



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen.



Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie.

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire au Biomédical et à
l'Environnement (LAMAABE).

THÈSE

Présentée par

MESSAOUDI OMAR

Pour l'obtention du diplôme de doctorat sciences
en Microbiologie appliquée.

Option : Maîtrise de la Qualité Microbiologique et du
Développement Microbien (MQMDM).

**Isolement et caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir
d'actinomycètes isolés du sol algérien**

Soutenue le 10 Mars 2020

Devant le jury :

Khelil Nihel.	Pr. U.A.B.B. Tlemcen.	Présidente.
Abdelouahid Djamel E.	Pr. U.A.B.B. Tlemcen.	Examineur.
Sbaihia Mohamed.	Pr. Université de Chlef.	Examineur.
Benmehdi Houcine.	Pr. Université de Bechar.	Examineur.
Wink Joachim.	Pr. Centre Helmholtz (Allemagne).	Examineur.
Bendahou Mourad.	Pr. U.A.B.B. Tlemcen.	Directeur de la thèse.

Année universitaire : 2019/2020.



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen.



Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie.

Laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agro-alimentaire au Biomédical et à
l'Environnement (LAMAABE).

THÈSE

Présentée par

MESSAOUDI OMAR

Pour l'obtention du diplôme de doctorat sciences
en Microbiologie appliquée.

Option : Maîtrise de la Qualité Microbiologique et du
Développement Microbien (MQMDM).

**Isolement et caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir
d'actinomycètes isolés du sol algérien**

Soutenue le 10 Mars 2020

Devant le jury :

Khelil Nihel.	Pr. U.A.B.B. Tlemcen.	Présidente.
Abdelouahid Djamel E.	Pr. U.A.B.B. Tlemcen.	Examineur.
Sbaihia Mohamed.	Pr. Université de Chlef.	Examineur.
Benmehdi Houcine.	Pr. Université de Bechar.	Examineur.
Wink Joachim.	Pr. Centre Helmholtz (Allemagne).	Examineur.
Bendahou Mourad.	Pr. U.A.B.B. Tlemcen.	Directeur de la thèse.

Année universitaire : 2019/2020.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

- **Ma mère et à mon père pour leur soutien et leur patience.**
- **Toute ma famille et mes amis.**

Remerciements

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédicale et à l'environnement (LAMAABE), université ABOU BEKR BELKAID (ABB) de Tlemcen en collaboration avec le laboratoire du centre de recherche sur les infections de Helmholtz (Allemagne).

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à notre ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour l'attribution d'une bourse dans le cadre du programme PNE qui m'a permis de finaliser mes travaux de recherche.

Je tiens tout d'abord à remercier madame Hassaine Hafeda, professeur à l'université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen et directrice du laboratoire LAMAABE, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire.

J'exprime tous mes remerciements à monsieur Joachim Wink, PD et directeur de recherche au centre de recherche sur les infections de Helmholtz (Allemagne) pour m'avoir accueilli dans l'unité de recherche et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse monsieur Mourad Bendahou, professeur à l'université ABB de Tlemcen (laboratoire LAMAABE) pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je le remercie pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et pour ses conseils précieux.

J'adresse toute ma gratitude à tous Les membres de jury d'avoir accepté d'examiner ma thèse en l'occurrence :

Khelil N. : Pr à l'université ABB de Tlemcen

Abdelouahid D.E : Pr à l'université ABB de Tlemcen,

Sbaihia M. : Pr à l'université de chlef,

Benmehdi H. : Pr à l'université de Bechar,

Wink J. : Pr. Centre Helmholtz (Allemagne)

Je remercie toutes les personnes du centre de recherche sur les infections de Helmholtz (Allemagne) en particulier :

✓ Pr Marc Stadler pour sa disponibilité, ses conseils avisés, son expérience et sa rigueur scientifique dans la réalisation de ce travail.

✓ Pr Rolf Jansen et Dr Enge Sudarman pour leur aide dans la caractérisation chimique des molécules

✓ Pr Steinmann et son doctorant Praditya D. F. pour la réalisation de l'activité antivirale contre HCV et Mme W. Collisi pour la réalisation de la cytotoxicité des molécules pures.

✓ Mme Kakosche pour la réalisation des spectres de RMN

Je remercie tous les membres de LAMAABE de l'université ABB de Tlemcen et tous les enseignants et étudiants de l'université de Laghouat

Enfin, Je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

الهدف الرئيسي من البحث يتلخص في عزل مركبات جديدة ذات فاعلية من سلالات الأكتينومييسينات الجديدة المعزولة من التربة الجزائرية. تم عزل 294 مستعمرة من الأكتينومييسينات من عينات مختلفة من التربة مأخوذة من بيئتين مختلفتين : السبخات والنخيل، و التي تقع في مناطق مختلفة من الصحراء الجزائرية. تم التعرف على 41 سلالة من بين، 294 مستعمرة معزولة، اعتماداً على تحديد ٩ نتائج النيوكليوتيدات المورثة المشفرة ADNr16s. النتائج أظهرت وجود 9 أجناس والتي تنقسم إلى ست مجموعات مختلفة: *Streptomyces* ، *Nocardiopsis* ، *Micromonospora* ، *Actinomadura* ، *Actinocorallia* ، *Couchioplanes* ، *Verrucosisspora*

التوصيف الجزئي للسلالات الخمسة المختارة (A111 ، CG3 ، A79 ، A93 ، S26)، أظهر وجود أربع فئات جديدة. ولقد سمحت دراسة نواتج الأيضية الثانوية التي تفرزها هذه العزلات الخمس الى إختيار السلالة CG3، التي تتوفر فيها جميع الشروط المطلوبة. نتائج التصنيف المتعدد الأوجه للعزلة، CG3، أشارة إلى أنها تمثل نوعاً جديداً داخل الجنس *Nocardiopsis*، ولقد إقترحنا الإسم *Nocardiopsis becharensis* sp.nov من أجل تسمية هذه السلالة الجديدة. أفضل إستخلاص المواد الأيضية الثانوية المفرزة من قبل العزلة CG3، إلى عزل خمسة مركبات جديدة، والتي أطلقنا عليها تسمية Kenalactams A-E تتميز هذه المركبات الجديدة بتشاطها الميكروبي المعتدل ضد البكتيريا و الخميرة: (CMI : 66.7 - 66.7 µg/ml).

فيما أظهرت المركبات الجديدة فاعلية معتبرة ضد الخلايا السرطانية خاصتاً المركب Kenalactam C، الذي أظهر نشاطاً سميّاً ضد 4 خلايا سرطانية مختلفة، خاصة خلايا سرطان البروستات PC-3: IC50 : 2.1µM.

الكلمات المفتاحية: التربة الصحراوية، العزل، الأكتينومييسينات، التصنيف متعدد الأوجه، الأصناف الجديدة، النشاط الحيوي.

The main objective of our research work is to obtain new bioactive molecules from strains of actinomycetes isolated from Algerian soil.

294 colonies of actinomycetes were isolated from different soil samples taken from two types of environments, sebkhas and palms, located in different regions of the Algerian Sahara. 41 strains of actinomycetes, out of the 294 isolated colonies, are identified by the sequencing of their 16s rDNA. The results indicate the presence of 9 genera subdivided into six different clusters, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Couchioplanes*.

Partial characterization of the five selected strains (CG3, A111, A93, S26 and A79), out of 41 identified, indicates the presence of four new taxa. The study of the secondary metabolites secreted by these five isolates allows to select the strain CG3 which fills all the desired characters.

The full characterization of the CG3 isolate, by the polyphasic approach, indicates that it represents a new species within the genus *Nocardiopsis*, and the name *Nocardiopsis becharensis* sp. nov was proposed as the name of this new strain.

The extraction, purification and characterization of the secondary metabolites secreted by the new strain CG3 allow to obtain five new polyene macrolactams, called kenalactams A-E. these new molecules have moderate antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC range from 16.7 to 66.7 $\mu\text{g} / \text{ml}$), as well as against fungi *Candida albicans* and *Mucor hiemalis* with MIC: 66.7 $\mu\text{g} / \text{ml}$. However, these molecules showed interesting cytotoxic activity, especially for kenalactam C which was active against four different cancer cell lines, the highest activity was noticed against PC-3 or 'Human prostate cancer' with a value of IC50 of 2.1 μM .

The amino acids lysine, alanine and methionine are used as starters by the strain CG3 for the biosynthesis of two kenalactams A and B, whereas the kenalactams C-E are biosynthesized only when the two amino acids, methionine and phenylalanine, are used as the sole source. nitrogen in ISP medium + 3% NaCl without nitrogen source.

Keywords: Saharan soil, Isolation, Actinomycetes, Polyphasic axonomy, New taxa, Biological activity.

L'objectif principale de notre travail de recherche vise à obtenir de nouvelles molécules bioactives à partir des souches d'actinomycètes isolées du sol algérien.

294 colonies d'actinomycètes ont été isolées à partir de différents échantillons du sol prélevés dans deux types d'environnements, les sebkhas et les palmiers, localisés dans différentes régions du Sahara algérien. 41 souches d'actinomycètes, sur les 294 colonies isolées, sont identifiées par le séquençage de leurs ADNr 16s. Les résultats indiquent la présence de 9 genres subdivisés en six clusters différents, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Couchioplanes*.

La caractérisation partielle des cinq souches sélectionnées (CG3, A111, A93, S26 et A79), sur les 41 identifiées, indique la présence de quatre nouveaux taxons. L'étude des métabolites secondaires sécrétés par ces cinq isolats a permis de sélectionner la souche CG3 qui remplit tous les caractères recherchés.

La caractérisation complète de l'isolat CG3, par l'approche polyphasique, indique qu'elle représente une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiopsis*, dont la dénomination *Nocardiopsis becharensis* sp. nov a été proposée comme nom de cette nouvelle souche.

L'extraction, purification et la caractérisation des métabolites secondaires sécrétés par la nouvelle souche CG3 a permis l'obtention de cinq nouvelles macrolactams polyéniques, nommées kenalactams A-E. Ces nouvelles molécules présentent une activité antimicrobienne moyenne contre la bactérie *Staphylococcus aureus* (CMI varié de 16.7 à 66.7 µg/ml), ainsi que les champignons *Candida albicans* et *Mucor hiemalis* avec une CMI de 66.7 µg/ml.

Cependant, ces molécules ont montré une activité cytotoxique intéressante, surtout pour le kenalactam C qui a été actif contre quatre lignées cancéreuses différentes. La plus forte activité a été remarquée contre la lignée, PC-3 ou 'Human prostate cancer' avec une valeur de IC50 de 2.1 µM.

Les acides aminés, lysine, alanine et méthionine sont utilisés comme starters par la souche CG3 pour la biosynthèse des deux kenalactams A et B, alors que les kenalactams C-E, sont biosynthétisés uniquement quand on utilise les deux acides aminés, méthionine et phénylalanine, comme seule source d'azote dans le milieu ISP+3% NaCl sans source d'azote.

Mots clés : Sols sahariens, Isolement, Actinomycètes, Taxonomie polyphasique, Nouveaux taxons, Activité biologique.

BLAST: Basic Local Aligement Search Tool.
CAA: casein amidon agar.
CCM : Chromatographie sur couche mince.
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.
Cosy : COrrelation SpectroscopY.
DAP : Acide diaminopimélique.
DEBS : 6-deoxyerythronolide B synthases.
DH: Déhydratase.
DMSO: Diméthylsulfoxyde.
DSMZ: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.
EDTA: Ethylenediaminetetra acetic acid.
ESIMS: electrospray ionization mass spectrometry.
HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HRESIMS: High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry.
HSQC: Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy.
HPLC: High Performance Liquid Chromatography.
IC50 : Concentration inhibitrice médiane.
MTPA: α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid.
m/z : Rapport masse sur charge.
NCCB: Netherlands Culture Collection of Bacteria.
NRPS : non-ribosomal peptides synthetase.
PCR: Polymerase Chain Reaction.
PDA: Potato dextrose agar.
PKS : polycétide *synthase*.
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.
ROESY: Rotating-frame Overhauser SpectroscOPY.
TAE : Tris, Acétate, EDTA.
TMS : tétraméthylsilane.
Tris : trishydroxyméthylaminométhane.

Tableau 1 :	Les critères utilisés pour la description des colonies d'actinomycètes	32.
Tableau 2 :	Couleurs des différents phospholipides après révélation par les différents types de révélateurs chimiques.	38.
Tableau 3 :	corrélation entre la position de l'activité et le temps de rétention	42.
Tableau 4 :	Résultats d'isolement des actinomycètes à partir de chaque échantillon du sol enrichi et non enrichi.	51.
Tableau 5 :	Résultat de l'identification moléculaire des isolats d'actinomycètes sélectionnés.	54.
Tableau 6 :	Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats sélectionnés.	67.
Tableau 7 :	Propriétés antimicrobiennes des six souches d'actinobactéries sélectionnées (CMI : µg/ml).	76.
Tableau 8 :	Les caractères qui différencient la souche CG3 des autres espèces du genre <i>Nocardiopsis</i> .	81.
Tableau 9 :	Résultat de la recherche de la formule brute, C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₅ , dans le 'dictionnaire des produits naturels', qui correspond aux deux métabolites numéros 12 et 13 sécrétés par la souche CG3..	84.
Tableau 10 :	Résultat de la recherche de la formule brute, C ₂₃ H ₂₉ NO ₃ , dans le 'dictionnaire des produits naturels', qui correspond aux deux métabolites numéros 39 et 43, sécrétés par la souche CG3.	85.
Tableau 11 :	Les données de RMN ¹ H (700.4 MHz) et ¹³ C (176.1 MHz) des deux molécules 43 et 69 dans le DMSO.	90.
Tableau 12 :	Les données de RMN ¹ H (700.4 MHz) et ¹³ C (176.1 MHz) des deux molécules 61 et 78 dans le DMSO.	94.
Tableau 13 :	Activité antimicrobienne et cytotoxique des kenalactams A et C-E.	99.
Tableau 14 :	Résultats de la biosynthèse des kenalactams (A-E) en fonction de l'acide aminé ajouté au milieu ISP2 sans source d'azote.	101.

Figure 1 :	Structure de quelques molécules obtenues à partir du milieu marin.	5.
Figure 2 :	Structure de l'antifongique secrété par <i>Pseudonocardia</i> afin de controlé la croissance du champignon <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .	7.
Figure 3 :	Structure des macrotermycin B et sceliphrolactam secrétés respectivement par <i>Amycolatopsis sp. M39</i> et <i>Streptomyces sp.</i>	8.
Figure 4 :	Organisation d'un cluster de gènes pour la production d'un métabolite secondaire.	10.
Figure 5 :	Organisation des domaines dans un module minimal de PKS I.	11.
Figure 6 :	Les différentes réactions catalysées par les domaines minimaux (AT, ACP, KS) et auxiliaires (KR, DH, ER).	12.
Figure 7 :	Mécanisme de la biosynthèse de l'érythromycine A par 6-deoxyerythronolide B synthases (DEBS).	13.
Figure 8 :	Modèle de l'organisation structurale de PKSII.	14.
Figure 9 :	Mécanisme de la biosynthèse des polycétides aromatiques par PKSII.	14.
Figure 10 :	La structure de quelques molécules de type macrolides.	15.
Figure 11 :	La structure des deux polycétides aromatiques, oxytétracycline et doxorubicine.	16.
Figure 12 :	Réaction d'activation de deux monomères sélectionnés par les deux domaines A en aminoacyl-O-AMP.	17.
Figure 13 :	Formation d'une liaison aminoacyl-thioesters fixée aux domaines T.	18.
Figure 14 :	Formation de la liaison peptidique entre deux substrats aminoacyl-thioester par le domaine C.	18.
Figure 15 :	Réaction d'hydrolyse et de cyclisation de la chaine peptidique catalysée par le domaine thioesterase lors de l'assemblage de la surfactine.	19.
Figure 16 :	Biosynthèse linéaire d'ACV.	20.
Figure 17 :	Biosynthèse itérative de l'entérobactine.	20.
Figure 18 :	La biosynthèse non linéaire de vibriobactin.	21.
Figure 19 :	Structure des deux peptides non ribosomiques, pyoverdine et cyclosporine.	21.
Figure 20 :	Exemple d'une NRPS-PKS modulaire bactérienne.	22.
Figure 21 :	Structure des deux molécules hybride NRPS-PKS, la chaétoglobosine A et les épothilones A et B.	22.
Figure 22 :	Localisation des sites de prelevement des échantillons.	24.
Figure 23 :	Protocole de purification de l'ADN par l'utilisation du kit Invisorb Spin Plant Mini Kit.	28.
Figure 24 :	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster I et les souches-types des espèces les plus proches de genre <i>Streptomyces</i> .	56.
Figure 25 :	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster II et les souches-types des espèces les plus proches de genre <i>Nocardioopsis</i> .	58.
Figure 26 :	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de Neighbor-Joining, qui montrent les relations des souches appartriennent au cluster III et les souches-types des espèces les plus proches de genre <i>Saccharopolyspora</i> .	59.
Figure 27 :	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster IV et les souches-types des espèces les plus proches des genres <i>Actinomadura</i> et <i>Actinocorallia</i> .	61.
Figure 28 :	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au	63.

