

## EFFET DE MILIEUX DE CULTURE SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE CHLORAMPHENICOL CHEZ DEUX SOUCHES DE *Saccharothrix* sp. PAL 54 ET PAL 42 ISOLEES D'UN SOL DE LA PALMERAIE DE GHARDAÏA

BOUALI Hadjer<sup>1</sup>, HAMZA Karima<sup>1</sup>, BOURAS Noureddine<sup>1,2\*</sup>, AOUICHE Adel<sup>1</sup>, MEKLAT Atika<sup>1,3</sup>, MOKRANE Salim<sup>1</sup>, HAMZA Kahina<sup>4</sup> et SABAOU Nasseridine<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, 16050, Vieux-Kouba, Alger, Algérie

<sup>(2)</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, 47000 Ghardaïa, Algérie

<sup>(3)</sup>Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saâd Dahleb, Blida, Algérie

<sup>(4)</sup>Laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB), Ecole Normale Supérieure de Kouba, 16050, Vieux-Kouba, Alger, Algérie

E-mail: [noureddine\\_bouras@yahoo.fr](mailto:noureddine_bouras@yahoo.fr)

(Received 26 January 2017– Accepted 13 April 2017)

**Résumé.-** Le présent travail s'intéresse à deux souches de *Saccharothrix* sp. PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub> dans le but de les étudier et d'optimiser la production du chloramphénicol en recherchant les meilleurs milieux de culture qui favorisent aussi bien cette production que la croissance des deux souches d'actinobactéries. Tous les essais ont été effectués en double et chaque valeur représente la moyenne de deux essais. Les microorganismes-cibles choisis sont *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (bactérie à Gram positif, sensible aux antibiotiques) et *Klebsiella pneumoniae* E<sub>40</sub> (bactérie à Gram négatif, multi-résistante aux antibiotiques) pour les deux souches PAL<sub>42</sub> et PAL<sub>54</sub>, et pour les trois milieux de culture (deux milieux semi-synthétiques: MSS<sub>1</sub> et MSS<sub>2</sub>, et un milieu complexe: ISP<sub>2</sub>). D'après les résultats obtenus, le choix du milieu de culture s'est porté sur le milieu MSS<sub>1</sub>. Ce dernier s'est révélé favorable pour la production d'antibiotiques par les deux souches de *Saccharothrix*. Bien que cette production soit moins intense par rapport aux milieux MSS<sub>2</sub> et ISP<sub>2</sub>, la raison de ce choix est due principalement au fait qu'il est privilégié le milieu qui contient le moins d'extrait de levure tout en permettant une bonne croissance et une bonne activité.

**Mots clés:** *Saccharothrix*, milieu de culture, croissance, biomasse, antibiotique, chloramphénicol.

## EFFECT OF CULTURE MEDIA ON THE GROWTH AND PRODUCTION OF CHLORAMPHENICOL BY TWO STRAINS OF *Saccharothrix* sp. PAL 54 AND PAL 42 ISOLATED FROM THE SOIL OF GHARDAÏA PALM GROVE

**Abstrat.-** In this work we interested in two strains of *Saccharothrix* sp. PAL<sub>54</sub> and PAL<sub>42</sub> in order to study and optimize the production of chloramphenicol by looking for the best culture media that promote this production as well as the growth of the two strains of actinobacteria. All experiments were carried out in duplicate and each value represents the average of two values. The target microorganisms selected are *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Gram-positive bacteria, antibiotic-sensitive) and *Klebsiella pneumoniae* E<sub>40</sub> (Gram-negative bacteria, multi-resistant to antibiotics) which used with two strains PAL<sub>42</sub> and PAL<sub>54</sub>, and for three culture media (two semi-synthetic media: MSS<sub>1</sub> and MSS<sub>2</sub>, and a complex medium: ISP<sub>2</sub>). The best selected culture medium was MSS<sub>1</sub> medium. The latter has proved favorable for the production of antibiotics by the two *Saccharothrix* strains. Although the antibiotic production was lower in this medium compared to the MSS<sub>2</sub> and ISP<sub>2</sub> media, MSS<sub>1</sub> was selected due to the fact that we have favored the medium which contains the least yeast extract while allowing good growth and good activity.

**Keywords:** *Saccharothrix*, culture medium, growth, biomass, antibiotic, chloramphenicol.

## Introduction

Les actinobactéries sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, généralement saprophytes, hétérotrophes, aérobies et mésophiles. Ces microorganismes ubiquitaires sont rencontrés sur une grande variété de substrats naturels: sols, débris végétaux, sédiments marins, lacs, mers et océans, etc. [1].

Les actinobactéries constituent l'un des plus grands groupes de la population microbienne du sol. Ils sont capables de dégrader les résidus organiques récalcitrants telles que les ligno-celluloses et la chitine, et contribuent ainsi à la fertilisation des sols [1]. Grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinobactéries sont utilisés dans la lutte biologique pour la protection de certaines plantes contre les maladies fongiques et bactériennes [2].

Les actinobactéries sont utilisés dans de nombreux processus biotechnologiques pour la production d'enzymes, de facteurs de croissance, de substances probiotiques, anticholestérolémiques, antihistaminiques, anticancéreuses, etc. [3]. Cependant, les actinobactéries sont surtout réputés pour la production de nombreux antibiotiques, et près de 50% des molécules actives connues et d'origine microbienne, sont sécrétées par ce groupe de microorganismes [4]. De nos jours, la recherche de nouvelles molécules actives est une orientation que privilégient beaucoup de chercheurs. Ceci s'explique par la prolifération des souches pathogènes résistantes aux antibiotiques disponibles sur le marché mondial et l'apparition de nouvelles maladies dangereuses [5].

