



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 9973

To link to this article : DOI:10.1016/j.mycmed.2011.12.077
URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.12.077>

To cite this version : Aouiche, Adel and Sabaou, Nasserline and Meklat, Atika and Zitouni, Abdelghani and Mathieu, Florence and Lebrihi, Ahmed. *Activité antimicrobienne de Streptomyces sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques*. (2012) *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, vol. 22 (n° 1). pp. 42-51. ISSN 1156-5233

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques

Antimicrobial activity of a Saharan Streptomyces spp. PAL111 strain against various clinical and toxigenic microorganisms resistant to antibiotics

A. Aouiche^a, N. Sabaou^{a,*}, A. Meklat^a, A. Zitouni^a,
F. Mathieu^b, A. Lebrihi^{b,c}

^a Laboratoire de biologie des systèmes microbiens, laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse, école normale supérieure de Kouba, BP 92, 16050 Kouba, Alger, Algérie

^b Laboratoire de génie chimique, UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), ENSAT/INP de Toulouse, université de Toulouse, 1, avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan cedex, France

^c Université Moulay-Ismaïl, Marjane 2, BP 298, Meknes, Maroc

MOTS CLÉS

Streptomyces ;
Taxonomie ;
Activité antimicrobienne ;
Microorganismes
pathogènes ;
Concentrations
minimales
inhibitrices (CMI)

Résumé

Objectif. – Étude de la taxonomie et de l'activité de l'isolat d'actinomycète PAL111 contre divers microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme et multirésistants aux antibiotiques.

Matériel et méthodes. – L'étude taxonomique de l'isolat PAL111 est réalisée sur la base de critères phénotypiques et moléculaires. Les tests contre les microorganismes pathogènes sont effectués sur les milieux ISP-2 et Bennett. Les cinétiques de production de l'antibiotique sont réalisées sur milieu ISP-2. L'antibiotique est mis en évidence par bioautographie et par révélation chimique, puis purifié par chromatographie sur couche épaisse de gel de silice et sur colonne de Séphadex LH20. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées contre les germes pathogènes.

Résultats. – Sur la base des caractéristiques phénotypiques et moléculaires, l'isolat PAL111 est rapproché de l'espèce *Streptomyces ambofaciens*. Il présente une forte activité contre *Candida*

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : nsabaou@yahoo.fr (N. Sabaou).

albicans, les champignons filamenteux et les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'activité optimale est obtenue en fin de phase exponentielle de croissance et début de phase de déclin. Les bioautographies ont montré la présence d'un antibiotique à activité antibactérienne et antifongique. Cet antibiotique est hydrophile et de nature osidique et aminé. Les CMI obtenues se situent entre 2 et 20 µg/mL pour les levures, 10 et 50 µg/mL pour les champignons filamenteux, 2 et 10 µg/mL pour les bactéries à Gram positif et 20 et 75 µg/mL pour les bactéries à Gram négatif.

Conclusion. — L'activité intéressante de PAL111 contre les germes pathogènes et la nature hydrophile de l'antibiotique qu'il sécrète incite à la poursuite des études sur cette molécule bioactive.

KEYWORDS

Streptomyces;
Taxonomy;
Antimicrobial activity;
Pathogenic
microorganisms;
Minimum inhibitory
concentrations (MIC)

Summary

Objective. — Study of the taxonomy and the biological activity of the actinomycete strain PAL111 against several pathogenic and toxigenic microorganisms for humans, and resistant to many antibiotics.

Materials and methods. — The taxonomic study of isolate PAL111 is carried out on the basis of phenotypic and molecular characteristics. The tests against the pathogenic microorganisms are realized on ISP-2 and Bennett media. The kinetics of antibiotic production was investigated on ISP-2 medium. The antibiotic is highlighted by bioautography and chemical revelations, and then purified by chromatography on thick layer of silica gel and Sephadex LH20 column. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined against pathogenic microorganisms.

Results. — The phenotypic and molecular studies showed that the isolate PAL111 is closely related to the type strain of *Streptomyces ambofaciens*. It showed a strong activity against *Candida albicans*, filamentous fungi, and Gram-positive and Gram-negative bacteria. The optimal antibiotic production was observed at the end of the exponential phase of growth and at the beginning of the decline phase. The bioautography tests showed the presence of an antibiotic with both antibacterial and antifungal activities. This antibiotic is a hydrophilic aminoglycoside compound. The MIC were observed between 2 and 20 µg/mL for yeasts, 10 and 50 µg/mL for filamentous fungi, 2 and 10 µg/mL for Gram-positive bacteria, and 20 and 75 µg/mL for Gram-negative bacteria.

Conclusion. — The strong activity of isolate PAL111 against the pathogenic microorganisms and the polar characteristic of the produced antibiotic could encourage further studies on this bioactive molecule.

Introduction

Les champignons et les levures causent de graves pathologies atteignant l'homme, parmi lesquelles on peut citer les myco-toxicoses (genres *Aspergillus*, *Fusarium*), les mycoallergies (genres *Penicillium*, *Mucor*) et les mycoses superficielles ou profondes (*Candida albicans*, *Microsporium*, *Trichophyton*) [9]. Les mycoses ont augmenté de manière drastique au cours de la dernière décennie et se classent au quatrième rang des infections nosocomiales [1]. Plusieurs travaux dans le monde et en Algérie ont, par ailleurs, signalé l'apparition de nouvelles souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés dont certains sont des céphalosporines de troisième et quatrième générations [25,30,34]. Récemment, un nouveau gène dénommé New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM-1) a été découvert chez plusieurs entérobactéries leur permettant de synthétiser une enzyme inactivant la plupart des antibiotiques présents dans le marché, provoquant ainsi un véritable danger sanitaire et une éventuelle impasse thérapeutique [20].