- cluster V et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Actinoplanes* et *Couchioplanes*.
- Figure 29 :** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster VI et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Planomonospora*, *Sphaerisporangium*, *Planobispora* et *Streptosporangium*. **65.**
- Figure 30 :** Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de la souche CG3 montrant des chaînes de spores courtes et droites à surface lisse, après croissance sur le milieu ISP3 additionnée de 3% de NaCl et incubé pendant 18 jours à 37 ° C. échelle : 200 nm. **69.**
- Figure 31 :** Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat S26 montrant les chaînes de spores entourées par une gaine épineuse. Échelle : 200 nm. **70.**
- Figure 32 :** Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat A79 montrant les sporanges disposés en deux rangées parallèles ressemblant à des bananiers (groupe de *P. parontospora*). Échelle : 200 nm. **71.**
- Figure 33 :** Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat A111 montrant des courtes chaînes d'arthrospores (3 à 5 spores) de surfaces lisses. Échelle : 200 nm. **73.**
- Figure 34 :** Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat A93, montrant de courtes chaînes d'arthrospores entourées par une gaine. Échelle : 200 nm. **75.**
- Figure 35 :** Résultats de l'analyse des phospholipides de l'isolat CG3T et ces espèces apparentées. **79.**
- Figure 36 :** Résultat de l'analyse des sucres de l'isolat CG3^T. **79.**
- Figure 37 :** Profile de fractionnement par HPLC de l'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3, préparé à partir de milieu SM+ 3 % NaCl, contre, A : *Staphylococcus aureus* ; B : *Mucor hiemalis*. **82.**
- Figure 38 :** Analyse de l'extrait brute méthanolique de l'isolat CG3^T, par HPLC couplé aux spectrométries de masse (HRESIMS). **83.**
- Figure 39 :** Spectre de HRESIMS du pic numéro 13 **83.**
- Figure 40 :** Spectre de HRESIMS du pic numéro 39 **84.**
- Figure 41 :** Spectre de HRESIMS du pic numéro 50. **86.**
- Figure 42 :** Spectre de HRESIMS de la molécule numéro 61. **87.**
- Figure 43 :** Spectre de HRESIMS de la molécule numéro 69. **87.**
- Figure 44 :** Spectre de HRESIMS de la molécule numéro 78. **87.**
- Figure 45 :** Spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 43. **88.**
- Figure 46 :** Structure complète de la molécule numéro 43. **90.**
- Figure 47 :** Spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 39. **91.**
- Figure 48 :** Structure complète de la molécule numéro 39. **92.**
- Figure 49 :** Spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 61. **93.**
- Figure 50 :** Structure complète de la molécule numéro 61. **93.**
- Figure 51 :** Spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 69. **95.**
- Figure 52 :** Structure complète de la molécule numéro 69. **95.**

- Figure 53 :** Spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 78. 96.
- Figure 54 :** Structure de la molécule numéro 78. 96.
- Figure 55 :** Structure des macrolactams structurellement apparentés avec les kenalactams A et B. 98.
- Figure 56 :** le spectre de ESIMS de l'expérience de l'alimentation de la souche CG3 par L-alanine-15N comme seule source d'azotes, qui indique l'augmentation du poids moléculaire de kenalactam A de $m/z = 367$ ($C_{23}H_{29}^{14}NO_3$) à $m/z = 368$ ($C_{23}H_{29}^{15}NO_3$) (dans le mode positif) ; alors que dans le mode négatif, le poids moléculaire de kenalactam A devient $m/z = 367.18$ $[M+H]^-$ pour $C_{23}H_{28}^{15}NO_3$. 102.
- Figure 57 :** Résultats de LC-MS, de l'extrait brut de la souche CG3, préparé après croissance sur le milieu ISP2 avec la méthionine comme source d'azote. 103.
- Figure 58 :** Un nouveau kenalactam avec le poids moléculaire de 351 g/mol détecté dans l'extrait brut de milieu ISP2 avec l'alanine comme seul source d'azote. 104.

	ملخص	I
Abstract.		II
Résumé.		III
Liste des abreviations.		IV
Liste des tableaux.		V
Liste des figures.		VI
Introduction.		1.
Revue bibliographique.		
1. Généralité sur les actinomycètes.		3.
2. La tendance actuelle pour l'obtention des nouvelles molécules bioactives à partir des actinomycètes.		3.
2.1 Le choix de l'habitat pour l'isolement des actinomycètes producteurs de nouvelles molécules bioactives.		4.
2.2 Les méthodes appliquées pour l'isolement des actinomycètes rares.		8.
3. Organisation génétique des gènes de la biosynthèse des métabolites secondaires bactériens.		9.
4. Les principales classes des métabolites secondaires obtenues à partir des actinomycètes.		10.
4.1 La classe des polycétides.		10.
4.1.1 Structure de PKS I et biosynthèse des macrolides.		10.
4.1.2 Structure de PKS II et biosynthèse des polycétides aromatiques.		13.
4.1.3 Structure de PKS III.		14.
4.1.4 Activité biologique des polycétides bactérienne.		15.
4.2 La classe des peptides non ribosomiques.		16.
4.2.1 Structure des Non-Ribosomal Peptide Synthétase.		17.
4.2.2 Mécanisme de la biosynthèse des peptides non ribosomiques.		19.
4.2.3 Activités biologiques des peptides non ribosomiques.		21.
4.3 La classe des molécules hybrides PKS-NRPS.		21.
Matériels et méthodes.		
I. Isolements, purifications et conservations des souches d'actinomycètes.		23.
1. Prélèvement des échantillons.		23.
2. L'enrichissement des échantillons du sol prélevés.		25.
3. Ensemencement et incubation.		25.
4. Purification et conservation des souches d'actinomycètes.		26.
5. Observation et sélection des souches d'actinomycètes.		26.
II. Identification moléculaire et analyses phylogénétiques des souches d'actinomycètes sélectionnées.		27.
1. Extraction d'ADN.		27.
2. Amplification de l'ADNr16 par PCR.		29.
3. Séquençage de l'ADNr 16s.		30.
4. Analyses phylogénétiques.		30.
5. Hybridation ADN-ADN.		31.
III. Etude taxonomique des nouveaux isolats d'actinomycètes.		31.
1. Etude morphologique.		31.
1.1. Caractères cultureux.		31.
1.2 Etude micro-morphologique.		32.
2. Etude physiologique et biochimiques		32.

2.1. Résistance à différentes concentrations de NaCl	32.
2.2. Tolérance à différents pH	33.
2.3. Croissance à différentes températures	33.
2.4. Utilisation de différentes sources de carbone	33.
2.5. Utilisation de différentes sources d'azote	34.
2.6. D'autres tests biochimiques	34.
3. Étude chimiotaxonomique des constituants cellulaires.	34.
3.1. Préparation de la biomasse	34.
3.2. Détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et détection de la glycine.	34.
3.3. Analyse des sucres cellulaires	35.
3.4. Analyse des phospholipides membranaires	36.
3.5. Identification des acides gras membranaires	38.
3.6. Analyse des menaquinones.	39.
IV. Activité antimicrobienne et étude des molécules bioactives sécrétées par les souches d'actinomycètes sélectionnées.	40.
1. Préparation de l'extrait brut.	40.
2. Activité antimicrobienne.	40.
2.1. Les souches tests utilisées.	40.
2.2. Détermination de l'activité antimicrobienne par la technique de dilution sur des microplaques de 96 puits.	41.
3. Fractionnements des extraits bruts et localisation des molécules bioactives.	41.
4. Analyse des extraits bruts par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.	43.
5. Recherche des molécules intéressantes dans les bases de données.	43.
V. Fermentation, extraction et purification des molécules bioactives à partir de la souche sélectionnée.	43.
1. Critères fixés pour la sélection de la souche d'actinomycète.	43.
2. Fermentation.	44.
3. Extraction et purification des métabolites secondaires sécrétés par la souche CG3.	44.
3.1. Extraction des métabolites à partir de XAD.	44.
3.2. Extraction et purification des métabolites secondaires à partir de la biomasse.	45.
4. Détermination de la structure des métabolites secondaires sécrétés par la souche CG3.	46.
5. Caractérisation chimique des métabolites purs de la souche CG3.	46.
5.1. Détermination de la configuration absolue.	46.
5.2. Détermination de la rotation optique.	47.
5.3. Détermination du spectre UV-visible et calcul du coefficient d'absorption molaire.	47.
6. Mise en évidence de l'activité biologique des métabolites purs de la souche CG3.	48.
6.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.	48.
6.2. Activité cytotoxique.	48.
7. L'expérience de l'alimentation (feeding experiment).	49.
Résultats et discussions.	
I. Résultats d'isolement des actinomycètes à partir de différents échantillons du sol.	51.
II. Identification moléculaire et étude phylogénétique des souches d'actinomycètes isolées.	53.
1. Actinomycètes du cluster I.	55.
2. Actinomycètes du cluster II.	57.
3. Actinomycètes du cluster III.	59.
4. Actinomycètes du cluster IV.	60.
5. Actinomycètes du cluster V.	61.

6. Actinomycètes du cluster VI.	63.
III. Description morphologique, physiologique et biochimique des souches d'actinomycètes sélectionnées.	66.
1. Description de l'isolat CG3.	68.
2. Description de l'isolat S26.	70.
3. Description de l'isolat A79.	71.
4. Description de l'isolat A111.	72.
5. Description de l'isolat A93.	74.
IV. Etude des propriétés antagonistes des six isolats d'actinomycètes sélectionnés.	75.
V. Hybridation ADN-ADN et description de <i>Nocardiopsis becharensis</i> nov sp.	78.
1. Hybridation ADN-ADN.	78.
2. Etude taxonomique de l'isolat CG3 et description de <i>Nocardiopsis becharensis</i> sp. nov.	78.
VI. Etude des métabolites secondaires sécrétés par l'isolat CG3.	82.
1. Fractionnement de l'extrait brut méthanolique et localisation des métabolites bioactive sécrétés par l'isolat CG3.	82.
2. Détermination des formules brutes des métabolites secrétée par l'isolat CG3 par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HRESIMS).	83.
3. Détermination de la structure des cinq nouveaux métabolites.	88.
3.1 Détermination de la structure de la molécule numéro 43.	88.
3.2 Détermination de la structure de la molécule numéro 39.	91.
3.3 Détermination de la structure de la molécule numéro 61.	92.
3.4 Détermination de la structure de la molécule numéro 69.	94.
3.5 Détermination de la structure de la molécule numéro 78.	95.
VII. Mise en évidence de l'activité biologique des nouvelles kenalactams A-E.	98.
VIII. Détermination des acides aminés starters utilisés par la souche CG3 pour la biosynthèse des kenalactams A-E, par l'expérience d'alimentation.	100.
Conclusion générale et perspectives.	105.
Références Bibliographiques.	108.
Annexes.	125.

Liste des publications

Messaoudi, O; Bendahou, M; Benamar, I; Abdelwouhid, D, E. Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2015, 5, 438–445.

Messaoudi, O; Sudarman, E; Bendahou, M; Jansen, R; Stadler, M; Wink, J. Kenalactams A-E, Polyene Macrolactams Isolated from *Nocardioopsis* CG3. J Nat Prod. 2019; 82 (5): 1081-1088.

Liste des communications

Internationales :

- **MESSAOUIDI, O.** Actinomycetes from unexplored regions of Algeria: isolation, identification and characterization of bioactive compounds. 8th annual retreat. **16-18 mai 2017.** Goslar Hahnenklee. **Allemagne.** Communication orale.
- **MESSAOUIDI O.** Identification and characterization, of bioactive compound, secreted by strain of *Nocardioopsis* CG3 sp isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. 7th HIPS SYMPOSIUM on pharmaceutical sciences devoted to infection research. **29 Juin 2017.** Saarbruken.
- **MESSAOUIDI O.** Biodiversity and description of some new taxa of rare actinobacteria isolated from Sahara soil of Algeria. 10th International PhD Symposium. **7 December 2017.** Braunschweig **Allemagne.**

Nationales:

- **MESSAOUIDI, O;** Bendahou, M; Sudarman, S, ; Wink, J; Jansen, R; Stadler, M. Purification et caractérisation des kenalactams A-E à partir de la nouvelle souche *Nocardioopsis* CG3. Alimentation, Santé et Environnement: Avancées et Perspectives. **25 et 26 Septembre 2019.** Bejaia, **Algerie.**

Introduction

À l'heure actuelle, la résistance bactérienne aux antibiotiques et l'émergence de différents types de maladies comme le cancer, le sida et l'hépatite C, constituent un vrai problème de santé publique (Aslam et al, 2018; Thornton et al, 2017). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS ; 2016), les maladies infectieuses graves, comme la tuberculose et les infections des voies respiratoires inférieures, ainsi que les différentes tumeurs malignes en plus du sida, sont classées parmi les dix principales causes de mortalité au niveau mondial.

Devant ces problèmes, la recherche de nouvelles molécules bioactives est plus que nécessaire pour lutter contre ces maladies. Parmi les sources les plus prometteuses de substances bioactives, on trouve les microorganismes, en particulier les actinomycètes, qui sont des bactéries à Gram positif avec un pourcentage de G+C élevé, dont la majorité tend à former un mycélium ramifié (Al-Dhabi et al, 2018).

L'intérêt majeur que suscitent les actinomycètes est leur pouvoir à produire des métabolites secondaires à différentes activités biologiques, à savoir, les antibiotiques, les antifongiques (Saturnino et al, 2017), les anticancéreux (Sui et al, 2014), les antiparasitaires (Nguyen et al, 2018), les immunosuppresseurs, les antioxydants, les insecticides, et les herbicides (Kumar et Jadeja, 2016). En effet, sur les 22 000 molécules bioactives isolées à partir des microorganismes, environ de la moitié de ces molécules sont produites par des actinomycètes, en particulier le genre *Streptomyces*, qui fournit à lui tout seul, 70% des antibiotiques utilisés pour le traitement des différents types d'infections (Ram, 2014).

Depuis la découverte de la streptomycine, sécrétée par l'espèce *Streptomyces griseus* par Waksman en 1943, les recherches sur les métabolites secondaires des *Streptomyces* ne se sont pas arrêtées, ce qui implique que la probabilité d'obtenir de nouvelles molécules bioactives à partir de ce genre, est devenue de plus en plus faible, à cause des interactions génétiques entre les espèces dans l'environnement (Ding et al, 2019). C'est pourquoi, la tendance actuelle est orientée vers l'exploitation de métabolismes secondaires des nouvelles souches rares d'actinomycètes et de culture difficile, isolés à partir des environnements négligés (non ou peu exploités) (Dhakal et al, 2017). En générale, une nouvelle souche, doit contenir des nouveaux clusters de gènes qui codent pour de nouvelles molécules bioactives (Jiang et al, 2016).

Le sol du Sahara algérien abrite une diversité microbienne abondante digne d'intérêts vu le nombre de nouveau taxon d'actinomycètes isolés (Zitouni et al., 2004; ; Badji et al., 2006; Toumatia et al., 2014; Aouiche et al., 2015; Boubetra et al, 2015; Boudjelal et al, 2015 ; Bouras et al., 2015; Driche et al., 2015; Messaoudi et al., 2015 ; Saker et al, 2015 ; Yekkour et

al., 2015; Bouznada et al, 2017 ; Chaabane et al, 2017), dont certains produisent de nouvelles molécules bioactives. En effet, Boudjella et al, 2010, ont purifié, à partir de la souche *Streptosporangium* sp. Sg3, une nouvelle molécule antimicrobienne qui appartient à la classe d'angucyclinone. Merrouche et al, (2010) et ont obtenu trois nouveaux dérivés de l'antibiotique, dithiopyrrolone, à partir de l'espèce *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Aussi, deux nouveaux dérivés de l'angucycline appelés, Mzabimycins A et B, ont été obtenus à partir de la souche *Streptomyces* sp. PAL114 par Tata et al, 2019).

En tenant compte du besoin mondial de trouver de nouvelles substances bioactives, nous nous sommes intéressés à certaines régions du sol du Sahara algérien, afin d'obtenir de nouveaux taxons d'actinomycètes qui secrètent des nouvelles molécules bioactives.

Pour atteindre l'objectif fixé nous avons suivi la démarche suivante :

- Isolement des actinomycètes à partir de deux environnements localisés dans différentes régions de l'Algérie : les sebkhas et les palmiers dattiers.
- Identification moléculaire, sur la base du séquençage de l'ADN ribosomal 16s, des souches d'actinomycètes sélectionnées.
- Caractérisation taxonomique des nouvelles souches obtenues.
- Étude des métabolites secondaires sécrétés par les souches sélectionnées.
- Extraction, purification et détermination de la structure des métabolites secondaires retenus.
- Mise en évidence de l'activité biologique des nouvelles molécules obtenues.

Revue Bibliographique

1. Généralité sur les actinomycètes.

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif possédant un pourcentage élevé en G+C. Ils sont classés dans le phylum des *Actinobacteria*, qui sont décrits dans le cinquième volume de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Ahmad et al, 2017). Ces bactéries sont généralement terrestres ou aquatiques (Kamjam et al, 2017). Morphologiquement, les actinomycètes incluent des espèces formant des bacilles isolés comme le cas du genre *Mycobacterium*, d'autres formant un mycélium très fragmenté à maturité, comme le genre *Nocardia*, alors que certains d'autres formant un mycélium stable et ramifié, comme dans le cas du genre *Streptomyces* (Hoza et al, 2016).

Les actinomycètes sont très divers dans leurs physiologies. En effet, certaines espèces sont thermophiles, et peuvent croître à des températures comprises entre 37-65 °C, avec un optimum entre 55-60 °C, c'est le cas par exemple des espèces qui appartiennent au genre *Thermomonospora* (Mazkour et al, 2017). D'autres espèces peuvent croître à des valeurs de pH faible qui peuvent atteindre un pH de 3.5, c'est le cas par exemple des espèces qui appartiennent au genre *Streptacidiphilus*, qui sont strictement acidophiliques (Kim et al, 2015), de même plusieurs espèces sont halophiles, et peuvent de ce fait tolérer des valeurs de NaCl très élevés comme par exemple les genres, *Salinispora*, *Nocardiopsis*, *Streptomonospora* (Mohamed et al, 2017).

Les actinomycètes peuvent avoir différents modes de vie. En effet certaines espèces sont commensales des cavités naturelles humaines et animales, comme les genres : *Bifidobacterium* et *Actinomyces* (Kononen et al, 2015). D'autres sont pathogènes à l'homme comme le cas des espèces de *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium diphtérie* (Lin et al, 2017 ; Belchior et al, 2017), alors que la plupart sont des saprophytes, jouant un rôle essentiel dans la décomposition des macromolécules dans le sol, ce qui contribue de ce fait au recyclage de la matière organique (Meij et al, 2017). Ces bactéries ont une valeur biotechnologique importante du fait que presque 10,000 molécules bioactives ont été obtenues à partir des actinomycètes, ce qui représente 45 % du total des métabolites secondaires obtenus à partir de toutes les bactéries (Ranjani et al, 2016).

2. La tendance actuelle pour l'obtention des nouvelles molécules bioactives à partir des actinomycètes.

Les actinomycètes continuent toujours d'attirer l'attention des chercheurs autour du monde, car ces bactéries produisent une variété de métabolites secondaires avec différentes activités biologiques, y compris les antibiotiques, des anticancéreuses, des antiparasitaires, des antiviraux et des pesticides (Meij et al, 2017).

En raison de la surexploitation des métabolites secondaires sécrétés par les actinomycètes, surtout ceux appartenant au genre *Streptomyces*, isolés à partir des habitats communs par l'utilisation des techniques conventionnelles (Jose et al, 2014). La tendance actuelle est l'exploitation des métabolites secondaires sécrétés par des actinomycètes appartenant aux genres rares et difficilement cultivables (Salimi et al, 2017).

Donc une nouvelle souche obtenue à partir d'un habitat non exploité, peut contenir de nouveaux clusters de gène qui peuvent produire des nouvelles molécules (Grasso et al, 2016).

2.1 Le choix de l'habitat pour l'isolement des actinomycètes producteurs de nouvelles molécules bioactives.

➤ Le milieu marin.

Les écosystèmes marins, représentent l'un des habitats les plus riches et les moins exploités, avec une grande diversité microbienne et un potentiel élevé de découverte de nouvelles molécules bioactives (Xu et al, 2018). En effet, les sédiments marins prélevés dans différentes profondeurs de l'océan représentent l'une des ressources riches en actinomycètes rares et nouveaux. Par exemple, l'exploitation des métabolites secondaires sécrétés par la souche *Salinispora* CNB-392, identifié comme *Salinispora tropica*, indique qu'elle produit une nouvelle famille de molécules nommée salinosporamide, dont le salinosporamide A (Jensen et al, 2015) (figure 1). Cette molécule est actuellement au stade clinique pour le traitement du myélome multiple. L'eau de mer prélevée à partir de l'océan abyssal, représente aussi une source riche en actinomycètes fournisseur de nouvelle molécule bioactive.

