



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**  
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**  
Génie de Procédés et Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**  
Mr Slim SMAOUI

**le :** 26 Mai 2010

**Titre :**  
Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes  
nouvellement isolés et identifiés

---

**JURY**

Pr. Néji GHARSALLAH	Président
Dr. Radhouane GDOURA	Rapporteur
Dr. Bertrand AIGLE	Rapporteur
Pr. Jean Luc PERNODET	Examineur

---

**Ecole doctorale :**  
Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**  
Laboratoire de Génie Chimique (LGC- Toulouse)

**Directeur(s) de Thèse :**  
Pr. Florence MATHIEU                      Directeur de Recherches au LGC  
Dr. Lotfi MELLOULI                        Directeur de thèse (Côté Tunisien)

**Rapporteurs :**  
Dr. Radhouane GDOURA              Rapporteur  
Dr. Bertrand AIGLE                        Rapporteur

République Tunisienne

\*\*\*\*\*

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Toulouse



Université de Sfax



Ecole Nationale Supérieure  
Agronomique de Toulouse



Ecole Doctorale Mécanique,  
Énergétique, Génie Civil  
et Procédés



Laboratoire de Génie  
Chimique



Faculté des Sciences de Sfax  
Département des Sciences de la Vie



Centre de Biotechnologie de Sfax  
Laboratoire de Microorganismes et de  
Biomolécules

---

# THÈSE

*Présentée à*

**La Faculté des Sciences de Sfax**

(Département des Sciences de la Vie)

*en vue de l'obtention du*

## DOCTORAT

**Dans la discipline : Sciences Biologiques**

*par*

### **Slim SMAOUI**

---

*Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes  
nouvellement isolés et identifiés*

---

Soutenue le 26 Mai 2010, devant le jury composé de:

Pr. Néji GHARSALLAH  
Dr. Radhouane GDOURA  
Dr. Bertrand AIGLE  
Pr. Jean Luc PERNODET  
Dr. Lotfi MELLOULI  
Pr. Florence MATHIEU

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Directeur de Recherches  
au LGC

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2009-2010**

# *Dédicace*

## **Je dédie ce travail à**

Mon père **Mohamed Néjib**, pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

Mon adorable mère **Raoudha**, qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ces enfants grandissent et prospèrent. Que dieu la protège et lui donne bonne santé et qu'elle trouve ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

Mes frères **Morsi** et **Becem** pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant, d'être coopératif et d'assumer à ma place certaine de mes responsabilités familiales.

Ma fiancée **Hajer** d'être toujours à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie par son amour et sa tendresse, j'espère qu'elle trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Ma **belle-famille** pour leur soutien, gentillesse et sympathie, pendant cette thèse parfois Envahissante, que dieu les protège et leurs donne une vie pleine de réussite et de bonheur.

# *Remerciements*

Le présent travail de thèse, qui entre dans le cadre d'un programme de recherche CMCU (thèse co-tutelle), a été réalisé dans le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) et au Laboratoire de Génie Chimique (LGC-ENSAT-Toulouse-France) sous la direction de Monsieur Lotfi MELLOULI (Directeur de thèse côté Tunisien) et Mme Florence MATHIEU (Directrice de thèse côté Français).

Avec une rigueur et un intérêt constant, Monsieur Lotfi MELLOULI Maître de Conférences au Centre de Biotechnologie de Sfax a dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques. Je tiens à lui exprimer ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'attention qu'il a porté à cette thèse, pour les encouragements, pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée, sa constante disponibilité et la gentillesse dont il a fait preuve à mon égard.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude au Pr. Florence MATHIEU, Directeur du LGC, pour avoir accepté d'être la directrice côté Français de cette thèse. Son enthousiasme et son dynamisme m'ont chaque fois permis de rebondir dans les moments difficiles. Je la remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et tous les conseils qu'il a pu me fournir.

Je remercie également Monsieur Samir BEJAR Chef du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du Centre de Biotechnologie de Sfax pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je profite de cette occasion d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Ahmed LEBRIHI, Professeur et Directeur de l'Ecole National Supérieur Agronomique de Toulouse pour les encouragements et les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer durant mes séjours au (LGC-ENSAT-Toulouse-France) et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée.

Que Messieurs : Bertrand AIGLE, Maitre de Conférences au Laboratoire de Génétique et de Microbiologie à la Faculté des Sciences et Technique de l'Université Henri Poincaré- Nancy. Radhouane GDOURA, Maitre de Conférences au Laboratoire de Microbiologie et Pathologie Humaine à l'Hôpital Habib Bourguiba, trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour avoir bien voulu être les rapporteurs de cette thèse malgré leurs nombreuses occupations et pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de participer au Jury de cette thèse. Par ailleurs, Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à Monsieur Néji GHARSALLAH Professeur au Laboratoire de Biotechnologie microbienne à la Faculté des Sciences de Sfax, de l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je remercie vivement Monsieur Jean Luc Pernodet, Directeur de recherche CNRS à l'Institut de Génétique et Microbiologie à l'Université Paris Sud11 qui me fait l'honneur, malgré ses importantes charges, d'accepter de juger mes travaux de thèse en tant qu'examineur. Je remercie Monsieur Yannick COPPEL, Ingénieur au Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse pour son aide précieuse et à sa disponibilité pour la réalisation des analyses spectroscopiques. Je remercie encore, Pr. Georges Merlina, Ingénieur de Recherches au Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle (EcoLab) à l'Ensat pour son aide et la réalisation des analyses des Acides gras.

Mes remerciements vont également à tous les membres du Centre de Biotechnologie de Sfax : étudiants, chercheurs, ingénieurs, techniciens, secrétaires... et en particulier les Ingénieurs et les techniciens du l'unité analyse du CBS et plus précisément (Mr Hedi Aouissaoui, Mme Najla Masmoudi et Mlle Lobna Jlaïel) pour leurs aides et les facilités analytiques qu'ils m'ont offertes.

Je suis également très redevable à tous les ami(e)s du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules, du Centre de Biotechnologie de Sfax qui n'ont jamais été en retrait pour apporter leur aide et en particulier: Belagacem, Ines, Monia et Kamel qui ont été toujours près de moi; je les remercie pour leurs soutien moral et matériel.

Hajer, Lobna, Ameny, Wacim, Mounira, Bassem Jaouadi, Bassem Khemakhem, et Samiha, je les remercie pour l'ambiance et l'amitié que j'ai trouvée auprès d'eux.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont également fait bénéficier de leurs conseils et de leurs expériences au sein du Laboratoire de Génie Chimique : Dr. Riadh Ben Hlima, Dr Walid TRABELSI, Mohammed Hussnin, Dr. Nafees, Dr. Ali, Dr. André, Patricia, Dr. Nouredine, Dr. Rafik, Dr. Abdelghani, Atika, Dr. Anne Claire, Dr. Caroline, Dr. Gwenaelle, pour lesquels je ne trouve pas les mots justes pour décrire ce que j'éprouve envers eux après ces années passées ensemble. J'ai beaucoup apprécié leurs qualités humaines et les échanges scientifiques et culturels que nous avons eus Grand MERCI à tous.

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ala	: Alanine
ARNr	: Acides Ribonucléiques Ribosomaux
Asn	: Asparagine
ATB	: Antibiotique
AWDA	: Agar Well Diffusion Assay
BHI	: Brain Heart Infusion
C	: Cytosine
CCE	: Chromatographie sur couche Epaisse
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
COSY	: Correlation Spectroscopy
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CTC	: Chlorotétracycline
d	: Doublet
DAP	: Acide Diaminopimélique
DCM	: Dichlrométhane
dd	: Doublet de doublet
DKP	: Dicétopipérazine
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	: Inonisation Electrospry

G	: Guanine
Gln	: Glutamine
GRAS	: Generally Recognized As Safe
H	: Constante de plank
h	: Heure
HCl	: Acide chlorhydrique
His	: Histidine
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	: Hertz
IE	: Ionisation Electronique
Ile	: Isoleucine
ISP	: International <i>Streptomyces</i> Project
J	: constante de couplage
kDa	: Kilodalton
LAB	: Bactéries Lactiques
LB	: Luria Bertani
LCMS	: Liquid chromatography-mass spectrometry
Leu	: Leucine
M	: molaire
m	: Multiplet



MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight mass spectrometry

MeOH : Méthanol

MHz : Megahertz

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

mM : millimolaire

MRS : Man, Rogosa and Sharpe

Mso : Sulfoximine de Méthionine

multi : Multiplicité

nm : nanomètre

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

Orn : Ornithine

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis

p-anisaldehyde : 4-méthoxy-benzaldehyde

PC : Phosphatidylcholine

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

PE : Phosphatidylethanolamine

PG : Phospholipides contenant de la Glucosamine

Phe : Phenylalanine

PMSF : Phenylmethanesulphonylfluoride

ppm : partie par million

Pro	: Proline
q	: Quadruplet
Rf	: Rapport frontal
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
s	: Singulet
SDS	: Sodium Dodecyl Sulphate
t	: Triplet
TC	: Tétracycline
TFA	: Trifluoroacetic acid
Thr	: Thréonine
TIR	: Terminal Inverted Repeats
TRH	: Thyrotropin-releasing hormon
Trp	: Tryptophane
trs/min	: Tours/min
TSB	: Tryptic Soy Broth
Tyr	: Tyrosine
UFC	: Unité Formant Colonies
UV	: Ultraviolet
Val	: Valine
$\delta$	: Déplacement chimique
$\lambda$	: longueur d'onde de la radiation
$\mu\text{m}$	: micromètre
$\Phi$	: Diamètre

## **INTRODUCTION GENERALE**

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie. En effet, ils sont doués de plusieurs activités importantes et peuvent être considérés comme étant des agents performants de transformation et certaines espèces permettent l'obtention de produits alimentaires fermentés stables à partir de matières premières d'origine naturelle. Les microorganismes sont également des agents de dégradation et leurs propriétés métaboliques et cinétiques peuvent être exploitées pour permettre l'hydrolyse, l'oxydation, la nitrification, la dénitrification, l'élimination des sulfates et des phosphates ainsi que la méthanisation des effluents polluants. De plus, les microorganismes sont de remarquables agents de production et on leur doit la production de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation et utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés. Parmi ces molécules, on peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques, les bactériocines, etc. Malgré ce côté très bénéfique des microorganismes, certains d'entre eux causent des problèmes majeurs pour l'humanité. Il s'agit de bactéries, de levures unicellulaires et de champignons filamenteux pathogènes pour l'homme. A ce propos, actuellement on assiste à un problème très épineux qui est la résistance de ces microorganismes pathogènes aux molécules antibactériennes et antifongiques communément utilisées. De plus, dans le domaine agro-alimentaire, les aliments que nous consommons sont en grande majorité d'origine biologique (végétale ou animale) et les modifications microbiologiques (par le développement de microorganismes altérants et pathogènes) qu'ils subissent, les rendent très vite inconsommables et voir impropres à la consommation. Pour combattre ces microorganismes pathogènes, plusieurs travaux de recherche sont actuellement orientés vers la découverte de nouvelles molécules bioactives, à savoir des antibiotiques, des antifongiques et des bactériocines, pour des applications

pharmaceutiques, agricoles (remplacement des pesticides chimiques par des molécules bioactives naturelles) et agro-alimentaires.

Vue la complexité de la structure chimique des molécules bioactives, le moyen le plus utilisé pour la recherche de nouvelles molécules actives est le moyen naturel qui consiste à chercher ces molécules notamment à partir de microorganismes. Les bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces*, sont les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. Ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70 % des molécules actives produites à l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques. Outre ces applications, les molécules bioactives extraites à partir des bactéries du genre *Streptomyces* connaissent diverses autres applications à savoir en agriculture et en agro-alimentaire. Plusieurs (bactéries et champignons filamenteux ou unicellulaires) sont des pathogènes qui peuvent contaminer les aliments et par la suite infecter les consommateurs. A ce propos, on peut citer les salmonelloses, les listérioses et les candidoses. Comme substances naturelles couramment utilisées dans l'industrie agro-alimentaire afin de prévenir les contaminations, on peut citer les bactériocines, famille de peptides synthétisés naturellement par certaines bactéries notamment les bactéries lactiques (LAB).

Les travaux de recherche de la présente thèse s'inscrivent dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives à partir de microorganismes pour des applications pharmaceutiques, agricoles et agro-alimentaires. C'est une thèse en cotutelle suite à un projet cmcu (N° 06S 0901, MELLOULI/AIGLE, 2006/2009), entre le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du Centre de Biotechnologie de Sfax (LMB-CBS), et le Laboratoire de Génie Chimique du Département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens » ENSAT-France.

Durant les travaux de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois souches bactériennes : deux du genre *Streptomyces* appelées TN17 et Fr10 et une bactérie lactique appelée TN635. Les résultats obtenus ainsi que leurs discussions seront présentés en trois chapitres comme suit :

- Le premier portera sur l'identification et la classification des deux souches d'actinomycètes, TN17 et Fr10.

- Le deuxième chapitre sera consacré pour l'optimisation des conditions de production des biomolécules de la souche TN17 ainsi que la purification des biomolécules des deux

souches TN17 et Fr10 et la caractérisation chimique des trois molécules biologiquement actives de la souche TN17.

- Le troisième chapitre s'intéressera à la sélection et l'identification de la souche TN635 ainsi qu'à la purification et la détermination des caractéristiques biochimiques et microbiologiques de la bactériocine (Bac TN635) sécrétée par cette souche.

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

Les microorganismes sont utilisés depuis des milliers d'années pour la transformation des produits alimentaires (boissons alcoolisées, pain, fromages, etc.). Plus récemment, et avec l'essor de la biotechnologie, des procédés exploitant certaines caractéristiques de microorganismes ont été développés, soit pour dégrader de nombreuses molécules organiques ou minérales afin de dépolluer les sols, les eaux ou l'air, soit pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes.

Bien que la plupart des micro-organismes soient très bénéfiques et inoffensifs pour l'homme, les animaux et les plantes, malheureusement certains sont néfastes et pathogènes en provoquant plusieurs maladies qui peuvent être très graves, et d'autres sont à l'origine de plusieurs dégâts en agriculture. Pour combattre cette pathogénicité, l'homme a utilisé depuis l'antiquité des pâtes moisies sur les plaies infectées et malgré les effets bénéfiques, il ne comprenait pas le phénomène en question. En 1928, le microbiologiste Alexander Fleming a constaté que l'une de ses cultures bactériennes, une souche de *Staphylococcus aureus*, était envahie par la moisissure, *Penicillium notatum*. Cette observation miraculeuse était à l'origine d'une des plus grandes révolutions du monde médical par l'ouverture de l'ère des antibiotiques. Par cette observation, Fleming déduisait que *Penicillium notatum* avait secrété une substance qui avait inhibé la croissance de la souche *Staphylococcus aureus*. Il a nommé cette substance la pénicilline. En 1938, le Français René Dubos a purifié le premier antibiotique, la Gramicidine ce qui a permis à Florey et Chain en 1939 de purifier la pénicilline G. Cet antibiotique a été utilisé pour la première fois en médecine humaine en 1941 pour le traitement des infections bactériennes. Depuis, la quête de nouveaux antibiotiques se poursuit de plus belle. Avec la découverte des antibiotiques, l'humanité a disposé d'un moyen et d'un remède extrêmement efficace contre les bactéries pathogènes qui l'accablaient depuis des millénaires.

Lors de la découverte des antibiotiques, le mot antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») désigne une substance naturelle qui a une action d'inhibition ou de destruction spécifique contre les bactéries. Actuellement, cette définition s'est encore élargie pour devenir : toute substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui a le pouvoir d'inhiber ou détruire

des microorganismes (bactéries et champignons) et également d'avoir des actions anti-inflammatoires, anti-suppresseurs et anti-tumorales.

Concernant l'action antifongique des antibiotiques, il est à noter que plusieurs de ces molécules, notamment celles de la famille des macrolides, en plus de leurs activités antibactériennes possèdent des activités antifongiques. Au contraire, un antifongique possède une action spécifique uniquement contre les champignons.

Ci-après, nous allons développer ces deux types de molécules bioactives : les antibiotiques et les antifongiques.

## **A. LES ANTIBIOTIQUES**

### **I. Classification et mode d'action des antibiotiques**

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs modes d'action sur les agents infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques. En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles mêmes divisées en plusieurs classes à savoir, les aminoglycosides, les  $\beta$ -lactamines, les céphalosporines, les chloramphénicol, les glycopeptides, les lincomycines, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicétopipérazines, les peptides cycliques, etc.

Les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire nos cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte. Comme le montre la figure 1, le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre. On distingue des antibiotiques :

#### **I.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane**

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram+ et à Gram-. La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives : la première qui se passe à l'intérieur de la bactérie, consiste en la formation des unités de base, l'UDP-N-acétyl-glucosamine et l'UDP-N-acéthylmuramyl-pentapeptide. La

deuxième étape permet le passage par un système de transporteurs lipidiques à travers la membrane cytoplasmique de ces deux précurseurs et leur addition pour former une molécule de disaccharide-pentapeptide. Au cours de la troisième étape, cette molécule s'intègre au peptidoglycane préexistant et, à ce stade, deux enzymes essentielles interviennent : une transglycosylase qui permet l'attachement des disaccharides-pentapeptides entre elles aboutissant à la formation des chaînes polysaccharidiques, et une transpeptidase qui réticule les chaînes entre elles par formation d'une liaison peptidique entre l'alanine-4 d'un disaccharide –pentapeptide et le peptide d'une chaîne voisine.

Chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. Par exemple, les  $\beta$ -lactames inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane.

## **I.2. Inhibiteurs de la synthèse protéique**

Plusieurs antibiotiques agissent au niveau du cycle des ribosomes et la biosynthèse des protéines des microorganismes. Dans cette classe on peut citer :

\* Les phénicol, qui se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl. Ils inhibent l'élongation de la chaîne peptidique ce qui arrête le mouvement des ribosomes le long de l'ARN messager.

\* Les tétracyclines, qui se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl et aussi au niveau du site peptidyl. La conséquence est l'arrêt de la fixation du nouvel aminoacyl-tRNA sur le ribosome et un arrêt de l'élongation des chaînes peptidiques.

\* L'acide fusidique, qui en se liant au site aminoacyl, bloque l'adjonction d'un nouvel acide aminé dans la chaîne peptidique en formation (blocage de la translocation).

\* Les aminosides agissent sur divers métabolismes cellulaires dont la synthèse des protéines. Ils pénètrent dans le cytoplasme par un mécanisme actif nécessitant de l'énergie (systèmes de transporteurs d'électrons et ATP). Ces antibiotiques sont des inhibiteurs de la traduction. En effet, ils provoquent des erreurs de lecture du message porté par l'ARN messager ce qui engendre plusieurs perturbations : altération fonctionnelle de la membrane cytoplasmique, blocage des systèmes de sécrétion et de respiration, etc.

\* Les macrolides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome. Les macrolides empêchent la translocation et par suite l'incorporation des aminoacides.



### **I.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs**

Dans cette classe, on trouve deux groupes d'antibiotiques. Un premier agit directement sur la synthèse des acides nucléiques, et un deuxième groupe intervient au niveau de leurs précurseurs de synthèse. Dans le premier groupe on peut distinguer :

\* Les quinolones qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN tel que les topoisomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN.

\* Les nitroimidazoles sont des antibiotiques limités aux bactéries anaérobies. La condition nécessaire à l'activité de ces antibiotiques est la réduction partielle de leurs groupements NO<sub>2</sub>. Les dérivés réduits se fixent sur l'ADN, notamment au niveau des régions riches en adénine et en thymine, provoquant ainsi des coupures des brins et le déroulement de l'ADN (Le Minor et Veron, 1989).

\* Les nitrofuranes nécessitent la réduction préalable du groupement NO<sub>2</sub> pour leur action. Cette réduction est réalisée par les nitroréductases des bactéries aérobies. Les dérivés réduits réagissent de façon électrostatique avec l'ADN, provoquant ainsi des coupures, substitutions de bases et même un effet mutagène.

Le deuxième groupe d'antibiotiques agit sur les précurseurs de synthèse des acides nucléiques qui sont les folates. Ces derniers et en particulier l'acide tétrahydrofolique joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Pour ce deuxième groupe, on peut citer les sulfamides et les 2-4-diaminopyrimidines.

Comme nous venons de le décrire, on distingue plusieurs classes d'antibiotiques qui diffèrent selon leur structure chimique mais également selon leur mode d'action. Plusieurs travaux de recherche ont été effectués sur les différentes classes d'antibiotiques. Dans ce qui suit, nous allons développer quelques aspects concernant la classe des antibiotiques peptidiques cycliques. Au sein de cette classe, on distingue les dipeptides cycliques appelés encore les dérivés dicétopipérazines (DKP) et les autres peptides cycliques. La classe d'antibiotiques peptidiques cycliques intéresse de plus en plus des laboratoires de recherche vue leurs intérêts thérapeutiques énormes et la possibilité d'obtention de nouvelles molécules hybrides à partir de ces deux classes par les moyens génétiques.

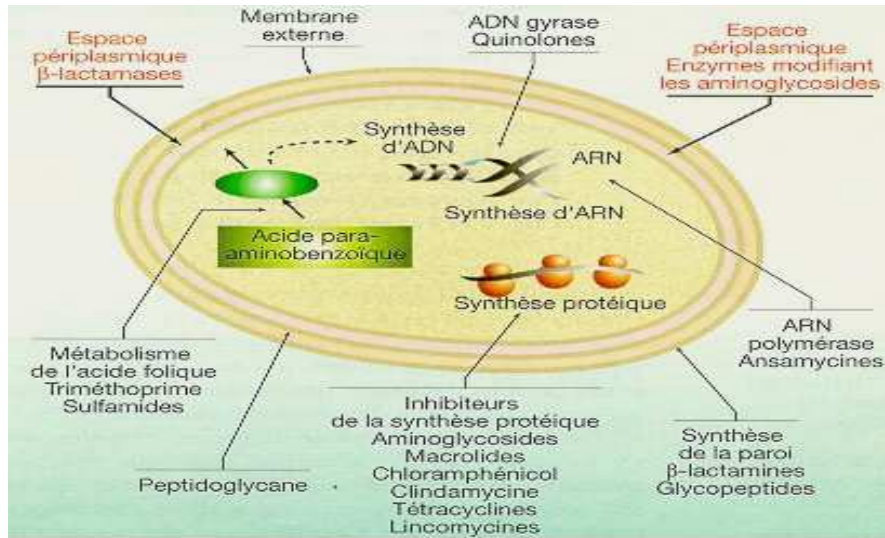


Figure 1. Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques ( Davies et Mazel, 1997)

## II. Les dicétopipérazines

### II. 1. Définition et historique

Les dicétopipérazines (DKP) sont des molécules ayant un cycle piperazine (piperazine-2,5-dione ou 2,5-dioxipiperazines ou 2,5 DKP), substitué en position 3- et 6- par des acides aminés (R1 et R2). (Figure 2).

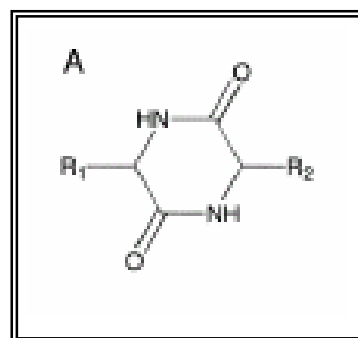


Figure 2 : Cycle piperazine des dérivés des dicétopipérazines

Les dérivés de DKP constituent une nouvelle classe de métabolites secondaires qui sont produits principalement par des levures, des champignons filamenteux et quelques bactéries comme les *Streptomyces* (Ben Ameer Mehdi *et al.*, 2004 ; 2006). D'autres ont été isolés à partir d'organismes marins comme les éponges.

Les DKP ont été longtemps hors d'attention car plusieurs dipeptides cycliques formés à partir des hydrolysats protéiques et trouvés dans les milieux de culture de divers microorganismes, avaient été considérés comme étant des artéfacts de fermentation indésirables résultant de la dégradation des polypeptides (Son *et al.*, 1999). Cependant, il a été vérifié par Fdhila *et al.*, 2003 que les dicétopiperazines ne sont pas générés par stérilisation thermique ni incubation du milieu de culture durant le processus de fermentation. En effet, ces dipeptides cycliques ne sont pas détectés dans les profils HPLC des extraits obtenus à partir du milieu de culture stérilisé sans inoculation.

## **II. 2. Propriétés biologiques des DKP**

Au début, les dipeptides cycliques ont été synthétisés chimiquement. La formation d'un DKP est une réaction secondaire classique qui résulte le plus souvent de la rupture par aminolyse intramoléculaire d'une liaison ester et plus rarement d'une liaison amide, conduisant à un dipeptide cyclique. Cette réaction secondaire qui peut se produire en milieu acide et basique est bien connue du côté C-terminal (c'est-à-dire quand elle résulte de la rupture d'une liaison ester) mais elle est rarement observée du côté N-terminal (c'est-à dire quand elle résulte de la rupture d'une liaison amide). Plusieurs travaux sont encore réalisés pour comprendre ce phénomène (Mc Cleland *et al.*, 2004). Récemment, des molécules plus complexes possédant un cycle pipérazine-2,5-dione ont retenu de plus en plus l'attention vue qu'elles présentent diverses activités biologiques et pharmaceutiques intéressantes.

### **II.2.1. Intérêt thérapeutique**

Les DKP possèdent des activités antimicrobiennes, antitumorales, antivirales et antiprotozoaires. Pour les activités antiprotozoaires, on peut citer la molécule dérivée de dicétopipérazines, la diméthylhyalodendrine tetrasulfite, utilisée contre le *Plasmodium falciparum*, agent de la malaria (Nilanonta *et al.*, 2003).

Les deux DKP, cyclo (L-leucyl-L-propyl) et cyclo (L-phenyl-L-propyl), isolés à partir de souches de *Streptomyces* (Rhee *et al.*, 2001; Rhee, 2002), possèdent des activités antimicrobiennes

contre les VRE (*enterococci* vancomycin résistants), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ces deux DKP inhibent également la croissance de plusieurs lignées de cellules tumorales, à savoir : HL60 et W937 (leucémie humaine) et SNU-1 (cancer de l'estomac) (Rhee, 2002). De plus, et à côté des deux DKP cyclo (L-leucyl-L-prolyl) et cyclo (L-phenyl-L-prolyl), il a été rapporté que d'autres dérivés de DKP tels que : l'ambewelamide, la verticilline et la phényl-ahistine possèdent des activités antitumorales sur plusieurs lignées cellulaires (Williams *et al.*, 1998). Des études hématologiques et anticancéreuses ont permis de déduire que les dicétopipérazines à histidine (cyclo (His-Ala) et cyclo (His-Gly)) constituent une nouvelle génération potentielle d'agents cytotoxiques avec des effets anti-thrombotiques (Lucietto *et al.*, 2006). Egalement, il a été rapporté que les trois DKP : le cyclo (L-His-L-Pro), le cyclo (L-Phe-L-Pro) et le cyclo (L-Pro-L-Tyr) agissent sur le système nerveux central où ils modulent un nombre remarquable de comportement humain (Prasad, 1995). Ceci en fait n'est pas surprenant si on considère la similarité structurale entre ces trois DKPs et les peptides signaux endogènes chez l'être humain à savoir la « thyrotropin-releasing hormon TRH ».

Récemment, une nouvelle activité pharmaceutique des dipeptides cycliques a été découverte en tant qu'agent anti-mutagénique contre les deux souches *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 (Rhee, 2004). Cette importante propriété évitera la formation de mutants naturels à haute virulence à partir de ces deux espèces de *Salmonella*.

### **II.2.2. Intérêt agronomique**

Outre leurs intérêts thérapeutiques, les dicétopipérazines connaissent de plus en plus d'applications dans le domaine agronomique. Le champignon *Pyricularia oryzae* est par exemple un des agents qui cause l'amincissement du riz, et possède un pouvoir destructif très sévère. Ce pathogène fongique attaque directement la plante de riz à partir de l'extrémité du tube de germination, comme il peut aussi attaquer les autres parties de la plante et il y persiste plusieurs années (Manandhar *et al.*, 1998 a et b). Des efforts sont de plus en plus fournis pour remédier à cette situation par l'utilisation d'antifongiques de différentes sources dont on peut citer, ceux obtenus par voie naturelle à savoir un dicétopipérazine nouvellement isolé à partir du champignon du milieu marin *Porphyra yezoensis* (Byun *et al.*, 2003).

La figure 3, montre la structure chimique de deux dérivés de dicétopipérazines qui sont : *cis* cyclo (L-Phe, L-Pro) et *cis* cyclo (L-Leu, L-Pro). Ces dérivés de DKP, ont été purifiés et

caractérisés chimiquement à partir de la souche de *Streptomyces* TN97 et possèdent des activités antibactériennes et antifongiques (Mehdi Ben Ameer *et al.*, 2006).

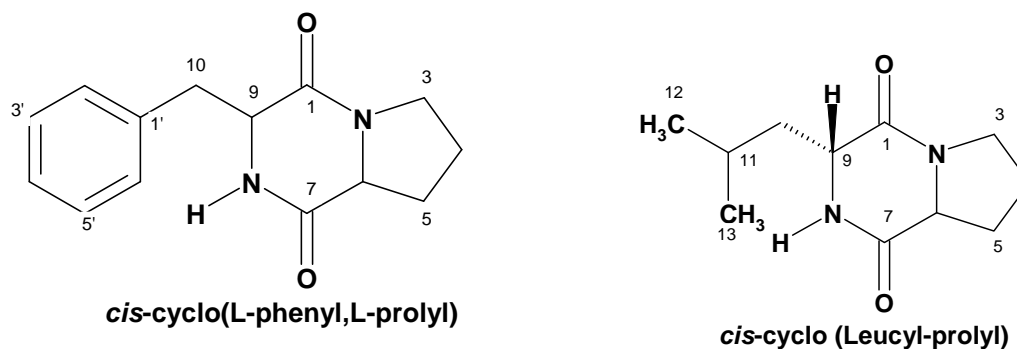


Figure 3. Structure chimique de deux dérivés de DKP : *cis cyclo (L-Phe, L-Pro)* et *cis cyclo (L-Leu, L-Pro)* (Mehdi Ben Ameer *et al.*, 2006)

### III. Les autres peptides cycliques

En 1975, Ovchinnikov et Ivanov notaient que l'importance des cyclopeptides était liée à leurs propriétés antibiotiques. Depuis, les peptides cycliques ont continué à faire l'objet de nombreux travaux et de nouvelles propriétés biologiques sont apparues à savoir: activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales et activité immunosuppressive. Dans ce qui suit, nous allons développer quelques aspects des peptides cycliques allant de trois jusqu'à dix acides aminés.

- **Les cyclotriptides**, très peu sont naturels et les structures publiées sont en fait des cyclopeptides alcaloïdes produits soit par des plantes surtout de la famille des *Rhamnaceae* soit par des éponges marines (Joulet et Nutt, 1983).
- **Les cyclotetraptides**, ces molécules sont souvent décrites comme des produits naturels et possèdent plusieurs activités biologiques intéressantes. A ce propos, on peut citer la Rhodopeptine isolée à partir d'une bactérie du genre *Rhodococcus*. Cette molécule possède des activités antifongiques (Chiba *et al.*, 1999). La molécule cyclotetraptide appelée

apicidin a été isolée à partir d'une souche de *Streptomyces* et possède des activités antitumorales (Okada *et al.*, 2006).

- **Les cyclopentapeptides**, ces molécules sont très peu décrites naturellement. On peut citer dans ce cas la Viscumamide, Cyclo (Leu-Ile-Leu-Ile-Leu), isolée à partir de la plante *Viscum album* (Okumura et Sakurai, 1973).
- **Les cyclohexapeptides**, ces molécules ont été caractérisées chez les plantes supérieures, les éponges marines et les microorganismes notamment les champignons (Whyte *et al.*, 2000).
- **Les cycloheptapeptides** forment une classe relativement importante et ont été isolés à partir de microorganismes, d'organismes marins et de plantes supérieures. Comme exemple, la Rhizonine A, est une mycotoxine hépatotoxique isolée à partir du champignon *Rhizopus microsporus* (Potgieter *et al.*, 1989).
- **Les cyclooctapeptides**, très peu de données existent sur la structure tridimensionnelle des peptides cycliques de huit résidus. Cependant, quelques peptides naturels de cette taille ont été isolés à savoir l'Agardhipeptine B, cyclo (Trp-Leu-Pro-Trp-Ala-Pro-Trp-Val) secrété par une souche de cyanobactérie. Cette molécule ne présente pas d'activité biologique (Shin *et al.*, 1996). Au contraire, la Cyclolinopeptide D, cyclo (Pro-Phe-Phe-Trp-Ile-Mso-Leu-Leu), produite par le spongiaire *Hymeciacidon*, présente une importante activité immunosuppressive (Morita *et al.*, 1999).
- **Les cyclononapeptides**, comme exemple, on peut citer le Cyclolinopeptide A, cyclo (Pro-Pro-Phe-Phe-Leu-Ile-Ile-Leu-Val) isolé à partir des graines de la plante de lin *Linum Usitatissimum*. Ce peptide très hydrophobe possède une forte activité immunosuppressive (Mann, 2001).
- **Les cyclodécapeptides**, le cas le plus connu est le Tyrocidine, qui est un décapeptide cyclique « D-Phe-Pro-Phe-D-Phe-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn-Leu » produit au début de la phase stationnaire de croissance de *Bacillus brevis* ATCC 8185 (Fûrbass *et al.*, 1991). Ce décapeptide a des activités antibiotiques contre plusieurs bactéries Gram+. Dans le surnageant de la culture de *Bacillus brevis*, la Tyrocidine est en fait produite sous forme d'un mélange de quatre décapeptides qui sont les Tyrocidines A, B, C, et D. La différence entre eux réside au niveau des résidus Phe et Tyr qui sont remplacés par Trp. Chaque Tyrocidine contient deux acides aminés dans la configuration D et le résidu L-ornithine

nonprotéinogénique. Comme autre cyclodécapeptide naturel, on peut citer la Gramicidine S, (Phe-Pro-Val-Orn-Leu)<sub>2</sub>, produite par la souche *Bacillus brevis* ATCC 9999 et possède des activités antibactériennes (Krätzschar *et al.*, 1989). Récemment, un nouveau décapeptide (Figure 4) désigné stylopeptide 2 a été isolé et caractérisé à partir d'une éponge marine appelée *Stylotella* sp. Cette molécule possède des activités antibactériennes (Brennan *et al.*, 2008).

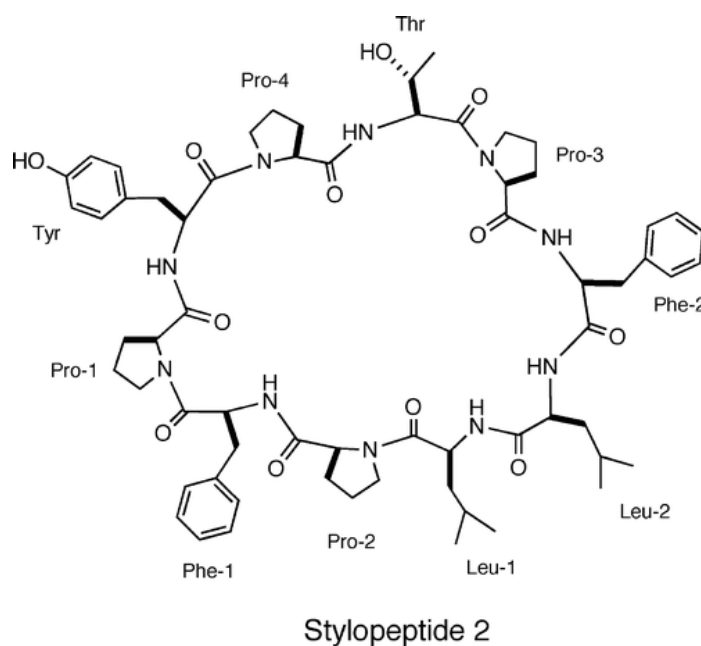


Figure 4: Structure chimique du cyclodécapeptide, Stylopeptide 2 (Brennan *et al.*, 2008).

## B. LES ANTIFONGIQUES

Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons. Ces organismes forment un groupe phylogénétique homogène constitué de champignons macroscopiques et de champignons microscopiques (mycètes) à savoir les levures et les moisissures qui peuvent être saprophytes ou parasites. Dans ce dernier cas, ils peuvent attaquer soit l'être humain et on parle de mycose, soit les plantes causant ainsi des maladies cryptogamiques.

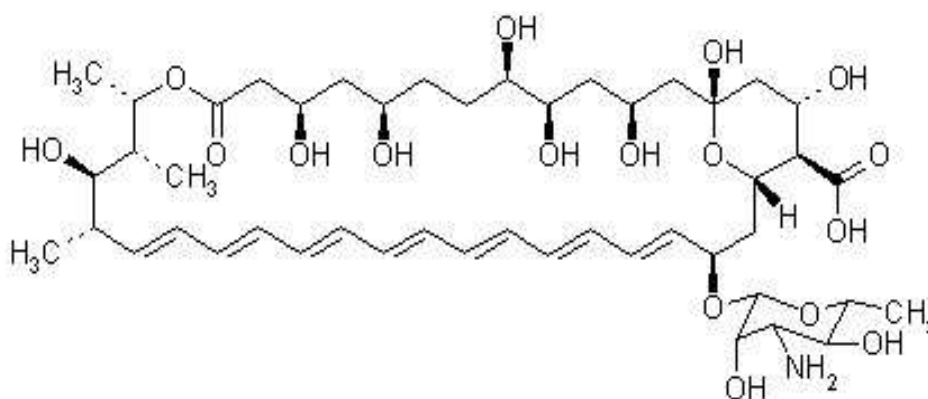
## **I. Les antifongiques luttant contre les mycoses**

Les mycoses sont des maladies provoquées par des champignons microscopiques qui touchent l'être humain. Elles sont à l'origine de plusieurs infections qui peuvent être soit superficielles, sous-cutanées ou encore systémiques.

Pour lutter contre les mycoses, divers antifongiques sont utilisés. Actuellement, l'emploi du terme antifongique s'est élargi pour inclure à côté des produits naturels élaborés au cours du métabolisme secondaire de certains micro-organismes, des composés synthétiques et semi-synthétiques. Selon l'activité qu'il exerce, un antifongique peut avoir un effet fongistatique (arrête la croissance des champignons) ou fongicide (détruit complètement la cellule fongique). Comparé aux infections bactériennes, le traitement des mycoses est souvent beaucoup plus difficile. Cela s'explique par le fait que les cellules des mycètes sont très proches des cellules humaines et animales, ainsi les produits qui sont toxiques pour le champignon pathogène peuvent l'être aussi pour les cellules de leurs hôtes. Par conséquent, la mise au point de drogues ayant une activité antifongique est délicate car ces composés peuvent perturber également le fonctionnement des cellules hôtes.

Jusqu'à nos jours, les antifongiques les plus utilisés pour le traitement des mycoses sont des molécules macrolides polyéniques. Toutes ces molécules sont cycliques, fermées par une liaison ester interne et comprennent deux parties : une partie apolaire rigide constituée de doubles liaisons conjuguées (2 à 7), et une partie polaire comportant un grand nombre de groupes hydroxyles et un aminosucre qui est généralement la mycosamine (André et Leroy, 2004). Leur spectre antifongique est très large et ne se limite pas aux micromycètes puisqu'ils sont actifs sur certains protozoaires ou algues, mais ils ne possèdent aucune activité antibactérienne ou antivirale. L'exemple type des macrolides polyéniques est l'amphotéricine B (Figure 5). Cette dernière, sécrétée par *Streptomyces nodosus*, est une molécule de référence qui représente le premier antifongique d'administration intraveineuse et qui possède un effet fongicide le plus efficace (Baginski *et al.*, 2005).





**Figure 5 : Structure chimique de l'amphotéricine B**

Les effets de l'amphotéricine B sur les cellules fongiques sont multiples : l'étape initiale de toxicité consiste en une interaction avec les stérols des membranes plasmiques pour former des pores. Ce phénomène entraîne immédiatement un déséquilibre ionique à l'intérieur de la cellule du champignon en particulier au niveau des ions monovalents  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et altère la perméabilité cellulaire. Les pores (ou canaux) résultant de l'agrégation de plusieurs molécules de l'amphotéricine B à l'intérieur de la bicouche lipidique de la membrane fongique, forment une sorte de cylindre creux par lequel peuvent fuir les ions et les constituants cellulaires essentiels du champignon (Baginski *et al.*, 2005).

Malgré leur efficacité, les antifongiques polyéniques trouvent des limitations d'applications en thérapeutique vue leur toxicité vis-à-vis des cellules hôtes. Ces effets indésirables des polyènes sur les cellules eucaryotes des mammifères peuvent s'expliquer par l'interaction de ces agents avec le cholestérol (Yilma *et al.*, 2007) « présent essentiellement dans le cerveau, le tissu nerveux est également le précurseur de plusieurs hormones comme la progestérone, le cortisol, l'aldostérone, etc. ». En effet, le cholestérol humain a une structure très proche de celle de l'ergostérol fongique, cible préférentielle des polyènes, d'où la toxicité de ce type de molécules antifongiques. Ces dernières provoquent généralement une toxicité surtout rénale (Knopik-Skrocka *et al.*, 2003).

Actuellement, l'attention est de plus en plus orientée vers la recherche de molécules antifongiques non polyéniques ayant comme sites d'action des cibles autres que l'ergostérol. Globalement, on distingue deux types de macrolides non polyéniques :

- Les macrolides non polyéniques ayant surtout des activités antibactériennes. Leur première utilisation en médecine remonte à 1952, date de la découverte de l'érythromycine (Vara *et al.*, 1989). Ils constituent un groupe d'antibiotiques surtout actifs sur les bactéries Gram<sup>+</sup>, et sont très utilisés actuellement en milieu hospitalier pour le traitement des infections microbiennes (Olano *et al.*, 1998). Ces antibiotiques sont constitués d'un macrocycle porteur d'une fonction lactone, sur laquelle viennent se greffer deux ou plusieurs sucres dont l'un est aminé.
- Les macrolides non polyéniques ayant des activités surtout antifongiques. Ces derniers, peuvent également avoir en plus des activités antibactériennes contre les Gram<sup>+</sup>. Ce genre de molécules trouve des applications en médecine mais surtout des applications de plus en plus dans le domaine agricole pour lutter contre les phytopathogènes causant des maladies cryptogamiques.

## **II. Les antifongiques luttant contre les maladies cryptogamiques**

Une maladie cryptogamique est une maladie causée par un champignon microscopique parasitant une plante. Les différentes formes de maladies cryptogamiques représentent environ 90% des maladies des végétaux. Pour que la maladie d'une plante se développe, trois composantes sont nécessaires : la plante et le pathogène, qui doivent se mettre en contact et interagir, et les conditions de l'environnement qui favorisent la prolifération du pathogène (Bouزيد, 2002).

### **II. 1. Evolution générale d'une maladie cryptogamique**

Une série d'événements s'opère et conduit au développement de la maladie. Ces événements sont l'inoculation, la pénétration, l'infection, la dissémination du pathogène et la conservation du pathogène (Bouزيد, 2002).

#### **II. 1. 1. L'inoculation**

L'inoculation se réalise quand un pathogène se met en contact avec une plante. Les propagules du champignon pathogène (spores, sclérotés, fragments mycéliens,...) qui se déposent

sur la plante sont appelées inoculum. Un inoculum en conservation provoque une contamination primaire.

### **II. 1. 2. La pénétration**

Le fragment mycélien ou le tube germinatif d'une spore en germination pénètre dans la plante directement, par les ouvertures naturelles (stomates, lenticelles,...) ou par des blessures.

### **II. 1. 3. L'infection**

L'infection commence quand le pathogène s'installe dans les cellules ou tissus sensibles de la plante hôte et s'en procure des éléments nutritifs. Ainsi, le pathogène se multiplie de façon à envahir la plante plus ou moins rapidement. Quand l'infection s'installe, les symptômes, qui sont les changements visibles dus à la maladie, apparaissent. La période entre l'inoculation et l'apparition des symptômes est appelée incubation. Nombreuses substances telles que les enzymes, les toxines et autres sont libérées par les pathogènes dans les plantes hôtes. Elles affectent l'intégrité structurale et les processus physiologiques des cellules hôtes. Pour réagir aux pathogènes, les plantes hôtes répondent par divers mécanismes de défense, aboutissant à différents degrés de protection allant de la sensibilité à la résistance.

### **II. 1. 4. La dissémination du pathogène**

Les spores du champignon sont activement transportées par le vent. Pour la plupart des cas, les spores sont passivement transportées par différents vecteurs tels que l'eau, l'air, les semences, les animaux, l'homme, etc.

### **II. 1. 5. La conservation du pathogène**

Les pathogènes se conservent principalement sous forme de spores, mais aussi sous forme de fragments mycéliens et de sclérotés. Ils se conservent dans le sol, les débris des plantes infectées et dans les semences. Les spores de dissémination, telles que les conidies se conservent quelques semaines tandis que les spores de conservation (chlamydospores, téliospores, ustilospores) peuvent se conserver plusieurs années. Les spores de dissémination sont produites activement par les champignons durant la saison favorable pour propager la maladie tandis que les spores de conservation sont produites par les champignons pour surmonter la saison défavorable (Bouزيد, 2002).

## **II. 2. Exemples de maladies cryptogamiques**

### **II. 2. 1. La fusariose**

La fusariose est une maladie causée par des champignons du genre *Fusarium* qui vivent dans le sol, et attaquent de nombreuses plantes (Amzelloug, 1999). Il existe plusieurs espèces recensées de ce champignon dont à savoir *Fusarium oxysporum*. Ce dernier est un agent vasculaire qui se conserve dans le sol sous forme de chlamydozoospores et infecte les plantes via les racines qu'elles pénètrent directement ou par des blessures d'origine mécanique ou biologique (percées des racines secondaires, piqûres de nématodes,...). Les maladies dues à l'espèce *F. oxysporum* sont largement répandues dans le monde. Elles sont dommageables pour de nombreuses plantes maraîchères (tomate, cucurbitacées,...) et ornementales (œillet), ainsi que pour des cultures en plein champ telles que le coton, le bananier (la maladie de Panama) et le palmier dattier (maladie du Bayoud) causée par *Fusarium oxysporum albedinis* (Foa). Ce champignon qui se trouve dans le sol, pénètre par les racines en cheminant la sève et envahissant le bourgeon terminal du palmier dattier. Par conséquent, il provoque un dessèchement puis un dépérissement rapide des arbres. Le bayoud ou la fusariose du palmier dattier se caractérise par sa résistance à la sécheresse et par sa capacité de rester dangereux après plus de trente ans passés sous sol. Il est également très prolifique soit par le repiquage de rejets apparemment sains, soit par l'irrigation, soit par les vents de sables qui peuvent transporter de minuscules éléments végétaux (El Hadrami *et al.*, 1998).

### **II. 2. 2. La verticilliose**

La verticilliose est une maladie causée par des champignons du genre *Verticillium* comme *Verticillium dahliae* qui se conserve dans le sol sous forme de microsclérotes. Il infecte aussi bien les arbres fruitiers (abricotier, amandier, etc.) et les plantes maraîchères (Solanacées, Cucurbitacées). Le champignon émet ses filaments qui pénètrent dans le système vasculaire de l'arbre. Il s'y développe en se ramifiant vers les parties aériennes où il entrave la circulation de la sève, provoquant le dessèchement de la ramification atteinte. Cette maladie est la plus grave pour l'olivier et provoque des pertes très importantes (Matallah *et al.*, 1997 ; Bellahcene *et al.*, 2000).

Les méthodes de luttés utilisées contre les phytopathogènes sont généralement chimiques. Ces fongicides agissent contre les champignons en dissolvant ou détruisant les membranes cellulaires, en inhibant la synthèse de certaines substances des parois cellulaires et en complexant

ou inactivant certains coenzymes essentiels. Ces fongicides peuvent être organiques à savoir des dérivés de composés aromatiques, hétérocycliques, des quinones ou inorganiques comme les composés soufrés, carbonatés et phosphatés. Cependant, l'utilisation massive des fongicides chimique a engendré des problèmes très graves sur l'environnement, la faune et la flore. Il est donc grand temps de limiter voir même d'interdire leur application et les remplacer par des usages biologiques. Actuellement, la tendance est orientée vers la lutte biologique selon deux approches :

- la première par le biais de microorganismes antagonistes. Elle consiste à utiliser des microorganismes antagonistes qui se trouvent normalement dans la nature. Leur mode d'action peut être par parasitisme direct, par concurrence ou effet toxique. Pour accroître l'efficacité de ces microorganismes, l'homme essaie de les introduire dans les sols en grande quantité ou de stimuler leur croissance. Il est à noter que cette méthode présente l'inconvénient de provoquer un risque de déséquilibre de la composition de la flore microbienne du sol.

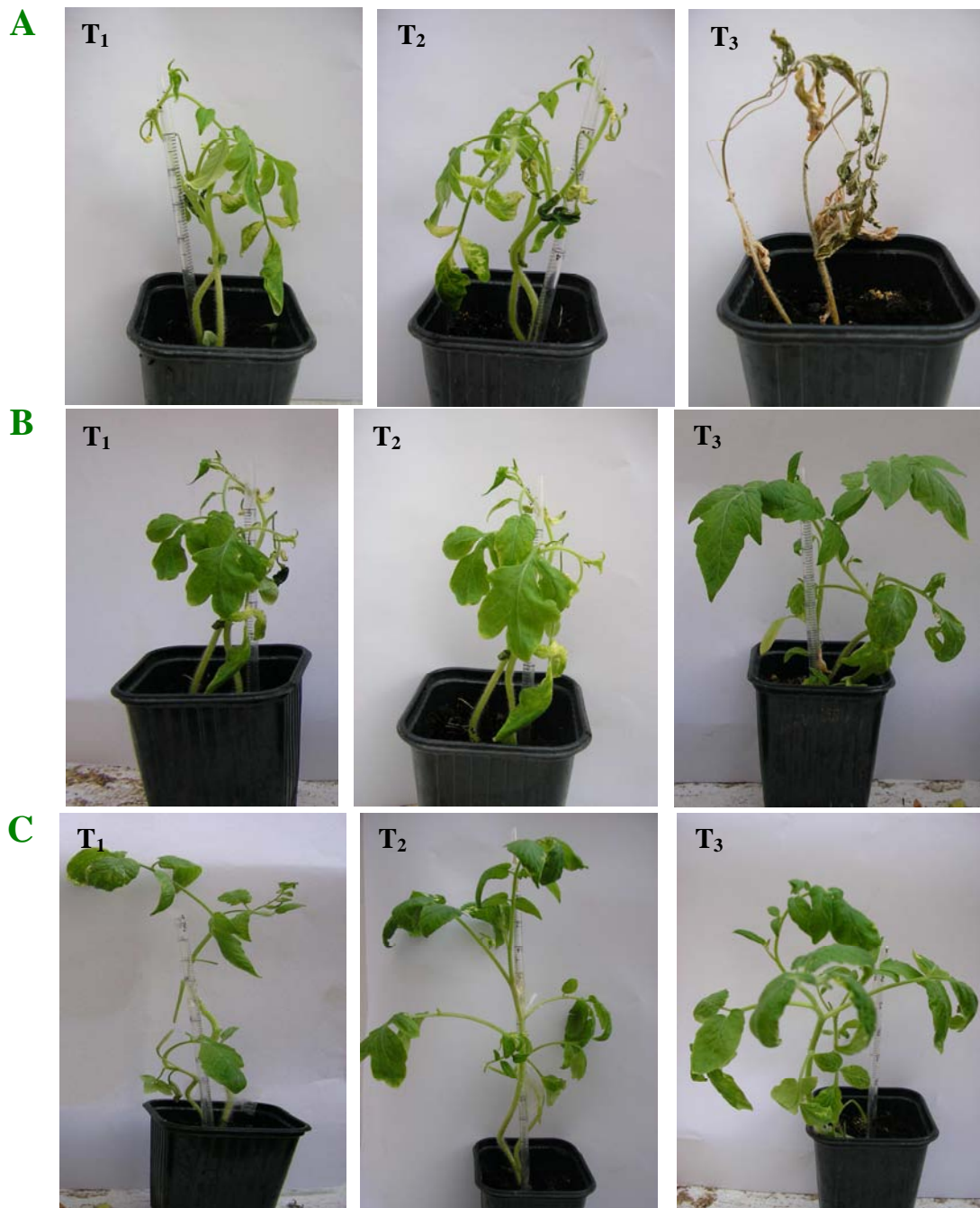
- La deuxième utilisant des molécules antifongiques produites par voies naturelles. Elle consiste à isoler et à sélectionner des microorganismes capables de synthétiser des molécules antifongiques non polyéniques naturelles.

Pour ces deux approches, les *Streptomyces* sont les candidats les plus potentiels pour l'utilisation en lutte biologique. Environ 60% des antifongiques naturels développés en agriculture ont pour origine des actinomycètes du genre *Streptomyces* (Tanaka et Omura, 1993).

A ce propos, nous pouvons citer la souche de *Streptomyces* sp. US80 qui produit trois molécules macrolides non polyéniques qui sont : l'irumamycine, le X-14952 B et le 17-Hydroxy-venturicidine A. Les deux premières molécules ont été déjà décrites à partir de deux souches de *Streptomyces* (chacune produit une molécule). La structure chimique totale de la troisième molécule n'a jamais été rapportée. La souche de *Streptomyces* sp. US80 est la seule bactérie capable de produire ces trois molécules macrolides simultanément (Fourati *et al.*, 2005).

Ces auteurs, après des études *in vitro*, ont essayé de tester, en pots, les activités antifongiques de l'extrait brut d'une culture de la souche de *Streptomyces* US80 contre un champignon phytopathogène, qui est le *Fusarium oxysporum*, responsable de la pourriture racinaire et du flétrissement de la plante de tomate. Comme le montre la figure 6, l'étude *in vivo* a permis de constater qu'il y a une absence totale des symptômes sur la plante inoculée par le champignon phytopathogène puis traitée par une solution de l'extrait sec actif de la culture de la souche de

*Streptomyces* US80. La plante inoculée puis traitée se comporte comme la plante témoin saine non infectée par le *Fusarium oxysporum*. Par contre pour la plante inoculée et non traitée par les activités antifongiques de l'extrait actif de la souche de *Streptomyces* US80, il a été observé le flétrissement des feuilles et par la suite la mort totale de la plante.



**Figure 6 : Effet des activités antifongiques sur la croissance de la plante de tomate en fonction du temps (T<sub>1</sub> : 7 jours, T<sub>2</sub> : 15 jours et T<sub>3</sub> : 26 jours) en présence et en absence du *Fusarium oxysporum* . A : Plante inoculée par *Fusarium oxysporum* et non traitée par l'extrait actif. B : Plante de tomate inoculée par *Fusarium oxysporum* puis traitée au cours du temps par l'extrait actif de la souche de *Streptomyces* US80. C : Plante de tomate saine (témoin), non inoculée.**

## C. LES STREPTOMYCES

Les *Streptomyces* (du grec *Streptos* : courbé, tordu et *Myces* : moisissure) sont des bactéries filamenteuses à Gram<sup>+</sup> et sporulantes (Molnar, 1994) dans des conditions de stricte aérobiose. Elles appartiennent à la classe des Actinomycètes (groupes de bactéries filamenteuses et ramifiées) (Larpent et Sanglier, 1989; Holt *et al*, 1994), à l'ordre des Actinomycétales et à la famille des Streptomycetaceae (Waksman et Henrici, 1943; Kutzner, 1981) et appartient au groupe des Streptomycetes.

### I. Caractéristiques générales

#### I.1. Cycle de développement

Les *Streptomyces* ont un cycle de développement complexe qui se divise en plusieurs étapes. Sur milieu solide (Figure 7), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinuclés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se spiralisent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninuclées, ces spores sont des agents de dissémination.

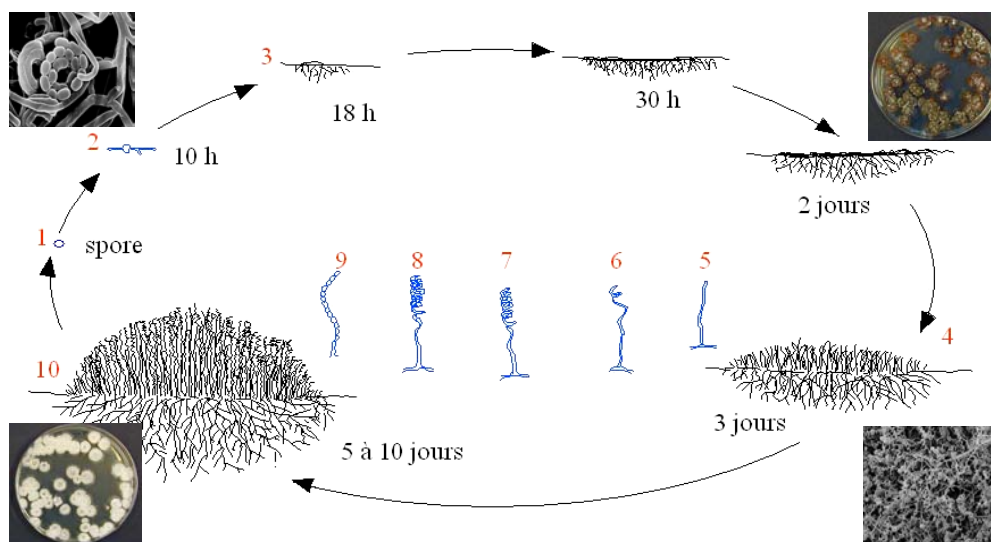


Figure 7 : Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985)

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement. En milieu



solide, une différenciation morphologique est donc observée (formation du mycélium aérien) tandis qu'en milieu liquide, la différenciation est généralement physiologique.

## **I.2. Importance Industrielle**

La différenciation morphologique des *Streptomyces* est accompagnée d'une différenciation métabolique. En effet, en milieu liquide et à la fin du cycle biologique, les *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien. Les *Streptomyces* produisent essentiellement la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement. Cette diversité considérable de composés biologiquement actifs a pour conséquence la grande importance des *Streptomyces* dans l'industrie pharmaceutique puisque les molécules produites par fermentation sont la deuxième source de revenus de l'industrie biotechnologique après la brasserie (Thomson *et al.*, 2004). Ces bactéries sont considérées comme le paradigme des microorganismes capables de synthétiser des molécules naturelles par le biais de leur métabolisme secondaire. L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (Bentley *et al.*, 2002 ; Ikeda *et al.*, 2003). En effet, l'analyse fonctionnelle des gènes a révélé que les prédispositions génétiques de ces microorganismes à produire des métabolites secondaires étaient très sous-estimées. Ces bactéries possèdent en réalité un grand nombre de métabolites « cachés » ou « cryptiques ». Si on arrive à induire la production de ces métabolites cryptiques, il serait possible d'obtenir plusieurs nouvelles molécules d'intérêts thérapeutique et industriel.

## **I.3. Le génome des *Streptomyces***

Le génome des *Streptomyces* se caractérise par un contenu élevé en guanine et cytosine (G + C). Cette richesse varie de 60% à 80%, selon la nature des gènes et des espèces, ce qui résulte un usage des codons hautement biaisé par les *Streptomyces* avec une dominance remarquable de G ou C à la troisième position du codon variant de 76 à 98% (Frank et Bibb, 1992).

L'ADN chromosomique des *Streptomyces* a une taille moyenne estimée par des expériences d'électrophorèse en champs pulsé, d'environ 8000 kilobases (Gladek et Zakrzewska,

1984). C'est l'un des plus grands génomes bactériens. En effet, la taille des chromosomes bactériens varie de 580 kb pour *Mycoplasma genitalium*, bactérie parasitaire à Gram<sup>+</sup>, à 9450 kb pour *Myxococcus xanthus* (Goldman *et al.*, 2006). Les *Streptomyces* sont les rares bactéries ayant un chromosome linéaire avec une origine de répllication *oriC* localisée au centre du chromosome (Kolsto, 1997). La séquence des bouts du chromosome des *Streptomyces* a montré de part et d'autre de l'*oriC* des répétitions terminales inversées appelées TIR (Terminal Inverted Repeats) dont la taille varie considérablement de 25 kb à 550 kb suivant les espèces. Chez la souche *S. ambofaciens*, leur taille est d'environ 210 kb (Leblond *et al.*, 1996).

## **II. Identification et classification des Actinomycètes « *Streptomyces* »**

### **II. 1. Généralités**

La taxonomie est une science ayant pour objectif de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons (familles, genres, espèces, etc) afin de pouvoir les nommer et les classer. Chez les bactéries, les taxons sont dans l'ordre hiérarchique : divisions, classes, sous-classes, ordres, familles, sous-familles, tribus, sous-tribus, genres, sous-genres, espèces et sous-espèces. Cependant parmi ces rangs hiérarchiques, il y a quelques uns qui sont très peu utilisés. Par conséquent, pour une bactérie donnée on peut attribuer des rangs et pas d'autres. Différentes approches taxonomiques sont utilisées pour la classification des bactéries :

#### **II.1.1. La Taxonomie phénétique**

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années 1960, la définition d'une espèce (et d'une manière générale toute la taxonomie bactérienne) reposait sur une classification phénétique ou phénotypique. Cette dernière utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la présence d'une spore, la mise en évidence d'un caractère biochimique jugé essentiel, l'habitat, le pouvoir pathogène... Une classification phénétique a l'inconvénient de ne refléter qu'une quantité d'information réduite.

#### **II.1.2. La Taxonomie numérique**

En 1957, Sneath développe une taxonomie qualifiée de numérique pour les bactéries. La méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux... et à attribuer le même poids à chacun des

caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables.

### **II.1.3. La Taxonomie phylogénétique**

Dès 1936, Kluver et van Niel proposaient l'utilisation d'une taxonomie phylogénétique, mais les outils nécessaires au développement d'une telle taxonomie n'étaient pas disponibles et il fallut attendre la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle pour qu'une taxonomie phylogénétique commence à se mettre en place.

#### *\* Détermination du (G+C %)*

En 1949, Chargaff *et al.*, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre. Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN.

#### *\* Etude des ARNr*

Chez une bactérie, les gènes qui codent pour les ARNr sont organisés en opérons. Ces opérons existent en un ou plusieurs exemplaires sur le chromosome. Le nombre de copies est grossièrement corrélé à la taille du génome et à la vitesse de croissance des bactéries. L'ARNr 16S est le plus utilisé et le séquençage des gènes correspondants peut être automatisé et les données concernant ces molécules s'accumulent en permanence. L'utilité du séquençage des ARNr 16S est reconnue par tous les taxonomistes mais, comme cette technique n'analyse qu'une faible partie du génome, elle ne permet pas de différencier les espèces proches les unes des autres. En revanche le séquençage des ARNr 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Pour Stackebrandt et Goebel 1994, lorsqu'il existe moins de 97% de similarité entre les séquences des ARNr 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou

supérieur à 97, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN.

\* *Les hybridations ADN-ADN*

Les hybridations ADN-ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. Leurs réalisations n'ont été possibles qu'après la découverte par Marmur (1961) du phénomène de renaturation de l'ADN. Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : Si les ADN des deux bactéries présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche. Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses.

## **II. 2. Identification des actinomycètes « *Streptomyces* »**

Les actinomycètes comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires (ex : hybridation ADN- ADN) séparent les espèces.

Cohn, dès 1875 décrit le premier actinomycète et deux années plus tard, Harz (1877) isola *Actinomyces bovis*, agent responsable des actinomycoses du bétail (Lechevalier et Lechevalier, 1970a). Durant les 30 dernières années, la taxonomie des actinomycètes a évolué considérablement. Elle fut marquée par quatre périodes essentielles dont chacune a apporté de nouveaux critères de classification.

Durant la première période, seuls les critères macro et micro morphologiques (mycélium fragmenté ou non, présence ou non de mycélium aérien, couleur des mycélia, production de spores, etc.) permettaient de différencier les genres entre eux. Ceci a donné lieu à la création de

nombreux genres dont les limites entre eux n'étaient pas toujours nettes, ce qui a engendré beaucoup de confusion (Waksman, 1943).

