

Effet des sources d'azote sur la production de la saquayamycine C par la souche PAL114 de *Streptomyces*

Samira Tata⁽¹⁾, AffafLaassami⁽¹⁾, Amine Yekkour⁽¹⁾, FawziaChaabane Chaouch⁽¹⁾, Lynda Lamari⁽¹⁾,
Noureddine Bouras^(1,2*) et NasseridineSabaou⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie.

⁽²⁾Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaia, BP 455, Ghardaïa 47000, Algérie.

Résumé–Le présent travail consiste à une mise en exergue de la situation actuelle de la pisciculture. L'étude est réalisée à travers 03 grandes régions du sud Algérien, à savoir les wilayas de Ouargla, Ghardaïa et El Oued.

Les résultats de l'enquête ont montré que la majeure partie des éleveurs n'ont pas bénéficié de formation. L'élevage est réalisé dans des bassins d'accumulation de l'eau d'irrigation et l'alimentation est, dans la plupart des cas, préparée au niveau de l'exploitation en se basant sur ce qui est disponible. D'autre part, la majeure partie de la population des consommateurs échantillonnés ne connaissent pas les poissons d'eau douce. La réussite de la pisciculture est tributaire d'un certain nombre de facteurs à respecter. La formation des éleveurs et l'alimentation restent des facteurs limitant pour la réussite de cette activité.

Mots clés : *Saquayamycine C*, *Streptomyces* sp. PAL114, milieu synthétique, sources d'azote, quantification.

1. Introduction

Au cours de ces dernières décennies, le monde de la santé a été marqué par une augmentation inquiétante du nombre de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques et par l'émergence de nouveaux agents pathogènes, encore plus dans les pays en voie de développement [1-2]. Cette résistance aux antibiotiques pose parfois de véritables problèmes thérapeutiques, surtout en milieu hospitalier ou souvent 99% des souches isolées présentent des résistances [3].

En Algérie, plusieurs travaux publiés ont signalé l'apparition de souches bactériennes résistantes ou multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés [4].

Les bactéries résistantes sévissant dans les hôpitaux sont souvent des entérobactéries ou des bactéries infectieuses des voies respiratoires, urinaires, etc., telles qu'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* et autres [4-5].

Les actinobactéries, bactéries mycéliennes à Gram positif, sont particulièrement très intéressantes par leur grande capacité à produire des métabolites secondaires avec des structures chimiques diversifiées [6]. Ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques antibactériens et antifongiques avec près de 70 % des molécules actives commercialisées [7]. Le genre *Streptomyces* est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques, soit 80 % des antibiotiques sécrétés par les actinobactéries [8]. Nos travaux précédents ont montré la richesse des sols sahariens d'Algérie en actinobactéries producteurs de nouvelles molécules [9].

La souche d'actinobactérie, PAL114, est une souche isolée à partir d'un sol de la palmeraie d'Ahbès (Ghardaïa, Mزاب). Les études taxonomiques basées sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires ont montré que cette souche appartient au genre *Streptomyces* [10]. La souche PAL114 a montré des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes. Elle produit sur milieu ISP2 des antibiotiques qui ont été identifiés à la chaetoglobosine A, aux saquayamycines A et C et à la vinéomycine A [10-11-12].

L'objectif de ce travail est d'étudier la production de la saquayamycine par cette souche sur milieu synthétique, et de voir l'influence des sources d'azote sur cette production.

2. Matériels et méthode

2.1. Souche PAL114 de Streptomyces

La souche d'actinobactérie utilisée dans notre travail provient du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de Kouba. Elle a été isolée par Aouiche (2010) lors d'un criblage de souches d'actinobactéries productrices d'antibiotiques provenant des sols de la région de Ghardaïa. La souche PAL114 a été isolée précisément à partir d'un sol de la palmeraie d'Ahbès (Béni-Isguen, Ghardaïa, Mزاب) en utilisant le milieu chitine-vitamines B additionné de pénicilline G (25 mg/L) et de cycloheximide (80 mg/L) [10].

2.2. Production de la saquayamycine C en milieux liquides

2.2.1. Milieu de culture de base

Une solution minérale de base synthétique utilisée est celui préconisée par Bouras (2005) pour la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 [13]. Ce milieu (MS) a été légèrement modifié en supprimant l'extrait de levure et le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et en réduisant la quantité de CaCO_3 à 2 g/L (au lieu de 5 g/L).