Récemment, Braña et al, 2017, ont isolé une souche d'actinomycète, *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227, qui produit une nouvelle famille de molécules, les branimycins (B-C) (figure 1), qui montrent une activité antibactérienne contre différentes bactéries à Gram positif, *Corynebacterium urealyticum*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus*, et à Gram négatif, *Neisseria meningitidis*.

Parmi les écosystèmes les plus extrêmes et les plus dynamiques sur terre, ce sont les sources hydrothermales, et les événements hydrothermaux situés sur l'axe des dorsales océanique (Thornburg et al., 2010). Ces endroits extrêmes comportent une communauté très dense et biologiquement diverse de microorganismes, dont les actinomycètes, avec un métabolisme distinct basé sur la chimioautotrophie et qui peut fournir de nouvelles molécules bioactives (Thornburg et al., 2010). Cependant, on connaît très peu sur la biodiversité des actinomycètes dans cet endroit extrême à cause de la difficulté d'échantillonnage.

Certains actinomycètes forment des associations symbiotiques avec de très nombreux invertébrés marins, en particulier les éponges, les coraux, les ascidies et les cnidaires (Subramani et al., 2019). Plusieurs auteurs ont suggéré que les actinomycètes contribuent, par la sécrétion de différents métabolites secondaires, à la protection de ces animaux marins (Behie et al., 2017 ; Brinkmann et al., 2017). De ce fait, plusieurs nouvelles molécules ont été obtenues à partir d'actinomycètes isolés de ces animaux fossiles (Sarmiento-Vizcaíno et al, 2017 ; Mahmoud et al, 2016). Alyaa et al, 2018, ont purifié un nouveau peptide cyclique, nocardiotide A (figure 1), qui possède des propriétés cytotoxiques, à partir d'une souche de *Nocardioopsis* sp. UR67, isolé de l'éponge marine *Callyspongia* sp, collecté de la mer rouge. La thiocoraline est un thiodepsipeptide cyclique qui a été purifié à partir de la souche *Micromonospora* sp. L-13-ACM2-092, isolé d'un corail collecté près de la côte du Mozambique. Cette molécule a montré une activité antitumorale puissante contre plusieurs lignées cellulaires P388, A549 et MEL288 (Alharbi, 2016).

En plus des éponges marines, plusieurs auteurs ont confirmés la richesse des coraux par les actinomycètes sécrètent des nouvelles molécules bioactives (Sarmiento-Vizcaíno et al, 2017 ; Mahmoud et al, 2016).

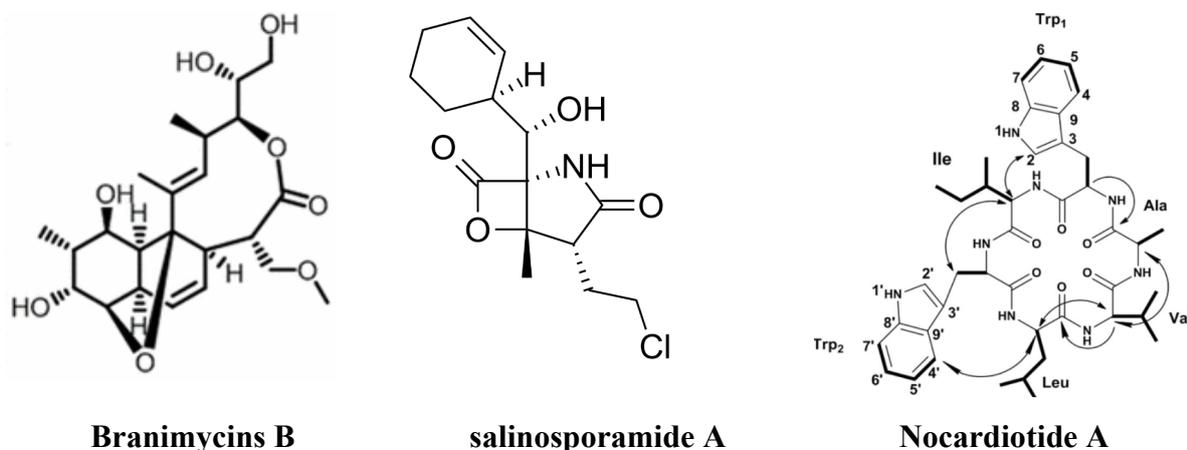


Figure 1 : Structure de quelques molécules obtenues à partir du milieu marin (Jensen et al, 2015; Braña et al, 2017; Alyaa et al, 2018).

➤ Les milieux terrestres extrêmes.

Les échantillons provenant d'environnement extrême terrestre, tels que les déserts, les grottes, les milieux sahariens arides, les sebkhas, les lacs salés ainsi que les échantillons recueillis à des altitudes élevées des montagnes, offrent la possibilité d'isolement des nouvelles souches d'actinomycètes producteurs de nouvelles molécules bioactives. En effet, à partir de la souche *Streptomyces* sp. isolat, ERI-26, isolée d'un échantillon provenant des montagnes indiennes, Duraipandiyam et al, 2016, ont purifiés une nouvelle anthraquinone, qui présente une faible

activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif et négatif. Ainsi, le criblage de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes obtenus à partir de différents échantillons du sol prélevés du Sahara Algérien, à révéler que trois souches de *Streptomyces*, parmi 32 isolats obtenus, ont montré une très bonne activité antimicrobienne contre différents microorganismes teste utilisés (Mohamed et al, 2017). De même, des échantillons prélevés à partir des grottes volcaniques localisées dans différents endroits dans le monde par Riquelme et al, 2015, ont montré que cet habitat présente un potentiel important pour l'isolement de nouvelle souche d'actinomycètes producteurs de substances bioactives.

➤ **Les racines des plantes.**

La plupart des actinomycètes décrits sont des bactéries saprophytes jouant un rôle important dans l'environnement par la décomposition de la matière organique, et contribuent dans le cycle du carbone et de l'azote (Limaye et al, 2017). D'autres actinomycètes dits endophytes, accomplissent tout ou une partie de leur cycle de vie à l'intérieur des racines d'une plante, sans conséquences négatives pour cette dernière (Matsumoto et al, 2017). Le premier actinomycète endophyte isolé à partir des plantes est le genre *Frankia*, qui formant des nodules sur les racines des plantes hôtes et contribue ainsi à la fixation de l'azote (Cissoko et al, 2018). Après, d'autres actinomycètes endophytes, tels que, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* et *Microbispora*, ont été isolés à partir des racines de différentes plantes (Trujillo et al, 2015). Ces actinomycètes assurent différents rôles pour les plantes hôtes, contribuant ainsi à leur protection, grâce à la sécrétion de différentes substances bioactives (antibactérienne, antiparasitaire, antifongique), et à la stimulation de la croissance des plantes hôtes par la sécrétion des phytohormones végétales indispensables aux développements des plantes telle que l'auxine et la gibberelline (Anwar et al, 2016 ; Patel et al, 2017).

Les actinomycètes endophytes sont une source riche pour la recherche des nouveaux composés bioactifs, et les études réalisées sur les endophytes confirment toutes leurs richesses par les actinomycètes rares (Kadiri et al, 2014 ; Golinska et al, 2015 ; Chaurasia et al, 2018). En effet, Gos et al, 2017, ont isolés 10 genres différents d'actinomycètes rares, à partir de la plante, *Vochysia divergens*, collecté d'une région inexploitée du Brésil. Les souches ont été identifiées comme *Aeromicrobium*, *Actinomadura*, *Microbacterium*, *Microbispora*, *Micrococcus*, *Sphaerisporangium*, *Streptomyces* et *Williamsia*.

➤ **Les actinomycètes symbiotiques avec les insectes.**

Certaines espèces d'actinomycètes ont naturellement développé une relation symbiotique avec des insectes guidés par une adaptation co-évolutive (Van der Meij et al, 2017). Le cas par exemple des fourmis coupeuses de feuilles, aussi appelées fourmis champignonnières, comme les espèces des genres *Atta* et *Acromyrmex*, sont des fourmis vivant dans les régions d'Amérique tropicale. Afin de se nourrir, elles ont développé une symbiose avec un champignon, *Leucoagaricus gongylophorus*, qu'elles cultivent dans leur fourmilière (Heine et al, 2018). La fourmi utilise diverses variétés de fleurs et de plantes, qu'elles découpent en petits morceaux et l'utilisent comme substrat afin de cultiver leur champignon. En parallèle, l'insecte forme une autre relation symbiotique avec des actinomycètes qu'ils les sélectionnent à partir du sol et qui ont la capacité de sécréter des molécules antifongiques pour contrôler la croissance de *Leucoagaricus gongylophorus*. L'exemple idéal est celui de la fourmi, *Apterostigma dentigerum*, qui forme une relation symbiotique avec l'actinomycète *Pseudonocardia*, qui sécrète un antifongique appelé la dentigerumycine afin de contrôler la croissance du champignon (Barke et al, 2010) (figure 2).

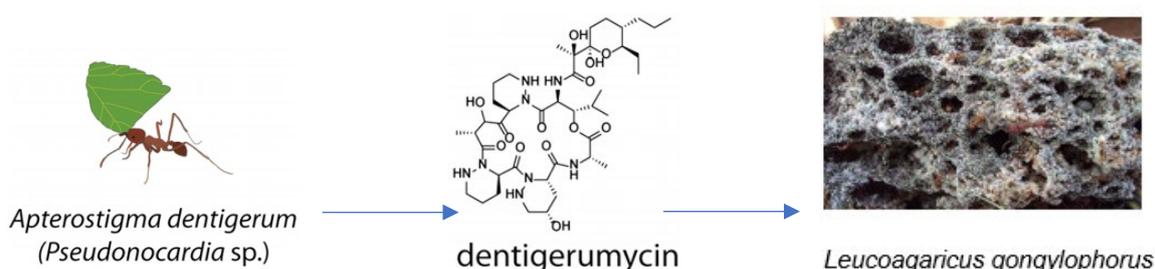


Figure 2 : Structure de l'antifongique dentigerumycine secrétée par *Pseudonocardia* pour contrôler la croissance du champignon *Leucoagaricus gongylophorus* (Barke et al, 2010).

Un nouveau polyène macrolactam, sceliphrolactam (figure 3), a été obtenu à partir d'une souche de *Streptomyces* sp qui vit en symbiose avec la guêpe maçonner, *Sceliphron caementarium*. Cette molécule montre une très bonne activité antifongique contre les espèces de *Candida albicans* résistante à l'amphotéricine B (CMI = 4 µg/mL, 8.3 µM) (Oh et al, 2010). De même, à partir de la souche d'actinomycètes, *Amycolatopsis* sp. M39, qui forme une relation symbiotique avec les termites, une nouvelle famille de macrolactams glycosylés a été purifiée, les macrotermycines (figure 3), ces molécules assurent la protection des termites contre *Pseudoxylaria*, qui est un champignon pathogène pour ces derniers (Beemelmans et al, 2017).

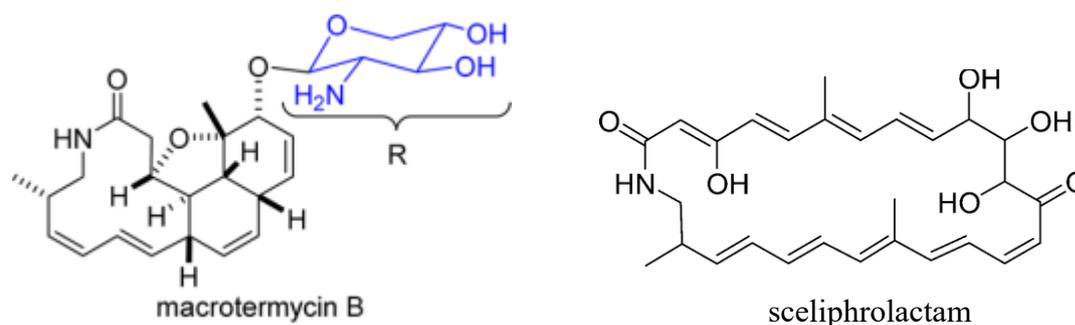


Figure 3 : Structure des macrotermycin B et sceliphrolactam sécrétés par *Amycolatopsis sp. M39* et *Streptomyces sp* respectivement (Oh et al, 2010; Beemelmans et al, 2017).

2.2 Les méthodes appliquées pour l'isolement des actinomycètes rares.

La grande majorité des bactéries, dont les actinomycètes, qui existe sur terre sont difficiles à isoler. Cette difficulté est due principalement aux techniques appliquées pour l'isolement de ces bactéries qui sont considérées comme une source de nouvelles molécules bioactives (Arocha-Garza et al, 2017). En effet, les méthodes conventionnelles basées sur la préparation des dilutions puis l'ensemencement des milieux de cultures non sélectifs, ne conduisent, dans la majorité des cas, qu'à l'obtention des actinomycètes connus, surtout ceux qui appartiennent au genre *Streptomyces*. Plusieurs techniques, basées principalement sur le prétraitement et l'enrichissement des échantillons du sol, ont été appliquées pour l'obtention des actinomycètes rares et peu fréquents.

Hayakawa et al, 1991a, ont proposé une technique pour l'isolement sélectif des *Microbispora* basé, sur le séchage des échantillons du sol à l'air chauffé à 120°C pendant 1 h.

Une autre technique consiste à utiliser une suspension aqueuse de l'échantillon du sol chauffé à 120 °C pendant une heure puis traité avec une solution de 1.5% de phénol et 0,03% de gluconate de chlorhexidine (CG), dans le but d'éliminer les bactéries indésirables. La suspension est ensuite ensemencée sur le milieu acide humique-vitamine additionnée avec l'acide nalidixique (Hayakawa et al, 1987).

Plusieurs auteurs ont confirmé l'efficacité de la technique de centrifugation-hydratation pour l'obtention des actinomycètes formants des zoospores, *Actinokineospora*, *Catenuloplanes*, *Kineosporia*, *Actinosynnema*, *Geodermatophilus* et *Sporichthya* (Hayakawa et al, 2000). D'autres techniques ont été proposées par le même auteur et ses collaborateurs pour l'obtention des actinomycètes rares qui forment des sporanges, *Streptosporangium*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* (Hayakawa et al, 1991b ; Hayakawa et al, 1997 ; Hayakawa et al, 1991c).

3. Organisation génétique des gènes de la biosynthèse des métabolites secondaires bactériens.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires chez les actinomycètes sont généralement regroupés dans le génome ou, rarement, dans un plasmide circulaire. Ces gènes sont organisés en clusters, qui sont un groupe de gènes biosynthétiques contenant de nombreux gènes groupés les uns derrière les autres, au niveau d'une même région du chromosome bactérien, comportant une ou plusieurs unités de transcription (Wei et al, 2018).

Chaque cluster de gène, contient entre 10 à 50 gènes remplissant différentes fonctions. En effet il y a (figure 4) :

➤ Des gènes de régulations :

La régulation est assurée par le système opérant qui existe en amont des gènes de structures.

➤ Les gènes de structures :

Après leurs transcriptions par l'ARN polymérase, les gènes de structures vont donner un ARNm qui sera ensuite traduit par des ribosomes pour donner une protéine.

Cette dernière correspond à l'enzyme impliquée dans la biosynthèse du métabolite secondaire, qui peut être un polycétide synthase (PKS) ou un Non ribosomal peptide synthase (NRPS) ou d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de différents métabolites secondaires.

➤ Des gènes impliqués dans la modification post-synthèse du métabolite secondaire :

Après la synthèse de la structure de base de la molécule, plusieurs métabolites secondaires subissent des modifications post-synthèses, qui incluent, la chloration, la méthylation, la glycosylation, la N-acylation, etc. Ces modifications post-synthèse ont pour but d'améliorer la stabilité de la molécule et assurent la protection de la molécule contre l'attaque par des enzymes intracellulaires.

➤ Un gène de transport : qui code pour un transporteur protéique, impliqué dans le transport de métabolite secondaire à l'extérieur de la cellule.

➤ Un gène d'immunité : codant une protéine d'immunité impliquée dans la protection de la souche productrice contre son propre métabolite secondaire, surtout lorsqu'il s'agit d'une molécule antibactérienne.



Figure 4 : Organisation d'un cluster de gènes pour la production d'un métabolite secondaire (Grasso et al, 2016).

4. Les principales classes des métabolites secondaires obtenues à partir des actinomycètes.

4.1 La classe des polycétides.

Cette classe de molécules prend une place importante, surtout dans le domaine médical humain et animal. En effet plusieurs médicaments utilisés comme des antibiotiques, des antifongiques, des antiparasitaires et des anticancéreux sont des polycétides. Ces molécules naturelles sont produites principalement par les bactéries et les champignons ainsi que certaines plantes (Müller et al, 2015).

Les polycétides sont synthétisés par une condensation successive de petit acide carboxylique sous forme d'acyle-COA. Le résultat est une chaîne d'alternance de groupes cétone ($>C=O$) et de groupe méthylène ($-CH_2-$) d'où provient le nom des polycétides (plusieurs cétide). Cette condensation est catalysée par des enzymes appelées, les polycétides synthases (PKS). La chaîne de polycétide nouvellement formée subit plusieurs modifications de réduction, de méthylation, de déshydratation et de la cyclisation, pour donner à la fin une famille très diverse de molécules (Chen et al, 2016). La biosynthèse de différents polycétides est catalysé par des enzymes appelées, les polycétides synthases (PKS), on distingue trois types de PKS (I, II et III) :

4.1.1 Structure de PKS I et biosynthèse des macrolides.

Ce sont des mégas-enzymes multifonctionnelles, qui possèdent une organisation soit modulaires soit itératives :

- Les PKS de type I itérative, l'extension de la chaîne du polykétide se réalise au sein d'un seul module, dans ce cas le site actif est utilisé de façon répétitive durant la condensation de la chaîne carbonée à partir des unités d'élongation. C'est le cas de PKS responsable de la production d'aflatoxines chez *A. flavus* (Chen et al, 2016).
- Les PKS du type I modulaire, regroupent plusieurs sites actifs ou module. Chaque module est formé au minimum par trois domaines (appelés aussi domaine minimal), qui sont (Barajas et al, 2017) :

- **Keto Synthase (KS)** : catalyse la réaction de condensation de deux unités de construction du polykétide entre elles, en catalysant la formation de liaisons carbone-carbone, avec libération de CO₂.
- **Acyl Transferas (AT)** : responsable du recrutement des différents blocs de constructions nécessaires à la formation du polykétide (acyl COA).
- **Acyl Carrier Protein (ACP)** : sert à porter la chaîne de la polycétide en élongation au cours des cycles de synthèse sur la PKS.

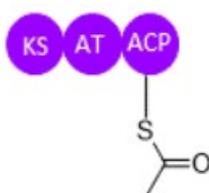


Figure 5 : Organisation des domaines dans un module minimal de PKS I.