La seconde période voit l'utilisation de la chimiotaxonomie basée sur la composition cellulaire en acides aminés (Becker *et al.*, 1964), en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970b), en acides mycoliques (lipides pariétaux complexes et insaturés) (Mordarska *et al.*, 1972) en phospholipides membranaires (Lechevalier *et al.*, 1977; Minnikin *et al.*, 1977) et en ménaquinones membranaires (collins *et al.*, 1980). La chimiotaxonomie, combinée aux critères morphologiques, fut d'un apport essentiel pour distinguer de nombreux genres entre eux, tels par exemple, *Streptomyces* de *Nocardia* (Becker *et al.*, 1964), *Actinomadura* de *Nocardiopsis* (Grund et Kroppenstedt, 1990) ou encore certains genres apparentés phylogénétiquement aux actinomycètes mais n'ayant pas un véritable mycélium, comme *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, etc. (Bergey, 1989).

La troisième période qui a débuté dans les années 70 et a trouvé son apogée entre 1980 et 1990, combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles. Ainsi est née la taxonomie numérique avec l'obtention de dendrogrammes qui ont permis d'apporter beaucoup de clarté au niveau de la composition en espèces des genres *Rhodococcus* (Goodfellow et Alderson, 1977), *Nocardia* (Orchard et Goodfellow 1980), *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1983), *Actinomadura* (Athalye *et al.*, 1985), *Nocardiopsis* (Grund et Kroppenstedt, 1990) et *Actinophanes* (Goodfellow *et al.*, 1990).

La quatrième période a débuté durant les années 80 et s'étend jusqu'à l'heure actuelle. Elle consiste en l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ARN ribosomique 16S, qui ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes (Stackebrandt et Kroppenstedt 1987; Kinoshita *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2004). Grâce au séquençage de l'ARN 16S, certains genres bactériens non mycéliens furent inclus dans l'ordre des *Actinomycetales*, tandis que d'autres en furent exclus.

Le genre *Streptomyces* se distingue des autres genres bactériens par des caractéristiques chimiques (présence de l'isomère de l'acide L-L-diamino-pimélique (DAP) et de glycine dans leurs parois), et morphologiques (production de chaînes de spores). Il comprend de nombreuses espèces dont la classification repose sur plusieurs critères telles que la détermination de la couleur de différents milieux après croissance des souches, la croissance possible à 4°C, la production de métabolites spécifiques ou la morphologie des chaînes de spores. D'autres critères

peuvent être également employés comme la tolérance au chlorure de sodium, la production de molécules odorantes (Dietz, 1988).

Généralement, plusieurs techniques sont associées pour l'identification et la classification des souches du genre *Streptomyces*:

- Coloration de Gram et observation microscopique.
- Aspect macroscopique et caractères cultureux. L'aspect phénotypique et les caractères cultureux sont déterminés sur des milieux de cultures spécifiques à savoir des milieux ISP (Petrosyan *et al.*, 2003).
- Analyse chimique des constituants de la paroi cellulaire. Il s'agit de déterminer les différents isomères de l'acide 2,6-diaminopimélique et les sucres pariétaux de la paroi.
- Caractères physiologiques et biochimiques : il s'agit de suivre la croissance de la souche à différentes températures, à différents pH, en présence de différentes concentrations en NaCl, etc.
- Et hybridation ADN-ADN.

Il est à noter que chez les *Streptomyces*, les deux moyens largement utilisés pour l'identification de ce genre bactérien, sont d'une part le suivi des aspects macroscopiques et des caractères cultureux sur milieux de cultures spécifiques, et d'autre part, l'analyse de la séquence nucléotidique du gène ARNr 16S. Ces deux moyens ont permis l'identification de plusieurs souches appartenant à ce genre bactérien (Mellouli *et al.*, 2003 ; Fourati *et al.*, 2005 ; Ben Ameer *et al.*, 2006). Mehling *et al.*, 1995 ont testé plusieurs amorces afin d'amplifier les gènes ARNr16S des souches de *Streptomyces*. Quatre amorces (P1, P2, P3 et P4), ont été retenues pour leur fiabilité d'amplification (Tableau 1).

**Tableau 1:** Séquences nucléotidiques et positionnement des amorces P1, P2, P3 et P4 sur les gènes ARNr16S (Mehling *et al.*, 1995).

<b>Amorces</b>	<b>Séquences nucléotidiques 5' → 3'</b>	<b>Position (nt)</b>
<b>P1</b>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8
<b>P2</b>	GTGGGCAATCTGCCCTTGCACTCT	120
<b>P3</b>	GTGAGTCCCCAGATCACCCGAAG	1100

P4	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1530
----	----------------------	------

### III. Production de métabolites secondaires

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. En effet, la composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires. Pour découvrir de nouveaux composés ayant une bioactivité prometteuse, plusieurs méthodes onéreuses, comme la recherche de nouveaux microorganismes producteurs par criblage de différentes sources biologiques particulières, ont été utilisées (Mellouli *et al.*, 2003 ; Miao *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2008). Alternativement, une approche d'optimisation efficace des conditions de production de biomolécules à partir de la souche sélectionnée peut être réalisée à travers des études et des analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de croissance et de production. Il y a couramment une étroite relation entre le taux de croissance et le rendement maximal des métabolites secondaires biologiquement actifs. Le rendement des composés bioactifs est généralement augmenté suite à l'optimisation des facteurs chimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligoéléments, etc.) et physiques (température, pH, aération, etc.) pour la croissance microbienne.

Les *Streptomyces* sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005). Plusieurs travaux ont été menés pour augmenter la production de métabolites d'intérêts à partir de ce genre bactérien. Il a été démontré l'importance majeure et l'implication de l'influence des conditions de culture de la bactérie productrice sur la production du ou des métabolites recherchés.

#### III. 1. Effet de la composition du milieu de culture

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En fait, les travaux

de Gesheva *et al.*, 2005 ont montré que la nature des sources : de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace éléments minéraux (essentiellement  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ ), affectent fortement la production de la molécule antifongique de type macrolide non polyénique, la AK-111-81, par *Streptomyces hygroscopicus*. De plus, Mellouli *et al.*, 2003 ont constaté que la production des deux biomolécules actives : un dérivé de DKP le Cyclo (L-Phe, L-Pro) et la molécule 3-indo-éthanol à partir d'une nouvelle bactérie de *Streptomyces*, est étroitement liée à la nature de la source de carbone. Egalement, l'origine d'une même source de carbone peut affecter la sécrétion des biomolécules par le microorganisme producteur. C'est le cas de l'antibiotique aminoglycoside, la néomycine. Il a été démontré par Adinarayana *et al.*, 2003, que la production de cette molécule par la souche *Streptomyces marinensis* est fonction de l'origine céréalière de l'amidon utilisé comme source de carbone.

Outre l'importance de la nature de la source de carbone, plusieurs travaux ont montré l'implication d'autres nutriments dans la production de biomolécules par les microorganismes. Pour la source d'azote, la production de l'antibiotique SBR-22 par *Streptomyces* BT-408 a été étudiée sur plusieurs sources d'azotes inorganiques ou sous forme d'acides aminés. Il a été rapporté que c'est la source d'azote inorganique (nitrate d'ammonium) qui donne la meilleure production de la molécule SBR-22 (Sujatha *et al.*, 2005). Ces mêmes auteurs ont montré également l'importance de la nature de la source de phosphate dont certaines peuvent conduire à l'arrêt de la production de la biomolécule SBR-22. Cette constatation a déjà été décrite pour la production de la tétracycline, l'actinomycine et le candidicine (Kishimoto *et al.*, 1996). L'importance du magnésium et du potassium dans la production des antibiotiques par différentes espèces de *Streptomyces* a été rapportée par plusieurs chercheurs. Mellouli *et al.*, 2004, ont constaté que le meilleur rendement de production de biomolécules de la nouvelle bactérie de *Streptomyces* TN58 est obtenu en présence de potassium à 2 mM.

Il est à noter que plusieurs autres additifs comme le sulfate, le chlorure, l'acétate et l'arginine peuvent influencer la production de plusieurs métabolites secondaires. C'est le cas des deux biomolécules, l'antibiotique IM-111-81 et de l'azalomycine B, dont la production par la souche *Streptomyces hygroscopicus* est stimulée par la présence de ces additifs (Gesheva *et al.*, 2005).



### **III. 2. Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation**

Les conditions de culture comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation, affectent énormément la production des métabolites secondaires. Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. En effet, depuis 1973, Iwai *et al.*, ont montré que la production, par le champignon *Cephalosporium caeruleus*, de la cerulenine qui est une petite molécule inhibitrice du métabolisme cellulaire du cholestérol et des lipides est affectée par la variation du pH du milieu de culture. Cette observation a été constatée lors de la production de plusieurs métabolites secondaires à savoir la production d'un antifongique par la souche *Streptomyces rochei* AK39. La production de cet antifongique peut être stimulée ou inhibée par des variations de pH (Augustine *et al.*, 2005). De même, chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline (CTC) et de la tétracycline (TC) dans le milieu de culture. Un pH acide favorise la production du CTC et un pH basique favorise la sécrétion de TC (Asanza-Teruel *et al.*, 1997).

Concernant la température, la souche marine *Streptomyces* BT-408 possède une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 40°C avec un optimum à 30°C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide SBR-22 est beaucoup plus étroite et varie entre 25 et 33°C (Sujatha *et al.*, 2005). L'optimum de production est obtenu à 30°C qui correspond à la température optimale de croissance. Dans ces cas, l'accroissement de la température d'incubation de 25 à 30°C fait augmenter la croissance des cellules et la production du métabolite SBR-22 d'un facteur de 3 et de 4,7 respectivement.

L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. Il a été rapporté par Mellouli *et al.*, 2004, que pour la souche de *Streptomyces* TN58, qui produit cinq molécules bioactives différentes, la meilleure production est obtenue à une agitation comprise entre 200 et 250 rpm. Pour des agitations faibles de l'ordre de 100 rpm ou fortes au voisinage de 300 rpm, la production de biomolécules chute énormément.

Chez les *Streptomyces*, l'évolution de la production des métabolites secondaires en fonction du temps, qui est un facteur déterminant, est variable d'une espèce à une autre. En effet, pour la souche de *Streptomyces* TN58, la production des biomolécules commence après 60 h

d'incubation pour atteindre un maximum après 72 h. Elle reste stable jusqu'à 80 h puis elle décroît progressivement pour disparaître à partir de 120 h (Mellouli *et al.*, 2004). Cependant, pour la souche *Streptomyces rochei* AK39, qui produit un métabolite antifongique, la production commence après quatre jours d'incubation pour atteindre un maximum après huit jours (Augustine *et al.*, 2005).

## **IV. Purification et Caractérisation des Métabolites Secondaires**

### **IV. 1. Purification**

A l'échelle industrielle, lors d'une production naturelle à partir de microorganismes, les métabolites secondaires biologiquement actifs sont produits dans des immenses cuves appelées fermenteurs, qui peuvent contenir des milliers de litres d'un milieu de culture favorable à la croissance du microorganisme producteur de ou des molécules recherchées. Généralement les milieux de production utilisés pour la préparation naturelle de métabolites secondaires biologiquement actifs sont complexes. Ces milieux peuvent devenir encore chargés vu que le microorganisme producteur peut sécréter plusieurs autres métabolites outre la ou les molécule(s) recherchée(s). L'extraction et la séparation de ces molécules d'intérêts du jus de fermentation, constituent une étape délicate et souvent tributaire de leurs caractéristiques.

Le schéma général consiste à séparer par centrifugation la biomasse du jus de fermentation contenant les molécules d'intérêts. Par ailleurs, il est à noter que dans des cas assez rares, certaines molécules ne sont pas secrétées en totalité dans le surnageant et une fraction reste intracellulaire. Dans cette situation il faut traiter la biomasse par des moyens physiques.

L'extraction et la purification des molécules actives du jus de fermentation nécessitent l'application de plusieurs techniques chimiques et physico-chimiques. Cependant, bien que le schéma utilisé pour l'extraction et la purification des molécules bioactives soit assez général, quelques étapes doivent être adaptés selon la nature de la molécule d'intérêt.

La figure 8 illustre le schéma général utilisé pour la préparation à l'état pur d'une molécule biologiquement active.

## **IV. 2. Caractérisation**

Après obtention de la molécule active à l'état pur et pour élucider sa structure chimique, il est nécessaire d'appliquer plusieurs techniques spectroscopiques. Le nombre de techniques à utiliser dépend de la nature de la molécule à savoir sa masse, sa géométrie dans l'espace, sa polarité, etc. L'élucidation structurale des molécules organiques ayant des activités biologiques telles que les antibiotiques est faite à l'aide de mesures de susceptibilité magnétique, des techniques spectroscopiques (UV-visible, Infrarouge ou Résonance Paramagnétique Electronique.....). Ces techniques sont complémentaires et généralement l'élucidation de la structure chimique de la molécule recherchée est obtenue par la combinaison de leurs résultats. Les spectres UV qui fournissent généralement moins de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres RMN et IR, sont utilisés soit pour une confirmation soit pour une identification grâce à des règles empiriques et à la comparaison avec des spectres de références.

Cependant, et malgré tous les techniques spectroscopiques innovantes qui sont de nos jours de plus en plus utilisées pour l'élucidation totale de la structure chimique des biomolécules, on se trouve parfois confronter à quelques problèmes de configuration de la molécule étudiée. En effet, la molécule, Haliangicine (Figure 9), ayant des activités antibiotiques, antifongiques et antitumorales a été décrite pour la première fois par Fudou *et al.*, 2001. Cependant, Bangi *et al.*, 2003, ont constaté que cette molécule possède quatre autres isomères qui sont biologiquement actifs (Tableau 2). Après l'élucidation du premier isomère par Fudou *et al.*, 2001, en utilisant des techniques spectroscopiques simples, Bangi *et al.*, 2003 ont suggéré que cette molécule peut présenter des isomères puisqu'elle contient un groupement époxyde traduisant la présence des isomères trans et cis et le groupement polyénique traduisant la présence des isomères Z et E. Cette suggestion a été confirmée par la technique spécifique de l'RMN 2D appelé NOESY permettant de voir la corrélation des protons dans l'espace.

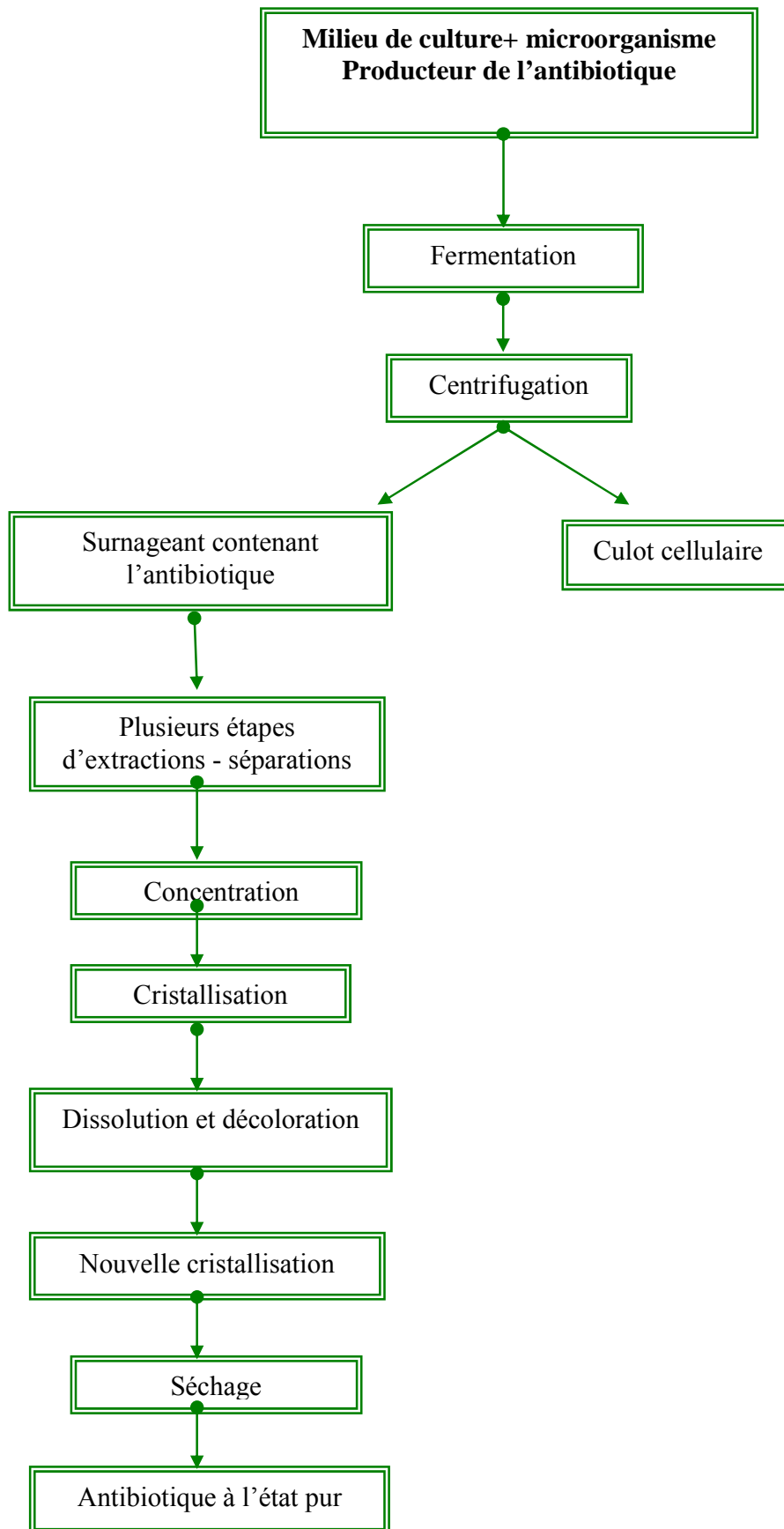
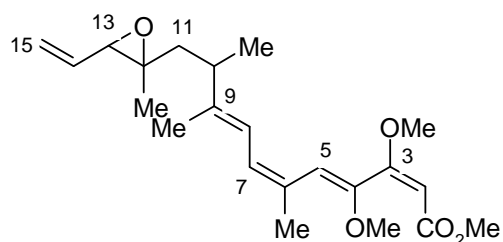


Figure 8 : Schéma général conduisant à l'obtention des antibiotiques à l'état pur



**Figure 9:** Structure chimique de la Haliangicine (Fudou *et al.*, 2001)

**Tableau 2:** Les isomères de la Haliangicine (Bangi *et al.*, 2003)

Composés	Géométrie			
	C2	C4	C6	Epoxide
Haliangicine (1)	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>Z</i>	<i>trans</i>
Cis-haliangicine (2)	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>Z</i>	<i>cis</i>
Haliangicine B (3)	<i>Z</i>	<i>Z</i>	<i>Z</i>	<i>trans</i>
Haliangicine C (4)	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>trans</i>
Haliangicine D (5)	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>trans</i>

## D. RESISTANCE MICROBIENNES AUX BIOMOLECULES

La découverte des antibiotiques à la fin des années 1940 a marqué une étape capitale dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces traitements ont permis d'épargner un grand nombre de vies et l'on a cru, un peu trop vite, que les maladies infectieuses seraient un jour toutes jugulées. En effet, cette introduction aurait dû provoquer une catastrophe chez les microbes, mais leur plasticité génétique leur a permis, non seulement de survivre, mais même de prospérer dans cet environnement hostile. Ainsi, on assiste de plus en plus au développement de souches

microbiennes résistantes aux molécules bioactives. Plus la résistance est élevée, plus on prescrit de biomolécules et on favorise l'émergence de nouvelles résistances et la survenue d'infections incurables. On assiste à une sorte de spirale infernale de la résistance, avec ses graves conséquences médicales.

## **I. Résistance aux antibiotiques**

Les mécanismes de résistances aux différents antibiotiques ont été dans la plupart des cas élucidés. Pour chacune des classes d'antibiotiques, il existe au moins un mécanisme permettant à la bactérie résistante de se protéger. D'après (Davies et Mazel 1994), les diverses formes de résistances aux antibiotiques (ATB) sont:

- ❖ Réduction de la perméabilité cellulaire aux ATB ;
- ❖ Inhibition du transport actif des ATB ;
- ❖ Rejet des ATB hors de la cellule par efflux actif grâce à une pompe à protons ;
- ❖ Modification de la cible d'ATB ;
- ❖ Amplification de la cible de l'ATB ;
- ❖ Inactivation de l'ATB par des enzymes bactériennes ;
- ❖ Et apparition d'une voie métabolique alternative.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est très complexe et peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. On peut citer par exemple, la résistance naturelle des entérobactéries et des *Pseudomonas* aux macrolides. La résistance acquise peut être soit par acquisition de gènes (résistance des Staphylocoques à la vancomycine), soit par mutation chromosomique (résistance des *Citrobacter* aux céphalosporines).

## **II. Résistance aux antifongiques**

A l'exemple des bactéries qui deviennent résistantes aux antibiotiques, les champignons pathogènes pour l'homme (causant des mycoses) ainsi que les phytopathogènes développent des formes de résistances aux antifongiques et aux fongicides respectivement.

Plusieurs familles thérapeutiques sont utilisables actuellement dans le traitement des mycoses à savoir : les polyènes (nystatine et amphotéricine B), les azolés (imidazolés et triazolés), etc. Les antifongiques agissent différemment selon leur famille chimique sur les organites cibles des champignons (Viguié, 2000) on distingue:

- Action sur la synthèse de la paroi fongique : polyoxines, nikkomycines, papulacandines.
- Action sur la membrane plasmique (polyènes, ciclopiroxolamine), ou l'ergostérol, constituant spécifique de la paroi des cellules fongiques (allylamines, azolés, terbinafine, thiocarbamate et amorphine).
- Blocage de la division cellulaire (griseofulvine).
- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (flucytosine).
- Inhibition de la chaîne respiratoire avec comme cible les mitochondries (ciclopiroxolamine).

En agriculture, les antifongiques (qu'on appelle aussi "fongicides") sont devenus une partie intégrale de production efficace. Plusieurs fongicides sont employés pour combattre des infections fongiques dans l'environnement mais ne sont pas utilisés en médecine en raison de leur toxicité. L'utilisation d'agents antifongiques de même classe chez l'homme et dans l'environnement pose des problèmes potentiels, particulièrement le développement de résistances. La résistance clinique d'*Aspergillus fumigatus* aux traitements par l'itraconazole, un des antifongiques les plus utilisés en médecine pour combattre les aspegilloses, augmente de plus en plus. *Aspergillus fumigatus* est aussi un organisme jouant un rôle important dans la dégradation de composants organiques. Il se répand dans l'environnement par la dispersion de spores de très petite taille. C'est l'espèce de champignon causant le plus d'infections (que l'on nomme "aspergilloses") à l'échelle mondiale (Accoceberry et Noel , 2006).

Les mécanismes de résistance, mis en place par certaines souches de champignons, sont maintenant mieux connus, en particulier chez les levures du genre *Candida*. Dans la majorité des cas, ces mécanismes reposent soit sur des mutations qui ont pour effet de modifier la cible de l'antifongique ou d'en bloquer l'accès, soit sur la surexpression de gènes codant pour la cible ou pour des transporteurs membranaires impliqués dans un rejet actif de l'antifongique.

L'émergence de la résistance des bactéries et des champignons pathogènes aux antibiotiques et aux antifongiques communément utilisés, constitue actuellement un problème très épineux. Pour combattre cette situation alarmante, de nouvelles biomolécules sont nécessaires. Ces dernières peuvent être obtenues par voie naturelle à partir de nouvelles souches microbiennes notamment les *Streptomyces*, par semi-synthèse ou synthèse totale, par génie génétique (manipulation des voies de biosynthèse pour obtenir des nouvelles biomolécules hybrides). A côté de ces possibilités, s'ajoute celle des bactériocines.

## **E. LES BACTERIOCINES**

Différentes définitions ont été données au cours du temps pour les bactériocines. Celle de (Klaenhammer, 1988) définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Actuellement, on admet une définition plus générale et le spectre d'activité des bactériocines peut être étroit et confiné à des bactéries fortement apparentées à l'espèce productrice ou, à l'opposé, large et agir sur une variété d'espèces microbiennes.

### **I. Domaines d'applications des bactériocines**

#### **I.1. Le typage bactérien**

Le pouvoir des bactériocines à inhiber certaines souches de la même espèce productrice et parfois des souches des autres espèces a été largement utilisé pour l'identification d'espèces de différents genres bactériens. La plupart des méthodes est basée sur l'inhibition d'une souche dite indicatrice ou sensible aux bactériocines. Cette méthode a été utilisée avec succès pour certaines bactéries Gram-négatif, telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Pitt et Gaston 1995). L'utilisation des bactériocines a permis aussi à Merino *et al.*, 2000 de différencier les souches de *Shigella*.

#### **I.2. Domaine alimentaire**

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (Ryan



*et al.*, 1998). Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (Harlander, 1993 ; Galvarez *et al.*, 2007). Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention. En effet, plusieurs bactériocines montrent des effets synergiques ou additionnels lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels (Grande *et al.*, 2007), et même d'autres protéines antimicrobiennes. L'utilisation combinée de bactériocines différentes, peut être aussi une approche attirante pour éviter le développement de souches résistantes (Galvarez *et al.*, 2007). La combinaison de bactériocines avec des traitements physiques, comme le traitement à haute pression ou dans un champ électrique, offre une conservation plus efficace des produits alimentaires, fournissant ainsi une barrière complémentaire aux formes les plus résistantes comme les endospores bactériennes (Galvarez *et al.*, 2007).

Malgré le fait que la majorité des bactériocines soit des substances naturelles non toxiques, seule la nisine est reconnue jusqu'à maintenant comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (Delves-Broughton, 1990). Ainsi, la nisine est utilisée comme additif dans les aliments en conserves, notamment dans les produits laitiers, les soupes et les poudings à base de céréales (Eckner *et al.*, 1992). Par ailleurs, Rayman *et al.*, 1981 ont démontré que l'interaction synergique entre la nisine et les nitrites contre les spores de *Clostridium botulinum* permettrait de réduire l'emploi de ces substances cancérigènes. A ce jour, plus de 45 pays ont approuvé l'utilisation de la nisine comme agent de conservation, ce qui fait de la nisine la bactériocine la plus utilisée à travers le monde (Riley et Wertz, 2002). Tout comme la nisine, l'utilisation de la pédiocine dans la conservation des viandes, des salades et du fromage a été brevetée en Europe (Chen *et al.*, 1997a).

### **I.3. Domaines de la médecine humaine et vétérinaire**

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendrait de sérieux problèmes de toxicité et de résistance. Par leurs caractéristiques mentionnées précédemment, les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des

agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie.

Quelques lantibiotiques sont utilisables dans les applications médicales pour l'espèce humaine et animale. L'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* (Allgaier *et al.*, 1986) est active contre *Propionibacterium acnes*, qui cause l'acné. Ce lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques et leur faible coût de production par rapport aux antibiotiques. La nisine, quant à elle, peut être utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pHs acides et son activité contre *Helicobacter pylori* (De Vuyst et Vandamme, 1993). Trois autres bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* YIT 9029 et *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 montrent une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* qui cause des ulcères gastriques (Avonts et De Vuyst, 2001). Cinnamycine produite par différentes souches de *Streptomyces* spp est impliqué dans l'immunité humaine (prolifération des leucocytes) et la régulation de la pression du sang avec l'intervention de phospholipase A2 et l'enzyme de conservation de l'angiotensine. De plus, ce groupe peut être impliqué aussi dans la protection contre le virus *Herpes simplex* (Marki et Franson, 1986). Une « bacteriocin-like inhibitory substance » (BLIS) anti – *Streptococcus pyogenes* produite par *Streptococcus salivarius* est appliquée dans la préservation de la pharyngite streptococcique (Tagg, 2004).

Dans le domaine de la médecine vétérinaire, les bactériocines pourraient être utilisées avec les ionophores dans une stratégie visant à prévenir l'apparition d'une résistance. L'utilisation d'une bactériocine à la place d'un antibiotique, par intermittence, aiderait à détruire les populations résistantes. Les ionophores antibiotiques ont un très large spectre d'action, donc ils peuvent agir sur à peu près la moitié de la flore naturelle trouvée dans le rumen des bovins, alors que les bactériocines sont par contre extrêmement spécifiques, ce qui permet, par exemple, de cibler seulement les bactéries qui dégradent des protéines alimentaires ou seulement celles qui produisent du méthane. Un autre avantage qui s'ajoute, tient au fait que les bactériocines sont des protéines non toxiques qui se digèrent facilement. Comme elles sont digérées par l'animal, il n'y a aucun risque qu'il reste des résidus dans la viande ou le lait. Par contre, les ionophores

antibiotiques classiques ne sont pas digestibles, sont très toxiques et doivent être manipulés et administrés avec précaution.

#### **I.4. Domaine agricole**

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences, sont les objets de l'exploitation des bactériocines en agriculture. Dans ce cas, les substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes (Paik *et al.*, 1997).

## **II. Microorganismes producteurs de bactériocines**

De nombreuses souches bactériennes, à Gram positive et à Gram négative ont été décrites pour leurs capacités à produire des bactériocines (Tableau 3). Pour les bactériocines du genre *Bacillus* on peut citer : la subtiline produite par *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Klein *et al.*, 1993) similaire à la nisine, la coaguline sécrétée par *Bacillus coagulans* I(4) (Le Marrec *et al.*, 2000), la bacillocine 490 produite par *Bacillus licheniformis* (Martirani *et al.*, 2002), la polyfermenticine SCD sécrétée par *Bacillus polyfermenticus* (Lee *et al.*, 2001), l'entomocine et la thuricine produites par *Bacillus thuringiensis* (Cherif *et al.*, 2008), etc.

Cependant, les bactéries lactiques restent les meilleures candidates pour la production de bactériocines. Ces dernières sont l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. Produites par de nombreuses espèces et dirigées contre des espèces homologues ou plus éloignées, comme *Listeria monocytogenes*, leur structure primaire a permis de définir une classification en trois classes (lantibiotiques, petites bactériocines, non lantibiotiques et bactériocines de grande taille). Leur mode d'action a été également analysé et différents modèles existent pour expliquer la perforation des membranes des cellules cibles de ces bactériocines. La formation de pores membranaires se fait via un récepteur protéique (non lantibiotique) ou par une insertion directe dans les bicouches phospholipidiques (lantibiotiques). Dans tous les cas, plusieurs molécules d'une même bactériocine agissent en synergie.

**Tableau 3** : Souches productrices de bactériocines (Gillor *et al.*, 2005).

Bactériocines	Souches indicatrices
Lantibiotiques	
Ancovenin	<i>Streptomyces.spp</i>
Cinnamycin	<i>Streptoverticillum and Sytreptomyces spp.</i>
Duramycin	<i>Streptoverticillum and Sytreptomyces spp.</i>
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Lacticin	<i>Lactococcus lactis</i>
Labthiopeptin	<i>Streptoverticillum cinnamonomum</i>
Mersacidin	<i>Bacillus subtilis</i>
Mutacin	<i>Streptococcus mutans</i>
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Colicins	
Ia, E1, E4,E7, E8, K et S8	<i>E.coli</i>
Microcins	
24, B17 et J25	<i>E.coli</i>
E294	<i>Klebsilla pneumoniae</i>
Pyocins	
S-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram (-) productrices de bactériocines	
Serracin-P	<i>Serratia plymthicum</i>
Glycinicin	<i>Xanthomonas campestris</i>
Carotovoricin	<i>Erwinia carotovora</i>

### III. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

#### III-1 Le pH et les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique

et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (Liu, 2003). Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Klaenhammer, 1993; Brul *et al.*, 1999; Caplice *et al.*, 1999; Hsiao *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2007).

Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments (Brul *et al.*, 1999) et sont reconnus comme des additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture (Hsiao *et al.*, 1999). Le principal problème consécutif à leur utilisation est la haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables et qui est parfois inacceptable pour le consommateur (Kobilinsky *et al.*, 2007). La concentration minimale inhibitrice (qui est la plus petite quantité d'acide qui peut empêcher la croissance d'un microorganisme) de chacun de ces acides doit être déterminée dans des conditions précises de pH mais aussi d'activité de l'eau, de température... (Hsiao *et al.*, 1999). Elle varie avec chaque microorganisme à inhiber. Hsiao *et al.*, 1999 ont montré qu'une concentration en acide acétique de 0,105 g/l inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* à un pH de 5,3 alors qu'il faut une concentration de 27,5 g/l pour inhiber *Lactobacillus plantarum* et une concentration de 1,6 g/l pour inhiber *Escherichia coli* dans les mêmes conditions. *Listeria monocytogenes* est inhibée par l'acide lactique et l'acide chlorhydrique à 9,0 g/l respectivement à un pH de 3,7 et 3,4 (Gravesen *et al.*, 2004).

### **III. 2. Le peroxyde d'hydrogène**

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Le peroxyde d'oxygène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan *et al.*, 2005). Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène

qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui sont parfois décrites comme étant des pseudocatalases (Strus *et al.*, 2006). La concentration de peroxyde d'hydrogène produite par des *Lactobacilli* varie entre 0,001 et 8 mM, en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions de cultures (Sakamoto *et al.*, 1998; Kullisaar *et al.*, 2002; Zalan *et al.*, 2005; Strus *et al.*, 2006). Son action se manifestera aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (Zalan *et al.*, 2005).

### **III.3. Le dioxyde de carbone**

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor *et al.*, 2006).

### **III.4. Le diacétyl**

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. et *Pediococcus* sp. Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney *et al.*, 1998). Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7 ppm) (Caplice *et al.*, 1999).

### **III.5. La reutérine**

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (El-Ziney *et al.*, 1998). La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord deshydraté par

une «glycérol deshydratase» pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. La reutéline s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (Vollenweider, 2004). La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif), les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004).

### **III.6. Les bactériocines**

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes comme proposées par (Klaenhammer, 1993):

#### **III.6.1. Classe I : Les lantibiotiques**

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147.

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par la liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur du peptidoglycane. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la mort de la cellule (McAuliffe et Hill., 2001 ; Twomey *et al.*, 2002 ; Bauer *et al.*, 2005 ; Patton *et al.*, 2005).

Les lantibiotiques composés de deux peptides comme la lacticine 3147 agissent également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (McAuliffe et Hill., 2001). La lacticine 3147 a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été récemment proposé que la lacticine 3147 A1 agit en se liant au lipide II, inhibant la synthèse du peptidoglycane et permettant à la lacticine 3147 A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible (Morgan *et al.*, 2005 ; Wiedemann *et al.*, 2006).

### **III. 6. 2. Classe II.**

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Le tableau 4, présente les séquences de quelques bactériocines appartenant à cette classe. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes.

- *La sous-classe IIa.* Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland *et al.*, 2000 ; Richard *et al.*, 2006). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Eijsink *et al.*, 1998 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Drider *et al.*, 2006 ; Richard *et al.*, 2006).

- *La sous-classe IIb.* Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.

- *La sous-classe IIc.* Toutes les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes a et b.



Tableau 4 : Séquences de quelques bactériocine de classe II

Classe IIa: « Pediocin-like bacteriocin »	
Mésentéricine Y105	MTNMKSVEAYQQLDNQNLKRVVGGKYYGNVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHLRLANGNGFW
Sakacine P	-----MEKFIELSLKEVTAITGGKYYGNVHCGKHSCTVDWGTAIIGNIGNNAAANWATGWNAGG
Curvacine A	-----MNNVKELSMTELQTITGGARSYGNVYCNKNCQWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM
Piscicoline 126	-----MKTVKELSVKEMQLTTGGKYYGNVSCNKNKCTVDWSKAIGIIGNNAAANLTTGGAAGWNKG
Carnobactériocine Bml	-----MKSVELNKEMWINGGAISSYGNVYCNKEKQWVNKAENKQAITGIVIGGWASSLAGMGH
Pédiocine PA-1	-----MKKIEKLTEKEMANIIGGKYYGNVTCGKHSQSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC
Entéroccine A	-MKHLKILSIKETWLIYGGTTHSGKYYGNVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC
Sakacine G	-----MKNTRSLTIQEIKSITGGKYYGNVSCNSHGCQAVTCGVNHLANGGHGGVC
Classe IIb: « Two-peptides bacteriocin »	
ABP-118	α KRGPNCVGNFLGGLFAGAAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL β KNGYGGSGNRVWHCGAGIVGGALIGAIGGFWSAVAGGISGGFTSCR
Lactocine 705	α MDNLNKFKKLSDNKLQATIGG β MESNKLEKFANISNKDLNKITGG
Lactococcine MN	M IRGTGKGLAAAMVSGAAMGGAIGAFGGPVGAIMGAWGGAVGGAMKYSI N GSIWGAIAGGAVKGAIAASWTGNPVGIGMSALGGAVLGGVTYARFVH
Plantaricine EF	E FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSI R F VFHAYSARGVRRNYKSAVGPADWVISAVERGFIHG
Classe IIc	
Plantaricine A	MKIQIKGMKQLSNKEMQKIVGGRSSAYSLSQMGATAIKQVKKLFKKWGW
Lactococcine A	MKNQLNFNIVSDEBLSEANGGLTFIQSTAAGDLYYNTNTHKYVYQQTQNAFGAAANTIVNGWMGG AAGGFGLHH
Lactococcine 972	MKTKSLVLALSAVTLFSAGGIVAQAEGTWQHGYGVSSAYSNYHHGSKTHSATVVNNNTGRQKDTQ RAGVWAKATVGRNLTEKASFYYNFW

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent, la mort de la cellule (Dalet *et al.*, 2000 ; Héchard *et al.*, 2001 ; Gravesen *et al.*, 2002 ; Arous *et al.*, 2004 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004 ; Bauer et Dicks., 2005). Le mécanisme de formation des pores n'est pas bien connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (Ennahar *et al.*, 2000 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Diep *et al.*, 2007). Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram<sup>+</sup>. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules à savoir les cations et les anions (Oppegard *et al.*, 2007). Le ratio optimal d'activité entre les deux sous-unités est en général de 1:1 mais il est de 4:1 pour la lactocine 705 (Castellano *et al.*, 2007 ; Oppegard *et al.*, 2007). Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines entre elles et avec la membrane cellulaire ne sont que très peu connus. Il a été montré qu'il n'y avait pas de liaison au même récepteur que pour les bactériocines de classe IIa (la « mannose perméase »). (Diep *et al.*, 2007) et Castellano *et al.*,

2007) ont récemment montré que les deux peptides composant la lactocine 705 ont des activités bien spécifiques. La lactocine 705 $\alpha$  interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la lactocine 705 $\beta$  de former des pores.

### **III.6.3. Classe III**

Ce sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2007).

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques du peptidoglycane des cellules sensibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (Nilsen *et al.*, 2003).

### **III. 6. 4. Classe IV**

Ce sont des peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité.

## **IV. La production des bactériocines**

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie productrice (Savijoki *et al.*, 2006) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à sa baisse de concentration de bactériocines dans le milieu de culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée.

Comme l'ont montré Moretro *et al.*, 2000 pour la production de sakacin P par *L. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de

production peut être variable. Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement de l'optimisation de la production de bactériocines (Parente *et al.*, 1999). Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (Verluyten *et al.*, 2004). Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux de la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de sakacin P par *L. sakei* CCUG42687 (Moretro *et al.*, 2000), d'amylovorin L471 par *L. amylovorus* DCE471 (De Vuyst *et al.*, 1996) et de pediocin PA-1 par *Pediococcus damnosus* (Nel *et al.*, 2001).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et d'azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (Aasen *et al.*, 2000 ; Nel *et al.*, 2001; Todorov *et al.*, 2004 ; Verluyten *et al.*, 2004). D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (Leal-Sanchez *et al.*, 2002 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2007 ; Anastasiadou *et al.*, 2008). L'ajout de ces nutriments lors d'une culture fed-batch permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en *batch* (Callewaert *et al.*, 2000 ; Lv *et al.*, 2005 ; Pérez Guerra *et al.*, 2005). L'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées dans des biofilms ou des billes d'alginate de calcium. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la lacticine 3147 et la nisine (Scannell *et al.*, 2000 ; Pongtharangkul *et al.*, 2006).

## **V. Le conditionnement des bactériocines**

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges

d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre est la semi - purification. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (Parente *et al.*, 1999). La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée.

## **VI. L'application des bactériocines dans le secteur alimentaire**

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ*.

### **VI. 1. Application de la bactériocine**

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après leur production en fermenteur. D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (Guinane *et al.*, 2005). Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment fait avec la lacticine 3147, un lantibiotique (Deegan *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007).

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en l'immobilisation sur des cellules productrices dans des gels ou des films tels que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides, etc. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de sa conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se

développer en surface durant la conservation du produit (Luchansky *et al.*, 2004 ; Deegan *et al.*, 2006 ; Ghalfi *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007).

## **VI. 2. Application de la bactérie productrice de bactériocines**

Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Elles doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans l'aliment à conserver. La composition du produit (nutriments accessibles, pH, additifs alimentaires, etc.) et les conditions de stockage (température, atmosphère, activité d'eau, etc.) doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocines. Si les bactéries sont ajoutées en tant que starter dans des produits fermentés, elles doivent pouvoir conférer au produit les propriétés organoleptiques désirables tout en produisant des bactériocines. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être également ajoutées en combinaison avec un autre starter qui confèrera les propriétés organoleptiques désirables. Dans ce cas, la bactérie productrice de bactériocines ne doit pas détériorer les qualités organoleptiques de l'aliment fermenté et la bactériocine produite ne doit pas avoir d'activité contre le starter (Deegan *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007).

Si la bactérie est appliquée en tant que culture protectrice, elle doit être capable de produire sa bactériocine sans modifier les propriétés organoleptiques (Rodgers, 2001). La concentration cellulaire maximale atteinte dans le produit doit par ailleurs être inférieure à la limite de  $10^6$  cfu/g généralement admise pour les produits non fermentés.

## A. MATERIEL

### I. Bactéries

#### I. 1. Souches d'*E. coli* pour les manipulations de clonage

Les souches d'*E. coli* utilisées lors des manipulations de clonage sont: DH5 $\alpha$ : *supE44*,  $\Delta$ lacU169, ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*, et TOP 10: *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 *deoR* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*.

#### I. 2. Bactéries lactiques

##### I.2.1. Productrices de bactériocines

La sélection de souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines a été réalisée sur une collection de cinquante quatre souches préalablement isolée lors de travaux antérieurs effectués au LEMP-CBS. Parmi les souches retenues, une appelée TN635 qui a fait l'objet d'une partie du travail de cette présente thèse.

##### I.2.2. Utilisées comme cellules indicatrices

*Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus sakei* 2525, *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20081, *Lactobacillus lactis* ATCC 11454 et *Lactobacillus lactis* subsp *cremoris* DSM 11603).

#### I. 3. Autres bactéries indicatrices

Bactéries Gram positives: *Micrococcus. luteus* LB 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria ivanovii* BUG 496, *Enterococcus faecalis* JH 2-2 et *Enterococcus faecium* ENSAIA 631. Bactéries à Gram négative *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189, *Hafnia* sp et *Serratia* sp.

#### **I. 4. *Streptomyces***

Deux souches ont fait l'objet d'études approfondies durant ce présent travail. Il s'agit de la souches TN17 et Fr10 qui ont été isolées, sélectionnées et identifiées lors de travaux antérieurs réalisés au LMB-CBS. Pour les études taxonomiques, les souches utilisées sont:

- trois souches apparentées à la souche TN17 qui sont: *Streptomyces lavendofoliae* NBRC 12882, *Streptomyces gobitricini* NBRC 15419 et *Streptomyces lilaceus* NBRC 13676
- Deux souches apparentées à la souche Fr10 qui sont: *Streptomyces microflavus* DSM 40331 et *Streptomyces griseorubiginosus* DSM 40469.

#### **II. Champignons**

Les activités antifongiques ont été déterminées contre le champignon filamenteux *Fusarium* sp., isolé à partir d'un consortium microbien au CBS, et la levure unicellulaire *Candida tropicalis* R2 CIP203 (CTR2), qui est une souche de référence résistante aux deux antifongiques polyéniques majeurs : l'amphotéricine B et la nystatine.

#### **III. Vecteur de clonage**

Le vecteur utilisé pour le clonage du gène ARN 16S de la souche TN635 est le pIJ2925 (Janssen et Bibb, 1993) : C'est un vecteur dérivé du pUC18 ayant une taille de 2,71 kb et portant le gène de la résistance à l'ampicilline. Il porte deux sites de restrictions *Bgl*III de part et d'autre du site multiple de clonage "polylinker".

#### **IV. Les milieux de cultures**

Sauf indication, la composition des milieux indiqués provient de Sambrook *et al.*, (1989) pour *E. coli*, Hopwood *et al.*, (1985) pour *Streptomyces* et de Man Rogosa et Sharpe (MRS) pour les bactéries lactiques. Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage en cycle humide 20 min à 120 °C.

##### **IV. 1. Milieux solides**

##### **IV. 1. 1. Milieux utilisés pour les souches d'*Escherichia coli***

C'est le milieu LB (Luria Bertani) de la composition : 10 g peptone ; 5 g NaCl ; 5 g extrait de levure ; H<sub>2</sub>O distillée q.s.p. 1l ; pH 7,2 et 15 g agar. Ce milieu est additionné si nécessaire, par l'antibiotique voulu et par le X-gal et l'IPTG à des concentrations appropriées. Pour le test des activités antibactériennes contre *E. coli*, le milieu utilisé est le LB à 5 g/l d'agar.

## **IV. 1. 2. Milieux utilisés pour les cellules indicatrices**

### **IV.1.2.1. Bactéries**

Pour les bactéries lactiques de genre *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus sakei* 2525 et *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20081) le milieu utilisé est le milieu MRS «Man, Rogosa and Sharpe» dont la composition est : polypeptone (10g/l), extrait de viande (10g/l), extrait autolytique de levure (5g/l), glucose (20g/l), Tween 80 (1,08g/l), phosphate dipotassique (2g/l), acétate de sodium (5g/l), citrate d'ammonium (2g/l), sulfate de magnésium (0,2 g/l) et sulfate de manganèse (0,05 g/l) . Pour les bactéries lactiques du genre *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* ATCC 11454 et *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* DSM 11603) le milieu utilisé est le milieu M17 dont la composition est : peptone (5 g/l), extrait de viande (2,5 g/l), peptone de caséine (2,5/g), extrait de levure (2,5g/l), extrait de levure (5g/l), glucose (5 g/l), acide ascorbique (0,5 g/l), sulphate de magnésium (0,25 g/l), hydrogénophosphate de dipotassium (13,3 g/l), dihydrogénophosphate de potassium (5,7 g/l) et agar (15 g/l). Pour *Listeria ivanovii* BUG 496, *Enterococcus faecalis* JH 2-2, *Enterococcus faecium* ENASAIA 631, *Serratia sp.* et *Hafnia sp.* et le milieu de culture utilisé est le BHI (Brain Heart Infusion) dont la composition : perfusion du cœur et du cerveau de porc (17,5g/l), gélatine de pancréas digéré (10g/l), chlorure de sodium (5g/l), phosphate disodique (2,5 g/l) et glucose (2g/l).

### **IV.1.2.2. Champignons**

Pour le champignon filamenteux, *Fusarium sp.*, c'est le milieu PDA commercial (Potato Dextrose Agar : Pomme de terre – Glucose – Agar) à raison de 39,5g/l. Concernant la levure *Candida tropicalis* R2 CIP203, le milieu utilisé est le YP10 dont la composition est : 10 g/l extrait de levure, 10 g/l peptone, 100 g/l glucose, 15 ml d'une solution d'adénine à 2 g/l et 15g/l Agar.

## **IV. 1. 3. Milieux utilisés pour les bactéries lactiques productrices de bactériocines**

C'est le milieu MRS solide

## **IV. 1. 4. Milieux utilisés pour les souches de *Streptomyces***

### **IV.1.4.1. Milieux de sporulation**

Pour la sporulation, deux milieux de cultures ont été utilisés :



\* Milieu Gruau : 30 g gruau ; 5 g glucose ; 5 g extrait de levure ; 1 g extrait de viande ; H<sub>2</sub>O distillée q.s.p. 1l ; pH 7,2 et 15 g agar

\* Milieu R2 (Okanish *et al.*, 1974) : 103 g sucrose ; 0,25 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 10,12 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ; 10 g Glucose ; 0,1 g casaminoacide ; H<sub>2</sub>O distillée q.s.p. 800 mL. Pour 80 ml du milieu R2, on ajoute 2,2 g Agar et autoclaver, après autoclavage ajouter: 1ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5%) ; 8 ml CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (3,68%) ; 1,5 ml L-proline (20%) ; 10 mL tampon TES (5,73% ; pH 7,2) ; 0,2 ml Oligo-éléments ; 0,5 ml NaOH (1N) ; 0,75 ml Facteurs de croissance. Pour les oligo-éléments (/l): 40 mg ZnCl<sub>2</sub> ; 200 mg FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ; 10 mg CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ; 10 mg MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ; 10 mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O ; 10 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O.

#### **IV.1.4.2. Milieux utilisés pour les études taxonomiques**

Milieux ISP (International *Streptomyces* Project ; (Shirling and Gottlieb, 1966) ISP1 à ISP9 dont la composition

\* **ISP1** : Extrait de levure 3 g, Tryptone 5 g, Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l.

\* **ISP2** : Extrait de levure 4 g, Extrait de malte 10 g, Dextrose 4 g, Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l.

\* **ISP3** : Farine d'avoine Agar (gruau 20 g, Agar 18 g), ajouter 1ml d'une solution saline dont la composition est la suivante : FeSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O (1g/l) , MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1g/l) et ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1g/l). Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l

\* **ISP4** : Amidon soluble 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> 1g, NaCl 1g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, CaCO<sub>3</sub> 2g, ajouter 1 ml d'une solution saline dont la composition est la suivante : FeSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O (1g/l) , MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1g/l) et ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1g/l). Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l

\* **ISP5** : glycérol 10 g, L-Asparagine 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g, ajouter 1 ml d'une solution saline dont la composition est la suivante : FeSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O (1g/l) , MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1g/l) et ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1g/l). Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l.

\* **ISP6** : Peptone 20 g, Citrate ferrique d'ammonium 0,5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, Thiosulfate de sodium 0,08g, extrait de levure 1 g, Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l.

\* **ISP7** : glycérol 15 g, L-Asparagine 1,0g, L-Tyrosine 0,5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5g, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g, NaCl 0,5g, FeSO<sub>4</sub> 0,01g, Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l.

\* **ISP 8** : Peptone 5g, Galactose 5g, Extrait de viande 3g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5, KNO<sub>3</sub> 1g , Agar 15 g, H<sub>2</sub>O qsp 1l.

\* **ISP9** :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,64 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,38g,  $\text{MgSO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5,65g, auquel on ajoute 1 ml d'une solution saline dont la composition est :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  6,4g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,1g/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  7,9g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5g/l, Agar 15 g,  $\text{H}_2\text{O}$  qsp 1l.

\* Milieu bouillon nitrate pour la mise en évidence de la nitrate réductase: Peptone : 1 g ; extrait de viande : 1 g ; extrait de levure : 2 g ;  $\text{KNO}_3$  : 1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml pH 7,5.

\* Milieu pour l'utilisation des composés glucidiques comme source de carbone (Goodfellow 1971): arabinose, inositol, mannose, raffinose, ribose, sucrose, tréhalose, fructose, galactose, glucose, maltose, lactose, glycérol, rhamnose et xylose, la concentration du sucre est de 10g/L, 10 g ; bacto-yeast-nitrogen base (Difco) : 6,3 g ; hydrolysate de caséine : 0,01 g ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 2 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml pH 7,2.

\* Milieu Gélose nutritive (Goodfellow 1971, Gordon *et al.*, 1974) pour la détermination de la capacité à hydrolyser: la tyrosine, l'hypoxanthine, la xanthine, l'adénine et la guanine : peptone : 5 g ; extrait de viande : 1 g ; extrait de levure : 2 g ;  $\text{NaCl}$  : 5 g ; agar : 15 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml pH 7,5.

\* Milieu pour l'étude de dégradation de l'esculine et l'arbutine (Marchal et Bourdon, 1973) :  
esculine (ou arbutine): 1 g ; citrate de fer ammoniacal : 1 g ; peptone : 10 g ; agar: 18 g ; eau distillée q.s.p.: 1000 ml pH 7.

\* Milieu pour l'étude de la dégradation du tween 80 (Sierra, 1957) : Tween 80 : 10 ml ;  $\text{NaNO}_3$  : 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline: 50 ml ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml; agar : 18 g pH 7,2.

\* Milieu pour l'utilisation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1974): Sel de sodium (Sulfate, Nitrate, Acétate, Tétraborate, Alginate, Hydrogen carbonate, Perchlorate, Desoxycholate, Thiosulfate, Sulfite, benzoate, butyrate, citrate, oxalate, propionate, pyruvate, succinate et tartrate): 2 g de l'un de ces sels,  $\text{NaCl}$ : 2 g ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,2 g ;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ : 1 g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,5g ; agar: 15 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; solution aqueuse de rouge de phénol.

\* Milieu pour l'utilisation des acides aminés (Gordon *et al.*, 1974). C'est le milieu ISP9 additionnée par 1ml d'une solution saline. La concentration d'acide aminé est de 10g/L. Les acides aminés testés sont : Méthionine, Asparagine, Phénylalanine, Acide aspartique, Cystéine,

Tyrosine, Histidine, Alanine, Leucine, Arginine, Isoleucine, Acide glutamique, Thréonine, Proline, Sérine, Tryptophane.

\* Milieu GYEA, pour tester la sensibilité à l'azide de sodium (à 0,001 et 0,01%), au phénol (à 0,05 et 0,1%) et à la lysozyme à 0,005% (Athalye *et al.*, 1985) : extrait de levure : 10 g ; glucose : 10 g ; agar : 18 g ; eau distillée q.s.p.: 1000 ml pH 6,8.

## **IV. 2. Milieux liquides**

### **IV. 2. 1. Milieux utilisés pour *E. coli***

C'est le milieu LB liquide additionné si nécessaire de l'antibiotique approprié.

### **IV. 2. 2. Milieux utilisés pour les souches de *Streptomyces***

- Pour l'extraction d'ADN génomique, c'est le milieu TSB (Tryptic Soy Broth) à 30g additionné de 5g/l d'extrait de levure. Ajuster le volume à 1l par H<sub>2</sub>O distillée et le pH à 7.
- Pour la production des molécules bioactives les milieux utilisés sont : Pour la souche TN17 c'est le milieu TSB (Bouillon triptyque de soja) à 30 g/l additionné de glucose à 1% (w/v) et de (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1 mmol/l. Pour la souche Fr10, il s'agit du milieu TSB à 30 g/l pour la préculture et le milieu Bennett dont la composition est la suivante : Extrait de viande (1g/l), extrait de levure (1g/l), tryptone (1g/l) et glycérol à 0,5% (w/v) pour la culture.

### **IV. 2. 3. Milieux utilisés pour les souches indicatrices**

Pour les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* et *Lactococcus* le milieu utilisé est le MRS. Pour les autres bactéries le milieu utilisé est le LB. Le soft correspondant à ce milieu est du LB à 5g/l d'agar-agar. Concernant *Fusarium sp.* nous avons utilisé le milieu PDA à raison de 39,5 g/l. Pour *Candida tropicalis* R2 CIP203, le milieu utilisé est le YP10.

## **V. Tampons et Solutions**

Sauf indication, la composition des tampons et des solutions utilisés sont décrites par Sambrook *et al.*, (1989).

### V. 1. Tampons

- T.E. 10X : 100 mM Tris base ; 10 mM EDTA ; H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1 l. Ajuster le pH à 8 avec du HCl et autoclaver 20 min à 120°C.
  - T.B.E 10X : 108 g Tris base ; 55 g acide borique ; 7,44 g EDTA ; H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1 l. Ajuster le pH à 8,3.
  - Tampon de chargement de l'ADN : 50% Sucrose ; 75 mM EDTA ; 0,2% Xylène cyanol ; 0,2% Bleu de Bromophénol.
  - Tampon CaCl<sub>2</sub>-MOPS-Glucose (pour la préparation des cellules compétentes d'*E.coli*) : 100mM CaCl<sub>2</sub> ; 100mM MOPS ; 0,5% glucose ; H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1 l. Ajuster le pH à 8.
  - Tampon de migration pour les protéines (10X) : Tris 0,25M pH 8,5, glycine 1M, SDS 1%.
  - Tampon phosphate (0.1M): il est composé par les proportions des solutions A et B suivantes:
    - **Solution A** : tampon phosphate de sodium monobasique (0,2 M) : 27,8 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1000 ml.
    - **Solution B** : tampon de phosphate de sodium dibasique (0,2 M) : 53,65 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dans 1000 ml.
- $V_t = 100 \text{ ml}$  (X ml de A + Y ml de B),  $V_t = \text{volume total égal à } 200\text{ml}$  (Tableau 5).

**Tableau 5** : Composition et pH du tampon phosphate 0,1 M

X (ml)	Y (ml)	pH
93,5	6,5	5,7
87,7	12,3	6
68,5	31,5	6,5
39,0	61,0	7,0
16,0	84,0	7,5
5,3	94,7	8

- Tampons utilisés pour la purification des biomolécules de *Streptomyces* par HPLC : Deux tampons d'élutions ont été utilisés :

- **Tampon A** : H<sub>2</sub>O 99,9 % ; acide formique 0,1%.
- **Tampon B** : Acétonitrile 99,9% ; acide formique 0,1%.
  - Tampons utilisés pour la purification des bactériocines de bactéries lactiques par HPLC : deux tampons ont été utilisés avec un débit de 0.5 ml/min et  $\lambda = 280\text{nm}$
- **Tampon A** : H<sub>2</sub>O 99,9 % ; acide trifluoroacétique "TFA" 0,1%.
- **Tampon B** : Acétonitrile 99,9% ; TFA 0,1%.

Les conditions utilisées sont mentionnées dans le tableau suivant :

**Tableau 6** : Condition HPLC pour la purification de la bactériocine de la souche TN635.

<b>Temps (min)</b>	<b>Tampon A (%)</b>	<b>Tampon B (%)</b>
0	90	10
5	50	50
30	50	50
35	20	80
50	10	90
60	10	90

## V. 2. Solutions

- Solution d'oligo-éléments : 40 mg ZnCl<sub>2</sub> ; 200 mg FeSO<sub>4</sub> ; 6,5 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 13,5 mg MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O et 100 ml H<sub>2</sub>O.
- Solution de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (0,1M).
- Solution de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1M).
- Solution de X-gal : dissoudre 20 mg de 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside (X-gal) dans 1 ml diméthyl-formamide, puis garder à -20°C à l'abri de la lumière.
- Solution d'IPTG : dissoudre 0,2 g d'isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) dans 10 ml d'eau distillée puis stériliser par filtration sur 0,22  $\mu\text{m}$  et garder à -20°C.
- Solution saline pour l'étude de la dégradation du tween 80 : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,25 g ; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O : 0,125 g ; NaCl : 0,125 g ; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O : 0,00 1 g ; MnSO<sub>4</sub> : 0,00 1 g ; eau distillée q.s.p. 50 ml.

- Solution aqueuse de rouge de phénol : 0,04% de rouge de phénol dans 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>D</sub>, pH 6,8.
- Solution saline pour la détermination de l'utilisation des acides aminés: CuSO<sub>4</sub>: 0,64 g, FeSO<sub>4</sub>: 0,11g, MnCl<sub>2</sub>: 0,79g, ZnSO<sub>4</sub>: 0,15g, Eau distillée : 100ml.
- Solutions d'antibiotiques : Ces solutions sont préparées dans H<sub>2</sub>O distillée et sont stockées à -20°C à des concentrations appropriées.
- Solutions HCl et NaOH (1N) pour l'ajustement du pH.
- Solution de catalase à 100 mg/ml pour la détection des activités bactériocines.
- Solution de trypsine (Sigma), pronase (Sigma), protéinase K (Behringer), lipase A (Sigma) et  $\alpha$ -amylase (Sigma) utilisées à une concentration finale de 1 mg/ml.
- Solutions de surfactants (Tween 20, Tween 80, urée, Triton X-100, SDS « sodium dodecyl sulphate », EDTA « ethylenediaminetetraacetic acid » et PMSF « phenylmethanesulphonylfluoride ») utilisées à 1% (V/V).
- Solutions de solvants organiques (acétate d'éthyle, isopropanol et méthanol) utilisées à 50% (V/V).
- Solution de phosphate de sodium à pH 7.
- acrylamide 30%, Bis-acrylamide 0,8%.
- Solution de persulfate d'ammonium : 100 mg de Persulfate d'ammonium dans 1 l d'eau distillée.
- Solution de bleu de charge (5x) : Tris HCl pH8 (100 $\mu$ l d'une solution de 10mM), EDTA (20 $\mu$ l de 1mM), SDS (2,5 ml d'une solution de 2,5%), B-mercaptoéthanol (0,5 ml de solution de 5%), Glycérol (1ml de solution 10%), Bleu de Bromophénol (5 $\mu$ g) et Eau distillée (5,88ml)
- Solution de coloration : 0,25% Bleu Coomassie R-250 dans le mélange : éthanol, eau distillée, acide acétique (5/5/1).
- Solution de décoloration : Ethanol 5%, acide acétique 7%, eau distillée 88%.
- Réactifs utilisés pour la purification des protéines : sulfate d'ammonium, réactif de Bradford (BIO-RAD), TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthyléthyldiamine, SAB (Sérum Albumine Bovine), PMSF (Phénylméthylsulphonyl fluoride) et EDTA.
- Solutions pour la préparation de l'ADN plasmidique à partir d'*E. coli*:

- Solution I : 45 ml glucose 20% ; 25 ml Tris-HCl 1M pH8 ; 20 ml EDTA 0,5 M à pH8 et H<sub>2</sub>O distillée q.s.p. 1 l.

- Solution II : NaOH 0,2 M ; SDS 1%.

- Solution III : 3 M acétate de potassium ; 0,2 M acide acétique glacial ; H<sub>2</sub>O distillée, q.s.p 1 l. Ajuster le pH à 4,8.

- Solutions pour la préparation de l'ADN total à partir de souches *Streptomyces*

- **Solution I** : Sucrose 0,3M; Tris-HCl (pH 8) 25mM; EDTA 25mM.

- **Solution II** : NaOH 0,2M / SDS 1%.

- **Solution III** : 3M acétate de potassium ; ajuster le pH à 4,8 par l'acide acétique glaciale et filtrer sur millipore.

- Solution de Bromure d'Ethidium: solution de marquage d'ADN à 1µg/ml final.

- Solution de phénol (Maniatis *et al.*, 1982): au phénol cristallisé fondu à 68°C, saturé et équilibré par du Tris 0,1 M pH 8, ajouter de l'hydroxyquinoléine à une concentration finale de 0,5%. Faire deux extractions par un volume égal de tampon Tris 1 M pH 8 suivi de plusieurs extractions avec le tampon Tris 0,1 M pH 8, jusqu'à ce que le pH de la phase aqueuse soit supérieur à 7,6. La phase phénolique est ensuite récupérée et conservée.

- Solutions et tampons pour la préparation de l'ADN total à partir de souches de bactéries lactiques :

- **Tampon I** : Glucose 50mM ; Tris 25mM, EDTA 10mM.

- **Solution I** : Lysozyme (5mg/ml).

- **Tampon II** : Tris 10mM, NaCl 100mM, EDTA 5mM et SDS 1%.

- **Solution II**: phénol/chloroforme

- **Solution III** : acétate de sodium (3M)

- Solution de ninhydrine : révélateur des amines, des acides aminés, des osamines et des phospholipides contenant la phosphatidyléthanolamine.

- **Solution de vaporisation**: dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol.

- **Traitement complémentaire:** chauffer à 110°C (5 à 10 min) jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette ou rose).

- Réactif de Dragendorff selon Munier et Macheboeuf: utilisé pour révéler la phosphatidylcholine.
- **Solution a:** dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth basique dans 10 ml d'acide acétique cristallisable et 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>D</sub>.
- **Solution b:** dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>D</sub>.
- **Solution de réserve:** mélanger a et b (volumes égaux). Cette solution se conserve bien au réfrigérateur (flacon sombre).
- **Solution de vaporisation:** avant emploi, mélanger 1 ml de solution de réserve, 2 ml d'acide acétique cristallisable et 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>D</sub>. Les taches de phosphatidylcholine apparaissent orange-jaune.
- Solution de lugol : 1g d'iode et 2g d'iodure de potassium dans 100 H<sub>2</sub>O<sub>D</sub>.