Devant les insuffisances encore perceptibles constatées lors des traitements des mycoses, la recrudescence des maladies bactériennes et la résistance de plus en plus rapide des microorganismes aux antibiotiques, les travaux actuels sont

orientés en partie vers la recherche de nouvelles molécules bioactives efficaces. Parmi les molécules à activité antimicrobienne, la gamme des antifongiques est beaucoup plus restreinte que celles des antibactériens [8]. Les molécules antifongiques disponibles à l'heure actuelle en thérapeutique ne réunissent pas les critères définissant l'antibiotique idéal : toxicité spécifique vis-à-vis de l'agent pathogène, bonne diffusion dans l'organisme, large spectre d'activité in vivo, absence de problèmes liés à l'apparition de souches résistantes et absence d'effets secondaires [21]. C'est pourquoi de nouveaux antifongiques non toxiques doivent être recherchés.

Les actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif, sont particulièrement très intéressants par leur grande capacité à produire des métabolites secondaires avec des structures chimiques diversifiées [35]. Ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques antibactériens et antifongiques avec près de 70 % des molécules actives commercialisées à leur actif [31]. Le genre *Streptomyces* est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques, soit 80 % des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes [7].

Nos travaux précédents ont montré la richesse des sols sahariens d'Algérie en actinomycètes producteurs d'antibiotiques [28]. Le présent travail a pour objectif d'étudier

l'activité antifongique et antibactérienne d'une souche d'actinomycète d'origine saharienne contre plusieurs microorganismes multirésistants aux antibiotiques et pathogènes ou toxigènes pour l'homme, dont certains sont responsables d'infections nosocomiales assez sévères.

Matériel et méthodes

Isolement de la souche d'actinomycète

Une souche d'actinomycète, désignée PAL111, a été isolée d'un échantillon de sol saharien de la région de Ghardaïa (centre de l'Algérie ; latitude, 32°24'N ; longitude, 03°48'E ; altitude, 468 m). L'isolement a été effectué par suspensions-dilutions et étalement sur milieu chitine-vitamines agar [15] coulé en boîtes de Pétri et additionné de cycloheximide

(80 mg/L) pour inhiber la croissance des champignons. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant deux semaines.

Caractéristiques des microorganismes-cibles

Les microorganismes-cibles sont pour la plupart pathogènes ou toxigènes pour l'homme et multirésistants aux antibiotiques (Tableaux 1 et 2). Ils comprennent des levures (*C. albicans* C2, C3, et IPA200 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226) et des champignons filamenteux (*Aspergillus carbonarius* M333, *Aspergillus flavus* AF3, *Fusarium culmorum* FC200, *Fusarium graminearum* FG3 et *Penicillium glabrum* PG1), ainsi que des bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* S1) et à Gram négatif (*Enterobacter cloacae* E13, *Escherichia coli* E195, *Klebsiella pneumoniae* E40, *Salmonella enterica* E32 et *Pseudomonas aeruginosa* IPA1).

Tableau 1 Profil de résistance des champignons-cibles aux antibiotiques antifongiques.
Resistance pattern of target fungi to antifungal antibiotics.

Levures et champignons filamenteux	Résistance à	Sensibilité à
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	N, I, Th, T	C, A
<i>Candida albicans</i> C2	N, I, Th, T, C	A
<i>C. albicans</i> C3	N, I, Th, T, C	A
<i>C. albicans</i> IPA200	N, I, Th, T, C	A
<i>Penicillium glabrum</i> PG1	C	N, I, Th, T, A
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	C, N	I, Th, T, A
<i>A. flavus</i> AF3	C	N, I, Th, T, A
<i>Fusarium culmorum</i> FC200	C, N, T, I, A	Th
<i>F. graminearum</i> FG3	C, N, T	I, Th, A

A : amphotéricine B ; C : cycloheximide ; I : itraconazole ; N : nystatine ; T : thioconazole ; Th : terbinafine.

Tableau 2 Profil de résistance des bactéries-cibles aux antibiotiques antibactériens.
Resistance pattern of target bacteria to antibacterial antibiotics.

Bactéries-cibles	Résistance à	Sensibilité à
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	NEO	C, CAR, CHL, ERY, GEN, K, RIF, SPI, SSS, VAN
<i>Staphylococcus aureus</i> S1	CAR, GEN, K, NEO, OLE, SPI, VAN	C, CHL
<i>Enterobacter cloacae</i> E13	AMC, ATM, CFP, CTX, FEP, FOX, GEN, PIP, TCC, TIC, TOB, TZP	C, CXC
<i>Escherichia coli</i> E195	AMC, AMX, CAZ, CF, CTX, CXM, FOX, TCC, TIC	C, CXC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E40	AMX, CAZ, CFP, CTX, FEP, GEN, PIP, TIC, TOB	AMC, ATM, C, CXC, TCC
<i>Salmonella enterica</i> E32	ATM, CAZ, CFP, CTX, FEP, GEN, PIP, TIC, TOB	C, CXC, FOX, TCC, TZP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPA1	CAR, ERY, GEN, NEO, SPI, SSS	C, CHL, K, RIF

AMX : amoxicilline ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; ATM : aztréonam ; C : chloramphénicol ; CAR : carbénicilline ; CAZ : ceftazidime ; CF : cefalotine ; CFP : cefpirome ; CHL : chlortétracycline ; CTX : céfotaxime ; CXC : céfotaxime + acide clavulanique ; CXM : céfuroxime ; ERY : érythromycine ; FEP : céfépime ; FOX : céfoxitine ; GEN : gentamicine ; K : kanamycine ; NEO : néomycine ; OLE : oléandomycine ; PIP : pipéracilline ; RIF : rifampicine ; SPI : spiramycine ; SSS : sulfamide ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; TOB : tobramycine ; TZP : pipéracilline + tazobactam ; VAN : vancomycine.