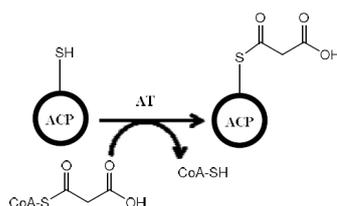
La chaîne de polycétides en élongation subit, au fur et à mesure de leur synthèse, des modifications structurales par des domaines auxiliaires, qui sont :

- Le domaine *Keto-Reductase* (KR) : réduit le groupe β -cétone en groupe β -hydroxy.
- Le domaine *DeHydratase* (DH) : catalyse la réaction de déshydratation, par libération de H₂O, ce qui entraîne la formation d'une double liaison.
- Le domaine *Enoyl-Reductase* (ER) : réduit la double liaison, générée par les domaines DH, en liaison simple.
- Le domaine *Methyl Transferase* (MT) : catalyse l'addition d'un groupe méthyle.

Les PKS du type I modulaire catalysent typiquement la biosynthèse des macrolides. Cette classe de molécules prend une place majeure dans le domaine médical, du fait que plusieurs médicaments sont des macrolides. La biosynthèse des macrolides par les PKS du type I modulaire passe par trois étapes :

➤ **La phase d'initiation.**

Catalysé par un module d'initiation formé par deux domaines, acyltransférase (AT) et acyl carrier protein (ACP), le domaine AT catalyse l'attachement de l'unité de starter, au groupement thiole (SH) de l'ACP, selon la réaction ci-après (**Keating et al, 1999**) :



➤ **La phase d'élongation.**

Dans cette étape plusieurs modules interviennent. Le nombre et l'ordre des modules du PKS I déterminent la longueur de la chaîne carbonée de la molécule. Chaque module est utilisé une seule fois durant l'assemblage de la molécule, la composition de chaque module en domaine, surtout les domaines auxiliaires, détermine le niveau de la réduction, de la déshydratation, et de la méthylation, de la chaîne de polycétide en extension.

Les différentes réactions qui se produisent durant cette phase sont résumées dans la **figure 6 (Walsh, 2013)** :

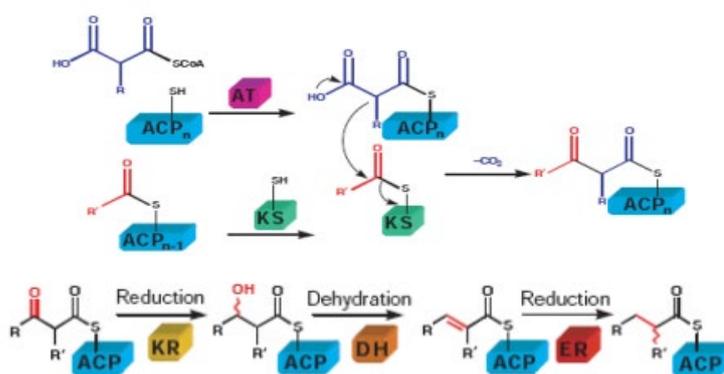


Figure 6 : Les différentes réactions catalysées par les domaines minimaux (AT, ACP, KS) et auxiliaires (KR, DH, ER) (Cane et al, 1999).

➤ **Phase de terminaison.**

Une thioestérase (TE) intervient à la fin de la synthèse pour libérer la chaîne de polycétide liée au domaine ACP de la polycétide synthase (Keating et al, 1999).

L'exemple le plus étudiés des PKS du type I modulaire est la PKS responsable de la biosynthèse d'érythromycine A chez *Saccharopolyspora erythraea*. Appelé aussi 6-deoxyerythronolide B synthases (DEBS). Cette enzyme est codée par trois gènes différents : eryAI (DEBS1), eryAII (DEBS2) et eryAIII (DEBS3). La première protéine, DEBS1, est formée par trois modules dont, le module d'initiation, la deuxième protéine est formée par deux modules, alors que

la dernière protéine est formée par trois modules dont le module de terminaison (TE) (Cane et al, 2010) (figure7).

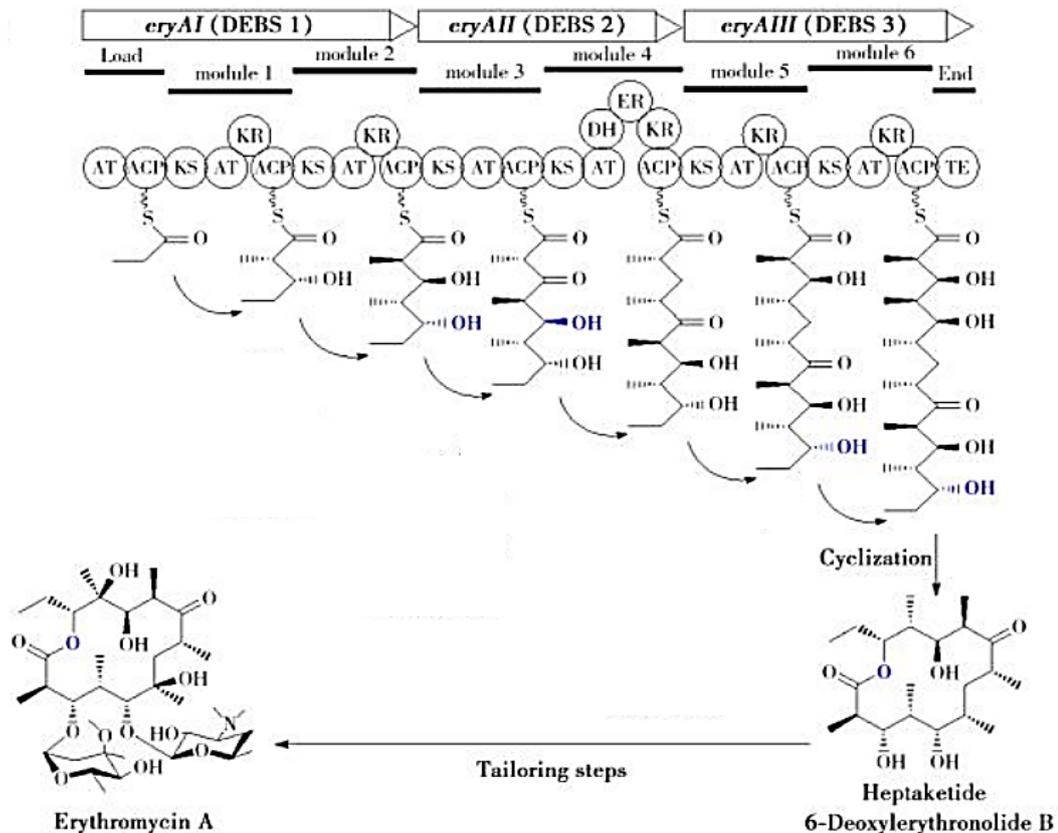


Figure 7 : Mécanisme de la biosynthèse de l'érythromycine A par 6-deoxyerythronolide B synthases (DEBS) (Bender et al, 1999).

4.1.2 Structure de PKS II et biosynthèse des polycétides aromatiques.

Les PKS II sont des complexes multienzymatiques monofonctionnels, à la différence des PKS I qui sont des mégas-enzymes. Chaque enzyme est formée au minimum par un ACP (acyl carrier protein) et deux ketosynthase (Zhang et al, 2017) :

- $KS\alpha$: catalyse la condensation de deux acyl-CoA
- $KS\beta$: appelé aussi chain-length facto, CLF, impliqué dans le contrôle de la chaîne de polycétide (figure 8).

Les PKS II minimales sont impliquées dans la condensation itérative des unités de malonyl-CoA et élongation de la chaîne de polycétide. Comme le cas de PKS I, l'unité enzymatique de

PKSII peut contenir d'autres fonctions catalytiques auxiliaires, telle que, Keto-Reductase (KR), cyclase (CYC), aromatase (ARO) (**figure8**).

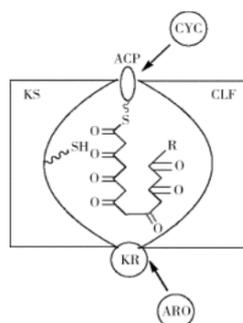


Figure 8 : Modèle de l'organisation structurale de PKSII (**Zhang et al, 2017**).

Le PKSII catalyse la biosynthèse surtout des polycétides aromatiques (**figure 9**) :

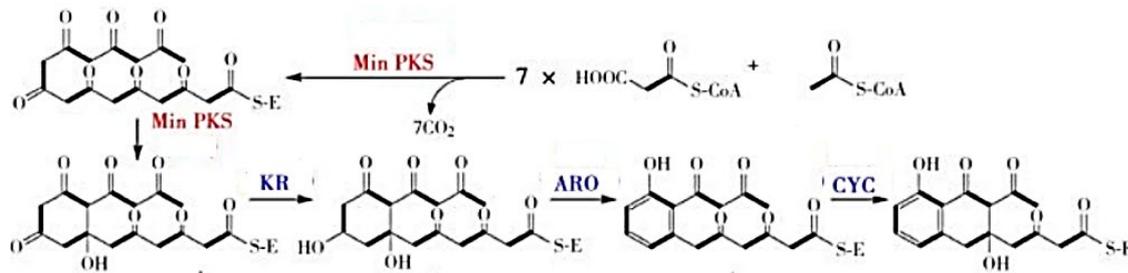


Figure 9 : Mécanisme de la biosynthèse des polycétides aromatiques par PKSII (**Hopwood et al, 1997**).

4.1.3 Structure de PKS III.

Ce type de PKS, est généralement trouvé chez les plantes, mais aussi il peut exister chez certaines bactéries et champignons. C'est une protéine unique qui ne possède ni module, ni domaine. Deux différences majeures distinguent le PKSIII par rapport aux autres PKS (**Meslet-Cladière et al, 2013**) :

- L'absence d'une protéine porteuse d'acyle (ACP).
- Ne possède pas des domaines auxiliaires : KR, DH, ER, MT.

Le PKS-III est un équivalent du domaine cétoynthase (KS) de PKS-I ou PKS-II. Les flavonoïdes, l'un des groupes les plus importants de métabolites végétaux, sont dérivés des polycétides synthétisés par PKSIII (**Meslet-Cladière et al, 2013**).

4.1.4 Activité biologique des polycétides bactériennes.

Les polycétides produits à travers les différentes voies de biosynthèse sont structurellement divers, selon la voie de biosynthèse on distingue :

➤ **Les polycétides de types macrolides d'origine bactérienne.**

Les PKS du type I modulaire catalysent la biosynthèse des macrolides, qui sont des macrocycles lactones, parfois ils sont associés à des sucres neutres ou aminés (Lowell et al, 2017). Il existe plusieurs types de macrolides qui se distinguent entre eux par le nombre d'atomes formant le macrocycle, ainsi que les types de liaisons entre les différents atomes de carbone à l'intérieur de cycle macrolactone. Parfois ces liaisons sont de nature polyénique (Dhokal et al, 2019).

Les macrolides représentent une famille très diverse de produits naturels possédant une très large gamme d'activités biologiques. En effet, plusieurs antibiotiques sont des macrolides, tels que, l'érythromycine, la spiramycine, roxithromycine, azithromycine, midécamycine, midécamycine (figure 10) (Bambeke et al, 2000). En plus de l'activité antibiotique, les macrolides possèdent d'autres activités biologiques, tels que l'amphotéricine B, qui est un antifongique de la famille des macrolides polyéniques, extrait de *Streptomyces nodosus* (figure 10) (Stone et al, 2016), alors que l'azithromycin, possède une activité antimalarique (figure 10) (Goodman et al, 2013).

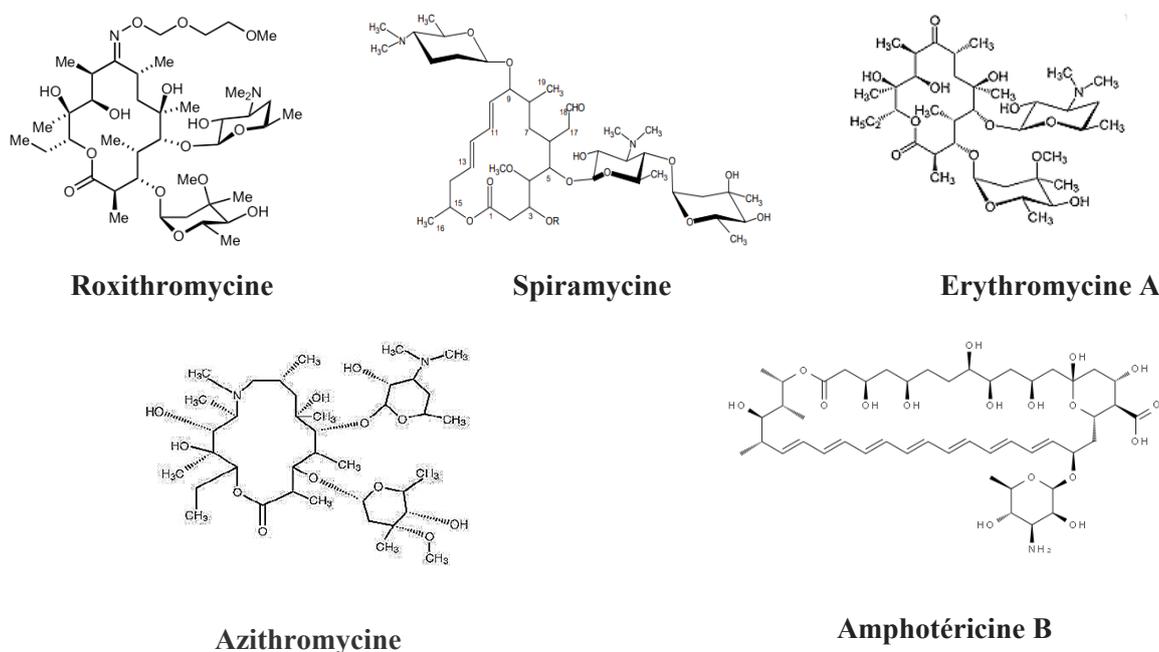
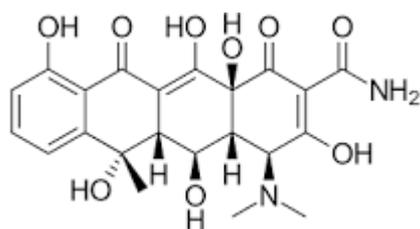


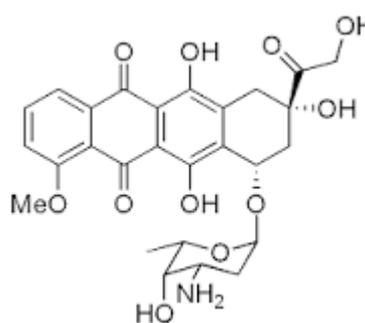
Figure 10 : La structure de quelques molécules de type macrolides (Bambeke et al, 2000 Stone et al, 2016 Goodman et al, 2013).

➤ Les polycétides aromatiques bactériennes.

Cette classe de molécules est synthétisée par les PKS II, du point de vue structurel. Ces molécules sont formées par plusieurs cycles attachés, dont certaines sont aromatiques. Cette famille de molécules naturelles est pourvue de diverses activités biologiques et propriétés pharmacologiques (Zhang et al, 2017). La famille des polycétides aromatiques la plus étudiée est les tétracyclines. Ces molécules ont pour caractéristique de posséder quatre cycles accolés, d'où leur nom. Parmi ces molécules, la doxorubicine est un dérivé polycétidique aromatique produit par *Streptomyces peucetius* et qui est utilisé en thérapie pour le traitement de certains cancers (figure 11), en particulier le cancer du sein (Malla et al, 2010). L'oxytétracycline est un antibiotique à large spectre d'action (figure 11), très utilisé pour le traitement de plusieurs infections bactériennes telles que, l'acné et peut aussi traiter d'autres infections de la peau, comme la rosacée, ou des infections des voies respiratoires, telles que la pneumonie (Cornejo et al, 2017).



Oxytétracycline



Doxorubicine

Figure 11 : La structure des deux polycétides aromatiques, oxytétracycline et doxorubicine (Cornejo et al, 2017; Malla et al, 2010).

4.2 La classe des peptides non ribosomiques.

Tomino *et al.*, 1967, ont remarqué qu'en présence de l'ARNases ou d'inhibiteurs de ribosomes, l'espèce, *Bacillus brevis*, continue toujours de synthétiser l'antibiotique gramicidine, Ils ont en déduit qu'il existait un mécanisme de synthèse peptidique indépendant de l'ARNm. Ensuite, Fritz et al, 1971, ont découvert qu'il s'agit de grandes enzymes capables de synthétiser des peptides non ribosomiques. Ces enzymes sont appelées aujourd'hui, Non-Ribosomal Peptide Synthétases (NRPS), identifiés chez les bactéries et les champignons (Miller et al, 2016).

Pour synthétiser les peptides non ribosomiques, les NRPS utilisent des unités appelées monomères, qui regroupent des acides aminés structurels et non structurels ainsi que d'autres

molécules. Actuellement on compte plus de 500 monomères qui peuvent être utilisés par les NRPS afin de synthétiser les peptides non ribosomiques. A la différence des ribosomes qui ne peuvent utiliser que des acides aminés structuraux (Caboche et al, 2010).

Les peptides non ribosomiques sont des molécules très complexe dotées de propriétés pharmacologiques intéressantes de fait que plusieurs médicaments appartiennent à cette classe de molécules (Martínez et al, 2016).

4.2.1 Structure des Non-Ribosomal Peptide Synthétase.

Comme les PKS I du type modulaire, les Non-Ribosomal Peptide Synthétase (NRPS) sont des mégas enzymes organisées en modules. Chaque module est responsable de la reconnaissance et l'incorporation d'un seul monomère dans la chaîne peptidique en élongation. Le nombre des modules, varie de 2 jusqu'à 50 modules, est en rapport avec le nombre des monomères incorporé dans la chaîne, (Stachelhaus & Marahiel, 1995). Chaque module est formé au minimum par trois domaines qui sont :

➤ Un domaine d'adénylation (A).

Responsable de la reconnaissance spécifique et l'activation des monomères sous forme d'aminoacyl adenylat, après hydrolyse d'une molécule d'ATP est en présence des ions de Mg^{2+} (figure 12). La composition de peptides en monomères ainsi que l'ordre de ces dernières dans la chaîne de peptides non ribosomiques est déterminé par la spécificité des domaines d'adénylation vis-à-vis des monomères le long de la chaîne d'assemblage d'NRPS (Wang et al, 2010).

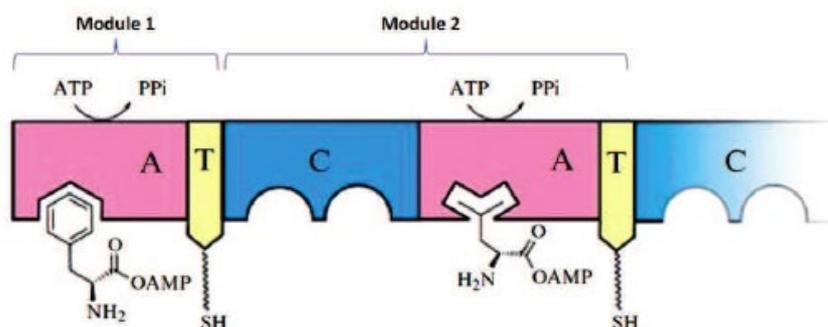


Figure 12 : Réaction d'activation de deux monomères sélectionnés par les deux domaines A en aminoacyl-O-AMP (Bachmann et Ravel, 2009).