## **VI. Enzymes, Kits et Oligonucléotides**

### **VI. 1. Enzymes**

\* **RNase pancréatique (RNase A)** : la RNase A est solubilisée à une concentration de 10mg/ml. Cette solution est traitée à 100°C pendant 15min. Après refroidissement à la température ambiante, la solution est gardée en aliquote à -20°C.

\* **Protéinase K** (pour la préparation de l'ADN): La protéinase K est solubilisée dans H<sub>2</sub>O distillée stérile à raison de 5mg/ml et garder en aliquote à -20°C.

\* **Les endonucléases de restrictions** sont utilisées selon les instructions du fournisseur.

\* **Phosphatase alcaline** : la phosphatase alcaline d'intestin de veau "CIP" (Calf Intestinal alkaline Phosphatase) est utilisée dans son tampon avec une activité optimale à 37°C.

\* **Ligase** : la ligase utilisée est la T<sub>4</sub> DNA ligase fournie par Amersham. Son activité optimale est atteinte dans le tampon T<sub>4</sub> DNA ligase fourni par le fabricant à une concentration finale de 1X.

\* **Taq DNA polymérase** (Fermentas): enzyme utilisée pour les réactions d'amplifications par PCR.



## **VI. 2. Kits**

\* **Kit de clonage** (clonage du gène ARNr 16S de la souche TN635) : Kit pGEM<sup>®</sup> T Easy Vector System I de Promega.

\* **Kit de purification de l'ADN**: Kit GFX d'Amersham.

## **VI. 3. Oligonucléotides**

Pour l'amplification du gène ARN 16S de la souche TN635 par PCR, les oligonucléotides utilisés sont préparés par Proligo ([www.proligo.com](http://www.proligo.com)).

Oligo 1 (direct): P1 : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et oligo 2 (reverse) P2: 5'-ATGGCTCAGGACGAACGCT-3'

## **VII. Matériel chimique et spectroscopique**

### **VII. 1. Purification des molécules actives**

#### **VII.1.1. A partir de *Streptomyces***

Le matériel utilisé pour la séparation et la purification des molécules actives des jus de fermentation des souches de *Streptomyces* :

- Des plaques CCM : ce sont des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice d'épaisseur 0,2 mm (gel 60 F254) fournies par Merck.
- Des plaques CCE : ce sont des plaques en verre recouvertes de gel de silice d'épaisseur 0,75 mm (gel 60 F254) fournies par Fluka.
- Des colonnes de longueur L et de diamètre  $\Phi$  (selon la nécessité) bien tassées de gel d'adsorption tel que le gel de silice 60 dont la taille des particules est comprise entre 0,035 – 0,070 mm fournie par Fluka, et de gel de filtration tel que le Sephadex LH20 dont la taille des particules est comprise entre 25-100  $\mu\text{m}$  fournie par Sigma-Aldrich.
- Une chromatographie de haute performance (HPLC) Shimadzu type LC-6A équipé d'un détecteur Shimadzu UV Visible SPD-6AV et d'un intégrateur C-R6A, les colonnes utilisées, sont des colonnes en C18 (analytique et semi-préparative).

### **VII.1.2. A partir de bactéries lactiques (bactériocines)**

Le matériel utilisé pour la séparation et la purification de la bactériocine de la souche de *Lactobacillus* TN635 :

- Des Amicon Ultra à un seuil de coupure de 10kDa.
- Une colonne de chromatographie de longueur L= 70 cm et de diamètre  $\Phi= 1,5$ cm bien tassée de gel de filtration Sephadex G25 ayant une limite d'exclusion: 5000 Da, équilibrée avec 20mmol/l du tampon phosphate de sodium (pH7,0) et fournie par Sigma-Aldrich.
- Une chromatographie à haute performance (HPLC, Knauer) : les colonnes utilisées, sont des colonnes en C18 (analytique et semi-préparative).

### **VII. 2. Identification des molécules actives**

- La détermination des spectres d'absorption est réalisée par un spectrophotomètre de type Shimadzu UV-160A.
- Les spectres IR sont détectés par un Spectrométrie infrarouge (IR).
- Trois types d'appareil résonance magnétique nucléaire RMN ont été utilisés qui sont: de genre Bruker AMX 300 (300.135 MHz), de genre Varian unité 300 (300.145) et de genre Varian inova 500 (499.875).
- Pour la détermination des masses des molécules bioactives, on a utilisé un appareil LC/MSMS Trap XCT – Electrospray (Agilent Technologies) équipé d'une HPLC Agilent 100 DAD detector (C18 column Zorbax 300 2.1 x 150 mm).

## B. METHODES

### I. Cultures des bactéries

#### I. 1. Souches d'*E. coli*

En milieu solide, les bactéries sont cultivées sur milieu LB solide additionné si nécessaire d'antibiotique, d'X-gal et d'IPTG à des concentrations appropriées. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant une nuit.

En milieu liquide, les cellules sont cultivées sur milieu LB additionné si nécessaire d'antibiotique. La culture est incubée à 37°C sous une agitation constante de 250 trs/min pendant une nuit.

Pour la conservation, les souches d'*E. coli* sont mises en culture dans le milieu LB liquide additionné si nécessaire d'antibiotique. La suspension cellulaire est mélangée avec du glycérol stérile à une concentration finale de 15%, elle est répartie dans des cryotubes puis conservée à -80°C.

#### I. 2. Souches de *Streptomyces*

En milieu solide, les souches de *Streptomyces* sont cultivées sur milieux Gruau. Les spores apparaissent après environ une semaine d'incubation à 30°C pour les deux souches TN17 et Fr10. Après sporulation, les cultures en milieux liquides sont inoculées à partir de spores obtenues par filtration sur coton comme suit:

- Mettre 10 ml d'eau distillée sur une boîte contenant la souche sporulée en question et gratter soigneusement avec une anse de platine. Passer la solution de spores ainsi récupérée sur une autre boîte.
- Passer sur filtre à coton pour retenir le mycélium.
- Compléter le volume à 45 ml par de l'eau distillée et centrifuger 10 min à 5000 trs/min et à 4°C.
- Reprendre le culot de spores dans du glycérol à 15%, et compter le nombre de spores obtenues sur cellule de Thomas.
- Conserver à -80°C.

Pour la production des biomolécules, des précultures sont préparées à partir des deux souches dans des erlenmeyers de 1 litre contenant chacune 200 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth). L'inoculation est à 10<sup>7</sup> spores/l. Après culture à 30°C pendant 24h et sous une agitation

de 250 rpm, ces précultures serviront pour la préparation des cultures en fermenteurs sous une agitation de 500 rpm. La composition du milieu de ces cultures semi-préparatives est:

\* **Souche TN17** : TSB à 30 g/l supplémenté de glucose à 1% (w/v) et de potassium de phosphate à 1 mmol/l

\* **Souche Fr10** : milieu Bennett (2 g peptone ; 10 g glucose ; 1 g extrait de levure ; 1 g extrait de viande ; pH 7,2 et H<sub>2</sub>O distillée q.s.p.1l) additionné de glycérol à 0,5% (w/v).

Les cultures de productions des biomolécules sont incubées durant trois jours à 30°C.

### **I. 3. Souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635**

La souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 (productrice de bactériocine) est cultivée sur milieu MRS de (Man Rogosa et Sharpe) à 30°C et le stockage est fait à -80°C dans des cryotubes après ajout de 20% (v/v) de glycérol. Avant utilisation, la souche est pré-cultivée deux fois dans MRS pendant 12 h à 30°C. La culture de production de bactériocine est inoculée à 1% (à partir de la deuxième préculture) sans agitation.

## **I. 4. Souches indicatrices**

### **I.4.1. Bactéries**

Pour la détermination des activités antibactériennes, les bactéries sont cultivées sur milieu MRS pour les bactéries lactiques et sur LB pour les autres bactéries dans des conditions d'aérobiose et à 30°C pour les souches suivantes : *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus sakei* 2525, *Lactococcus lactis* ATCC 11454, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 11603, *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica* ATCC43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189 et *Micrococcus. luteus* LB 14110. Dans des conditions d'aérobiose et à 37°C pour les souches suivantes : *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Dans des conditions d'anaérobioses et à 30°C pour les souches : *Enterococcus faecalis* JH 2-2, *Enterococcus faecium* ENSAIA 631, *Hafnia* sp. et *Serratia* sp, et dans des conditions d'anaérobiose à 37°C pour la souche *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20081.

### **I.4.2. Champignons**

Deux souches ont été utilisées. Un champignon filamenteux, *Fusarium* sp., et un champignon unicellulaire, *Candida tropicalis* R2 CIP203. Le *Fusarium* sp., est cultivé sur boîtes

de Pétri contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) puis incubées durant 7 jours à 30°C. Les spores correspondantes sont collectées dans de l'eau distillée puis concentrée pour obtenir une suspension d'environ 10<sup>4</sup> spores/ml. La levure *Candida tropicalis* R2 CIP203 est cultivée en milieu YP10 à 30°C pendant 24h et sous une agitation de 200 rpm.

## **II. Détection des activités biologiques**

### **II.1. Activités biologiques à partir des souches de *Streptomyces***

Après la culture des deux souches étudiées (TN17 et Fr10), et observation microscopique (vérification de l'absence de contaminants), nous procédons à une centrifugation de ces cultures à 8000 tr/min durant 20 min. Après récupération des surnageants, nous testons la présence des activités antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques) soit directement sur les surnageants bruts, soit après des étapes d'extraction et de purification.

#### **II.1.1. Dosage de l'activité antimicrobienne dans le surnageant brut**

- Couvrir une boîte de Pétri contenant du milieu solide « LB » avec 3,5 ml de LB soft (milieu LB à 5g/l agar-agar) contenant 30 µl d'une culture de 5 h (phase exponentielle) de la souche indicatrice en question, ou 100 µl d'une suspension de spores du champignon filamenteux *Fusarium* sp., ou 50 µl d'une culture de la levure *Candida tropicalis* R2 CIP203.

- Laisser sécher les boîtes environ 20 min dans des conditions stériles.

- Sur des disques de 8 mm de diamètre soigneusement mis sur la boîte de Pétri, déposer 150µl du surnageant (par dépôts successifs de 20 µl chacun tout en évitant les débordements). Laissez sécher les disques dans des conditions stériles.

- Placez les boîtes 2 h à 4°C pour faire diffuser l'activité biologique déposée sur le disque vers le milieu de la boîte de pétri.

- Incubez une nuit les boîtes à la température optimale de croissance de la souche indicatrice

La présence de l'activité antimicrobienne dans un surnageant donné est détectée par la formation d'une zone d'inhibition de croissance de la souche indicatrice autour du disque. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus l'activité contenue dans le surnageant est importante.

### **II.1.2. Dosage de l'activité antimicrobienne après extraction des biomolécules**

Au volume du surnageant, nous ajoutons un volume égal de solvant organique, l'acétate d'éthyle. Après extraction liquide - liquide, le volume de la phase organique obtenue est réduit par évaporation (Rotavapor, LABOROTA 4000). Les activités antimicrobiennes au niveau de cette phase organique sont effectuées dans les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus. La seule différence c'est la quantité déposée sur le disque qui est inférieure à 150 µl. Elle varie selon la concentration de la phase organique (entre 20 et 60 µl). Comme témoin négatif, nous déposons sur un disque et pour chaque souche indicatrice 60 µl du solvant d'extraction (l'acétate d'éthyle).

Les molécules pures sont testées dans les mêmes conditions. Les quantités utilisées sont de 50µg par boîte.

## **II.2. Activités biologiques à partir des bactéries lactiques**

Cinquante quatre souches de bactéries lactiques ont été testées pour leur capacité à produire des bactériocines.

### **II.2.1 La méthode d'antagonisme différé**

Pour vérifier la présence d'activité inhibitrice dans les surnageants de culture des souches lactiques testées, nous avons utilisé la méthode d'antagonisme différé. Cette méthode consiste à inclure la souche indicatrice dans une gélose LB pour les bactéries et dans le milieu PDA pour les champignons. Ainsi, la souche indicatrice bactérienne ayant poussé dans un milieu liquide LB durant environ 5 heures est diluée 60 fois (50µl dans 3ml de LB soft, un milieu LB contenant de l'agar à 5g/l). La solution obtenue est ensuite homogénéisée et coulée sur une boîte contenant déjà un milieu gélosé LB. Pour les activités antifongiques, c'est le même principe sauf pour le *Fusarium* sp., nous utilisons une suspension de spores diluée, et pour la levure *Candida tropicalis* R2 CIP203 nous utilisons une dilution d'une culture de 24h. Après étalement de la cellule

indicateur, 20 µl des échantillons à tester sont déposés sur un disque de papier de diamètre 8 mm délicatement mis sur la boîte. Les boîtes sont ensuite placées à 4°C durant 2h pour faire diffuser les biomolécules puis incubées à la température optimale de croissance de la souche indicatrice en question. Comme contrôle négatif, 20µl de milieu MRS incubé sans ensemencement microbien sont déposés sur un disque dans les mêmes conditions.

### **II.2.2 La méthode des dilutions (AWDA)**

Pour doser le pouvoir inhibiteur du surnageant de la culture de la souche TN635, nous avons utilisé la méthode Agar Well Diffusion Assay (AWDA) (Tagg et McGiven 1971). Pour déterminer le nombre d'unités arbitraires du surnageant, nous avons réalisé différentes dilutions. L'activité est définie comme étant l'inverse de la plus grande dilution montrant une zone d'inhibition de la souche indicatrice. Elle est exprimée en unités arbitraires par millilitre (UA/ml).

## **III. Purification et caractérisation des biomolécules**

### **III.1. A partir de souches de *Streptomyces***

#### **III.1.1. Purification**

Pour la purification des biomolécules et après leur extraction à partir du surnageant de la culture de la souche étudiée en utilisant le solvant organique adéquat (acétate d'éthyle) la phase organique obtenue est concentrée puis soumise à plusieurs étapes chromatographiques :

##### **III.1.1.1. Chromatographie sur couche épaisse (CCE)**

La chromatographie sur couche épaisse a le même principe que la chromatographie sur couche mince sauf que cette dernière permet une analyse qualitative alors que la première permet une étude quantitative. Après dépôt de l'extrait à analyser et élution avec le solvant qui nous permet de détecter la bonne séparation, la révélation est effectuée sous UV ce qui permet de marquer les différentes bandes qui existent.

Après grattage des différentes bandes séparément, le contenu correspondant est dissout dans un solvant adéquat. Après filtration et évaporation du solvant, la solution en conséquence est testée pour sa teneur en biomolécules. Si, cette dernière est biologiquement active, nous poursuivons la purification tout en utilisant d'autres techniques chromatographiques. Par ailleurs, et dans des rares cas, la séparation par CCE peut conduire à l'obtention de molécules pures.

### **III.1.1.2. Chromatographie sur colonne**

Dans la présente étude nous avons utilisé la chromatographie d'adsorption et la chromatographie de filtration.

\* *Chromatographie d'adsorption* : Ce genre de chromatographie consiste à séparer les différentes molécules selon leurs polarités. La colonne utilisée présente une longueur et un diamètre qui dépend de la quantité d'extrait à introduire. L'entassement est réalisé par un gel de silice 60 dissout dans un solvant apolaire puis l'élution sera faite par le même solvant tout en augmentant la polarité par un autre solvant plus polaire.

\* *Chromatographie d'exclusion* : Le principe de la chromatographie d'exclusion (appelée aussi filtration sur gel ou tamisage moléculaire ou chromatographie de perméation) repose en première approximation sur la masse molaire des molécules à séparer. La phase stationnaire est constituée de billes de polysaccharides, de type séphadex, gonflées dans le solvant utilisé pour l'élution. Vu que le volume des billes est très finement calibré, les molécules dont le volume est supérieur à celui des billes ne peuvent y pénétrer et sont éluées rapidement. En revanche, les molécules dont le volume est inférieur à celui des billes y pénètrent et y subissent des frottements qui les retardent. En effet, si l'on connaît la masse molaire de la molécule que l'on veut séparer d'un mélange par cette technique, il faut choisir le gel le mieux adapté: c'est celui dont le domaine de fractionnement, c'est-à-dire la gamme des masses molaires pour lesquelles il y a diffusion partielle ou totale, englobe la masse molaire de la molécule à purifier.

### **III.1.1.3. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique instrumentale basée sur les mêmes principes que ceux que la chromatographie classique sur colonne. Elle peut donc mettre en œuvre selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage (qui sont les plus courants), que des phénomènes d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Dans notre cas nous avons utilisé une colonne C18 et comme éluant: A = eau et B = acétonitrile. Selon la nature de la séparation, on utilise un gradient d'élution ou on procède la séparation par un phénomène isocratique

Généralement, pour aboutir à des biomolécules pures, il est indispensable d'utiliser toutes ces différentes techniques chromatographiques. A chaque étape il faut tester l'activité biologique



de la solution en question et également procéder à des tests chimiques par le biais de la chromatographie sur couche mince CCM.

#### **III.1.1.4. Chromatographie sur couche mince**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est relativement facile sur la plaque. Dans le cas contraire, nous devons rendre les tâches visibles par révélation. Les méthodes de révélation utilisées sont les suivantes:

\* *Révélation par Radiation UV* : En exposant la plaque à une source de radiation UV de 365 nm ou de 254nm, certains composés apparaissent sous forme de tâches brillantes.

\* *Révélation chimique* : p-anisaldehyde: (84 / 14/ 1/ 0,5) méthanol, acétate d'éthyle, acide sulfurique, p-anisaldehyde. Ce genre de révélateur permet de mettre en évidence la présence de plusieurs substances entre autres des glycosides, antioxydants, stéroïdes, sapoginines, phénols, alcools et des macrolides.

#### **III.1.2. Caractérisation chimique des biomolécules**

Pour la détermination de la structure chimique des biomolécules purifiées à partir des surnageants des cultures des souches de *Streptomyces*, nous avons utilisé plusieurs techniques spectroscopiques :

##### **III.1.2.1. Spectre Ultraviolet (UV)**

La région de l'UV s'étend de 10 nm à 400 nm mais les spectromètres UV usuels ne permettent le tracé des spectres que pour les longueurs d'onde comprises entre 200 nm et 400 nm (proche UV). Un spectre UV (ou visible) résulte de l'absorption de radiations UV (ou visibles) par une molécule. Dans les régions UV et visible, les longueurs d'ondes correspondent à des différences d'énergie  $DE = E_2 - E_1$  ( $DE = hc/l$  avec  $l$ , longueur d'onde de la radiation) qui affectent le domaine des transitions électroniques : passage d'une orbitale d'énergie  $E_1$  à une orbitale d'énergie  $E_2$  plus élevée. Le retour de l'état excité à l'état fondamental se fait par

restitution sous forme de lumière de l'énergie absorbée. Le principe de dosage par spectrophotométrie UV-visible consiste à chercher l'absorbance à chaque valeur de la longueur d'onde. On utilise un système de type monochromateur pour fixer la longueur d'onde et un photomultiplicateur pour enregistrer l'absorbance correspondante. La variation de la longueur d'onde sur une plage adéquate permet d'obtenir un spectre d'absorption.

Pour cette détermination :

- Dissoudre la molécule pure dans un solvant adéquat
- Préparer une cuve de solvant qui servira de référence.
- Faire un spectre d'absorption de la molécule dans un domaine compris entre 185 et 400 nm.

### **III.1.2.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique polyvalente utile aussi bien en analyse quantitative que structurale. Elle est généralement utilisée en complément des autres méthodes de spectroscopie classiques et de la spectrométrie de masse pour localiser les atomes, de préciser la formule développée et la stéréochimie du composé étudié.

Le spectre RMN est constitué d'un diagramme représentant des signaux de résonance émis par certains noyaux atomiques de l'échantillon. Pour obtenir ces signaux, l'échantillon est soumis à l'action conjointe de deux champs magnétiques dont l'un est intense et fixe, tandis que l'autre est environ 10.000 fois plus faible et variable.

*RMN 2D* : Les spectres RMN 2D possèdent des données de déplacement chimiques sur deux axes de fréquences. Ils permettent une corrélation des fréquences de résonance de différents noyaux. On distingue des corrélations homo ou hétéronucléaire, selon que F1 ou F2 (les deux axes de fréquence) contiennent des fréquences de noyaux de même espèce ou d'espèce différents.

#### **\* Expérience COSY (COrrélation SpectroscopY) :**

Cette expérience permet de visualiser des taches de corrélations dites aussi signaux ou pics d'intersections hors diagonale indiquant les noyaux qui sont couplés entre eux. L'expérience permet à l'aide de ces pics d'intersection, de noter les corrélations entre protons géminés non équivalents et vicinaux et d'obtenir des informations sur la structure moléculaire.

**\* Expérience HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) :**

Elle permet de visualiser sur un spectre à deux dimensions ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) les taches de corrélation correspondantes au couplage direct  $1J$  des protons avec les carbones qui les portent.

**\* Expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) :**

Elle permet de visualiser les taches de corrélation entre un noyau  $^{13}\text{C}$  et un noyau  $^1\text{H}$  via un couplage à longue distance  $^2J$  et  $^3J$ . On peut ainsi observer les carbones quaternaires grâce aux protons se trouvant à des distances  $^2J$  et  $^3J$ . Cette expérience permet de déterminer l'enchaînement du squelette carboné de la molécule étudiée.

### **III.1.2.3. Spectroscopie de Masse**

Parmi les différentes méthodes d'analyses structurales utilisées en chimie organique, la spectrométrie de masse présente l'originalité de s'adresser à des substances analysées en phase gazeuse et non en phase liquide condensée. Toutes les techniques de spectrométrie de masse font appel non aux espèces moléculaires en tant que telles mais aux entités ioniques qui en proviennent. Tous les procédés de spectrométrie de masse reposent en effet sur les déplacements de particules chargées dans des champs électromagnétiques. Cela nécessite donc, pour que l'analyse d'une substance organique soit réalisable en spectrométrie de masse, une étape préalable d'ionisation de l'échantillon.

Un spectromètre de masse comporte trois parties distinctes : Une source d'ion, un analyseur et un détecteur

#### **III.1.2.3.1. Source d'ions**

Enceinte au sein de la quelle les ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé.

Les différentes sources d'ions sont :

**\* Ionisation Electronique (IE) :** Elle s'adresse à des composés suffisamment volatils, apolaires et stables à la chaleur pour que l'évaporation puisse avoir lieu sans pyrolyse. Les ions sont produits par suite à un bombardement de la molécule  $M$  par des électrons de forte énergie émis par un filament incandescent. En raison de l'énergie du faisceau d'électron utilisé, l'ion moléculaire  $M^+$  se décompose suivant un mécanisme qui dépend de la structure moléculaire pour fournir une série d'ions caractéristiques de la molécule étudiée.

**\* Ionisation Electrospray (ESI) :** L'électrospray repose sur l'introduction d'une solution aqueuse du composé à analyser par un capillaire très fin porté à un haut potentiel. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes

chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse.

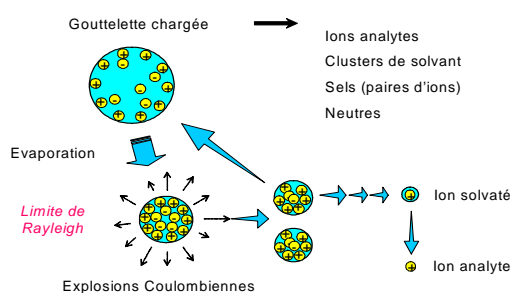
Les spectres ESI présentent en général un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type  $[M+nH]^{n+}$  en mode positif où M correspondant à la masse moléculaire de la molécule analysée, et n au nombre de charges portées par cette molécule ionisée. En mode négatif, la formation d'espèces ionisées s'obtient par déprotonation, anionisation ou perte de contre cation (Figure 10). Dans le présent travail, nous avons utilisé une source ESI.

### III.1.2.3.2. Analyseur

Pour chacune des espèces ioniques issues de la source d'ion, l'analyseur mesure le rapport entre la masse (m) et la charge (z). On distingue deux types d'analyseurs :

\* *Analyseur quadripolaire* : Il est constitué de quatre barreaux, de section hyperbolique ou circulaire, disposés autour de la trajectoire des ions dans l'analyseur. Ces quatre barreaux sont soumis deux à deux à un potentiel composé d'une tension continue (U) et d'une tension alternative (V).

\* *Analyseur à trappe d'ions* : Les ions produits par la source electrospray sont ensuite piégés dans la trappe puis éjectés en fonction de leur m/z pour parvenir au détecteur. Il est bien sûr possible de garder un ion dans la trappe. Cet ion parent peut alors y être fragmenté par collisions avec un gaz rare induisant des dissociations et les ions fils formés sont alors éjectés de la trappe. Il est possible dans certaines conditions de répéter tout le processus plusieurs fois ; c'est de la MS<sup>n</sup>. Dans le présent travail, nous avons utilisé un spectromètre de masse à trappe d'ions.



**Figure 10** : Ionisation Electrospray (ESI)

### **III.1.2.3.3. Détecteur**

Le détecteur mesure en fonction des différentes valeurs de  $m/z$ , l'intensité de signal (I) qui leurs correspond.

## **III.2. A partir de la souche de *Lactobacillus plantarum* TN635**

Pour la purification de la bactériocine BacTN635 à partir de la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, nous avons utilisé une culture de 900 ml (milieu MRS ensemencé à 1% v/v par une préculture de la souche étudiée). Après 16h d'incubation à 30°C et sans agitation, nous avons appliqué au surnageant de culture, quatre étapes de purification différentes pour la purification de la bactériocine BacTN635. Ces étapes sont :

### **III.2.1. Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium**

Pour la purification des bactériocines, les protéines du surnageant brut sont précipitées en présence de sulfate d'ammonium à 40, 60 et 80% de saturation, ajouté peu à peu sous une douce agitation pendant 4h à 4°C. Après centrifugation à  $9000 \times g$  pendant 30 min à 4°C, le précipité est suspendu dans 10 ml de 20 mmol/l de tampon phosphate de sodium (pH 7).

### **III.2.2. Purification sur membrane cutoff (10 kDa)**

Le précipité récupéré est dessalé dans des microconcentrators centrifuges (Amicon, Inc), avec une membrane de coupure 10-kDa. Elle se fait par des centrifugations successives à  $4500 \times g$  pendant 30 min à 4 ° C.

### **III.2.3. Gel filtration sur colonne de Séphadex G-25**

La solution résultante de la deuxième étape de purification, est chargée sur une colonne ( $70 \times 1,5$  cm) de gel filtration Sephadex G-25 équilibrée avec 20 mmol / l du tampon phosphate de sodium (pH 7). L'élution des protéines est effectuée avec le même tampon avec un débit de 30 ml / h. Cent quarante fractions (F1-F140) de 5 ml chacune ont été éluées de la colonne et collectées automatiquement grâce au suivi de l'absorption à 280nm. Ces 140 fractions ont été regroupées en six échantillons (S1-S6): S1 (F1-F40), S2 (F41-F70), S3 (F71-F76), S4 (F77-F81), S5 (F82-F93) et S6 (F94-F140). L'activité antimicrobienne des différentes fractions

recueillies a été testée contre *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica* ATCC43972 et contre *Candida tropicalis* R2 CIP203.

### **III.2.4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

La fraction active a été soumise à une étape de purification par HPLC en phase inverse en utilisant une colonne C18 (300 × 4,6 mm) à un débit de 0,5 ml/min, avec deux solvants : le solvant A (99,9% d'eau, 0,1% d'acide trifluoroacétique "TFA") et le solvant B (99,9% d'acétonitrile, 0,1% TFA). Le programme d'élution est le suivant : de 0 à 5 min (90% A, 10% B), de 5 à 30 min (50% A, 50% B), de 30 à 35 min (20% A, 80% B), de 35 à 50 min (10% A, 90% B) et de 50 à 60 min (90% A, 10% B). Les protéines sont détectées par UV à une longueur d'onde de 280 nm.

### **III.2.5. Effet des différents traitements sur l'activité bactériocine**

Les souches indicatrices utilisées dans ces expériences sont : *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica* ATCC43972, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* JH 2-2 et *Enterococcus faecium* ENSAIA 631 et le champignon pathogène *Candida tropicalis* R2 CIP203. Toutes ces expériences ont été menées simultanément trois fois dans les mêmes conditions. Pour chaque détermination, des tests de contrôle ont été réalisés (sans le traitement correspondant).

#### **III.2.5.1. Effet de la température et du pH**

La sensibilité à la chaleur de la bactériocine de la souche TN635 a été étudiée en traitant le surnageant d'une culture de 16 h de cette souche incubée à 30° C (conditions optimales de production de l'activité antimicrobienne d'après les études cinétiques préalablement réalisées), à différentes températures : 45, 70, 85 et 100°C pendant 90 min et 2 h et à l'autoclave (20 min à 121°C).

Afin de déterminer la sensibilité de la bactériocine au pH, le surnageant de la culture de la souche TN635 (30°C, 16 h d'incubation) est ajustée à différents pH allant de 1 à 14 (intervalle de 1,0) avec des solutions stériles de HCl ou de NaOH 1N. Après 6h de contact à 4°C, le surnageant est ajusté à pH de 7. Les activités antimicrobiennes sont ensuite effectuées sur les différents échantillons traités.

### **III.2.5.2. Effet des enzymes et des surfactants**

Pour la détermination de la nature de l'activité antimicrobienne produite par la souche TN635, nous avons incubé un ml du surnageant d'une culture de cette souche pendant 3 h à 37°C en présence de 1 mg de catalase (Boehringer). Un échantillon du même surnageant non traité a servi de témoin. La sensibilité des composés antimicrobiens contenus dans le surnageant de la culture de la souche TN635 à différentes enzymes : la trypsine, la pronase E (Sigma), la protéinase K (Boehringer), la lipase A (Sigma) et  $\alpha$ -amylase (Sigma) à concentration finale de 1 mg/ml, a été également étudiée. Pour ce faire, les échantillons ont été incubés pendant 2 h à 37°C en présence de l'enzyme testée, et immédiatement après, l'activité résiduelle a été déterminée par la méthode (AWDA). L'effet des surfactants a été également déterminé en utilisant les surfactants suivants : le Tween 20, le Tween 80, l'urée, le Triton X-100, le SDS, l'EDTA et le PMSF ajoutés au surnageant de la culture de la souche TN635 (30°C, 16 h) à une concentration finale de 1% (v/v) et incubé à 30°C pendant 2 h. Les activités résiduelles sont ensuite déterminées tout en réalisant des témoins de contrôles.

### **III.2.5.3. Effet des solvants organiques**

Des échantillons du surnageant de la culture de la souche TN635 (30°C, 16 h) ont été mélangés à des solvants organiques : l'acétate d'éthyle, l'isopropanol et le méthanol à une concentration finale de 50% (v/v). Après une incubation de 1 h à température ambiante, le solvant organique correspondant a été évaporé sous vide par un Rotavapor et l'activité antimicrobienne résiduelle a été déterminée.

### **III.2.6. Electrophorèse en gel polyacrylamide (SDS-PAGE)**

L'estimation de la masse moléculaire de la bactériocine purifiée a été réalisée par SDS-PAGE, gel d'acrylamide à 20% (Laemmli 1970). La concentration en protéine est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford 1976). Le marqueur de protéine utilisé est de BioLabs (2-212 kDa). Après migration, le gel a été coupé en deux parties. La partie contenant l'échantillon et le marqueur de protéine a été traitée par une solution de bleu brillant Coomassie R-250 (Biorad) à 0,25%. La deuxième partie qui contient uniquement l'échantillon, a été lavée avec une solution à 10 mmol/l de tampon phosphate (pH 7.0) pendant 4 h, puis fixée et utilisée pour la détection directe de l'activité antimicrobienne contre *Listeria ivanovii* BUG 496.

### **III.2.7. Mode d'inhibition**

Pour la détermination du mode d'action de la bactériocine, nous avons utilisé deux microorganismes indicateurs: *Listeria ivanovii* BUG 496 et *Candida tropicalis* R2 CIP203. La bactériocine de la souche TN635 partiellement purifiée à 400 UA/ml (la fraction obtenue par chromatographie de filtration sur gel et lyophilisé), a été ajoutée à 200 ml d'une culture de *Listeria ivanovii* BUG 496 (en milieu LB) et 200 ml d'une culture du champignon unicellulaire *Candida tropicalis* R2 CIP203 (en milieu YP10) en début de la phase exponentielle de croissance soit avec environ de  $10^7$  UFC/ml. Les variations de la turbidité des cultures ont été enregistrées à une DO à 600nm et le nombre d'UFC a été déterminé pour chaque culture

### **III.2.8. Détermination de la masse de BacTN635**

Afin de déterminer la masse moléculaire exacte de BacTN635, nous avons utilisée la technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF Applied Biosystems). La matrice utilisée est l'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique préparé à 5 mg/ml dans 50% acétonitrile contenant 0.1% l'acide trifluoroacétique.

## **IV. Techniques d'extraction et de manipulation de l'ADN**

### **IV. 1. Extraction de l'ADN plasmidique à partir d'*E. coli***

#### **IV. 1. 1. Les mini préparations (Birnboim et Doly "1979" modifiée)**

Les bactéries hybergeant les plasmides sont mises en culture de 2 ml en milieu LB additionné de l'antibiotique adéquat. L'ADN plasmidique est préparé comme suit :

- centrifuger 1,5 ml de cette culture dans un tube « Eppendorf » ;
- resuspendre le culot dans 100  $\mu$ l de solution I, puis bien homogénéiser ;
- ajouter ensuite 200  $\mu$ l de solution II préparée extemporanément ;
- mélanger pendant 2 min à température ambiante et garder 5 min dans la glace ;
- ajouter 150  $\mu$ l de la solution III glacée, homogénéiser, garder 10 min dans la glace puis centrifuger 10 min à 12000 trs/min ;
- ajouter au surnageant 0,6 volume d'isopropanol, garder 10 min à température ambiante puis centrifuger 10 min à 12000 trs/min et reprendre le culot dans 100  $\mu$ l de TE1X ;
- faire un traitement par la RNase A ;



- ajouter un volume de phénol, bien homogénéiser, centrifuger pendant 3min ;
- prendre la phase supérieure et refaire une extraction par un volume égal de phénol/chloroforme suivie d'une autre extraction par du chloroforme ;
- ajouter à la phase aqueuse 2 volumes d'éthanol et 1/10 du volume NaCl 5 N, homogénéiser et garder 15 min à -80°C ;
- centrifuger pendant 15 min, rincer le culot à l'éthanol 70%, sécher puis resuspendre dans 50 µl environ du tampon TE1X et conserver à -20°C.

#### **IV. 1. 2. Les maxi préparations (lyse alcaline)**

Le principe est le même que celui des mini préparations.

Les bactéries contenant les plasmides sont mises en culture (400 ml) en milieu LB, additionné d'antibiotique adéquat, à 37°C durant une nuit. L'ADN est préparé comme suit :

- centrifuger pendant 5 min à 8000 trs/min ;
- resuspendre le culot dans 20 ml de solution I, puis bien l'homogénéiser ;
- ajouter ensuite 40 ml de solution II et garder 10 min à 0°C ;
- ajouter 30 ml de la solution III glacée, homogénéiser, garder 10 min dans la glace puis centrifuger 10 min à 10000 trs/min ;
- ajouter au surnageant 0,6 volume d'isopropanol, garder 30 min à température ambiante puis centrifuger 15 min à 12000 trs/min et resuspendre le culot dans du TE1X ;
- faire un traitement par la RNase A puis par la protéinase K ;
- ajouter un volume de phénol, bien homogénéiser, centrifuger pendant 3min ;
- prendre la phase supérieure et refaire une extraction par un volume égal de phénol/chloroforme suivie d'une autre extraction par du chloroforme ;
- ajouter à la phase aqueuse 2 volumes d'éthanol et 1/10 du volume NaCl 5N, homogénéiser et garder 15 min à -80°C, centrifuger pendant 15 min ;
- rincer le culot à l'éthanol 70%, sécher puis resuspendre dans du TE1X.

#### **IV. 2. Extraction de l'ADN génomique à partir des souches de *Streptomyces* (méthode de Marmur, 1961 modifiée)**

Les souches de *Streptomyces* sont mises en cultures (500 ml) pendant 48 h, puis:

- centrifuger 10 min à 10000 trs/min et à 4°C ;

- éliminer le surnageant et remettre le culot en suspension dans 200 ml de tampon TES et centrifuger à nouveau ;
- reprendre le culot dans 60 ml de tampon TES contenant du lysosyme à 2 mg/ml ;
- homogénéiser et placer la suspension environ 20 min à 37°C ;
- ajouter 40 ml d'une solution de SDS à 10%, porter à 60°C durant 5 min et laisser refroidir à température ambiante ;
- traiter la préparation par un volume égal d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (24/24/1) et agiter vigoureusement ;
- séparer les deux phases par centrifugation 5 min à 5000 trs/min ;
- sur la phase supérieure, effectuer 5 traitements successifs comme précédemment .
- ajouter à la phase aqueuse des petites quantités d'éthanol froid (-20°C) et agiter doucement.
- récupérer, à l'aide d'une pipette pasteur effilée, les filaments d'ADN apparus ;
- remettre en solution les filaments d'ADN dans 20 ml de tampon TE1X ;
- faire un traitement par la RNase A puis par la protéinase K ;
- traiter la solution par un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24/24/1) ;
- précipiter l'ADN 2 heures à -20°C. ;
- reprendre le précipité dans du tampon TE1X

### **IV.3. Extraction de l'ADN génomique de la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 (Leenhouts 1990)**

Après culture (40 ml) de la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 pendant 16h à 30°C:

- centrifuger 10 min à 10.000 rpm,
- éliminer le surnageant et laver le culot cellulaire obtenu une fois avec 10 ml d'eau distillée,
- mettre en suspension le culot dans 4 ml de solution de lyse (25 mM acide chlorhydrique Tris [pH 8], 50 mM EDTA, 50 mM de glucose) pendant 20 min.
- centrifuger et reprendre le culot dans 4 ml de tampon de lyse contenant du lysozyme à (5 mg/ml)
- homogénéiser et incuber la suspension 30 min à 37°C
- centrifuger 15min à 5000 et à 4°C,
- au surnageant ajouter 150µl de protéinase K à 20 mg/ml et 350µl de SDS 10%.
- incuber la suspension pendant 30 min à 60 ° C.

- extraire 5 fois le lysat avec un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et deux fois avec un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1)
- ajouter (0.1 V) d'une solution d'acétate de sodium (3M) et 2V d'éthanol
- placer à -20°C pendant 2h
- centrifuger 15 min à 10000 tr/min
- reprendre le culot obtenu dans 300µl de TE (1x)
- estimer la quantité et la qualité de l'ADN en déposant 2µl sur gel d'agarose 0,8%

#### **IV.4. Quantification de l'ADN**

La concentration d'ADN peut être déterminée soit par spectrophotométrie (Sambrook *et al.*, 1989), soit par estimation de la quantité après électrophorèse sur gel d'agarose.

##### **IV.4.1. Méthode spectrophotométrique**

La lecture des densités optiques est effectuée à 280 nm et à 260 nm. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée par le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$ . Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2.

##### **IV.4.2. Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique)**

L'intensité de la fluorescence émise par les molécules de BET intercalées au sein de l'ADN est proportionnelle à la masse totale de ce dernier. Ainsi, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est estimée par comparaison de la fluorescence de l'échantillon et celle d'une gamme de concentration connue après électrophorèse sur gel d'agarose.

#### **IV. 5. Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction**

La digestion de l'ADN par une ou plusieurs enzymes de restriction se fait selon les instructions du fournisseur. Le mélange réactionnel contenant l'ADN, le tampon de réaction adéquat et l'enzyme de restriction (généralement à raison de 3 à 5 unités/µg d'ADN), est incubé pendant environ 2 heures à la température adéquate. Cette digestion est suivie par électrophorèse d'un aliquot du milieu réactionnel.

#### **IV.6. Déphosphorylation de l'ADN**

La phosphatase alcaline d'intestin de veau "CIP" catalyse l'hydrolyse des groupements phosphates situés en 5' des molécules d'acides nucléiques linéaires. Elle est utilisée pour éviter la fermeture du vecteur de clonage sur lui-même lors de la ligation. Le mélange réactionnel, contenant l'ADN plasmidique linéarisé par une ou plusieurs endonucléases de restriction et le tampon de réaction et l'enzyme "CIP", est incubé à 37°C durant 30 min. Ensuite, l'enzyme est inactivée par la chaleur (10 min à 70°C). Le mélange est extrait aux phénol, phénol-chloroforme, chloroforme et précipité à l'éthanol.

#### **IV.7. Ligation de l'ADN**

L'ADN ligase permet la formation d'une liaison covalente entre une extrémité 3' hydroxylée et une extrémité 5' phosphate de deux molécules d'ADN. La réaction de ligation contenant le vecteur linéarisé et déphosphorylé, l'ADN à insérer et le tampon de ligation et l'ADN ligase, est faite selon les instructions du fournisseur de l'ADN ligase.

#### **IV.8. Electrophorèse sur gel d'agarose**

Ce protocole est décrit par Sambrook *et al.*, (1989). Il s'agit de séparer les fragments d'ADN selon leur taille sur un gel d'agarose (0,8 à 1,4%) dans du tampon TBE1X. La migration se fait dans un champ électrique à voltage constant.

#### **IV.9. Purification de l'ADN**

Pour purifier des fragments d'ADN, nous avons utilisé la technique d'élution à partir de gel d'agarose. Cette technique utilise un agarose spécifique ayant un point de fusion bas vers 65°C (NuSieve® GTG® Agarose). Le protocole expérimental est le suivant :

- après séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose, visualiser la bande à purifier et découper la partie du gel qui la contient ;
- ajouter un volume suffisant de TE1X de façon à recouvrir l'agarose et porter à 65°C pendant 10 min jusqu'à liquéfaction complète de l'agarose ;
- faire une extraction au phénol (préchauffé à 60°C), au phénol/chloroforme, puis au chloroforme ;

- précipiter l'ADN en présence du glycogène (200 µg/ml) ;
- centrifuger puis reprendre le culot d'ADN dans du TE1X.

#### **IV.10. Séquençage de l'ADN**

La méthode utilisée est celle automatisée en utilisant un séquenceur automatique. Les séquenceurs automatiques sont capables de réaliser à la fois les réactions ainsi que la détermination de la séquence nucléotidique du fragment d'ADN étudié. Les fragments d'ADN sont marqués grâce à des marqueurs fluorescents. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence émise par les colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée et par suite la séquence nucléotidique qui en résulte.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé le séquenceur automatique ABIPrism3100 (Applied Biosystem) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS). Les réactions de séquences ont été réalisées dans des plaques PCR de 96 puits en utilisant l'appareil PCR « GeneAmp PCR system 9700 » et le kit de séquençage « Bigdye Terminator version 3.1 ABI ». Le volume de réaction est 10 µl contenant : 2 µl de produit à séquencer ; 1,5 µl de tampon (ABI 5X seq buffer) ; 1 µl d'un mélange d'enzyme/dNTP/ddNTP marqués (Rrmix 2,5X) ; 0,25 µl de différents primers (200 ng/µl = 30 µM) et l'eau ultra pure q.s.p à 10 µl. Le programme de la réaction comporte 25 cycles : 10 sec de dénaturation à 96°C ; 5 sec d'hybridation à 50°C et 4 min d'élongation à 60°C.

#### **IV.11. Analyse des Séquences nucléotidiques**

Les séquences obtenues sont analysées par le logiciel "Oméga" qui contient plusieurs programmes permettant de déterminer les phases de lectures ouvertes et la position potentielle des codons d'initiation et d'arrêt. L'alignement des séquences nucléotidiques a été réalisé par utilisation du programme "Blast Search Algorithm".

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées par l'utilisation du programme PHYLIP package (Felsenstein, 1989), et les arbres phylogénétiques ont été construits par le programme algorithmique (NJ) «Neighbor Joining » (Saitou and Nei, 1987).

#### **IV.12. Amplification par PCR**

La PCR est une technique d'amplification spécifique d'une séquence d'ADN grâce à l'emploi de deux oligonucléotides de synthèse qui s'hybrident avec des séquences qui leurs sont complémentaires et qui bordent la séquence à amplifier. Nous avons utilisé la technique de PCR pour amplifier le gène ARN 16S de la souche de *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. Les conditions opératoires sont :

Mélange réactionnel :

1 µl	ADN matrice (200 ng)
1 µl	oligo 1 (150 pmoles/µl)
1 µl	oligo 2 (150 pmoles/µl)
5 µl	tampon DNA polymérase 10X
1 µl	dNTP 10 mM
1 µl	DNA polymérase ADN dépendante ( <i>pfu</i> )
q.s.p 50 µl	H <sub>2</sub> O bidistillée.

Les cycles PCR sont précédés par une étape de dénaturation de la matrice pendant 3 minutes à 94°C. 40 cycles sont utilisés dont chacun comprend :

- une étape de dénaturation : 30 sec à 94°C ;
- une étape d'hybridation des oligonucléotides à la matrice : 1 min à 60°C
- une étape de polymérisation : 3 min à 72°C.

Les deux oligonucléotides utilisés sont :

Direct Oligo 1 : 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

Réverse oligo 2 : 5' ATGGCTCAGGACGAACGCT 3'

#### **V. Transformation d'*E. coli***

La méthode utilisée est celle au CaCl<sub>2</sub>. Une culture de 30 ml de cellules en phase exponentielle (DO<sub>600nm</sub> : 0,4-0,5) est centrifugée. Le culôt obtenu est repris dans le tampon MOPS-glucose-CaCl<sub>2</sub>. Après 30 min à 4°C, les cellules sont centrifugées puis reprises dans 2 ml de nouveau dans le même tampon. Pour la transformation, l'ADN est ajouté à 0,2 ml de ces cellules puis gardé 1h à 4°C avant de réaliser un choc thermique à 42°C pendant 2 min. Par la suite, 1,7 ml du milieu LB sont ajoutés et l'ensemble est incubé (90 min) à 37°C pour l'expression du phénotype. L'étalement est effectué sur le milieu de sélection contenant

l'antibiotique. L'efficacité de la transformation est généralement de  $10^6$  à  $10^7$  transformants par  $\mu\text{g}$  d'ADN pour un ADN plasmidique et de  $10^4$  à  $10^5$  pour une ligation.

## **VI. Identification et classification des souches de *Streptomyces***

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux études des critères morphologiques, aux analyses des constituants de la paroi et aux études physiologiques

### **VI.1. Critères Morphologiques**

Cette étude consiste à noter, aux 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour d'incubation à 30°C, la croissance des deux souches d'actinomycètes TN17 et Fr10, l'aspect et la couleur des mycéliums, la production et la couleur des pigments diffusibles sur les milieux de culture suivants : l'ISP<sub>2</sub>, l'ISP<sub>3</sub> et l'ISP<sub>4</sub>, Sabouraud, Agar nutritif et Bennett (Shirling et Gottlieb, 1966).

### **VI. 2. Analyse des constituants de la paroi**

Ces analyses sont effectuées sur des extraits ou des hydrolysats cellulaires. Concernant la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique ou DAP (forme LL ou DL) et la présence de la glycine, la technique utilisée est la chromatographie descendante sur papier. Pour connaître la composition cellulaire en sucres et en phospholipides membranaires, la technique utilisée est la chromatographie ascendante sur couche mince. La détermination des acides gras est réalisée par chromatographie en phase gazeuse.

#### **VI. 2.1. Obtention de la biomasse mycélienne**

Les deux souches: TN17 et Fr10 sont cultivées sur milieu ISP<sub>2</sub> liquide (50 ml par Erlenmeyer de 250 ml) en agitation permanente (à 250 rpm) à 30°C. Après 3 jours, lorsque les cultures deviennent denses, le mycélium est recueilli par filtration, lavé plusieurs fois à l'eau distillée, séché à 37°C durant une nuit puis conservé à -20°C pour les analyses ultérieures.

#### **VI. 2.2. Analyse des acides aminés pariétaux**

Il s'agit dans ce cas de déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous forme LL ou DL (= méso) et de noter la présence ou non de glycine.

La méthode utilisée est celle de Becker *et al.* (1964). Dix mg de mycélium sec sont hydrolysés pendant 18 h à 100°C par 1 ml de HCl 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés. Après refroidissement, les hydrolysats sont filtrés sur membranes en verre pour éliminer

les débris mycéliens. Les filtrats sont évaporés à sec dans un bain de sable chaud. Des lavages à l'eau distillée sont effectués jusqu'à l'élimination complète du HCl et l'obtention d'un pH compris entre 5,5 et 7.

Le résidu sec est repris dans 0,3 ml d'eau distillée. 15 microlitres sont chromatographiés sur papier Wathman n° 1. Les papiers sont développés pendant 18 h par chromatographie descendante à front perdu dans un solvant composé de méthanol, eau distillée, HCl 10N et pyridine (8 - 17,5 - 2,5 - 10 en volumes). Dix microlitres d'une solution à 0,01M d'acide diaminopimélique (mélange des isomères LL et DL) et d'une solution de glycine à 0,2 % sont utilisés comme standards et chromatographiés.

La révélation des chromatogrammes se fait par une solution de ninhydrine à 0,2 %. Les tâches de DAP sont de couleur olive virant par la suite au jaune. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL (Becker *et al.*, 1964). La glycine apparaît de couleur violette et migre plus rapidement que les deux isomères de DAP.

### **VI. 2.3. Analyse des sucres cellulaires**

La méthode d'analyse est celle de Lechevalier et Lechevalier (1970b). Cinquante milligrammes de mycélium sec sont hydrolysés par 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N dans des tubes hermétiquement fermés, pendant 2 h à 100°C. Après refroidissement, l'acide est neutralisé avec une solution saturée d'hydroxyde de baryum. Le précipité blanc obtenu est éliminé par centrifugation (7500g durant 20 min). Le surnageant est recueilli, évaporé à sec puis dissout dans 0,3 ml d'eau distillée. Vingt microlitres d'hydrolysats sont déposés sur papier Wathman n°1, de même que 15 µl de solutions aqueuses standards à 0,1% des sucres suivants : arabinose, xylose, ribose, galactose, glucose, mannose, et rhamnose.

Les papiers sont développés durant 36 h par chromatographie descendante (à front perdu) dans un système de solvant composé par la partie supérieure d'un mélange de *n*-butanol - eau distillée - pyridine - toluène (5/3/3/4 en volumes).

Les chromatogrammes sont séchés à température ambiante puis révélés par une solution acide de phtalate d'aniline. Après chauffage à 100°C pendant 5 min, les tâches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses.



#### **VI. 2.4. Analyse des phospholipides membranaires**

C'est une étape importante dans la classification des actinomycètes et surtout dans la différenciation entre certains genres proches d'actinomycètes. Selon Lechevalier *et al.*, (1977), le *Streptomyces* possède le type PII ce type est caractérisé par la présence de la PE (phosphatidyléthanolamine).

La méthode utilisée est celle préconisée par Minnikin *et al.*, (1977). Quatre cent mg de mycélium sec sont mis dans un Erlenmeyer de 250 ml hermétiquement fermé, contenant 40 ml du mélange chloroforme - méthanol (2-1; v/v) puis laissé en agitation (250 rpm) durant une nuit à température ambiante. L'extrait organique est ensuite récupéré et évaporé à sec à 37°C. Le résidu est dissout dans 0,3 ml du même mélange de solvants, puis 10 µl de cet échantillon sont déposés en double dans deux plaques de gel de silice G60 (Fluka) et développés par chromatographie ascendante dans un solvant composé d'un "mélange chloroforme - méthanol - eau distillée" (65 - 25 - 4, en volumes). De même, 10 µl des solutions témoins (0,01g dans 1ml de chloroforme) de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) sont également chromatographiés.

La première plaque est révélée avec le réactif de Dragendorff pour la détection de la PC dont les tâches apparaissent de couleur jaune - orange vif et la seconde plaque, avec la solution de ninhydrine (0,2% dans de l'acétone) pour la détection de la PE, de couleur violette, après un chauffage de 5 min à 100°C.

#### **VI. 2.5. Analyse des acides gras cellulaires**

- Extraction des acides gras des souches *Streptomyces* (Quatre étapes sont utilisées) :
  - la saponification : 45 g d'hydroxyde de sodium, 150 ml de MeOH et 150 ml d'eau distillée
  - la méthylation : 325 ml de HCl à 6N et 275 ml de MeOH permettant d'abaisser le pH jusqu' à 1,5
  - l'extraction : 200 ml d'hexane et 200 ml de méthyltertiobutyléther : permettant d'extraire les esters méthyliques d'acides gras dans la phase organique pour l'utilisation avec le chromatographe en phase gazeuse.
  - le lavage : 10,8g de NaOH dissout dans 900 ml d'eau distillée.

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG) : les caractéristiques de la CPG sont les suivantes :
  - ✓ Mode d'injection : Splitless
  - ✓ Température = 26°C
  - ✓ Temps d'ouverture de Splitless : 0,5 min en mode Surge 100kPa
  - ✓ Débit : 1ml/min
  - ✓ Colonne Zebron (ZB 5MS, 30 mètres, 0,25 mm, 0,25µm) société Phenomenex (USA)
  - ✓ Les conditions chromatographiques sont : Température de Four 65°C pendant 0,5 min 60°C jusqu'à 140°C pendant 4min 4°C/min jusqu'à 240°C pendant 15min
  - ✓ Détection (ligne de transfert) à 220°C
  - ✓ Thermo Fisher Trace GC2000
  - ✓ Détecteur TF DSQ2
  - ✓ Mode scan avec 1633V (emv)
  - ✓ Température de source d'ions à 200°C
  - ✓ Mass range (40-450) en UMA (Unité de masse atomique).
- Un standard pour la détermination des acides gras pariétaux : « Bacterial Acid Methyl Esters Mix » Catalog No 47080-U- Supelco, Bellefonte, Philadelphia.

### **VI. 3. Etudes physiologiques**

#### **VI. 3. 1. Production de pigments mélanoïdes**

L'observation des pigments mélanoïdes est réalisée sur les milieux gélosés ISP<sub>1</sub>, ISP<sub>6</sub> et ISP<sub>7</sub> recommandés à cet effet par Shirling et Gottlieb (1966).

#### **VI. 3. 2. Production de nitrate réductase**

La mise en évidence du nitrate réductase se fait sur bouillon nitrate. La recherche du nitrate réductase est effectuée grâce au réactif de Griess (commercialisé) (Marchal et Bourdon, 1973).

#### **VI. 3. 3. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone**

Les glucides sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1 %. Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant du glucose sert de témoin positif. Les glucides testés

comme seule source de carbone sont les suivants : arabinose, inositol, mannose, raffinose, ribose, sucrose, tréhalose, fructose, galactose, glucose, maltose, lactose, glycérol, rhamnose et xylose.

#### **VI. 3. 4. Dégradation de divers autres composés organiques**

\* Hydrolyse de la tyrosine, de l'hypoxanthine, de la xanthine, de l'adénine, de la guanine (Goodfellow 1971, Gordon *et al.*, 1974). La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

\* Hydrolyse de la gélatine. Le réactif de Frazier (commercial), permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine (auréole claire autour des colonies).

\* Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974). L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

\* Dégradation de l'esculine et de l'arbutine (Marchal et Bourdon, 1973). La dégradation de ces 2 hétérosides se manifeste par l'apparition d'un pigment brun à noir autour des colonies.

\* Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1973). Une goutte d'une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

\* Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957) : Tween 80 : 10 ml ; NaNO<sub>3</sub> : 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline: 50 ml ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 0,1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml; agar : 18 g. pH 7,2. La dégradation du tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

\* Utilisation des sels de sodium. La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose. (Gordon *et al.*, 1974).

\* Utilisation des acides aminés. Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des acides aminés ou en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant de l'acide aminé sert de témoin positif (Gordon *et al.*, 1974).

#### **VI. 3. 5. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques**

Pour évaluer la sensibilité des souches TN17 et Fr10 vis-à-vis de certains composés, à des concentrations définies, certains tests préconisés dans la taxonomie des actinomycètes (Athalye *et al.*, 1985) sont choisis à savoir :

- Sensibilité au lysozyme à 0,005% (Gordon et Barnett, 1977).

- Sensibilité à l'azide de sodium (à 0,001 et 0,01%) et au phénol (à 0,05 et 0,1%). Le milieu de base utilisé est le GYEA (Athalye *et al.*, 1985).

- Sensibilité aux pH 5 et 9 (sur GYEA liquide), aux températures : 12, 20, 30, 37, 40, 45 et 50 °C et aux antibiotiques (sur GYEA solide) suivants : érythromycine, streptomycine et pénicilline, (10 mg/l pour chacun), rifampicine, gentamicine, vancomycine (5 mg/l pour chacun), chloramphénicol, oxytétracycline et kanamycine (25 mg/l pour chacun).

- Sensibilité à différentes concentrations de NaCl à savoir : 0, 5, 7 et 10% sur milieu Nutrient Agar (Gélose nutritif)-Fluka.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

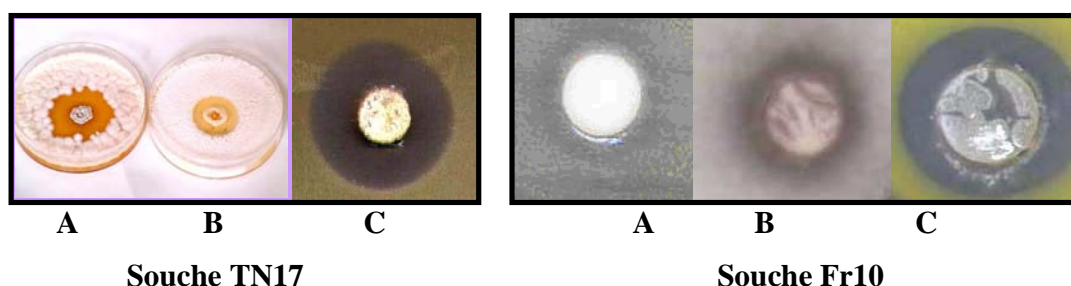
Bien que le nombre de molécules bioactives obtenu par voie naturelle, notamment à partir des microorganismes ne cesse d'augmenter, il n'y a qu'une faible proportion de ces molécules qui peuvent aboutir à des applications. Il est donc évident d'orienter les cribles vers des niches particulières, et également de s'assurer que la bactérie productrice est bien nouvelle, non déjà décrite pour augmenter les chances d'avoir des biomolécules nouvelles. Par ailleurs, il est à signaler que les manipulations d'extraction, de purification et de caractérisation chimique des biomolécules sont très délicates, fastidieuses et coûteuses. En effet, la détermination complète de la structure chimique d'une molécule biologiquement active nécessite d'une part, la combinaison de plusieurs techniques d'extractions et de purifications et la disposition d'une quantité assez importante (quelques mgs) de la molécule à l'état pur, une telle quantité ne peut être obtenue que dans des conditions semi-préparatives ou même préparatives, et d'autre part, l'utilisation de plusieurs techniques physico-chimiques et spectroscopiques.

L'objectif de ce premier chapitre relatif aux travaux de cette présente thèse, concerne l'étude taxonomique des deux souches TN17 et Fr10.

## A. CARACTERISTIQUES TAXONOMIQUES DES SOUCHES TN17 ET FR10

### I. Rappel des résultats antérieurs

Les souches TN17 et Fr10 ont été isolées durant un programme de recherche de nouvelles souches d'actinomycètes à partir de différents habitats Tunisiens. Ces souches ont été sélectionnées pour leurs activités biologiques (antibactériennes et antifongiques) importantes (Figure 11). En utilisant le moyen moléculaire (amplification, séquençage et analyse de la séquence nucléotidique des gènes codant pour l'ARN 16S correspondant), il apparaît que les souches TN17 et Fr10 sont de nouvelles souches d'actinomycètes, et qu'elles appartiennent au genre *Streptomyces*.



**Figure 11** : Activités biologiques des souches TN17 et Fr10 contre : *Fusarium* sp (A) et *Verticillium dahliae* (B) et contre *Micrococcus luteus* (C) estimées en milieu solide après une durée d'incubation spécifique pour chaque souche cible. Les souches TN17 et Fr10 sont ensemencées en un point central de la boîte de pétri.

Vu l'importance des activités biologiques et notamment antifongiques des deux souches TN17 et Fr10, nous nous sommes proposés d'approfondir leur identification. Plusieurs critères classiques sont utilisés dans la classification et l'identification des microorganismes et peuvent être globalement classés en deux groupes : les critères classiques qui englobent les critères morphologiques, chimiotaxonomiques et physiologiques, et les critères moléculaires qui

concernent les analyses de la séquence des gènes codant pour l'ARN 16S, la phylogénie, les hybridations ADN-ADN, etc.

## **II. Etudes morphologiques des souches TN17 et Fr10**

Les analyses morphologiques sont importantes en taxonomie microbienne, elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives vu que les critères morphologiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables.

Dix milieux de cultures ont été utilisés : Milieux ISP1 à ISP7, milieu Bennett, milieu gélose nutritive et milieu Sabouraud. Ces différents milieux sont généralement utilisés pour les bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb, 1966). D'après les résultats présentés sur les tableaux 7 et 8, nous pouvons déduire que:

\* L'isolat TN17 présente une croissance et une sporulation abondantes sur les milieux ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>3</sub>, ISP<sub>4</sub>, ISP<sub>5</sub> et ISP<sub>7</sub> et Bennett. La croissance est aussi abondante sur ISP<sub>1</sub> mais sans production de mycélium aérien; elle est par contre moyenne sur ISP<sub>6</sub>, gélose nutritive et Sabouraud.

La couleur du mycélium végétatif est globalement brun jaunâtre, et celle du mycélium aérien est grise ou blanche. Les pigments mélanoides ne sont pas produits sur les milieux ISP<sub>1</sub>, ISP<sub>6</sub> et ISP<sub>7</sub>, conçus spécialement pour la production de ces pigments, ce qui implique que la souche TN17 ne produit pas de pigments mélanoides.

\* L'isolat Fr10 présente une croissance et une sporulation abondantes sur les milieux ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>3</sub>, ISP<sub>5</sub> et Bennett. La croissance est aussi abondante sur ISP<sub>1</sub> et ISP<sub>6</sub> mais sans production de mycélium aérien; elle est par contre moyenne sur gélose nutritive et ISP<sub>4</sub> et faible sur le milieu Sabouraud.

La couleur du mycélium végétatif est grisâtre ou jaune en fonction du milieu de culture, et celle du mycélium aérien est jaune, jaune verdâtre. Comme la souche TN17, la souche Fr10 ne produit pas de pigments mélanoides et ce suite aux résultats obtenus sur les milieux de cultures ISP<sub>1</sub>, ISP<sub>6</sub> et ISP<sub>7</sub>.

**Tableau 7.** Caractéristiques culturelles de l'isolat TN17

Croissance et sporulation: ++++ = abondante; +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.

Milieux de culture	Croissance	Sporulation	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Pigments solubles
ISP n° 1	++++	-	brun jaunâtre	non produits	non produits
ISP n° 2	++++	++++	brun jaunâtre	grisâtre	brun jaunâtre
ISP n° 3	++++	+++++	brun jaunâtre	blanchâtre	brun jaunâtre
ISP n° 4	++++	+++	blanc jaunâtre	blanchâtre	blanc jaunâtre
ISP n° 5	++++	++++	brun	grisâtre	brun
ISP n° 6	++	++	brun jaunâtre	grisâtre	non produits
ISP n° 7	++++	+++	brun jaunâtre	grisâtre	non produits
Bennett	+++	+++	brun jaunâtre	grisâtre	brun jaunâtre
Gélose nutritive	++	+	brun jaunâtre	grisâtre	non produits
Sabouraud	++	++	jaunâtre	grisâtre	jaunâtre



**Tableau 8.** Caractéristiques culturelles de l'isolat Fr10

Croissance et sporulation: + + + + = abondante; + + + = bonne; + + = moyenne; + = faible; - = nulle.