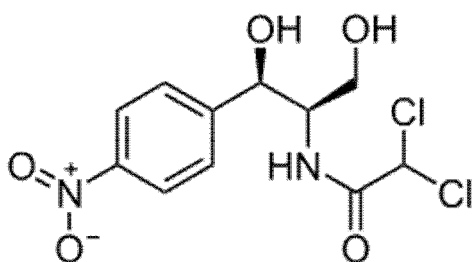
Des espèces ou souches appartenant à des genres peu fréquents ou rares (autres que *Streptomyces*) sont sélectionnées et étudiées, et ce, de manière à augmenter les chances de découverte de nouvelles molécules actives. Ainsi, de nombreuses stratégies visant à mettre au point des méthodes de sélection des genres rares, l'utilisation d'échantillons provenant des milieux extrêmes (comme les zones arides) ont conduit à la découverte de nouveaux genres et espèces et/ou de nouveaux antibiotiques [6], dont certains se sont montrés intéressants par leur forte action antimicrobienne [7].

L'une des pistes exploitées par les chercheurs consiste en l'exploration d'écosystèmes particuliers, souvent ignorés par le passé, avec une variété de nouvelles cibles [8]. Par conséquent, la recherche a été dirigée principalement sur les actinobactéries des sols sahariens, sols qui ont montré une grande diversité en genres et en espèces, y compris ceux qui sont parmi les plus rares au monde [9].

Parmi les actinobactéries rares, deux souches de *Saccharothrix* sp. nommées PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub>, ont été isolées à partir d'un sol saharien sur un milieu sélectif à base de chitine et de vitamines B [10]. Les études taxonomiques basées sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires ont montré que ces deux souches appartiendraient très probablement à une même espèce mais semblent se distinguer de celles existantes [10]. Les travaux menés ont montré qu'elles produisent toutes les deux du chloramphénicol, un antibactérien de la famille des phénicolés [11].

Le chloramphénicol (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, masse moléculaire de 323.14 g/mol) est une substance solide cristallisée, jaune pâle blanchâtre, inodore, très peu soluble dans l'eau (<2,5 g/l à 20°C). Sa structure est représentée sur la figure 1. Le chloramphénicol absorbe

sous UV à 213 et 273 nm [12].



**Figure 1.** Structure du chloramphénicol.

Le chloramphénicol a une structure relativement simple et fut le premier antibiotique à large spectre découvert. Largement utilisé en médecine humaine dans les années qui suivirent sa découverte en raison de la nature de son spectre et de son excellente diffusion dans l'organisme, cet antibiotique est actuellement réservé, compte-tenu des troubles hématologiques et des inductions de résistance qu'il peut provoquer, au traitement des infections du système nerveux central (méningites à *Haemophilus influenzae* des enfants), au traitement des abcès profonds provoqués par des germes anaérobies, et au traitement des salmonelloses en particulier de la fièvre typhoïde [13].

En médecine vétérinaire, son large spectre d'activité, son efficacité particulière sur les salmonelles, les rickettsia, les mycoplasma, les chlamydia, les pasteurelles et les coliformes, son coût modéré font du chloramphénicol un antibiotique très utilisé, comme en témoigne sa présence dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques [14,15].

Nous nous sommes intéressées aux deux souches de *Saccharothrix* sp. PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub> dans le but d'étudier et d'optimiser la production du chloramphénicol en recherchant les meilleurs milieux de culture qui favorisent aussi bien cette production que la croissance des deux souches d'actinobactéries.

## 1. - Matériel et Méthodes

### 1.1. - Souches d'actinobactéries

Les deux souches de *Saccharothrix* sp. (PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub>) ont été isolées à partir des échantillons de sols provenant de la palmeraie de Beni-Isguen (Mzab, Ghardaïa-Algérie). Les deux souches sont productrices de chloramphénicol [11].

### 1.2. - Souche de microorganismes-cibles

Les microorganismes-cibles utilisés sont les suivants: Une bactérie à Gram positif: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), et une bactérie à Gram négatif *Klebsiella pneumoniae* (E<sub>40</sub>). Elles sont conservées à 4°C sur milieu solide ISP<sub>2</sub>. Elles proviennent, respectivement, de la collection du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Alger (Algérie), et du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), Université Abderrahmane Mira de Béjaïa (Algérie). Les profils de résistance de ces bactéries vis-à-vis de plusieurs antibiotiques cliniquement utilisés ou non sont indiqués dans le tableau 1.

**Tableau I.-** Profils de résistance des bactéries-cibles utilisées [16,17]

Bactérie cible	Origine	Résistance à:	Sensibilité à:
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	ATCC	NEO.	C, CAR, CHL, ERY, GEN, K, RIF, SPI, SSS, VAN.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (E40)	Lait *	AMX, CAZ, CFP, CTX, FEP, GEN, PIP, TIC, TOB.	AMC, ATM, C, CXC, TCC.

**Légende:**

ATCC: *American Type Culture Collection*; \*: Source hospitalière.