➤ Un domaine de thiolation (T).

Appelé aussi domaine PCP pour « Peptidyl Carrier Protein », joue le même rôle que les domaines d'ACP de PKS, et ils sont responsables du déplacement de la chaîne peptidique en élongation le long des modules de NRPS. Ce domaine fixe de manière covalente le peptide en élongation par l'intermédiaire d'une liaison thioester, sous forme d'aminoacyl-thioester (figure 13) (Kittila et al, 2017).

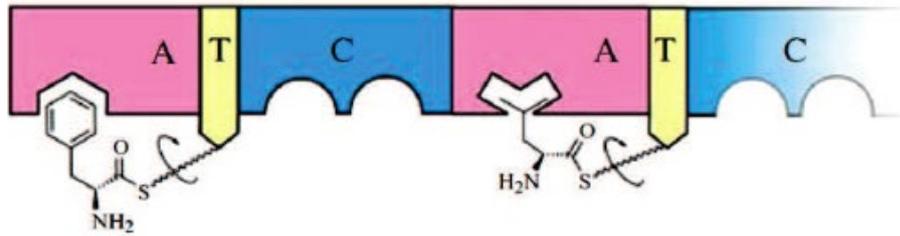


Figure 13 : Formation d'une liaison aminoacyl-thioesters fixée aux domaines T (**Bachmann et Ravel, 2009**).

➤ **Un domaine de condensation (C).**

Ce domaine est responsable de la formation des liaisons peptidiques entre deux monomères adjacents portés chacun par un domaine de thiolation (**Stachelhaus et al., 1998**). Comme le cas des ribosomes, le domaine C, est formé par deux sites de liaison du substrat (**Figure 12**), un site accepteur (a) et un autre site donneur (d). L'acide aminé du site accepteur (a) se fixe sur le domaine T du module correspondant. Cet aminoacyl-thioester acceptera un peptide en croissance à partir du site donneur (d) du module précédent, ainsi une liaison peptide est formée par l'attaque nucléophile de l'acide amine du module correspondant et le peptide du module précédent. Le site accepteur a plus d'affinités pour l'acide aminé activé que le site donneur, c'est ainsi que la direction de la chaîne peptidique en croissance est maintenue (**figure 14**) (**Mootz et al, 2002**).

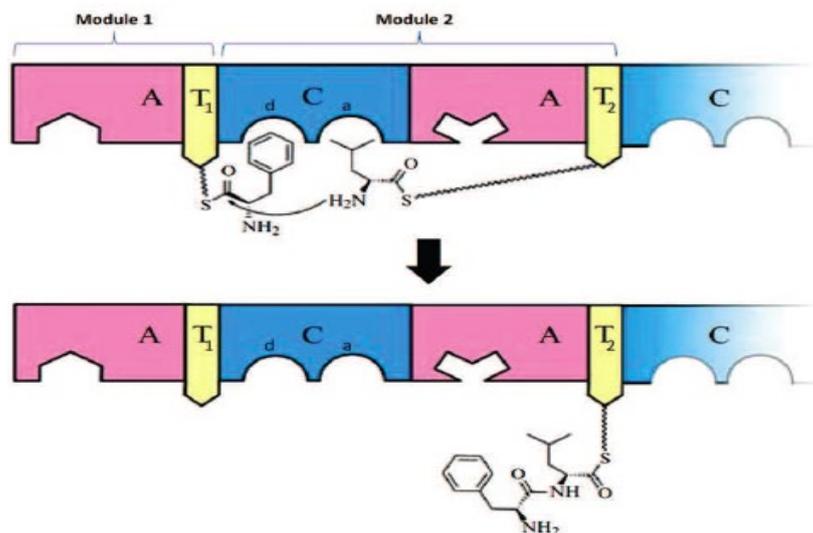


Figure 14 : Formation de la liaison peptidique entre deux substrats aminoacyl-thioester par le domaine C (**Bachmann et Ravel, 2009**).

➤ **Le domaine thioestérase (Te).**

En plus de ces trois domaines obligatoires, un domaine thioestérase (Te) est généralement situé dans le module de terminaison de la synthétase. Ce domaine est impliqué dans la libération du peptide néoformé, qui, selon la structure de peptide, le domaine TE va, soit catalyser l'hydrolyse de la liaison thioester qui liait le peptide au domaine T du module de terminaison pour former un peptide linéaire, soit catalyser la cyclisation de la chaîne peptidique néoformée pour former un peptide cyclique ou partiellement cyclique (**figure 15**) (Sieber et Marahiel, 2003).

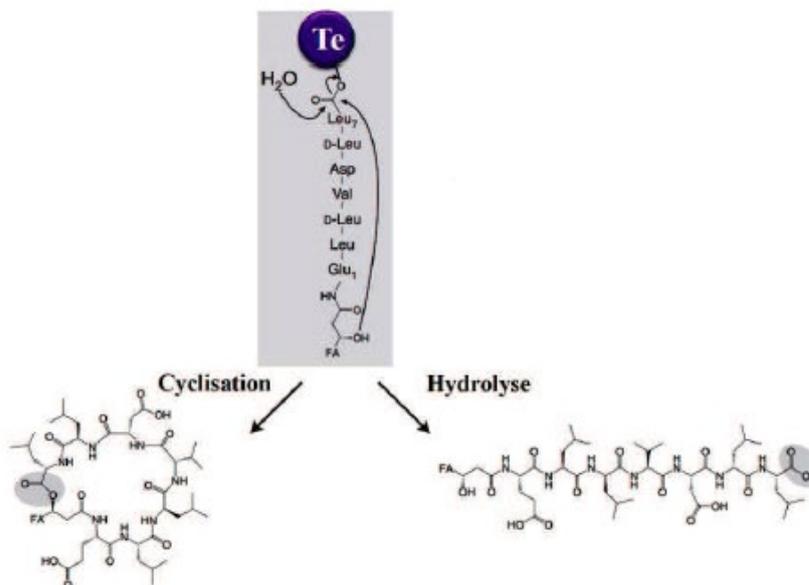


Figure 15 : Réaction d'hydrolyse et de cyclisation de la chaîne peptidique catalysée par le domaine thioestérase lors de l'assemblage de la surfactine (Sieber et Marahiel, 2003).

En plus de ces domaines principaux, d'autres domaines auxiliaires impliqués dans la modification structurale du peptide non ribosomique, peuvent être rencontrés dans le NRPS, tel que le domaine d'épimérisation (E), de cyclisation (Cy), de méthylation (Mt), de formylation (F), d'oxydation (Ox) et de réduction (R) (Miller et al, 2016).

4.2.2 Mécanisme de la biosynthèse des peptides non ribosomiques.

Selon la souche, trois mécanismes de biosynthèse peuvent être rencontrés

➤ **La biosynthèse linéaire.**

Dans ce cas les monomères activés sont assemblés selon l'ordre des modules. Le nombre des monomères formant le peptide est l'équivalent du nombre des modules. L'exemple le plus simple est celle de tripeptide ACV, précurseur de la biosynthèse de la pénicilline (**figure 16**).

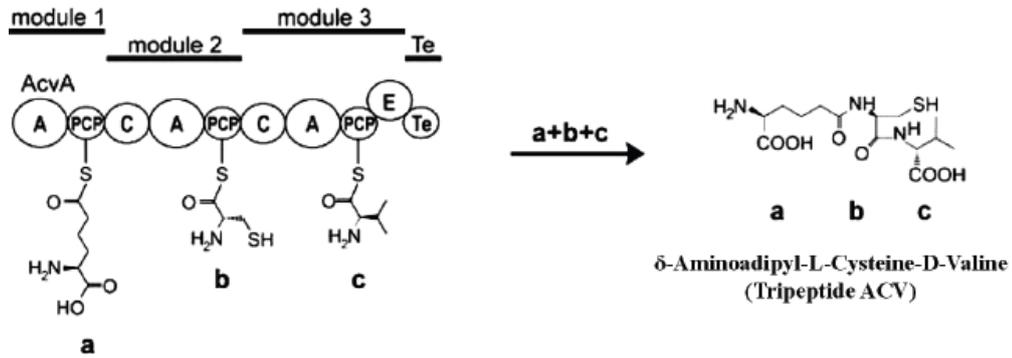


Figure 16 : Biosynthèse linéaire d'ACV (Mootz et al, 2002).

➤ **La biosynthèse itérative.**

Dans ce cas, chaque module de NRPS peut être utilisé plusieurs fois, ce qui conduit à l'apparition des peptides non ribosomiques avec des motifs répétés. C'est le cas de l'entérobactine, un sidérophore produit par des bactéries à Gram négatif telles qu'*Escherichia coli* (figure 17) (Gehring et al, 1998).

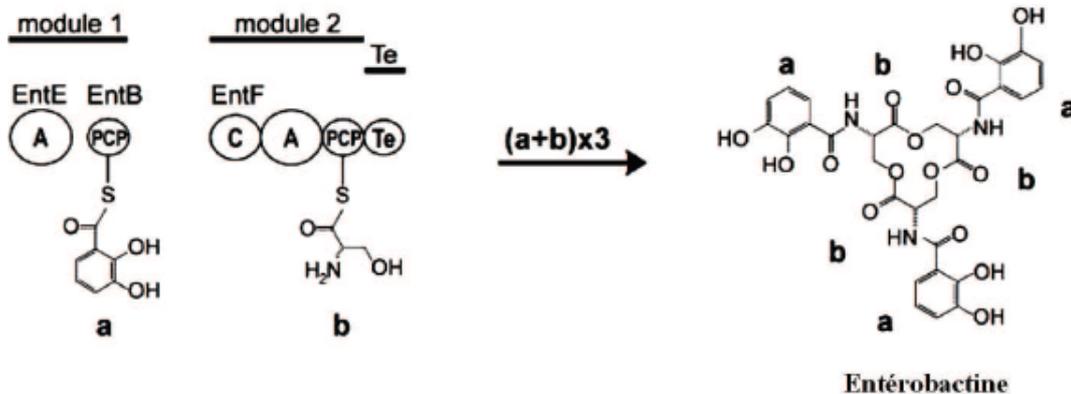


Figure 17 : Biosynthèse itérative de l'entérobactine (Mootz et al, 2002).

➤ **La biosynthèse non linéaire.**

À la différence de la biosynthèse linéaire, cette biosynthèse est caractérisée par une organisation des modules différents par rapport à l'apparition des monomères dans les peptides. Par exemple, la vibriobactin, un sidérophore formé par trois monomères (un acide 2,3 dihydroxybenzoïque, une thréonine et une norspermidine), Il n'y a pas de corrélation entre l'organisation des modules et des domaines et la structure vibriobactin (figure 18) (Mootz et al, 2002).

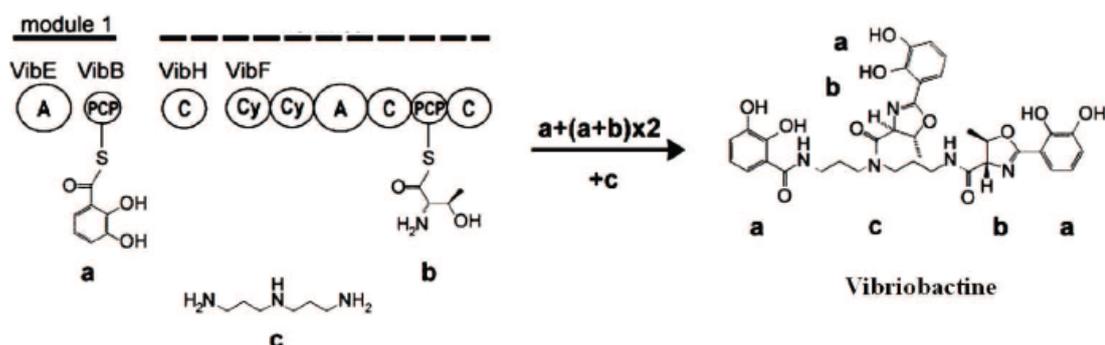


Figure 18 : La biosynthèse non linéaire de vibriobactin (Mootz et al, 2002).

4.2.3 Activité biologique des peptides non ribosomique.

Les molécules qui appartiennent à cette classe, représentent une famille très diverse de produits naturels doués de diverses propriétés biologiques, dont des antibiotiques ; par exemple la pénicilline et la céphalosporine, qui sont les deux antibiotiques avec un spectre large d'activité antibactérienne. Certains peptides non ribosomiques sont des immunomodulateurs, comme la cyclosporine qui est utilisée pour réduire les risques de rejet après une greffe d'organe (Cataland et al, 2017) (figure 19), d'autres sont des sidérophores qui sont sécrétés par certaines bactéries afin de capter le fer dans le milieu, en cas de carence en fer, par exemple l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, est caractérisés par la production d'un sidérophore appelé pyoverdine (Kang et al, 2018) (figure 19).

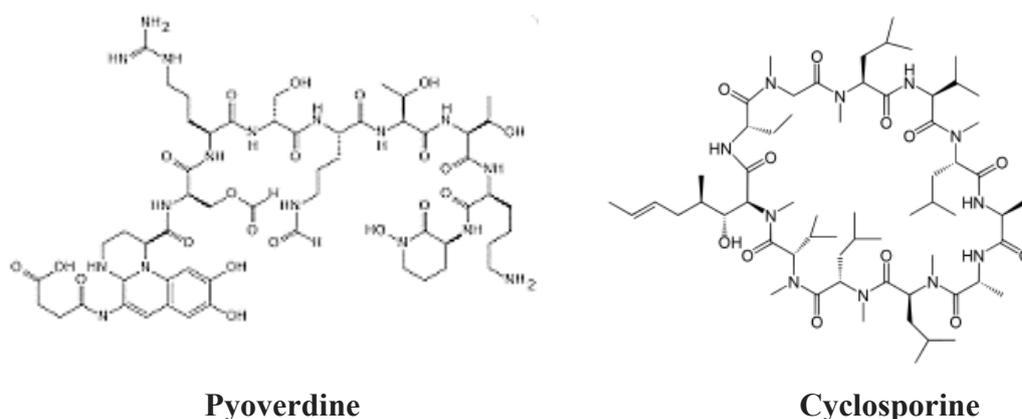


Figure 19 : structure des deux peptides non ribosomiques, pyoverdine et cyclosporine (Cataland et al, 2017; Kang et al, 2018).

4.3 La classe des molécules hybrides PKS-NRPS.

La biosynthèse de cette classe de molécules implique, chez les bactéries, des enzymes organisés en modules hybrides. En effet certains de ces modules contiennent des domaines de

l'enzyme PKS et d'autres modules contiennent des domaines de l'enzyme NRPS (**figure 20**), les résultats, sont des molécules hybrides, qui contiennent des parties polycétidiques et d'autres parties peptidiques (**Fisch, 2013**).

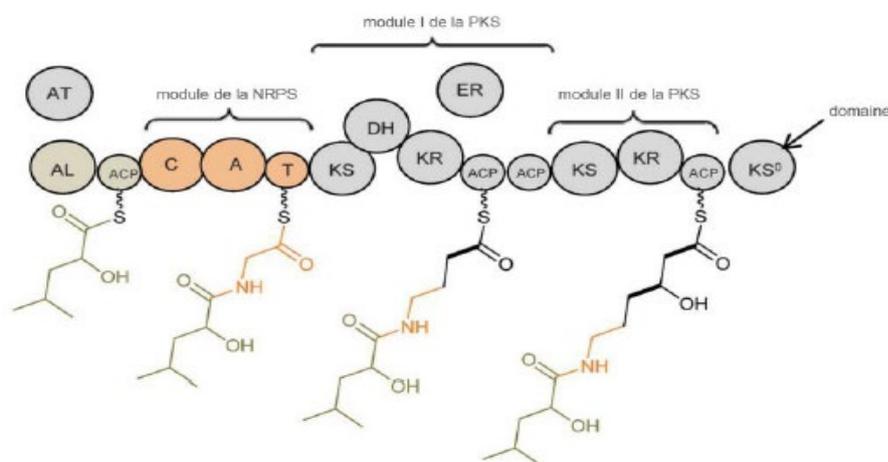
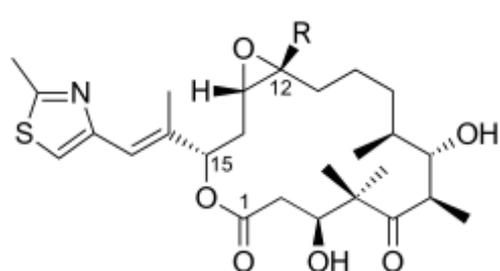
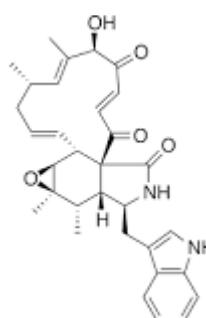


Figure 20 : Exemple d'une NRPS-PKS modulaire bactérienne (**Fisch, 2013**).

Cette classe de molécule regroupe plusieurs métabolites secondaires avec différentes activités biologiques. En effet, les épothilones A et B (**figure 21**), sécrétés par l'espèce de mycobactérie *Sorangium cellulosum*, sont des molécules ayant une activité anticancéreuse très puissante (**Gao et al, 2018**). La chaétoglobosine A est une molécule antifongique ayant une activité anticancéreuse in vitro (**figure 21**) (**Jiang et al, 2017**).



Epithilones A (R = H) and B (R = CH₃)



Chaetoglobosin A

Figure 21 : Structure de deux molécules hybride NRPS-PKS, la chaétoglobosine A et les épithilones A et B (**Gao et al, 2018 Jiang et al, 2017**).

Matériel et méthodes

I. Isolements, purifications et conservations des souches d'actinomycètes.

En général, afin que la procédure d'isolement conduise à l'obtention de nouvelles souches d'actinomycètes à partir des échantillons prélevés, nous avons suivi la méthode suivante (**Jiang et al, 2016**):

- Prélèvement des échantillons à partir des environnements négligés et non exploités.
- L'enrichissement des échantillons prélevés : le défi pour l'obtention de nouvelles souches d'actinomycètes passe par le freinage ou l'élimination de la croissance des microorganismes indésirables. Le prétraitement des échantillons a pour but d'écarter au maximum les microorganismes à croissance rapide, à savoir, les champignons et les bactéries ainsi que les *Streptomyces*, qui peuvent inhiber la croissance des actinomycètes rares qui ont une croissance lente.
- L'utilisation des milieux de culture sélective, auquel on ajoute des antibiotiques et des antifongiques.

1. Prélèvement des échantillons.

Les prélèvements ont été effectués à partir de deux types d'environnement, selon la méthode décrite par **Pochon et Tardieux, 1962** :

- **Sebkha** : les échantillons du sol ont été prélevés à partir de différentes sebkhas localisées dans cinq régions différentes : Kenadsa (Bechar) ; Bougtob (El-Bayadh) ; Tadjrouna (Laghouat) ; Hassi bahbah (Djelfa) ; Ain ouarka (Naâma).
- **Sol de palmier** : Les échantillons du sol ont été prélevés autour des palmiers de la région d'Ain Salah.

La localisation géographique des sites de prélèvements est indiquée dans la **Figure 22**.