La composition de la solution minérale est la suivante:

- NaCl: 2 g.
- KH_2PO_4 : 0,5 g.
- K_2HPO_4 : 1 g.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g.
- CaCO_3 : 2 g.
- Eau distillée: 1000 mL.
- pH: 7,0.

Des cultures de production sont également réalisées dans le milieu complexe ISP2 liquide, afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus avec le milieu synthétique MS.

2.2.2. Sources d'azote

Sept acides aminés (sources organiques simples) ont été testés, ainsi que la tryptone qui est une source d'azote organique assez complexe.

Les acides aminés sont les suivants: la DL-proline, la L-histidine, le L-tryptophane, la L-valine, la L-leucine, la L-tyrosine, la L-phénylalanine. Le sulfate d'ammonium (source d'azote inorganique) est aussi utilisé. Tous les acides aminés ont été additionnés au milieu MS à raison de 5 mM. La tryptone et le sulfate d'ammonium ont été ajoutés à des quantités équivalentes à 25 mM [12]. La proline a été choisie car elle est connue pour favoriser la production d'antibiotiques. Nous avons retenu la forme DL car elle a permis d'avoir de meilleurs résultats que la forme L lors d'expériences préliminaires. Les autres acides aminés ont été choisis car ils sont capables d'être dégradés par la souche PAL114 [10]. La tryptone et le sulfate d'ammonium ont été retenus comme représentant respectivement, une source d'azote organique complexe et une source d'azote minérale.

Lors de cette production, le milieu MS est additionné d'amidon comme source de carbone. La figure 1 montre un schéma récapitulatif qui résume toutes les sources d'azote utilisées lors de la production de la saquayamycine C sur le milieu synthétique MS.

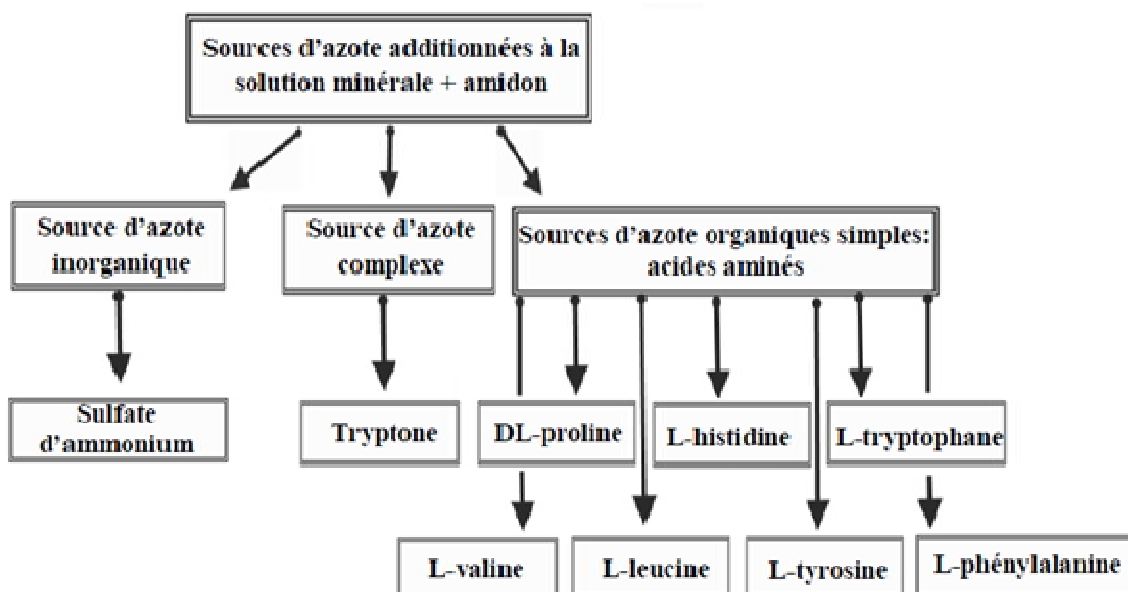


Fig. 1. Sources d'azote utilisées lors de la production de la saquayamycine C sur milieu synthétique MS par la souche PAL114.