AMC: Amoxicilline + clavulanate, ATM: Aztréonam, AMX: Amoxicilline, C: Chloramphénicol, CAR: Carbénicilline, CAZ: Ceftazidime, CFP: Cefpirome, CHL: Chlorotétracycline, CTX: Céfotaxime, CXC: Céfotaxime + Clavulanate, ERY: Erytromycine, FEP: Céfépime, GEN: Gentamicine, K: Kanamycine, NEO: Néomycine, PIP: Pipéracilline, RIF: Rifampicine, SPI: Spiramycine, SSS: Sulfamide, TCC: Ticarcilline + Clavulanate, TIC: Ticarcilline, TOB: Tobramycine, VAN: Vancomycine.

### 1.3. - Milieux de cultures

Trois milieux de culture (liquides) sont utilisés: deux milieux semi-synthétiques (MSS<sub>1</sub> et MSS<sub>2</sub>) contenant respectivement 2 g/l et 3 g/l d'extrait de levure, et un autre complexe, qui est l'ISP<sub>2</sub>. Ces trois milieux de culture contiennent le glucose (à 10 g/l pour MSS<sub>1</sub> et MSS<sub>2</sub>) ou (à 4 g/l pour l'ISP<sub>2</sub>).

Le milieu de culture MSS1 est composé de: D-glucose: 10 g, extrait de levure: 2 g, NaCl: 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,2 g, CaCO<sub>3</sub>: 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g, eau distillée q.s.p. 1 L; pH = 7,2 [6]. Le milieu MSS2 est composé de: D-glucose: 10 g, extrait de levure: 3 g, NaCl: 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,2 g, CaCO<sub>3</sub>: 2 g, eau distillée q.s.p. 1 L; pH = 7,2 [18]. L'ISP<sub>2</sub> (*International Streptomyces Project 2*) est composé de: D-glucose: 4 g, extrait de levure: 4 g, extrait de malt: 10 g, eau distillée q.s.p. 1 L; pH = 7,2 [19].

Les souches (PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub>) sont conservées à 4°C sur milieu ISP<sub>2</sub> [19] solide (contenant 18 g/l d'agar).

### 1.4. - Stérilisation des milieux de culture

La stérilisation des milieux de culture s'effectue à 120°C dans un autoclave. Les fioles Erlenmeyer de 500 ou de 250 ml et contenant respectivement 100 ou 50 ml de milieu, sont stérilisées pendant 20 min à 120°C (sous 1 bar).

### 1.5. - Conditions de fermentation

La cinétique de production des antibiotiques (par les deux souches) a été réalisée, et l'évolution de l'activité antibactérienne, du pH et du poids sec du mycélium sont suivis quotidiennement. Tous les essais ont été effectués en double et chaque valeur représente la moyenne de deux essais (± écarts-types).

#### 1.5.1. - Pré-culture

Des pré-cultures sont préparées à partir de cultures mûres des souches de *Saccharothrix* sp. (PAL<sub>54</sub> ou PAL<sub>42</sub>) âgées de 10 j et poussant sur milieu solide ISP<sub>2</sub>. La surface des colonies est raclée à partir d'une culture en boîte de Pétri avec une anse stérile pour récupérer les spores. Celles-ci sont inoculées dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu liquide ISP<sub>2</sub> pour chaque souche. L'incubation se fera

pendant 2 à 3 jours dans un agitateur (Shaker New Brunswick) à une température de 30°C et sous une agitation de 250 rpm. Parmi les pré-cultures obtenues, il est choisi celle qui contient le plus de biomasse pour servir à ensemercer 3 milieux de cultures différents (MSS<sub>1</sub>, MSS<sub>2</sub> et ISP<sub>2</sub>).

### 1.5.2. - Cinétique de croissance et de production du chloramphénicol en milieu liquide

La cinétique de croissance et de production des antibiotiques (par les deux souches de *Saccharothrix* sp. PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub>) a été réalisée dans le but de comparer les trois milieux de culture utilisés (MSS<sub>1</sub>, MSS<sub>2</sub> et ISP<sub>2</sub>), et de choisir le milieu de culture qui permet une bonne croissance et une production de l'activité antibactérienne (mais qui contient en même temps un minimum d'extrait de levure).

Des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant chacune 100 ml de milieu liquide (pH 7,2) sont ensemencées chacune avec 0,1 g ( $\pm$  0,02 g) d'actinobactérie contenu dans 5 ml de la pré-culture. Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 250 rpm dans un agitateur pendant une période de 9 jours. Cette durée correspond à la production maximale de substances actives produites par les deux souches de *Saccharothrix* (constatation faite lors d'études préliminaires).

Pendant les 9 jours d'incubation, 4 ml (2 ml en double) de chaque milieu de cultures sont prélevés à des intervalles de temps fixe (de 48 h) dans des conditions aseptiques, dans des tubes Eppendorf de 2 ml afin d'évaluer les variations de la biomasse, du pH et de l'activité antibactérienne vis-à-vis des deux microorganismes cibles.

### 1.5.3. -Mesure du pH

Les tubes Eppendorf contenant les filtrats de cultures sont centrifugés à 12000 rpm (Centrifuge 54 15 R) pendant 10 min. Les surnageants obtenus sont utilisés pour enregistrer, grâce à un pH mètre (HANNA instruments), les variations de pH au cours du temps.