Ces deux environnements ont été choisis pour deux raisons : (i) Ils sont peu exploités en matière de la biodiversité des actinomycètes, (ii) Ils se caractérisent par un climat saharien chaud, avec une température basse la nuit et élevée le jour.



Figure 22 : Localisation des sites de prelevement des échantillons (d-maps.com).

2. L'enrichissement des échantillons du sol prélevés.

Deux techniques ont été appliquées

➤ Le séchage des échantillons du sol.

Les échantillons du sol sont séchés à la température ambiante pendant sept jours, afin de réduire la flore bactérienne végétative dans les échantillons prélevés (**Messaoudi et al, 2015**).

Après séchage, les échantillons sont divisés, en deux parties. Une partie est enrichie par la **méthode de réhydratation –centrifugation**, alors que la deuxième partie estensemencée, après préparation des dilutions, directement sur le milieu de culture sans enrichissement.

➤ Enrichissement des échantillons du sol par la méthode de réhydratation – centrifugation.

Cette technique de prétraitement a pour but d'obtenir des actinomycètes qui libèrent des spores mobiles (*Actinoplanes, Planomonospora, Spirillospora,etc*).

50 ml du tampon phosphate (10 mM) stérile contenant 10 % d'extrait de sol est placé dans un Erlenmeyer (60 mm de longueur et 46 mm de diamètre), sur lequel on a ajouté 0.5 g du sol sec, le tout est incubés à 30 °C pendant 90 minutes. En effet, cette étape a pour but de libérer les zoospores des actinomycètes. Ensuite, 8 ml de cette solution est transféré vers un tube conique (16.5 × 105 mm) qui sera centrifugé à 1.500 X g pendant 20 minutes dans une centrifugeuse avec un rotor à godets oscillants. Après, les tubes sont placés sur la pailleasse pendant 30 minutes à la température ambiante. Une série de dilutions est préparé à partir de chaque tube ; les dilutions sont ensuiteensemencées sur différents milieux sélectifs (**Hayakawa et al, 2000**).

3. Ensemencement et incubation.

Un volume de 0.1 ml de chaque dilution estensemencé à la surface de trois milieux de cultures différents, additionnés à 50 mg/l de cycloheximide pour empêcher la croissance des champignons :

- Le milieu caséine amidon agar.
- Le milieu chitine vitamine B.
- Le milieu acide humique vitamine B.

La composition des milieux de cultures est donnée en **annexe 1**.

Les boîtes sont incubées à la température de 30 °C, et elles sont vérifiées régulièrement pendant 90 jours.

4. Purification et conservation des souches d'actinomycètes.

Les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques et microscopiques, sont purifiées pour obtenir des cultures pures.

Les isolats obtenus sont ensuite conservés pour être utilisés dans des tests ultérieurs. Pour cela des cubes de 1 cm³ des isolats d'actinomycètes sont coupés, à partir du milieu gélosé, puis placés dans des tubes Eppendorf bien scellés contenant 50% glycérol. Les tubes sont ensuite conservés à -70°C.

5. Observation et sélection des souches d'actinomycètes.

Afin d'éviter l'identification moléculaire de tous les isolats d'actinomycètes, et se focalisant uniquement sur les actinomycètes rares, les souches isolées et purifiées, subissent une pré-sélection sur la base de leurs :

- **Aspect macroscopique :** l'aspect des colonies et la couleur du mycélium aérien, peuvent orienter, dans certains cas, sur un groupe d'actinomycète. En effet, généralement les colonies de *Streptomyces* apparaissent après quelques jours d'incubation (3 à 7 jours) et forment un mycélium aérien poudreux et coloré. Un autre indice important est l'existence ou non de mycélium aérien. Par exemple la famille de *Micromonosporaceae* regroupe des genres importants et rares qui ont un caractère en commun qui est l'absence de mycélium aérien, par contre les espèces de genre *Streptomyces* ont tous un mycélium aérien bien développé (Li et al, 2016).
- **Aspect microscopique :** l'observation des souches au microscope optique permet de reconnaître certains genres qui ont un aspect microscopique caractéristique, et de les différencier du genre *Streptomyces*. En effet, l'existence des sporanges au niveau du mycélium aérien caractérise plusieurs genres rares d'actinomycètes comme par exemple *Streptosporangium*, *Spirillospora*. L'existence des sporanges cylindriques qui libèrent des spores mobiles (zoospores) au niveau du mycélium aérien caractérise le genre *Planomonospora*, tandis que la formation des sporanges dans le mycélium de substrat avec la libération des zoospores caractérise le genre *Actinoplans*, alors que les spores uniques, en double ou groupés en quatre caractérisent respectivement les genres, *Micromonospora*, *Microbispora* ainsi que *Microtetrasporea* (Li et al, 2016).

II. Identification moléculaire et analyses phylogénétiques des souches d'actinomycètes sélectionnées.

1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est effectuée par un kit d'extraction commercialisé : Invisorb Spin Plant Mini Kit.

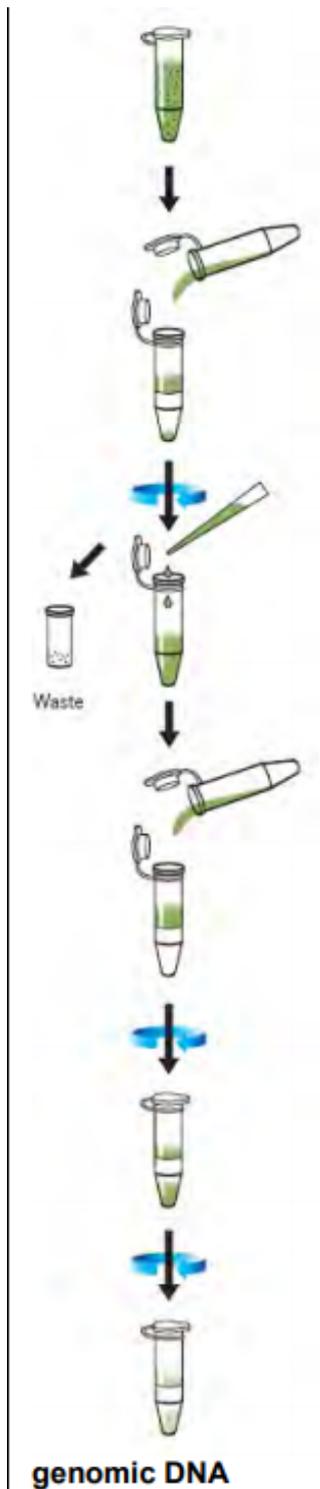
En principe, on distingue deux étapes pour l'extraction de l'ADN

- Destruction des cellules végétatives.

Afin de perturber les cellules végétatives pour rendre l'extraction d'ADN facile, un volume de 1 ml est prélevé à partir d'une culture jeune liquide de 3 à 5 jours. En effet, au-delà du cinquième jour les spores commencent de se former, ce qui rend l'opération d'extraction de plus en plus difficile voir impossible. Ce volume est placé dans un tube Eppendorf de 1.5ml. La culture est ensuite centrifugée pendant une minute à 14000 tr/min, après, le surnageant est jeté, puis 400µl de tampon de la solution de lyse 'P' sont ajoutés à la biomasse, après homogénéisation, le tout est incubés pendant 5 minutes à 100°C pour détruire les cellules végétatives.

- Purification d'ADN à partir des cellules végétatives perturbées.

La purification de l'ADN à partir des cellules détruites est réalisée en suivant le protocole ci-après (**figure 23**), fourni avec le Kit : Invisorb Spin Plant Mini Kit.



- Ajouter 20 μ l de protéinase K * aux tubes de lyses (qui contiennent la biomasse détruite). Incuber le mélange pendant 30 minutes à 65 ° C dans un thermo-mixer.
- Insérer le 'PreFilter' dans un tube de 2 ml et transférer la solution de lyse dans le PreFilter.
- Centrifuger pendant 1 min à 12 000 rpm.
- Ecarter le PreFilter et garder le filtrat.
- Ajouter 200 μ l de tampon d'attachement (qui permet l'attachement d'ADN sur le filtre) au filtrat et vortexer le tout.
- Le mélange (filtrat plus tampon d'attachement) sont transférés dans un SpinFilter qui est placé dans un nouveau tube.
- Le tout est incubé pendant une minute puis centrifugé pendant une minute à 12000 rpm
- L'AND, attaché sur le SpinFilter, est rincé deux fois par 550 μ l de la solution de rinçage I et II.
- Ajouter 30 μ l de tampon d'éluion D préchauffé puis incubé pendant 3 min.
- Centrifuger pendant une minute
- Ecarter le SpinFilter est incubé les tubes à 4°C.

Figure 23: Protocole de purification de l'ADN par l'utilisation du kit Invisorb Spin Plant Mini Kit.

2. Amplification de l'ADNr16s par PCR.

Deux amorces sont utilisées pour amplifier la région d'ADNr16s, le forward primer F27 (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) et le revers primer R1525 (AAG GAG GTG WTC CAR CC), la réaction de PCR est réalisée dans un tube de 200 μ L, chaque tube contenant un volume réactionnel de 49 μ L, composé de (Lane, 1991) :

- 25 μ L de JumpStart Taq ReadyMix (1.25 units Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, stabilisant) : c'est un mélange, préparé par Sigma Aldrich, prêt à l'emploi, il contient l'enzyme nécessaire pour l'amplification de la région d'ADNr16s (Taq polymerase), les différents désoxynucléotide triphosphate (dNTP), le magnésium qui est un cofacteur pour l'activité de l'enzyme Taq polymerase, ainsi que le tampon réactionnel nécessaire pour garder le pH stable durant la réaction.
- 22 μ L PCR water : c'est une eau distillée qui ne contient pas d'acide nucléique.
- 1 μ L de forward primer F27
- 1 μ L de revers primer R1525

Après la distribution de 49 μ L du mélange réactionnel dans des tubes de 200 μ L, 1 μ L d'ADN des souches à identifier sont ajoutés, séparément, dans chaque tube. Un tube est utilisé comme contrôle négatif. Les tubes sont, ensuite, placés dans un thermocycleur, réglés au programme suivant :

- | | | | |
|-------|------|---------|----------------------|
| • 1x | 95°C | 5 min | Denaturation initial |
| • 34x | 94°C | 0,5 min | Denaturation |
| | 52°C | 0,5 min | Hybridation |
| | 72°C | 2 min | Elongation |
| • 1X | 72°C | 10 min | Elongation final |
| | 10°C | --- | Refroidissement |

À la fin de l'amplification, les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sous voltage de 70 V, pendant 45 minutes sur gel d'agarose à 0,8% en tampon TAE 1X (Tris Acétate-EDTA). Le bromure d'éthydiu (BET) est utilisé comme colorant fluorescent pour voir les bandes d'ADN, et en présence d'un marqueur de taille de 1 Kb (Promega). Après migration, le gel est examiné sous la lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées (bandes d'ADNr16S ~ 1500 paires de bases).

3. Séquençage de l'ADNr 16S.

Le séquençage de l'ADNr 16S des souches d'actinomycètes isolées a été effectué par le service de séquençage en HZI (Braunschweig, Germany). Deux amorces sont utilisées, l'une est une amorce sens (F27) et l'autre est une amorce anti-sens (R518).

Les électrophérogrammes sont visualisés par le logiciel BioEdit, afin de vérifier la qualité des séquences obtenues. En effet, les séquences de bonnes qualités doivent avoir les caractéristiques suivantes :

- Pas des pics superposés,
- Une bonne séparation des pics, les uns des autres,
- Un bruit de fond faible.

Après avoir vérifié la qualité des électrophérogrammes, les deux séquences sont assemblées pour obtenir un consensus d'une seule séquence, qui sera comparé avec celles des espèces de référence disponible dans les banques génomiques de données "NCBI Blast" et EZ-TAXON, disponible respectivement sur internet : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> et <http://www.ezbiocloud.net/>. Cette comparaison permettra d'évaluer les pourcentages de similarité entre les séquences des espèces de souches de références disponibles dans Genbank et les souches d'actinomycètes isolées.

À noter que les deux amorces (F27 et R518) nous permettent d'obtenir que la séquence partielle de l'ADNr16s (environ 700 à 900 pb), mais si le pourcentage de similarité entre l'isolat d'actinomycète et l'espèce de référence est faible, un séquençage complet de l'ADNr 16S sera demandé, et trois amorces supplémentaires sont nécessaires (R1100, F1100 et R1525).

4. Analyses phylogénétiques.

Une fois les séquences des isolats d'actinomycètes sont identifiées, elles sont utilisées pour effectuer une analyse phylogénétique. En effet, cette analyse a pour but de déterminer la relation de parenté qui existe entre les différents isolats d'actinomycètes et les souches de références les plus proches. En d'autres termes, recherchés, qui se rapproche de qui.

Pour procéder à une telle analyse plusieurs étapes sont suivies :

- Les séquences des souches de références sont tout d'abord téléchargées à partir des banques de gènes, Ez-taxon et NCBI blast.
- Afin d'obtenir un arbre phylogénétique enraciné, une séquence très éloignée par rapport aux séquences étudiées (out groupe), est ajouté aux séquences traitées.

- Un alignement est effectué par le programme « Clustal W ». Le but de l'alignement des séquences est de trouver les régions similaires entre eux, ou les régions conservées (homologues). Les divergences entre les séquences sont interprétées comme résultant des mutations (insertion, délétion et substitution).

➤ Calcul des arbres phylogénétiques par le programme MEGA 6 :

Les analyses phylogénétiques sont effectuées par la méthode de calcul des matrices des distances d'évolution de **Jukes et Cantor (1969)**, en utilisant l'algorithme de "Neighbor-Joining" (**Saitou et Nei, 1987**). La validation statistique des liens phylogénétiques établis est réalisée par le test du Bootstrap (**Felsenstein, 1981**).

5. Hybridation ADN-ADN.

Cette étape a été réalisée à Justus-Liebig-Universität, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Giessen (Allemagne), par l'utilisation de la méthode de **Ziemke et al, 1998**. Elle a été effectuée que pour la souche CG3, qui donne un pourcentage de similarité faible, après une comparaison de leur ADNr 16S avec les espèces de références les plus proches.

Le principe d'hybridation est de comparer l'ADN génomique de deux souches bactériennes, l'une est une espèce de référence connue et l'autre est une souche bactérienne isolée.

Cette analyse est demandée dans le cas où les deux souches bactériennes partageant un pourcentage de similarité supérieur à la limite de (98.65%), fixée par **Kim et al. (2014)**, pour différencier deux souches bactériennes proches. En effet, si le pourcentage de renaturation (après hybridation) mesuré entre les deux ADN est inférieur à 70 % cela veut dire que les deux souches appartiennent à deux espèces bactériennes différentes (**Wayne et al 1987**).

III. Etude taxonomique des nouveaux isolats d'actinomycètes.

Cette étude taxonomique ne concerne que les isolats d'actinobactéries rares, et qui sont avérés être des nouveaux taxons.

1. Etude morphologique.

Elle consiste à étudier les caractères cultureux ainsi que l'aspect microscopique des isolats sélectionnés.

1.1. Caractères cultureux.

Les caractères cultureux (couleur de mycélium aérien et de substrat, production des pigments diffusibles, production des pigments melanoïde, croissance sur les différents milieux de culture) sont déterminés après 21 jours d'incubation à 30 C° ou 37 C° (selon la souche), sur les milieux de cultures préconisées par **Shirling et Gottlieb (1966)** et décrit dans "*International Streptomyces Project*" (ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 et ISP7). La composition des milieux est donnée en **annexe 1**.

La description des colonies est effectuée selon le **tableau 1** suivant :

Tableau 1 : les critères utilisés pour la description macromorphologique des colonies d'actinomycètes (**Söhngen et al, 2016**).

Caractère	Description du caractère
Croissance	Il faut différencier entre : une bonne croissance ; une croissance clairsemée et pas de croissance.
Couleur de mycélium de substrat	Souvent influencée par les pigments solubles, cette couleur est déterminée à l'aide de la charte RAL-code (Edition de 1990 – Reichsausschuß für Lieferbedingungen– Deutsches Institut für Gütesicherung und Kennzeichnung e.V.).
Couleur de mycélium d'aérien	S'il est formé, il faut différencier entre, une bonne formation et une formation clairsemée. Dans le cas où la formation de mycélium aérien est abondante, la couleur est déterminée par RAL-code
Pigments solubles	La formation des pigments solubles est détectée, après la période d'incubation, par le changement de la couleur du milieu de culture.

La formation des pigments mélanoides est identifiée sur quatre différents milieux de cultures :

ISP6, ISP7, le milieu de **Suter (1978)** avec et sans tyrosine. La formation des pigments mélanoides est contrôlée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à la température de 37 °C.

1.2. Etude micro-morphologique.

Afin de vérifier si le mycélium de substrat des isolats d'actinomycètes sélectionnés est stable ou non, 2 µl d'une culture vieille (10 à 14 jours), réalisé sur le milieu liquide, est étalé sur une lame stérile puis couverte par une lamelle, qui sera ensuite observée sous microscope optique sous différents grossissements : 40 et 100.

En plus de la microscopie optique, une observation par microscopie électronique est réalisée pour les souches sélectionnées. En effet, après incubation dans le milieu approprié pendant deux à trois semaines, des cubes de 1 cm³ des souches sélectionnées, ont été coupés puis placés dans des tubes contenant 2 ml de glutaraldehyde à 5%. Les tubes sont ensuite étiquetés puis envoyés au laboratoire de « Central Facility for Microscopy, HZI, Braunschweig Allemagne).

2. Etude physiologique et biochimiques.

Cette étude inclut :

2.1. Résistance aux différentes concentrations de NaCl.

Le milieu ISP2 solide (pH=7) est préparé avec différentes concentrations d' NaCl (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20) %, w/v, les boîtes sont incubées à 37°C. Après 14 jours, l'intervalle de

tolérance ainsi que la concentration optimale de croissance en NaCl sont notés pour chaque souche d'actinomycètes sélectionnée.

2.2. Tolérance aux différents pH.

Ce paramètre physiologique est testé dans le milieu ISP2 +3 % NaCl liquide, uniquement pour la souche CG3, le milieu de culture est préparé dans des tubes aux différents pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10, 12, 14). Après 14 jours d'incubation à 37 C°, l'intervalle de croissance ainsi que le pH optimal de croissance sont notés, à l'œil nu.

2.3. Croissance aux différentes températures.

Ce test est effectué uniquement pour la souche CG3. Les boîtes de milieu (ISP2+3% NaCl), ensemencées par la souche CG3, sont incubées aux différentes températures : 20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 et 55 °C. Après 14 jours d'incubation, l'intervalle de croissance ainsi que la température optimale de croissance sont notés.

2.4. Utilisation de différentes sources de carbone.

La possibilité des souches d'actinomycètes sélectionnées d'utiliser dix sources de carbone différentes (arabinose – mannitol- cellulose – raffinose – fructose – rhamnose – glucose – saccharose - inositol – xylose) est testée sur le milieu ISP9 stérile. Le test a été réalisé sur des plaques de 12 puits. La solution mère de chaque source de carbone est préparée à la concentration de 10 %, puis stérilisée par filtration ; ensuite ajoutée séparément dans la plaque de 12 puits qui contient le milieu ISP9 en surfusion. La concentration finale de chaque source de carbone doit être 1 % dans chacun des puits. Le premier puits, contient le glucose (contrôle positif) alors que le dernier puits, contient l'eau distillée stérile (contrôle négatif).