Milieus de culture	Croissance	Sporulation	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Pigments solubles
ISP n° 1	+ + +	-	brun jaunâtre	non produits	non produits
ISP n° 2	+ + + +	+ + + +	brun jaunâtre	Jaune verdâtre	jaunâtre
ISP n° 3	+ + + +	+ + + +	brun jaunâtre	jaunâtre	brun jaunâtre
ISP n° 4	+ +	+ +	blanc jaunâtre	jaunâtre	Jaunâtre
ISP n° 5	+ + +	+ + +	grisâtre	jaune verdâtre	grisâtre
ISP n° 6	+ + +	-	grisâtre	non produits	non produits
ISP n° 7	+ +	+	jaunâtre	Jaunâtre	non produits
Bennett	+ + + +	+ + + +	jaune	jaune verdâtre	jaunâtre
Gélose nutritive	+ +	+ +	jaunâtre	jaune verdâtre	jaunâtre
Sabouraud	+	+	grisâtre	Jaunâtre	Jaunâtre

### III. Etudes chimiotaxonomiques

La chimiotaxonomie se base sur l'étude des constituants de la paroi. Les plus utilisés sont le peptidoglycane (Schleifer et Kandler, 1972), les sucres, les quinones (présence de ménaquinones ou d'ubiquinones), les lipides polaires et les acides mycoliques. Pour le genre *Streptomyces*, la chimiotaxonomie repose surtout sur la mise en évidence et la détection d'acide

diaminopimélique sous forme L comme acide aminé particulier du peptidoglycane, la présence de la glycine et l'absence de glucides caractéristiques des autres actinomycètes (Murray *et al.*, 1989).

### **III. 1. Analyse des acides aminés et des sucres pariétaux**

D'après nos études, nous avons révélé dans la paroi des isolats TN17 et Fr10, la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique, la présence de glycine et l'absence des sucres : xylose, arabinose, galactose et rhamnose. Ces résultats indiquent que la paroi des deux souches est du type I (Murray *et al.*, 1989). En effet, d'après Murray *et al.*, (1989), et comme le montre le tableau 9, la présence ou l'absence de quelques glucides dans la paroi cellulaire permet la classification des actinomycètes en différents groupes. La présence d'arabinose et de galactose est caractéristique de la grande majorité des Nocardioformes et des Micropolysporas (paroi type IV). La présence du madurose (3-Ométhyl-D-galactose) caractérise les *Maduromycetes*, *Dermatophilus* et certaines souches du genre *Frankia*. La richesse des parois cellulaires en xylose et arabinose indique que les isolats appartiennent au groupe des Actinoplanètes et au genre *Glycomyces*. Alors que la présence du rhamnose et du galactose caractérise le genre *Saccharothrix*.

**Tableau 9 :** Différents types de parois et leurs constituants majeurs chez les actinomycètes (Murray *et al.*, 1989)

Type de paroi	Constituants pariétaux majeurs	Groupe/Genre
I	L-DAP+Glycine	<i>Arachnia, Pimelobacter, Nocardioïdes, Streptomyces</i>
II	Méso-DAP+Glycine	<i>Actinoplanes, Actinomyces</i>
III	Méso-DAP	<i>Dermatophilus, Maduromycetes, Frankia, Geodermatophilus, Thermonospora, Kitasatospria, Spirillosporia, Thermoactinomyces</i>
IV	Méso-DAP+Arabinose	Micropolyspora, Nocardioformes
V	Lysine+Ornithine	Actinomyces
VI	Présence variable de l'acide asparatique et du galactose	<i>Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Actinomyces, Arcanobacterium</i>
VII	Acide diamonobutyrique+Glycine	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
VIII	Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium,</i>

		<i>Cellulomonas</i>
--	--	---------------------

DAP : Acide Diaminopimélique

Les données obtenues à ce niveau, confortent que les deux isolats étudiés sont des actinomycètes du genre *Streptomyces*. Ces mêmes données ont été rapportées par d'autres auteurs à savoir Dastager *et al.*, 2007, qui ont démontré la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique, la présence de glycine et l'absence des sucres (xylose, arabinose, galactose et rhamnose) dans la paroi de la nouvelle bactérie de *Streptomyces gulbargensis sp. nov.*

### **III. 2. Analyse des lipides membranaires**

Pour la classification et l'identification des actinomycètes, trois sortes de lipides sont généralement recherchées : les acides gras à longue chaîne, les ménaquinones et les phospholipides (Minnikin et Goodfellow, 1981).

Dans la présente étude, nous avons analysé la présence et la nature des phospholipides et des acides gras au niveau des parois des souches TN17 et Fr10.

#### **III. 2. 1. Les phospholipides**

L'analyse des phospholipides a montré la présence de la phosphatidyléthanoline (PE) dans les parois cellulaires des deux isolats (TN17 et Fr10) révélée par la ninhydrine. En revanche aucune trace de phosphatidylcholine (PC) n'a été décelée. A ce propos, il est à noter que la composition des membranes cellulaires en phospholipides a permis de diviser les actinomycètes en 5 types (Lechevalier *et al.*, 1977):

- Type P I: il se distingue par l'absence de phospholipides azotés tels que la phosphatidyléthanoline (PE) et la phosphatidylcholine (PC). Ex: *Spirillospora*, *Actinomadura*.
- Type P II: il est caractérisé par la présence de la PE. Ex: *Streptomyces Saccharothrix*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Spirillospora*.
- Type P III: présence de la PC. Ex: *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*.
- Type P IV: présence de PE et de phospholipides contenant de la glucosamine (PG). Ex: *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*.
- Type PV: présence de PG et de phosphatidylglycérol. Ex: *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Promicromonospora*.

D'après notre étude de la nature des phospholipides des parois des souches TN17 et Fr10, on peut déduire que ces deux souches sont des actinomycètes de type PII et du genre

*Streptomyces*. Par ailleurs, il est à signaler que les actinomycètes du genre *Streptomyces* sont caractérisés par la présence du phospholipide (PE) dans leur paroi. L'autre type de phospholipide (PC) peut être présent ou absent. En effet, la paroi cellulaire de la souche *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. contient les deux types de phospholipides « PE + PC » (Dastager et al., 2007) et la paroi cellulaire de la souche de *Streptomyces mayteni* sp. nov. qui contient, comme la paroi des souches TN17 et Fr10, uniquement le « PE » (Chen et al., 2009).

### III. 2. 2. Les acides gras

Les acides gras constituent les éléments essentiels des lipides cellulaires chez les bactéries et leur proportion majeure est localisée au niveau des membranes cellulaires (Kroppenstedt, 1985). En se basant sur la composition cellulaire en acides gras, les actinomycètes se divisent en trois groupes majeurs :

- Type à acides gras iso et anteiso : c'est la composition en acide gras la plus rencontrée chez les bactéries à Gram-positif et plusieurs genres d'actinomycètes ont ce type de composition (Okami et al., 1968).

- Type à chaînes linéaires mono-insaturées : les chaînes longues 16 :1 et 18 :1 sont les acides gras dominants dans ce type. Généralement, les chaînes sont branchées à des acides 10-méthyliques et en particulier l'acide 10-méthyl octadécanoïque (Suzuki, 1988).

- Type complexe : dans ce type, la composition en acides gras est constituée non seulement par des acides iso et anteiso mais aussi par des acides gras à chaîne linéaire monoinsaturée et des acides 10-méthyliques.

La composition en acide gras de la paroi des souches TN17 et Fr10 est présentée sur le tableau 10. Nous remarquons que les acides gras dominants au niveau de la paroi sont :

\* **Souche TN17** : l'anteiso C<sub>15:0</sub> (29,889 %), suivi de l'iso C<sub>16:0</sub> (28,529 %) et de l'iso C<sub>15:0</sub> (23,583 %). Ces acides gras et leur richesse dans la paroi de cette souche sont semblables à ceux de la bactérie de *Streptomyces gulbargensis* sp. nov., (Dastager et al., 2007). La paroi de cette dernière possède une composition et une richesse en acides gras comme suit : l'anteiso C<sub>15:0</sub> (26 %), suivi de l'iso C<sub>16:0</sub> (20%) et de l'iso C<sub>15:0</sub> (10 %) (Dastager et al., 2007).

\* **Souche Fr10** : l'iso C<sub>16:0</sub> (43,124%), suivi de l'anteiso C<sub>15:0</sub> (24,192%), l'iso C<sub>15:0</sub> (12,082%) et C<sub>16:0</sub> (6,812%). Concernant cette souche, on distingue une abondance des mêmes types d'acides gras que la souche TN17 et *Streptomyces gulbargensis* sp. nov., mais avec des richesses différentes. Par ailleurs, il est à noter que pour la souche Fr10, les deux acides gras les

plus abondants au niveau de la paroi à savoir l'iso C<sub>16:0</sub> et l'anteiso C<sub>15:0</sub>, sont les mêmes que pour la paroi de la souche de *Streptomyces mayteni* sp. nov. La paroi de cette dernière possède la composition suivante en acides gras : l'iso C<sub>16:0</sub> (28,1%), l'anteiso C<sub>15:0</sub> (16,2%), l'anteiso C<sub>17:0</sub> (14,8%) (Chen *et al.*, 2009).

D'après ces données, on peut déduire que les parois des souches TN17 et Fr10 sont du type iso et ante-iso caractéristique de la plupart des actinomycètes (Okami *et al.*, 1968). De plus, les parois des deux souches étudiées ont une composition en acides gras presque similaire à celle des souches *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. et *Streptomyces mayteni* sp. nov., respectivement. Une fois de plus on confirme l'appartenance des deux souches étudiées au genre *Streptomyces*.

**Tableau 10.** Profil des acides gras des isolats TN17 et Fr10

Acides gras	% d'acides gras de la souche TN17	% d'acides gras de la souche Fr10
Acide undécyclique 11 :0	-	-
Acide 2-Hydroxy caprique 10 :0	-	-
Acide laurique 12 :0	0,094	-
Acide tricéclique 13 :0	-	0,316
Acide 2 hydroxy laurique 12 :0	0,026	-
Acide 3 hydroxy laurique 12 :0	1,611	0,579
Acide myristique 14 :0	0,453	1,184
Acide iso 13-méthylmyristique 15 :0	23,583	12,082
Anteiso 12-méthylmyristique 15 :0	29,889	24,192
Acide pentadécyclique 15 :0	3,120	2,846
Acide 2 hydroxy myristique 14 :0	0,152	-
Acide 3 hydroxy myristique 14 :0	-	-
Acide methyl pentadecyclique 16 :0	28,529	43,124
Acide palmitoléique 16 :1 <sup>9</sup>	3,578	3,523
Acide palmitique 16 :0	4,490	6,812
Acide iso 15 méthylpalmitique 17 :0	3,891	2,540
Acide cis 9,10 méthylenepalmitique 17 :0 <sup>Δ</sup>	0,3508	2,035
Acide margarique 17 :0	0,146	0,515
Acide 2 hydroxymargarique 16 :0	-	-
Acide α linoléique 18 : 2 <sup>9,12</sup>	0,0701	-
Acide oléique 18 :1 <sup>9</sup>	0,0109	0,0639
Acide stéarique 18 :0	-	-
Acide α nonadécyclique 19 : 0 <sup>Δ</sup>	-	-
Acide nonadécyclique 19 :0	-	-
Acide arachidique 20 :0	-	-

Comme nous venons de le développer par les études morphologiques et chimiotaxonomiques, nous pouvons conclure que les deux souches étudiées sont bien des actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces*. Ces données confirment en réalité les résultats obtenus lors des travaux antérieurs se rapportant à la détermination et l'analyse de la séquence nucléotidique des gènes ARN 16S de ces deux souches.

Avant d'aborder les études physiologiques, nous nous sommes proposés de définir l'arbre phylogénique des deux souches de *Streptomyces* TN17 et Fr10 et pouvoir ainsi, déterminer les souches apparentées en conséquence. En réalité, nous avons décidé de réaliser cette étude avant les études physiologiques dans le but d'effectuer ces dernières sur nos deux souches et également, sur les souches apparentées en même temps.

#### **IV. Arbres phylogéniques des souches de *Streptomyces* TN17 et Fr10**

Comme nous l'avons signalé, les gènes codant pour l'ARN 16S des deux souches de *Streptomyces* TN17 et Fr10 ont été amplifiés par PCR, clonés et séquencés lors de travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire. Ces gènes ont une taille de 1521 pb pour la souche TN17 et 1430 pb pour la souche Fr10. L'alignement de ces séquences nucléotidiques avec les banques de données a révélé une similarité très forte, allant de 97 à 99%, avec les séquences nucléotidiques des gènes codant pour l'ARN 16S de souches bactériennes du genre *Streptomyces* uniquement.

Pour la souche *Streptomyces* TN17, le pourcentage de similarité le plus élevé (99%) est obtenu avec la souche de *Streptomyces lilaceus* AB 184457.

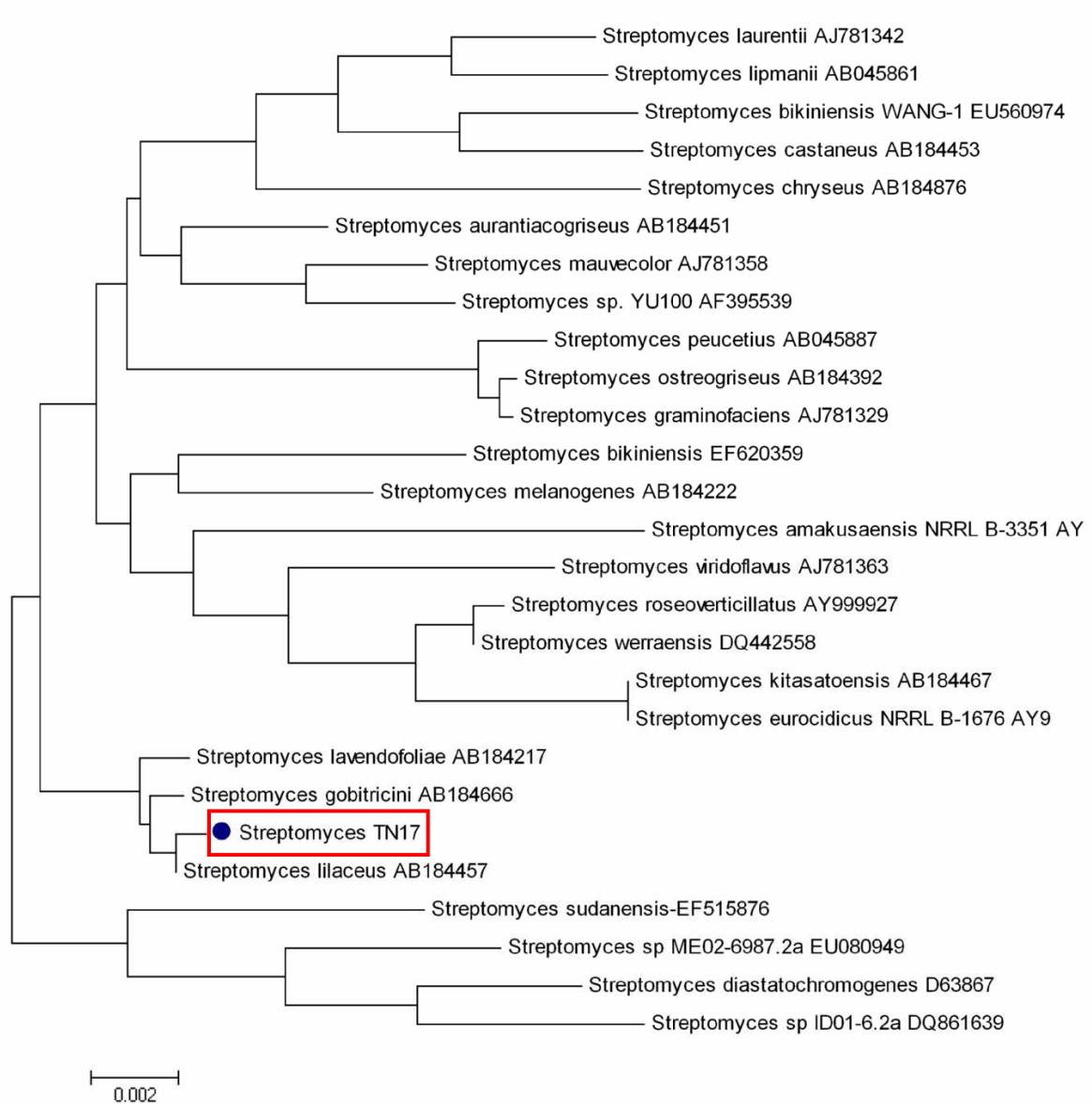
Concernant, la souche *Streptomyces* Fr10, le pourcentage de similarité le plus élevé (99%) est obtenu avec la souche *Streptomyces microflavus* HBUM 174043.

En utilisant les séquences nucléotidiques des gènes codant pour l'ARN 16S :

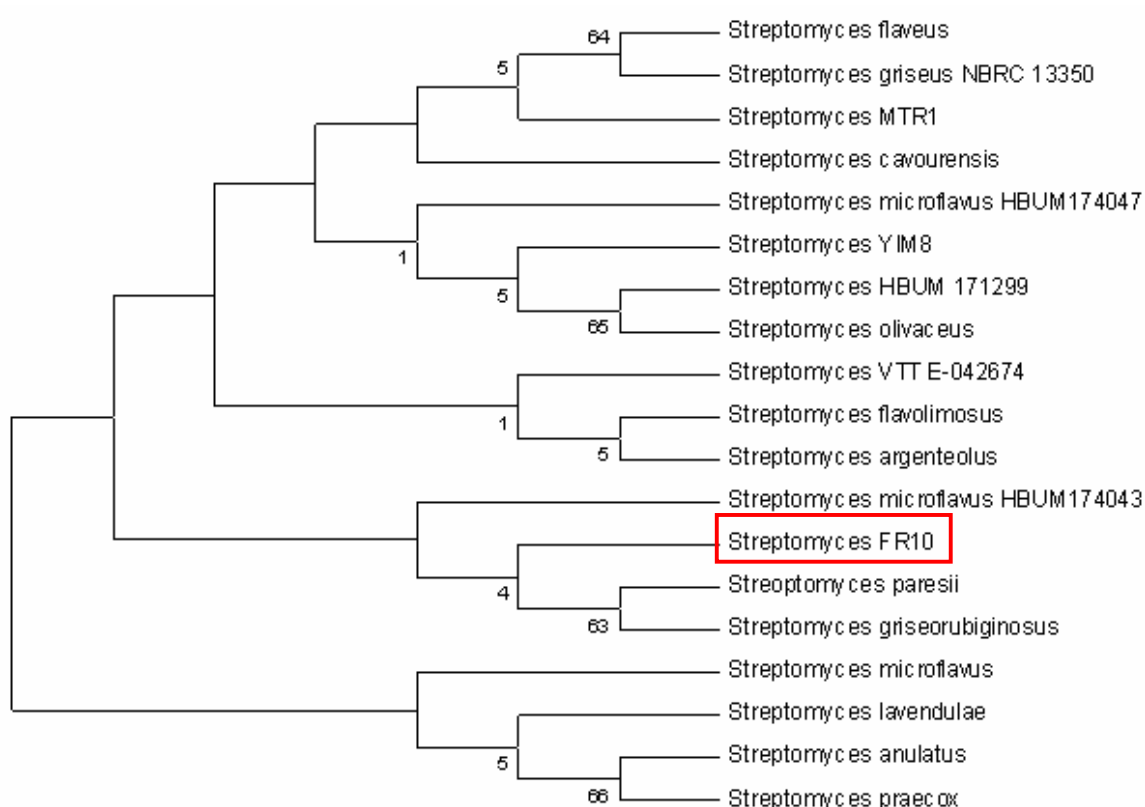
- des deux souches TN17 et Fr10 ;
- des souches de *Streptomyces* ayant les plus fortes similarités (détectés par l'alignement des séquences nucléotidiques), nous avons élaboré les arbres phylogéniques des deux souches, *Streptomyces* TN17 (Figure 12) et *Streptomyces* Fr10 (Figure 13).

Comme le montre la figure 12, les souches les plus apparentées à la souche TN17 sont: *Streptomyces lavendofolia* AB 184217, *Streptomyces gobitricini* AB 184666 et *Streptomyces lilaceus* AB 184457.

D'après la figure 13, les souches les plus apparentées à la souche Fr10 sont : *Streptomyces microflavus* HBUM 174043 et *Streptomyces griseorubiginosus*.



**Figure 12:** Arbre phylogénique de la souche de *Streptomyces* TN17



**Figure 13:** Arbre phylogénique de la souche de *Streptomyces* Fr10

Dans ce qui suit, nous abordons le côté physiologique des deux souches de *Streptomyces* ainsi que les souches apparentées standardisées reçues à partir des banques internationales de souches NBRC et DSM :

\* Pour la souche de *Streptomyces* TN17, les souches apparentées reçues sont : *Streptomyces lavendofoliae* NBRC 12882 ; *Streptomyces lilaceus* NBRC 13676 et *Streptomyces gobitricini* NBRC 15419.

\* Pour la souche de *Streptomyces* Fr10, les souches apparentées reçues sont : *Streptomyces griseorubiginosus* DSM 40469 et *Streptomyces microflavus* DSM 40331.

Les études physiologiques permettent de regrouper les espèces d'actinomycètes appartenant à un même genre. Plusieurs types de tests sont ainsi utilisés. Ils portent sur la dégradation ou non de plusieurs composés glucidiques, lipidiques, protéiques ou autre et la



sensibilité ou la résistance à quelques agents physiques et chimiques (pH, température, concentration ionique, antibiotiques, etc.).

## V. Etudes Physiologiques

### V. 1. La souche *Streptomyces* TN17 et les trois souches de *Streptomyces* apparentées

Le tableau 11 résume toutes les données à savoir :

- \* L'hydrolyse des bases puriques et leurs dérivés.
- \* la dégradation des glucides, des acides aminés, des surfactants et des sels de sodium.
- \* La réduction des nitrates.
- \* La production des pigments mélanoides.
- \* La croissance à différentes températures et valeurs de pH.
- \* La tolérance au lysozyme, au phénol, à l'azide de sodium et au chlorure de sodium.
- \* La résistance aux antibiotiques.

**Tableau 11 :** Caractéristiques physiologiques de la souche *Streptomyces* TN17 (**A**) et des trois souches apparentées : *Streptomyces lavendofoliae* NBRC 12882 (**B**) ; *Streptomyces lilaceus* NBRC 13676 (**C**) ; et *Streptomyces gobitricini* NBRC 15419 (**D**).

Caractéristiques	Souche <i>Streptomyces</i> TN17 et les souches apparentées			
	A	B	C	D
<b>Hydrolyse des bases puriques et leurs dérivés</b>				
Adénine	-	-	-	-
Guanine	-	-	-	+
Xanthine	-	+	-	+
Hypoxanthine	+	+	+	+
<b>Utilisation des glucides</b>				
Arbutine	-	+	-	-
Esculine	-	+	+	-
Amidon	+	+	+	+

Arabinose	+	-	+	+
Fructose	+	+	+	-
Galactose	+	-	+	+
Glucose	+	-	+	-
Glycérol	+	-	+	+
Inositol	-	+	-	-
Lactose	+	-	+	+
Maltose	+	+	-	+
Mannose	+	-	+	+
Raffinose	-	+	-	-
Rhamnose	-	+	-	+
Ribose	+	-	-	+
Sucrose	+	+	+	-
Tréhalose	+	-	-	+
Xylose	-	+	-	+
<b>Utilisation des acides aminés et des protéines</b>				
Méthionine	+	+	+	+
Asparagine	-	+	-	+
Phénylalanine	+	-	+	-
Acide aspartique	-	+	-	-
Cystéine	+	-	-	+
Tyrosine	-	+	+	-
Histidine	+	+	+	-
Alanine	+	+	+	+
Leucine	+	-	+	-
Arginine	+	-	+	-
Isoleucine	+	-	+	-
Acide glutamique	-	-	-	-
Thréonine	-	-	-	+
Proline	+	-	+	+
Sérine	+	-	+	+
Tryptophane	-	+	-	-
Caséine	+	+	+	+
Gélatine	+	+	+	-
<b>Utilisation des sels de sodium</b>				
Acétate	+	+	+	-
Alginate	-	+	-	-

Benzoate	-	+	-	-
Butyrate	-	-	+	+
Citrate	+	+	+	+
Desoxycholate	-	+	+	-
Hydrogen carbonate	-	+	-	-
Nitrate	-	-	+	+
Oxalate	-	+	-	+
Perchlorate	+	-	+	+
Propionate	-	-	+	+
Pyruvate	-	+	+	-
Succinate	+	+	-	-
Sulfite	-	+	-	-
Tartrate	-	-	+	-
Tétraborate	-	+	+	-
Thiosulfate	+	-	+	+
<b>Décomposition de surfactants</b>				
Tween 80	+	+	+	+
<b>Réduction des nitrates</b>	+	+	+	+
<b>Production des pigments mélanoides</b>	-	+	-	+
<b>Croissance à différentes Températures</b>				
12°C	-	-	-	-
20°C	-	-	+	-
30°C	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+
40°C	+	-	+	+
45 °C	-	-	-	+
50 °C	-	-	-	-
<b>Croissance à différents pH : (pH initial)</b>				
pH 5.0	+	+	+	+
pH 6.0	+	+	+	+
pH 7.0	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	-	-
pH 9.0	+	+	-	-
<b>Tolérance à</b>				
Lysozyme (0,05%)	+	+	+	+
Phénol (0,05%)	+	+	+	+
Phénol (0,1%)	-	-	-	-

Azide de sodium (0,001%)	-	+	-	+
NaCl (5 %)	+	+	-	-
NaCl (7%)	-	-	-	-
NaCl (10%)	-	-	-	-
<b>Résistance aux antibiotiques</b>				
Chloramphénicol (25µg/ml)	-	-	-	-
Erythromycine (10µg/ml)	-	-	-	-
Gentamicine (5 µg/ml)	+	+	-	+
Kanamycine (25 µg/ml)	-	+	+	-
Oxytétracycline (25 µg/ml)	+	-	+	-
Pénicilline (10 µg/ml)	-	-	-	-
Rifampicine (5 µg/ml)	-	+	+	-
Streptomycine (10 µg/ml)	+	+	-	-
Vancomycine (5 µg/ml)	+	-	-	-

Il est à noter que toutes les analyses effectuées et présentées dans le tableau 11 ont été réalisées trois fois et les résultats sont reproductibles. D'après les données ainsi obtenues, nous pouvons déduire les caractéristiques suivantes pour la souche *Streptomyces* TN17:

- \* Elle est incapable d'hydrolyser les bases puriques.
- \* Elle utilise la plupart des glucides testés comme seule source de carbone sauf l'arbutine, l'esculine, l'inositol, le raffinose, le rhamnose et le xylose.
- \* Elle est capable d'utiliser la plupart des acides aminés comme source d'azote.
- \* Elle a une capacité réduite pour la dégradation des sels de sodium.
- \* Elle peut croître en présence de Tween 80 à 1% et a la capacité de réduire les nitrates.
- \* Elle ne produit pas des pigments mélanoides.
- \* Elle croît à des températures comprises entre 30 et 40°C et par conséquent elle est mésophile.
- \* Elle tolère des pH initiaux de culture entre 5 et 9.
- \* Elle tolère des concentrations en NaCl jusqu'à 5%.

\* Sur les neuf antibiotiques testés, la souche *Streptomyces* TN17 peut croître en présence des antibiotiques suivants : Gentamicine, Oxytétracycline, Streptomycine et Vancomycine à des concentrations respectives de 5, 25, 10 et 5 µg/ml.

En tenant compte de toutes les analyses chimiotaxonomiques, phylogéniques et physiologiques, nous confirmons bien que notre souche TN17 est une nouvelle espèce du genre *Streptomyces*. Si on considère les critères physiologiques, nous remarquons que la souche étudiée présente des caractéristiques très proches de la souche apparentée *Streptomyces lilaceus* NBRC 13676. Par conséquent, nous proposons la nomenclature suivante pour la souche TN17 : *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17.

### **V. 2. La souche *Streptomyces* Fr10 et les deux souches de *Streptomyces* apparentées**

Ce sont les mêmes études réalisées que pour *Streptomyces* TN17. Le tableau 12 illustre les résultats des caractéristiques physiologiques de la souche *Streptomyces* Fr10. Toutes les analyses ont été effectuées trois fois et les résultats sont bien reproductibles.

**Tableau 12 :** Caractéristiques physiologiques de la souche *Streptomyces* Fr10 (A) et des deux souches apparentées : *Streptomyces griseorubiginosus* DSM 40469 (B) *Streptomyces microflavus* DSM 40331 (C).

Caractéristiques	Souche <i>Streptomyces</i> Fr10 et les souches apparentées		
	A	B	C
<b>Hydrolyse des bases puriques et dérivés</b>			
Adénine	+	-	+
Guanine	-	+	+
Xanthine	-	-	-
Hypoxanthine	-	+	-

<b>Utilisation des glucides</b>			
Arbutine	-	-	-
Esculine	-	+	-
Amidon	+	+	+
Arabinose	-	-	+
Fructose	+	-	-
Galactose	+	-	+
Glucose	+	-	-
Glycérol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Lactose	-	+	-
Maltose	+	-	+
Mannose	+	-	-
Raffinose	-	+	-
Rhamnose	-	+	+
Ribose	+	+	+
Sucrose	+	-	+
Tréhalose	-	-	-
Xylose	+	+	-
<b>Utilisation des acides aminés et des protéines</b>			
Méthionine	+	-	+
Asparagine	+	-	-
Phénylalanine	+	+	+
Acide aspartique	-	-	-
Cystéine	+	-	+
Tyrosine	-	-	-
Histidine	-	+	+
Alanine	+	+	+
Leucine	-	+	-
Arginine	+	-	-
Isoleucine	-	+	-
Acide glutamique	-	-	-
Thréonine	+	-	+
Proline	+	+	+
Sérine	+	+	+
Tryptophane	+	-	-
Caséine	+	-	+
Gélatine	+	+	-

<b>Utilisation des sels de sodium</b>			
Acétate	-	+	+
Alginate	+	+	-
Benzoate	-	-	-
Butyrate	-	+	-
Citrate	+	+	+
Desoxycholate	-	-	-
Hydrogen carbonate	-	-	-
Nitrate	+	-	+
Oxalate	-	+	-
Perchlorate	-	+	+
Propionate	-	-	+
Pyruvate	-	-	+
Succinate	+	-	+
Sulfite	-	+	-
Tartrate	-	-	+
Tétraborate	-	-	-
Thiosulfate	+	-	+
<b>Décomposition de surfactants</b>			
Tween 80	-	-	+
<b>Réduction des nitrates</b>	+	+	+
<b>Production des pigments mélanoides</b>	-	+	+
<b>Croissance à différentes Températures</b>			
12°C	-	-	-
20°C	-	-	+
30°C	+	+	+
37°C	+	+	+
40°C	+	+	+
45 °C	-	-	-
50 °C	-	-	-
<b>Croissance à différents pH : (pH initial)</b>			
pH 5.0	+	+	+
pH 6.0	+	+	+
pH 7.0	+	+	+
pH 8.0	+	+	-
pH 9.0	+	-	-

Tolérance à			
Lysozyme (0,05%)	+	+	+
Phénol (0,05%)	+	+	+
Phénol (0,1%)	-	+	+
Azide de sodium (0,001%)	-	+	+
NaCl (5 %)	+	+	+
NaCl (7%)	+	-	-
NaCl (10%)	-	-	-
<b>Résistance aux antibiotiques</b>			
Chloramphénicol (25µg/ml)	-	-	+
Erythromycine (10µg/ml)	-	-	-
Gentamicine (5 µg/ml)	-	+	-
Kanamycine (25 µg/ml)	+	+	-
Oxytétracycline (25 µg/ml)	+	-	+
Pénicilline (10 µg/ml)	-	-	-
Rifampicine (5 µg/ml)	+	-	+
Streptomycin(10 µg/ml)	+	+	+
Vancomycine (5 µg/ml)	-	-	-

D'après les données ainsi obtenues, nous pouvons déduire que *Streptomyces* Fr10:

- \* Elle est incapable d'hydrolyser les bases puriques.
- \* Elle utilise la plupart des glucides testés comme seule source de carbone sauf l'arbutine, l'esculine, l'arabinose, l'inositol, le lactose, le raffinose, le rhamnose et le tréhalose.
- \* Elle est capable d'utiliser la plupart des acides aminés comme source d'azote.
- \* Elle a une capacité réduite pour la dégradation des sels de sodium.
- \* Elle ne peut pas croître en présence de Tween 80 à 1%. Elle est nitroréductrice.
- \* Elle ne produit pas de pigments mélanoides.
- \* Elle croît à des températures comprises entre 30 et 40°C et par conséquent elle est mésophile.



\* Elle tolère des pH initiaux de culture entre 5 et 9.

\* Elle tolère des concentrations en NaCl jusqu'à 7%.

\* Sur les neuf antibiotiques testés, la souche *Streptomyces* Fr10 peut croître en présence des antibiotiques suivants : Kanamycine, Oxytétracycline, Rifampicine et Streptomycine à des concentrations respectives de 25, 25, 5 et 10 µg/ml.

En tenant compte de toutes les analyses chimiotaxonomiques, phylogéniques et physiologiques, nous confirmons bien que notre souche Fr10 est une nouvelle espèce du genre *Streptomyces*. Si on considère les critères physiologiques, nous remarquons que la souche étudiée présente des caractéristiques très proches de la souche apparentée *Streptomyces microflavus* DSM 40331. Par conséquent, nous proposons la nomenclature suivante pour la souche Fr10 : *Streptomyces microflavus* sp. Fr10.

## **Conclusion**

Les travaux de recherche de ce premier chapitre de la présente thèse ont été orientés vers l'identification des deux souches TN17 et Fr10. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs études qui sont :

\* Des études morphologiques utilisant dix milieux de culture solides. Les résultats obtenus confortent l'hypothèse que les deux souches étudiées sont des bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces*.

\* Des études chimiotaxonomiques qui se basent sur l'analyse des constituants de la paroi. Durant ces analyses nous nous sommes intéressés à :

- L'analyse des acides aminés et des sucres pariétaux : Nous avons constaté que la paroi des deux souches TN17 et Fr10, contient l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et la glycine. Ces résultats indiquent que la paroi des deux souches est du type I. Ce dernier est caractéristique des bactéries du genre *Streptomyces*.

- L'analyse des lipides membranaires à savoir les phospholipides et les acides gras. Nous avons démontré la présence de phosphatidyléthanolamine (PE) et l'absence de phosphatidylcholine (PC) dans les parois cellulaires des deux isolats (TN17 et Fr10). Ce résultat nous a permis de déduire que ces deux souches sont des actinomycètes de type II. De plus, et suite aux analyses des acides gras pariétaux, nous avons remarqué que les parois des souches TN17 et Fr10 sont de type iso et ante-iso caractéristique de la plupart des actinomycètes.

\* Des études phylogéniques qui se basent sur les analyses des séquences nucléotidiques du gène codant pour l'ARN16S. Par le biais de programmes spéciaux, nous avons élaboré les arbres phylogéniques des deux souches TN17 et Fr10. D'après les résultats obtenus, nous constatons que les souches les plus apparentées à la souche TN17 sont: *Streptomyces lavendofolia* AB 184217, *Streptomyces gobitricini* AB 184666 et *Streptomyces lilaceus* AB 184457. Pour la souche Fr10, les souches les plus apparentées sont : *Streptomyces microflavus* HBUM 174043 et *Streptomyces griseorubiginosus*.

\* Des études physiologiques qui s'intéressent à la capacité des isolats à hydrolyser les bases puriques et leurs dérivés, à dégrader les glucides, les acides aminés, les surfactants et les sels de sodium, à réduire les nitrates, à produire des pigments mélanoides, à tolérer différentes températures, différents pH initiaux, le lysozyme, le phénol, l'azide de sodium, le chlorure de sodium et les antibiotiques. Ces études ont permis de conforter l'idée que les deux isolats TN17 et Fr10 sont des actinomycètes du genre *Streptomyces* et que ces deux bactéries sont des nouvelles espèces de *Streptomyces*.

Compte tenu de toutes les analyses morphologiques, chimiotaxonomiques, phylogéniques et physiologiques, nous confirmons bien que les deux souches TN17 et Fr10 sont deux nouvelles espèces du genre *Streptomyces*, et nous proposons les nomenclatures suivantes : *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17 et *Streptomyces microflavus* sp. Fr10.

## **B. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION CHIMIQUE DES BIOMOLECULES DE LA SOUCHE DE *Streptomyces lilaceus* sp. TN17. PURIFICATION DES BIOMOLECULES DE LA SOUCHE DE *Streptomyces microflavus* sp. Fr10**

Comme nous l'avons signalé dans la partie bibliographique, les métabolites secondaires biologiquement actifs (antibiotiques, antifongiques,..) sont généralement liés et influencés par le métabolisme primaire de la bactérie productrice. Un ou plusieurs métabolites intermédiaires du métabolisme primaire servent fréquemment comme précurseur pour leur synthèse. Toutefois, la composition du milieu de culture gouverne la capacité et la quantité de métabolites secondaires produit par le micro-organisme en question. Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone ainsi que les additifs chimiques à savoir le potassium ( $K_2HPO_4$ ), le magnésium ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) et les oligo-éléments influencent énormément la capacité de production des antibiotiques chez les *Streptomyces* (Mellouli *et al.*, 2003 – 2004 ; Fourati ben Fguira 2005 ; Ben Ameer Mehdi *et al.*, 2006).

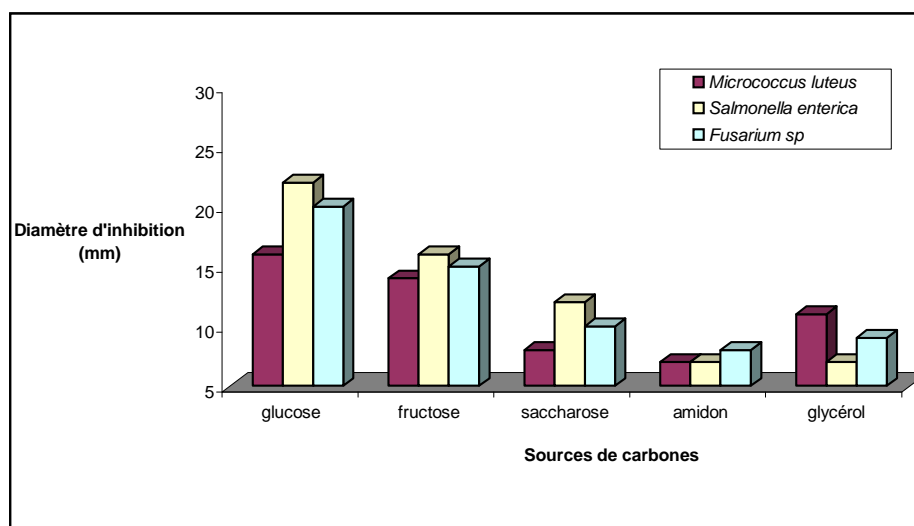
### **I. Optimisation des conditions de production des biomolécules de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17**

#### **I. 1. Sources de carbone**

En utilisant comme milieu de base (pour la pré-culture et la culture) le milieu TSB (Bouillon tryptique de Soja) à 30 g/l nous avons testé cinq sources de carbone (le glucose, l'amidon, le fructose, le saccharose et le glycérol) à 1% (w/v). Les cinq cultures de 200 ml

chacune de 18h par la pré-culture correspondante. Après 72 h d'incubation à 30°C sous une agitation à 250 rpm, les surnageants des cinq cultures ont été séparés de la biomasse par centrifugation. Un double extraction par l'acétate d'éthyle (2v/v) a été réalisé sur chacun des cinq surnageants obtenus. Après évaporation, les extraits actifs correspondants ont été repris dans 2 ml de mélange de « dichlorométhane 90 % et méthanol 10 % », puis utilisés pour la détermination des activités biologiques en utilisant les tests d'inhibitions de la croissance des cellules indicatrices suivantes : une bactérie à Gram+ (*Micrococcus luteus* LB 14110), une bactérie à Gram- (*Salmonella enterica* ATCC 43972) et un champignon filamenteux (*Fusarium sp.*)

Comme le montre la figure 14, des zones d'inhibitions (plus au moins importantes) ont été obtenues pour toutes les sources de carbones contre tous les microorganismes cibles testés. La plus forte inhibition est observée avec la source de carbone glucose. En utilisant cette source de carbone, nous avons testé quatre concentrations différentes (0,5%; 0,75%; 1% et 1,5% w/v). Pour se faire, quatre cultures de 200 ml chacune, ont été réalisées et étudiées dans les mêmes conditions utilisées pour la détermination de la meilleure source de carbone. En se basant sur les tests d'inhibitions de la croissance des trois souches indicatrices, nous avons constaté que la concentration en glucose de 1% (w/v) est celle qui donne la meilleure activité biologique : le glucose est un précurseur nécessaire pour la production de ces métabolites.



**Figure 14** : Effet des sources de carbones à 1% (w/v) sur les activités biologiques de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17

## **I. 2. Eléments chimiques**

Comme la source de carbone, les additifs chimiques tels que le magnésium, le potassium et les oligo-éléments peuvent influencer la production des métabolites secondaires biologiquement actifs chez les bactéries et notamment les *Streptomyces* (Elleuch *et al.*, 2009). Dans le présent travail, nous avons testé l'effet des trois additifs chimiques :  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 mM) et les oligo-éléments à raison de 7,5 ml /l d'une solution contenant (40 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 200 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6,5 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  et 13,5 mg  $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pour 100 ml d'eau distillée) sur la production des activités antimicrobiennes de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17. Pour ce faire, huit cultures de 200 ml chacune sur milieu TSB compléter avec 10g/l de glucose ont été réalisées comme suit : La première culture (témoin) sans additifs chimiques, la deuxième contient du  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , la troisième est additionnée de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , la quatrième contient la solution d'oligoéléments, la cinquième est additionnée des deux additifs  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , la sixième contient du  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et la solution d'oligoéléments, la septième est additionnée de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et de la solution d'oligoéléments et la huitième culture est enrichie par les trois additifs chimiques testés. Les huit cultures sont incubées durant 72h à la température 30°C est sous une agitation de 250 rpm.

Après une double extraction par l'acétate d'éthyle des surnageants des huit cultures, les phases organiques correspondantes ont été évaporées à sec puis les extraits secs correspondants ont été repris chacun dans 2 ml de mélange de « dichlorométhane 90% et méthanol 10% », puis utilisés pour la détermination des activités biologiques contre : *Micrococcus luteus* LB 14110, *Salmonella enterica* ATCC 43972 et le champignon filamenteux *Fusarium* sp.

Les résultats obtenus montrent que la présence du  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dans le milieu de culture affecte positivement la production des biomolécules de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17 alors que, la présence des oligoéléments affecte négativement cette production. Concernant l'additif  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nous n'avons pas constaté d'effet ni positif et ni négatif. Le milieu de culture retenu pour les cultures de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17 dans des conditions semi-préparatives (en fermenteur) est le TSB à 30 g/l additionné de glucose à 1% (w/v) comme source de carbone et de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1mM) comme additif chimique.

Par ailleurs, il est à noter que ces mêmes constatations (effet positif de l'additif  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et négatif des oligoéléments sur la sécrétion de métabolites secondaires biologiquement actifs) ont été déjà rapportées pour la souche de *Streptomyces* sp. TN58 (Mellouli *et al.*, 2004). Cependant, la

nature de l'influence de ces additifs chimiques n'est pas toujours la même et elle varie selon la souche étudiée. En effet, alors que les oligoéléments influencent négativement la sécrétion de métabolites secondaires chez les deux bactéries *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17 et *Streptomyces* TN58. Ces mêmes oligoéléments augmentent (influencent positivement), la production des métabolites secondaires biologiquement actifs chez la souche de *Streptomyces* sp. US24 (Mellouli *et al.*, 2003).

## **II. Extraction, purification et caractérisation chimique des biomolécules de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17**

### **II.1. Extraction**

La nouvelle souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17 a été sélectionnée pour des études approfondies lors de travaux antérieurs pour ses activités antimicrobiennes importantes contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et contre des champignons. Pour la purification et la caractérisation chimique des biomolécules de cette souche nous avons préparé un volume de surnageant actif de 30 litres (6 fermentations de 5 litres chacune). Pour ce faire, à partir d'une préculture de 24 h inoculée à  $10^7$  spores/l, les 5 litres du milieu de culture du fermenteur (milieu TSB à 30 g/l additionné de glucose à 1 % w/v et de  $K_2HPO_4$  à 1mM) sontensemencés à 5 % v/v. Après incubation de 72 h à 30°C, le jus de fermentation est filtré puis centrifugé. Le surnageant obtenu est extrait deux fois par un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase organique contenant le composé actif est évaporé à sec par Rotavapor. Les six extraits secs obtenus sont de couleur marron. Ils ont été mélangés pour donner une masse totale de 2,8 g et puis dissous dans 5 ml de dichloro-méthane - méthanol (DCM 90% - MeOH 10%).

Les tests biologiques réalisés sur les extraits secs collectés montrent un fort pouvoir inhibiteur de ces extraits contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et les champignons (Tableau 12).

**Tableau 12 :** Activités biologiques des extraits secs collectés de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp.

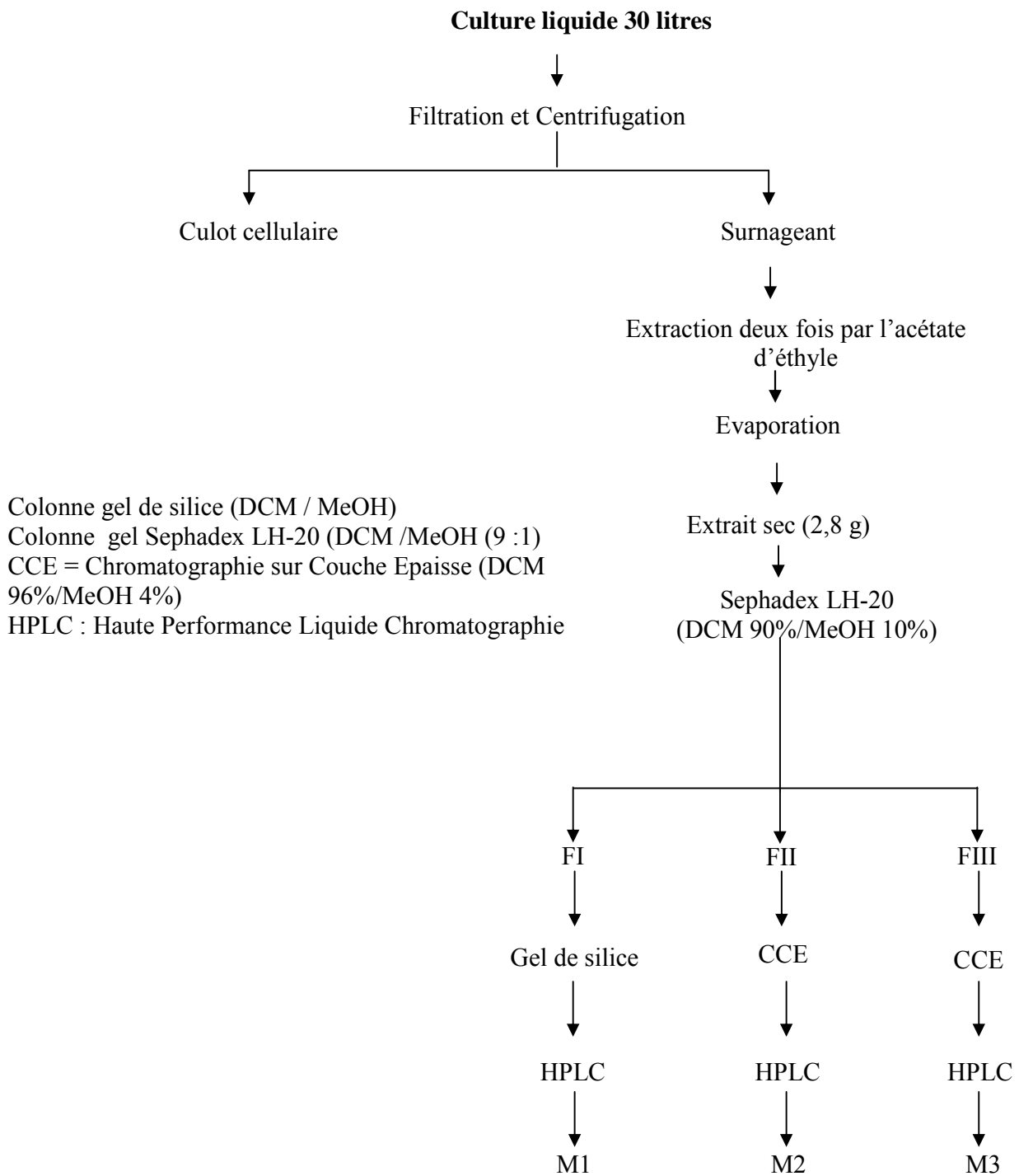
TN 17: Pour chaque test, 50 µl (du mélange 5 ml de DCM–MeOH (9 :1) ont été déposés.

Cellules indicatrices	<i>M. luteus</i> LB 14110	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. enterica</i> ATCC43972	<i>E. Coli</i> ATCC 8739	<i>Fusarium.sp</i>
Φ(mm)	24	22	23	21	21

## II. 2. Purification

La figure 15, présente le schéma global adopté pour la purification des trois molécules bioactives (M1, M2 et M3) de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17





**Figure 15 :** Schéma de purification des trois biomolécules de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17

Les 2,8 g d'extrait sec actif obtenus ont été dissous dans 5 ml de dichlorométhane - méthanol (DCM 90% - MeOH 10%) puis déposés sur une colonne de chromatographie (Séphadex LH-20) en utilisant comme tampon d'élution un mélange de dichlorométhane - méthanol (DCM 90% - MeOH 10%). Cette première étape de purification nous a permis d'obtenir sept fractions qui ont été réduites à trois fractions (FI, FII et FIII) suite aux analyses chromatographiques sur couche mince (CCM).

### **II. 2. 1. Fraction I (FI)**

Après concentration, cette fraction biologiquement active a été soumise à deux autres étapes chromatographiques successives :

\* Chromatographie sur colonne de gel de silice éluee par un gradient allant de « 100% dichlorométhane - 0% méthanol » à « 0% dichlorométhane – 100% méthanol ». Plusieurs sous fractions ont été collectées et en se basant sur des tests microbiologiques nous avons constaté qu'une seule sous fraction présente une activité biologique.

\* Chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La sous fraction active de la fraction FI a été le siège d'une étape de purification HPLC à travers une colonne C18 (250x7). L'élution a été réalisée avec un gradient linéaire utilisant deux solutions A (eau) et B (acétonitrile) à un débit de 1ml/min. Les proportions utilisées sont les suivantes : De 100% A à 50% A et 50% B pendant 35 min puis jusqu'à 100% B et 0% A pendant 10 min (jusqu'à 45 min). Le chromatogramme obtenu montre plusieurs pics bien développés et séparés entre les temps de rétentions 5 et 45 min. Les différents pics ont été collectés séparément, concentrés puis testés pour leurs activités biologiques. Seule la solution correspondant au pic ayant un temps de rétention de 39 min est biologiquement active. La molécule correspondante est nommée M1.

### **II. 2. 2. Fractions II et III (FII et FIII)**

Ces deux fractions ont fait chacune l'objet de deux étapes de séparation qui sont : La chromatographie sur couche épaisse (CCE) suivie par une Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Les conditions de purification HPLC utilisées pour les deux sous fractions issues de la purification CCE des fractions FII et FIII, sont les mêmes que celles utilisées pour la sous fraction issue de la fraction FI. Les tests microbiologiques ont montré que les molécules obtenues M2 et M3 sont biologiquement actives.

## II. 3. Caractérisation chimique de M1, M2 et M3

### II. 3. 1. Molécule M1

Plusieurs techniques spectroscopiques ont été appliquées pour la caractérisation chimique de cette molécule M1. Les techniques ainsi que les interprétations des résultats obtenus sont présentés dans ce qui suit.

#### \* Spectre RMN $^1\text{H}$ de M1 :

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  à 600MHz dans DMSO (Figure 16) de la molécule M1 montre un signal dans la région aromatique et douze signaux dans la région aliphatiques.

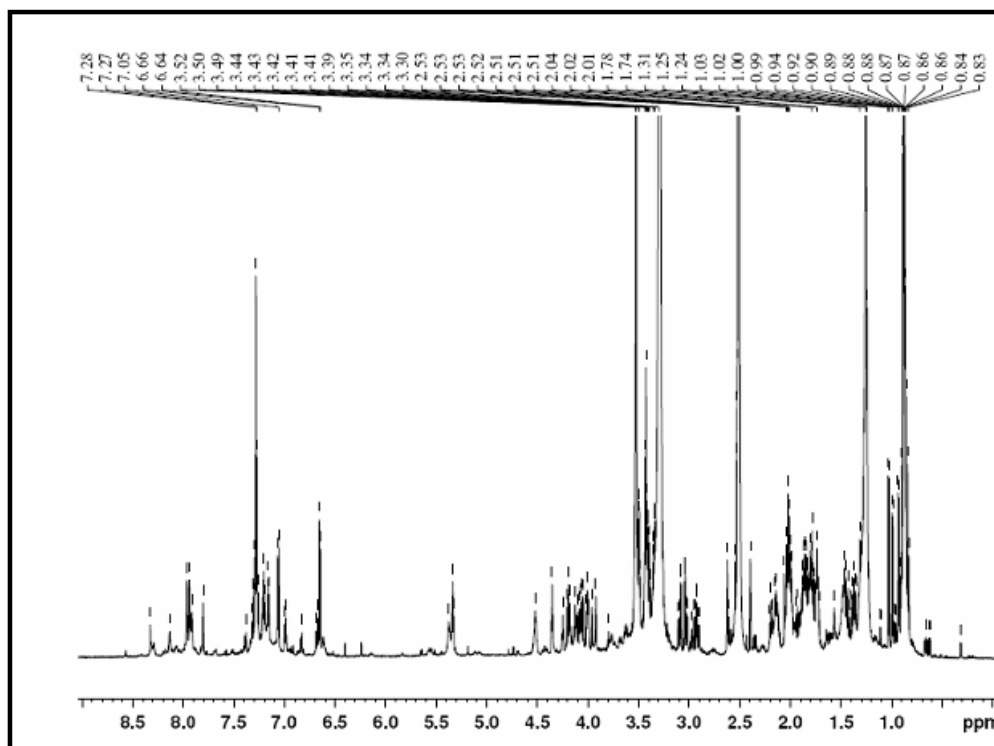


Figure 16: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600MHz, DMSO) de la molécule M1

Le tableau 13 résume les données relatives aux études RMN  $^1\text{H}$  de M1

Tableau 13 : RMN <sup>1</sup>H (600MHz, DMSO) de M1

$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	multi	Intégration et J(Hz)	RMN <sup>1</sup> H
7,96	s	NH	Ces quatre signaux correspondent aux hydrogènes proches d'éléments électronégatifs (O ou N).
4,19	dd	(1H, J=8.1, 8.0)	
4,01	dd	(CH, J=6.9, 5.9)	
3,41	m	1H	
3,28	m	1H	
2,13	m	1H	Ces huit signaux correspondent à des H aliphatiques.
1,92	m	1H	
1,90	m	1H	
1,79	m	1H	
1,77	m	1H	
1,37	m	1H	
0,88	d	(1H, J=7.0)	
0,87	d	(1H, J=7.0)	

\* Spectre RMN <sup>13</sup>C de M1 :

Le spectre RMN <sup>13</sup>C de M1, réalisé à 150 MHz dans le DMSO (Figure 17), présente 11 signaux relatifs à 11 carbones différents. Chaque singulet correspond à un carbone différent. Le Tableau14, résume les données spectrale de l'étude RMN <sup>13</sup>C de M1.

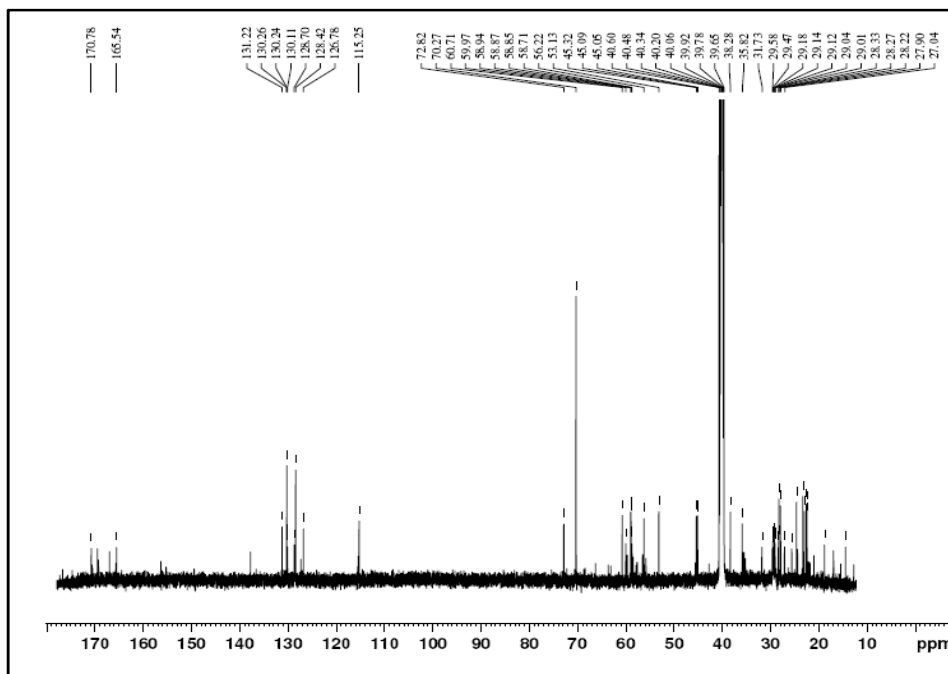


Figure 17: Spectre RMN <sup>13</sup>C de M1

Tableau 14 : RMN  $^{13}\text{C}$  (150MHz, DMSO) de M1

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	RMN $^{13}\text{C}$
170,8	$\begin{array}{c} \text{C}=\text{O} \text{ avec } \text{X}=\text{O}, \text{ ou } \text{X}=\text{N} \\   \\ \text{X} \end{array}$
167,0	
59,0	CH
53,1	CH
45,3	CH <sub>2</sub> aliphatique
38,3	CH <sub>2</sub> aliphatique
27,9	CH <sub>2</sub> aliphatique
24,6	CH
23,2	CH <sub>3</sub>
22,9	CH <sub>2</sub> aliphatique
22,4	CH <sub>3</sub>

D'après le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , il est possible de discerner deux groupes carbonyle ( $\delta\text{C}$  170,8 et 167,0), trois  $\text{sp}^3$ -carbures hybridées portant un hétéroatome électronégatif ( $\delta\text{C}$  59.0, 53.1 et 45.3), quatre  $\text{sp}^3$ -hybridées de carbone ( $\delta\text{C}$  38.3, 27,9, 24,6 et 22,9) et deux groupes de méthyle ( $\delta\text{C}$  23.3 et 22.4). Les données spectrales, RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de la molécule M1, sont insuffisantes pour déterminer la structure chimique de cette molécule. Il est donc nécessaire de réaliser des expériences RMN multidimensionnelles qui vont permettre de corréler les hydrogènes et les carbones entre eux.

\* **Spectre HH COSY** : Cette étude (Figure 18) permettra de corréler les protons entre eux par couplage scalaire (interaction à 2, 3 voir 4 liaisons). Le tableau 15 résume les corrélations en conséquences.

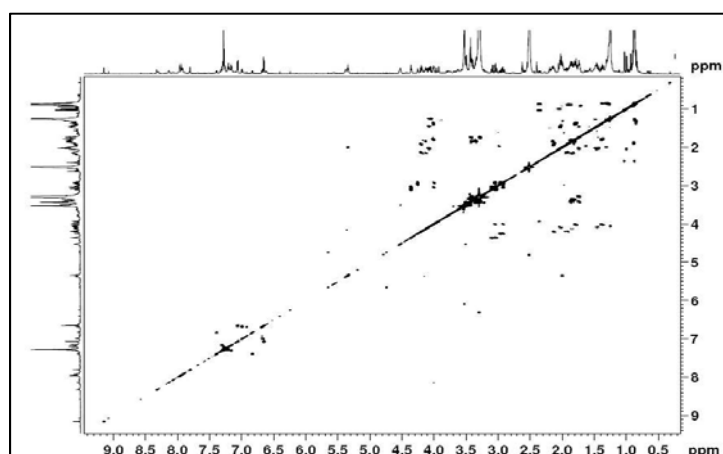


Figure 18: Spectre HH COSY de M1.

Tableau 15 : Corrélations HH COSY de M1

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	H-H COSY
2,13	m	1,79	m	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
2,13	m	1,92	m	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
2,13	m	4,19	dd	$\begin{array}{c} \text{X} \\   \\ \text{X-N-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-X} \end{array}$
1,79	m	3,28	m	
1,79	m	4,19	d	
3,28	m	4,19	d	
1,79	m	1,92	m	
1,77	m	1,90	m	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
1,77	m	1,37	m	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
1,90	m	0,88	d	
1,90	m	0,87	d	
1,90	m	4,01	m	
1,92	m	4,19	d	
1,37	m	4,01	d	
1,37	d	1,90	m	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
4,01	dd	4,19	dd	

L'ensemble de ses résultats montre la structure suivante (figure 19).



Figure 19: Structure chimique de M1 déduite selon les analyses spectrales réalisées

Toutes ces informations sont toujours insuffisantes pour donner une structure exacte de M1. Pour cette raison, nous avons réalisé l'expérience HSQC qui permet de corréler les hydrogènes avec les carbones à une liaison. Nous avons réalisé une expérience en mode « edité » qui permet de distinguer les CH/CH<sub>3</sub> (positif) des CH<sub>2</sub> (négatif).

\* *Spectre HSQC* : La figure 20 présente le spectre obtenu et le Tableau 16, illustre les corrélations en conséquence.

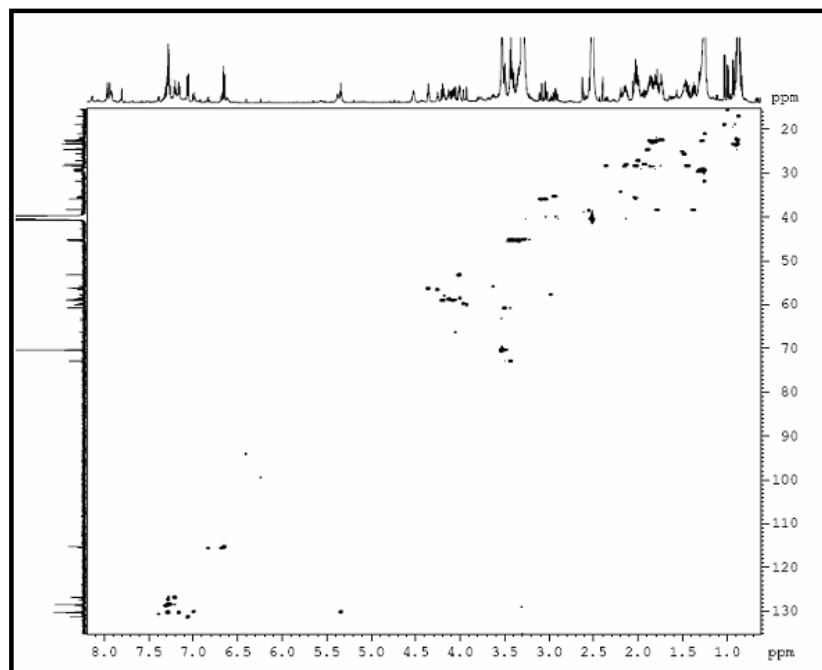


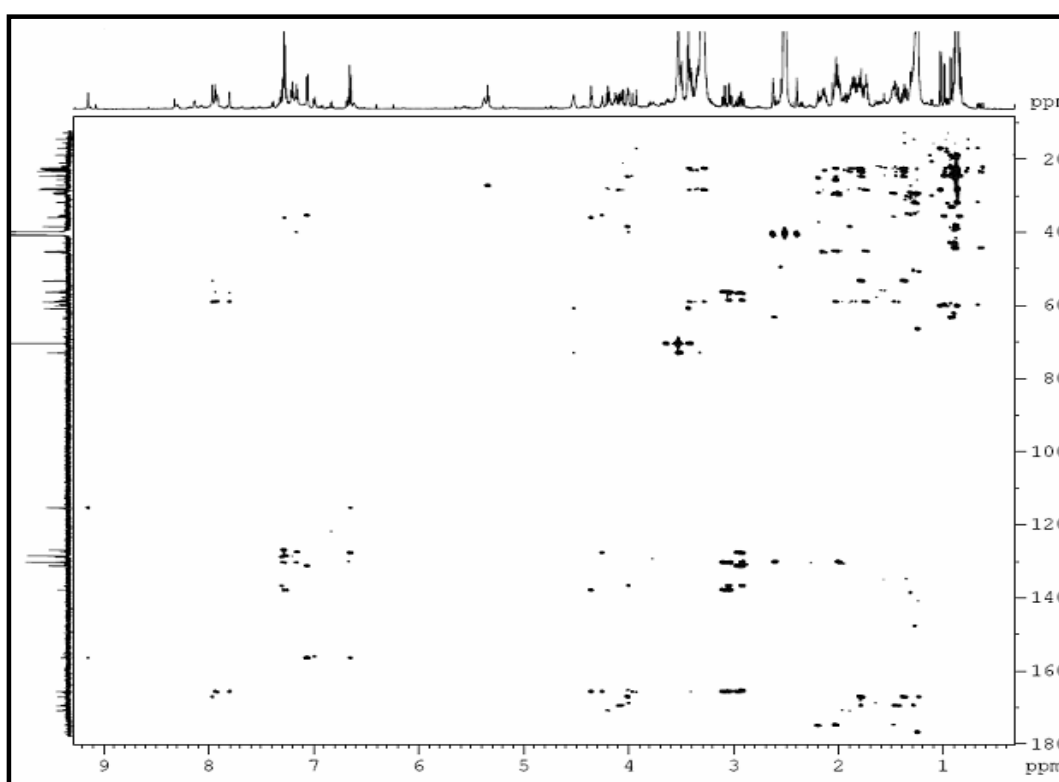
Figure 20: Spectre HSQC de M1.