Certains microorganismes-cibles (les trois souches de *C. albicans* et toutes les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, à l'exception de *B. subtilis*) ont été isolés à partir de patients malades au niveau des hôpitaux d'Alger et de Bejaia (Algérie) et sont responsables d'infections nosocomiales assez sévères. Ils sont en plus multirésistants aux antibiotiques, y compris parfois vis-à-vis des céphalosporines de troisième et quatrième générations pour les bactéries et vis-à-vis de la nystatine et d'autres antifongiques pour les souches de *C. albicans* (qui présentent, entre elles, le même profil de résistance). Les souches de champignons toxogènes présentent une résistance variée aux antifongiques, les plus résistantes étant *F. culmorum* et, à un degré moindre, *F. graminearum*.

Identification de la souche d'actinomycète

Caractéristiques morphologiques et chimiques

La détermination du genre de l'isolat PAL111 est effectuée sur la base des caractéristiques morphologiques et de l'analyse chimique des constituants cellulaires.

Les caractéristiques culturales et micromorphologiques sont notées après 14 jours d'incubation à 30 °C, sur les milieux International *Streptomyces* Project (ISP) : ISP-2 (extrait de levure-extrait de malt-glucose agar), ISP-3 (farine d'avoine agar), ISP-4 (amidon-sels minéraux agar) et ISP-5 (glycérol-asparagine agar) [23]. Les caractéristiques micromorphologiques sont observées au microscope optique aux grossissements (10 × 10) et (10 × 40).

Pour l'analyse chimiotaxonomique, la biomasse est obtenue à partir d'une culture poussant en milieu ISP-2 liquide [23], en agitation permanente (250 rpm) à 30 °C pendant quatre jours. La forme isomérique de l'acide diaminopimélique (LL ou DL), la présence ou non de la glycine, la composition en sucres et celle en phospholipides cellulaires sont déterminées par les méthodes rapportées par Goodfellow et Minnikin [13].

Caractéristiques physiologiques

Les caractéristiques physiologiques sont évaluées selon les méthodes de Locci [23]. Elles concernent la production de pigments mélanoides, l'assimilation des glucides et dérivés comme seules sources de carbone, la dégradation de l'amidon et de la xanthine, l'assimilation des acides aminés comme seules sources d'azote, la réduction des nitrates, la résistance au phénol (0,1 %), à l'azide de sodium (0,01 %), au chlorure de sodium (4, 7, 10 et 13 %), à la rifampicine (50 µg/mL) et à la pénicilline G (10 UI) et la croissance à 45 °C.

Caractéristiques moléculaires et analyses phylogénétiques

L'extraction de l'ADN est réalisée selon la méthode de Liu et al. [22]. L'isolat PAL111 est cultivé sur milieu ISP-2 liquide (Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu) en agitation (250 rpm) à 30 °C pendant quatre jours. L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S est réalisée par Polymerase Chain Reaction (PCR) avec un kit Invitrogen, en utilisant deux amorces universelles : 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') [5]. Le mélange réactionnel contient, pour un volume final de 50 µL : tampon PCR 1 × (Tris-HCl 10 mM ; KCl 50 mM ; pH

9,0 à 25 °C), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 1 µM de chaque amorce, 1,25 U de Taq polymérase et 1 µl (500 ng) d'extrait d'ADN pur. L'amplification du gène codant pour l'ARN 16S est réalisée dans un thermocycleur « Stratagene RoboCycler Gradient 96 » selon le profil suivant : une étape initiale de dénaturation à 98 °C pendant trois minutes, suivie de 30 cycles d'amplification à 94 °C pendant une minute, 52 °C pendant une minute et 72 °C pendant deux minutes. À la fin des cycles, une étape finale consiste à maintenir le mélange réactionnel à 72 °C pendant dix minutes, lequel est ensuite refroidi à 4 °C. Les amplifiants obtenus sont détectés par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisés sous ultraviolet (UV) après ajout de bromure d'éthidium.

Le gène amplifié a été séquencé par la compagnie MilleGen (Toulouse, France) en utilisant un séquenceur automatique et le même couple d'amorces que pour la PCR. La séquence déterminée du gène codant pour l'ARN 16S est comparée aux séquences homologues d'espèces microbiennes de référence répertoriées dans les banques génomiques, grâce au « BLAST NCBI » disponible sur le site Internet : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

L'analyse phylogénétique est réalisée en utilisant un logiciel inclus dans MEGA version 3.0 [19]. La séquence du gène codant pour l'ARN 16S de l'isolat PAL111 est alignée grâce au programme CLUSTAL W [33] avec les séquences homologues les plus proches des souches d'actinomycètes retrouvées dans les banques génomiques. Le calcul des matrices des distances d'évolution est réalisé par la méthode de Jukes et Cantor [16] et la construction de la topologie de l'arbre phylogénétique est faite par l'algorithme du « neighbor-joining » [29]. La validation statistique des liens phylogénétiques établis est effectuée par le test du Bootstrap dont les valeurs sont basées sur le résultat de 1000 analyses [12].

Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'isolat PAL111 est évaluée sur le milieu solide ISP-2 par la technique des stries croisées contre les microorganismes-cibles listés dans les Tableaux 1 et 2. Une öse remplie de spores de l'isolat PAL111, arrivé à maturité après dix jours de culture sur milieu ISP-2, est ensemencée en un seul trait sur le même milieu, en bordure de boîte de Pétri. Après dix jours de croissance de l'actinomycète à 30 °C, les microorganismes-cibles sont ensemencés en traits perpendiculaires à la culture de l'isolat PAL111. L'activité antimicrobienne est évaluée en mesurant la longueur de la zone d'inhibition entre les bordures de la colonie de l'actinomycète et celles des microorganismes-cibles, après 24 heures pour les bactéries et les levures et 36 heures pour les champignons.