D'autres sources de carbone sont testés, afin d'effectuer une caractérisation complète de la souche CG3: maltose, ribose, saccharose, glycérol, acétate de sodium, amidon, galactose, mannose, cellobiose, lactose, sorbitol et xylitol.

Les plaques sont ensuite incubées à la température appropriée pendant 14 jours. Les résultats sont notés par comparaison de chaque puits avec le contrôle positif et négatif, selon quatre critères arbitraires :

- - : croissance moins par rapport au contrôle négatif
- (+) : croissance mieux que dans le contrôle négatif mais pas aussi bon que dans le contrôle positif.
- + : croissance similaire au contrôle positif.
- ++ : croissance mieux que dans le contrôle positif.

2.5. Utilisation de différentes sources d'azote.

Ce test est réalisé, dans des plaques de 12 puits, uniquement pour la souche CG3. En effet, la capacité de cette souche à utiliser 15 sources d'azote différentes (alanine – arginine – glycine – histidine - adénine -acide glutamique - lysine - méthionine - phénylalanine - thréonine – valine – arginine – cystéine – hydroxyproline - tryptophane) est testée sur le milieu de base avec la composition suivante : D-glucose, 1.0% (w/v) ; MgSO₄, 7H₂O, 0.05%; NaCl, 0.05%; FeSO₄. 7H₂O, 0.001 %; K₂HPO₄, 0.1 %; Bacto-agar, 1.2%; pH 7.4. Les sources d'azote sont ajoutées séparément sur le milieu de base préalablement versé dans les puits de la plaque, de manière à ce que la concentration finale de chaque source d'azote soit de 1 %. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 14 jours (Williams et al 1983).

2.6. D'autres tests biochimiques.

D'autres tests biochimiques, comme nitrate réductases, uréase, liquéfaction de gélatine, libération de H₂S, la mise en évidence de différentes enzymes, sont évaluées dans des plaques Api : **Api Coryne, Api zym et API Campyl.**

Afin d'ensemencer les plaques API, 1 ml d'une culture jeune de 3-5 jours des souches d'actinomycètes sélectionnés, sont versées dans un tube Falcon de 15 ml, qui contient 4 ml d'eau distillée stérile, le tout est homogénéisé. L'ensemencement des plaques API est réalisé en suivant le protocole de producteur (biomerieux). Les plaques sont ensuite incubées à la température de 30 ou 37 °C (selon la souche) pendant 24 à 48 heures, sous une atmosphère humide pour éviter la déshydratation.

3. Étude chimiotaxonomique des constituants cellulaires.

L'étude chimiotaxonomique a été effectuée uniquement pour l'isolat CG3. En effet, cette étude consiste à déterminer la nature de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) (forme LL ou DL = *meso*), la présence ou non de glycine, ainsi que la composition cellulaire en sucres, phospholipides, acides gras et en ménaquinones.

3.1. Préparation de la biomasse.

La biomasse utilisée dans l'étude chimiotaxonomique de la souche CG3 a été préparé par l'ensemencement de l'isolat CG3 dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant le milieu (ISP2 + 3 % NaCl), la culture a été ensuite incubée à 37°C pendant 3 jours. La biomasse a été récupérée par centrifugation puis déshydratée par lyophilisation.

3.2. Détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et détection de la glycine.

La détermination de la nature de l'isomère de DAP, ainsi que la détection de la présence ou l'absence de glycine est réalisée selon la méthode de Hasegawa et al (1983).

100 mg de la biomasse sec de l'isolat CG3 subit une hydrolyse acide à la température de 120 °C pendant 18 heures, par 1 ml d'une solution d'HCL 6N, dans un tube bien scellé. L'hydrolysate obtenu est centrifugé à 14000 rpm pendant 10 minutes pour éliminer les débris mycéliens. Le surnageant obtenu est évaporé à sec, puis lavé trois fois avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de pH compris entre 5-7, enfin le résidu sec est repris dans 0.3 ml d'eau distillée.

10 µl de l'hydrolysate cellulaire sont déposés dans une plaque chromatographique de gel de silice (silicagel 60, Merck). En parallèle, 10µL des deux solutions témoins, l'une à 0.2% de glycine et l'autre à 0.01M de DAP, sont déposés sur la même plaque.

La plaque CCM est développée pendant 18h dans le système de solvant composé de méthanol-eau distillé- HCl 6N- pyridine (80 :26 :4 :10).

La révélation des taches est réalisée en pulvérisant une solution de ninhydrine à 0.2 % dans l'acétone (poids/volume). Les plaques sont ensuite séchées à 100°C pendant cinq minutes. Les taches de l'acide DAP sont de couleur verte pâle alors que les autres acides aminés ont une couleur pourpre. Dans ce système, la forme LL de l'acide DAP migre plus rapidement que la forme méso, alors que les autres acides aminés migrent plus rapidement que les formes de DAP (**Becker et al, 1964**).

3.3. Analyse des sucres cellulaires.

L'analyse des constituants cellulaires en sucre a été effectuée selon les méthodes décrites par **Lechevalier et Lechevalier (1974)** et **Staneck et Roberts (1974)**.

100 mg de la biomasse lyophilisée de la souche CG3 a été hydrolysée, dans un tube scellé, par 1 ml d'acide sulfurique à 1 N pendant 2 heures. Après refroidissement, l'hydrolysate a été transféré dans un tube conique de centrifugation (15 ml), auquel l'hydroxyde de baryum saturé est ajouté goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 5.2 à 5.5 (déterminé par un papier pH) le précipité formé est éliminé par centrifugation. Le surnageant est séché par l'azote gazeux, et le résidu formé est dissous dans 0.3ml d'eau distillés.

2 µl de l'extrait cellulaire ainsi préparé est déposé en bandes fines (environ 1 cm de largeur) sur une plaque CCM de gel de silice (silicagel 60, Merck), qui est ensuite développée dans le système de solvant : n-butanol- eau distillé pyridine- toluène (10: 6: 6:1, v/v/v/v). Une solution aqueuse à 0,01 M, contenant le rhamnose, le ribose, le xylose, l'arabinose, le glucose et le galactose, est utilisée comme standard.

La plaque CCM est, ensuite, révélée par une solution aqueuse de phtalate d'aniline à 0,2% (w/v) en chauffant celle-ci pendant 5 min à 100°C. Les taches sont de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses. Les sucres apparaissent dans l'ordre de migration suivant (de haut en bas) (**Lechevalier et Lechevalier, 1974**); **Staneck et Roberts, 1974**) :

- Rhamnose (spot de couleur verte brune)
- Ribose, xylose et arabinose (spot de couleur rose)
- Glucose puis galactose (spot de couleur brune)

Cet ordre a pu être déterminé en spotant les sucres séparément et en les mélangeant.

3.4. Analyse des phospholipides membranaires.

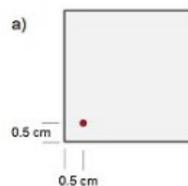
La méthode utilisée pour l'extraction et l'analyse des phospholipides est celle de **Minnikin et al. (1979)**.

- 200 mg de la biomasse lyophilisées de la souche CG3 est agitée à la température ambiante dans un tube bien scellé avec 6.75 ml de la solution d'extraction composé de chloroforme-méthanol-solution aqueuse saline à 0,3% NaCl (50 : 100 :40).
- Après une nuit d'agitation, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 10000 rpm pour éliminer les débris mycéliens.
- Le surnageant obtenu est récupéré dans un nouveau tube contenant, 1.75 ml de chloroforme plus 1.75 ml d'une solution saline de 0.3% NaCl.
- Deux phases sont formées, la phase organique, qui existe en bas du tube, est collecté par pipetage puis évaporé par l'azote gazeux à 37°C jusqu'au séchage,
- Le résidu sec ainsi obtenu est dissous dans 0,3 ml de mélange chloroforme-méthanol (2-1, v/v).
- L'analyse de l'extrait se fait par CCM de gel de silice (silicagel 60, Merck). bidimensionnelle, en utilisant deux systèmes de solvants :

Système N° 1 : chloroforme-méthanol-eau (65 :25 :4 ; v/v/v).

Système N° 2 : chloroforme- acide acétique -méthanol-eau (80 : 18 : 12 : 5 ; v/v/v/v).

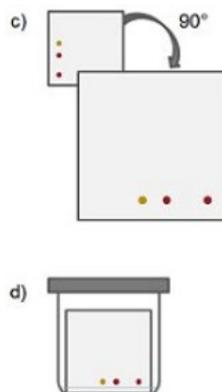
D'abord, l'extrait est spoté à 0.5 cm du bord inférieur et latéral des plaques CCM.



Ensuite, la plaque est développée par le système de solvant N°1 :



Après, la plaque est retirée de la première cuve puis séchée à la température ambiante, elle est ensuite tournée d'un angle de 90° puis placée dans une autre cuve qui contient le deuxième système de solvant (**système N°2**) :



Après le deuxième développement, la plaque est retirée de la cuve puis séchée. Cette expérience est répétée cinq fois dans cinq plaques de gel de silice différents.

Les plaques sont ensuite, révélées, séparément, par cinq révélateurs chimiques (**tableau 2**):

- La première plaque est révélée par l'acide phosphomolybdique, qui permet la détection de tous les lipides (apparition des taches bleues).
- La deuxième plaque, est révélée par le molybdène bleu qui permet la détection de tous les phospholipides (apparition des taches bleues).

Une comparaison entre ces deux plaques, permet de différencier entre les lipides et les phospholipides.

- La troisième plaque, est révélée par ninhydrine, qui est un révélateur des phospholipides azotés.
- La quatrième plaque est révélée par l'anisaldéhyde, qui est un révélateur des glycolipides. Une comparaison entre cette plaque avec la première ainsi que la deuxième plaque, permet de différencier entre les glycolipides et les glycopospholipides.
- La cinquième plaque est révélée par le réactif de Dragendorff, qui est un révélateur de la phosphatidylcholine.

La préparation des cinq révélateurs utilisés est donnée en **annexe 2**.

Tableau 2 : Couleurs de différents phospholipides après révélation des plaques CCM par les différents types de révélateurs chimiques.

Numéro de plaque	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Plaque 4	Plaque 5
Les réactifs	Acide phosphomolybdique	Molybdène bleu	Ninhydrine	Anisaldéhyde	Réactif de Dragendorff
Chauffage	5 minutes à 160°C	-	5 minutes à 100°C	5 minutes à 120°C	-
Phosphatidylethanolamine	Bleu	Bleu	Rose	violet	jaune-orange
OH-phosphatidylethanolamine	Bleu	Bleu	Rose	violet	-
Phosphatidylglycerol	Bleu	Bleu	-	violet	-
Diphosphatidylglycerol	Bleu	Bleu	-	violet	-
Phosphatidylcholine	Bleu	Bleu	-	violet	jaune-orange
Phosphatidylinositol	Bleu	Bleu	-	violet	-
Phosphatidylinositol mannoside	Bleu	Bleu	-	Vert jaune	-

3.5. Identification des acides gras membranaires.

La composition de la membrane cytoplasmique en acide gras de la souche CG3 a été effectuée selon la méthode de **Sasser (1990)** par le laboratoire de Microbiologie de la «German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Braunschweig, Allemagne ».

Tous les tubes en verre et les pipettes utilisés durant l'expérience doivent être lavés plusieurs fois par le dichlorométhane pour éliminer les traces d'acide gras.

Cinq solutions sont utilisées pour l'extraction des acides gras :

Solution N1 : Solution d'hydroxyde de sodium et le méthanol (MeOH : NaOH 15%; 1 : 1; v : v).

Solution N2 : Solution d'acide chlorhydrique et le méthanol (MeOH : HCl 37%; 10:2; v : v)

Solution N3 : Solution de hexane/tert-butyl methyl ether (1:1; v : v)

Solution N4 : Solution de d'hydroxyde de sodium à 0.5 M

Solution N5 : Solution saturée de chlorure de sodium.

L'extraction et l'analyse des acides gras sont réalisées en cinq étapes :

- **Saponification.**

1 ml de la **solution N° 1** est ajouté à un tube en verre de 4 ml hermétiquement scellés contenant 40 mg de la biomasse lyophilisée de la souche CG3. Le tube est brièvement vortexé puis chauffé pendant 1h à 100°C dans un thermoblock.

- **Méthylation.**

La méthylation consiste à ajouter des groupements méthyle aux acides gras afin d'augmenter leurs volatilités. Pour cela, après avoir refroidi le tube de 4 ml contenant l'échantillon à la température ambiante, 2 ml de la **solution N°2** est ajouté au tube, qui est ensuite placé une autre fois au thermoblock réglé à la température de 80 °C pendant 10 minutes. Après, les échantillons sont rapidement refroidis dans un bain de glace.

- **Extraction.**

1ml de la **solution N°3** (solution d'extraction) est ajouté au tube de méthylation, le mélange est vortexé pendant 30 secondes. Deux phases sont formées, la phase organique (phase supérieure) est récupérée par pipetage, puis placée dans un nouveau tube, cette opération est répétée deux à trois fois pour l'extraction de tous les acides gras présents dans l'échantillon.

- **Lavage.**

Afin de purifier les acides gras et éliminer les débris, 2.5 ml de la **solution N°4** est ajouté au tube contenant la solution d'extraction. Le tube est vortexé pendant 30 secondes, si les phases ne sont pas séparées, la **solution N°5** est ajoutée en goutte à goutte jusqu'à la séparation des phases. Les deux tiers (2/3) de la phase supérieure sont récupérés, par pipetage, dans un tube, puis analysé par CPG (chromatographie phase gazeuse).

- **Analyse des échantillons.**

L'analyse de l'échantillon se fait par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), l'appareil est de type (**Agilent 6890**), muni d'une colonne Ultra 2 (A25 m x 0.2 mm) et une colonne capillaire en silice (phényl méthyl silicone). La température du four progressant de 170 °C jusqu'à 270 °C à raison de 5 °C/min. La détection se fait par ionisation de flamme.

La composition en acides gras cellulaires a été déterminée, en utilisant le système Sherlock version 6.1 (méthode TSBA40, base de données TSBA6).

3.6 Analyse des menaquinones.

L'analyse de la composition en menaquinones de la souche CG3 a été réalisée au laboratoire de microbiologie de la "German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)", Braunschweig, Allemagne.

Les menaquinones sont des lipides constitués d'un noyau naphthoquinones pourvues d'une chaîne latérale de 'n' unités isopréniques, noté MK-n.

Les quinones respiratoires sont extraites de la biomasse lyophilisée en utilisant le protocole de **Minnikin et al. (1984)**. Après extraction, la séparation des quinones est réalisée par chromatographie sur couche mince préparative (plaques de 20 x 20 cm, gel de silice GF 254 nm

type 60, épaisseur de la couche de gel, 0,5 mm), en utilisant le système de solvant, éther de pétrole-diéthyl éther (85:15 v/v). Après séchage des plaques, les bandes qui correspondent aux quinones sont visualisées par une lampe UV de la longueur d'onde de 254 nm. Ces bandes, apparaissent de couleur bleue sombre sur un fond vert, sont repérés par un crayon, puis elles sont grattées et repris dans le diéthyléther. Après séchages, les échantillons sont dissous dans 100 µl d'isopropanol et filtré, puis transféré dans un tube pour être analysés sur le système UHPLC-ESI-Qtof-MS (Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization-Quadropole-Time of Flight-Mass Spectrometry) (Romano et al, 2006).

IV. **Activité antimicrobienne et étude des molécules bioactives sécrétées par les souches d'actinomycètes sélectionnées.**

1. **Préparation de l'extrait brut.**

Les souches d'actinomycètes sélectionnées sont mises en culture dans des Erlenmeyers contenant le milieu 5294 (liquide) (voir annexe 1). Les Erlenmeyer sont incubés à 30 °C ou à 37 °C (selon la souche) en agitation (160 rpm) pendant 10 jours, la contamination des cultures est vérifié par microscopie optique. Pour préparer l'extrait brut, on doit suivre la procédure ci-après :

- 20 ml de la culture liquide, âgée de 10 jours, des souches sélectionnées sont versées dans des tubes falcons contenant 20 ml d'éthyle acétate.
- Le tout est agité pendant 30 minutes.
- La phase organique est séparée par rapport au milieu liquide par centrifugation pendant 10 minutes à la vitesse de 9000 rpm.
- La phase organique (le surnageant) est transférée, par pipetage, dans un ballon à fond rond, puis séchée dans un évaporateur rotatif à 40°C.
- Finalement, l'extrait sec est récupéré dans 1ml de méthanol.

2. **Activité antimicrobienne.**

2.1 **Les souches tests utilisées.**

Les propriétés antagonistes des isolats d'actinomycètes sélectionnés, ont été déterminées contre des microorganismes tests qui sont :

Les bactéries à Gram positifs : *Bacillus subtilis* DSM10, *Micrococcus luteus* DSM 1790, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus* Newman

Les bactéries à Gram négatifs : *Chromobacter violaceum* DSM 30191, *E. coli* DSM1 116, *E. coli* TolC, ATCC 700084, *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

Les champignons : *Mucor hiemalis* DSM2656, *Pichia anomala* DSM6766, *Candida albicans* DSM 1665.

2.2 Détermination de l'activité antimicrobienne par la technique de dilution sur des microplaques de 96 puits.

L'expérience est réalisée dans des plaques de 96 puits, en utilisant une seule plaque pour chaque microorganisme test (Mulwa et al ; 2018).

Des cultures jeunes de 18 heures, sont préparées après ensemencement des bactéries dans le bouillon de Muller Hinton, et les champignons dans le bouillon de Sabouraud. Après incubation, la densité optique de chaque suspension de microorganisme est ajustée entre 0.08 et 0.1, à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à la longueur d'onde de 600 nm.

150 µl d'une suspension qui correspond à un microorganisme test, est transférés dans les puits de la première colonne (de A1 jusqu'à H1) d'une microplaque de 96 puits. Après, 130 µl supplémentaires de la même suspension sont ajoutés dans le puits A1. Ensuite, 20 µl d'un extrait brute méthanoliques, préparés à partir d'un isolat d'actinomycète, est ajouté dans le premier puits A1. Après avoir bien mélangé le contenu du puits A1 (le volume total est égal à 300 µl), 150 µl du mélange est transférés dans le puits B1, cette opération est répétée jusqu'au le dernier puits (H1). De cette manière, l'extrait organique brut sera dilué à raison de ½, après chaque transfert d'un puits vers un autre. Les puits de la dernière colonne (de A12 jusqu'à H12) sont utilisés comme contrôle négatif, en utilisant le méthanol.

Les plaques sont incubées pendant 2 jours à 30 °C ou à 37 °C, selon le microorganisme testé (Rupcic et al, 2018). À noter que dans la même plaque de 96 puits, on peut tester au même temps, plusieurs extraits organiques sur le même microorganisme.