Tableau 16: Corrélations HSQC de M1

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	HSQC
59,0	4,19	dd	-		CH-N
53,1	4,01	dd	-		CH-N
45,3	3,41	m	3,28	m	CH <sub>2</sub> -N
38,3	1,37	m	1,77	m	CH <sub>2</sub> aliphatique
27,9	1,92	m	2,13	m	CH <sub>2</sub> aliphatique
24,6	1,9	m	-		CH <sub>2</sub> aliphatique
23,3	0,88	d	-		CH-N
22,4	0,87	d	-		CH <sub>3</sub>
22,9	1,79	m	-		CH <sub>2</sub> aliphatique

Les données obtenues sont toujours insuffisantes d'élucider la structure chimique complète de M1. Nous étions amenés à réaliser le spectre HMBC qui permet de rétablir les corrélations des protons et les  $^{13}\text{C}$  à deux, trois ou à quatre liaisons.

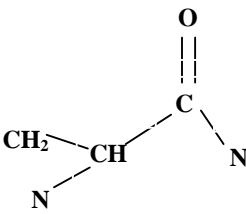
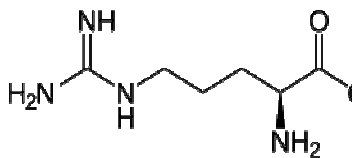
\* *Spectre HMBC* : La figure 21 présente le spectre obtenu et le tableau 17, illustre les corrélations en conséquences



**Figure 21:** Spectre HMBC de M1



Tableau 17: Corrélations HMBC de M1

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	HSQC
170,8	2,13	m	4,19	d	
167,0	1,77	m	4,01	d	
170,8	2,13	m	4,19	d	
170,8	0,88	d	-	-	

Les données des analyses RMN de M1 sont résumées dans le Tableau 18.

Tableau 18: Données des analyses RMN de M1

Données de RMN du Produit 1 dans le DMSO		
Position	$\delta\text{C}$ , mult.	$\delta\text{H}$ , mult (J)
<i>Leu</i>		
1	167.0, qC	
2	53.1, CH	4.01, dd (6.9, 5.9)
3	38.3, CH <sub>2</sub>	1.37, m
		1.77, m
4	24.6, CH	1.9, m
5	22.4, CH <sub>3</sub>	0.87, d (7.0)
5'	23.3, CH <sub>3</sub>	0.88, d (7.0)
<i>Arg</i>		
1	170.8, qC	

2	59.0, CH	4.19, dd (8.1, 8.0)
3	27.9, CH <sub>2</sub>	1.92, m
		2.13, m
4	22.9, CH <sub>2</sub>	1.79, m
5	45.3, CH <sub>2</sub>	3.41, m
		3.28, m
NH		7.96, br s

**\* Elucidation de la structure chimique complète de M1 :**

Les expériences de la 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C montrent deux fragments leucine et arginine. La présence d'un proton NH ( $\delta$ H 7,96) est observée et les corrélations HMBC et NOE ont permis d'identifier le composé M1 en tant qu'un dipeptide (L-Leu-L-Arg). Sur la base de ces données, deux structures possibles ont été proposées pour M1. La première est une structure linéaire et dans ce cas le poids moléculaire correspondant (MW) sera 287 g/mol (Figure 22 a), et la seconde est une structure cyclique est le MW sera 269 g/mol (Figure 22 b).

Pour déterminer la nature de structure de la biomolécule M1, nous avons réalisé une analyse LC/MS. Comme le montre la figure 23, la masse obtenue pour M1 est de 269 Da. Ceci implique que la molécule M1 est le dérivé de dikétopipérazine (DKP) : (L-Leu, L-Arg) ayant une structure cyclique. C'est donc le Cyclo (L-Leu, L-Arg) ce qui correspond à la structure présentée par la figure 22a. La formule moléculaire correspondante à M1 est : C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>.

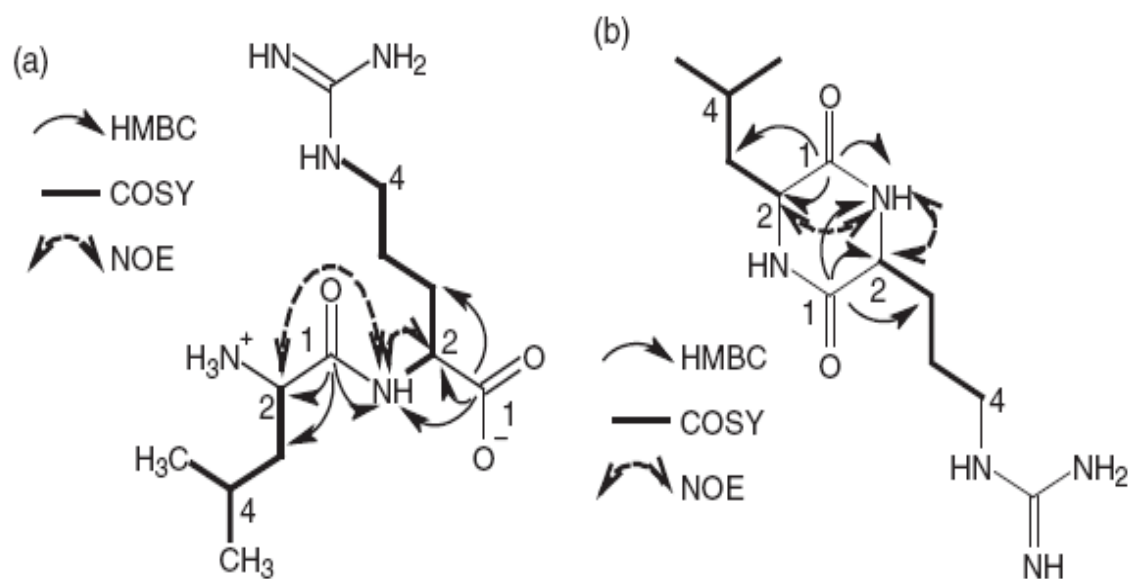


Figure 22 : Structures chimiques possibles de M1.

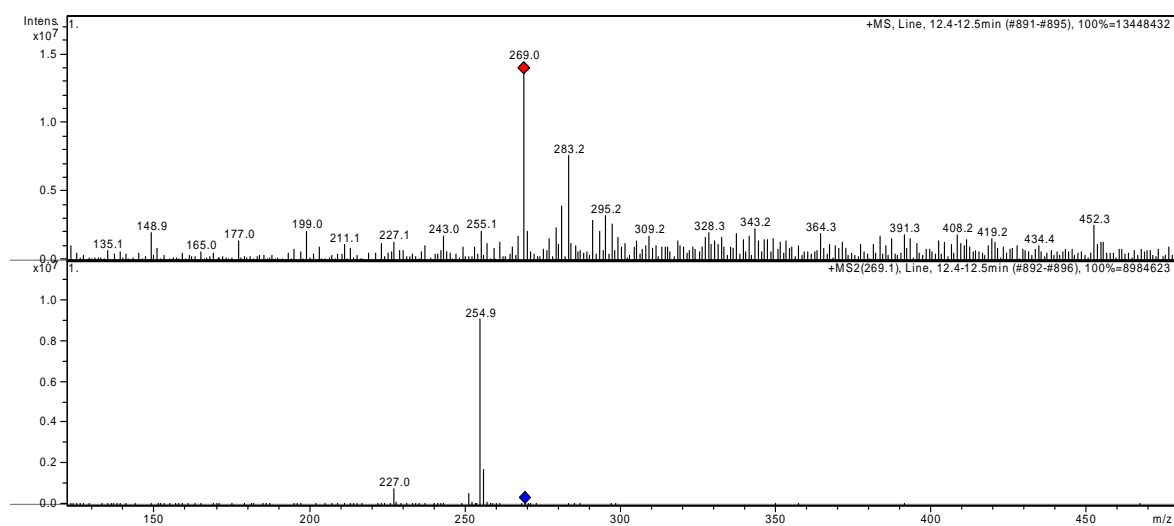


Figure 23: Spectre LC/MS de M1

### II. 3. 2. Molécule M2

Cette molécule est de couleur blanche à l'état solide. Son  $R_f = 0,411$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH 4%). Comme la molécule M1, l'identification chimique de cette molécule a été déterminée par le biais de plusieurs techniques spectroscopiques.

\* **Spectre RMN  $^1\text{H}$  de M2:** Comme le montre la figure 24, dix signaux ont été obtenus dont deux dans la région aromatique et 8 signaux dans la région aliphatiques. Le tableau 19, résume les données relatives aux études RMN  $^1\text{H}$  de M2.

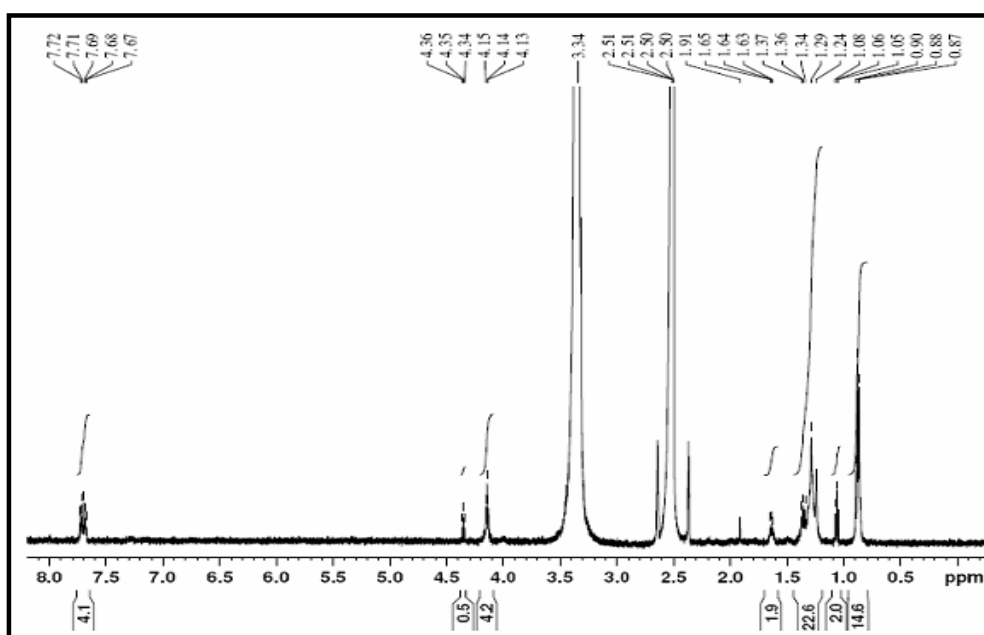
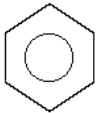


Figure 24 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de M2

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de M2 a montré un système caractéristique AA'BB' à 7,74 et 7,59 ppm ( $J_{AA'} = 0,7$  Hz,  $J_{AB} = J_{A'B'} = J_{BB'} = 7,8$  Hz et  $J_{AB'} = J_{A'B} = 1,1$  Hz obtenus à partir de simulation).

Tableau 19 : Corrélations RMN <sup>1</sup>H de M2

$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	multi	Intégration et J (Hz)
7,74	m	
7,59	m	
4,25	dd	(CH <sub>2</sub> O, J=10.8, 5.6)
4,21	dd	(CH <sub>2</sub> O, J=10.8, 6.0)
1,71	m	CH <sub>2</sub> aliphatique
1,46	m	CH <sub>2</sub> aliphatique
1,40	m	CH <sub>2</sub> aliphatique
1,36	m	CH <sub>2</sub> aliphatique
0,96	t	(CH <sub>3</sub> , J=7.3)
0,94	t	(CH <sub>3</sub> , J=7.0)

\* *Spectre RMN <sup>13</sup>C de M2* : Le spectre obtenu présente 12 signaux relatifs à 12 carbones différents (Figure 25).

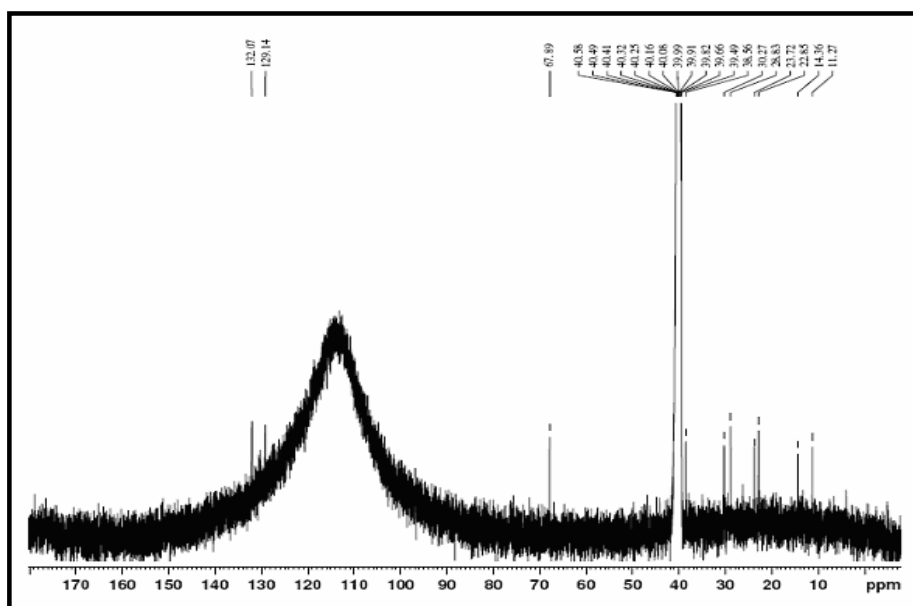
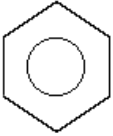


Figure 25 : Spectre RMN <sup>13</sup>C de M2

L'analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C de M2 a permis de distinguer les corrélations suivantes (Tableau 20).

Tableau 20 : RMN <sup>13</sup>C de M2

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	RMN <sup>13</sup> C
162,5	
132,5	
130,9	
128,7	
68,0	CH <sub>2</sub> =O
38,8	CH <sub>2</sub> aliphatiques
30,4	
28,9	
23,8	
23,0	
13,8	CH <sub>3</sub>

D'après les résultats des analyses en RMN <sup>13</sup>C de M2, il est possible de discerner un carbonyle du groupe ( $\delta\text{C}$  162,5), trois sp<sup>2</sup>-carbures hybridés ( $\delta\text{C}$  132,5, 130,9 et 128,7), une sp<sup>3</sup>-hybridés de carbone portant un hétéroatome électronégatif ( $\delta\text{C}$  68,0), cinq sp<sup>3</sup>-carbures hybridés ( $\delta\text{C}$  35,8 et 23,8) et deux groupes de méthyles ( $\delta\text{C}$  13,8 et 10,7).

\* *Spectre HH COSY de M2* : Les données sont portées sur la Figure 26 et le Tableau 21

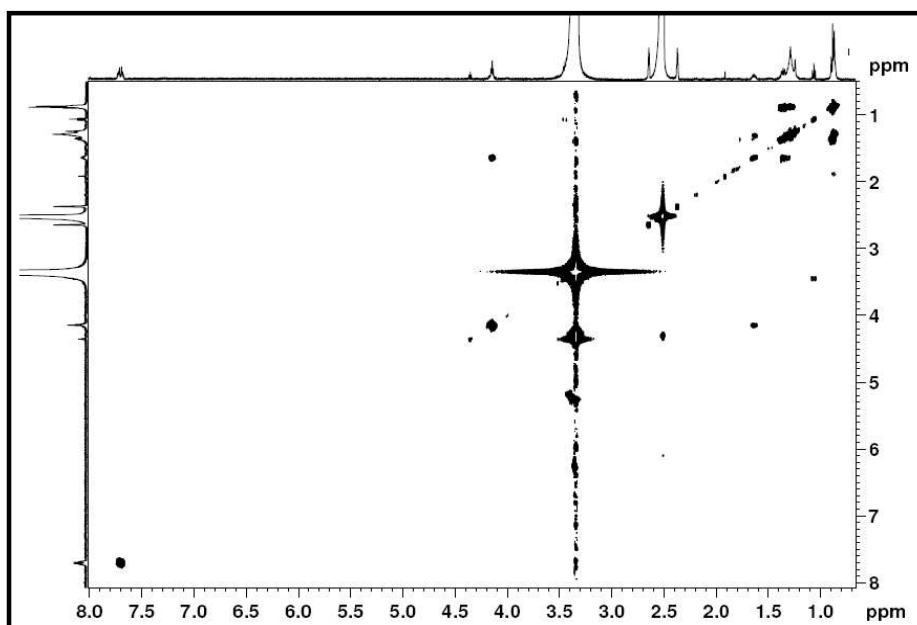
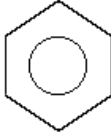


Figure 26. Spectre HH COSY de M2.

Tableau 21: Corrélations HH COSY de M1.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	H-H COSY
7,74	m	7,59	m	
4,21	d	1,36	m	CH <sub>2</sub> -CH
1,36	m	0,96	m	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
1,71	m	1,36	m	CH-CH <sub>2</sub>

L'ensemble des résultats montre la structure suivante (Figure 27).

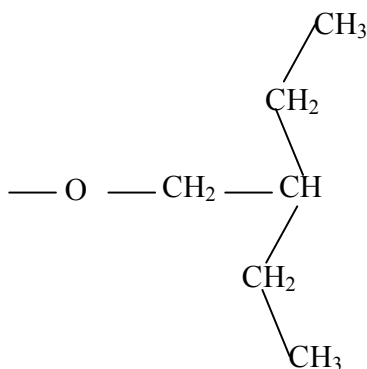


Figure 27: Structure partielle déduite selon les études RMN

Les données obtenues suite aux différentes études spectrales RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) restent insuffisantes pour l'élucidation totale de la structure de la molécule de M2. Nous avons alors poussée les études spectroscopiques :

\* *Spectre HSQS de M2* : Les résultats obtenus suite à ces études sont montrés par la Figure 28 et le Tableau 22.

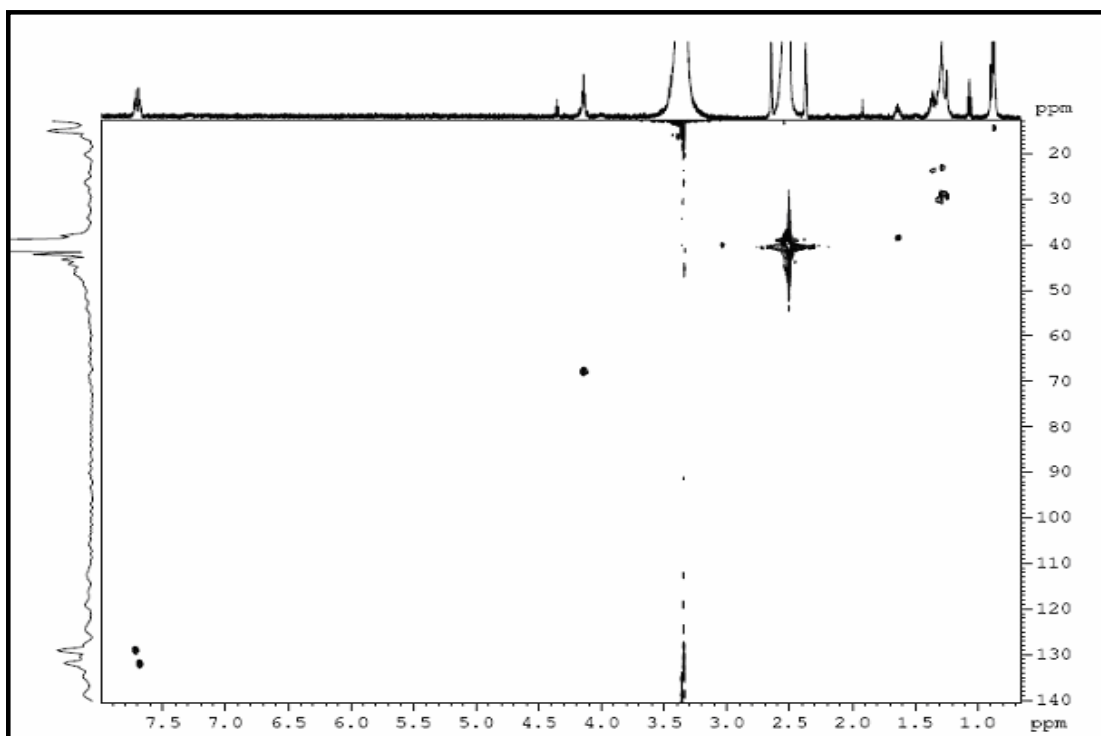


Figure 28: Spectre HSQC de M2

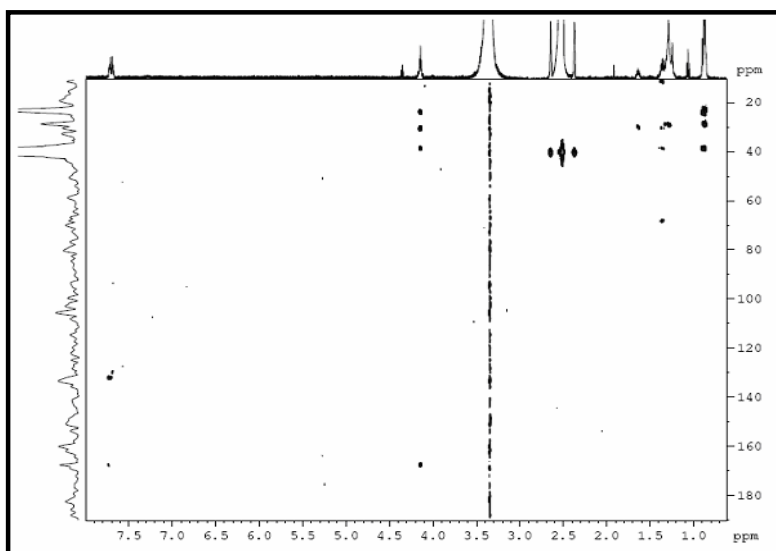
Tableau 22: Corrélations HSQC de M2

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	HSQC
128,7	7,74	m	CH typiques d'un cycle aromatique
130,9	7,59	m	
68,0	4,25	dd	CH <sub>2</sub> -O
68,0	4,21	dd	
38,8	1,71	m	CH
30,4	1,40	m	CH <sub>2</sub>
28,9	1,36	m	
23,0	1,36	m	
13,8	0,94	t	CH <sub>3</sub>
23,8	1,46	m	CH <sub>2</sub>
10,7	0,96	t	CH <sub>3</sub>

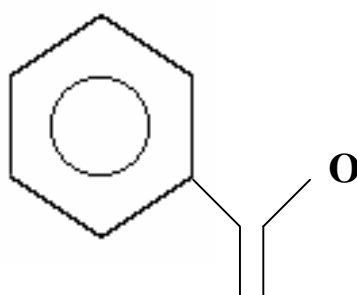


\* *Spectre HMBC de M2* : (Figure 29) Cette étude a permis de distinguer :

C (168,5ppm) ↔ H (4,14ppm) ↔ H (7,74ppm) qui correspond à un noyau benzénique (Figure 30).



**Figure 29:** Spectre HMBC de M2.



**Figure 30:** Noyau benzénique de M2 suite aux études HMBC

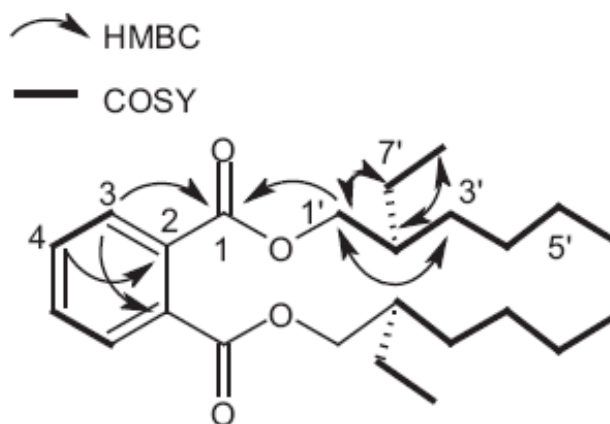
L'ensemble des données des études RMN de M2 sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 23:** Données RMN de M2.

**Données de RMN du produit 1 dans CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

Position	δC, mult.	δH, mult (J)
1	162.5, qC	
2	132.5, qC	
3	128.7, CH	7.74, m
4	130.9, CH	7.59, m
1'	68.0, CH <sub>2</sub>	4.25, dd (10.8, 5.6) 4.21, dd (10.8, 6.0)
2'	38.8, CH	1.71, m
3'	30.4, CH <sub>2</sub>	1.40, m
4'	28.9, CH <sub>2</sub>	1.36, m
5'	23.0, CH <sub>2</sub>	1.36, m
6'	13.8, CH <sub>3</sub>	0.94, t, (7.0)
7'	23.8, CH <sub>2</sub>	1.46, m
8'	10.7, CH <sub>3</sub>	0.96, t, (7.3)

Ces données sont en accord avec un composé qui a une di ortho-substitués aromatique. Tenant compte de ces résultats ainsi que des recherches dans AntiBase, le composé M2 a été identifié comme di-(2-éthylhexyl) phtalate (Figure 31). La formule moléculaire correspondante, est C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> avec une masse de 390 g/mol.



**Figure 31:** Structure chimique de la biomolécule M2.

### II. 3. 3. Molécule M3.

Cette molécule présente un  $R_f = 0,353$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH } 4\%$ ). Les différentes études spectroscopiques ayant permis la détermination de la structure chimique de M3 sont :

\* *spectre RMN  $^1\text{H}$  de M3*: Le spectre obtenu (Figure 32), montre trois signaux dans la région aromatique et neuf signaux dans la région aliphatique. Le Tableau 24 présente les corrélations en conséquence.

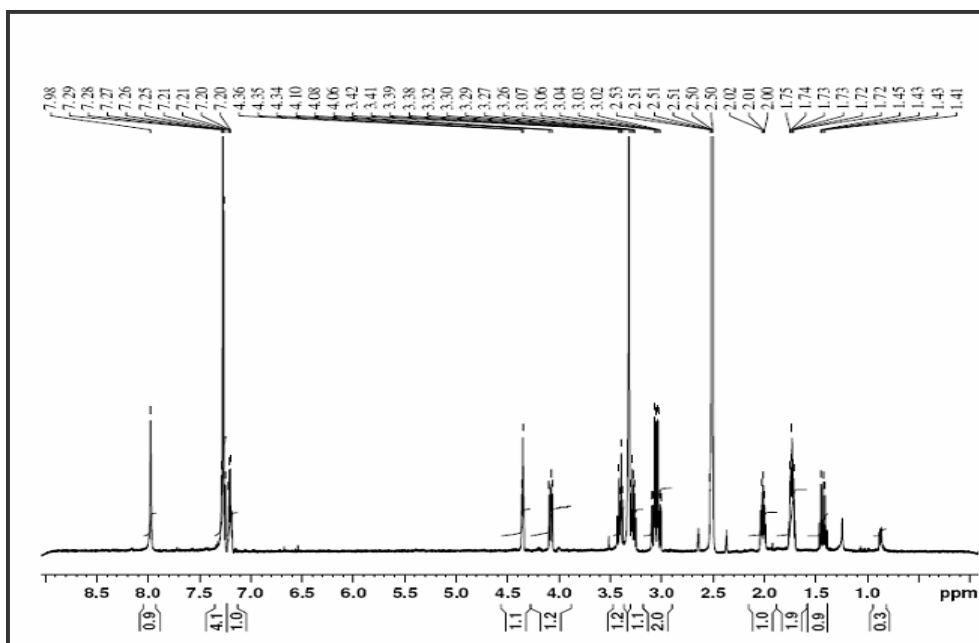


Figure 32: Spectre RMN  $^1\text{H}$  de M3

Tableau 24: Corrélations RMN  $^1\text{H}$  de M3

$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	multi	Intégration et J(Hz)	
7,98	s	NH	
7,27	m	H	Les H sont de type benzénique
7,20	m	H	
4,36	t	(H, J=5.1)	Ces six signaux correspondent à des hétéro éléments, de type de CH ou CH-N ou CH-O
4,09	d	H	
3,40	m	H	
3,28	m	H	
3,08	dd	(H, J=14.2, 5.1)	
3,02	dd	(H, J=14.2, 5.1)	
2,01	m	Ces trois signaux correspondent à des CH aliphatiques	
1,73	m		
1,43	m		

\* *Spectre RMN de  $^{13}\text{C}$  de M3* : D'après la Figure 33, on peut distinguer 12 signaux relatifs à 12 carbones différents. Chaque signal correspond à un carbone différent. Le tableau 25 donne les corrélations en conséquence.

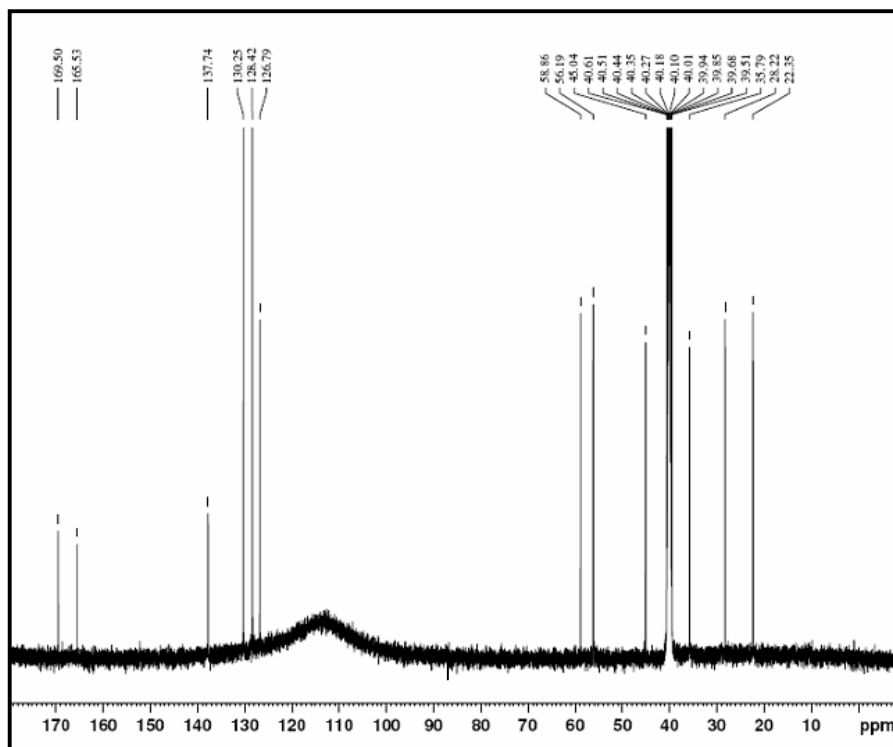
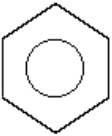


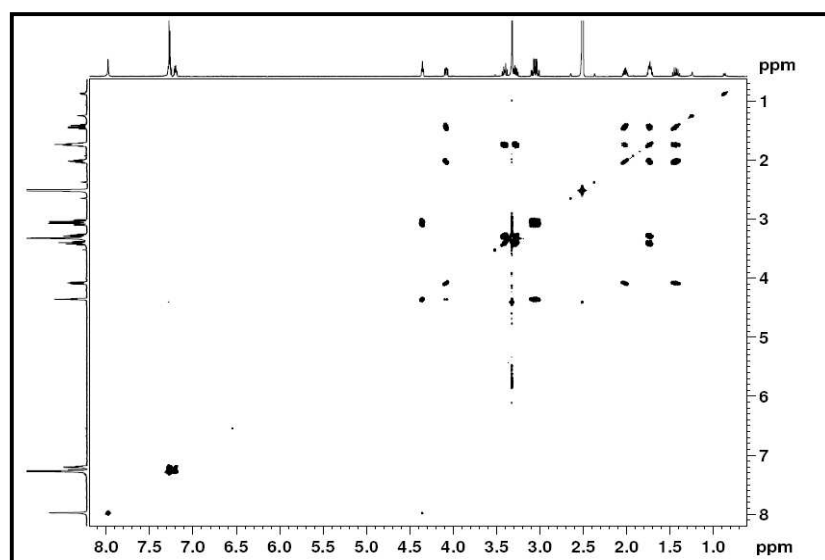
Figure 33: Spectre RMN de  $^{13}\text{C}$  de M3

Tableau 25: Corrélations Spectre RMN de  $^{13}\text{C}$  de M3

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	RMN $^{13}\text{C}$
169,5	X- C=O avec X=O, ou X=N
165,53	
137,74	
130,2	
128,4	
126,79	
58,86	
56,2	
45,04	C- C=O
35,8	CH <sub>2</sub> aliphatique
28,22	
22,35	

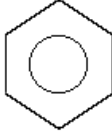
La RMN  $^{13}\text{C}$ , montre qu'il est possible de discerner deux groupes carbonyle ( $\delta\text{C}$  169,5 et 165,5), quatre carbones  $\text{sp}^2$ -hybridées ( $\delta\text{C}$  137,7 à 126,8), trois  $\text{sp}^3$ -carbures hybridés portant un hétéroatome électronégatif ( $\delta\text{C}$  58.9, 56.2 et 45.0) et trois  $\text{sp}^3$ -carbures hybridés ( $\delta\text{C}$  35.8, 28.2 et 22.4).

\* *Spectre HH COSY de M3*: La figure 34 présente le spectre obtenu est le tableau 26 illustre les corrélations correspondantes.



**Figure 34:** Spectre HH COSY de M3

Tableau 26: Corrélations HH COSY de M3

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	H-H COSY
7,20	m	7,27	m			
1,43	m	1,73	m	2,01	m	$\left. \begin{array}{c} \text{X-N-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-X} \\   \\ \text{X} \end{array} \right\} \mathbf{I}$
1,73	m	3,28	m	3,40	m	
1,43	m	2,01	m	4,09	d	
2,01	m	4,09	d			
2,01	m	1,43	m	1,73	m	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
1,73	m	3,28	m	4,09	d	CH-CH <sub>2</sub>
3,08	d	4,36	d			
4,36	d	4,09	d			

L'ensemble des analyses réalisées sur la molécule M3 permet de déduire que cette dernière contient une structure chimique présentée sur la figure ci-dessous.

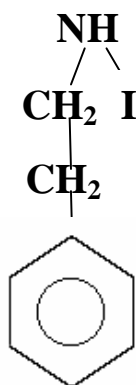
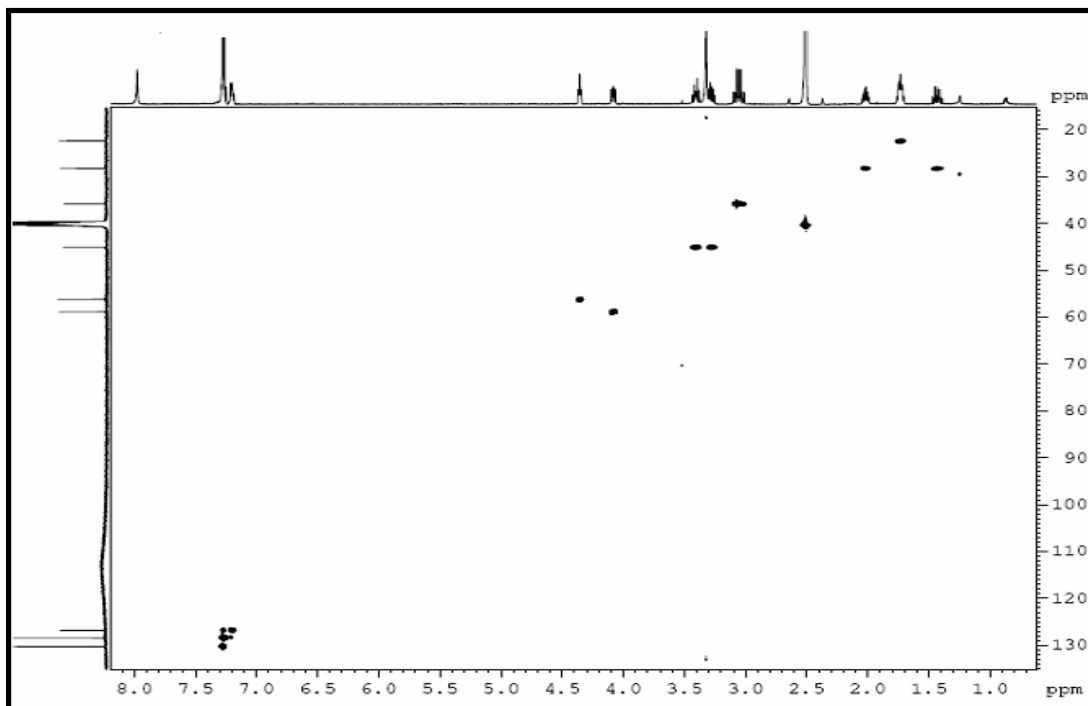


Figure 35: Une composante chimique de la molécule M3

\* *Spectre HSQS de M3* : La figure 36, montre le spectre obtenu et le tableau 27 les corrélations correspondantes.



**Figure 36:** Spectre HSQS de M3

**Tableau 27:** Corrélations HSQS de M3

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	HSQC
130,2	7,27	m	-	-	CH typiques de cycle aromatique
126,8	7,20	d	-	-	
128,4	7,27	m	-	-	
58,9	4,09	d	-	-	CH-N
56,2	4,36	t	-	-	CH-N
45,0	3, 4	m	3,28	m	CH <sub>2</sub> -N
35,8	3,08	d	3,02	d	CH <sub>2</sub> aliphatique
28,2	2,01	m	1,43	m	
22,4	1,73	m	-	-	

\* *Spectre HMBC de M3* : Ci après le spectre obtenu (Figure 37) et les corrélations en conséquence (Tableau 28).

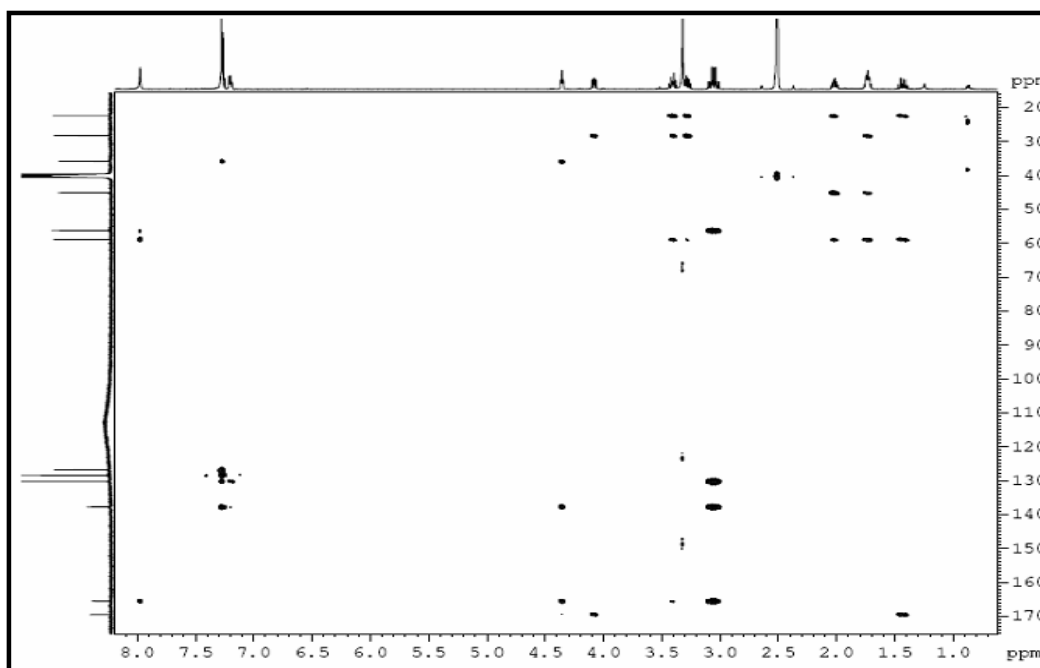
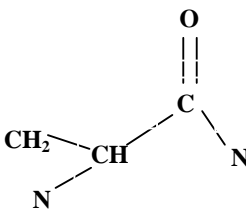
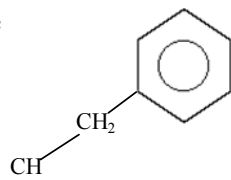


Figure 37: Spectre *HMBC* de *M3*



Tableau 28: Corrélations HMBC de M3

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multi	HSQC
169,5	1,43	m	4,09	d	
165,5	3,08	d	4,36	d	NH
169,5	1,43	m	4,09	d	NH
137,7	3,02	d	-	-	CH <sub>2</sub> lié au quatrième carbone de benzène 

Les données obtenues suite aux études HMBC, montrent qu'il s'agit d'une Phénylalanine (Figure 38).

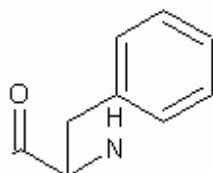
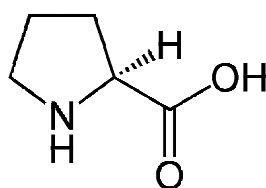


Figure 38: Présence d'une Phénylalanine dans M3

Par ailleurs, les données combinées des expériences HMBC et HSQC, montrent la présence d'une proline dans la molécule M3 (Figure 39).



**Figure 39:** Présence d'une Proline dans M3

Le tableau ci-après englobe toutes les données d'analyses RMN réalisées sur la molécule M3.

**Tableau 29:** Résultats des analyses RMN de la molécule M3

Données de RMN du produit 1 dans CD <sub>3</sub> OD		
Position	δC, mult.	δH, mult (J)
<i>Phe</i>		
1	165.5, qC	
2	56.2, CH	4.36, t (5.1)
3	35.8, CH <sub>2</sub>	3.08, dd (14.2, 5.1) 3.02, dd (14.2, 5.1)
4	137.7, qC	
5	130.2, CH	7.27, m
6	128.4, CH	7.27, m
7	126.8, CH	7.20, m
NH		7.98, s
<i>Pro</i>		
1	169.5, qC	
2	58.9, CH	4.09, dd (9.0, 7.0)
3	28.2, CH <sub>2</sub>	2.01, m 1.43, m
4	22.4, CH <sub>2</sub>	1.73, m
5	45.0, CH <sub>2</sub>	3.40, m 3.28, m

Les expériences 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C montrent la présence de deux fragments proline et phénylalanine. Les corrélations HMBC de CH<sub>2</sub> proline-5 protons à l'amide respectifs carbonyles établit une structure de type térapeptide cyclique. Tenant compte de toutes les analyses spectroscopiques, la structure de la molécule M3 (figure 40) a été fixée à :

1 - [2 - (cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl) - pyrrolidine-2-carboxylique (1-carbamoyl-propyl)-amide.

La formule moléculaire correspondant à M3 est  $C_{28}H_{32}O_4N_4$  avec une masse de 488 g/mol.

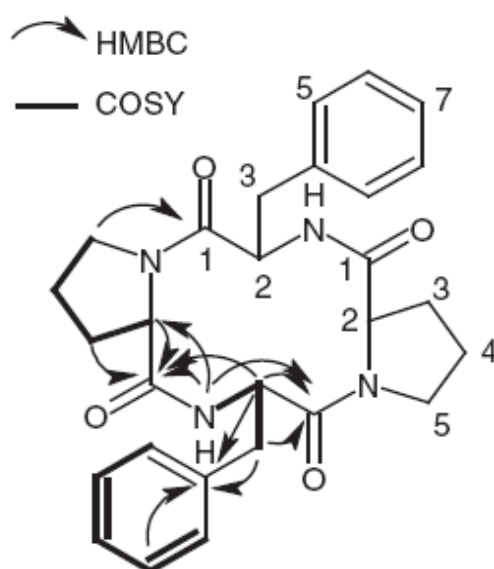


Figure 40: Structure chimique de la molécule M3

#### II. 4. Activités biologiques des biomolécules M1, M2 et M3.

La nouvelle souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17 secrète simultanément trois molécules biologiquement actives qui sont M1 (Cyclo [L-Leu, L-Arg]), M2 (di-(2-éthylhexyl) phtalate) et M3 (1 - [2 - (cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl) - pyrrolidine-2-carboxylique (1-carbamoyl-propyl)-amide).

Nous avons déterminé les activités biologiques de ces trois biomolécules à l'état pur contre les deux bactéries à Gram+ (*M. luteus* LB 14110 et *S. aureus* ATCC 6538), la bactérie à Gram – (*E. coli* ATCC 8739) et contre le champignon filamenteux *Fusarium* sp. Les activités biologiques obtenues sont portées sur le Tableau 30.

#### **II. 4. 1. La biomolécule M1**

Cette molécule M1 Cyclo (L-Leu, L-Arg), est un dérivé de dikétopipérazines « DKP ». Ces dérivés sont produits naturellement par plusieurs microorganismes et possèdent différentes activités biologiques très intéressantes à savoir : antibactériennes, antifongiques, herbicides, immunosuppresseurs, antitumorales etc (Magyar *et al.*, 1999). Plusieurs dérivés de DKP ont été purifiés et caractérisés à partir de souche de *Streptomyces* (Rhee 2002 ; Ben Ameer Mehdi *et al.*, 2004 – 2006). Par ailleurs, il est à noter que ces dérivés intéressent de plus en plus plusieurs groupes de recherche afin de produire des nouveaux dérivés de DKP hybrides et ce par le biais des techniques de la biologie moléculaire. En effet, et bien que les voies de biosynthèse des dérivés de DKP demeurent en grande partie encore inconnues, les premières recherches montrent que ces molécules actives semblent généralement être produites par les voies nonribosomales (NRPS : Non Ribosomal peptide synthétases). Par analogie au polyketide synthases de type I (PKSI), les NRPSs présentent une architecture modulaire et un module peut être encore subdivisé en différents domaines, chacun responsable d'une réaction biochimique bien déterminée. Cette architecture modulaire des dérivés de DKP, offre une potentialité réelle pour la construction de nouveaux peptides hybrides ayant des activités biologiques intéressantes par génie génétique (Sioud *et al.*, 2007).

Suite aux tests d'inhibitions de la croissance des microorganismes (bactéries et champignon), et comme le montre le Tableau 30, la molécule M1 inhibe la croissance de toutes les souches indicatrices testées et par conséquent elle présente des activités antibactériennes contre les bactéries à Gam<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> et également une activité antifongique.

#### **II. 4. 2. La biomolécule M2**

La deuxième molécule (M2) produite par la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17 est le dérivé de phtalate le di-(2-éthylhexyl) phtalate. Les phtalates sont généralement connus comme étant des sous produits de la pétro-chimie. Cependant, plusieurs molécules de cette famille ont été déjà décrites produites à partir d'algues marines, à partir de plantes et également à partir de microorganismes et notamment les bactéries du genre *Streptomyces* (Lee *et al.*, 2000). Comme exemple on peut citer le dérivé dibutyl phthalate produit par trois souches de *Streptomyces* qui sont : *Streptomyces nasri* (El Naggar 1997), *Streptomyces albidoflavus* (Roy *et al.*, 2006) et

*Streptomyces melanosporofaciens* (Lee, 2000). Notre molécule M2 a été déjà décrite, produite par la souche de *Streptomyces bangladeshiensis* (Al Bari *et al.*, 2006).

D'après nos tests microbiologiques, la molécule M2 possède des activités antibactériennes contre les bactéries à Gram+ et une activité antifongique (Tableau 30).

#### **II. 4. 3. La biomolécule M3**

La molécule M3 produite par *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17, est un tetracyclopeptide : 1 - [2 - (cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl] - pyrrolidine-2-carboxylique (1-carbamoyl-propyl)-amide. Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique, l'importance des cyclopeptides est liée à leurs propriétés antibiotiques uniquement (Ovchinnikov et Ivanov, 1975). Depuis, les peptides cycliques ont continué à faire l'objet de nombreux travaux et de nouvelles propriétés biologiques sont apparues à savoir: activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales et activité immunosuppressive (Horton *et al.*, 2008).

Plusieurs biomolécules tétrapeptides cycliques ont été décrites notamment à partir de bactéries à savoir la Rhodopeptine, purifiée à partir d'une bactérie du genre *Rhodococcus* et cette biomolécule se caractérise par ses activités antifongiques (Chiba *et al.*, 1999). L'apicidin, un tétrapeptide cyclique produit par une souche bactérienne du genre *Streptomyces* et possèdent des activités antitumorales (Okada *et al.*, 2006).

Concernant la molécule M3 sécrétée par notre souche, elle a été récemment décrite à partir d'une autre souche de *Streptomyces* (Lebrihi *et al.*, 2008). Ces auteurs ont breveté la molécule M3 pour ses activités antifongiques applicables dans le domaine agronomique contre des phytopathogènes. Selon nos tests d'inhibitions de la croissance des microorganismes utilisés, nous avons constaté que cette molécule outre ses activités antifongiques, elle possède des activités antibactériennes contre les bactéries à Gram+ (Tableau 30).

**Tableau 30.** Activités microbiennes des molécules pures M1, M2 et M3: La quantité déposée pour chaque molécule est de 50 µg. Les diamètres d'inhibitions des cellules indicatrices sont donnés en mm.

Microorganismes testés	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)		
	M1	M2	M3
<i>M. luteus</i> LB 14110	20	17	19
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	14	12	15
<i>E. coli</i> ATCC 8739	11	ND	ND
<i>Fusarium</i> sp.	21	14	17

### III. Extraction et purification des biomolécules de la souche de *Streptomyces microflavus* sp. Fr10

#### III. 1. Extraction

La nouvelle souche de *Streptomyces microflavus* sp. Fr10 a été sélectionnée durant des travaux antérieurs pour ses activités antimicrobiennes importantes contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et les champignons. Les conditions de production de biomolécules de cette souche ont été également optimisées lors de travaux antérieurs réalisés au LMB-CBS. Les meilleures conditions retenues sont : Le milieu Bennett ayant comme source de carbone le glycérol à 0,5% ; une température de croissance de 30°C avec une agitation de 250 rpm. Les additifs chimiques testés « MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (2 mM) ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 mM) et les oligo-éléments » n'ont pas d'effet sur la production de biomolécules.

Pour l'extraction et la purification des biomolécules de cette souche nous avons préparé un volume de surnageant actif de 35 litres (7 fermentations de 5 litres chacune) utilisant les conditions optimales décrites ci-dessus. Après incubation de 72 h à 30°C, le jus de fermentation est filtré puis centrifugé. Le surnageant obtenu est extrait deux fois par un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase organique biologiquement active, est évaporée à sec par Rotavapor. Les sept extraits secs obtenus (des sept fermentations successives) de couleur marron ont été mélangés pour donner une

masse totale de 3g et puis dissous dans 5 ml de dichloro-méthane - méthanol (DCM 95% - MeOH 5%).

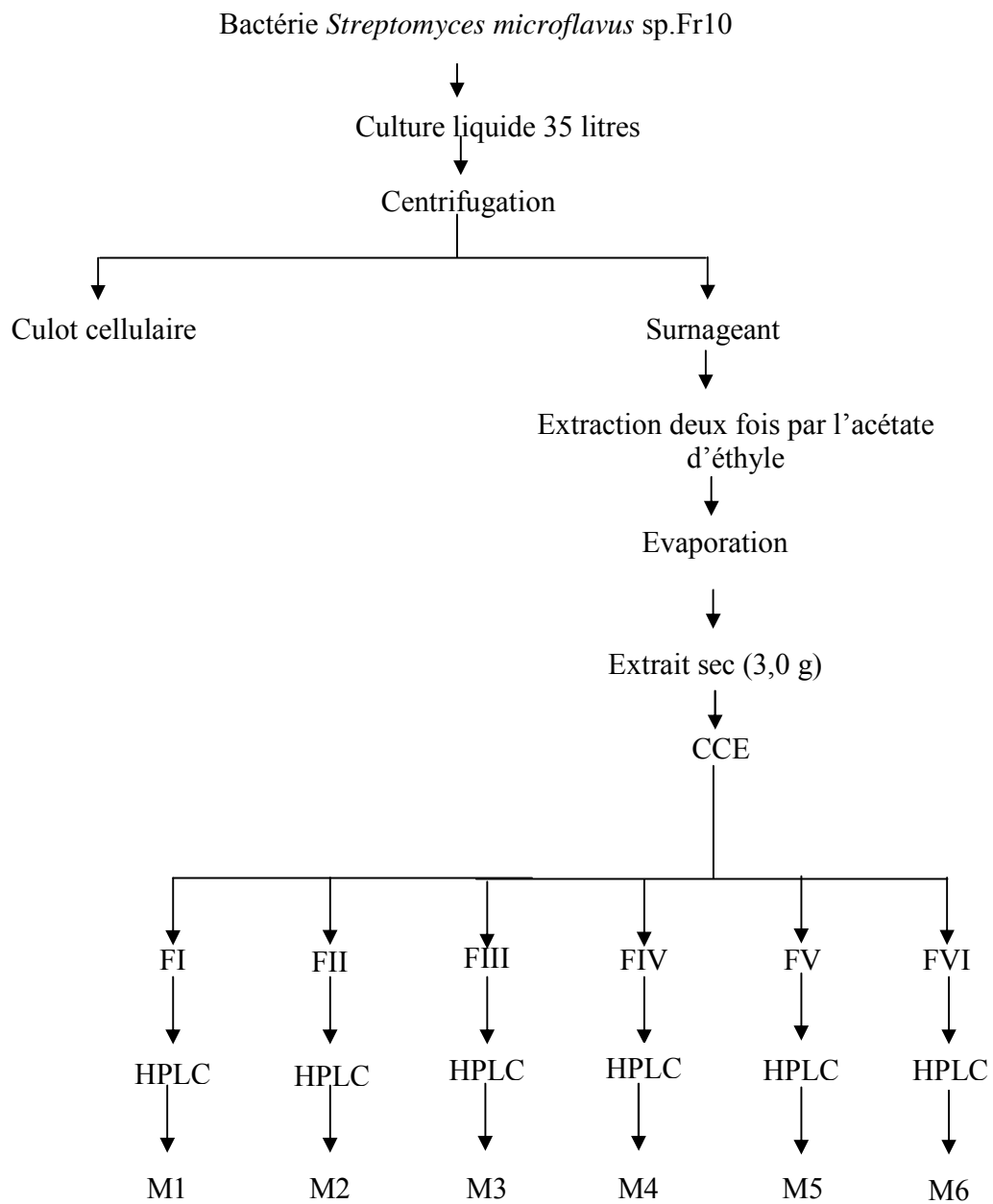
Les tests biologiques réalisés sur les extraits secs collectés montrent un fort pouvoir inhibiteur de ces extraits contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et les champignons (Tableau 31).

**Tableau 31.** Activités biologiques des extraits secs collectés de la souche de *Streptomyces microflavus* sp. Fr10: Pour chaque test, 50 µl (du mélange 5 ml de dichloro-méthane – méthanol) ont été déposés.

<b>Cellules indicatrices</b>	<b><i>M. luteus</i> LB 14110</b>	<b><i>S. aureus</i> ATCC 6538</b>	<b><i>S. enterica</i> ATCC43972</b>	<b><i>E. Coli</i> ATCC 8739</b>	<b><i>Fusarium.sp</i></b>
<b>Φ(mm)</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>19</b>	<b>20</b>

### **III. 2. Purification**

La figure 41, présente le schéma global adopté pour la purification de six molécules bioactives (M1 – M6) de la souche de *Streptomyces microflavus* sp. Fr10



**Figure 41** : Les différentes étapes utilisées pour la purification des six biomolécules de la souche de *Streptomyces microflavus* sp. Fr10

CCE = Chromatographie sur Couche Epaisse (DCM 95%/MeOH 5%)  
 HPLC= traitement par colonne RP-18



Les six molécules bioactives ont été obtenues à l'état pur suite à deux étapes chromatographiques : Une chromatographie sur couche épaisse suivie par une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les tests d'inhibition de la croissance des microorganismes utilisés comme cellules indicatrices ont montré que :

\* Les molécules M1, M2 et M6, à l'état pur, possèdent une forte activité inhibitrice contre les champignons et les bactéries à Gram+ et à Gram-.

\* Les molécules M3, M4 et M5, à l'état pur, possèdent des activités antibactériennes uniquement contre les bactéries à Gram+. Egalement, ces molécules possèdent des activités antifongiques qui sont moins importantes que celles des molécules M1, M2, et M6.

Nous avons déterminé, par la technique LC/MS/MS, les masses de ces six biomolécules pures (Figure 42 A-F). Ces masses MW en Da sont : M1 = 413 ; M2 = 300 ; M3 = 279 ; M4 = 194 ; M5 = 239 et M6 = 290g/mol.

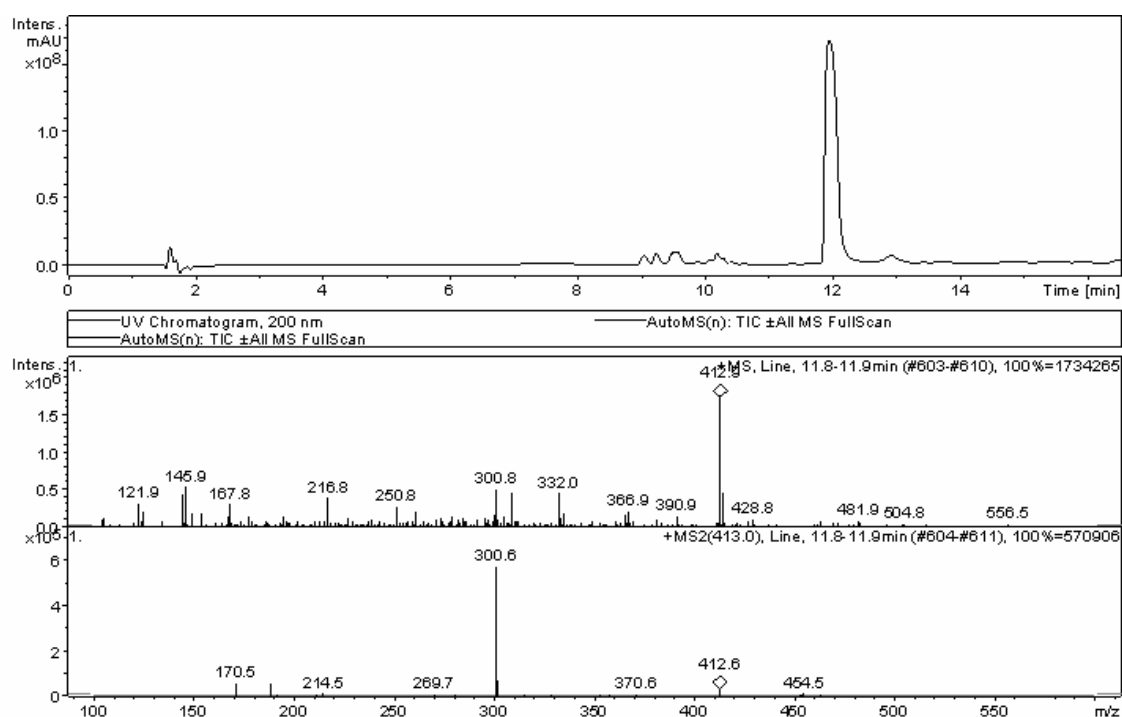


Figure 42 A : Masse moléculaire MW de la biomolécule pure M1

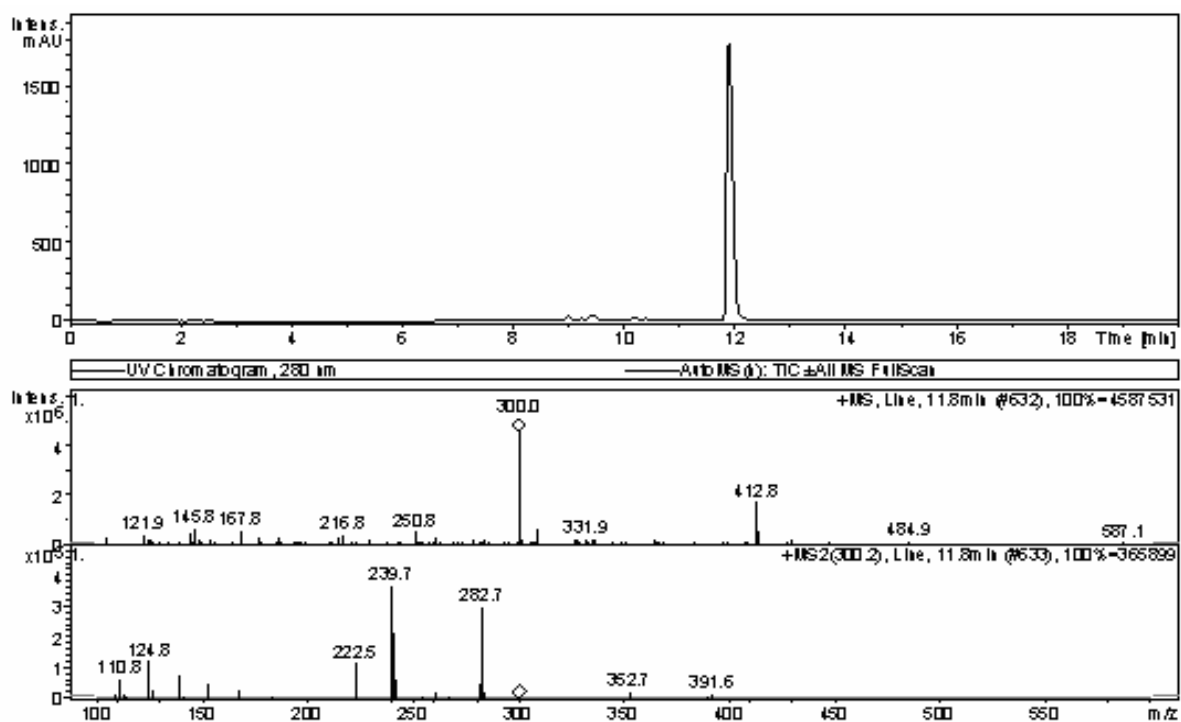


Figure 42 B : Masse moléculaire MW de la biomolécule pure M2

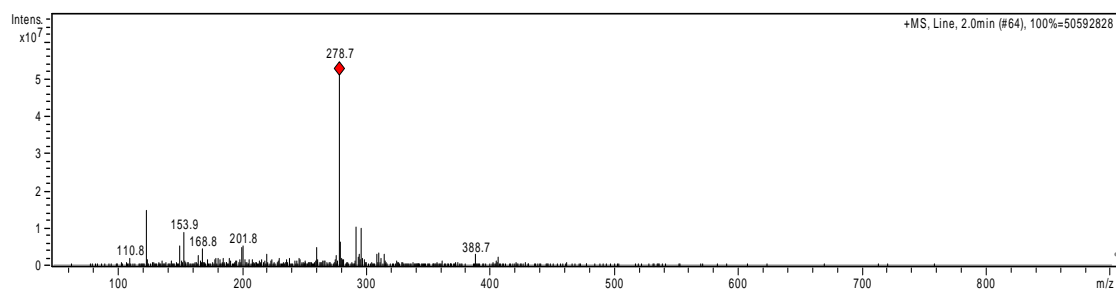


Figure 42 C : Masse moléculaire MW de la biomolécule pure M3

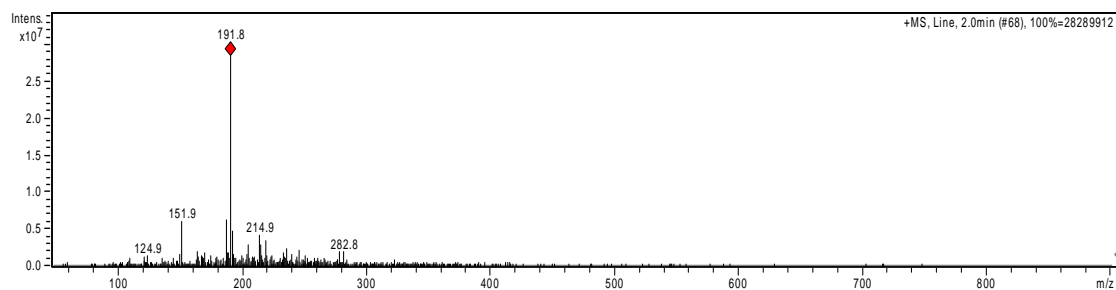


Figure 42 D : Masse moléculaire de la biomolécule pure M4

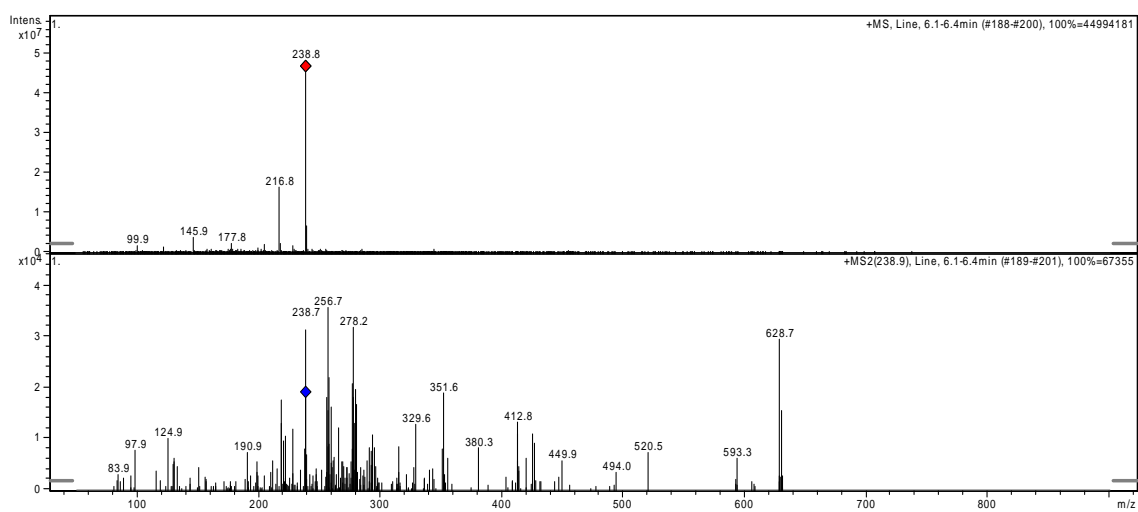


Figure 42 E: Masse moléculaire de la biomolécule M5

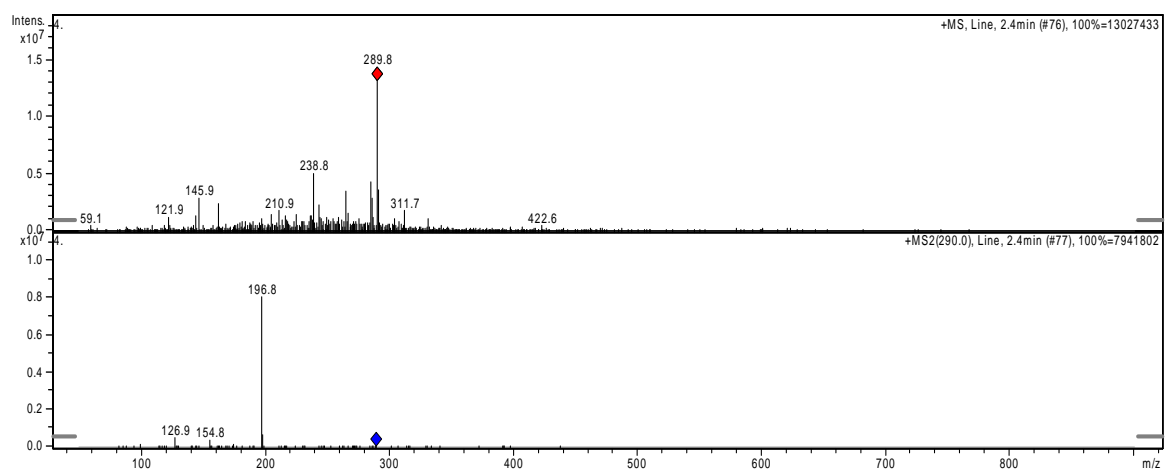


Figure 42 F: masse moléculaire de la biomolécule pure M6

Les analyses spectroscopiques sont actuellement en cours pour la détermination de la structure chimique de ces six biomolécules pures.