Cinétique de croissance et d'activité antimicrobienne

La cinétique de l'activité antimicrobienne de l'isolat PAL111 est réalisée en milieu ISP-2 liquide. Une préculture est préparée sur ce même milieu de la manière suivante : une öse remplie de spores de l'isolat PAL111, âgé de dix jours et poussant sur milieu ISP-2, est ensemencée dans un Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu ISP-2 liquide. Après quatre jours d'incubation dans un shaker (30 °C, 250 rpm),

3 mL de la préculture (soit $1 \pm 0,1$ mg de mycélium humide) sont ensemencés dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu ISP-2. Les cultures sont incubées à 30 °C et agitées à 250 rpm pendant 12 jours. L'évolution de l'activité antimicrobienne est déterminée suivie quotidiennement durant ces 12 jours par la méthode de diffusion des puits (150 µL de filtrat de culture par puits de 10 mm de diamètre) contre *C. albicans* IPA200, *A. carbonarius* M333, *K. pneumoniae* E40 et *B. subtilis* ATCC 6633. L'évolution du pH et du poids sec du mycélium est évaluée durant ce temps selon la méthode de Pfefferle et al. [27].

Extraction du composé actif, bioautographies et révélations chimiques

Après une culture agitée (250 rpm, 30 °C) sur milieu ISP-2, d'une durée correspondant au jour optimal de production (déterminée lors des cinétiques), le filtrat de culture est récupéré par centrifugation. Quatre solvants organiques de polarités différentes (*N*-hexane, dichlorométhane, *N*-butanol et acétate d'éthyle) sont testés pour l'extraction du composé actif. Un volume de filtrat de culture est extrait par un volume égal de chacun des solvants. Les extraits organiques et les phases aqueuses restantes sont concentrés à sec, puis récupérés respectivement dans 0,5 mL de méthanol ou 0,5 mL d'eau distillée pour tester leur activité par la méthode des disques de papier (disques de 6 mm de diamètre) contre *C. albicans* IPA200, *A. carbonarius* M333, *K. pneumoniae* E40 et *B. subtilis* ATCC 6633.

Des chromatographies sont réalisées en utilisant des plaques de gel de silice (Merck Art. 5735, Kiesselgel 60HF 254–366) pour détecter le composé actif et le discerner des impuretés présentes. La phase active est reprise dans 0,5 mL de solvant (eau ou méthanol en fonction des résultats obtenus précédemment), puis déposée sur les plaques à l'aide d'une microseringue. Les plaques sont développées dans le système de solvants éthanol-ammoniac-eau (8-1-1, v/v/v). Après migration, les composés séparés sont visualisés sous UV à 254 nm (absorbance) et à 365 nm (fluorescence) et la zone active est détectée par révélation microbiologique ou bioautographie [3]. Pour cela, les plaques sont mises dans des boîtes en polyéthylène (23 × 23 × 2,2 cm, Fisher Scientific Labosi), puis le dispositif est stérilisé sous UV à 254 nm durant 45 minutes. Cinquante millilitres de milieu ISP-2 (à 7 g/L d'agar) préalablement ensemencé avec le germe-cible (*C. albicans* IPA200, *A. carbonarius* M333, *K. pneumoniae* E40 ou *B. subtilis* ATCC 6633) est réparti uniformément sur la plaque de gel de silice, laquelle est incubée à 30 °C. La zone d'inhibition est alors observée et le rapport frontal (Rf) de l'antibiotique est déterminé.

Une révélation chimique du composé actif est réalisée parallèlement aux bioautographies sur des chromatogrammes développés dans les mêmes conditions. Les révélateurs utilisés [24] sont les suivants : la ninhydrine, le naphtoré-sorcinol-H₂SO₄, le chlorure de fer ferrique et le formaldéhyde-H₂SO₄.

Purification du composé actif

L'antibiotique est produit en milieu ISP-2 liquide de la même manière que pour les cinétiques. Un total de 1600 mL de culture est réalisé. L'antibiotique, contenu dans le filtrat

de culture, subit plusieurs étapes de purification. La première consiste en une extraction du filtrat par du *N*-butanol. La phase aqueuse (contenant l'antibiotique non extrait par le *N*-butanol) est concentrée sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. La deuxième étape est une semi-purification de l'antibiotique sur plaques épaisses de gel de silice 60HF. Le dépôt de l'extrait se fait par bandes concentrées. Après développement des plaques dans le système de solvants éthanol-ammoniac-eau (8-1-1, v/v/v), la silice contenant la bande active contre les germes pathogènes est récupérée et éluee dans de l'eau. Elle est ensuite éliminée par filtration sur verre fritté n° 4 et le filtrat contenant l'antibiotique semi-pur est concentré sous vide à l'évaporateur rotatif. La troisième étape consiste en la poursuite de la purification sur colonne de Séphadex LH20 de 37,2 cm de hauteur du gel et 1,90 cm de diamètre. L'éluant est un mélange eau-méthanol (50 %/50 % v/v) et le débit est de 1,2 mL/min. Des fractions de 5 mL sont récupérées et testées contre *C. albicans* IPA200, *A. carbonarius* M333, *K. pneumoniae* E40 et *B. subtilis* ATCC 6633. Seules les fractions très actives (contenant l'antibiotique) sont récupérées et évaporées à sec.

Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'antibiotique purifié ont été effectuées en utilisant la méthode conventionnelle des dilutions en milieu gélosé coulé sur boîtes de Pétri [26], sur le milieu Mueller Hinton pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour les champignons filamenteux et les levures, ainsi que sur le milieu gélose nutritive pour l'ensemble des microorganismes-cibles cités dans les Tableaux 1 et 2. L'antibiotique est ajouté au milieu de telle sorte que les concentrations finales soient de 1, 2, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75 et 100 µg/mL. Un contrôle sans antibiotique est réalisé dans les mêmes conditions. Les différents germes-cibles (levures, champignons filamenteux et bactéries) sont ensemencés par point en déposant 1 µL de la suspension cellulaire levurienne ou bactérienne ou encore de spores fongiques, à la surface du milieu, de telle sorte que l'inoculum (précédemment calibré) soit de 10⁵ cellules ou spores. Deux essais sont réalisés par souche. La lecture est effectuée après 24 à 36 heures d'incubation à 30 °C pour les bactéries et les levures et après 36 à 72 heures d'incubation pour les champignons filamenteux. Elle consiste à évaluer la croissance des microorganismes et à déterminer, ainsi, la concentration minimale qui les inhibe totalement.

Résultats et discussion

Taxonomie de l'isolat d'actinomycète PAL111

L'isolat PAL111 croît très bien sur tous les milieux de culture utilisés. Il possède un mycélium du substrat non fragmenté, surmonté par un mycélium aérien produisant des chaînes de spores non mobiles et portées par des sporophores. Le mycélium aérien est gris sur ISP-4 et ISP-5, gris verdâtre sur ISP-3 et blanc grisâtre sur ISP-2. Le mycélium du substrat est brun pâle. Aucun pigment diffusible n'est sécrété. La sporulation est très bonne sur ISP-4 et ISP-5 et faible sur

ISP-2 et ISP-3. Les chaînes de spores sont spiralées (dix à 30 spores/chaîne et deux à quatre tours/spire).

L'isolat PAL111 contient dans sa paroi cellulaire l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et de la glycine. Les sucres présents dans l'hydrolysate cellulaire sont le galactose, le glucose et le ribose. La phosphatidyléthanolamine est le phospholipide membranaire taxonomiquement important. Ces caractéristiques morphologiques et chimiques permettent de rattacher l'isolat PAL111 au genre *Streptomyces* [23].

La séquence partielle du gène codant pour l'ARN 16S (1464 pb) est déterminée et déposée au niveau du GenBank sous le numéro d'accès JN225875. L'analyse de cette séquence a permis de rapprocher l'isolat PAL111 de l'espèce *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 avec un taux de similarité de 99,7 %. La position phylogénétique de cet isolat vis-à-vis des espèces les plus proches du genre *Streptomyces* est représentée sur la Fig. 1. Le Tableau 3 montre une comparaison de la physiologie de l'isolat PAL111 avec celle de *S. ambofaciens* [23]. Cette comparaison montre trois différences concernant la réduction des nitrates, la croissance sur milieu contenant 7 % (w/v) de NaCl et la résistance à la pénicilline G (10 UI) (tests positifs pour l'isolat PAL111, contrairement à *S. ambofaciens*). Cette dernière est surtout réputée pour la production de la spiramycine, puissant antibiotique antibactérien de la famille des macrolides [2].]

Activité antimicrobienne de l'isolat PAL111

L'activité antimicrobienne de l'isolat PAL111 contre les microorganismes-cibles est donnée dans le Tableau 4. Cet isolat a montré une forte activité contre la plupart des champignons filamenteux toxigènes et une activité moyenne à forte contre les trois souches de *C. albicans* et contre *S. cerevisiae*. En plus de cette action antifongique, l'isolat PAL111 est fortement antagoniste contre la majorité des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.

Des isolats de *Streptomyces* à large spectre d'action (antibactérien et antifongique) sont souvent décrits dans la littérature [11,32,35,36]. Certains sont même actifs contre des champignons pathogènes pour l'homme et multi-résistants aux antibiotiques [18] ou encore contre des larves d'insectes [37]. En Algérie, plusieurs souches de *Streptomyces* isolées à partir de sols, d'eau et d'écorces d'arbres ont montré des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes contre divers microorganismes pathogènes [4,17]. *S. ambofaciens*, espèce la plus proche phylogénétiquement de notre isolat, possède uniquement une activité antibactérienne (pas d'action contre *Candida* et *Aspergillus*) [23], ce qui la différencie encore plus de PAL111.

Il est intéressant de noter l'absence de corrélation (d'une manière générale) entre la résistance des microorganismes-cibles aux antibiotiques et leur sensibilité à l'action de l'isolat PAL111. Cela suggère que l'isolat d'actinomycète sécrète des antibiotiques différents de ceux auxquels les germes-cibles sont résistants.

Cinétique de croissance et d'activités antimicrobiennes

Les cinétiques des activités antimicrobiennes et de l'évolution du pH et du poids sec, réalisées sur milieu ISP-2, sont représentées sur la Fig. 2. Les activités débutent entre le milieu et la fin de la phase exponentielle (troisième jour pour *A. carbonarius* M333, *C. albicans* IPA200 et *B. subtilis* ATCC 6633, et quatrième jour pour *K. pneumoniae* E40). Les activités deviennent maximales dès le cinquième ou le sixième jour, c'est-à-dire, à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase de déclin et restent persistantes jusqu'à la fin de l'incubation. Cela indique que ces activités sont dues à des métabolites secondaires. Durant l'incubation, le pH (initialement de 7,2), diminue à 5,9 (troisième jour) avant d'augmenter à 8,3.