### 1.5.4. -Estimation de la biomasse

L'évolution de la biomasse durant la fermentation est estimée selon la méthode de PFEFFERLE *et al.* [20] avec quelques modifications. Pour chaque échantillon, 4 ml de culture sont prélevés et mis dans 2 tubes Eppendorf (2 ml par tube) préalablement tarés. Les tubes sont ensuite centrifugés (comme cité précédemment). Le culot est lavé par centrifugation à deux reprises avec une solution d'HCl (0,35 N) qui dissout le CaCO<sub>3</sub> résiduel. Un dernier lavage est effectué à l'eau distillée. Par la suite, les tubes sont placés dans une étuve à 100°C durant 24 h, puis pesés (après refroidissement) pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare. Le poids sec ainsi déterminé est ensuite rapporté au litre de volume de fermentation (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture). Les pesées sont effectuées sur une balance analytique (KERN ABJ).

### 1.5.5. -Détermination de l'activité antimicrobienne globale des antibiotiques

Les tubes Eppendorf contenant les filtrats de cultures sont centrifugés à 12000 rpm pendant 10 min. Les surnageants sont récupérés et vont servir pour déterminer

l'activité antibactérienne par la méthode des puits.

Deux cent microlitres de filtrat de culture de l'actinobactérie sont prélevés quotidiennement à l'aide d'une micropipette dans des conditions stériles, puis déposés dans un puits de 10 mm de diamètre, sur milieu ISP<sub>2</sub> (en surfusion à 45°C, et contenant 12 g/l d'agar) afin de permettre une bonne diffusion de l'antibiotique préalablement ensemencé par le germe-cible (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Klebsiella pneumoniae* E<sub>40</sub>) et coulé dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Les boîtes sont gardées à 4°C durant 3 h de manière à inhiber momentanément la croissance des germes-cibles tout en permettant la diffusion des antibiotiques. Ensuite, les boîtes sont incubées pendant 24 h dans l'étuve (à 28°C); le diamètre des zones d'inhibition des germes est ensuite mesuré. L'activité est estimée par la mesure du diamètre de l'auréole d'inhibition du germe-cible autour des puits.

## 2. – Résultats

Dans le but de choisir les meilleures conditions de culture, il est choisi trois milieux de culture, et établis une cinétique de croissance, de pH et de production des antibiotiques de deux souches de *Saccharothrix* sp. (PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub>) durant 9 jours en milieu liquide agité (250 rpm, 30°C).

Tous les essais ont été effectués en double et chaque valeur représente la moyenne de deux essais. Les microorganismes-cibles choisis sont *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (bactérie à Gram positif, sensible aux antibiotiques) et *Klebsiella pneumoniae* E<sub>40</sub> (bactérie à Gram négatif, multi-résistante aux antibiotiques) pour les deux souches PAL<sub>42</sub> et PAL<sub>54</sub>, et pour les trois milieux de culture.

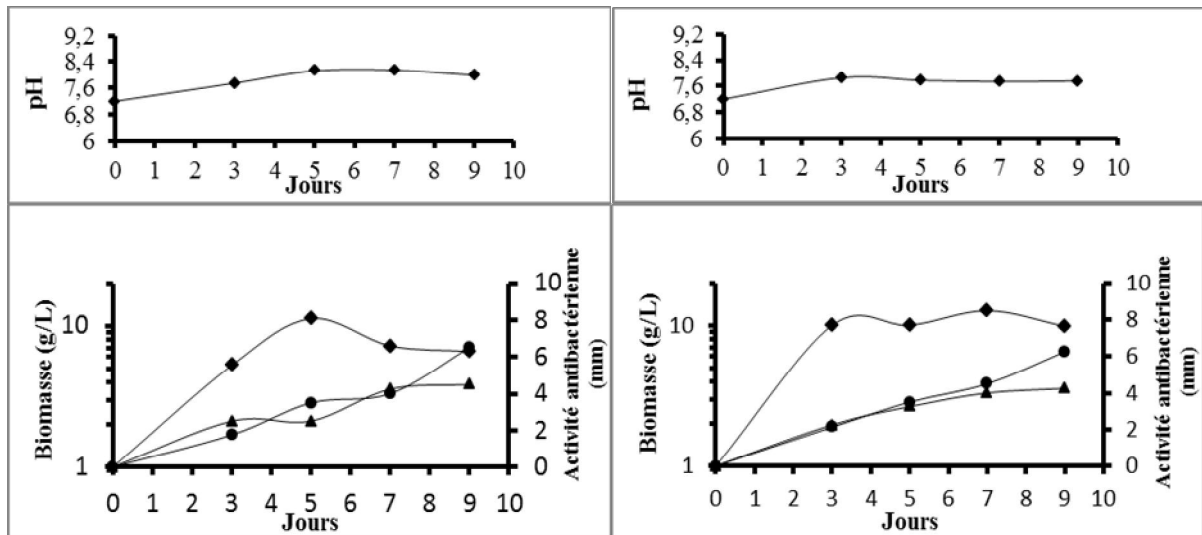
### 2.1.- Milieu MSS1

Le milieu MSS1 (milieu semi-synthétique avec 2 g/l d'extrait de levure) s'est révélé favorable pour la croissance de deux souches de *Saccharothrix*, ainsi que la production d'activité antibactérienne. Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de deux souches de *Saccharothrix* (PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub>) en milieu MSS1 sont illustrées sur la figure 2.

