THESE EN COTUTELLE

Présentée à

L'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès

UFR DOCTORALE 'Biotechnologies Microbiennes'

ET

L'Université Montpellier 1

École Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Par **Mme Siham JIHANI**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

Titre :

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE SOUCHES D'ACTINOMYCETES PRODUCTRICES DE SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES A PARTIR DE BIOTOPES MAROCAINS ET CARACTERISATION PARTIELLE DES PRINCIPES ACTIFS

Soutenue le : 18/05/2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. Mohammed IRAQUI, Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah	Président
Mme Claire LE HENAFF, Professeur, ENSCPB-IPB	Rapporteur
M. Mostafa ELLOUALI, Professeur, Université Sultan Moulay Slimane	Rapporteur
M. Abdellah HOUARI, Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah	Rapporteur
M. Jean Paul LEONETTI, Directeur de recherche, CNRS	Examinateur
M. Konstantin BRODOLIN, Chargé de recherche, INSERM	Directeur de thèse
M. Abdellatif HAGGOUD, Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah	Directeur de thèse

Résumé

Vingt souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de sol et de bois prélevés à partir d'une vielle maison dans l'ancienne médina de Fès et d'échantillons de sol prélevés de la région de Moulay Yacoub et des rives d'Ouèd Sebbou. L'activité antimicrobienne, réalisée par la technique des cylindres d'agar et celle des stries croisées, a été déterminée contre des bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* 5262, *Bacillus cereus* cip 14579, *Staphylococcus aureus* 7625, *Staphylococcus epidermidis* 6821) ; des bactéries à Gram négatif (*Pseudomanas aeroginosa* 76110, *E.coli* cip 7624) et la levure *Candida albicans*. Parmi les vingt isolats, douze (60 %) ont montré une activité contre au moins une des souches tests.

Par ailleurs, l'analyse moléculaire des vingt isolats par amplification et séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S a permis d'attribuer dix huit isolats au genre Streptomyces et deux aux genres Saccharothrix et Lentzea.

De plus, le séquençage de la quasi-totalité de l'ADNr 16S de cinq isolats (Sj32, Sj33, Sj38, Sj68 et Sj69) nous a permis d'assigner les isolats Sj38 et Sj69 à *S. parvus*, et *Saccharothrix sp.*, respectivement.

Les substances bioactives produites par les cinq souches d'actinomycètes sont extraites par des solvants organiques et les molécules produites sont purifiées par HPLC. Une étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la température et de la protéinase K a montré que les substances bioactives seraient de nature non protéique pour Sj32, Sj33, Sj68 et Sj69 et protéique pour Sj38.

Une étude de la cytotoxicité de la fraction active de la souche Sj32 sur les cellules MRC-5 a montré qu'elle présente une forte cytotoxicité contre ces cellules.

Enfin, l'étude de l'effet de la fraction active de la souche Sj32 sur la transcription et la traduction bactérienne *in vitro*, a montré que cette substance purifiée n'inhibe pas ces deux processus biologiques.

Mots clés : Actinomycètes, Streptomyces, Saccharothrix, Lentzea, identification moléculaire, substances antimicrobiennes.