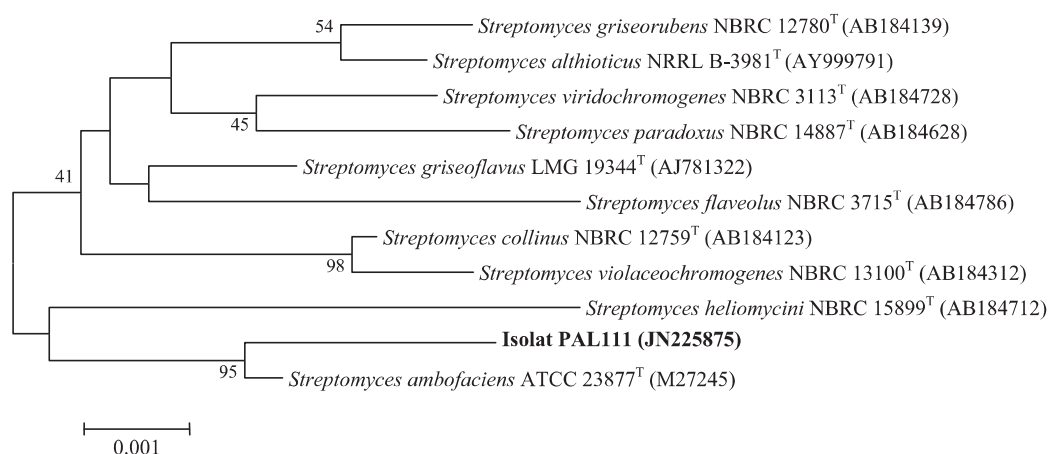


Figure 1 Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre l'isolat PAL111 et les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. La barre représente une substitution pour 1000 nucléotides. Les valeurs du Bootstrap (supérieures à 40 %) basées sur 1000 analyses sont indiquées au niveau des nœuds de l'arbre.

Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships among isolate PAL111 and the most close type strain species of *Streptomyces*.

Tableau 3 Caractéristiques physiologiques de l'isolat PAL111 en comparaison avec celles de *Streptomyces ambofaciens*.

Physiological characteristics of the isolate PAL111 in comparison with those of Streptomyces ambofaciens.

	Isolat PAL111	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ^a
Utilisation comme seule source de carbone		
Arabinose	+	+
Fructose	+	+
Inositol	+	+
Galactose	+	+
Mannitol	+	+
Mélibiose	—	v
Raffinose	—	—
Rhamnose	+	+
Salicine	+	ND
Saccharose	+	+
Xylose	+	+
Utilisation comme seule source d'azote		
Histidine	+	v
Phénylalanine	+	+
Proline	+	ND
Dégradation de		
Amidon	+	+
Xanthine	+	v
Réduction des nitrates	+	—
Croissance en présence de NaCl (w/v)		
4 %	+	+
7 %	+	—
10 %	+	—
13 %	—	—
Résistance à		
Azide de sodium (0,01 %)	—	v
Phénol (0,1 %)	+	+
Pénicilline G (10 UI)	+	—
Rifampicine (50 µg/mL)	+	+
Croissance à 45 °C	+	v

Tests : + : positif ; — : négatif ; v : variable suivant les souches ; ND : non déterminé.

^a Données de Locci [23] et Nonomura [27].

Extraction du composé actif, bioautographies et révélations chimiques

Aucun des solvants organiques (à polarité croissante) utilisés (*N*-hexane, dichlorométhane, *N*-butanol et acétate d'éthyle) n'a extrait l'antibiotique (aucune activité contre *A. carbonarius* M333, *C. albicans* IPA200, *K. pneumoniae* E40 et *B. subtilis* ATCC 6633). En revanche, l'activité est retrouvée au niveau des phases aqueuses (extraites précédemment par chacun des quatre solvants). Les diamètres d'inhibition (diamètre du disque de 6 mm compris) sont de 21 mm (*A. carbonarius*), 18 mm (*C. albicans*), 16 mm (*K. pneumoniae*) et 24 mm (*B. subtilis*). Cela montre donc

Tableau 4 Activité antimicrobienne de l'isolat PAL111 sur milieu ISP-2.

Antimicrobial activity of the isolate PAL111 on ISP-2 medium.

Microorganismes-cibles	Activité (en mm)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	26
<i>Candida albicans</i> C2	7
<i>C. albicans</i> C3	13
<i>C. albicans</i> IPA200	11
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	21
<i>A. flavus</i> AF3	10
<i>Fusarium culmorum</i> FC200	26
<i>F. graminearum</i> FG3	17
<i>Penicillium glabrum</i> PG1	17
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	31
<i>Staphylococcus aureus</i> S1	18
<i>Enterobacter cloacae</i> E13	10
<i>Escherichia coli</i> E195	23
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E40	18
<i>Salmonella enterica</i> E32	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPA1	3

que le composé actif sécrété par la souche PAL111 est très hydrophile et non extractible par des solvants peu ou moyennement polaires.

Sur les plaques de chromatographie de gel de silice (système de solvants : éthanol-ammoniac-eau, 8-1-1 v/v/v), la phase aqueuse a migré en révélant une seule zone active, notée 111A (Rf = 0,40) ayant une action à la fois contre *C. albicans* IPA200, *A. carbonarius* M333, *K. pneumoniae* E40 et *B. subtilis* ATCC 6633.

Parallèlement aux bioautographies, des plaques similaires de CCM ont fait l'objet de révélations chimiques. Le produit 111A réagit positivement avec le naphthorésorcinol-H₂SO₄ (révélateur des glucides, en rose), la ninhydrine (révélateur des amines, en violet) et le FeCl₃ (révélateur des acides hydroxamiques, en rose) et négativement avec la formaldéhyde-H₂SO₄ (révélateur des aromatiques polycycliques). Cela suppose que ce produit est glycosylé et aminé et contient des acides hydroxamiques dans sa structure.