La courbe de croissance de la souche PAL<sub>54</sub> débute directement par une phase exponentielle d'une durée de 3 jours, puis une phase de ralentissement qui dure 2 jours (entre J<sub>3</sub> et J<sub>5</sub>), est observées. Au-delà du 5<sup>ème</sup> jour, il est noté la présence d'une phase de déclin qui persiste jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour (avec une légère stabilisation entre J<sub>8</sub> et J<sub>9</sub>). Au cours de la croissance, le pH augmente légèrement lors de la phase de croissance (jusqu'à 7,75), il continue à augmenter encore pour atteindre un maximum de 8,14 au 7<sup>ème</sup> jour lors de la phase de déclin. Au-delà du 7<sup>ème</sup> jour le pH commence à baisser. La production d'antibiotiques débute le 3<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et *K. pneumoniae*, soit, durant la phase exponentielle de croissance. Le maximum de production est noté lors de la phase de déclin selon le germe-cible.

La courbe de croissance de la souche PAL<sub>42</sub> débute directement par une phase exponentielle d'une durée de 3 jours (entre J<sub>0</sub> à J<sub>3</sub>). Une phase stationnaire est observée entre J<sub>3</sub> et J<sub>5</sub>, puis une seconde phase exponentielle est notée entre J<sub>5</sub> et J<sub>7</sub>, ceci suggère la présence d'un phénomène de diauxie, phénomène qui n'a pas été remarqué chez la souche PAL<sub>54</sub>. Une phase de déclin débute le 7<sup>ème</sup> jour (avec une légère stabilisation entre J<sub>8</sub> et J<sub>9</sub>).

Au cours de la croissance, le pH augmente légèrement lors de la phase exponentielle (jusqu'à 7,8). Par la suite, le pH diminue légèrement à 7,7 pour se stabiliser durant toutes les autres phases de croissance. La production d'antibiotiques débute le 3<sup>ème</sup> jour contre les deux germes-test, soit, durant la phase exponentielle. Le maximum de production est noté le 9<sup>ème</sup> jour pour *B. subtilis* et *K. pneumoniae*, c'est-à-dire à la fin de la phase de déclin. Quoique la production de l'antibiotique a été régulière et continue jusqu'au dernier jour de la culture pour la souche PAL<sub>42</sub>, celle de la souche PAL<sub>54</sub> a été légèrement plus forte.



**Figure 2.-** Cinétiques de production des activités antibactériennes et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL<sub>54</sub> (à gauche) et de la souche PAL<sub>42</sub> (à droite) en milieu liquide MSS1 (♦, biomasse; ●, activité contre *B. subtilis*; ▲, activité contre *K. pneumoniae*)

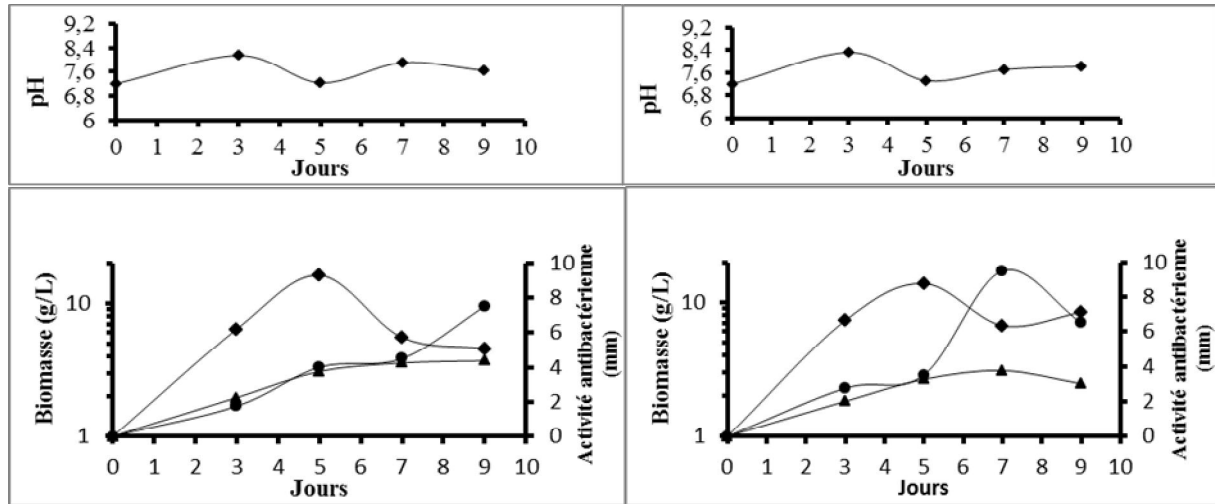
## 2.2. - Milieu MSS2

Le milieu MSS<sub>2</sub> est un milieu semi-synthétique avec 3 g/l d'extrait de levure, il a donné une bonne croissance et une bonne production d'antibiotique pour les deux souches étudiées sur milieu liquide. Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de deux souches en milieu MSS<sub>2</sub> sont illustrées par la figure 3.

Une phase exponentielle d'une durée de 5 jours (J<sub>0</sub> à J<sub>5</sub>) est directement observée durant la cinétique de croissance de la souche PAL<sub>54</sub>. La croissance passe directement dans une phase de déclin qui persiste jusqu'au dernier jour (avec une légère stabilisation entre J<sub>8</sub> et J<sub>9</sub>). Il faut noter que le minimum de croissance (4,57 g/l) est atteint avec ce milieu par rapport aux deux autres milieux durant la phase de déclin (9<sup>ème</sup> jour). Le pH varie au cours de la même phase exponentielles, en premier lieu, il augmente (jusqu'à 8,15), puis baisse pour atteindre le même pH de départ. Par la suite, le pH augmente durant la phase de déclin pour baisser de nouveau. La production d'antibiotiques débute le 3<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et *K. pneumoniae*, soit, durant la phase exponentielle de croissance. Le maximum de production est noté le 9<sup>ème</sup> jour pour *B. subtilis* et *K. pneumoniae*, c'est-à-dire à la fin de la phase de déclin.