## **Conclusion**

Les résultats des travaux de recherche se rapportant à ce deuxième chapitre, peuvent être résumés comme suit :

\* Nous avons optimisé les conditions de production des biomolécules de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17. Les conditions de cultures retenues sont : milieu TSB à 30 g/l additionné de glucose à 1 % w/v et de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> « 1mM ». La température d'incubation est de 30°C avec une agitation de 250 rpm en Erlenmayer. En utilisant ces conditions nous avons préparé une culture de 30 litres dans un fermenteur (500 rpm et 30°C).

\* Après une double extraction du surnageant par l'acétate d'éthyle, l'extrait sec actif obtenu a été soumis à plusieurs étapes chromatographiques (Séphadex LH-20, Chromatographie sur couche épaisse et chromatographie en phase liquide à haute performance). Trois molécules pures biologiquement actives (M1, M2 et M3) ont été obtenues et les structures chimiques correspondantes ont été caractérisées par le biais de plusieurs techniques spectroscopiques. Il s'agit de :

- M1 (MW = 269 g/mol) c'est un dérivé de DKP (L-Leu, L-Arg). Cette molécule possède des activités antibactériennes contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et antifongiques.

- M2 (MW = 390 g/mol), c'est un dérivé de phtalate le di-(2-éthylhexyl) phtalate. Cette molécule possède des activités antibactériennes contre les Gram+ et des activités antifongiques.

- M3 (Mw = 488 g/mol), c'est térapeptide cyclique;  
le 1 - [2 -(cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl] - pyrrolidine-2-carboxylique (1-carbamoyl-propyl)-amide. Cette molécule possède des activités antibactériennes contre les Gram+ et des activités antifongiques.

\* Nous avons également préparé une culture de 35 litres à partir de la deuxième souche étudiée, la souche de *Streptomyces microflavus* sp. Fr10. Après une double extraction par l'acétate

d'éthyle du surnageant correspondant, l'extrait sec actif a été soumis à deux étapes de purification : Une chromatographie sur couche épaisse suivie par une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Six molécules bioactives ont été obtenues (M1-M6). Les masses moléculaires de ces dernières sont : M1 = 413 ; M2 = 300 ; M3 = 279 ; M4 = 194 ; M5 = 239 et M6 = 290g/mol.

Les travaux de recherche relatifs à la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17 ont fait l'objet d'un article publié dans le Journal à Comité de lecture Internationale : Natural Product Research et un brevet National :

## Article

**Slim Smaoui**, Lotfi Mellouli<sup>\*</sup>, Ahmed Lebrihi, Yannick Coppel, Lilia Fourati-Ben Fguira and Florence Mathieu (2009). **Purification and structure elucidation of three naturally bioactive molecules from the new terrestrial *Streptomyces* sp. TN17 strain.** *Natural Product Research*. In press

*Natural Product Research*  
Vol. ??, No. ?, Month?? 2009, 1–9



### **Purification and structure elucidation of three naturally bioactive molecules from the new terrestrial *Streptomyces* sp. TN17 strain**

Slim Smaoui<sup>a</sup>, Lotfi Mellouli<sup>a\*</sup>, Ahmed Lebrihi<sup>b</sup>, Yannick Coppel<sup>c</sup>,  
Lilia Fourati Ben Fguira<sup>a</sup> and Florence Mathieu<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes (LEMP), Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Route de Sidi Mansour Km 6, B.P. '1177', 3018 Sfax, Tunisie; <sup>b</sup>Département Bioprocédés & Systèmes Microbiens, Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS). INP-ENSAT, 1 Av, de l'Agrobiopôle, BP 32607, 31326 Castanet-Tolosan, France; <sup>c</sup>Laboratoire de Chimie de Coordination UPR8241 (CNRS) 205 route de Narbonne, Université de Toulouse, 31 077 Toulouse Cedex 4, France

(Received 21 January 2009; final version received 10 April 2009)

**Brevet**

**Slim SMAOUI**, Florence MATHIEU, Ahmed LEBRIHI, Yannick COPPEL, Lilia FOURATI Ben FGUIRA, Lobna ELLEUCH, Samir BEJAR et Lotfi MELLOULI\* (2009). Trois molécules biologiquement actives, dont une nouvelle dérivé de dikétopipérazine, produites simultanément à partir d'une nouvelle souche bactérienne appelée *Streptomyces* sp. TN17. *INNORPI TUNISIE TN2009/0065*.

Requête déposée L'INNORPI En l'obtention d'un brevet D'invention conformément a la loi No.2000-84 Du 24-08-2000	Patent Application Addressed to INNORPI In accordance with law No.2000-84 Dated 24-8-2000	عريضة مودعة للمعهد الوطني للمواصفات للحصول على براءة اختراع وفق القانون عدد 84-2000 المؤرخ في 24 أوت 2000
TITLE OF INVENTION : TITRE DE L'INVENTION : Trois molécules biologiquement actives, dont une nouvelle dérivée de dikétopipérazine, produites simultanément à partir d'une nouvelle souche bactérienne appelée <i>Streptomyces</i> sp. TN17		عنوان الاختراع :
PRIORITE : PRORITY :		الأسبقية :
PAYS COUNTRY TUNISIE	البلد NUMERO العدد DATE : DATE :	التاريخ DATE :
TITULAIRE : CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX. OWNER :		
ADDRESS : ADRESSE : ROUTE DE SIDI MANSOUR KM 6, BP "1177" 3018 Sfax – Tunisie.		العنوان :
INVENTEUR : INVENTOR : Slim SMAOUI, Florence MATHIEU, Ahmed LEBRIHI, Yannick COPPEL, Lilia FOURATI- BEN FGUIRA, Lobna ELLEUCH, Samir BEJAR et Lotfi MELLOULI		المخترع :
MANDATAIRE : REPRESENTATIVE : MOHAMED KERKENI MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR, DE LA RCHECHER SCIENTIFIQUE ET DE LA TECHNOLOGIE.		الوكيل :
الإمضاء والتاريخ SIGNATURE ET DATE DATE AND SIGNATURE		
NO. DU DEPOSIT FILING NO : DATE: 27 FEV. 2009	عدد الإيداع : 2009 / 0065 تاريخ الإيداع :	

## **C. SELECTION ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. ETUDE DES CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES ET PURIFICATION DE LA BACTERIOCINE BACTN635**

Avec la découverte des antibiotiques, l'humanité a disposé d'un moyen et d'un remède extrêmement efficaces contre le fléau des bactéries pathogènes qui l'accablaient depuis des millénaires. Depuis la découverte de la pénicilline, des milliers d'antibiotiques sont produits et différentes classes ont été décrites. L'utilisation des antibiotiques a représenté alors le plus grand succès thérapeutique et cette utilisation sauve annuellement des millions de vies. Malheureusement, l'utilisation massive et répandue des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, a engendré un problème très épineux qui est la résistance des bactéries pathogènes aux traitements par les antibiotiques. Les scientifiques ont observé que les bactéries qui étaient auparavant sensibles pouvaient y devenir résistantes, et plus on utilise d'antibiotiques, plus cette résistance s'accroît. On s'est rendu compte que le miracle « antibiotique » a ses limites. Actuellement, il existe des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* qui résistent à tous les antibiotiques connus. La question est donc comment remédier à cette situation ?

Outre la recherche de nouvelles molécules antibiotiques, l'une des solutions pour surmonter le problème de la résistance des bactéries pathogènes aux biomolécules, pourrait être l'utilisation des bactériocines. En effet, les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, complémentaire aux antibiotiques. Les domaines d'utilisation des bactériocines sont multiples à savoir :

- dans le domaine agronomique où l'utilisation est avantageuse parce que les bactériocines sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et du fait qu'elles sont des substances naturelles, leur emploi permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation.

- Dans le domaine agricole où l'exploitation des bactériocines en agriculture, pour la protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes, connaît un essor qui intéresse de plus en plus les chercheurs.

- Dans les domaines de la médecine humaine et vétérinaire et bien que cette utilisation ne soit pas encore répandue, mais plusieurs études s'orientent actuellement vers cet axe de recherche pour résoudre les problèmes de résistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques.

De nombreuses souches bactériennes, à Gram positif et à Gram négatif ont été décrites pour leur capacité à produire des bactériocines. Cependant, les bactéries lactiques restent les meilleures candidates pour la production de ce genre de biomolécules.

Dans cette troisième partie de cette présente thèse, notre intérêt s'est porté vers les biomolécules de nature bactériocine produites par des bactéries lactiques, pour des éventuelles applications en agro-alimentaire, en agronomie et en médecine humaine. Ci-après nous développons les principaux résultats obtenus.

## **I. Sélection des bactéries lactiques productrices de bactériocines**

Durant des travaux antérieurs réalisés au LMB-CBS, une collection de cinquante quatre bactéries lactiques a été construite. Ces bactéries ont été isolées à partir de plusieurs origines (viandes, fruits, végétaux et produits laitiers). Nous avons testé ces bactéries pour leur capacité à produire des biomolécules (bactériocines) en utilisant cinq souches indicatrices qui sont : *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica* ATCC 43972, *Fusarium sp* et *Candida tropicalis* R2. Comme le montre le tableau 32, nous avons obtenu différents profils d'inhibition pour les souches indicatrices. Cependant, neuf bactéries lactiques (TN600, TN606, TN615, TN618, TN623, TN627, TN635, TN644 et TN653) parmi les cinquante quatre testées, présentent des activités biologiques ayant des spectres d'actions qui semblent être intéressants. Nous avons alors sélectionné ces neuf bactéries pour des tests plus poussés, tout en utilisant un nombre plus important de souches indicatrices. Il s'agit de : bactéries à Gram+ (*Micrococcus luteus* LB 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria ivanovii* BUG 496, *Enterococcus faecalis* JH 2-2 et *Enterococcus faecium* ENSAIA 631), des bactéries à Gram- (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189, *Hafnia sp* et *Serratia sp.*), des lactobacilles



(*Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus sakei* 2525, *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20081, *Lactobacillus lactis* ATCC 11454 et *Lactobacillus lactis* subsp *cremoris* DSM 11603) et deux champignons, *Fusarium* sp. (champignon filamenteux) et *Candida tropicalis* R2 (champignon unicellulaire). Comme le montre le tableau 33, l'isolat TN635 inhibe la croissance de toutes les souches indicatrices testées. A ce propos, il est à noter que les bactériocines extraites des bactéries lactiques sont généralement dirigées vers les bactéries à Gram+ et rares sont celles qui possèdent un spectre d'action large (Atanassova et al., 2001). Le spectre large de la biomolécule (bactériocine) de l'isolat TN635 pourrait être intéressant, ce qui nous a amené à étudier les caractéristiques et purifier cette bactériocine.

**Tableau 32.** Spectre d'action des isolats (TN600-TN653) contre cinq souches cibles testées.

Isolats	Microorganismes indicateurs				
	<i>Lb. casei</i> DSM 20011	<i>Listeria ivanovii</i> BUG 496	<i>Salmonella enterica</i> ATCC43972	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Candida tropicalis</i> R2 CIP203
TN600	6	12	22	14	8
TN601	-	7	-	-	-
TN602	-	-	-	-	-
TN603	8	-	-	-	6
TN604	-	-	-	8	8
TN605	10	16	7	7	-
TN606	7	18	16	16	9
TN607	6	5	-	-	-
TN608	8	8	8	-	-
TN609	9	-	7	8	-
TN610	-	13	15	-	-
TN611	-	-	-	-	-
TN612	-	-	-	-	-
TN613	9	17	10	-	8
TN614	-	6	7	8	15
TN615	7	6	18	19	5
TN616	8	-	-	16	-
TN617	-	-	-	18	-
TN618	8	14	16	18	9
TN619	8	7	-	10	-
TN620	7	16	-	-	-
TN621	6	-	-	20	-
TN622	-	7	5	-	6
TN623	7	20	18	17	19
TN624	8	8	7	7	-
TN625	7	6	17	-	-
TN626	-	-	-	-	-
TN627	8	9	12	14	10

TN628	-	-	6	16	-
TN629	7	-	-	6	-
TN630	9	9	-	6	6
TN631	-	18	17	9	-
TN632	-	8	8	-	-
TN633	9	-	-	-	7
TN634	6	-	7	7	-
TN635	9	22	21	23	21
TN636	9	6	-	7	-
TN637	8	7	-	15	-
TN638	7	-	7	16	-
TN639	-	7	7	18	7
TN640	7	7	8	6	-
TN641	-	16	17	-	15
TN642	6	-	-	16	-
TN643	-	6	7	17	6
TN644	7	16	6	22	6
TN645	6	7	8	-	-
TN646	-	-	-	18	7
TN647	7	-	6	8	-
TN648	8	8	-	18	-
TN649	-	-	8	16	6
TN650	-	16	-	17	17
TN651	6	-	7	7	6
TN652	-	8	-	12	7
TN653	7	16	17	18	8

**Tableau 33.** Spectre d'action des neuf isolats pré-sélectionnés (TN600, TN606, TN615, TN618, TN623, TN627, TN635, TN 644 and TN653) contre les quinze bactéries et les deux champignons utilisés comme souches indicatrices.

<b>Souches indicatrices</b>	TN600	TN606	TN615	TN618	TN623	TN627	<b>TN635</b>	TN644	TN653
<b>Bactérie Gram positive</b>									
<i>Micrococcus luteus</i> LB 14110	23	14	6	14	14	6	23	14	11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12	15	16	14	9	16	22	21	8
<i>Listeria ivanovii</i> BUG 496	12	18	6	16	20	9	22	16	16
<i>Enterococcus faecalis</i> JH 2-2	6	18	8	-	15	16	22	7	8
<i>Enterococcus faecium</i> ENSAIA 631	6	14	7	-	14	14	21	8	6

<b>Bactérie Gram negative</b>	5	22	13	15	15	23	22	13	22
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739									
<i>Salmonella enterica</i> ATCC43972	22	16	18	16	18	12	21	6	17
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 49189	22	16	6	9	14	9	22	8	9
<i>Hafnia.sp</i>	5	15	6	13	24	6	24	5	7
<i>Serratia.sp</i>	12	6	12	15	21	7	23	8	9
<b>bactérie <i>Lactobacilli</i></b>									
<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011	6	7	7	8	7	8	9	7	7
<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i> DSM 20081	-	6	8	-	-	9	9	6	-
<i>Lactobacillus sakei</i> 2525	-	6	7	-	7	6	9	-	-
<i>lactococcus lactis</i> ATCC 11454	-	-	6	5	6	7	9	-	9
<i>lactococcus lactis</i> <i>cremoris</i> DSM 11603	-	-	5	7	7	9	8	-	8
<b>Champignons</b>									
<i>Fusarium. Sp</i>	14	16	19	18	17	14	23	22	18
<i>Candida tropicalis</i> R2 CIP203	8	9	5	9	19	10	21	6	8

## II. Identification de l'isolat TN635

Avant d'initier la caractérisation et la purification de la biomolécule (bactériocine) de l'isolat TN635, il est bien entendu primordial de s'assurer que cette bactérie est nouvelle et n'a jamais été décrite. Pour cette réalisation, nous avons appliqué la technique d'identification moléculaire qui consiste à amplifier, séquencer et analyser la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN 16S de la souche TN635. Après préparation de l'ADN total de cette souche, nous avons utilisé deux oligonucléotides P1 et P2 (P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et P2: 5'-ATGGCTCAGGACGAACGCT-3') pour amplifier le gène codant pour l'ARN 16S de la souche TN635. L'analyse du produit de PCR a montré l'amplification d'un seul fragment d'ADN

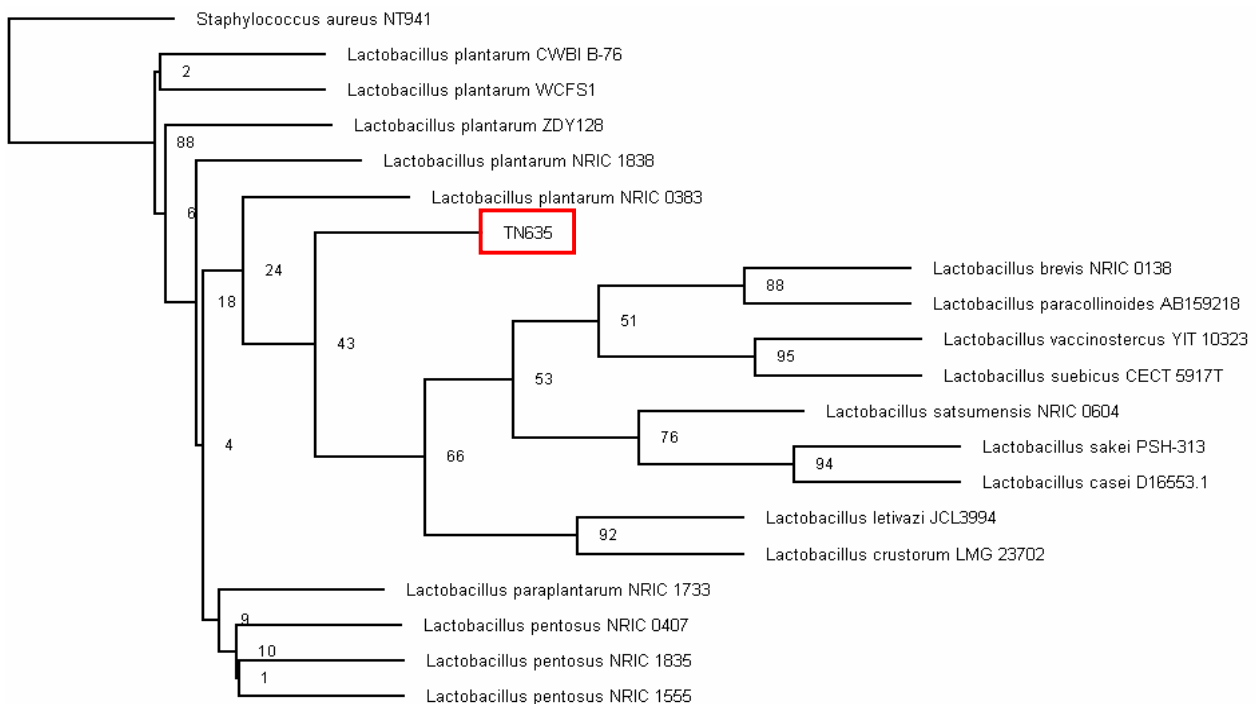
ayant une taille attendue d'environ 1500 pb. Ce fragment a été purifié puis cloné dans un vecteur approprié. Après transformation de cellules compétentes d'*E. coli* par le produit de ligation, nous avons analysé les ADNs plasmidiques de quelques transformants ce qui nous a permis d'obtenir le plasmide recombinant pSS1 contenant comme insert le fragment d'ADN d'environ 1500 pb. Ce fragment a été séquencé dans les deux sens et la séquence nucléotidique correspondante est de 1540 pb (Figure 43).

5'TGATCCAGCCCCAGGTCCTCTTACGGCTACCATAATACTTCAGCTTAATCATCT  
GTCCCACCTTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACA  
AACTCTCAGGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCGG  
CATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTAC  
AATCCGAAGTGAAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCG  
TTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGAAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTG  
ACCTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTT  
AATGGTGGCAACTGTTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATATC  
AGTTCAGGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACG  
TCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGTCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTT  
CGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC  
AGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAA  
GGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTA  
TCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAG  
CCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAG  
TTCCACGGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGA  
GCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATA  
AATCCGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTAAGCC  
GTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGATGTTCTCAGATATGTTCTTC  
TTAACAACAGAGTTTTACGTGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCAT  
CAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCC  
GTGTCTCACTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCAT  
GGTGAGCCGTTACCTCGCCGTCTACCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATA  
GCCCAAGCCATCTTCAAGGTAGGACCATGCGGTCCAAGGGGTTGTGCGGTATTAGC

CTCTGTTTCGAGGTGTTATCCCCGCTTTTAGGAAGGTTTCCCACGTGTTACTCAACT  
 GTTCGCCACTCACTCAAATGGAAAACATGGTGCAAGCACCAATCAATACCAGACTTG  
 GTCCAAGTTGCATGTATTAGGGACCCCGGTAGCGGTCGTCCTGAGCCAT3'

**Figure 43 :** Séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN 16S de la souche TN635.

L'alignement de cette séquence nucléotidique avec celles des gènes codant pour l'ARN 16S des banques de données a montré une forte similarité (entre 97 et 99%) avec les gènes codant pour l'ARN 16S du genre *lactobacillus*. Le score d'identité le plus élevé a été obtenu avec la séquence nucléotidique du gène ARN 16S de la souche *Lactobacillus plantarum* NRIC 0383. L'étude de la phylogénie de la souche TN635 (Figure 44) a confirmé ce résultat.

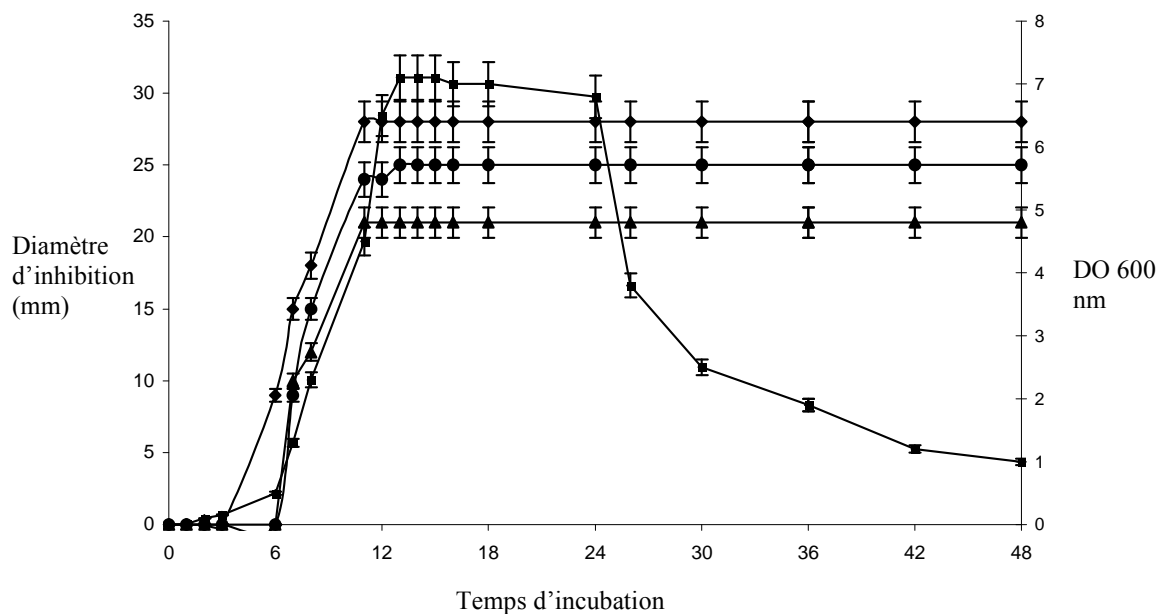


**Figure 44:** Arbre phylogénique de la souche TN635.

En tenant compte de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN 16S de l'isolat TN635 ainsi que de l'arbre phylogénique correspondant, nous constatons que cette souche est une nouvelle espèce du genre *lactobacillus* et nous proposons sa désignation comme étant *Lactobacillus plantarum* sp. TN635.

### III. Température optimale et cinétique de production de la biomolécule (bactériocine)

Pour tester l'effet de la température et la durée d'incubation sur la croissance bactériennes et la production de l'activité antimicrobienne, cinq cultures de la souche *Lactobacillus plantarum* TN635 en milieu MRS liquide dans des conditions anaérobies, ont été maintenues à quatre températures différentes (25, 30, 37 et 45°C). La croissance a été suivie en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm et l'activité antimicrobienne a été déterminée contre les trois micro-organismes indicateurs: *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica* ATCC43972 et *Candida tropicalis* R2 CIP203. Des aliquots ont été prélevés à des intervalles de 3h de temps. Les résultats obtenus montrent que la production de l'activité biologique est corrélée avec la production de la biomasse. La croissance la plus dense et la meilleure activité antimicrobienne ont été obtenues à 30°C. Cette activité optimale a été notée pour un temps d'incubation de 16h (Figure 45). L'activité reste stable entre 13 et 20 h, puis elle diminue progressivement.



**Figure 45.** Cinétique de production de la biomolécule (bactériocine) de la souche *L. plantarum* TN635 à 30°C, (■) densité optique à 600nm. Activité inhibitrice contre *Candida tropicalis* R2 CIP203 (▲); contre *S. enterica* ATCC43972 (●) et contre *L. ivanovii* BUG 496 (◆).

## **IV. Effets des différents traitements sur l'activité antimicrobienne de la souche TN635**

### **IV.1. Effet de la catalase, des enzymes protéolytiques, de la lipase et de l' $\alpha$ -amylase**

Les analyses antimicrobiennes contre les cellules indicatrices: *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972 et *C. tropicalis* R2 CIP203, du surnageant de culture de la souche *Lb. plantarum* sp. TN635 (culture de 16h à 30°C), ont montré que l'activité biologique n'est pas affectée par l'addition de catalase. Ce résultat implique que l'inhibition de la croissance des cellules indicatrices n'est pas due à la production de peroxidase d'hydrogène mais elle est vraisemblablement due à la production de biomolécule(s). Par contre, le traitement du surnageant par les enzymes protéolytiques (Trypsine, Pronase E et Proteinase K) fait perdre totalement l'activité biologique. Cette constatation implique que la biomolécule en question est de nature protéique.

Par comparaison au témoin, nous avons constaté également que les activités biologiques du surnageant de culture de la souche *Lb. plantarum* sp. TN635 sont insensibles à l'action de la lipase et de l' $\alpha$ -amylase. Ce résultat implique que la (les) molécule(s) bioactive(s) en questions ne contiennent pas des composés lipidiques et des carbohydrates (Aktypis *et al.*, 1998).

Ces analyses nous permettent d'avancer que la ou les biomolécules secrétée(s) par la souche *Lb. plantarum* sp. TN635 est une bactériocine du type I qu'on a nommée BacTN635.

### **IV. 2. Effet des surfactants et des solvants organiques**

L'effet des surfactants suivants : le Tween 20, le Tween 80, l'urée, le Triton X-100, le SDS, l'EDTA et le PMSF sur BacTN635 a été également analysé. Ces surfactants ont été ajoutés au surnageant bioactif à une concentration finale de 1% (v/v) et incubées à 30°C pendant 2h. L'analyse des activités biologiques résiduelles (par comparaison aux activités du surnageant sans traitement « témoin positif »), sont ensuite déterminées tout en réalisant des témoins de contrôles. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une diminution de l'activité biologique de l'ordre de 15% en présence de l'agent SDS. Les autres surfactants affectent négativement BacTN635 à un taux d'environ 40%. Ces mesures sont effectuées par rapport des diamètres d'inhibitions.

Concernant les solvants organiques (l'acétate d'éthyle, l'isopropanol et le méthanol) testés à une concentration finale de 50% (v/v), nous n'avons pas remarqué d'effet négatif sur l'activité biologique de BacTN635.

### IV. 3. Effet de la température

Nous avons testé l'effet de différents traitements de températures (45, 70, 85 et 100°C durant 90 min et 2 h et à l'autoclave (20 min à 121°C) du surnageant de culture de la souche *Lb. plantarum* sp. TN635 (contenant BacTN635). Comme le montre le tableau 34, pour un traitement de 100°C pendant 90 min, BacTN635 garde presque 80% de ses capacités inhibitrices contre les cellules indicatrices testées. Après un traitement à 100°C pendant 2h, l'activité biologique résiduelle de BacTN635 est d'environ 50%. Cette activité est totalement perdue par autoclavage (20 min à 121°C).

**Tableau 34:** Effet de la température sur l'activité inhibitrice de BacTN635 contre les cellules indicatrices testées : *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica*, *Fusarium* sp et *Candida tropicalis* R2.

Traitement	Activités inhibitrices (mm)			
	<i>Listeria ivanovii</i> BUG 496	<i>Salmonella enterica</i> ATCC43972	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Candida tropicalis</i> R2
Témoin	22	21	23	21
45°C à 90 min	22	21	23	21
70°C à 90 min	20	20	19	18
85°C à 90 min	20	19	19	17
100°C à 90min	18	18	17	17
45°C à 120 min	22	21	23	21
70°C à 120 min	20	20	19	18
85°C à 120 min	16	15	15	17
100°C à 120min	12	10	10	11
121°C à 20min	-	-	-	-



#### IV. 4. Effet du pH

Afin de déterminer la sensibilité de BacTN635 aux pH, le surnageant de la culture de la souche TN635 (30°C, 16 h d'incubation) est ajustée à différents pH allant de 1 à 14 (intervalle de 1,0). Les activités antimicrobiennes sont ensuite effectuées sur les différents échantillons traités. D'après le tableau 35, nous pouvons déduire que BacTN635 présente une activité dans une large gamme de pH comprise entre 3 et 11 avec un optimum de 7. Approximativement, une activité résiduelle de 50% est maintenue à pH 12. Cette activité est totalement détruite à des pH 1, 2, 13 et 14.

**Tableau 35:** Effet du pH sur l'activité BacTN35 contre les cellules indicatrices testées : *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica*, *Fusarium. sp* et *Candida tropicalis* R2.

pH	Activités inhibitrices (mm)			
	<i>Listeria ivanovii</i> BUG 496	<i>Salmonella enterica</i> ATCC43972	<i>Fusarium. sp</i>	<i>Candida tropicalis</i> R2
Témoin	22	21	23	21
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	10	8	9	10
4	16	11	13	15
5	18	20	18	18
6	22	20	20	21
<b>7</b>	22	21	23	21
8	20	19	20	20
9	16	12	14	15
10	15	12	10	12
11	12	11	9	10
12	10	9	-	9
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-

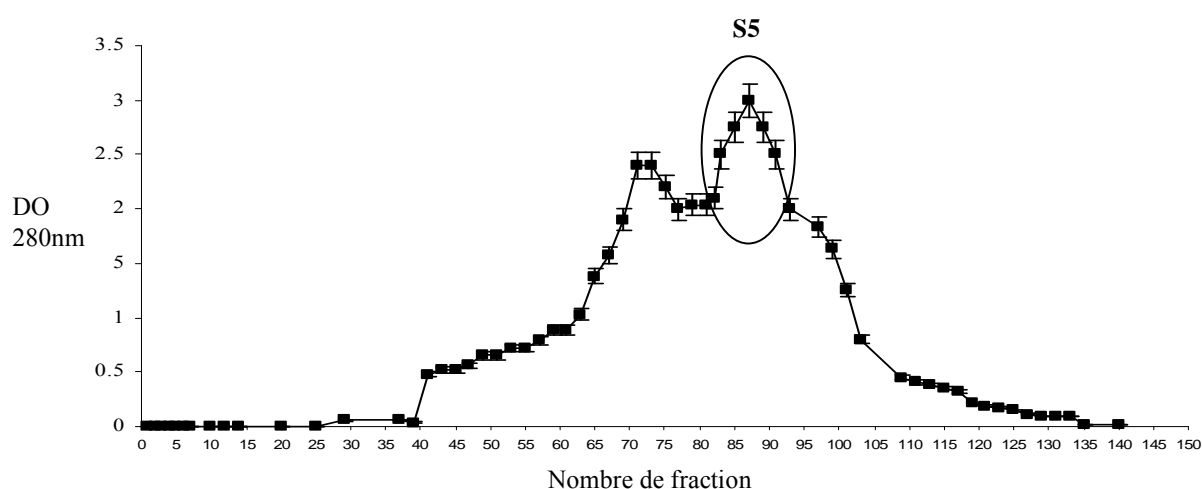
## V. Purification de BacTN635

Pour la purification de BacTN635 à partir de la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, nous avons utilisé une culture de 900 ml. Après 16h d'incubation à 30°C et sans agitation, nous avons appliqué, sur le surnageant obtenu, quatre étapes de purification différentes qui sont :

\* **Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium** : Suite aux tests antimicrobiens, le maximum d'activité a été obtenu entre des concentrations de 60 et 80% de sulfate d'ammonium.

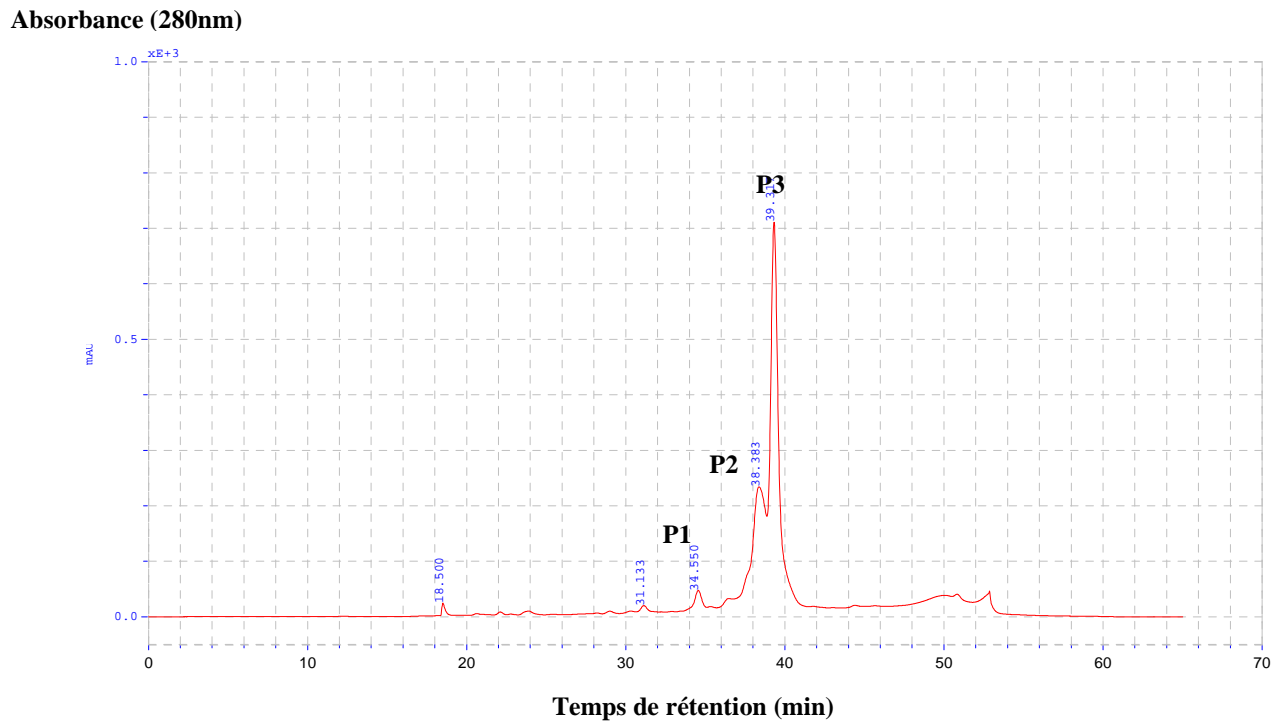
\* **Purification sur membrane cutoff (10 kDa)** : Le précipité récupéré par la première étape de purification a été resuspendu dans le tampon phosphate 0,1 M et passé à travers des microconcentrateurs centrifuges (Amicon, Inc), avec une membrane de coupure de 10-kDa.

\* **Gel filtration sur colonne de Séphadex G-25** : La solution non retenue résultante de la deuxième étape de purification, a été passée sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25. Cent quarante fractions (F1-F140) ont été collectées. Comme le montre la figure 46, ces 140 fractions détectées au moyen de mesures d'absorbance à 280 nm ont été regroupées en six échantillons (S1-S6): S1 (F1-F40), S2 (F41-F70), S3 (F71-F76), S4 (F77-F81), S5 (F82-F93) et S6 (F94-F140). L'activité antimicrobienne des différentes fractions recueillies a été testée contre *Listeria ivanovii* BUG 496, *Salmonella enterica* ATCC43972 et contre *Candida tropicalis* R2 CIP203. Seul l'échantillon S5 (F82-F93), présente une activité inhibitrice contre les trois souches indicatrices testées.



**Figure 46.** Fractions obtenues suite à la purification de BacTN635 par filtration sur gel G-25.

\* **Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)** : L'échantillon S5 biologiquement actif a été soumis à une quatrième étape de purification HPLC en phase inverse en utilisant une colonne C18. Comme l'illustre la figure 47, trois pics bien définis (P1-P3) ont été obtenus ayant respectivement les temps de rétention suivants: P1: 34.55 min, P2: 38.38 min et P3: 39.31 min. Seule la fraction du pic P3 possède une activité antimicrobienne contre les trois microorganismes testés et aucune activité n'a été observée pour les deux autres fractions correspondantes aux pics P1 et P2



**Figure 47.** Profil d'éluion de BacTN635 par HPLC (quatrième étape de purification)

Sur le tableau 36, nous résumons toutes les données relatives aux différentes étapes de purifications à savoir : La teneur en protéines, l'activité totale, l'activité spécifique, le rendement et le facteur de purification.

**Tableau 36.** Bilan de purification de la bactériocine BacTN635.

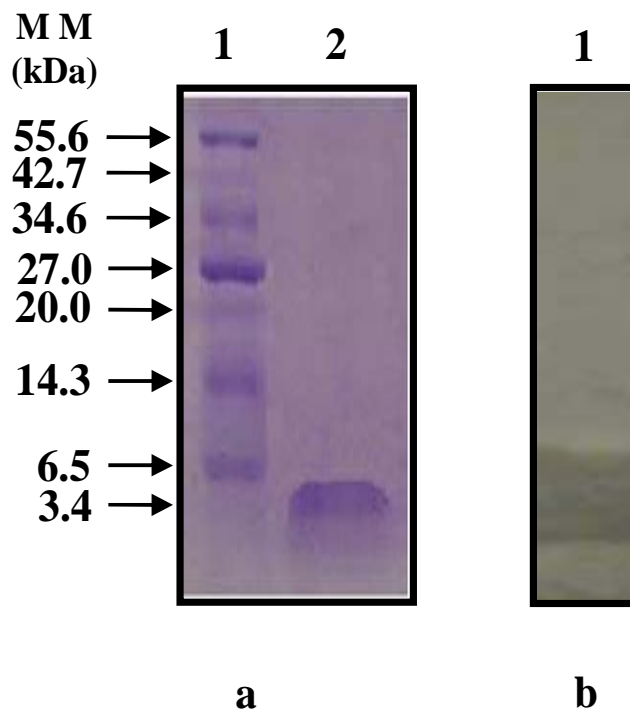
Étape de purification	Volume (ml)	Protéine totale (mg)	Activité totale (UA)	Activité spécifique (UA/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
<b>Surnageant brut</b>	900	2160	$45 \cdot 10^5$	2083	100	1
<b>Précipitation par Sulfate d'Ammonium</b>	50	52,5	$5,2 \cdot 10^5$	9904	11,55	4,75
<b>AMICON</b>	32	23,2	$3,32 \cdot 10^5$	14310	7,38	6,87
<b>Gel de filtration</b>	3,5	1,54	$2,25 \cdot 10^5$	146104	5	70,14
<b>HPLC</b>	0,7	0,57	$1,125 \cdot 10^5$	197368	2,5	94,75

Les résultats présentés sur le tableau 36, montre que les différentes étapes de purification adoptées ont permis l'obtention de la BacTN635 avec un degré de pureté d'environ 95 fois que celle existante dans le surnageant brut. Le rendement de purification est de 2,5%. L'activité spécifique de BacTN635 purifiée est de l'ordre de 197368 UA/mg de protéines.

## VI. Détermination de la masse de BacTN635

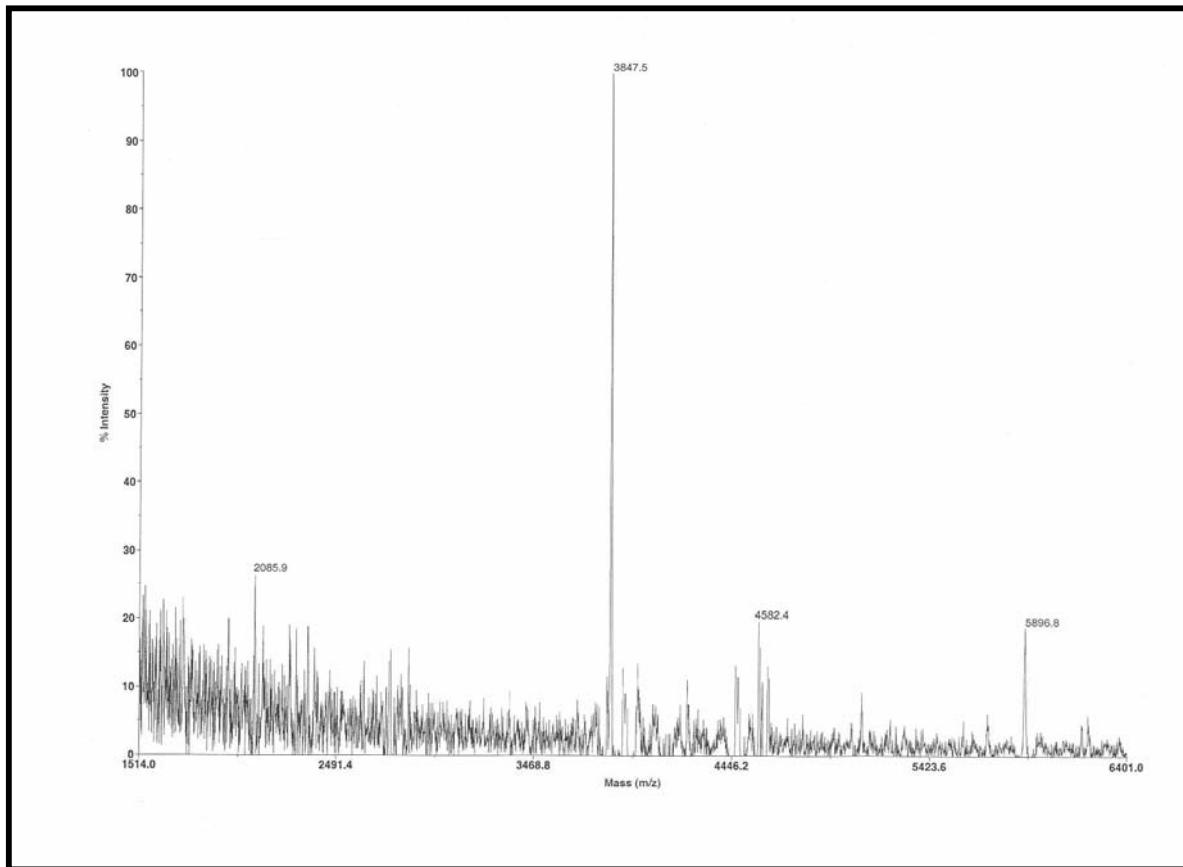
Dans une première étape nous avons essayé d'estimer la masse moléculaire de BacTN635 purifiée par SDS-PAGE. Après migration, le gel a été coupé en deux parties. La partie contenant l'échantillon et le marqueur de protéine a été traitée par une solution de bleu brillant Coomassie R-250 (Biorad) à 0,25%. La deuxième partie qui contient uniquement l'échantillon, a été lavée avec une solution à 10 mmol/l de tampon phosphate (pH 7,0) pendant 4 h, puis fixée et utilisée pour la détection directe de l'activité antimicrobienne contre la cellule indicatrice *Listeria ivanovii* BUG 496.

Comme le montre la figure 48a, une seule bande a été révélée avec une masse moléculaire d'environ 4 kDa. Ce résultat implique que BacTN635 a été purifiée à homogénéité. De plus, le test antimicrobien contre la cellule indicatrice utilisée, *Listeria ivanovii* BUG 496, montre une zone d'inhibition de croissance (figure 48b) au même niveau que la bande détectée



**Figure 48.** Electrophorèse et zymogramme de Bac TN635. **a** : gel SDS-PAGE. Colonne 1: marqueur de taille ; colonne 2: BacTN635 ; **b** : zymogramme contre *L. ivaonvii* BUG 496

Afin de déterminer la masse moléculaire exacte de BacTN635, nous avons utilisée la technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF). La matrice utilisée est l'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique préparé à 5 mg/ml dans 50% acétonitrile contenant 0,1% l'acide trifluoroacétique. La masse exacte de BacTN635 est de 3847 Da (figure 49).



**Figure 49** : Spectre de masse de BacTN635

Au cours des dernières années, plusieurs bactériocines ont été décrites à partir de bactéries *Lactobacillus*. Cependant, la plus part de ces bactériocines présentent des activités inhibitrices dirigées uniquement contre les bactéries à Gram<sup>+</sup>. Les bactériocines ayant des activités contre les bactéries à Gram<sup>-</sup> et les champignons sont très rares. Ce genre de bactériocines sont généralement des dérivés de dicétopipérazines à faible masse moléculaire inférieure à 1 kDa (Lavermicocca et al., 2000). De rares bactériocines sont décrites à partir de *Lactobacillus* ayant une masse moléculaire supérieure à 1 kDa et ayant une activité antifongique. Dans ce cas, nous pouvons mentionner la bactériocine de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 avec une masse moléculaire de 43 kDa (Atanassova et al., 2003) et pentocine TV35b produite par *Lactobacillus pentosus*, dont la masse moléculaire est de 3930 Da (Okkers et al., 1999).

Toutes ces données suggèrent fortement que BacTN635 produite par la nouvelle *Lactobacillus plantarum* isolées sp. TN635 est une nouvelle bactériocine originale ayant un spectre d'action très large contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et contre les champignons filamenteux et unicellulaires.

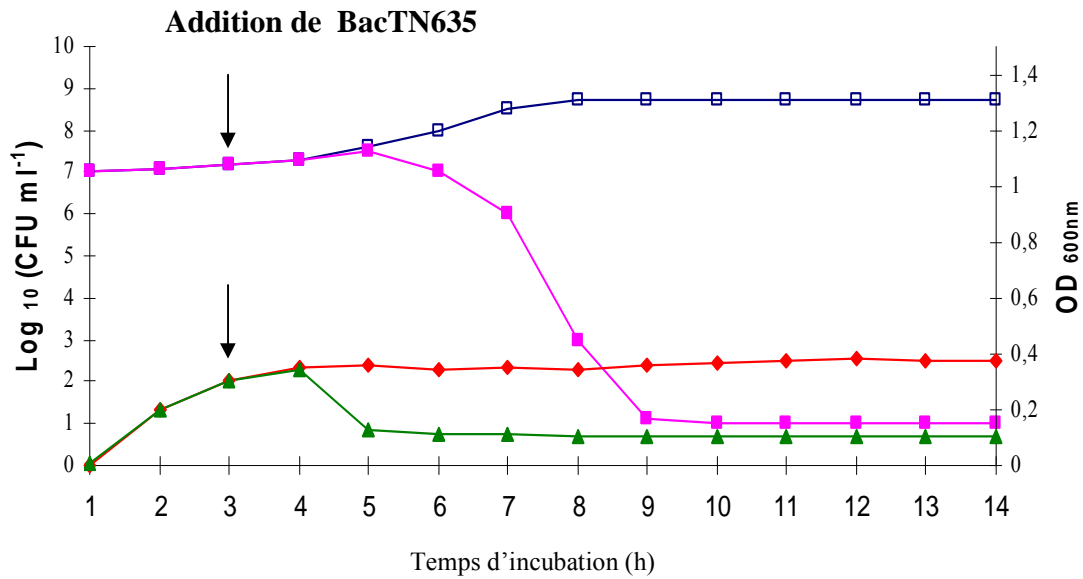
## **VII. Mode d'action de BacTN635**

Pour la détermination du mode d'action de la bactériocine BacTN635, nous avons utilisé deux microorganismes indicateurs: *Listeria ivanovii* BUG 496 (action antibactérienne) et *Candida tropicalis* R2 CIP203 (action antifongique). La bactériocine de la souche TN635 partiellement purifiée à 400 UA/ml (après la troisième étape de purification sur gel de Sephadex G-25), a été ajoutée à 200 ml d'une culture de *Listeria ivanovii* BUG 496 (en milieu LB) et 200 ml d'une culture du champignon unicellulaire *Candida tropicalis* R2 CIP203 (en milieu YP10) en début de la phase exponentielle de croissance à raison de  $10^7$  UFC (Unité Formant Colonies) /ml. Les variations de la turbidité des cultures ont été enregistrées à une DO à 600nm et le nombre d'UFC a été déterminé pour chaque culture.

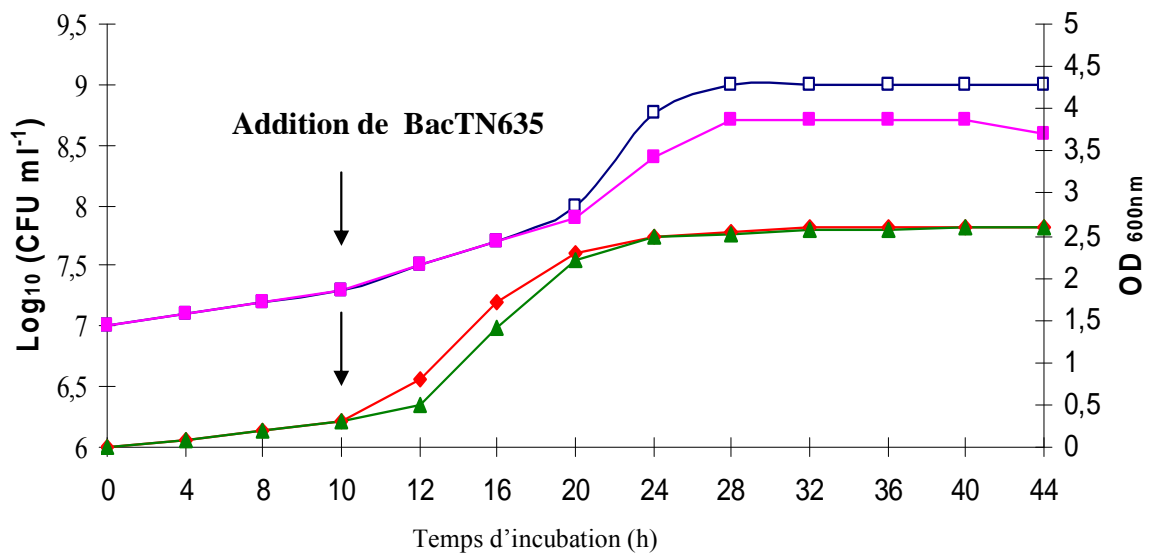
Nous avons constaté que l'ajout de BacTN635, engendre une diminution rapide du nombre de cellules viables de *Listeria ivanovii* BUG 496. En effet, on passe de  $10^7$  UFC / ml à moins de 10 UFC/ml) pour une période de 5h (figure 50). De plus, dès l'ajout de BacTN635, la densité optique de la culture de *Listeria ivanovii* BUG 496 a resté constante (figure 50).

Ces données indiquent que BacTN635 a un effet bactéricide contre *Listeria ivanovii* BUG 496.

Concernant le mode d'action de BacTN635 contre *Candida tropicalis* R2 CIP203, et comme le montre la figure 51, nous constatons que la densité optique de la culture de ce champignon est très similaire à celle du témoin (sans ajout de BacTN635). Cependant, nous remarquons qu'à partir de 20h de croissance, une augmentation de cellules viables en absence de BacTN635 (figure 51). Ces données indiquent que BacTN635 a un effet fongistatique contre *Candida tropicalis* R2 CIP203.



**Figure 50** : Effet de BacTN635 sur la croissance de *L. ivanovii* BUG 496 : Densité optique à 600 nm en absence (◆) et en présence (▲) de BacTN635. CFU/ml en absence (□) et en présence (■) de BacTN635.



**Figure 51** : Effet de BacTN635 sur la croissance de *Candida tropicalis* R2 CIP203: Densité optique à 600 nm en absence (◆) et en présence (▲) de BacTN635. CFU/ml en absence (□) et en présence (■) de BacTN635.



## **Conclusion**

Dans la troisième partie des travaux de recherche de cette présente thèse, notre intérêt a été porté vers les biomolécules de nature bactériocine à partir de bactéries lactiques. Il est à noter que durant des travaux antérieurs réalisés au LMB-CBS, une collection de cinquante quatre bactéries lactiques (TN600-TN653) a été construite. Ces bactéries ont été isolées à partir de plusieurs origines (viande, fruits, végétaux et produits laitiers).

Dans une première étape, nous avons testé ces bactéries pour leur capacité de produire des biomolécules (bactériocines) tout en utilisant différentes cellules indicatrices. Cette étude a permis la présélection de neuf isolats (TN600, TN606, TN615, TN618, TN623, TN627, TN635, TN644 et TN653). Ces derniers ont été ensuite testés une deuxième fois tout en utilisant d'autres cellules indicatrices (bactéries à Gram+ et à Gram- et des champignons). L'isolat TN635 a été retenu pour ses activités biologiques importantes contre toutes les cellules indicatrices testées.

Pour l'identification de l'isolat TN635, nous avons appliqué la technique d'analyse de la séquence nucléotidique du gène ARN 16S. Tenons compte de cette analyse ainsi que de l'arbre phylogénique correspondante, nous avons constaté que notre souche est une nouvelle bactérie du genre *Lactobacillus* et nous avons proposé sa désignation comme étant *Lactobacillus plantarum* sp. TN635.

L'étude de la cinétique de production des biomolécules par la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 a montré une activité optimale pour un temps d'incubation de 16 h à 30°C. L'activité reste stable entre 13 et 20 h, puis elle diminue progressivement. L'analyse des effets de la catalase, des enzymes protéolytiques, de lipase et d' $\alpha$ -amylase sur l'activité biologique du surnageant de la culture de la souche étudiée, nous a permis de déduire qu'il s'agit d'une biomolécule de nature protéique, vraisemblablement une bactériocine de classe I qu'on a désigné BacTN635. Cette biomolécule garde presque 80 % de ses capacités inhibitrices après un traitement de 90 min à 100°C. BacTN635 présente une activité dans une large gamme de pH large comprise entre 3 et 11 avec un optimum de 7.

Pour la purification de BacTN635 à partir de la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, nous avons utilisé quatre étapes de purification différentes qui sont : une précipitation

fractionnée par le sulfate d'ammonium à 80 %, une purification sur membrane cutoff (10 kDa), un passage à travers le Gel filtration sur colonne de Séphadex G-25 et la quatrième étape une Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Ces différentes étapes de purification ont permis l'obtention de la BacTN635 avec un degré de pureté d'environ 95 fois que celle existante dans le surnageant brut. Le rendement de purification est de 2,5 %. L'activité spécifique de BacTN635 purifiée est de l'ordre de 197368 UA/mg de protéines. La masse de BacTN635 pure a été estimée par SDS-PAGE à environ 4 kDa. La masse exacte déterminée par spectroscopie de masse est de 3847 Da.

Les études de mode d'action de BacTN635, ont montré que BacTN635 a un effet bactéricide contre *Listeria ivanovii* BUG 496 et fongistatique contre *Candida tropicalis* R2 CIP203.

Les données obtenus à ce niveau de travail, suggèrent fortement que BacTN635, produite par la nouvelle *Lactobacillus plantarum* sp.TN635, est une nouvelle bactériocine originale ayant un spectre d'action très large contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et contre les champignons filamenteux et unicellulaires (*Fusarium sp.* et *Candida tropicalis* R2) .

Le travail de recherche relatif à la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 et la bactériocine bacTN635, a fait l'objet d'un article publié dans le Journal à Comité de Lecture Internationale *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Appl Biochem Biotechnol  
DOI 10.1007/s12010-009-8821-7

---

**Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria  
by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus  
plantarum* sp. TN635**

**Slim Smaoui • Lobna Elleuch • Wacim Bejar • Ines Karray-Rebai • Imen Ayadi •  
Bassem Jaouadi • Florence Mathieu • Hichem Chouayekh • Samir Bejar •  
Lotfi Mellouli**

Received: 18 August 2009 / Accepted: 11 October 2009  
© Humana Press 2009

## CONCLUSION GENERALE

Dans ce présent travail de thèse, qui entre dans le cadre de l'axe de recherche métabolites secondaires biologiquement actifs du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), nous nous sommes intéressés aux aspects microbiologiques, taxonomiques, biochimiques et spectroscopiques des activités antimicrobiennes de nouvelles souches bactériennes. Trois parties ont été développées :

\* Les travaux de recherche de la première partie ont été orientés vers la classification des deux actinomycètes TN17 et Fr10, isolés et sélectionnés lors de travaux antérieurs pour leur capacité de produire des activités antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques). Pour se faire, nous avons développé plusieurs études qui sont :

- Des études morphologiques utilisant dix milieux de culture solides. Les résultats obtenus laissent penser fortement que les deux souches étudiées sont des actinomycètes du genre *Streptomyces*.

- Des études chimiotaxonomiques qui se basent sur l'analyse des constituants de la paroi. Durant ces analyses nous nous sommes intéressés d'une part à l'analyse des acides aminés et des sucres pariétaux, et d'autre part à l'analyse des lipides membranaires à savoir les phospholipides et les acides gras. Nous avons constaté que la paroi des deux souches TN17 et Fr10 contient l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et la glycine. Ces résultats indiquent que la paroi de nos deux souches est du type I. Ce dernier est caractéristique des bactéries du genre *Streptomyces*. Egalement, nous avons démontré la présence de la phosphatidyléthanolamine (PE) et l'absence de phosphatidylcholine (PC) dans les parois cellulaires des deux isolats (TN17 et Fr10). Ce résultat nous a permis de déduire que nos deux souches sont des actinomycètes du type II. De plus, et suite aux analyses des acides gras pariétaux, nous avons remarqué que les parois des souches TN17 et Fr10 sont du type iso et ante-iso caractéristique de la plupart des actinomycètes.

- Des études phylogéniques qui se basent sur les analyses des séquences nucléotidiques des gènes ARN16S. Par le biais de programmes spéciaux, nous avons élaboré les arbres

phylogéniques des deux souches TN17 et Fr10. D'après les résultats obtenus, nous constatons que les souches les plus apparentées à la souche TN17 sont: *Streptomyces lavendofolia* AB 184217, *Streptomyces gobitricini* AB 184666 et *Streptomyces lilaceus* AB 184457. Pour la souche Fr10, les souches les plus apparentées sont : *Streptomyces microflavus* HBUM 174043 et *Streptomyces griseorubiginosus*.

- Des études physiologiques qui s'intéressent à la capacité des isolats à hydrolyser les bases puriques et leurs dérivés, à dégrader les glucides, les acides aminés, les surfactants et les sels de sodium, à réduire les nitrates, à produire des pigments mélanoides, à tolérer différentes températures, différents pH, le lysozyme, le phénol, l'azide de sodium, le chlorure de sodium et les antibiotiques. Ces études ont permis de renforcer de plus en plus que les deux isolats TN17 et Fr10 sont des actinomycètes du genre *Streptomyces* et que ces deux bactéries sont des nouvelles espèces de *Streptomyces*.

En tenant compte de toutes les analyses morphologiques, chimiotaxonomiques, phylogéniques et physiologiques, nous confirmons bien que nos deux souches TN17 et Fr10 sont deux nouvelles espèces du genre *Streptomyces*, et nous leur proposons les nomenclatures suivantes : *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17 et *Streptomyces microflavus* sp. Fr10.

En perspectives pour cette première partie de travaux de thèse, nous projetons de compléter les différentes analyses citées ci-dessus, par des études moléculaires qui consistent à comparer le degré d'hybridation des ADN totaux des souches *Streptomyces lilaceus* sp. TN 17 et *Streptomyces microflavus* sp. Fr10, avec les ADN totaux des souches les plus apparentées.