SOMMAIRE

Introduction générale 1

Revue bibliographique 4

I- Actinomycètes 5

1- Définition et caractéristiques principales 5

2- Taxonomie et identification des actinomycètes 8

3-Classification des actinomycètes 11

2-1- Les actinomycètes nocardioformes 11

2-2- Les actinomycètes à sporanges multiloculaires 11

2-3- Les actinoplanes 12

2-4- Streptomyces et les genres apparentés 12

2-5- Actinosynnemataceae 14

2-6- Les thermoactinomycètes 15

4- Rôle écologique des actinomycètes 16

5- Les Actinomycètes en biotechnologie 17

II- Les antibiotiques produits par les Actinomycètes 20

1- Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane 21

2- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines 21

2-1- Macrolides, Lincosamides, Streptogramines 22

2-2- Les phénicolés : chloramphénicol et thiamphénicol 22

2-3- Les aminoglycosides 23

2-4- Les tétracycline 23

3- Antibiotiques agissant au niveau de l'ARN polymérase 24

3-1- Les ansamycines 24

3-2- La streptolydigine 24

3-3- La lipiarmycine 25

3-4- Le peptide GE23077 25

3-5- Les pyrrothines 25

III- Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes 26

1-Influence des sources nutritionnelles 27

1-1- Source de carbone 28
1-2- Source d'azote 28
1-3- Source de phosphate 29
1-4- Influence des oligoéléments 29
2- Influence du taux de croissance 30
3-Influence des conditions de culture 30
4- Induction du métabolisme secondaire 31
4-1- Les précurseurs 31
4-2- Les inducteurs 32
4-3- Les messagers nucléotidiques phosphorylés 32
IV-Résistance aux antibiotiques 33
1- Résistance bactérienne aux antibiotiques 34
2- Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques 36
3-Le phénomène de persistance 40
4-Recherche de nouvelles molécules antibiotiques 40
4-1- Trouver et/ou développer de nouveaux antibiotiques 41
4-2- Alternatives aux antibiotiques 42
Matériel et méthodes 43
Partie I : Isolement et identification des isolats d'actinomycètes 44
I- Isolement des actinomycètes 44
1- Prélèvements des échantillons 44
2- Isolement, purification et conservation des souches d'actinomycètes 44
II- Etude morphologique, physiologique et biochimique des isolats 45
1- Caractérisation morphologique 45
2- Production de pigments mélanoïdes 46
3- Hydrolyse de la caséine 46
4- Tolérance au chlorure de sodium 46
5- Croissance à différentes températures 46
6- Tests de sensibilité à divers agents chimiques 46
7- Utilisation de différents substrats carbonés 47
8- Test de la croissance sur différentes sources d'azote 47
III- Identification moléculaire des isolats d'actinomycètes 48

1- Amplification et séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S 48
1-1- Extraction de l'ADN 48
1-2- Amplification de l'ADNr 16S par PCR 48
1-3- Electrophorèse sur gel d'agarose 48
1-4- Purification des produits PCR 49
1-5- Séquençage et analyse des séquences 49
2- Amplification et séquençage de la quasi-totalité de l'ADNr 16S 49
2-1- Séquençage 50
2-2- Analyse des séquences 50
2-3- Analyse phylogénétique 50
Partie II : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats 52
1- Les micro-organismes tests 52
2- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide 52
3- production de substances antimicrobiennes sur milieu liquide 53
4- Cinétique de production des molécules bioactives 53
Partie III- Purification et caractérisation partielle des substances produites 54
I- Extraction par des solvants organiques 54
II- Purification et caractérisation partielle des substances actives 54
1- Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) 54
2- Purification du produit de nature protéique 55
2-1- Précipitation au sulfate d'ammonium 55
2-2- Gel SDS-PAGE 55
2-3- Dialyse du précipité 56
2-4- Purification par FPLC (fast protein liquid chromatography) 56
3- Etude de la stabilité des extraits organiques 57
III- Etude de la substance purifiée de la souche sj32 57
1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 57
2- Détermination de la cytotoxicité 58
3- Effet sur la transcription et la traduction bactérienne 58
3-1- Effet sur la transcription *in vitro* 58
3-2 Effet sur la traduction *in vitro* 59

Résultats et discussion 61

Chapitre I : Isolement, identification et mise en évidence de l'activité antimicrobienne des actinomycètes 62

I- Isolement des souches d'actinomycètes 63

II- Criblage pour la production de substances antimicrobiennes 65

III- Identification des isolats d'actinomycètes 67

1- Séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S 68

2- Séquençage de la quasi-totalité du gène de l'ARNr 16S de cinq isolats 72

3- Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des cinq isolats d'actinomycètes 75

3-1- Caractéristiques morphologiques 75

3-2- Caractéristiques physiologiques et biochimiques 76

Chapitre II : Purification et caractérisation partielle des substances produites par des souches représentatives 78

I- Choix du milieu de production 79

II- Production et extraction des substances bioactives 82

1- Cinétique de production 82

2- Extraction par des solvants organiques 84

III- Stabilité de l'activité antibactérienne 85

IV- Séparation des substances bioactives par HPLC 85

V- Purification du produit de nature protéique 88

Chapitre III : Etude de la substance purifiée de la souche Sj32 90

I- Détermination de la CMI et de la cytotoxicité 91

II- Effet de la substance active purifiée de la souche Sj32 sur la transcription et la traduction bactérienne 92

1- Effet sur la transcription bactérienne 92

2- Effet sur la traduction bactérienne 93

Conclusion générale et perspectives 95

Références bibliographiques 99