2.3. Extraction des antibiotiques

Les cultures de la souche PAL114 sont centrifugées afin d'éliminer la masse mycélienne. Le surnageant obtenu est extrait avec du dichlorométhane dans une ampoule à décanter, à raison d'un volume de filtrat pour un volume de solvant organique. Le dichlorométhane est le meilleur solvant d'extraction selon les travaux de Aouiche [10].

Les substances actives sont récupérées en grande majorité lors de la première extraction de sorte qu'une réextraction du filtrat n'est pas nécessaire. La phase organique est récupérée et filtrée sur papier filtre (Whatman n° 1) plissé contenant du sulfate de sodium anhydre, pour éliminer les traces d'eau résiduelles contenant les contaminants hydrophiles. Les extraits au dichlorométhane sont ensuite concentrés et évaporés sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est solubilisé dans du méthanol (1 mL pour un volume initial de 100 mL de culture).

2.4. Purification de la saquayamycine C par HPLC

La saquayamycine C produite par la souche PAL114 a été purifiée par HPLC. Pour cela, des gradients sont réalisés à partir d'eau bidistillée et de méthanol pour HPLC préalablement filtrés. Le gradient est continu, linéaire, allant de 20 à 100% de méthanol dans l'eau. Le débit de l'éluant est de 1 mL/min. La détection se fait à 220 nm. Avant injection des échantillons, la colonne est conditionnée et équilibrée avec les conditions initiales (20% de méthanol dans l'eau) pendant 10 min. Les extraits sont dissous dans 1 mL de méthanol, ultrafiltrés à l'aide d'un filtre de 0,2 µm de porosité, puis introduits dans l'appareil HPLC à raison de 100 µL par injection. La fraction qui correspond à la saquayamycine est récoltée, évaporée sous vide à 40°C et utilisée par la suite pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices contre les microorganismes ainsi que la réalisation de la courbe d'étalonnage. Le tableau 1 résume les conditions d'élution des antibiotiques par HPLC.

Tableau 1. Conditions d'élution des antibiotiques par HPLC.

	Temps (min)	Débit(m L/min)	Eau (solvant A %)	Méthanol(so lvant B %)
'Pré-run' (équilibrage de la colonne)	10	1	80	20
'Run' (gradient linéaire)	0	1	80	20
	55	1	0	100
'Post-run' (lavage de la colonne)	55	1	0	100
	65	1	0	100

2.5. Quantification de la saquayamycine C

Afin d'estimer la quantité de la saquayamycine C dans le milieu synthétique additionné des différentes sources d'azote ainsi que dans le milieu complexe ISP2, nous avons établi une courbe d'étalonnages en fonction de l'aire du pic correspondant (voir résultats). Après avoir purifié l'antibiotique une série de concentrations de cet antibiotique comprises entre 200 et 1000 µg/mL a été réalisées. Une courbe d'étalonnage (droite) du type $Y = ax$, a été établie à partir des concentrations de l'antibiotique purifié et de la surface du pic correspondant. Les échantillons sont injectés deux fois de manière à obtenir une moyenne et minimiser ainsi les erreurs.

3. Résultats et discussion

3.1. Production de la saquayamycine C en milieux liquides

La production de la saquayamycine C par *Streptomyces* sp. PAL114 est étudiée en fioles Erlenmeyer agitées dans le milieu de culture MS contenant la solution minérale supplémentée par différentes sources d'azote et de carbone, et ce, pour faire d'une part une comparaison avec la production obtenue auparavant dans le milieu de culture complexe ISP2, et d'autre part, de déterminer les sources nutritionnelles permettant une production optimale de cet antibiotique.

La souche PAL114 s'est distinguée par un fait assez rare: elle ne pousse pas sur le milieu MS (éléments minéraux + source d'azote) à l'état solide mais croît bien dans le milieu MS liquide. Ainsi, nos expérimentations sur la production d'antibiotiques par cette souche sont toutes réalisées en utilisant directement le milieu MS liquide.

3.2. Détection de la saquayamycine C par HPLC

L'analyse des antibiotiques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été poursuivie sur les extraits au dichlorométhane des surnageants de culture de la souche PAL114 issus du milieu ISP2 et du milieu synthétique additionné de différentes sources d'azote.