\* Concernant les travaux de recherche relatifs à la deuxième partie de la présente thèse, les études réalisées ainsi que les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

- Optimisation des conditions de production des biomolécules de la souche de *Streptomyces lilaceus* sp. TN17. Les conditions de cultures retenues sont : milieu TSB à 30 g/l additionné de glucose à 1 % w/v et de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à une concentration de « 1 mM ». La température d'incubation est de 30°C avec une agitation de 250 rpm. En utilisant ces conditions nous avons préparé une culture de 30 litres.

- Après une double extraction du surnageant par l'acétate d'éthyle, l'extrait sec actif obtenu a été soumis à plusieurs étapes chromatographiques (Sephadex LH-20, Chromatographie sur couche épaisse et Chromatographie en phase liquide à haute performance). Trois molécules pures

biologiquement actives (M1, M2 et M3) ont été obtenues et les structures chimiques correspondantes ont été caractérisées par le biais de plusieurs techniques spectroscopiques. Il s'agit de : M1 (Masse moléculaire = 269 g/mol) c'est un dérivé de DKP (L-Leu, L-Arg). Cette molécule possède des activités antibactériennes contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et antifongiques. M2 (Masse moléculaire = 390 g/mol), c'est un dérivé de phtalate le di-(2-éthylhexyl) phtalate. Cette molécule possède des activités antibactériennes contre les Gram+ et des activités antifongiques. M3 (masse moléculaire = 488 g/mol), c'est un térapeptide cyclique, le 1 - [2 -(cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl) - pyrrolidine-2-carboxylique (1-carbamoyl-propyl)-amide. Cette molécule possède des activités antibactériennes contre les Gram+ et des activités antifongiques.

- Nous avons également préparé une culture de 35 litres à partir de la deuxième souche étudiée, la souche de *Streptomyces microflavus* sp. Fr10. Après une double extraction par l'acétate d'éthyle du surnageant correspondant, l'extrait sec actif a été soumis à deux étapes de purification : Une chromatographie sur couche épaisse suivie par une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Six molécules bioactives ont été obtenues (M1-M6). Les masses moléculaires de ces dernières, déterminées par spectroscopie de masse, sont : M1 = 413 ; M2 = 300 ; M3 = 279 ; M4 = 194 ; M5 = 239 et M6 = 290 g/mol.

En perspectives à cette deuxième partie de travail de thèse, nous comptons caractériser, par applications de différentes techniques spectroscopiques, la structure chimique complète de chacune des six biomolécules pures secrétées par la souche de *Streptomyces microflavus* sp. De plus, et vue l'importance des activités biologiques secrétées par les deux souches étudiées, et notamment les activités antifongiques, une des perspectives la plus immédiate est l'essai *in vivo* de ces biomolécules contre quelques phytopathogènes qui causent des dégâts dans le domaine agronomique.

\* Dans la troisième partie des travaux de recherche de cette présente thèse, notre intérêt s'est porté vers des biomolécules de nature bactériocine produite par des bactéries lactiques. Il est à noter que durant des travaux antérieurs réalisés au LMB-CBS, une collection de cinquante quatre bactéries lactiques (TN600-TN653) a été construite. Ces bactéries ont été isolées à partir de plusieurs origines (viande, fruits, végétaux et produits laitiers). Les travaux réalisés sont :

- Nous avons testé ces bactéries pour leur capacité à produire des biomolécules (bactériocines) actives contre différentes souches indicatrices. Cette étude a permis la présélection de neuf isolats (TN600, TN606, TN615, TN618, TN623, TN627, TN635, TN644 and TN653). Ces derniers ont été ensuite testés une deuxième fois en élargissant leur spectre d'action avec d'autres souches indicatrices (bactéries à Gram+ et à Gram- et des champignons). L'isolat TN635 a été retenu pour ses activités biologiques importantes contre toutes les souches indicatrices testées.

- Pour l'identification de l'isolat TN635, nous avons appliqué la technique d'analyse de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN 16S. Tenons compte de cette analyse ainsi que de l'arbre phylogénique correspondant, nous avons constaté que notre souche est une nouvelle bactérie du genre *Lactobacillus* et nous avons proposé sa désignation comme étant *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. L'étude de la cinétique de production des biomolécules par la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 a montré une activité optimale pour un temps d'incubation de 16 h à 30°C. L'activité reste stable entre 13 et 20 h, puis elle diminue progressivement. L'analyse des effets de la catalase, des enzymes protéolytiques, de la lipase et de l' $\alpha$ -amylase sur l'activité biologique provenant du surnageant de culture de la souche étudiée nous a permis de déduire qu'il s'agit d'une biomolécule de nature protéique, vraisemblablement une bactériocine du type I désignée BacTN635. Cette biomolécule garde presque 80% de ses capacités inhibitrices après un traitement de 90 min à 100°C. BacTN635 présente une activité à une large gamme de pH compris entre 3 et 11 avec un optimum à pH 7.

- La purification de BacTN635 à partir de la souche *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, a été réalisée en quatre étapes: une précipitation fractionnée par l'ajout d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à 80%, une purification sur membrane de type Amicon de seuil de coupure 10 kDa, une filtration sur gel sur colonne Séphadex G-25 pour finir avec une Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Ces différentes étapes de purifications ont permis l'obtention de la BacTN635 avec un degré de pureté d'environ 95 fois par rapport à sa forme existant dans le surnageant brut. Le rendement de purification est de 2,5 %. L'activité spécifique de BacTN635 purifiée est de l'ordre de 197368 UA/mg de protéines. La masse de BacTN635 pure a été estimée par SDS-PAGE à environ 4 kDa. La masse exacte déterminée par spectroscopie de masse est de 3847 Da.

- Les études de mode d'action de BacTN635 ont montré que BacTN635 a un effet bactéricide contre *Listeria ivanovii* BUG 496 et fongistatique contre *Candida tropicalis* R2 CIP203.

En perspectives à ce travail, nous projetons la détermination de la séquence N-H<sub>2</sub> terminale de BacTN635. Egalement, des essais de cette bactériocine dans le domaine agro-alimentaire seraient très intéressants vu le spectre d'action très large de BacTN635 contre les bactéries à Gram+ et à Gram- et contre les champignons filamenteux et unicellulaires.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### *A*

**Aasen I.M., Møretrø T., Katla T., Axelsson L. and Storrø I. (2000)** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 159-166.

**Accoceberry I. and Noël T. (2006)** Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie* **61** (3): 195-199.

**Adinarayana K., Ellaiah P., Srinivasulu B., Bhavani Devi R. and Adinarayana G. (2003)** Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochem.* **38**: 1565-1572.

**Al-Bari, M.A.A., Abu Sayeed, M., Sazedur Rahman, M., and Ashik Mossadik. M. (2006)** Characterization and Antimicrobial Activities of a Phthalic Acid Derivative Produced by *Streptomyces bangladeshiensis* A Novel Species Collected in Bangladesh. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(2): 77-81

**Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis IN'T Veld, J. H. J., and Ten Brink, B. (1998).** Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 568–576.

**Allgaier H., Jung G., Werner R. G., Schneider U. and Zahner H. (1986)** Epidermin Squencing of a heterodet tetracyclic 21- peptide amide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* **160**: 9-22.

**Ammor S., Tauveron G., Dufour E. and Chevallier I. (2006)** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control* **17**: 454-468.

**Amzelloug A. (1999)** Des espoirs pour anéantir le bayoud. *Ecologie. LE MATIN*

**Anastasiadou S., Papagianni M., Ambrosiadis I. and Koidis P. (2008)** Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. *Bioresource Technol.*, **99**(14): 6646-6650.

**André J. M. and Leroy G. (2004)** All-electrons band structure of polyene. *Int. J. Quantum Chem.* **5** (5): 557-563.

**Arous S., Dalet K. and Héchard Y. (2004)** Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **238**: 37-41.

**Asanza-Teruel M. L., Gontier E., Bienaime C., Nava-Saucedo J. E. and Barbotin J. N. (1997)** Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 314-320.

**Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985)** Numerical classification of *Actinomyces* and *Nocardia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 86-98.

**Atanassova, V., Meindl, A., and Ring, C. (2001).** Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham--a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, **68**:105– 113.

**Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarrrondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, Haertlé T. (2003).** Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*, **8**, 63–73.

**Augustine S.K., Bhavsar S.P. and Kapadnis B.P. (2005)** Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indien J. Med. Res.* **121**: 164-170.

**Avonts L. and De Vuyst L. (2001)** Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol. Wet. **66**: 543-50.

**B**

**Baginski M., Sternal K., Czub J. and Borowski E. (2005)** Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim. Polon.* **52(3)**: 655–658.

**Bangi A., Kundim Y., Youji I., Ryosuke F., Takashi I., Shigeru Y. and Makoto O. (2003)** New Haliangicin isomers, potent antifungal metabolites produced by a marine myxobacterium. *J. Antibiotics*, **56 (7)**: 630-638.

**Bauer R. and Dicks L.M.T. (2005)** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, **101** : 201-216.

**Bellahcene M., Forats Z., Geiger J. P., Matallah A. and Henni D. (2000)** La verticilliose de l'olivier en Algérie: répartition géographique et importance de la maladie. *Olivae*. **82**: 41–43.

**Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E. and Lechevalier H.A. (1964)** Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, **12**, 421-423

**Ben Ameer-Mehdi R., Mellouli L., Chabchoub F., Fotso S. and Bejar S. (2004)** Purification and Structure Elucidation of two Biologically Active Molecules from a new Isolated *Streptomyces* sp. US24 strain *Chemistry of Natural Compounds*: **40 (5)**: 510-513.

**Ben Ameer Mehdi R., Sioud S., Fourati Ben Fguira L., Bejar S. and Mellouli, L. (2006)** Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Process Biochemistry*. **41**: 1506-1513.

**Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R.,**

**Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J. and Hopwood D.A. (2002)** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. **417** : 141-147.

**Birnboim H. and Doly J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for engineering of coryneform bacteria. *Trends Biotechnol.* **3**: 305-310.

**Bouzi N. (2002)** Fungal disease development and means of control Main fungal diseases of food legumes in Tunisia. *Collection M, Sciences de l'ingénieur.* 22-30

**Bradford, M.M. (1976)** *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

**Brennan M.R., Costello C.E., Maleknia S.D., Pettit G.R. and Erickson K.L. (2008)** Stylopeptide 2, a Proline-Rich Cyclodecapeptide from the Sponge *Stylotella* sp. *J. Nat. Prod.* **71** (3): 453-456.

**Brötz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P.E. and Sahl H.G. (1998)** The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**(1):154-60.

**Brul S. and Coote P. (1999)** Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50**(1-2): 1-17.

**Byun H.G., Zhang H., Mochizuki M., Adachi K., Shizuri Y., Lee W.J. and Kim S.K. (2003)** Novel antifungal diketopiperazine from marine fungus. *J. Antibiot (Tokyo)*, **56**:102-106.

## C

**Callewaert T. and De Vuyst L. (2000)** Bacteriocin production with *L. amylovorus* DCE471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2): 606-613.

**Castellano P., Vignolo G., Farías R.N., Arrondo J.L. and Chehín R. (2007)** Molecular view by Fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(2): 415-420.

**Caplice E. and Fitzgerald G. (1999)** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**(1-2): 131-149.

**Chargaff, E. and Vischer E. (1949)** The composition of the desoxypentose nucleic acids of thymus and spleen. *J. Biol. Chem.* **177**:405–416.

**Chen H. H., Qin S., Lee J. C., Kim C. J., Xu L. H., Li W.J. (2009)** *Streptomyces mayteni* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Chinese medicinal plant. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **95**(1):47-53.

**Chen Y.S., Srionnual S., Onda T. and Yanagida F. (2007)** Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**: 190-193.

**Chen Y., Ludescher R. D. and Montville T. J. (1997a)** Electrostatic interactions but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles. *App. Environ. Microbiol.* **63** : 4770-4777.

**Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D. and Boudabous A. (2008)** Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110 *Microbiological Research*, **163**(6): 684-692.

**Chiba H., Agematu H., Dobashi K. and Yoshioka T. (1999)** Rhodopeptins, novel cyclic tetrapeptides with antifungal activities from *Rhodococcus* sp. II. Structure elucidation. *J. antibiotics* **52**: 700.

**Gladek A. and Zakrzewska J.(1984)** Genome size of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**: 73-76.

**Cohn F. (1972)** Genus *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore. 1105-1139

**Cotter P.D. and Hill C. (2003)** Surviving the acid test: response of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**(3): 429-453.

### *D*

**Dalet K., Briand C., Cenatiempo Y. and Hécharde Y. (2000)** The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.*, **41**(6): 441-443.

**Damasko C., Konietzny A., Kaspor H., Appel B., Dersch P. and Strauch E. (2005)** Studies of the efficacy of enterocolitacin, a phage-tail like bacteriocin, as antimicrobial agent against *Yersinia enterocolitica* serotype O3 in a cell culture system and a mice. *J. Vet. Med. B.* **52**: 171-179.

**Dastager S. G., Li W. J., Agasar D., Sulochana M.B., Tang S. K., Tian X. P. and Zhi X.Y. (2007)** *Streptomyces gulbargensis* sp. nov., isolated from soil in Karnataka, India. *Antonie van Leeuwenhoek.* **91**:99–104.

**Davies J. and Mazel D. (1997).** Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur.* **170**: 14-17.

**Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. and Ross P. (2006)** Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, **16**: 1058-1071.

**Delves-Broughton, I. (1990)** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**: 100.

**De Vuyst L. and Vandamme E. J. (1993)** Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications, in bacteriocins of Lactic

Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications (De Vuyst, L and Vandamme, E. J., Eds): 151-221. London: Chapman et Hall.

**De Vuyst L., Callewaert R. and Crabbé K. (1996)** Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, **142**: 817-827.

**Diep D., Salehian Z., Holo H. and Nes I.F. (2007)** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **104**: 2384-2389.

**Dietz A. (1988)** Practical and proposed cooperative investigational criteria for taxonomic studies of Actinomycetales. In *biology of Actinomycetes* **88**. Okami, Y., Beppu, T. And Ogawara, H. (eds). Tokyo: Japan scientific societies press.

**Drider D., Fimland G., Héchard Y., Mc Mullen L.M. and Prevost H. (2006)** The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70** (2): 564-582.

### *E*

**Eijsink V.G.H., Skeie M., Middelhoven P.H., Brurberg M.B. and Nes I.F. (1998)** Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(9): 3275-3281.

**El Hadrami I., Bellaj M., Idrissi A., J'Aiti F., Jaafari S. and Daayf F. (1998)** Biotechnologie végétales et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactilifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. *Cahiers Agriculture.* **7** (6): 463-468.

**Elleuch L., Shaaban M., Smaoui S., Mellouli L., Karray-Rebai I., Fourati-Ben Fguira L., Shaaban, K.A. and Hartmut Laatsch. (2009)** Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Appl Biochem Biotechnol.* DOI 10.1007/s12010-009-8808-4.

**El-Naggar, M.Y.M. (1997)** Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35. *Biomed. Lett.* **55**, 125.

**El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J. and Jakobsen M. (1998)** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* **20(10)**: 913-916.

**Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. and Ishizaki A. (2000)** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 85-106.

### *F*

**Favret M.E. and Yousten A.A. (1989)** Thuricin: The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **53** (2): 206-216.

**Fdhila F., Vázquez V., Sánchez J.L. and Riguera R. (2003)** dd-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, **66**: 1299-1301.

**Felsenstein, J. (1989)**. PHYLIP-phylogeny inference package, version 3.2. *Cladistics*, **5**, 164-166.

**Fimland G., Johnsen L., Axelsson L., Brurberg M.B., Nes I.F., Eijsink V.GH. and Nissen-Meyer J. (2000)** A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial *spectrum*. *J. Bacteriol.*, **182**: 2643-2648.

**Fourati Ben Fguira L., Fotso S., Ben Ameer Mehdi R., Mellouli L. and Laatsch H. (2005)** Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. US80 strain. *Research in Microbiology*. **156** (3): 341-347.

**Frank W. and Bibb M. J. (1992)** Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.



**Fudou R., Iusika T. and Yamanaka S. (2001)** Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. Isolation and structure elucidation. *J. Antibiotics* ; **54**: 153-156.

**Fûrbass R., Gocht M., Zuber P. and Marahiel M.A. (1991)** Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus brevis*, with promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*. *Mol. Gen. Genet*, **225**: 347-354.

## G

**Gahan C. and Hill C. (1999)** The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella* Typhimurium and *L. monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **50**(1-2): 93-100.

**Galverz A., Abriouel H., Lopez R. L. and Omar N.B. (2007)** Bacteriocin- based strategies for food bioservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120** (1-2):51-70.

**Gesheva V., Ivanova V. and Gesheva R. (2005)** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.* **160**: 243-248.

**Ghalfi H., Allaoui A., Destain J., Benkerroum N. and Thonart P. (2006)** Bacteriocin activity by *L. curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *J. Food Protect.* **69**: 1066-1071.

**Gillor O., Nigro L.M. and Riley M.A. (2005)** Genetically bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, **(11)**

**Goodfellow M. (1971)** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **69**, 33-90.

**Goldman B. S., Nierman W. C., Kaiser D., Slater S. C., Durkin A. S., Eisen J., Ronning C. M., Barbazuk W. B., Blanchard M., Field C., Halling C., Hinkle G., Iartchuk O., Kim H. S.,**

**Mackenzie C., Madupu R., Miller N., Shvartsbeyn A., Sullivan S. A., Vaudin M., Wiegand R., and Kaplan H. B. (2006)** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**:15200-15205.

**Gordon R.E., Barnett D.A., Handarhan J.E. and Hor-Nay-Pang C. (1974)** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 54-63.

**Grande M. J., Lopez R. L., Abriouel H., Valdivia E., Ben Omar N., Maqueda M., Martinez-Canamero M. and Galvez A. (2007)** Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or a combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **70**: 405-11.

**Gravesen A., Ramnath M., Rechinger K.B., Andersen N., Jänsch L., Héchard Y., Hastings J.W. and Knøchel S. (2002)** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, **148**: 2361-2369.

**Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C. and Ross P. (2005)** A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol.*, **98**: 1316-1325.

## *H*

**Harlander S. K. (1993)** Regulatory aspects of bacteriocin use. In: Hoover, D. G. and Steenson, L. R., Editors, 1993. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Academic Press, New York, 233-236.

**Héchard Y., Pelletier C., Cenatiempo Y. and Frère J. (2001)** Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, **147**: 1575-1580.

**Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. and Williams S. T. (1994)** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Hopwood D.A., Bibb M. J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C. P., Ward J.M. and Schremph H. (1985)** Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation.

**Horton, D.A., Bourne, G.T., Coughlan, J., Kaiser, S.M., Jacobs, C.M., Jones, A., Ruhmann, A., Turner, J.Y., and Smythe, M.L. (2008)** Cyclic tetrapeptides via the ring contraction strategy: chemical techniques useful for their identification. *Org. Biomol. Chem.* 6, 1386

**Hsiao, C. and Siebert K. (1999)** Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 47(3): 189-201.

## *I*

**Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y. Hattori M. and Omura S. (2003)** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21: 526-531.

**Iwai Y., Awaya J., Kesado T., Yamada H., Omura S. and Hat T. (1973)** Selective fermentation of cerulenin by *Cephalosporin caeruleus*. *J. Ferment. Technol.* 51: 575-578.

## *J*

**Janssen G. R. and Bibb M. J. (1993)** Derivatives of pUC18 that have *Bgl*III sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *E.coli* colonies. *Gene.* 124: 133-134.

**Janssen M., Geeraerd A.H., Cappuyns A., Garcia-Gonzalez L., Schockaert G., Houteghem N.V., Vereecken K.M., Debevere J., Devlieghere F. and Impe, J. (2007)** Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5): 1601-1611.

**Joullié M.M. and Nutt R.F. (1983)** Cyclopeptides alkaloids in “Alkaloids, chemical and biological perspectives”. S. W. Pelletier. J. Willey & Son, N.Y., 113-168.

## K

**Kishimoto K., Park Y.S., Okabe M. and Akiyama S. (1996)** Effect of phosphate ion on mildiomycin production by *Streptoverticillium rimofaciens*. *J. Antibiotics*. **49**: 775-780.

**Klaenhammer T.R. (1988)** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**: 337-349.

**Klaenhammer T.R. (1993)** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**(1-3): 39-85.

**Klein C., Kaletta C. and Etian K.D. (1993)** Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by ahistidine kinase/responce regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:296–303.

**Kluyver A. J. and Van Niel C. B. (1936)** Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyb Abt II* **94**: 369–403.

**Kobilinsky A., Nazer A.I. and Dubois-Brissonnet F. (2007)** Modeling the inhibition of *Salmonella* Typhimurium growth by combination of food antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* **115**: 95-109.

**Kolsto A. B. (1997)** Dynamic bacterial genome organization. *Mol. Microbiol.* **24**: 241-248.

**Kroppenstedt, R. M. (1985)** Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp. 173–199. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. New York: Academic Press.

**Kullisaar T., Zilmer M., Mikelsaar M., Vihalemm T., Annuk H., Kairane C. and Kilk, A. (2002)** Two antioxidative Lactobacilli strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **72**(3): 215-224.

**Knopik-Skrocka A., Bielawski J., Glab M., Klafaczynska A. and Wulkiewicz M. (2003)** A kinetics study of pig erythrocyte hemolysis induced by polyene antibiotics. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**: 439-454.

**Krätzschar J., Krause M. and Marahiel M.A. (1989)** Gramicidin S Biosynthesis Operon Containing the Structural Genes *grsA* and *grsB* Has an Open Reading Frame Encoding a Protein Homologous to Fatty Acid Tioesterases. *J. Bacteriol.* **171**: 5422-5429.

**Kutzner H. J. (1981)** The family *Streptomycetaceae*. In the prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., and Schegel H. (eds). *Berlin: Springer-Verlag KG,pp.*

## *L*

**Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

**Larpent J. P. and Sanglier J. J. (1989)** La biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris.

**Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A and Gobbetti M. (2000)** Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4084–4090.

**Leal-Sánchez M.V., Jiménez-Díaz R., Maldonado-Barragán A., Garrido-Fernández A. and Ruiz-Barba J.L. (2002)** Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *L. plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** : 4465-4471.

**Lebrihi, A., Errakhi, R., and Barakate, M. (2008)** Patent deposited: INP / AGRONUTRITION, FR08 54053.

**Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970a)** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. *In: The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.

**Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970b)** Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In: The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.) G. Fisher Verlag, Jena, 311-316.

**Lechevalier M.P., De bievre C. and Lechevalier H.A. (1977)** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.

**Lee, K. H.; Kim, J. H.; Lim, D. S.; Kim, C. H. (2000)** Anti-leukaemic and antimutagenic effects of di (2-ethylhexyl) phthalate isolated from aloe linne. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 593.

**Leenhouts, K. J., Kok, J. and Venema, G. (1990)** Stability of Integrated Plasmids in the Chromosome of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2726– 2735

**Leblond P., Fischer G., Francou F.X., Berger F., Guerineau M. et Decaris B. (1996)** The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Mol. Microbiol.* 19: 261-27

**Le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B. and Urdaci, M.C. (2000)** Biochemical and genetic characterization of coagulins, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 5213–5220.

**Le Minor L. and Veron M. (1989)** Bacteriologie medicale. 2<sup>ème</sup> édition. *Medecine. Sciences Flammarion*.

**Leroy F., De Winter T., Adriany T., Neysens P. and De Vuyst L. (2006)** Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *L. amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.*, **12** : 102-111.

**Liu, S. (2003)** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **83**(2) : 115-131.

**Luchansky J.B. and Call J.E. (2004)** Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J. Food Prot.*, **67**: 1017-1021.

**Lúcia L.F., Farias F.F., Eustáquio C.J., Auxiliadora M., Carvalho R., Alviano C.S. and Farias L.M. (2002)** Bacteriocin production by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the oral cavity of humans with periodontal disease, periodontally healthy subjects and marmosets. *Research in Microbiology* **153**: 45–52.

**Lucietto F.R., Milne P.J., Kilian G., Frost C.L. and Van De Venter M. (2006)** The biological activity of the histidine-containing diketopiperazines cyclo(His-Ala) and cyclo(His-Gly). *Peptides*, **27**: 2706-2714.

**Lv W., Zhang X. and Cong W. (2005)** Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 322-326.

## *M*

**Magyar, A., Zhang, X., Abdi, F., Kohn, H., and Widger, W. (1999)** Identifying the Bicyclomycin Binding Domain through Biochemical Analysis of Antibiotic-resistant Rho Proteins *J. Biol. Chem.* **274**, 7316.

**Manandhar H.K., Lyngs Jørgensen H.J., Mathur S. B. and Smedegaard-Petersen V. (1998 a)** Smedegaard-Petersen Suppression of Rice Blast by Preinoculation with Avirulent *Pyricularia oryzae* and the Nonrice Pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Disease*, **88**: 735-739.

**Manandhar H.K., Lyngs Jørgensen H.J., Smedegaard-Petersen V. and Mathur S.B. (1998 b)** Seedborne Infection of Rice by *Pyricularia oryzae* and Its Transmission to Seedlings. *Plant Disease*, **82**: 1093-1099.

**Maniatis T., Fritsch E. F. And Sambrouk J. (1982)** Molecular cloning. Cold. Spring. Harbor. Laboratory, New York.

**Mann J. (2001)** Natural products as immunosuppressive agents. *Nat. Prod. Rep.*, **18**: 417-430.

**Marchal N. and Bourdon J.L. (1973)** Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds.), Paris.

**Marmur J., (1961)** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Microbiol.* **3**: 208-218.

**Martirani L., Varcamonti M., Naclerio G. and De Felice M. (2002)** Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact.* **18**: 1(1):1.

**Marmur, J. (1961)** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.

**Matallah-Boutiba A., Nicole M., Fortas Z., Bellahcene M., Henni D. and Geiger J. P. (1997)** Defense responses of inoculated olive tree seedlings to *Verticillium dahliae*. In: 7th International Verticillium Symposium. Athens (GR).



**Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. and Drosinos E.H. (2003)** Influence of pH and temperature on bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Meat Sci.*, **64**: 265-271.

**McClelland K., Milne P.J., Lucieto F.R., Frost C., Brauns S.C., Van De Venter M., Du Plessis J. and Dyason K. (2004)** An investigation into the biological activity of the selected histidine-containing diketopiperazines cyclo (His-Phe) and cyclo (His-Tyr). *J Pharm Pharmacol* **56**: 1143–1153

**Mehling A., Whmeir Udo F. and Peipersberg W. (1995)** Nucleotide sequence of Strptomycete 16S using PCR. *Microbiology*. **141**:2139-2147.

**Mellouli L., Ben Ameer-Mehdi R., Sioud S., Salem M. and Bejar S. (2003)** Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a new isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology* **154**: 345-352.

**Mellouli L., Karray-Rebai .I, Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R., Naili B, Bejar S. (2004)** Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology* **49(6)** : 400-406.

**Merino L. A., Hrenuk G. E., Alonso J. M and Ronconi M. C. (2000)** Interêt de l'antibiotypie et la bactériocinotypie pour différencier les souches de *Shigella* isolées en Argentine. Manuscrit n° 2166 « Bactériologie ».

**Messens W., Verluyten J., Leroy F. and De Vuyst L (2003)** Modelling growth and bacteriocin production by *L. curvatus* LTH1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.*, **81** : 41-52

**Miao L., Kwong T. F. N. and Qian P. Y. (2006)** Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium* c.f. *saccharicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 1063-1073.

**Minnikin D.E., Patel P.V., Alshamaony L. and Goodfellow M. (1977)** Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**,104-107.

**Minnikin D.E. & Goodfellow M., (1981)** Lipids in the classification of actinomycetes. *Zbl. Bakteriol. Hyg. Suppl.* **11**: 99-109.

**Molnar I. (1994)** Secretory Production of Homologous Proteins by Recumbent Streptomyces: What has been Accomplished? pp: 181-104 dans *Recombinant Microbes For Industrial And Agricultural Applications*. Murooka Y. and Imanaka T. (éditeurs), Marcel Dekker INC.

**Moretro T., Aasen I.M., Storro I. and Axelsson L. (2000)** Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.*, **88**(3): 536-545.

**Morgan S.M., O’connor P.M., Cotter P.D., Ross. P. and Hill C. (2005)** Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**(7): 2606-2611.

**Morita H., Shishido A., Matsumoto T., Itokawa H. and Takeya K. (1999)** Cyclolinopeptides B-E, new cyclic peptides from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron*, **55**: 967-976.

**Murray R.G.E., Brenner D.J., Holt J.G., Krieg N.R., Mulder J.W., Pfenning N., Sneath P.H., Stoley J.T. and Williams S.T., (1989)** In “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”. Williams & Wilkins Eds. **Vol. 4**, pp: 2333-2648.

*N*

**Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J. and Dicks L.M. (2001)** Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.*, **91**: 1131-1138.

**Nigutova K., Morovsky M., Pristas P., Teather R.M., Holo, H. and Javorsky, P. (2007)** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* **102**(2): 563-569.

**Nilanonta C., Isaka M., Kittakoop P., Saenboonrueng J., Rukachaisirikul V., Kongsaree P. and Thebtaranonth Y. (2003)** New diketopiperazines from the entomopathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. *J. Antibiot.* **56**: 647-51.

*O*

**Okada T., Tanaka K., Nakatani F., Sakimura R., Matsunobu T., Li X., Hanada M., Okumura Y.A. and Sakurai Y. (1973)** Chemical studies on the mistletoe. II. Structure of vascumamide, a new cyclic peptide isolated from *Viscum album* var *coloratum*. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **46**: 2190-2193.

**Okada, T., Tanaka. K., Nakatani, F., Sakimura, R., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Nakamura, T., Oda, Y., Tsuneyoshi, M., and Iwamoto, Y. (2006)** Involvement of P-glycoprotein and MRP1 in resistance to cyclic tetrapeptide subfamily of histone deacetylase inhibitors in the drug-resistant osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells *International journal of Cancer.* 118, 90.

**Okami Y., Hamada M. and Ueda N. (1968)** Proceed. of the first Intern. Conference on Culture Collection (Iizuka H. & Hasegawa T. Ed.) pp: 457-475.

**Okanish M., Suzuki K. and Umezawa H. (1974)** Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: culture conditions and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**: 389-400.

**Okkers D.J., Dicks L.M.T., Silvester M., Joubert J.J. and Odendaal H.J. (1999)** Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Applied Microbiology.* **87**(5):726-734.

**Olano C., Rodriguez A. M., Michel J. M., Mendez C., Raynal C. and Salas J. A. (1998)** Analysis of a *Streptomyces antibioticus* chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of macrolactone ring. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 299-308.

**Oppegard C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen P.E., Fimland G. and Nissen-Meyer J. (2007)** The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**(4): 210-219.

**Ovchinnikov Y. A. and Ivanov V. T. (1975)** Conformational states and biological activity of cyclic peptides. *Tetrahedron.* **31**: 2177-2209.

*P*

**Paik H. D., Bae S. S., Park S. H and Pan J.G. (1997)** Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tochigiensis*. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **19**: 294-298.

**Papagiannin M. (2003)** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.* **21**(6): 465-499.

**Parente E. and Ricciardi A. (1999)** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**: 628-638.

**Patton G.C. and Van Der Donk W.A. (2005)** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**: 543-551.

**Pérez Guerra N., Bernárdez P.F., Agrasar A.T., López Macías C. and Castro L.P. (2005)** Fed-batch pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 on whey. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **42**: 17-23.

**Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C. and Flores M. E. (2003)** *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. j. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 269-273.

**Pitt T. L. and Gaston A.M. (1995)** Bacteriocin typing. Methods in molecular biology. Edited by Haward, J. et Whitecombe, D.M. Edition: Human press.Inc. Totowa, New Jersey (NJ). **46**: 5-14.

**Pongtharangkul T. and Demirci A. (2006)** Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.*, **22**: 217-224.

**Potgieter M., Steyn P.S., Van Heerden F.R., Van Rooyen P.H. and Wessels, P.L. (1989)** Conformational analysis of the cyclic peptide rhizonin A in solution and crystalline state. *Tetrahedron*, **45**: 2337-2350.

**Prasad C. (1995)** Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, **16**:151–64.

*R*

**Rayman M. K., Aris B. and Hurst A. (1981)** Nisin: a possible alternative of adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 375-380.

**Rhee K.H., Choi K.H., Kim C.J. and Kim C.H. (2001)** Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-335 producing antibiotic substance inhibitory to VRE (vancomycin-resistant enterococci). *J. Micribiol. Biotechnol.*, **11**: 469–74.

**Rhee K.H. (2002)** Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **48**:321–7.

**Rhee K.H. (2004)** Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **24**: 423-427.

**Richard C., Canon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H. and Drider D. (2006)** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* **23**(2): 175-183.

**Riley M. A. and Wertz J. E. (2002)** Bacteriocin diversity: ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* **7**: 129-133.

**Rodgers S. (2001)** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, **12**: 276-284.

**Roy, R.N., Laskar, S., Sen., S.K. (2006).** Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. *Microbiological Research* 161, 121.

**Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R.P. and Hill C. (1998)** Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ Microbiol.* **64**: 2287-2290.

## S

**Saitou N. and Nei M. (1987)** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425

**Sakamoto M., Tano Y., Uchimura T. and Komagata K. (1998)** Aerobic growth of some lactic acid bacteria enabled by the external addition of peroxidase (horseradish) to the culture medium. *J Fermentation and Bioengineering* **85**(6): 627-629.

**Sambrook J. E., Fritsh E. F. and Maniatis T. (1989)** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Sasser M., (2001)** Identification of bacteria by Gas Chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. www.midi-inc.com.

**Savijoki K., Ingmer H. and Varmanen P. (2006)** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**: 394-406.

**Scannell A.G., Hill C., Ross R.P., Marx S., Hartmeier W. and Arendt E.K. (2000)** Continuous production of lactacin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. *J. Appl. Microbiol.*, **89**: 573-579.

**Schleifer K.H. and Kandler (1972)** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477.

**Shin H.J., Matsuda, H., Murakami, M. and Yamaguchi, K. (1996)** Agardhipeptins A and B, two new cyclic hepta and octapeptide, from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-204). *Tetrahedron*, **52**: 13129-13136.

**Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966)** Methods for characterization of *Streptomyces* species *Int J Syst Bacteriol* **16**: 313–340.

**Sioud S, Karray-Rebai I, Aouissaoui H, Aigle B, Bejar S. and Mellouli L. (2007)** Targeted gene disruption of the Cyclo (L-Phe, L-Pro) biosynthetic pathway in *Streptomyces* sp. US 24 strain. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. ID : 91409 , doi : 10.1155/2007/91409.

**Sierra G., (1957)** A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **23**, 15-22.

**Sneath P.H.A. (1957)** The application of computers to taxonomy. *J.Gen. Microbiol.* **17**: 201-226.

**Son B.W., Jensen P.R., Kauffman C.A. and Fenical W. (1999)** New cytotoxic epidthiodioxopiperazines related to verticillin A from a marine isolate of the fungus *Penicillium*. *Nat. Prod. Lett.*, **13**: 213.

**Stackebrandt E. and Goebel B.M. (1994)** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**: 846-849.

**Strus M., Gosiewski T., Kochan P. and Heczko P.B. (2006)** The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immuno. Medical Microbiol.* **48**: 56- 63.

**Sujatha P., Bapi-Raju K. V. V. S. N. and Ramana T. (2005)** Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* **160**: 119-126.

**Suzuki K., (1988)** Cellular fatty acid analysis in actinomycetes taxonomy. In “*Biology of Actinomycetes*” 88, ed. Okami, Y., Beppu, T. & Ogawara, H., Scientific Societies Press, Tokyo: Japan, pp: 251-256.

## *T*

**Tagg, J.R. and McGiven, A.R. (1971)** *Appl. Microbiol.* **21**: 943.

**Tanaka Y. and Omura S. (1993)** Agroactive compounds of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 57-87.



**Thomson C.J., Power E., Ruebsamen-Waigmann H. and Labischinski H. (2004)** Antibacterial research and development in the 21st Century-an industry perspective of the challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* **7** (5): 445-50.

**Todorov S.D. and Dicks L.M. (2004)** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic Microbiol.*, **44**: 305-316.

**Twomey D., Ryan M., Meaney B. and Hill C. (2002)** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**: 165-185.

V

**Vadyvaloo V., Snoep J.L., Hasting J.W. et Rautenbach M. (2004)** Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. *Microbiology*, **150**: 335-340.

**Vara J., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y. G., Donadio S. and Hutchinson C.R. (1989)** Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J. Bacteriol.* **171**: 5872-5881.

**Verluyten J., Leroy F. and De Vuyst L. (2004)** Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5081-5088.

**Viguié C (2000)** Médecine thérapeutique. 3, (3), *Thérapeutique*.

**Vollenweider S. (2004)** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* **64**: 16-27.

W

**Waksman S.A. and Henrici A.T. (1943)** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.* **46**: 337-341.

**Whyte A.C., Joshi B.K., Gloer J.B., Wicklow D.T. and Dowd P.F. (2000)** New cyclic peptide and bisindolyl benzoid metabolites from the Sclerotia of *Aspergillus sclerotiorum*. *J. Nat. Prod.*, **63**: 1006-1009.

**Wiedemann I., Böttiger T., Bonelli R.R., Wiese A., Hagge S.O., Gutschmann T., Seydel U., Deegan L., Hill C., Ross P. and Sahl H.G. (2006)** The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147 - a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.*, **61**(2): 285-296.

**Willey J.M. and Van der Donk W.A. (2007)** Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**: 477-501.

**Williams D.E., Bombuwala K., Lobkovsky E., Dilip de Silva E., Karunaratne V., Allen T.M., Clardy J. and Andersen R.J. (1998)** Ambewelamides A and B, antineoplastic epidithiapiperazine-diones isolated from the lichen *Usnea sp.* *Tetrahedron Lett.* **39**: 9579–9582.

Y

**Yilma S., Cannon-Sykora J., Samoylov A., Loc T., Liu N., Brinker C. J., Neely W. C. and Vodyanoy V. (2007)** Large-conductance cholesterol–amphotericin B channels in reconstituted lipid bilayers. *Biosensors Bioelectron.* **22**: 1359–1367.

**Yu J., Liu Q., Liu Q., Liu X., Sun Q., Yan J., Qi X. and Fan S. (2008)** Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technol.* **99**: 2087-2091.

Z

**Zalan Z., Barath A. and Halasz A. (2005)** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.* **43**(3): 219- 225.

## TABLE DE MATIERE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
A. LES ANTIBIOTIQUES.....	5
I. Classification et mode d'action des antibiotiques.....	5
I.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.....	5
I.2. Inhibiteurs de la synthèse protéique.....	6
I.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs.....	7
II. Les dicétopipérazines.....	8
II. 1. Définition et historique.....	8
II. 2. Propriétés biologiques des DKP.....	9
II.2.1. Intérêt thérapeutique.....	9
II.2.2. Intérêt agronomique.....	10
III. Les autres peptides cycliques.....	11
B. LES ANTIFONGIQUES.....	13
I. Les antifongiques luttant contre les mycoses.....	14
II. Les antifongiques luttant contre les maladies cryptogamiques.....	16
II. 1. Evolution générale d'une maladie cryptogamique.....	16
II. 1. 1. L'inoculation.....	16
II. 1. 2. La pénétration.....	17
II. 1. 3. L'infection.....	17
II. 1. 4. La dissémination du pathogène.....	17
II. 1. 5. La conservation du pathogène.....	17
II. 2. Exemples de maladies cryptogamiques.....	18
II. 2. 1. La fusariose.....	18
II. 2. 2. La verticilliose.....	18
C. LES STREPTOMYCES.....	22
I. Caractéristiques générales.....	22
I.1. Cycle de développement.....	22
I.2. Importance Industrielle.....	23
I.3. Le génome des <i>Streptomyces</i> .....	23
II. Identification et classification des Actinomycètes « <i>Streptomyces</i> ».....	24
II. 1. Généralités.....	24
II.1.1. La Taxonomie phénétique.....	24
II.1.2. La Taxonomie numérique.....	24

II.1.3. La Taxonomie phylogénétique .....	25
II. 2. Identification des actinomycètes « <i>Streptomyces</i> » .....	26
III. Production de métabolites secondaires .....	29
III. 1. Effet de la composition du milieu de culture .....	29
III. 2. Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation .....	31
IV. Purification et Caractérisation des Métabolites Secondaires .....	32
IV. 1. Purification.....	32
IV. 2. Caractérisation .....	33
D. RESISTANCE MICROBIENNES AUX BIOMOLECULES .....	35
I. Résistance aux antibiotiques .....	36
II. Résistance aux antifongiques.....	36
E. LES BACTERIOCINES.....	38
I. Domaines d'applications des bactériocines .....	38
I.1. Le typage bactérien .....	38
I.2. Domaine alimentaire .....	38
I.3. Domaines de la médecine humaine et vétérinaire.....	39
I.4. Domaine agricole .....	41
II. Microorganismes producteurs de bactériocines .....	41
III. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	42
III-1 Le pH et les acides organiques.....	42
III. 2. Le peroxyde d'hydrogène.....	43
III.3. Le dioxyde de carbone .....	44
III.4. Le diacétyl .....	44
III.5. La reutérine .....	44
III.6. Les bactériocines .....	45
III.6.1. Classe I : Les lantibiotiques .....	45
III.6.2. Classe II. ....	46
III.6.3. Classe III .....	48
III.6.4. Classe IV .....	48
IV. La production des bactériocines.....	48
V. Le conditionnement des bactériocines .....	49
VI. L'application des bactériocines dans le secteur alimentaire .....	50
VI. 1. Application de la bactériocine.....	50
VI. 2. Application de la bactérie productrice de bactériocines .....	51
A. MATERIEL.....	51
I. Bactéries.....	51
I. 1. Souches d' <i>E. coli</i> pour les manipulations de clonage.....	51
I. 2. Bactéries lactiques .....	51
I.2.1. Productrices de bactériocines.....	51
I.2.2. Utilisées comme cellules indicatrices.....	51

I. 3. Autres bactéries indicatrices .....	51
I. 4. <i>Streptomyces</i> .....	52
II. Champignons .....	52
III. Vecteur de clonage .....	52
IV. Les milieux de cultures .....	52
IV. 1. Milieux solides .....	52
IV. 1. 1. Milieux utilisés pour les souches d' <i>Escherichia coli</i> .....	52
IV. 1. 2. Milieux utilisés pour les cellules indicatrices .....	53
IV. 1. 3. Milieux utilisés pour les bactéries lactiques productrices de bactériocines .....	53
IV. 1. 4. Milieux utilisés pour les souches de <i>Streptomyces</i> .....	53
IV. 2. Milieux liquides .....	56
IV. 2. 1. Milieux utilisés pour <i>E. coli</i> .....	56
IV. 2. 2. Milieux utilisés pour les souches de <i>Streptomyces</i> .....	56
IV. 2. 3. Milieux utilisés pour les souches indicatrices .....	56
V. Tampons et Solutions .....	56
V. 1. Tampons .....	57
V. 2. Solutions .....	58
VI. Enzymes, Kits et Oligonucléotides .....	61
VI. 1. Enzymes .....	61
VI. 2. Kits .....	62
VI. 3. Oligonucléotides .....	62
VII. Matériel chimique et spectroscopique .....	62
VII. 1. Purification des molécules actives .....	62
VII.1.1. A partir de <i>Streptomyces</i> .....	62
VII.1.2. A partir de bactéries lactiques (bactériocines) .....	63
VII. 2. Identification des molécules actives .....	63
B. METHODES .....	64
I. Cultures des bactéries .....	64
I. 1. Souches d' <i>E. coli</i> .....	64
I. 2. Souches de <i>Streptomyces</i> .....	64
I. 3. Souche <i>Lactobacillus plantarum sp. TN635</i> .....	65
I. 4. Souches indicatrices .....	65
I.4.1. Bactéries .....	65
I.4.2. Champignons .....	65
II. Détection des activités biologiques .....	66
II.1. Activités biologiques à partir des souches de <i>Streptomyces</i> .....	66
II.1.1. Dosage de l'activité antimicrobienne dans le surnageant brut .....	66
II.1.2. Dosage de l'activité antimicrobienne après extraction des biomolécules .....	67

II.2. Activités biologiques à partir des bactéries lactiques .....	67
II.2.1 La méthode d'antagonisme différé .....	67
II.2.2 La méthode des dilutions (AWDA) .....	68
III. Purification et caractérisation des biomolécules .....	68
III.1. A partir de souches de <i>Streptomyces</i> .....	68
III.1.1. Purification .....	68
III.1.2. Caractérisation chimique des biomolécules .....	70
III.2. A partir de la souche de <i>Lactobacillus plantarum</i> TN635 .....	74
III.2.1. Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium .....	74
III.2.2. Purification sur membrane cutoff (10 kDa) .....	74
III.2.3. Gel filtration sur colonne de Séphadex G-25 .....	74
III.2.4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	75
III.2.5. Effet des différents traitements sur l'activité bactériocine .....	75
III.2.6. Electrophorèse en gel polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	76
III.2.7. Mode d'inhibition .....	77
III.2.8. Détermination de la masse de BacTN635 .....	77
IV. Techniques d'extraction et de manipulation de l'ADN .....	77
IV. 1. Extraction de l'ADN plasmidique à partir d' <i>E. coli</i> .....	77
IV. 1. 1. Les mini préparations (Birnboim et Doly "1979" modifiée) .....	77
IV. 1. 2. Les maxi préparations (lyse alcaline) .....	78
IV. 2. Extraction de l'ADN génomique à partir des souches de <i>Streptomyces</i> .....	78
IV.3. Extraction de l'ADN génomique de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> sp. TN635 .....	79
IV.4. Quantification de l'ADN .....	80
IV.4.1. Méthode spectrophotométrique .....	80
IV.4.2. Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique) .....	80
IV. 5. Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction .....	80
IV.6. Déphosphorylation de l'ADN .....	81
IV.7. Ligation de l'ADN .....	81
IV.8. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	81
IV.9. Purification de l'ADN .....	81
IV.10. Séquençage de l'ADN .....	82
IV.11. Analyse des Séquences nucléotidiques .....	82
IV.12. Amplification par PCR .....	83
V. Transformation d' <i>E. coli</i> .....	83
VI. Identification et classification des souches de <i>Streptomyces</i> .....	84
VI.1. Critères Morphologiques .....	84
VI.2. Analyse des constituants de la paroi .....	84
VI. 2.1. Obtention de la biomasse mycélienne .....	84

VI. 2.2. Analyse des acides aminés pariétaux.....	84
VI. 2.3. Analyse des sucres cellulaires.....	85
VI. 2.4. Analyse des phospholipides membranaires.....	86
VI. 2.5. Analyse des acides gras cellulaires.....	86
VI. 3. Etudes physiologiques.....	87
VI. 3. 1. Production de pigments mélanoides.....	87
VI. 3. 2. Production de nitrate réductase.....	87
VI. 3. 3. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone.....	87
VI. 3. 4. Dégradation de divers autres composés organiques.....	88
VI. 3. 5. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques.....	88
RESULTATS ET DISCUSSION.....	90
A. CARACTERISTIQUES TAXONOMIQUES DES SOUCHES TN17 ET FR10.....	91
I. Rappel des résultats antérieurs.....	91
II. Etudes morphologiques des souches TN17 et Fr10.....	92
III. Etudes chimiotoxonomiques.....	94
III. 1. Analyse des acides aminés et des sucres pariétaux.....	95
III. 2. Analyse des lipides membranaires.....	96
III. 2. 1. Les phospholipides.....	96
III. 2. 2. Les acides gras.....	97
IV. Arbres phylogéniques des souches de <i>Streptomyces</i> TN17 et Fr10.....	99
V. Etudes Physiologiques.....	102
V. 1. La souche <i>Streptomyces</i> TN17 et les trois souches de <i>Streptomyces</i> apparentées.....	102
V. 2. La souches <i>Streptomyces</i> Fr10 et les deux souches de <i>Streptomyces</i> apparentées.....	106
B.OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION CHIMIQUE DES BIOMOLECULES DE LA SOUCHE DE <i>Streptomyces lilaceus</i> sp. TN17. PURIFICATION DES BIOMOLECULES DE LA SOUCHE DE <i>Streptomyces microflavus</i> sp. Fr10.....	
I. Optimisation des conditions de production des biomolécules de la souche de <i>Streptomyces lilaceus</i> sp. TN 17.....	113
I. 1. Sources de carbone.....	113
I. 2. Eléments chimiques.....	115
II. Extraction, purification et caractérisation chimique des biomolécules de la souche de <i>Streptomyces lilaceus</i> sp. TN 17.....	116
II.1. Extraction.....	116
II. 2. Purification.....	117
II. 2. 1. Fraction I (FI).....	119
II. 2. 2. Fractions II et III (FII et FIII).....	119
II. 3. Caractérisation chimique de M1, M2 et M3.....	120
II. 3. 1. Molécule M1.....	120



II. 3. 2. Molécule M2.....	129
II. 3. 3. Molécule M3.....	136
II. 4. Activités biologiques des biomolécules M1, M2 et M3.....	144
II. 4. 1. La biomolécule M1 .....	145
II. 4. 2. La biomolécule M2 .....	145
II. 4. 3. La biomolécule M3 .....	146
III. Extraction et purification des biomolécules de la souche de <i>S. microflavus</i> sp. Fr10 .....	147
III. 1. Extraction .....	147
III. 2. Purification .....	148
C. SELECTION ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE <i>Lactobacillus plantarum</i> sp. TN635. ETUDE DES CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES ET PURIFICATION DE LA BACTERIOCINE BACTN635.....	156
I. Sélection des bactéries lactiques productrices de bactériocines .....	157
II. Identification de l'isolat TN635 .....	160
III. Température optimale et cinétique de production de la biomolécule (bactériocine) .....	163
IV. Effets des différents traitements sur l'activité antimicrobienne de la souche TN635 .....	164
IV. 1. Effet de la catalase, des enzymes protéolytiques, de la lipase et de l' $\alpha$ -amylase .....	164
IV. 2. Effet des surfactants et des solvants organiques .....	164
IV. 3. Effet de la température .....	165
IV. 4. Effet du pH.....	166
V. Purification de BacTN635.....	167
VI. Détermination de la masse de BacTN635.....	169
VII. Mode d'action de BacTN635.....	172
CONCLUSION GENERALE .....	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	181

---

## AUTHOR QUERIES

---

**Journal id: GNPL\_A\_398794**

**Corresponding author: Lotfi Mellouli**

**Title: Purification and structure elucidation of three naturally bioactive molecules from the new terrestrial Streptomyces sp. TN17 strain**

Dear Author

Please address all the numbered queries on this page which are clearly identified on the proof for your convenience.

Thank you for your cooperation

Query number	Query
1	Please provide article title and the page range for all the journal references.
2	Please provide complete reference details for Lebrihi et al. (2008).
3	Acknowledgement section – Please specify Mr/Ms.

---

## Purification and structure elucidation of three naturally bioactive molecules from the new terrestrial *Streptomyces* sp. TN17 strain

Slim Smaoui<sup>a</sup>, Lotfi Mellouli<sup>a\*</sup>, Ahmed Lebrihi<sup>b</sup>, Yannick Coppel<sup>c</sup>,  
Lilia Fourati Ben Fguira<sup>a</sup> and Florence Mathieu<sup>b</sup>

5 <sup>a</sup>Laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes (LEMP), Centre de  
Biotechnologie de Sfax (CBS), Route de Sidi Mansour Km 6, B.P. '1177', 3018 Sfax,  
Tunisie; <sup>b</sup>Département Bioprocédés & Systèmes Microbiens, Université de Toulouse,  
Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS). INP-ENSAT, 1 Av,  
10 de l'Agrobiopôle, BP 32607, 31326 Castanet-Tolosan, France; <sup>c</sup>Laboratoire de Chimie de  
Coordination UPR8241 (CNRS) 205 route de Narbonne, Université de Toulouse, 31 077  
Toulouse Cedex 4, France

(Received 21 January 2009; final version received 10 April 2009)

15 Thirty litres of fermentation broth was extracted from the newly isolated  
*Streptomyces* sp. strain TN17 and various separation and purification  
steps led to the isolation of three pure bioactive compounds (1–3).  
Compound 1: Cyclo (L-Leu-L-Arg), a diketopiperazine 'DKP' derivative;  
2: di-(2-ethylhexyl) phthalate, a phthalate derivative and 3: Cyclo  
20 1-[2-(cyclopentanecarbonyl-3-phenyl-propionyl)]-pyrrolidine-2-carboxylic  
acid (1-carbamoyl-propyl)-amide, a cyclic tetrapeptide derivative. The  
chemical structure of these three active compounds was established on the  
basis of spectroscopic studies MS and NMR and by comparing with data  
from the literature. According to our biological studies, we showed in this  
work that the pure compounds (1–3) possess antibacterial and antifungal  
activities.

25 **Keywords:** *Streptomyces* sp. TN17; purification; chemical structure; cyclo  
(L-Leu-L-Arg); phthalate derivative; cyclic tetrapeptide

### 1. Introduction

30 Increase in the frequency of multi-resistant pathogenic bacteria created an urgent  
demand in the pharmaceutical industry for more rational approaches and strategies  
to screen new antibiotics. Currently available bioactive molecules can be classified  
into different ways based on the bacterial spectrum, the type of activity (bactericidal  
or bacteriostatic) and the chemical structure. Using the chemical structure  
classification, several classes of antibiotics can be distinguished:  $\beta$ -lactams chemically  
35 characterised by a  $\beta$ -lactam ring; chloramphenicol, a nitro benzene derivative of  
dichloroacetic acid; macrolides, macrocyclic lactones divided in two main subgroups:  
polyene macrolide and non-polyenic macrolide antibiotics; glycopeptides, they  
consist of glycosylated cyclic or polycyclic nonribosomal peptides; polyethers, which

---

\*Corresponding author. Email: lotfi.mallouli@cbs.rnrt.tn

contain a number of cyclic ether and ketal units and have a carboxylic acid group; aminoglycosides, which characteristically contain amino sugars; tetracyclines, characterised as containing a polyhydronaphthacene nucleus; cyclic tetrapeptides family; diketopiperazine derivatives 'DKP' (piperazine 2,5-diones, 2,5-dioxopiperazines or cyclodipeptides); phthalate derivatives; etc.

It has been well established that microorganisms are an unlimited source of natural products, many of which have potential therapeutic applications. Filamentous soil bacteria belonging to the genus *Streptomyces* are widely recognised as industrially important microorganisms because of their ability to produce many kinds of secondary metabolites including antibiotics and bioactive compounds valued in human and veterinary medicine and agriculture (Williams et al., 1983). These bacteria produce about 75% of commercially and medically useful antibiotics, and approximately 60% of antibiotics, which have been developed for agricultural use were isolated from *Streptomyces* species (Miyadoh, 1993; Tanaka & Mura, 1993). This genus of bacteria represents at least 90% of actinomycetes isolated from soil (Anderson & Wellington, 2001). Active molecules of *Streptomyces* species are generally extracellular and their isolation in highest purity from the complex fermentation broth needs the application of a combination of various separation steps such as solvent extraction, chemical precipitation, ion exchange chromatography, HPLC purification, etc.

From Tunisian soil we have isolated a new actinomycete strain called *Streptomyces* sp. TN17 producing diverse biological activities (data not shown). The present article describes the extraction, the purification (using different chromatographic techniques) and the structure elucidation of three bioactive molecules from a liquid culture broth of this strain. The biological activity of these pure compounds is addressed as well.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Structure elucidation of the active compounds

#### 2.1.1. Cyclo (*L*-Leu-*L*-Arg) (**1**)

Compound **1** was obtained as a yellowish UV-absorbing solid. In DMSO, the  $^{13}\text{C}$  and HSQC spectra showed 11 carbon signals. From the  $^{13}\text{C}$  data, it was possible to discern two carbonyl groups ( $\delta_{\text{c}}$  170.8 and 167.0), three  $\text{sp}^3$ -hybridised carbons bearing an electronegative heteroatom ( $\delta_{\text{c}}$  59.0, 53.1 and 45.3), four  $\text{sp}^3$ -hybridised carbon ( $\delta_{\text{c}}$  38.3, 27.9, 24.6 and 22.9) and two methyl groups ( $\delta_{\text{c}}$  23.3 and 22.4). The 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  experiments permitted to assign two fragments to leucine and arginine. The presence of a NH proton ( $\delta_{\text{H}}$  7.96) and observed HMBC and NOE correlations enabled to identify compound **1** as a (*L*-Leu-*L*-Arg) dipeptide. Based on these data, two possible structures were suggested for this compound. The first one is a linear structure where the corresponding molecular weight (MW) will be 287, and the second one is a cyclic structure where the MW will be 269 (Figure 1a and b). To distinguish between these two situations, we have determined the mass of compound **1** using the LC/MS technique. Obtained result,  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 268.5$ , shows that the corresponding MW is 269. Consequently, we can deduce that compound **1** possesses a cyclic structure (Figure 1b) and the corresponding molecular formula is  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2\text{N}_5$ .

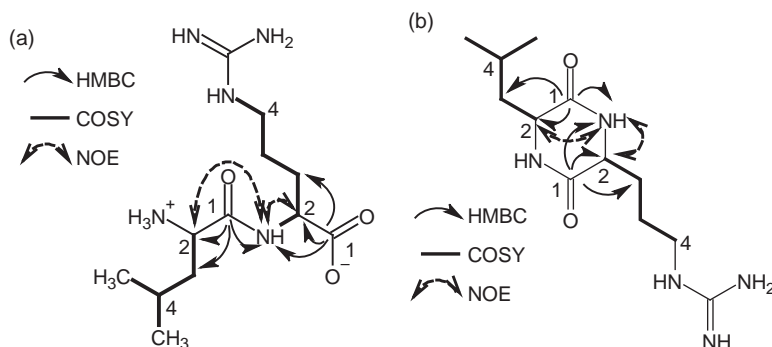


Figure 1. HMBC, COSY and NOE correlations of the two proposed structures (a and b) of compound **1**.

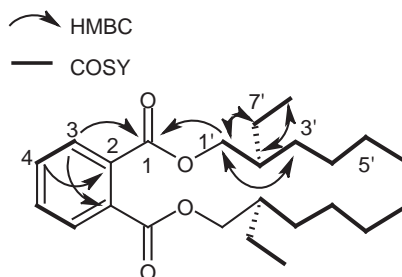


Figure 2. HMBC and COSY correlations of compound **2**.

### 2.1.2. *Di-(2-ethylhexyl) phthalate (2)*

Compound **2** was obtained as a white coloured solid. In  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , the  $^{13}\text{C}$  and HSQC spectra showed 12 carbon signals. From the  $^{13}\text{C}$  data, it was possible to discern one carbonyl group ( $\delta_c$  162.5), three  $\text{sp}^2$ -hybridised carbons ( $\delta_c$  132.5, 130.9 and 128.7), one  $\text{sp}^3$ -hybridised carbon bearing an electronegative heteroatom ( $\delta_c$  68.0), five  $\text{sp}^3$ -hybridised carbons ( $\delta_c$  35.8–23.8) and two methyl groups ( $\delta_c$  13.8 and 10.7). The  $^1\text{H}$  NMR spectrum showed a characteristic AA'BB' system at 7.74 and 7.59 ppm ( $J_{AA'}=0.7$  Hz,  $J_{AB}=J_{A'B'}=J_{BB'}=7.8$  Hz and  $J_{AB'}=J_{A'B}=1.1$  Hz obtained from simulation). These data established a compound that has a di *ortho*-substituted aromatic ring. Based on the revealed spectral data and search in AntiBase, compound **2** was identified as di-(2-ethylhexyl) phthalate (Figure 2). The corresponding molecular formula is  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$  with a MW of 390.

### 2.1.3. *Cyclo 1-[2-(cyclopentanecarbonyl-3-phenyl-propionyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid (1-carbamoyl-propyl)-amide (3)*

Compound **3** was obtained as a white coloured solid. In  $\text{CD}_3\text{OD}$ , the  $^{13}\text{C}$  and HSQC spectra showed 12 carbon signals. From the  $^{13}\text{C}$  data, it was possible to discern two carbonyl groups ( $\delta_c$  169.5 and 165.5), four  $\text{sp}^2$ -hybridised carbons ( $\delta_c$  from 137.7 to 126.8), three  $\text{sp}^3$ -hybridised carbons bearing an electronegative heteroatom ( $\delta_c$  58.9, 56.2 and 45.0) and three  $\text{sp}^3$ -hybridised carbons ( $\delta_c$  35.8, 28.2 and 22.4).

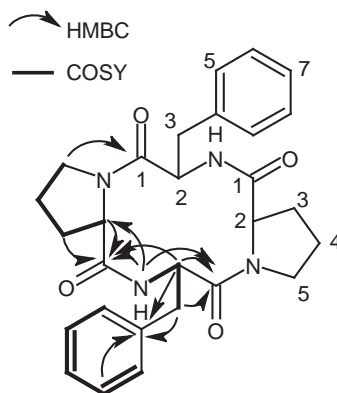


Figure 3. HMBC and COSY correlations of compound 3.

The 2D  $^1\text{H}-^1\text{H}$  and  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  experiments permitted to assign two fragments to proline and phenylalanine. The HMBC correlations from the  $\alpha$ -protons and proline  $\text{CH}_2$ -5 protons to the respective amide carbonyls established the cyclic tetrapeptide. The structure of compound 3 was determined to be 1-[2-(cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid (1-carbamoyl-propyl)-amide (Figure 3). The corresponding molecular formula is  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}_4$  with a MW of 488.

## 2.2. Biological activities of the three characterised compounds

The new isolated *Streptomyces* sp. strain TN17 produced simultaneously three active compounds belonging to three different structure types.

The first active compound (**1**) is the cyclo (L-Leu-L-Arg), a diketopiperazine (DKP) derivative. DKP derivatives, produced naturally by many organisms and microorganisms, display a very wide diversity of structures and biological functions, making them useful chemical entities for the discovery and development of new drugs. Useful biological properties have already been demonstrated for some of them, such as antibacterial, fungicidal, herbicidal, antiviral, immunosuppressor, antitumour activities, etc. (Magyar, Zhang, Abdi, Kohn, & Widger, 1999). Several DKP derivatives have been purified and characterised especially from *Streptomyces* species (Ben Ameer-Mehdi, Mellouli, Chabchoub, Fotso, & Bejar, 2004; Ben Ameer-Mehdi, Sioud, Fourati Ben Fguira, Bejar, & Mellouli, 2006; Rhee, 2002). Concerning compound **1**, it has been previously described as a natural product from *Streptomyces* species (Tatsuta, Tsuchiya, Umezawa, Naganawa, & Hamao, 1972) or obtained by chemical synthesis (Sasaki et al., 1982). According to our antimicrobial activities studies, we have observed that compound **1** possesses antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as antifungal activities (Table 1).

The second active compound produced by the *Streptomyces* sp. TN17 is the di-(2-ethylhexyl) phthalate (**2**). Phthalate compounds are petrochemicals used as plasticisers or solvents in a variety of industrial products. Nevertheless, many phthalate derivatives have been isolated from terrestrial and marine organisms including plants (Lee, Kim, Lim, & Kim, 2000), marine algae (Chen, 2004), fungal

Table 1. Antimicrobial activities of compounds 1–3.

Test organism	Diameter of inhibition zones (mm)		
	1	2	3
<i>M. luteus</i> LB 14110	20	17	19
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	14	12	15
<i>E. coli</i> ATCC 8739	11	ND	ND
<i>Fusarium</i> sp.	21	14	17

Note: A total of 50 µg per platelet, diameter of inhibition zones in mm. ND: activity not detected. For each pure active compound and indicator microorganism, the experiment was carried out simultaneously three times in the same conditions. In each case, all obtained diameters of inhibition zones were quite similar and the reported inhibition zones (mm) are the average of the three experiments.

(Amade, Mallea, & Bouaicha, 1994) and bacterial culture broths, especially those belonging to the genus *Streptomyces*. Compound 2 has been already described from *Streptomyces bangladeshiensis* (Al-Bari, Abu Sayeed, Sazedur Rahman, & Ashik Mossadik, 2006). Other phthalate derivatives have been isolated from *Streptomyces* species, such as the dibutyl phthalate (El-Naggar, 1997; Lee, 2000; Roy, Laskar, & Sen, 2006). Phthalate derivatives which possess several antimicrobial activities are also effective compounds against demodicidosis (Yuan, Guo, Qin, Deng, & Huang, 2001), as well as endocrine disruptors with estrogenic activity (Marchetti et al., 2002) and drug channelling agents (Makhija & Vavia, 2003). Our antimicrobial studies show that compound 2 possesses antibacterial activities against Gram-positive bacteria and fungi (Table 1).