La courbe de tendance de la cinétique de croissance de la souche PAL<sub>42</sub> prend exactement la même allure que celle de la souche PAL<sub>54</sub>, sauf qu'au-delà du 7<sup>ème</sup> jour, il est noté la présence d'une légère croissance additive ou croissance cryptique et ce, jusqu'au 9 jour. La courbe de tendance du pH de la souche PAL<sub>42</sub> varie exactement de la même

façon que la courbe de la souche PAL<sub>54</sub>, sauf qu'à la fin, le pH ne baisse pas, il continue à augmenter. La production d'antibiotiques débute le 3<sup>ème</sup> jour contre les deux germes-test. Le maximum de production est noté le 7<sup>ème</sup> jour pour *B. subtilis* et *K. pneumoniae*, c'est-à-dire à la fin de la phase de déclin. L'activité diminue par la suite lors de la seconde phase exponentielle.



**Figure 3.-** Cinétiques de production des activités antibactériennes et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL<sub>54</sub> (à gauche) et de la souche PAL<sub>42</sub> (à droite) en milieu liquide MSS<sub>2</sub> (◆, biomasse; ●, activité contre *B. subtilis*; ▲, activité contre *K. pneumoniae*)

### 2.3. - Milieu ISP<sub>2</sub>

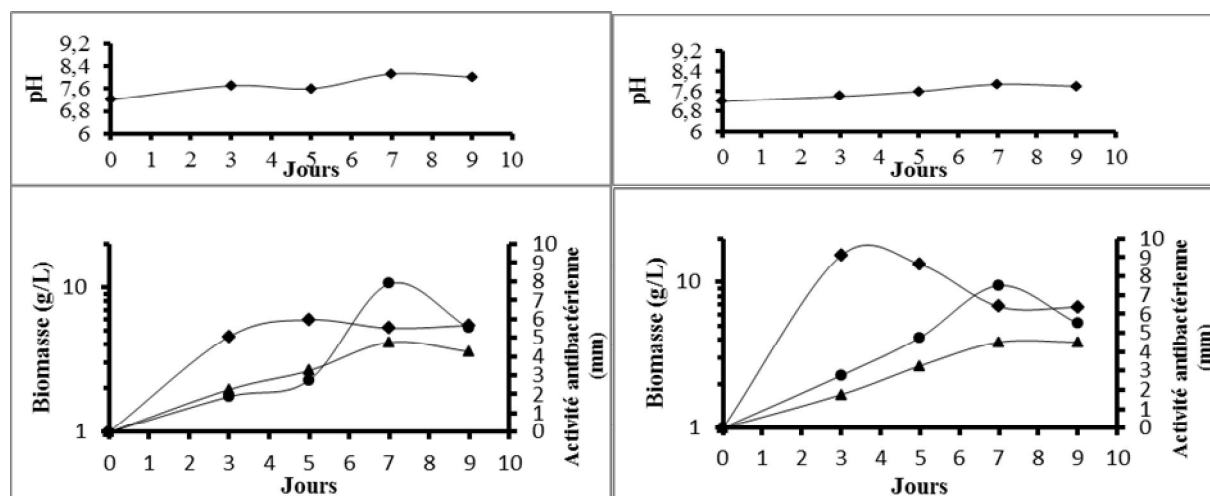
Le milieu ISP<sub>2</sub>, milieu complexe, a donné de bons résultats de croissance et de production d'antibiotique pour les deux souches (PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub>). Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche PAL<sub>54</sub> et de la souche PAL<sub>42</sub> en milieu ISP<sub>2</sub> sont illustrées sur la figure 4.

La courbe de croissance de la souche PAL<sub>54</sub> débute par une phase exponentielle d'une durée de 3 jours (J<sub>0</sub> à J<sub>3</sub>). Une phase de ralentissement est notée entre J<sub>3</sub> et J<sub>5</sub> puis la croissance passe directement dans une phase de déclin qui persiste jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour. Au-delà, une croissance additive (ou croissance cryptique) est observée. Il faut noter que la croissance durant les premiers jours était minimum par rapport au deux autres milieux, MSS<sub>1</sub> et MSS<sub>2</sub>. Au cours de la croissance, le pH augmente légèrement lors de la phase exponentielle (jusqu'à 7,7) mais une légère baisse apparaît (pH = 7,6) lors de la phase de ralentissement. Par la suite, le pH augmente de nouveau à 8,1 lors de la phase de déclin, pour diminué légèrement de nouveau et atteindre la valeur 8 au 9<sup>ème</sup> jour. La production d'antibiotiques débute le 3<sup>ème</sup> jour contre les deux germes-cibles (*B. subtilis* et *K. pneumoniae*), soit, durant la phase exponentielle. Le maximum de production est noté le 7<sup>ème</sup> jour pour les deux germes-cibles, c'est-à-dire à la fin de la phase de déclin. L'activité diminue par la suite durant la croissance cryptique.