La figure 2 montre le profil d'élution en HPLC de l'extrait au dichlorométhane du surnageant de culture de la souche PAL114 ayant poussé sur ISP2 liquide. Ce milieu est considéré comme un milieu témoin par rapport aux autres milieux (synthétiques) dont on a fait varier les sources d'azote. Les fractions obtenues sont matérialisées sur le chromatogramme par de nombreux pics dont certains ont été numérotés de P61 à P65 selon leur temps de rétention (ex: la fraction P65 est le produit ayant un temps de rétention voisin de 65 min). Il est à signaler que la saquayamycine C à un temps de rétention de 63 min, elle est alors représentée par le P63 dans le profil HPLC.

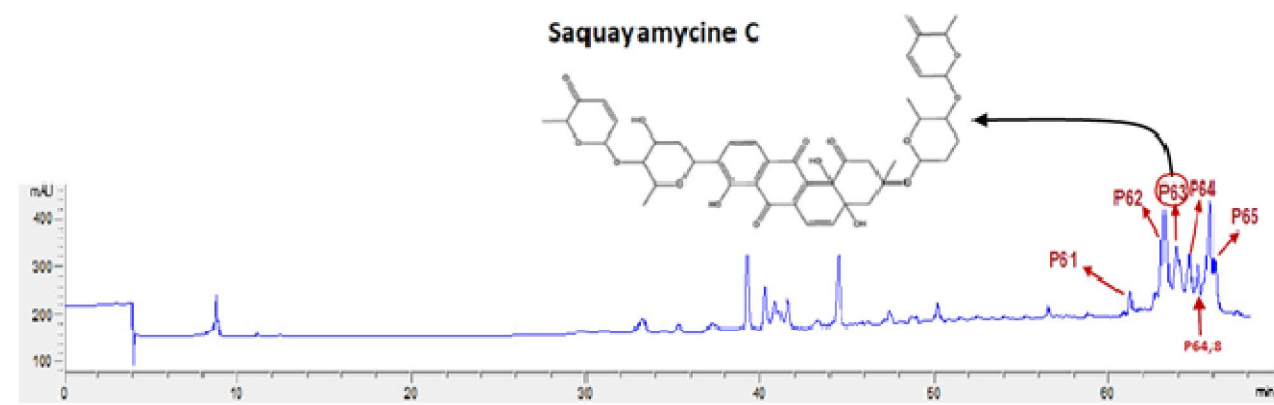


Fig. 2. Profil d'élution par HPLC de l'extrait au dichlorométhane du surnageant de culture de la souche PAL114.

Note: Conditions: Colonne Waters C18, gradient méthanol-eau 20-100%; débit, 1 mL/min; détection, 220 nm.

3.3. Quantification de la saquayamycine C

Le dosage de la saquayamycine synthétisé par la souche PAL114 a été réalisé sur le milieu MS en fonction des sources d'azote et sur milieu ISP2 pris comme « témoin ». Ce dosage a été effectué grâce à une courbe d'étalonnage (droites du type $y = ax$) a été réalisée en considérant les concentrations croissantes de l'antibiotique. La courbe d'étalonnage (figure 3) est indiquée ci-dessous.

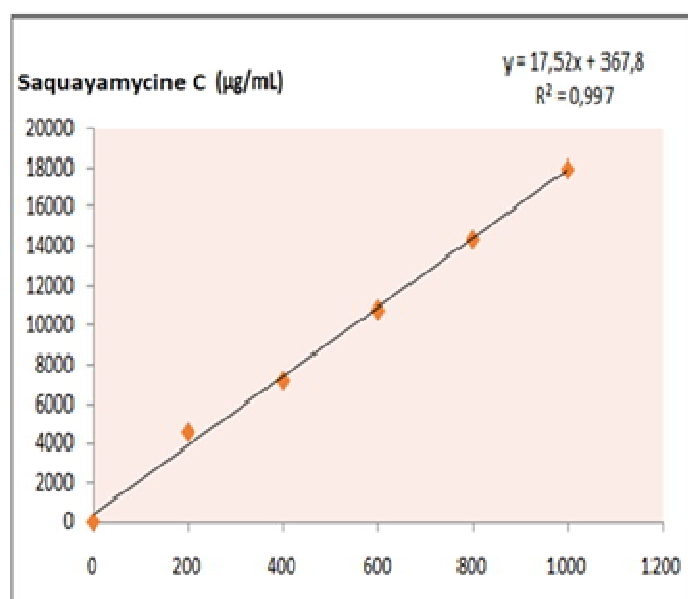


Fig. 3. Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage de la saquayamycine C.