The third active compound (3), produced by the studied TN17 strain is the cyclo 1-[2-(cyclopentanecarbonyl-3-phenyl-propionyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid (1-carbamoyl-propyl)-amide, a cyclic tetrapeptide derivative. Cyclic tetrapeptides are a class of natural products that have been shown to possess broad-ranging biological activities and good pharmacokinetic properties (Horton et al., 2008). Several groups of cyclic tetrapeptides have been described, such as rhodopeptides isolated from *Rhodococcus* species having antifungal activities (Chiba, Agematu, Dobashi, & Yoshioka, 1999), cyclic tetrapeptides group of protein synthesis inhibitors described from *Streptomyces* genus (Brandi et al., 2006), apicidin tetrapeptides group acting as antitumour agents that can induce cell cycle arrest and apoptosis in various cancer cells (Okada et al., 2006). Compound 3 has been recently isolated from the *Streptomyces barakatei* J2 and a patent for the use of this active molecule in plants treatment has been deposed (Lebrihi, Errakhi, & Barakate, 2008). According to our microbiological tests, compound 3 shows inhibitory activities against Gram-positive bacteria and fungi (Table 1).

### 3. Experimental

An NMR sample was prepared by dissolving the pure compounds (1–3) in 600 µL of DMSO, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CD<sub>3</sub>OD, respectively. 1D and 2D <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR experiments were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with

a 5 mm triple resonance inverse Z-gradient probe (TBI  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ , BB) or a Bruker Avance 600 spectrometer equipped with a 5 mm triple resonance inverse (TCI  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) Z-gradient cryoprobe. All chemical shifts for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  are relative to TMS using  $^1\text{H}$  (residual) or  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of the solvent as a secondary standard. The temperature was set at 298K. All the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  signals were assigned on the basis of chemical shifts, spin-spin coupling constants, splitting patterns and signal intensities, and by using  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY45,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC experiments.

The LC/MS analysis of compound **1** was performed using an LC/MSD Trap XCT – Electrospray (Agilent Technologies), equipped with an HPLC Agilent 100 DAD detector (C18 column Zorbax 300 2.1  $\times$  150 mm).  $[\text{M}-\text{H}]^+$  of **1** is 268.5, which involves a corresponding MW of 269.

### 3.1. Microorganisms

The *Streptomyces* sp. TN17 strain was isolated and selected as a producer of potent antimicrobial activities. Bacterial strains: *Micrococcus luteus* LB 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 8739 were used as indicator microorganisms for the antibacterial activity essays. Antifungal activity was determined against the filamentous fungus, *Fusarium* sp.

### 3.2. Culture conditions and biological assays of antimicrobial activities

Indicator microorganisms were grown overnight in LB medium at 30°C for *M. luteus* LB14110 (Gram-positive bacteria) and at 37°C for *S. aureus* ATCC 6538 (Gram-positive bacteria) and *E. coli* ATCC 8739 (Gram-negative bacteria), then diluted 1:100 in LB medium and incubated for 5 h under constant agitation of 200 rpm at the appropriate temperature. *Fusarium* sp. was grown in potato dextrose agar (PDA) for 7 days at 30°C. Spores were collected in sterile distilled water and then adjusted to a spore density of approximately  $10^4$  spores  $\text{L}^{-1}$ . Antimicrobial activities were determined by the agar diffusion test: a paper disk (8 mm  $\varnothing$ ) was impregnated with 50  $\mu\text{L}$  of the corresponding sample and then laid on the surface of an agar plate containing 3 mL of top agar inseeded by 40  $\mu\text{L}$  of a 5-h-old culture of the corresponding microorganism. For antifungal activity against the *Fusarium* sp., 100  $\mu\text{L}$  of spores suspension were added to the 3 mL of top agar. After 2 h at 4°C, plates containing *M. luteus* LB 14110 and *Fusarium* sp. were incubated at 30°C and those inoculated with *S. aureus* ATCC 6538 and *E. coli* ATCC8739 were incubated overnight at 37°C. The antimicrobial activities of the three pure compounds (**1**–**3**) were determined under the same conditions mentioned above. The quantity used for each pure active compound was 50  $\mu\text{g}$  per disk. Plates were examined for evidence of antimicrobial activities represented by a zone of inhibition of growth of the corresponding indicator microorganisms around the paper disk.

### 3.3. Extraction and purification of active compounds

Spores at  $10^7 \text{L}^{-1}$  of *Streptomyces* strain TN17 were used to inoculate 1000 mL Erlenmeyer flasks with four indents, containing 200 mL of TSB (Tryptic Soy Broth)



medium at  $30\text{ gL}^{-1}$  supplemented with 1% (w/v) of glucose and potassium phosphate at  $1\text{ mmolL}^{-1}$ . After incubation at  $30^\circ\text{C}$  for 24 h in an orbital incubator with shaking at 200 rpm, this pre-culture was used to inoculate (5% v/v) a total volume of 30 L culture medium having the same composition of the pre-culture. The shaker culture broth was harvested after 3 days to separate mycelium and supernatant. The resulting supernatant was extracted two times by ethyl acetate (v/v). The obtained organic phases were evaporated to dryness under vacuum, to give a brown crude extract (2.8 g) which was dissolved in 5 mL of dichloromethane–methanol (DCM/90% MeOH/10%) and then subjected to a column chromatography on Sephadex LH-20 using a dichloromethane–methanol (DCM/90% MeOH/10%) giving seven fractions, which were reduced to three fractions (FI–FIII) by monitoring of TLC.

### 3.3.1. Fraction FI

The biologically active fraction FI was then subjected to a series of chromatographic systems: a column chromatography on silica gel eluted with a gradient of 100%DCM–0%MeOH to 0%DCM–100%MeOH. An active sub-fraction was obtained at 85%DCM–15%MeOH. This sub-fraction was then fractionated by HPLC (waters: controller 600, pump 600, dual  $\lambda$  absorption detector 2487, Linear Recorder); column C18 ( $250 \times 7$ ) 8 mm UP ODS). Elution was at a flow rate of  $1\text{ mL min}^{-1}$  with a linear gradient of two solutions A (water) and B (acetonitrile) from 100% buffer A to 50% buffer A and 50% buffer B over the first 35 min, followed by a linear gradient to 100% buffer B from 35 to 45 min. Detection was carried out by using a wavelength of 280 nm. Different well-developed peaks having a retention time between 5 min and 45 min were collected separately, concentrated and then tested for the inhibitory activity against the used indicator microorganisms. Only the compound corresponding to the peak having a retention time of 39 min (**1**) possesses biological activities.

Compound (**1**): Cyclo(L-Leu-L-Arg).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$  7.96 (1H, br s, Arg-NH),  $\delta$  4.19 (1H, dd,  $J = 8.1, 8.0$  Hz, Arg-H2),  $\delta$  4.01 (1H, dd,  $J = 6.9, 5.9$  Hz, Leu-H2),  $\delta$  3.41 (1H, m, Arg-H5),  $\delta$  3.28 (1H, m, Arg-H5),  $\delta$  2.13 (1H, m, Arg-H3),  $\delta$  1.92 (1H, m, Arg-H3),  $\delta$  1.90 (2H, m, Leu-H4),  $\delta$  1.79 (2H, m, Arg-H4),  $\delta$  1.77 (1H, m, Leu-H3),  $\delta$  1.37 (1H, m, Leu-H3),  $\delta$  0.88 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, Leu-H5),  $\delta$  0.87 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, Leu-H5');  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150MHz)  $\delta$  170.8 (C, Arg-C1),  $\delta$  167.0 (C, Leu-C1),  $\delta$  59.0 (CH, Arg-C2),  $\delta$  53.1 (CH, Leu-C2),  $\delta$  45.3 (CH<sub>2</sub>, Arg-C5),  $\delta$  38.3 (CH<sub>2</sub>, Leu-C3),  $\delta$  27.9 (CH<sub>2</sub>, Arg-C3),  $\delta$  24.6 (CH, Leu-C4),  $\delta$  23.3 (CH<sub>3</sub>, Leu-C5),  $\delta$  22.9 (CH<sub>2</sub>, Arg-C4) and  $\delta$  22.4 (CH<sub>3</sub>, Leu-C5').

### 3.3.2. Fractions FII and FIII

These two active fractions were subjected separately to two other purification steps: preparative thin-layer chromatography (PTLC) and HPLC fractionation, using the conditions similar to those for compound **1** to obtain the two pure active compounds (**2** and **3**) having retention times of 11.2 and 23.5 min, respectively.

Compound (**2**): Di-(2-ethylhexyl) phthalate.  $^1\text{H}$  NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz)  $\delta$  7.74 (1H, m, H3),  $\delta$  7.59 (1H, m, H4),  $\delta$  4.25 (1H, dd,  $J = 10.8, 5.6$  Hz, H1'),

8 S. Smaoui et al.

$\delta$  4.21 (1H, dd,  $J=10.8, 6.0$  Hz, H1'),  $\delta$  1.71 (1H, m, H2'),  $\delta$  1.46 (2H, m, H7'),  $\delta$  1.40 (2H, m, H3'),  $\delta$  1.36 (4H, m, H4', H5'),  $\delta$  0.96 (3H, t,  $J=7.3$  Hz, H8'),  $\delta$  0.94 (3H, t,  $J=7.0$  Hz, H6');  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 125 MHz)  $\delta$  162.5 (C, C1),  $\delta$  132.5 (C, C2),  $\delta$  130.9 (CH, C4),  $\delta$  128.7 (CH, C3),  $\delta$  68.0 ( $\text{CH}_2$ , C1'),  $\delta$  38.8 (CH, C2'),  $\delta$  30.4 ( $\text{CH}_2$ , C3'),  $\delta$  28.9 ( $\text{CH}_2$ , C4'),  $\delta$  23.8 ( $\text{CH}_2$ , C7'),  $\delta$  23.0 ( $\text{CH}_2$ , C5'),  $\delta$  13.8 ( $\text{CH}_3$ , C6') and  $\delta$  10.7 ( $\text{CH}_3$ , C8').

Compound (3): Cyclo 1-[2-(cyclopentanecarbonyl-3-phenyl-propionyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid (1-carbamoyl-propyl)-amide.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  7.98 (1H, br s, Phe-NH),  $\delta$  7.27 (4H, m, Phe-H5, Phe-H6),  $\delta$  7.20 (1H, m, Phe-H7),  $\delta$  4.36 (1H, t,  $J=5.1$  Hz, Phe-H2),  $\delta$  4.36 (1H, dd,  $J=9.0, 7.0$  Hz, Pro-H2),  $\delta$  3.40 (1H, m, Pro-H5), 3.28 (1H, m, Pro-H5),  $\delta$  3.08 (1H, dd,  $J=14.2, 5.1$  Hz, Phe-H3), 3.02 (1H, dd,  $J=14.2, 5.1$  Hz, Phe-H3), 2.01 (1H, m, Pro-H3), 1.73 (2H, m, Pro-H4), 1.43 (1H, m, Pro-H3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125MHz)  $\delta$  169.5 (C, Pro-C1),  $\delta$  165.5 (C, Phe-C1),  $\delta$  137.7 (C, Phe-C4),  $\delta$  130.2 (CH, Phe-C5),  $\delta$  128.4 (CH, Phe-C6),  $\delta$  126.8 (CH, Phe-C7),  $\delta$  58.9 (CH, Pro-C2),  $\delta$  56.2 (CH, Phe-C2),  $\delta$  45.0 ( $\text{CH}_2$ , Pro-C5),  $\delta$  35.8 ( $\text{CH}_2$ , Phe-C3),  $\delta$  28.2 ( $\text{CH}_2$ , Pro-C3) and  $\delta$  22.4 ( $\text{CH}_2$ , Pro-C4).

### Acknowledgements

This work was supported by the CMCU project No: 06/S 0901 'MELLOULI/AIGLE'. The authors are grateful to Mr H. Aouissaoui and Ms L. Jlail for the LC/MS determination and to Ms L. Elleuch and M.I. Karray-Rebai for generous help.

## 1

### References

- Al-Bari, M.A.A., Abu Sayeed, M., Sazedur Rahman, M., & Ashik Mossadik, M. (2006). *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1, 77.
- Amade, P., Mallea, M., & Bouaicha, N. (1994). *The Journal of Antibiotics*, 47, 201.
- Anderson, A.S., & Wellington, E.M.H. (2001). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 797.
- Ben Ameer-Mehdi, R., Mellouli, L., Chabchoub, F., Fotso, S., & Bejar, S. (2004). *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 510.
- Ben Ameer-Mehdi, R., Sioud, S., Fourati Ben Fguira, L., Bejar, S., & Mellouli, L. (2006). *Process Biochemistry*, 41, 1506.
- Brandi, L., Lazzarini, A., Cavaletti, L., Abbondi, M., Corti, E., Ciciliato, I., et al. (2006). *Biochemistry*, 45, 3692.
- Chen, C.Y. (2004). *Water Research*, 38, 1014.
- Chiba, H., Agematu, H., Dobashi, K., & Yoshioka, T. (1999). *The Journal of Antibiotics*, 52, 700.
- El-Naggar, M.Y.M. (1997). *Biomedical Letters*, 55, 125.
- Horton, D.A., Bourne, G.T., Coughlan, J., Kaiser, S.M., Jacobs, C.M., Jones, A., et al. (2008). *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6, 1386.
- Lee, D.S. (2000). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 271.
- Lebrihi, A., Errakhi, R., & Barakate, M. (2008). Patent deposited: INP/AGRONUTRITION, FR08 54053.
- Lee, K.H., Kim, J.H., Lim, D.S., & Kim, C.H. (2000). *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 593.

3

2

- 290 Magyar, A., Zhang, X., Abdi, F., Kohn, H., & Widger, W. (1999). *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 7316.
- Makhija, S.N., & Vavia, P.R. (2003). *Journal of Controlled Release*, 89, 5.
- Marchetti, L., Sabbieti, M.G., Menghi, M., Materazzi, S., Hurley, M.M., & Manghi, G. (2002). *Histology and Histopathology*, 17, 1061.
- Miyadoh, S. (1993). *Actinomycetologica*, 9, 100.
- 295 Okada, T., Tanaka, K., Nakatani, F., Sakimura, R., Matsunobu, T., Li, X., et al. (2006). *International journal of Cancer*, 118, 90.
- Rhee, K.H. (2002). *Journal of General and Applied Microbiology*, 48, 321.
- Roy, R.N., Laskar, S., & Sen, S.K. (2006). *Microbiological Research*, 161, 121.
- Sasaki, Y., Akutsu, Y., Matsui, M., Suzuki, K., Sakurada, S., Sato, T., et al. (1982). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 12, 4435.
- 300 Tanaka, Y.T., & Mura, S.O. (1993). *Annual Review of Microbiology*, 47, 57.
- Tatsuta, K., Tsuchiya, T., Umezawa, S., Naganawa, H., & Hamao, U. (1972). *The Journal of Antibiotics*, 25, 674.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wllington, E.M., Sneath, P.H., & Sacki, M.J. (1983). *Journal of General Microbiology*, 129, 1747.
- 305 Yuan, F.S., Guo, S.L., Qin, Z.X., Deng, S.H., & Huang, G.H. (2001). *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 9, 160.

## Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635

Slim Smaoui · Lobna Elleuch · Wacim Bejar · Ines Karray-Rebai · Imen Ayadi ·  
Bassem Jaouadi · Florence Mathieu · Hichem Chouayekh · Samir Bejar ·  
Lotfi Mellouli

Received: 18 August 2009 / Accepted: 11 October 2009

© Humana Press 2009

**Abstract** The aim of this study was to evaluate 54 lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from meat, fermented vegetables and dairy products for their capacity to produce antimicrobial activities against several bacteria and fungi. The strain designed TN635 has been selected for advanced studies. The supernatant culture of this strain inhibits the growth of all tested pathogenic including the four Gram-negative bacteria (*Salmonella enterica* ATCC43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189, *Hafnia* sp. and *Serratia* sp.) and the pathogenic fungus *Candida tropicalis* R2 CIP203. Based on the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of the strain TN635 (1,540 pb accession no FN252881) and the phylogenetic analysis, we propose the assignment of our new isolate bacterium as *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 strain. Its antimicrobial compound was determined as a proteinaceous substance, stable to heat and to treatment with surfactants and organic solvents. Highest antimicrobial activity was found between pH 3 and 11 with an optimum at pH=7. The BacTN635 was purified to homogeneity by a four-step protocol involving ammonium sulfate precipitation, centrifugal microconcentrators with a 10-kDa membrane cutoff, gel filtration Sephadex G-25, and C18 reverse-phase HPLC. SDS-PAGE analysis of the purified BacTN635, revealed a single band with an estimated molecular mass of approximately 4 kDa. The maximum bacteriocin production (5,000 AU/ml) was recorded after a 16-h incubation in Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium at 30°C. The mode of

---

S. Smaoui · L. Elleuch · W. Bejar · I. Karray-Rebai · I. Ayadi · B. Jaouadi · H. Chouayekh · S. Bejar ·  
L. Mellouli

Laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes (LEMP), Centre de Biotechnologie de Sfax  
(CBS), Route de Sidi Mansour Km 6, B.P. "1177", 3018 Sfax, Tunisia

F. Mathieu

Département « Bioprocédés & Systèmes Microbiens » INP-ENSAT, Université de Toulouse, Laboratoire  
de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), 1 Av, de l'Agrobiopôle, BP 32607, 31326 Castanet-  
Tolosan, France

L. Mellouli (✉)

Laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes, Centre de Biotechnologie de Sfax, B.P  
"1177", Route Sidi Mansour Km 6, 3018 Sfax, Tunisia  
e-mail: lotfi.mellouli@cbs.rnrt.tn

action of the partial purified BacTN635 was identified as bactericidal against *Listeria ivanovii* BUG 496 and as fungistatic against *C. tropicalis* R2 CIP203.

**Keywords** *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 · Identification · BacTN635 · Purification · Broad inhibitory spectrum

## Introduction

During the last two decades, with the misuse use of existing antibiotics in human and veterinary medicine and in agriculture, the effectiveness of currently available antibiotics is decreasing due to the increasing number of resistant pathogenic strains. This is presently an urgent focus of research and it becomes inevitable to discover new antimicrobial agents for combating such a problem. Numerous antibacterial agents are now being considered, such as bacteriophage [1], probiotic bacteria [2], antimicrobial peptides [3], and bacteriocins [4]. Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides with a narrower spectrum of antimicrobial activity than most antibiotics [5]. Their antimicrobial activity has been found more effective against closely related strains [6]. Actually, attention is turning to the potential application of bacteriocins in the protection of human health [7], in agriculture [8], and in food preservation [9]. Although bacteriocins are produced by many Gram-positive and Gram-negative bacteria, those produced by lactic acid bacteria (LAB) are of particular interest because they are known as “good bacteria” and can be used as natural preservatives in food industry [10]. During the last few years, a large number of new LAB bacteriocins have been identified and characterized. However, only few have been described to possess activities against Gram-negative bacteria, e.g., plantaricin 35d produced by *Lactobacillus plantarum* [11], bacteriocin ST34BR produced by *L. lactis* subsp. *Lactis* [12], bacteriocins ST26MS and ST28MS produced by *L. plantarum* [13] and bacteriocin AMA-K produced by *L. plantarum* AMA-K [14].

During our search program for bioactive compounds from LAB, a new bacterium called TN635 was selected. This paper describes the selection, identification, and phylogenetic determination of this bacterium. The purification and the characterization of a bacteriocin-like substance called BacTN635, from the supernatant culture of this new strain are also reported.

## Materials and Methods

### Bacterial Strains and Plasmids

The TN635 strain was selected as a producer of potent antimicrobial activities and was used as the source of chromosomal DNA to amplify the 16S rRNA gene. *E. coli* TOP10 (Invitrogen), F-*mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\phi$  80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 deoR recA1 araD139  $\Delta(ara-leu)$ 7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*, and *E. coli* DH5 $\alpha$  [15] were used as host strains. Bacterial strains: Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus* LB 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria ivanovii* BUG 496, *Enterococcus faecalis* JH 2-2 and *Enterococcus faecium* ENSAIA 631), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189, *Hafnia* sp. and *Serratia* sp.), and lactic acid bacteria: (*Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus sakei* 2525, *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20081, *Lactococcus lactis* ATCC*

11454 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 11603) were used as indicator microorganisms for the antibacterial activity assays. Antifungal activity was determined against the *Fusarium* sp. and *Candida tropicalis* R2 CIP203.

pIJ2925 [16] derivative of pUC18 and pCR-Blunt vector (Invitrogen) *Col* E1 origin (pUC-derived)  $\text{Kn}^{\text{R}}$  were used as the cloning vectors. pSS1, derivative of pCR-Blunt vector carrying a 1,540-bp DNA fragment corresponding to the whole 16S rRNA gene of the TN635 strain (this work).

### Culture Conditions

*E. coli* DH5 $\alpha$  was grown on Luria Bertani (LB) plates supplemented with ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) when appropriate [17]. Transformation of *E. coli* DH5 $\alpha$  with pIJ2925 derivatives was carried out according to Hanahan [15]. Growth and transformation of TOP10 *E. coli* strain with the pCR-Blunt vector derivative were carried out according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For determination of antibacterial activities, indicator microorganisms were grown overnight in LB medium in aerobic conditions at 30°C for *Lb. casei* DSM 20011, *Lb. sakei* 2525, *Lc. lactis* ATCC 11454, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DSM 11603, *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, *P. aeruginosa* ATCC 49189, and *M. luteus* LB 14110, in aerobic conditions at 37°C for *E. coli* ATCC 8739 and *S. aureus* ATCC 6538, in anaerobic conditions at 30°C for *E. faecalis* JH 2-2, *E. faecium* ENSAIA 631, *Hafnia* sp and *Serratia* sp, and in anaerobic conditions at 37°C for *Lb. delbrueckii* DSM 20081. For antifungal activities determination, *Fusarium* sp. was grown in potato dextrose agar (PDA) for 7 days at 30°C. Spores were collected in sterile distilled water and then concentrated to produce a suspension with approximately  $10^4$  spores/ml. *C. tropicalis* R2 CIP203 was grown in YP10 medium (10 g/l yeast extract, 10 g/l peptone, 100 g/l glucose, 15 ml of 2 g/l adenine solution) at 30°C for 24 h in an orbital incubator with shaking at 200 rpm. The TN635 strain was maintained as frozen stocks at -80°C in Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth containing 20% (v/v) glycerol. Before experimental use, the cultures were propagated twice in MRS medium at 30°C for 12 h and the transfer inoculum was 1% (v/v).

### DNA Isolation and Manipulation

Total DNA preparation from TN635 strain was carried out according to the method of Leenhouts et al. [18] with slight modifications as described by Lee et al. [19]. Small-scale plasmid preparations from *E. coli* were performed as described by Sambrook et al. [17]. Digestion with restriction endonucleases, separation of DNA fragments by agarose gels electrophoresis, dephosphorylation with alkaline calf intestinal phosphatase, ligation of DNA fragments, and transformation of *E. coli* were performed according to Sambrook et al. [17].

### PCR Amplification of the 16S rRNA Gene of TN635 Strain

PCR amplification of the 16S rRNA gene of TN635 strain was performed using two specific primers P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and P2: 5'-ATGGCTCAGGACGAACGCT-3'. Approximately 200 ng genomic template DNA was used with 150 pmol of each primer per 50  $\mu\text{l}$  reaction volume. Amplification was performed in an automated thermocycler (Perkin Elmer) using 1 U Pfu DNA polymerase (Stratagene) according to the following amplification profile: 94°C (3 min) followed by 40 cycles of denaturation at 94°C (30 s), annealing at 60°C (1 min), and extension at 72°C (3 min).

## DNA Sequencing and Analysis

Nucleotide sequence of the whole 16S rRNA gene of TN635 strain was determined on both strands by an automated 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) using specific primers. Homology search was performed using Blast Search algorithm. The nucleotide sequence of the whole 16S rRNA gene (1,540 pb) of TN635 strain has been assigned GenBank (EMBL) under accession number FN252881. Multiple sequence alignment was carried out using CLUSTAL W [20] at the European Bioinformatics Institute website (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Phylogenetic analyses were performed using programs from the PHYLIP package [21] and phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining (NJ) algorithm [22] using Kimura ten-parameter distance. The robustness of the inferred tree was evaluated by bootstrap (100 replications).

## Antimicrobial Activities Determination

The ability of TN635 strain to produce diffusible metabolites was tested by the agar well diffusion assay [23]. The diameters of the inhibition zones were measured. The bacteriocin samples to be spotted were serially diluted twofold, and the reciprocal of the highest inhibitory dilution was used to calculate the arbitrary activity units (AU) per milliliter. The un-inoculated media were also tested for inhibitory zones as a control.

## Effect of Different Treatments on the Antimicrobial Activity of the TN635 Strain

The indicator strains used in these experiments were: *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* JH 2-2 and *E. faecium* ENSAIA 631, and the pathogenic fungus *C. tropicalis* R2 CIP203. All determinations were carried out simultaneously three times under the same conditions. For each determination, control tests were realized without the corresponding treatment.

## Effect of Temperature and Stability at Different pH

Cultures of the TN635 strain in MRS broth under anaerobic condition were maintained at different temperatures (25, 30, 37, and 45°C). The growth was followed by measuring the optical density (OD) at 600 nm. Sensitivity to heat of antimicrobial compounds was investigated by treating the 16-h culture supernatant of the TN635 strain growing at 30°C in water bath at 45, 70, 85, and 100°C for 90 min and 2 h and by autoclaving (20 min at 121°C). In order to determine the sensitivity of the bacteriocin to pH, the supernatant of the TN635 strain culture (30°C, 16 h incubation) was adjusted to pH levels ranging from 1 to 14 (intervals of 1.0) with sterile 1 N HCl or 1 N NaOH and kept at 4°C for 6 h. The treated supernatants were adjusted to pH 7.0 and tested for their antimicrobial activities as previously described.

## Sensitivity to Different Enzymes and Surfactants

In order to determine the biological nature of the antimicrobial activity produced by the strain TN635, 1 ml of the cell-free supernatant was incubated for 3 h at 37°C in the presence of 1 mg/ml catalase (Boehringer). The untreated bacteriocin-containing cell-free supernatant served as control. Sensitivity to proteolytic, lipolytic and  $\alpha$ -amylase enzymes of antimicrobial compounds was investigated by the addition of Trypsin, pronase E (Sigma),

Proteinase K (Boehringer), lipase A (Sigma) and  $\alpha$ -amylase (Sigma) at final concentration of 1 mg/ml to the culture supernatants of the TN635 strain (30°C, 16 h). The samples were incubated for 2 h at 37°C and immediately after, the residual activity was determined as described above. The surfactants used were Tween 20, Tween 80, urea, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) which were added to the culture supernatants of the TN635 strain (30°C, 16 h) at a final concentration of 1% (v/v) and incubated at 30°C for 2 h. Surfactants at 1% in MRS broth were used as controls. All surfactants were prepared at 10% in water and filter-sterilized before use.

### Effect of Organic Solvents

The culture supernatants of the TN635 strain (30°C, 16 h) were mixed with various organic solvents (ethyl acetate, isopropanol and methanol) at a final concentration of 50% (v/v). After incubation for 1 h at room temperature, the organic solvent was evaporated in a vacuum concentrator and the residual antimicrobial activity was determined.

### Bacteriocin Purification, Molecular Weight Determination, and Zymogram Analysis

Strain TN635 was inoculated (1% v/v) into 900 ml (Duran bottles, containing 900 ml of MRS broth), and incubated without agitation at 30°C until early stationary phase (16 h) corresponding to maximum bacteriocin production. For bacteriocin purification, proteins of the crude supernatant fluid (CSF) were precipitated with 40, 60, and 80% saturated ammonium sulfate, gradually added by slow stirring during 4 h at 4°C. After centrifugation at 9,000×g for 30 min at 4°C, the precipitate was suspended in 10 ml of 20 mmol/l sodium phosphate buffer (pH 7.0) and desalted in centrifugal microconcentrators (Amicon, Inc.) with a 10-kDa membrane cutoff. The resulting solution (3.5 ml) was loaded on a column (70×1.5 cm) of gel filtration Sephadex G-25 equilibrated with 20 mmol/l sodium phosphate buffer (pH 7). Elution of proteins was performed with the same buffer at 30 ml/h; 140 fractions (F1–F140) with 5 ml each were eluted from the Sephadex G-25 column and collected automatically. These 140 fractions detected using absorption measurements at 280 nm were fractionated into six samples (S1–S6): S1 (F1–F40), S2 (F41–F70), S3 (F71–F76), S4 (F77–F81), S5 (F82–F93), and S6 (F94–F140). The antimicrobial activity of the different collected fractions was tested using *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, and *C. tropicalis* R2 CIP203 as an indicator strains. The active fraction was then applied to a second round of purification by a reverse-phase HPLC method using a C18 column (300×4.6 mm) at a flow rate of 0.5 ml/min. Bacteriocin was eluted from the column with two mobile phases: A (99.9% water, 0.1% trifluoroacetic acid “TFA”) and B (99.9% acetonitrile, 0.1% TFA); from 0 to 5 min (90% A, 10% B), from 5 to 30 min (50% A, 50% B), from 30 to 35 min (20% A, 80% B), from 35 to 50 min (10% A, 90% B) and from 50 to 60 min (90% A, 10% B). Proteins were monitored at 280 nm. The pooled biological active fraction obtained from HPLC elution was concentrated and stored at –20°C. The estimated molecular weight of the purified bacteriocin was determined by SDS-PAGE according to Laemmli [24] with 20% acrylamide gel. Protein concentration was measured using BSA as reference as described by Bradford [25]. The used protein marker is from BioLabs with a broad range of 2–212 kDa. To determine the apparent molecular mass of the bacteriocin, the gel was cut into two vertical parts after SDS-PAGE. The part of the gel containing the sample and the protein marker was stained with 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 (BioRad), while the remaining part, containing only the sample, was washed in 10 mmol/l phosphate buffer (pH 7) for 4 h, then



fixed and used for direct detection of antimicrobial activity by overlaying with LB soft agar containing 100 µl of a 5 h culture of *L. ivanovii* BUG 496.

### Mode of Action of BacTN635

For this realization, we have used two indicator microorganisms: *L. ivanovii* BUG 496 and *C. tropicalis* R2 CIP203. Partially-purified BacTN635 (the fraction obtained from gel filtration chromatography and freeze-dried) at 400 AU/ml, was added to 200 ml LB culture of *L. ivanovii* BUG 496 and 200 ml YP10 of *C. tropicalis* R2 CIP203 at in early exponential phase ( $10^7$  colony-forming units (CFU)/ml). The two indicator microorganisms growing in LB (*L. ivanovii* BUG 496) and YP10 (*C. tropicalis* R2 CIP203) in the absence of bacteriocin were used as controls. Changes in the turbidity of the cultures were recorded at an O.D. of the 600 nm and the number of CFU was determined by plating the samples on LB or YP10 agar.

## Results and Discussion

### Screening of LAB Strains Producing Bacteriocin

During previous works (data not shown), a collection of 54 LAB strains were isolated from several isolates (meat, fermented vegetables, and dairy products). We have tested these bacteria for their capacity to produce antimicrobial activities against the following indicator microorganisms: *Lb. casei* DSM 20011, *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, *Fusarium* sp., and *C. tropicalis* R2 CIP203. As shown in Table 1, different profiles of inhibition were observed. Nine strains (TN600, TN606, TN615, TN618, TN623, TN627, TN635, TN644, and TN653) were characterized by the broad-spectrum inhibition. These nine isolates were tested for their capacity to inhibit the growth of other microorganisms (Table 2). The largest spectrum of inhibition was showed by TN635 strain which inhibited all used indicator microorganisms. Moreover, the active molecule(s) of the TN635 strain presents the highest inhibitory effect against all tested microorganisms including the pathogenic Gram-positive bacteria (*L. ivanovii* BUG 496, *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* JH 2-2 and *E. faecium* ENSAIA 631), the four pathogenic Gram-negative bacteria (*S. enterica* ATCC43972, *P. aeruginosa* ATCC 49189, *Hafnia* sp. and *Serratia* sp.), and the pathogenic fungus *C. tropicalis* R2 CIP203. Since bacteriocins often have a narrow killing spectrum and inhibit only bacteria closely related to those from which they have been formed, bacteriocins from Gram-positive bacteria are generally not effective against Gram-negative bacteria and have no effect with yeasts and fungi [26, 27]. The search for new bacteriocins with a wider spectrum of activity which can be used in human health, agriculture, and the food industry is being studied by several research groups. According to its large inhibitory spectrum, our finding, BacTN635 of the new isolated TN635 strain, may be of applied interest as food preservation and/or in the protection of human health.

### Identification and Phylogenetic Analysis of TN635 Strain

Using the two specific primers: forward P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and reverse P2: 5'-ATGGCTCAGGACGAACGCT-3' and the TN635 strain genomic DNA as template, we have amplified by PCR a DNA fragment having an expected size of approximately 1,500 pb. After purification, this DNA fragment was cloned in the pGEM-T

**Table 1** Inhibitory spectrum (zone of inhibition/mm) of the isolated 54 LAB (TN600- TN653) against *Lb. casei* DSM 20011, *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, *Fusarium*.sp, and *C. tropicalis* R2 CIP203: *L* (*listeria*); *Lb* (*Lactobacillus*); *C* (*Candida*).

Isolates	Indicator microorganisms				
	<i>Lb. casei</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>S. enterica</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>C. tropicalis</i>
	DSM 20011	BUG 496	ATCC43972		R2 CIP203
TN600	6	12	22	14	8
TN601	–	7	–	–	–
TN602	–	–	–	–	–
TN603	8	–	–	–	6
TN604	–	–	–	8	8
TN605	10	16	7	7	–
TN606	7	18	16	16	9
TN607	6	5	–	–	–
TN608	8	8	8	–	–
TN609	9	–	7	8	–
TN610	–	13	15	–	–
TN611	–	–	–	–	–
TN612	–	–	–	–	–
TN613	9	17	10	–	8
TN614	–	6	7	8	15
TN615	7	6	18	19	5
TN616	8	–	–	16	–
TN617	–	–	–	18	–
TN618	8	14	16	18	9
TN619	8	7	–	10	–
TN620	7	16	–	–	–
TN621	6	–	–	20	–
TN622	–	7	5	–	6
TN623	7	20	18	17	19
TN624	8	8	7	7	–
TN625	7	6	17	–	–
TN626	–	–	–	–	–
TN627	8	9	12	14	10
TN628	–	–	6	16	–
TN629	7	–	–	6	–
TN630	9	9	–	6	6
TN631	–	18	17	9	–
TN632	–	8	8	–	–
TN633	9	–	–	–	7
TN634	6	–	7	7	–
TN635	9	22	21	23	21
TN636	9	6	–	7	–
TN637	8	7	–	15	–
TN638	7	–	7	16	–
TN639	–	7	7	18	7

**Table 1** (continued).

Isolates	Indicator microorganisms				
	<i>Lb. casei</i> DSM 20011	<i>L. ivanovii</i> BUG 496	<i>S. enterica</i> ATCC43972	<i>Fusarium sp.</i>	<i>C. tropicalis</i> R2 CIP203
TN640	7	7	8	6	–
TN641	–	16	17	–	15
TN642	6	–	–	16	–
TN643	–	6	7	17	6
TN644	7	16	6	22	6
TN645	6	7	8	–	–
TN646	–	–	–	18	7
TN647	7	–	6	8	–
TN648	8	8	–	18	–
TN649	–	–	8	16	6
TN650	–	16	–	17	17
TN651	6	–	7	7	6
TN652	–	8	–	12	7
TN653	7	16	17	18	8

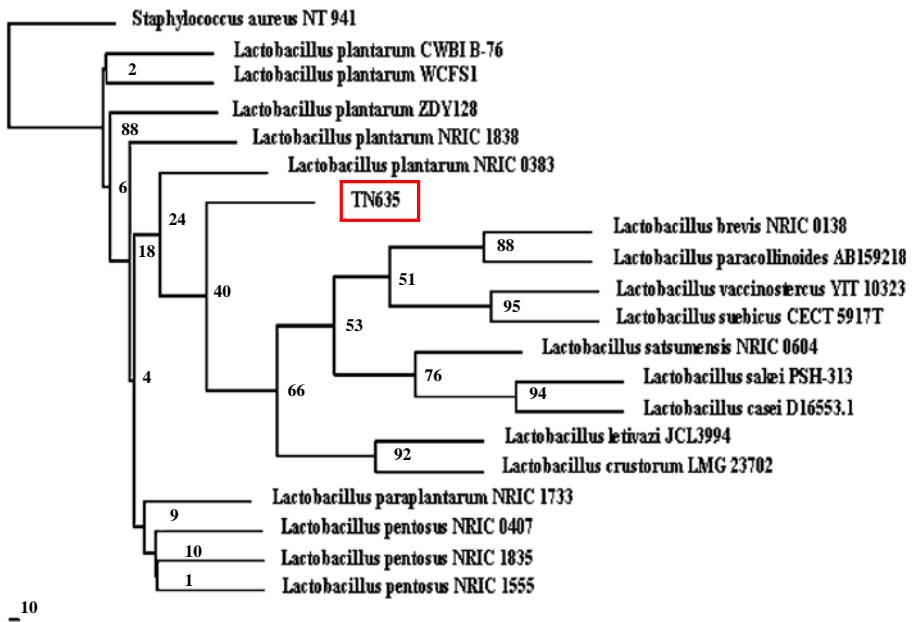
**Table 2** Inhibitory spectrum (zone of inhibition/mm) of TN600, TN606, TN615, TN618, TN623, TN627, TN635, TN 644 and TN653 strains against Gram-positive and Gram-negative bacteria, LAB and fungi: *L* (*listeria*); *Lb* (*Lactobacillus*); *Lc* (*Lactococcus*); *C* (*Candida*).

Indicator strains	TN600	TN606	TN615	TN618	TN623	TN627	TN635	TN644	TN653
Gram-positive bacteria									
<i>M. luteus</i> LB 14110	23	14	6	14	14	6	23	14	11
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	12	15	16	14	9	16	22	21	8
<i>L. ivanovii</i> BUG 496	12	18	6	16	20	9	22	16	16
<i>E. faecalis</i> JH 2-2	6	18	8	–	15	16	22	7	8
<i>E. faecium</i> ENSAIA 631	6	14	7	–	14	14	21	8	6
Gram-negative bacteria									
<i>E. coli</i> ATCC 8739	5	22	13	15	15	23	22	13	22
<i>S. enterica</i> ATCC43972	22	16	18	16	18	12	21	6	17
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 49189	22	16	6	9	14	9	22	8	9
<i>Hafnia sp.</i>	5	15	6	13	24	6	24	5	7
<i>Serratia sp.</i>	12	6	12	15	21	7	23	8	9
LAB									
<i>Lb. Casei</i> DSM 20011	6	7	7	8	7	8	9	7	7
<i>Lb. delbrueckii</i> DSM 20081	–	6	8	–	–	9	9	6	–
<i>Lb. Sakei</i> 2525	–	6	7	–	7	6	9	–	–
<i>Lc. lactis</i> ATCC 11454	–	–	6	5	6	7	9	–	9
<i>Lc. lactis cremoris</i> DSM 11603	–	–	5	7	7	9	8	–	8
Fungi									
<i>Fusarium sp.</i>	14	16	19	18	17	14	23	22	18
<i>C. tropicalis</i> R2 CIP203	8	9	5	9	19	10	21	6	8

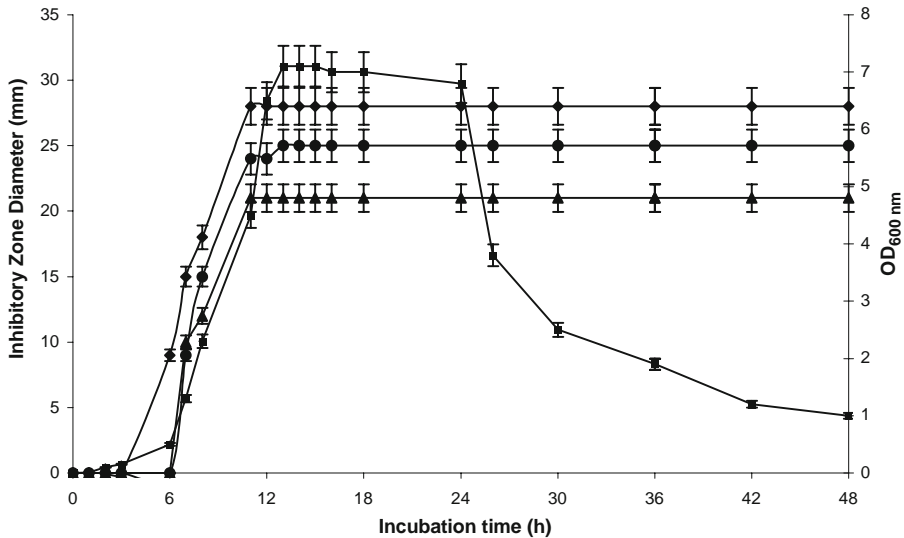
Easy vector, yielding the pSS1 plasmid. Total nucleotide sequence of 1,540 pb (accession number FN252881) of the whole 16S rRNA gene of strain TN635 was determined in both strands. The alignment of this sequence through matching with reported 16S rRNA gene sequences in gene bank shows high similarity (97–99%) to the *Lactobacillus* 16S rRNA genes. The organism most similar to the new isolate TN635 strain was *L. plantarum* NRIC 0383 (Fig. 1). Based on the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of the TN635 strain and the phylogenetic analysis, we propose the assignment of our new isolate bacterium as *L. plantarum* sp. TN635 strain.

### Growth and Bacteriocin Production

To test the effect of incubation temperature on cell growth and antimicrobial activity production, cultures of the *L. plantarum* sp. TN635 strain in MRS broth under anaerobic conditions were maintained at different temperatures (25, 30, 37, and 45°C). The growth was followed by measuring the OD at 600 nm and the antimicrobial activity was determined against the three indicator microorganisms: *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, and *C. tropicalis* R2 CIP203. Aliquots were withdrawn at 3 h time intervals. Obtained results show that the secretion of biological activity is correlated with biomass production. Highest growth and antimicrobial activity were obtained at 30°C (Fig. 2). We can deduce that the extracellularly antimicrobial activity was produced in the logarithmic growth phase and the production profile was a typical growth associated patten. The maximum antimicrobial activity was detected 16 h after incubation. This activity remains stable between 13 and 20 h and then gradually decreased.



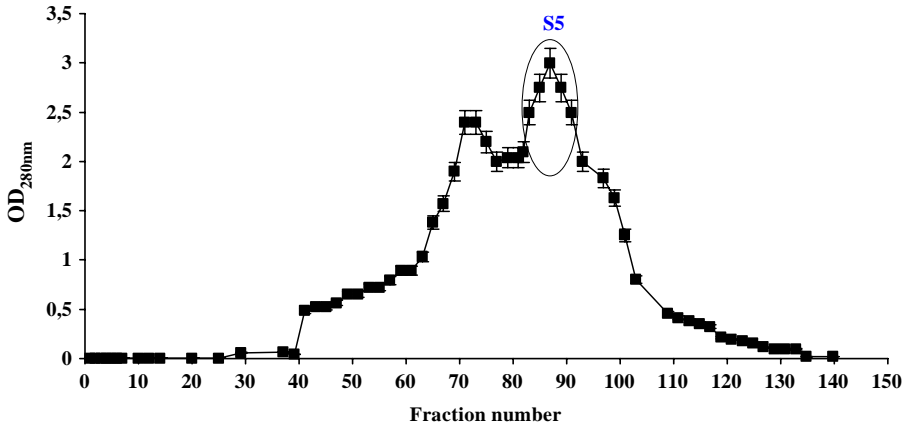
**Fig. 1** Phylogenetic trees derived from 16S rDNA sequence of *L. plantarum* sp. TN635 strain. All the sequences used here were from LAB type strains



**Fig. 2** BacTN635 production during growth of *L. plantarum* TN635 in MRS broth at 30°C. (filled square) Optical density at 600 nm; activities of BacTN635 against *C. tropicalis* R2 CIP203 (filled upright triangle); against *S. enterica* ATCC43972 (filled circle), and against *L. ivanovii* BUG 496 (filled diamond) were measured by diameter (mm) of zone of inhibition

### Effects of Enzymes, Heat, pH, Surfactants and Organic Solvents

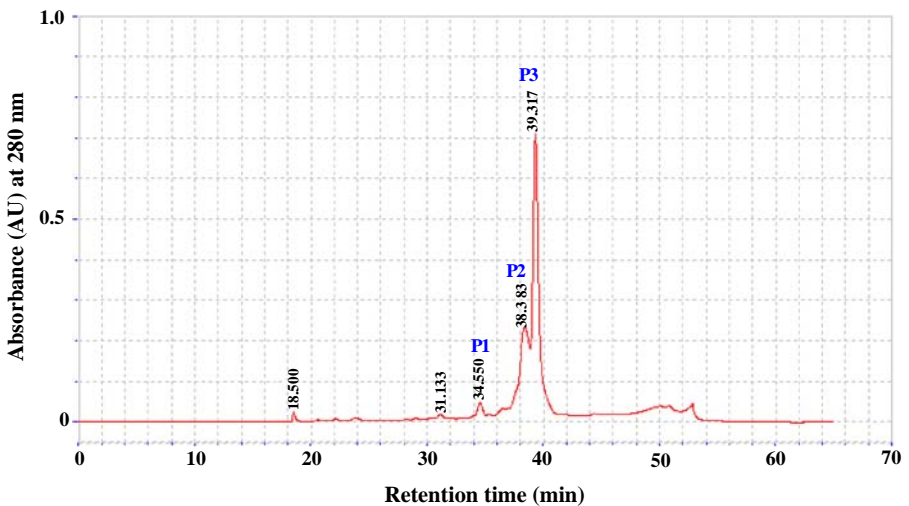
Enzymatic tests showed that the antimicrobial activity against the three tested indicator microorganisms, *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, and *C. tropicalis* R2 CIP203, of the supernatant culture of the *L. plantarum* sp. TN635 strain was not affected by the addition of catalase, indicating that the observed growth inhibition was not due to hydrogen peroxide production. In contrast, treatment with the proteolytic enzymes (Trypsin, pronase E, and Proteinase K) caused complete inactivation of the antimicrobial compounds, which therefore identified them as proteinaceous substances. The sensitivity of the inhibitory compounds to heat treatment showed that inhibitory activity was not significantly altered by boiling for 90 min showing that the antagonistic activity of the culture supernatant is heat-resistant. The activity of the sample was insensitive to lipase and  $\alpha$ -amylase, which eliminates the possibility that synthesized active compounds are included in the group of complex biologically active substances containing a lipid or carbohydrate component [28]. Concerning the sensitivity to pH, the supernatant culture of the *Lb. plantarum* sp. TN635 (30°C, 16 h incubation) was adjusted to pH levels ranging from 1 to 14 (intervals of 1.0). The obtained results show that bacteriocin activity was highest when the pH of the supernatant was between 3 and 11, with an optimum at pH 7. About 50% activity was maintained at pH 12 and was completely inactivated above pH 12. Exposure to surfactants caused about 15% inactivation of the antimicrobial activity for the SDS agent and about 40% for the other tested surfactants (Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Urea, EDTA, and PMSF). Concerning the treatment with organic solvents (ethyl acetate, methanol, and isopropanol), no significant alteration of the BacTN635 activity was observed.



**Fig. 3** Purification of BacTN635 by cation-exchange chromatography using Sephadex G-25 monitoring by absorbance at 280 nm (filled square)

#### Bacteriocin Purification and Molecular Weight

BacTN635 was purified to homogeneity from a cell-free culture supernatant of *Lb. plantarum* sp. TN635 strain by a four-step protocol. Maximum antimicrobial activity was obtained when the cell-free culture supernatant was precipitated with 80% ammonium sulfate. One hundred forty fractions (F1–F140) with 5 ml each were eluted from a Sephadex G-25 column. These 140 fractions detected using absorption measurements at 280 nm were fractioned into six samples (S1–S6). After concentration, the antagonistic activity of each sample was assayed using *L. ivanovii* BUG 496, *S. enterica* ATCC43972, and *C. tropicalis* R2 CIP203 as indicator microorganisms. Only sample S5 (F82–F93) possesses inhibitory activity against the three tested cells (Fig. 3). Sample S5 was then applied to another round of purification using the HPLC technique. Three well-defined



**Fig. 4** Elution profile of bacteriocin using HPLC reverse-phase chromatography on C18 column monitoring by absorbance at 280 nm

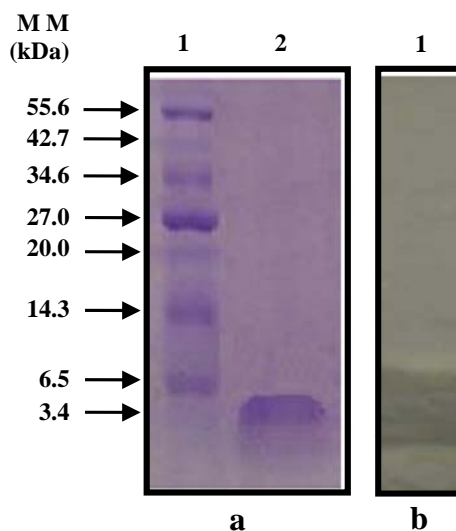
**Table 3** Purification of BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635 strain.

Step	Volume (ml)	Total activity (AU) <sup>a</sup>	Total protein (mg)	Specific activity (AU/mg)	Purification fold	Yield %
Culture supernatant	900	45×10 <sup>5</sup>	2,160	2,083	1	100
Ammonium sulfate precipitation	50	5.2×10 <sup>5</sup>	52.5	9,904	4.75	11.55
Microconcentrators	32	3.32×10 <sup>5</sup>	23.2	14,310	6.87	7.38
Gel filtration	3.5	2.25×10 <sup>5</sup>	1.54	146,104	70.14	5
HPLC	0.7	1.125×10 <sup>5</sup>	0.57	197,368	94.75	2.5

<sup>a</sup> Antibacterial activity (in arbitrary units [AU]) was assayed by agar well diffusion assay using *L. ivanovii* BUG 496 as an indicator strain

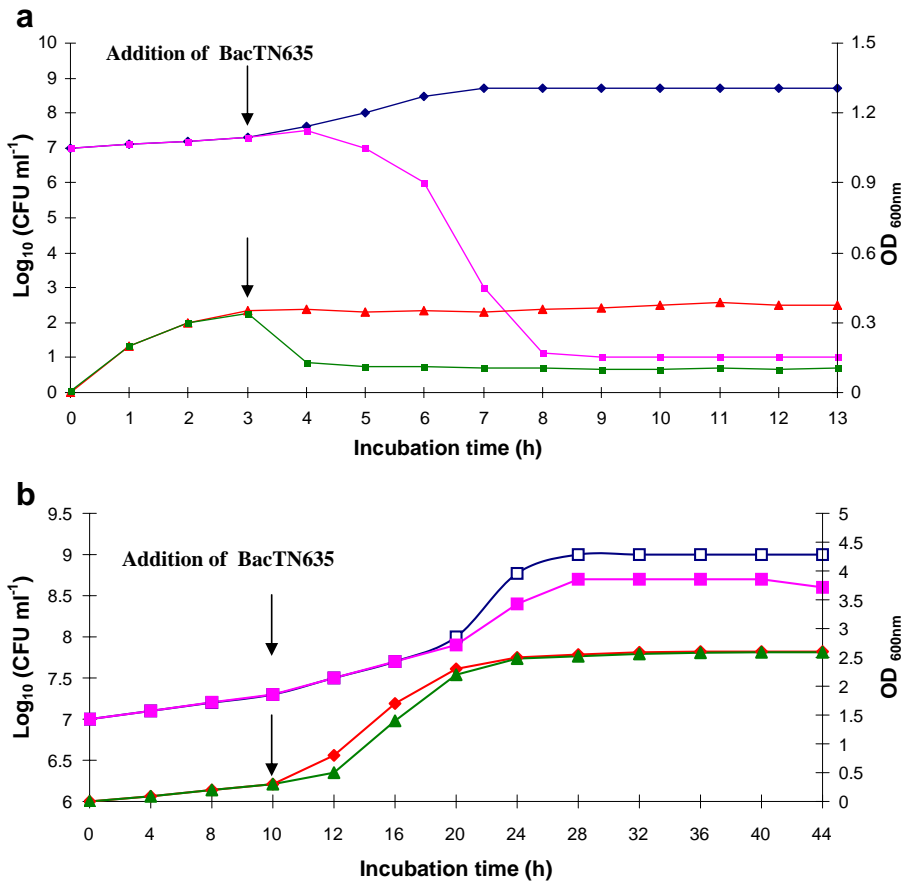
peaks (P1–P3) were obtained having, respectively, the following retention times: P1: 34.55 min, P2: 38.38 min, and P3: 39.31 min (Fig. 4). Only the fraction of the peak P3 possesses an antimicrobial activity against the three tested microorganisms mentioned above and no activity has been observed for the two other fractions. The yield, activity, and purification fold of the BacTN635 of the four various purification steps were summarized in Table 3. SDS-PAGE analysis of the purified BacTN635, revealed a single band with an estimated molecular mass of approximately 4 kDa indicating that this bacteriocin had been purified to homogeneity (Fig. 5a). Antibacterial activity determination against *L. ivanovii* BUG 496 strain, reveals a growth inhibitory zone at the same position than that visualized in the stained gel (Fig. 5b). During the last few years, a large number of new bacteriocins produced by LAB bacteria have been identified and characterized. However, a few bacteriocins produced by this species have been reported to be active against Gram-negative bacteria and particularly against fungi. Most of the described bacteriocins as antifungal agents from *Lactobacillus* are organic compounds or diketopiperazine derivatives with low molecular mass, lower than 1 kDa [29]. Too rare are the bacteriocins described from LAB bacteria with a molecular mass higher than 1 kDa and having antifungal activities [30].

**Fig. 5** Electrophoretic and zymogram analyses of the purified BacTN635. Coomassie brilliant blue R-250 stained SDS-PAGE gel. Lane 1 molecular mass markers; lane 2 purified BacTN635 (a). Portion of the renaturated SDS-PAGE, overlaid with LB soft agar containing *L. ivanovii* BUG 496 (b)



## Mode of Action of the BacTN635

The addition of partial purified BacTN635 (the fraction obtained from gel filtration chromatography and freeze-dried) at 400 AU/ml, to cells of *L. ivanovii* BUG 496 (3 h old) and *C. tropicalis* R2 CIP203 (10 h old) in their early logarithmic growth phase, resulted in a rapid decrease in the number of *L. ivanovii* BUG 496 viable cells (from  $10^7$  CFU/ml to less than 10 CFU/ml) over a period of 5 h (Fig. 6a). The optical density readings of this indicator microorganism remained constant since the addition of the BacTN635 (Fig. 6a). These results indicate that the studied bacteriocin exhibits bactericidal effect against *L. ivanovii* BUG 496 strain. Concerning the *C. tropicalis* R2 CIP203, the optical density readings were very similar in presence and absence of BacTN635 (Fig. 6b). However, we notice an increase of the number of viable cells grown in the absence of the bacteriocin at



**Fig. 6** The effect of BacTN635 on the growth of *L. ivanovii* BUG 496. Optical density at 600 nm in absence (▲) and in presence (■) of BacTN635. Viable cell counts (CFU/ml) in absence (♦) and in presence (■) of BacTN635 (a). The effect of BacTN635 on the growth of *C. tropicalis* R2 CIP203. Optical density at 600 nm in absence (♦) and in presence (▲) of BacTN635. Viable cell counts (CFU/ml) in absence (□) and in presence (■) of BacTN635 (b)



40 h of growth (Fig. 6b). These data indicate that BacTN635 acts with a fungistatic effect against *C. tropicalis* R2 CIP203.

## Conclusions

A new LAB strain has been selected for its antimicrobial activity against pathogenic Gram-negative bacteria and fungi. Based on the analysis of the nucleotide sequence (1,540 pb) of the whole 16S rRNA gene (accession no: FN252881) and the phylogenetic study, we propose the assignment of our new isolate bacterium as *Lb. plantarum* sp. TN635 strain. The antimicrobial compound of this strain was determined as a proteinaceous substance. The maximum bacteriocin-like substance (BacTN635) production (5,000 AU/ml) was recorded after a 16-h incubation in MRS medium at 30°C. BacTN635 was stable to heat and to treatment with surfactants and organic solvents. Highest antimicrobial activity was found between pH 3 and 11 with an optimum at pH=7. The purified BacTN635, revealed a single band with an estimated molecular mass of approximately 4 kDa. BacTN635 produced by *Lb. plantarum* sp. TN635 strain, may possess potential practical applications, since it was able to inhibit important Gram-negative pathogenic bacteria such as (*S. enterica* ATCC43972, *P. aeruginosa* ATCC 49189, *Hafnia* sp., and *Serratia* sp.) and pathogenic fungi such as *C. tropicalis* R2 CIP203. *S. enterica* is an important cause of human salmonellosis and food-poisoning associated with consumption of contaminated chicken eggs and poultry products [31]. *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen of humans. It causes urinary tract infections, respiratory system infections, gastrointestinal infections, and a variety of systemic infections, particularly in patients with severe burns and in cancer and AIDS patients who are immunosuppressed [32]. *Serratia* and *Hafnia* sp. are usually found in the intestinal tract. These pathogenic bacteria cause a wide variety of infections primarily pneumonia, wound, and urinary tract infections. Moreover, it should be noted that the number of patients with fungal infections has been rising in recent years. In addition to the species *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, *C. tropicalis* is one of the significant pathogenic yeasts in humans belonging to the genus *Candida* [33].

**Acknowledgments** This work was supported by the Tunisian government (Contract Program CBS-LEMP) and the CMCU project (2006-2008) No 06/S 0901 "MELLOULI/AIGLE". We are grateful to Dr. M. Ferchichi for providing the indicator bacteria.

## References

1. Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., & Troitsky, N. (1998). *Journal of Infection*, 36, 5–15.
2. Macfarlane, G. T., & Cummings, J. H. (2002). *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15, 501–506.
3. Papagianni, M. (2003). *Biotechnology Advances*, 21, 465–499.
4. Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., & Hill, C. (2002). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 165–18.
5. Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. (1998). *Jawetz, Melnick, and Adelberg's medical microbiology* (p. 269). Upper Saddle River, New Jersey, USA: Appleton & Lange.
6. Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123–138.
7. Nawaz, S. K., Riaz, S., Riaz, S., & Hasnain, S. (2009). *African. J. Biotechnol.*, 8, 365–368.
8. Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A., & Nesme, X. (2009). *Letters in Applied Microbiology*, 48, 253–260.

9. Diop, M. B., Dubois-Dauphin, R., Tine, E., Ngom, A., Destain, J., & Thonart, P. (2007). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, *11*, 275–281.
10. Paul, R. R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). *International Journal of Food Microbiology*, *79*, 3–16.
11. Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., & Manicardi, G. (2001). *International Journal of Food Microbiology*, *64*, 193–198.
12. Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2004). *Journal of Basic Microbiology*, *44*, 305–316.
13. Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2005). *Enzyme and Microbial Technology*, *36*, 318–326.
14. Todorov, S. D., Nyati, H., Meincken, M., & Dicks, L. M. T. (2007). *Food Control*, *18*, 656–664.
15. Hanahan, D. (1983). *Journal of Molecular Biology*, *16*, 557–580.
16. Janssen, G. R., & Bibb, M. J. (1993). *Gene*, *124*, 133–134.
17. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Leenhouts, K. J., Kok, J., & Venema, G. (1990). *Applied and Environmental Microbiology*, *56*, 2726–2735.
19. Lee, C. M., Siew, C. C., Abdullah, N., & Ho, Y. W. (2008). *FEMS Microbiology Letters*, *287*, 136–141.
20. Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). *Nucleic Acids Research*, *22*, 4673–4680.
21. Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package, version 3.2. *Cladistics*, *5*, 164–166.
22. Saitou, N., & Nei, M. (1987). *Molecular Biology and Evolution*, *4*, 406–425.
23. Tagg, J. R., & McGiven, A. R. (1971). *Applied Microbiology*, *21*, 943.
24. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, *227*, 680–685.
25. Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
26. Karunasagar, I., Krohne, G., & Goebel, W. (1993). *Infection and Immunity*, *61*, 162–169.
27. Atanassova, V., Meindl, A., & Ring, C. (2001). *International Journal of Food Microbiology*, *68*, 105–113.
28. Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis IN'T Veld, J. H. J., & Ten Brink, B. (1998). *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 568–576.
29. Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobetti, M. (2000). *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 4084–4090.
30. Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarroun, D., Chobert, J. M., Dousset, X., Ivanova, I., et al. (2003). *International Journal of Food Microbiology*, *8*, 63–73.
31. Erich, L., & Martin, J. (1997). Antimicrobial food additives, characteristics, uses, effects (2nd Ed.). Translated by S.F. Laichena Berlin: Springer.
32. Wiblin, R. T. (1997). Nosocomial pneumonia. In R. P. Wenzel (Ed.), *Prevention and control of nosocomial infections* (3rd ed., pp. 807–819). Baltimore: Williams and Wilkins.
33. Kobayashi, H., Matsuda, K., Ikeda, T., Suzuki, M., Takahashi, S., Suzuki, A., et al. (1994). *Infection and Immunity*, *62*, 615–622.

### **Résumé :**

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux études taxonomiques des deux souches TN17 et Fr10 qui sont deux nouvelles espèces du genre *Streptomyces* dont nous avons proposé les nomenclatures suivantes : *Streptomyces lilaceus* sp. TN17 et *Streptomyces microflavus* sp. Fr10.

A partir de la souche *Streptomyces lilaceus* sp. TN17, trois molécules ont été purifiées et identifiées par le biais de plusieurs techniques spectroscopiques, il s'agit d'un dérivé de DKP (L-Leu, L-Arg), un dérivé de phtalate le di-(2-éthylhexyl) phtalate et un tétrapeptide cyclique : le 1 - [2 -(cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl) - pyrrolidine-2-carboxylique (1-carbamoyl-propyl)-amide. Ces trois molécules présentent des activités antibactériennes et antifongiques.

Suite au criblage des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines de la collection de notre laboratoire et leurs caractérisations, nous avons identifié une nouvelle souche de *Lactobacillus* nommée *Lactobacillus plantarum* sp.TN635 qui produit une bactériocine « BacTN635 » de 3,8 KDa. Cette dernière a été purifiée à homogénéité, elle possède un spectre d'action très large contre les bactéries à Gram+, à Gram- et contre les champignons filamenteux et unicellulaires. BacTN635 a un effet bactéricide contre *Listeria ivanovii* BUG 496 et fongistatique contre *Candida tropicalis* R2 CIP203.

**Mots clés :** *Streptomyces*, taxonomie, structure chimique, *Lactobacillus plantarum* sp TN635, bactéricocine, purification.

### **Abstract :**

In This Thesis, we are interested in taxonomic studies of two strains TN17 and Fr10 which are two new species of the genus *Streptomyces*, and we have proposed the following names: *Streptomyces lilaceus* sp. TN17 and *Streptomyces microflavus* sp. Fr10.

From *Streptomyces lilaceus* strain sp. TN17, three molecules have been purified and identified by means of several spectroscopic techniques, it is a derivative of DKP (L-Leu, L-Arg), a derivative of phthalate di-(2-ethylhexyl) phthalate and cyclic peptide 1 - [2 -(cyclopentanecarbonyl-3-phenylpropionyl) - pyrrolidine-2-carboxylic acid (1-carbamoyl-propyl)-amide. All three molecules exhibit antibacterial and antifungal activities.

A novel strain of lactic acid bacteria was isolated and characterized from a collection of our laboratory. It's identified as a new strain of *Lactobacillus*, named *Lactobacillus plantarum* sp.TN635 producing a new bacteriocin "BacTN635" of 3.8 kDa, purified to homogeneity and spectrum with a very broad action against Gram + and Gram-, filamentous and unicellular fungi. BacTN635 has a bactericidal effect against *Listeria ivanovii* BUG 496 and fungistatic against *Candida tropicalis* R2 CIP203.

**Key-words:** *Streptomyces*, taxonomy, chemical structure, *Lactobacillus plantarum* sp TN635, bacteriocin, purification