La courbe de croissance de la souche PAL<sub>42</sub> débute directement par une phase exponentielle d'une durée de 3 jours (J<sub>0</sub> à J<sub>3</sub>). La croissance passe dans une phase stationnaire (entre J<sub>3</sub> et J<sub>5</sub>). Il se remarque ensuite une phase de déclin qui persiste jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour (avec une légère stabilisation entre J<sub>7</sub> et J<sub>9</sub>). Au cours de la croissance, le pH augmente légèrement lors de la phase exponentielle (jusqu'à 7,4). Il continu à augmenter lors de la phase stationnaire et de la phase de déclin. Par la suite, une légère baisse est observée. La courbe de tendance pour la production d'antibiotiques chez la souche PAL<sub>42</sub>



prend exactement la même allure que la souche PAL<sub>54</sub>, avec seule différence la quantité produite, elle est légèrement plus importante chez la souche PAL<sub>54</sub>.



**Figure 4.-** Cinétiques de production des activités antibactériennes et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL<sub>54</sub> (à gauche) et de la souche PAL<sub>42</sub> (à droite) en milieu liquide ISP<sub>2</sub> (◆, biomasse; ●, activité contre *B. subtilis*; ▲, activité contre *K. pneumoniae*)

### 3. - Discussion

Les souches PAL<sub>54</sub> et PAL<sub>42</sub> de *Saccharothrix* sp. possèdent de fortes potentialités inhibitrices contre *Bacillus subtilis* et la bactérie pathogène *Klebsiella pneumoniae* E<sub>40</sub> (bactérie multi-résistante aux antibiotiques). Les cinétiques de croissance et de production des antibiotiques par les deux souches d'actinobactéries ont été menées en conditions liquides et en agitation, en utilisant le milieu complexe ISP<sub>2</sub>, et les deux milieux semi-synthétique MSS<sub>1</sub> et MSS<sub>2</sub>. Ce choix a été fait en tenant compte des résultats obtenus lors des études réalisées précédemment et qui ont démontré que le milieu ISP<sub>2</sub>, composé d'extrait de malt (10 g/l), d'extrait de levure (4 g/l) et de glucose (4 g/l), est l'un des plus favorables à la production d'antibiotiques chez les actinobactéries [7,10,18,21]. La différence existante entre les milieux semi-synthétiques MSS<sub>1</sub> et MSS<sub>2</sub> réside dans la quantité d'extrait de levure (2 g/l pour le premier et 3 g/l pour le second) et la quantité de CaCO<sub>3</sub> (5 g/l pour le premier et 2 g/l pour le second).

Le choix du milieu de culture pour l'étude s'est porté sur le milieu MSS<sub>1</sub>. Ce dernier s'est révélé favorable pour la production d'antibiotiques par les deux souches de *Saccharothrix*. Bien que cette production soit moins intense par rapport aux milieux MSS<sub>2</sub> et ISP<sub>2</sub>, la raison de ce choix est due principalement au fait qu'il est privilégié le milieu qui contient le moins d'extrait de levure tout en permettant une bonne croissance et une bonne activité. En effet, la complexité de la composition de l'extrait de levure incite à l'utiliser en faible quantité lors des études d'optimisation, ce composé ne pouvant être complètement enlevé au vu de l'auxotrophie des deux souches de *Saccharothrix*. Le même travail a été mené par LAMARI (2006), pour l'optimisation de la production des antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis*, qui a démontré que la croissance mais aussi la production évolue positivement en fonction de l'augmentation de la concentration d'extrait de levure et que la meilleure concentration est aussi de 2 g/l tout comme pour le milieu MSS<sub>1</sub> qui est retenu [7].

L'addition de carbonate de calcium est souvent effectuée pour maintenir le pH aux environs de la neutralité. Plusieurs chercheurs utilisent le  $\text{CaCO}_3$  pour favoriser la croissance bactérienne et augmenter la biomasse cellulaire, et par la suite la production des antibiotiques [7,22,23]. Les travaux réalisés par LAMARI (2006) ont démontré que le  $\text{CaCO}_3$  stimulait nettement la biomasse [7]. Dans ce cas, le milieu  $\text{MSS}_1$  contient 5 g/l de  $\text{CaCO}_3$ , quantité plus élevée que celle contenue dans les milieux  $\text{MSS}_2$  et  $\text{ISP}_2$ .

Concernant la cinétique de croissance, il est noté certains points communs entre les deux souches dans les différents milieux de culture, comme par exemple, l'absence d'une phase de latence et d'une phase stationnaire. L'absence de la phase de latence peut être expliquée par le fait que les pré-cultures soient menées dans les mêmes conditions que les cultures et qu'elles étaient prises en phase exponentielle de croissance. L'absence de la phase stationnaire est un phénomène qui a déjà été observé plusieurs fois chez les actinobactéries [18].

L'autre point commun est celui de la production des antibiotiques au cours de la phase exponentielle. Contrairement à ce phénomène, la production des métabolites secondaires par les microorganismes a lieu généralement durant les phases de ralentissement et stationnaire (idiophase). Cependant, dans le cas des actinobactéries, le moment de production est variable: il peut avoir lieu en phase exponentielle [18,21], durant les deux phases stationnaires observées lors de croissance diauxique comme dans le cas de *Saccharothrix algeriensis* [24], ou même en fin de phase de déclin [25].