Les actinomycètes, dont le genre *Streptomyces*, sont connus pour sécréter de nombreux antibiotiques très diversifiés par leur activité (antibactérienne, antifongique, antivirale, etc.) et leur structure chimique (aminosides, aromatiques, polyènes, antibiotiques nucléosidiques, etc.) [2,6]. Les antibiotiques nucléosidiques sont généralement hydrophiles et souvent révélés chimiquement par les révélateurs des glucides, des acides aminés et des acides hydroxamiques (formule générale : R-CO-NH-OH pour ces derniers composés) en raison de la présence de bases azotés et de sucres aminés dans leur structure ; ils peuvent avoir également une activité à la fois antifongique et antibactérienne [2,9,38]. Ces caractéristiques sont aussi celles de l'antibiotique 111A qui pourrait être de nature nucléosidique. Cet antibiotique ne peut en aucun cas être de nature polyénique, sachant que les polyènes sont bien extraits par le *N*-butanol et très peu solubles dans l'eau (contrairement à 111A). Ce résultat est intéressant car les molécules polyéniques sont indésirables dans les programmes de recherche de nouvelles molécules antifongiques en raison des problèmes liés à leur

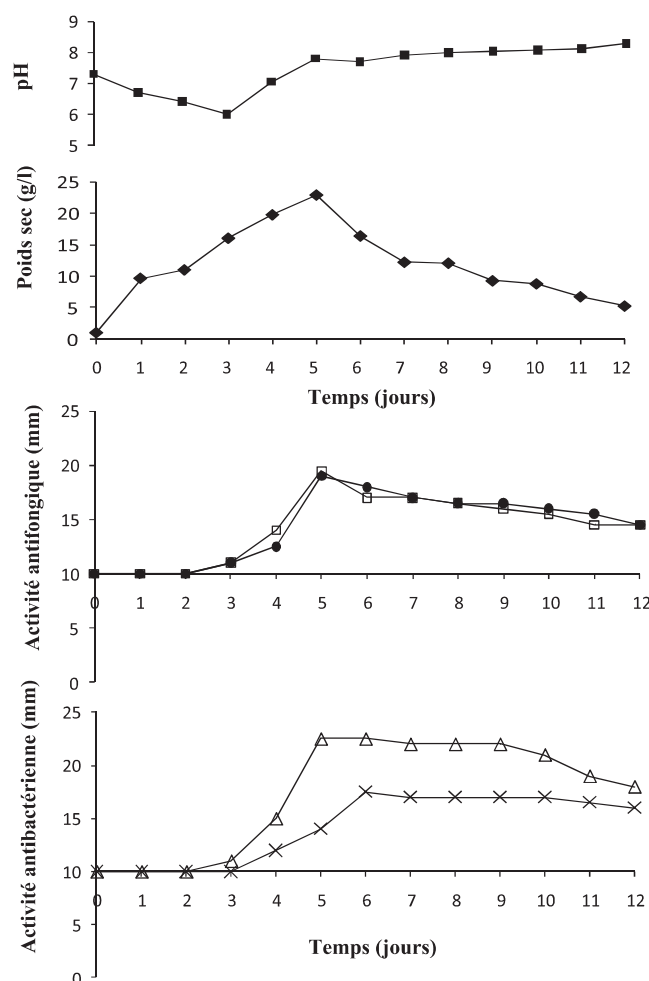


Figure 2 Cinétiques de l'évolution du pH, de la croissance et des activités antimicrobiennes dans le milieu ISP-2, contre *Candida albicans* IPA200 (cercle rempli), *Aspergillus carbonarius* M333 (carré vide), *Klebsiella pneumoniae* E40 (croix) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (triangle vide). La croissance est mesurée par l'évolution du poids sec selon la méthode de Pfefferle et al. [27]. L'activité est suivie par la méthode des puits, dont le diamètre (10 mm) est compris dans les mesures.

Kinetics of pH, growth and antimicrobial activities in ISP-2 medium, against Candida albicans IPA200 (filled circle), *Aspergillus carbonarius* M333 (open square), *Klebsiella pneumoniae* E40 (cross) and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (open triangle).

toxicité, à leur instabilité et à leur mauvaise solubilité dans l'eau [10,14]. Des études spectroscopiques ultérieures (masse, RMN du proton et du carbone 13) permettront d'élucider la structure de l'antibiotique de la souche PAL111.

Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les CMI du composé 111A (purifié sur plaques épaisses de gel de silice et sur colonne de Séphadex LH20) vis-à-vis des microorganismes pathogènes sont données dans le Tableau 5. Les CMI obtenues sont les mêmes sur les milieux Mueller Hinton et gélose nutritive pour les bactéries et sur les milieux Sabouraud et gélose nutritive pour les champignons filamenteux et les levures. Elles se situent entre 2 et 20 µg/mL pour les levures, 10 et 50 µg/mL pour les champignons filamenteux, 2 et 10 µg/mL pour les bactéries à Gram positif et 20 et 75 µg/mL pour les bactéries à Gram négatif. Les plus sensibles sont *B. subtilis* et *S. cerevisiae* (2 µg/mL). Les trois souches de *C. albicans* sont

moyennement sensibles (CMI entre 10 et 20 µg/mL), de même que les champignons filamenteux *A. carbonarius*, *F. culmorum*, *F. graminearum* et *P. glabrum* (CMI entre 10 et 15 µg/mL). Les microorganismes les plus résistants sont *A. flavus* et *P. aeruginosa* (CMI égales à 50 et 75 µg/mL respectivement).