Note: cette courbe a été déterminée en considérant l'aire du pic de l'antibiotique en fonction de sa concentration.

L'échantillon a été injecté deux fois, de manière à avoir une moyenne et limiter les erreurs. Les concentrations en antibiotique est ainsi calculées à partir de cette droite, en utilisant la formule: concentration = aire du pic/coefficient de réponse.

La figure 4 montre la production de la saquayamycine C sur milieux ISP2 et sur milieux synthétiques après addition de différentes sources d'azote. Nous remarquons que cette production est meilleure en présence de la DL-proline (14,3 µg/mL). Elle reste appréciable en présence de la L-histidine (10,67 µg/mL), mais est moindre en présence de la L-tyrosine, la L-valine, L-leucine et la tryptone (3,5; 0,9; 0,5 et 0,2 µg/mL, respectivement). En revanche, le sulfate d'ammonium, la L-phénylalanine et le tryptophane ne permettent pas la biosynthèse de cet antibiotique.

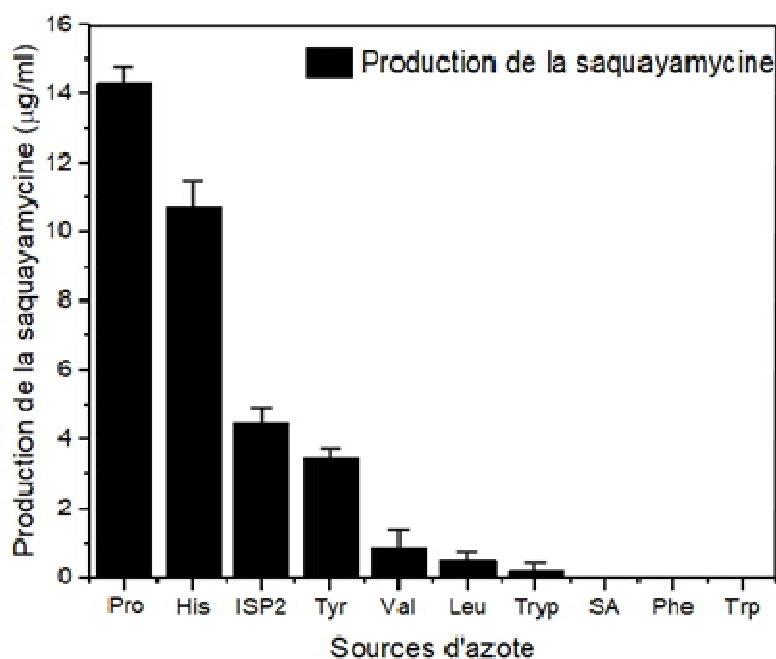


Fig. 4. Quantification de la saquayamycine C produite sur milieu synthétique additionné de différentes sources d'azote.

Note: la production est déterminée au jour de production optimale.

[Pro: DL-proline, His: L-histidine, Tyr: L-tyrosine, Val: L-valine, Leu: L-leucine, Trp: tryptone, SA: sulfate d'ammonium, Phe: L-phénylalanine, Trp: L-tryptophane. L'ISP2 est donné comme milieu organique de référence].

La souche PAL114 produit une meilleure quantité de la saquayamycine C en présence de DL-proline. Cette production est même supérieure à celle obtenue dans le milieu ISP2 (milieu organique complexe considéré comme référence). La production est également favorisée par la présence de L-histidine, mais est moindre en présence de L-valine, L-tyrosine, L-leucine et tryptone. Nous avons remarqué aussi que certaines sources d'azote ne permettent pas la production de cet antibiotique comme c'est le cas de la L-phénylalanine, le tryptophane et le sulfate d'ammonium. La quantité d'antibiotique dépend des souches productrices et des conditions de culture. Par exemple, la souche *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 produit 0,12 mg/L d'un nouveau dérivé dithiopyrrolone (l'iso-hexanoyl-pyrrothine) dans un milieu semi-synthétique additionné d'acide sorbique [14]. Bouras a montré que cette même souche mène à une augmentation de la production spécifique de la thiolutine en présence de L-proline, acide L-glutamique et DL-histidine dans le milieu de culture semi synthétique de 6, 4 et de 3 fois, respectivement [13].