Le chloramphénicol fut découvert en 1947 à partir de *Streptomyces venezuelae*. Cette molécule est synthétisée également par *S. omiyaensis* et *S. phaeochromogenes* [26]. Il fut préparé en 1948 par synthèse chimique [26]. C'est un antibiotique appartenant à la famille des phénicolés (famille des aromatiques benzéniques). Il a un spectre large touchant plusieurs bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif [27]. Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique qui inhibe la synthèse protéique bactérienne en inhibant l'activité peptidyl transférase de la grande sous-unité du ribosome bactérien 50S [26]. Le chloramphénicol présente un risque d'induction d'aplasie médullaire due à l'inactivation des mitochondries des cellules de la moelle osseuse. L'induction d'aplasie médullaire a des conséquences très graves (maladie irréversible et mortelle), mais d'incidence faible (environ 0,1% des cas).

Du fait de sa toxicité potentielle, il n'est plus utilisé qu'en application externe dans les pays occidentaux (collyres dans les infections ophtalmiques) ou parfois dans le cas d'infections sévères et résistantes en milieu hospitalier. Cependant, Il reste encore utilisé par voie générale dans certains pays en voie de développement (comme le Cambodge). L'organisation mondiale de la santé (OMS) le conserve sur sa liste des médicaments autorisés considérant que malgré ce risque, il peut apporter un bénéfice important.

La résistance au chloramphénicol est due le plus souvent à la production des enzymes inactivant les phénicolés, comme une chloramphénicol acétyl-transférase plasmidique détectée chez certaines espèces d'entérobactéries telles que *Salmonella typhi*, *Pseudomonas* sp. et *Yersinia* sp. Cependant, il existe également une résistance au chloramphénicol par le biais d'une nitroréductase [28].

## Références bibliographiques

- [1].- Lacey J., 1997.- Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 4, 113–121.
- [2].- Goodfellow M. et Williams S. T., 1983.- Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol*, 37: 189–216.
- [3].- Buckingham J., 1997.- *Dictionary of Natural Products*. England: Chapman and Hall/CRC, CD-ROM.
- [4].- Solecka J., Zajko J., Postek M, Rajnisz A., 2012.- Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Cen. Europ. J Biol.*, 7: 373–39.
- [5].- Kumarasamy K. K, Toleman M. A, Walsh T. R., 2010.- Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infect Dis*, 10: 597–602.
- [6].- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2006.- Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 390–397.
- [7].- Lamari L., 2006.- Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 153 p.
- [8].- Phoebe C. H., Cambie J., Albert, F. G., Van Tran K., Cabrera J., Correia H. J., Gruo Y., Lindermuth J., 2001.- Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *Journal of Antibiotics*. 54: 56–65.
- [9].- Sabaou N., Boudjella H., Bendji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L *et al.* 1998.- Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques d'antibiotiques. *Secheresse*, 9: 147–153.
- [10].- Aouiche A., 2010.- Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Mémoire de Magister en microbiologie, Université de Sidi Bel-Abbes, 127 p.
- [11].- Aouiche A, Sabaou N, Meklat A, Zitouni A, Bijani C, Mathieu F, Lebrihi A., 2012.- *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 943–951.
- [12].- Lu X.W., Dang Z. and Yang C., 2009.- Preliminary investigation of chloramphenicol in fish, water and sediment from freshwater aquaculture pond. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6: 597–604.
- [13].- Powell D. A., and Nahata M. C., 1982.- Chloramphenicol: new perspectives on an old Drug intelligence and clinical pharmacy, 16: 295–300.
- [14].- Dagnra A. Y., Akolly K., Gbadoe A., Aho K. and David M., 2007.- Émergence des souches de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques à Lomé (Togo). *Médecine*

et maladies infectieuses, 37: 266–269.

- [15].- Weill F. X., 2008.- *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des Laboratoires, 38: 38-48.
- [16].- Touati A., 2006.- Caractérisation des phénotypes de résistance acquis aux  $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries isolées dans les hôpitaux de Bejaia. Doctorat soutenu à l'Université A. Mira de Bejaia, 96 p.
- [17].- Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Guatier V., Arlet G. and Bakour R., 2008.- Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). Pathologie Biologie, 56: 319–325.
- [18].- Zitouni A., 2004.- Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiosis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 230 p.
- [19].- Shirling B. and Gottlieb D., 1966.- Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology, 16: 3313-3340.
- [20].- Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H., Fiedler H-P., 2000.- Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. Journal of Biotechnology, 80: 135-142.
- [21].- Badji B., 2006.- Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 226 p.
- [22].- Ikeda Y., Naganawa H., Kondo S. et Takeuchi T., 1992.- Biosynthesis of bellenaminate by *Streptomyces nashvillensis* using stable isotope labeled compounds. Journal of Antibiotics (Tokyo), 45: 1919–24.
- [23].- Lamsaïf D., 1992.- Effets des sources d'azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium. Thèse de Doctorat de l'INPL de Nancy, 127 p.
- [24].- Strub C. 2008.- Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 203 p.
- [25].- Toumatia O., 2010.- Actinomycètes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, ENS. de Kouba, Alger, 115 p.
- [26].- Asselineau J. et Zalta P., 1973.- Les antibiotiques. Structure et exemples de mode d'action. Ed. Hermann, Paris: 1-6.
- [27].- Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K. L., 1987.- CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1,2,3. Florida, USA. CRC Press,

Boca Raton, 577 p.

- [28].- Smith A. L., Erwin, A. L, Kline T., William C. T., Unrath K. N., Weber A. and Howald W. N., 2007.- Chloramphenicol is a substrate for a novel nitroreductase pathway in *Haemophilus influenza*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 2820–2829.