Ces résultats sont intéressants au vu de la résistance des microorganismes-cibles utilisés dans le présent travail, tels que les souches de *C. albicans*, résistantes à tous les antifongiques utilisés (excepté l'amphotéricine B) et le champignon toxigène *F. culmorum*, résistant même à l'amphotéricine B. Il en est de même pour les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (parfois de troisième et quatrième générations), telles que les entérobactéries testées et *S. aureus*. Dans tous les cas et comme nous l'avons déjà signalé précédemment, l'absence de corrélation entre l'activité de l'isolat PAL111 et la résistance des germes-cibles aux antibiotiques connus, suggère que l'antibiotique 111A sécrété par la souche d'actinomycète diffère de ceux auxquels ces germes sont résistants.

Tableau 5 Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'antibiotique sécrété par l'isolat PAL111 contre divers champignons et bactéries.

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the antibiotic secreted by the isolate PAL111 against several fungi and bacteria.

Microorganismes-cibles	CMI (µg/mL) ^a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	2
<i>Candida albicans</i> C2	20
<i>C. albicans</i> C3	15
<i>C. albicans</i> IPA200	10
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	10
<i>A. flavus</i> AF3	50
<i>Fusarium culmorum</i> FC200	10
<i>F. graminearum</i> FG3	15
<i>Penicillium glabrum</i> PG1	10
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2
<i>Staphylococcus aureus</i> S1	10
<i>Enterobacter cloacae</i> E13	30
<i>Escherichia coli</i> E195	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E40	20
<i>Salmonella enterica</i> E32	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPA1	75

^a Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) représentent la moyenne de quatre répétitions.

L'activité intéressante de l'isolat de *Streptomyces* PAL111 contre plusieurs souches de *C. albicans* et de champignons filamenteux toxigènes pour l'homme résistants à plusieurs antifongiques et contre des bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques, ainsi que la production d'un antibiotique hydrophile de nature non polyénique, incite donc à poursuivre les recherches sur cet isolat et sur le produit bioactif qu'il sécrète.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Beck-Sagué C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States 1980–1990. *J Infect Dis* 1993;167:1247–51.
- [2] Berdy J, Aaszalos A, Mc Nitt KL. CRC Handbook of antibiotic compounds. Microbial metabolites. Vol XIII. Parts 1, 2, 3. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 1987.
- [3] Betina V. Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J Chromatogr* 1973;78:41–51.
- [4] Boudemagh A, Kitouni M, Boughachiche F, Hamdiken H, Oulmi L, Reghioua S, et al. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south-east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Mycol Med* 2005;15:39–44.
- [5] Boudjella H, Bouti K, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *J Appl Microbiol* 2007;103:1364–5072.
- [6] Bycroft BW. Dictionnaire of antibiotics and related substances. London: Chapman and Hall; 1988.
- [7] Demain AL. From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33:486–95.
- [8] Di Domenico B. Novel antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:509–15.
- [9] Drouhet E. Antifungal agents. *Antibiot Chemother* 1978;25:253–88.
- [10] Drouhet E, Dupont B. Evolution of antifungal agents: past, present and future. *Rev Infect Dis* 1987;9:4–16.
- [11] Duraipandiyan V, Sasi AH, Islam VH, Valanarasu M, Ignacimuthu S. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J Mycol Med* 2010;20:15–20.
- [12] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–91.
- [13] Goodfellow M, Minnikin DE. Chemical methods in bacterial systematics. London: Academic Press; 1985.
- [14] Gupte M, Kulkarni P, Ganguli BN. Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58:46–57.
- [15] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamins agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 1987;65:501–9.
- [16] Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press; 1969. p. 21–132.
- [17] Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioua S, Boughachiche F, Zerizer H, et al. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Mycol Med* 2005;15:45–51.
- [18] Kumar S, Kannabiran K. Antifungal activity of *Streptomyces* VITSVK5 spp. against drug resistant *Aspergillus* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J Mycol Med* 2010;20:101–7.
- [19] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150–63.
- [20] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010;10:597–602.
- [21] Lacroix C, Dubach M, Feuilhade M. Les échinocandines : une nouvelle classe d'antifongiques. *Med Mal Infect* 2003;33:183–91.
- [22] Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:471.
- [23] Locci R. Streptomycetes and related genera. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1989. p. 2451–93.
- [24] Merck E. Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt; 1975.
- [25] Messai Y, Iabadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol Biol* 2008;56:319–25.
- [26] Oki T, Tenmyo O, Tomatsu K, Kamei H, Pradimicins A. B and C: new antifungal antibiotics II. *In vitro* and *In vivo* biological activities. *J Antibiot* 1990;30:334–6.
- [27] Pfefferle C, Theobald U, Gürtler H, Fiedler HP. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotechnol* 2000;80:135–42.
- [28] Sabaou N, Boudjella H, Bennadji A, Mostefaoui A, Zitouni A, Lamari L, et al. Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse* 1998;9:147–53.

- [29] Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–25.
- [30] Sekhsokh Y, Chadli M, El Hamzaoui SA. Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Med Mal Infect* 2008;38:324–7.
- [31] Solanki R, Kahanna M. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol* 2008;48:410–31.
- [32] Thakur D, Yadav D, Gogoi BK, Bora TC. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J Mycol Med* 2007;17:242–9.
- [33] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
- [34] Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, de Champs C. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:397–402.
- [35] Valanarasu M, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Mycol Med* 2008;18:147–53.
- [36] Valanarasu M, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J Mycol Med* 2009;19:22–8.
- [37] Valanarasu M, Kannan P, Ezhilvendan S, Ganesan G, Ignacimuthu S, Agastian P. Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Mycol Med* 2010;20:290–7.
- [38] Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, et al. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol* 2005;156:984–93.