En revanche, l'ajout de L-méthionine, DL-éthionine ou L-glutamine diminue considérablement la production spécifique de la thiolutine (de 6 à 70 fois) [13].

Par ailleurs, nos résultats ont montré que l'addition du sulfate d'ammonium ne favorise pas la production de la saquayamycine C. Cette observation témoigne de la complexité des systèmes enzymatiques employés pour la production des métabolites secondaires [13]. Cet effet négatif sur la production de la saquayamycine C en présence de certains substrats ajoutés peut être dû à la répression

ou à l'inhibition d'une ou de plusieurs enzymes responsables de la biosynthèse d'antibiotique. Dans ce cas, l'effet de l'ammonium pourrait être mis en cause [15].

Récemment, Khebizi (2018) a constaté que le milieu MaC contenant du glucose, de la peptone et du caséine permet une meilleure production volumétrique de deux antifongiques par rapport au milieu de référence. Ainsi la production d'oligomycine E qui correspond à 52,3 % de plus par rapport au milieu de référence, et de 2,1 mg/L. Pour l'oligomycine A, soit une quantité de 80,4 % plus élevée que celle du milieu de référence [16].

Les résultats obtenus confirment que la composition du milieu de culture influe fortement sur la production de la saquaymycine par la souche PAL114, ce qui est en accord avec les études effectuées sur différentes souches de *Streptomyces* par d'autres chercheurs.

4. Conclusion

L'augmentation de la production de la saquaymycine C lors de l'addition de certaine source d'azote, ainsi que l'inhibition de la production avec d'autre sources incite donc à poursuivre les recherches et d'étudier l'effet d'autres paramètres sur la production de la saquaymycine (autres sources nutritionnelles organiques, composés minéraux, oligo-élément, pH, température, aération, etc.)

5. Références

- [1] Singh BP, Rateb, ME, Rodriguez-Couto S, PolizeliMdLTd M, Wen-Jun L. (2019). Editorial MicrobialSecondaryMetabolites:RecentDevelopments and Technological Challenges. *Frontiers in Microbiology*; 10-914.
- [2] Islam MA, Alam MM, Choudhury ME, Kobayashi N, Ahmed MU. (2008) Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. *Bangl. J. Vet. Med*; 6 (1): 121–126.
- [3] Meyer A, Deiana J, Bernard A. (2004) Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2ème édition. (Collection biosciences et techniques). France. 430 p. ISBN 2-7040-1170-2.
- [4] Messai Y, Iabadence H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Guatier V, Arlet G, Bakour R. (2008) Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Path. Bio. G*; 319-325.
- [5] Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, De Champs C. (2006) First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*; 27: 397-402.
- [6] Valanarasu M, Duraipandian V, Agastian P, Ignacimuthu S. (2008) Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Mycol Med*; 18:147-53.
- [7] Solanki R, Kahanna M. (2008) Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol*; 48:410-31.
- [8] Demain AL. (2006) From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 33:486-95.
- [9] Tata S, Aouiche A, Bijani C, Bouras N, Pont F, Mathieu F, Sabaou N. (2019). Mzabimycins A and B, novel intracellular angucycline antibiotics produced by *Streptomyces* sp. PAL114 in synthetic medium containing L-tryptophan. *Saudi Pharmaceutical Journal*; 27: 907-913.

- [10] Aouiche, A. (2011). Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Thèse de magister, Université Djillali Liabes, Sidi-bel-abbes. 127 p.
- [11] Aouiche A. (2013) Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigène pour l'Homme. Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba. 159 p.
- [12] Aouiche A, Bijani C, Zitouni A, Mathieu F, Sabaou N. (2014) Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* sp. PAL114 isolated from a Saharan soil. *Journal de mycologie médicale*; 24: 17-23.
- [13] Bouras N. (2005). Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (INP-ENSAT). 238 p.
- [14] Merrouche R. (2012). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture. Thèse de Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique. El-Harrach. 197 p.
- [15] Drew S X, Demain A L. (1977) Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol*; 31: 343-356.
- [16] Khebizi N. (2018). Étude taxonomique de trois souches de *Streptomyces* isolées des sols Sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques produits par *Streptomyces* sp. HG29. Thèse de doctorat, École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 164 p.