3. Fractionnement des extraits bruts et localisation des molécules bioactives.

Le fractionnement et l'analyse des extraits bruts des souches d'actinomycètes sélectionnées, sont réalisés par HPLC analytique muni d'un collecteur de fraction (Agilent 1100). Le but de cette analyse est de localiser la ou les molécules responsables de l'activité dans l'extrait brut. De ce fait on utilise une colonne phase inverse (RP-HPLC), qui, à la différence des colonnes phases normales, se caractérise par une phase stationnaire apolaire, la phase mobile dans ce cas est polaire. Ces colonnes sont surtout utilisées pour la séparation des molécules polaires et moyennement apolaire.

Les extraits bruts des isolats d'actinomycètes sélectionnés, qui montrent une activité antimicrobienne remarquable, subissant un fractionnement, sur une microplaque de 96 puits, par une HPLC analytique, sous les conditions suivantes :

- Une colonne phase inverse du type NUCLEODUR C18 ec - MACHEREY-NAGEL
- Un système de solvant constitué de deux solvants de polarité différente : solvant A (5% Acetonitrile/ 95% Eau/ 40 ml HCOOH/5Mm) et le solvant B (95% Acetonitrile/5% Eau/ 40 ml HCOOH/5Mm).
- Le gradient utilisé commence par 10% du solvant B jusqu'à 100 % du solvant B pendant 30 minutes, après, une étape de rinçage de la colonne par le solvant B (100%) pendant 10 minutes, avant de retourner aux conditions initiales (10%) pendant 30 secondes.

Généralement 10 µl d'un extrait brut, préparé à partir d'un isolat d'actinomycètes, sont injectés. Chaque 30 secondes, une fraction est collectée sur un puits différent de la microplaque de 96 puits, jusqu'aux 40 minutes (temps total de fractionnement). A la fin du fractionnement, le solvant est éliminé par l'azote gazeux. Sur les plaques sèches, 150 µL d'une suspension d'un microorganisme sensible (DO: 0.08 à 0.1), sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées pendant 24h à 48h à la température de 30 C° ou 37 C°, selon le type de microorganisme utilisé. Le temps de rétention qui correspond aux puits où l'inhibition de microorganisme test est observée, est déterminé selon le **tableau 3**. Ce temps de rétention est corrélé ensuite avec le chromatogramme d'HPLC obtenu à la fin de l'expérience, afin de localiser la ou les pics responsables de l'activité.

Tableau 3 : corrélation entre la position de l'activité et le temps de rétention

MIC TEST - FRACTIONATION

TIME MAP (min)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	7,5	8		16		24		32		40	
B	0,5	7	8,5	15		23		31		39		
C	1	6,5	9		17		25		33			
D	1,5	6	9,5	14		22		30		38		
E	2	5,5	10		18		26		34			
F	2,5	5		13		21		29		37		
G	3	4,5	11		19		27		35			
H	3,5	4		12		20		28		36		

4. Analyse des extraits bruts par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Afin de déterminer le poids moléculaire ainsi que la formule brute des pics intéressants, 2 μL d'extraits brut, avec une concentration de 1mg/ml, sont injectés dans une spectrométrie de masse de type (High resolution Electrospray Ionisation Masse Spectrometry, Maxis) (Bruker, Maxis), couplé à l'HPLC (Agilent 1260 series), muni d'une colonne à phase inverse avec une phase stationnaire de type (Acquity UPLC BEH C18 column 50 \times 2.1 mm (Waters). La phase mobile est formée de :

- Solvant A : 0.1% d'acide formique dans H₂O,
- Solvant B : 0.1% acide formique dans acetonitrile ;

Le gradient utilisé pour la séparation, commence par 5% solvant B pendant 0.5 min, puis un mode gradient de 5 % B aux 100 % B pendant 19.5 min, et à la fin un mode isocratique de 100 % B pendant 5 min pour le rinçage de la colonne ; le débit utilisé est de 0.6 mL/min; la température de la colonne est fixée à 40 °C; l'appareil est muni d'un détecteur du type DAD (diode array detector) avec des longueurs d'onde : 220, 350 et 360 nm.

5. Recherche des molécules intéressantes dans les bases de données.

Après la détermination du poids moléculaire, la formule brute ainsi que les absorbances maximales d'UV-visible des pics intéressants, les résultats obtenus sont ensuite comparés avec les molécules connues enregistrées dans le dictionnaire des produits naturels (CRC press ; Taylor et Francis group), ainsi que la base de données interne de «Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Allemagne» Myxobase, dans le but de vérifier s'ils sont des molécules connues ou nouvelles.

V. Fermentation, extraction, purification et caractérisation des molécules bioactives sécrétées par la souche sélectionnée.

1. Critères fixés pour la sélection de la souche d'actinomycète.

Parmi tous les isolats obtenus à partir des échantillons des sols analysés, nous n'avons sélectionné que les souches qui remplissent les critères suivants :

- Doit être une nouvelle souche d'actinomycète.
- Ne doit pas appartenir au genre de *Streptomyces*.
- Doit avoir une bonne activité antimicrobienne.

- Doit produire plusieurs métabolites qui ne correspondent à aucune molécule enregistrée dans les bases de données des molécules chimiques.

En suivant ces critères, nous avons sélectionné l'isolat CG3, parmi toutes les souches d'actinomycètes isolés à partir du sol algérien, pour l'extraction, purification et la caractérisation de ces molécules bioactives.

2. Fermentation.

La souche CG3 est ensemencée dans deux Erlenmeyers d'un litre, contenant le milieu Soya bean plus 3% NaCl. Les deux Erlenmeyers sont incubés à la température de 37 °C sous agitation (150 rpm) pendant 6 jours.

Ces deux cultures sont utilisées pour l'inoculation, à 10%, de vingt litres du milieu Soya bean, distribué dans des Erlenmeyers de 1 litre, contenant chacune 400 ml de milieu de culture. Les Erlenmeyers sont ensuite incubés sous agitation (160 rpm) pendant 13 jours à la température de 37 °C (160 rpm).

La biomasse est séparée par rapport au surnageant par centrifugation à la vitesse de 7000 rpm pendant 30 minutes, en utilisant une centrifugeuse de type : Dupont Instrument, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge. La biomasse est récoltée dans des flacons en plastique puis conservé à 4°C pour être utilisée ultérieurement.

Le surnageant obtenu, est versé dans des récipients en verre de 5 L de volume, puis la résine absorbante de type, Amberlite XAD-16, est ajoutée à raison de 10% au surnageant. Le tout est incubé sous agitation à 4°C, pendant une nuit. Les métabolites secondaires sécrétés par l'isolat CG3 seront adsorbés à la surface de XAD. Ensuite, ce dernier est séparé du surnageant par filtration à travers un tamis.

3. Extraction et purification des métabolites secondaires sécrétés par la souche CG3.

Cinq nouvelles molécules ont été obtenues à partir de l'isolat CG3. le protocole utilisé pour l'extraction, purification, caractérisation et la détermination de la structure de ces molécules est représenté ci-après :

3.1 Extraction des métabolites à partir de XAD.

Le XAD est placé dans une colonne puis rincée trois fois par le mélange H₂O/MeOH (3/7 ; V/V) pour éliminer les composés polaires, ensuite, le XAD est élué trois fois par le méthanol. L'extrait méthanolique est ensuite séché par un évaporateur rotatif, puis dissous dans 100 ml

d'acétone, le tout est incubé à 4 °C jusqu'à la formation d'un précipité, qui sera récupéré par centrifugation, lavé plusieurs fois par l'acétone, puis séché.

Le précipité sec (10 mg) est ensuite dissous dans le mélange 10 % DMSO plus 90 % méthanol, puis purifié par HPLC préparatif, en utilisant une colonne de type inverse : Nucleodur Phenyl-hexyl Macherey Nagel, 250×21. mm, 5µm. Le système de solvant utilisé est composé de : solvant A [H₂O–acetonitrile (95/5), 5 mmol NH₄Ac, 0.04 mL/L CH₃COOH]; et solvant B [H₂O–acetonitrile (5/95), 5 mmol NH₄Ac, 0.04 mL/L CH₃COOH]; le gradient commence par 25% solvant B jusqu'au 70% solvant B durant 60 min; le débit est de 20 mL/min. La détection est réalisée à trois différentes longueurs d'onde : 240, 300 et 350 nm.

Les tubes contenant les molécules pures, sont localisés par HPLC analytique. Après élimination du solvant par évaporation, la pureté, le temps de rétention ainsi que le poids moléculaire des nouveaux métabolites sont vérifiés par LC-MS.

3.2 Extraction et purification des métabolites secondaires à partir de la biomasse.

La biomasse de la souche CG3 est placée dans un Erlenmeyer de 2 litres, auquel on a ajouté l'acétate d'éthyle. Le mélange est incubé sous agitation à la température ambiante, pendant une heure, puis la phase organique est récupérée par filtration à travers un papier Wattman N°1, cette opération d'extraction est répétée trois fois. Ensuite, l'extrait d'acétate d'éthyle est séché dans un évaporateur rotatif.

Le résidu d'acétate d'éthyle sec (1.15g) est dissous dans 15 ml de mélange (90% méthanol + 10% DMSO) puis séparé par une chromatographie d'exclusion du type Sephadex LH-20 (3×830 cm), l'élution est réalisée par le méthanol (100%) comme phase mobile, avec un débit de 3,8 ml/min, pendant 4 heures.

Quatre fractions ont été obtenues (**fra 1-4**), l'analyse des fractions par HPLC couplée à la spectrométrie de masse, a révélé que les métabolites secondaires intéressantes existent dans la première fraction.

La première fraction (**Fra 1**) (50mg) a été séparée par HPLC préparatif, avec les conditions suivantes :

- Colonne de type Nucleodur Phenyl-hexyl Macherey Nagel, 250×21. mm, 5µm.
- Système de solvant composé de, solvant A : Eau, et solvant B : acetonitrile.

- Le gradient de séparation utilisé commence de 50% solvant B jusqu'à 60% solvant B, pendant 60 minutes, avec un débit de 20ml/min.

La détection se fait à trois longueurs d'onde : 220, 350 et 360 nm

À la fin de l'expérience, les tubes contenant les métabolites secondaires intéressants de la souche CG3 sont collectés séparément dans des ballons. Après avoir éliminé le solvant par évaporation, la pureté des molécules est vérifiée par LC/MS.

4. Détermination de la structure des métabolites secondaires sécrétés par la souche CG3.

Les structures des molécules purifiées à partir de l'extrait brut de la souche CG3, ont été déterminées par une technique basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN). Les spectres RMN ont été enregistrés sur les spectromètres : Bruker (Bremen, Germany) Avance III 700 spectromètre avec 5 mm TXI cryoprobe (^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz) et Bruker Avance III 500 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz) spectromètre. Les molécules pures sont dissoutes dans des solvants de qualité RMN, qui sont choisis selon la solubilité de la molécule, avant d'être placés dans des tubes Shigemi, puis elles sont envoyées au service RMN du HZI (Braunschweig en Allemagne).

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal de tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, et les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). Le traitement des spectres est réalisé grâce au logiciel MestRec.

5. Caractérisation chimique des métabolites purs de la souche CG3.

5.1 Détermination de la configuration absolue.

Le but de déterminer la configuration absolue d'une molécule est de savoir l'arrangement spatial des radicaux autour du carbone asymétrique (stéréocentre) si elle est R ou S.

La configuration absolue n'a été déterminée que pour le kenalactam A, en utilisant la réaction de Mosher. En effet dans un tube de 4 ml, 2 mg de la molécule Kenalactam A a été dissoute dans 200 μl de dichlorométhane, puis 100 μl de la pyridine plus 5 μl de chlorure de S- (-) – MTPA (l'acide α -methoxy- α -trifluorométhylphénylacétique) ont été ajoutés au tube, le tout est agité à la température ambiante pendant 2 heures. L'ester de (S) -MTPA a été purifié par RP-HPLC semi-préparative [colonne NUCLEODUR: 250 x 10 mm, 100-5 C18 ec, Macherey-Nagel, solvant A: eau, solvant B: acétonitrile. Gradient: de 40% B à 100% B en 30 min, débit: 6 mL / min, détection UV: 220, 350 et 360 nm] pour donner 0,3 mg du composé 1a (m / z 584,32). L'ester de (S) -MTPA pure, est dissous directement dans 100 μl de chloroforme (qualité RMN) puis envoyé au service RMN pour obtenir le spectre RMN entier : **^1H , COSY, TOCSY et ROESY.**

5.2 Détermination de la rotation optique.

La rotation optique est définie comme la propriété des molécules dissoutes dans un solvant de faire tourner le vecteur d'un faisceau de la lumière polarisé, vers la droite (les valeurs prennent un signe positif) ou vers la gauche (les valeurs prennent un signe négatif). Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_d^T$ est calculé par la loi de Biot. Elle dépend de la température, de la longueur d'onde, et du solvant sur laquelle l'expérience a été réalisée. On considère, généralement, que l'expérience est réalisée sous température ambiante (20 °C) à la longueur d'onde de 589nm.

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{100 \times \alpha}{l \times c}$$

α : angle de rotation observé en degrés.

l : longueur de la cuve en dm.

c : concentration de la solution en g / mL.

$[\alpha]_d^T$: pouvoir rotatoire spécifique défini à une température T et mesuré pour une longueur d'onde donnée, exprimée en g-1.mL.dm-1.

A noter que la rotation spécifique a été mesuré par un polarimètre de type PerkinElmer 241 MC, en utilisant une cuvette en quartz de 10 cm de longueur avec 0.5 ml de volume.

5.3 Détermination du spectre UV-visible et calcul du coefficient d'absorption molaire.

Les spectres UV-Visibles des kenalactams (A-E) sont mesurés dans le MeOH pur (99,98%), sur un spectrophotomètre du type Shimadzu UV/vis-2450 à double faisceau. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm de largeur. Les longueurs d'onde varient entre 100 - 400 nm.

Le coefficient d'extinction molaire, appelé aussi, le coefficient d'absorption molaire, est calculé à partir de la formule suivante :

$$\varepsilon = \frac{A}{CL}$$

Où

A : est l'absorbance de la molécule considérée, pour une longueur d'onde donnée.

C : la concentration molaire de la solution.

L : la longueur du trajet optique, c'est-à-dire l'épaisseur de solution traversée par la lumière.

6. La mise en évidence de l'activité biologique des métabolites purs de la souche CG3.

6.1 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.

La concentration minimale inhibitrice des molécules pures sécrétées par la souche CG3, a été déterminée par la méthode de dilution sur des microplaques de 96 puits (protocole décrit précédemment). 20 μ l des solutions des molécules pures avec la concentration de 1 mg/ml (la concentration finale dans le premier puits de chaque molécule est de 67 μ g / ml), a été testés contre deux bactéries à Gram positifs (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), une bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli* TolC) et deux champignons (*Candida albicans* et *Mucor hiemalis*) avec du méthanol comme contrôle négatif, alors que l'oxytétracycline et la nystatine ont été utilisé comme contrôle positif.

6.2 Activité cytotoxique.

L'activité cytotoxique (IC₅₀) des molécules pures sécrétées par la souche CG3, a été déterminée contre un panel de six lignés cellulaires différentes, dont une cellule normale, mouse fibroblasts L929, et cinq lignées cellulaires cancéreuses, HeLa cells KB3.1, human lung carcinoma A549, ovarian carcinoma SKOV-3, human prostate cancer PC-3, human breast adenocarcinoma MCF-7.

L'évaluation de l'activité cytotoxique a été réalisée par le test au MTT (bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium) ou tétrazolium, en effet, c'est une méthode colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité des cellules au sein d'un échantillon. Le principe de cette méthode repose sur la réduction de tétrazolium, qui possède une couleur jaune, par le succinate déshydrogénase mitochondriale, en formazan, qui possède une couleur pourpre, la quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

Les différentes lignées cellulaires sont d'abord cultivées dans le milieu EBM-2 (Lonza) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal. L'incubation est réalisée sous 10 % de CO₂ à la température de 37 ° C.

Le test de cytotoxicité est réalisé dans des plaques de 96 puits. Pour chaque ligné cellulaire, des suspensions de 50000 cellules/ml ont été préparés. 120 μ l de chaque suspension cellulaire est introduit dans chaque puits de la microplaque, ensuite, 60 μ l de la molécule à tester (1 mg/ml) est ajouté au premier puits. Après avoir bien mélangé le contenu du 1^{er} puits, des dilutions à ½ sont effectuées jusqu'au 12^{ème} puits. Les différentes plaques sont incubées pendant 16, 24 et 48 h à 37 ° C sous 10 % de CO₂. Après incubation, 10 μ l de tétrazolium (5 mg/ml) ont été déposés dans chacun des puits. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 3 h à 37° C et à 10 % de CO₂. Les

plaques ont été centrifugées à 3000 tr/min pendant 5 min, puis 50 à 100 μ L de PBS ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été centrifugées à nouveau puis les surnageantes ont été jetées. 50 à 100 μ L d'isopropanol avec 40 mM d' HCl ont été ajoutés dans chaque puits pour solubiliser les cristaux de MTT, puis les plaques ont été agitées à 450–700 tr/min sur un agitateur à plaques. L'absorbance a été mesurée par un lecteur de plaque Elisa (Victor, PerkinElmer, Überlingen, Germany) à la longueur d'onde 590 nm, pour déterminer les cellules mortes et vivantes. IC50 correspond à la concentration de la molécule qui réduit l'absorbance par 50% par rapport au contrôle positif (Mulwa et al, 2018).

Le méthanol a été utilisé comme contrôle négatif, alors que l'épothilone B est utilisé comme contrôle positif.

7. L'expérience de l'alimentation (feeding experiment).

Les nouvelles molécules purifiées à partir de la souche CG3 appartiennent à la famille des macrolactams polyénique, d'après la bibliographie de la biosynthèse de ce genre de molécules, par les actinomycètes, implique des starters, qui sont généralement des acides aminés structurels. Afin de déterminer l'acide aminé starter utilisé par la souche CG3 pour la biosynthèse de ces molécules, nous avons procédé à l'expérience d'alimentation ou « **feeding experiment** » de la souche CG3.

D'après les résultats de la mise en évidence de l'utilisation de différentes sources d'azote par la souche CG3, nous avons remarqué que notre souche peut utiliser onze acides aminés différents : Lys, Ala, Met, Val, Arg, Gly, Phe, Pro, His, Thr, Glu.

L'expérience de l'alimentation est réalisée en utilisant le milieu ISP2 liquide + 3 % NaCl sans extrait de malt, qui représente la source d'azote, comme milieu de base.

Le milieu ISP2 liquide + 3 % NaCl sans extrait de malt, est distribué dans 13 Erlenmeyers de 50 ml de volume, dans chaque erlenmeyer, 20 ml de milieu de culture de base (ISP2 sans extrait de malt) est ajouté. Après stérilisation de milieu de culture, les acides aminés, stérilisés par filtration, sont ajoutés séparément dans les 11 Erlenmeyers à la concentration de 1% d'acide amine dans chaque Erlenmeyer. Un Erlenmeyer sert comme contrôle positif, après l'ajout de 1% de l'extrait de malt, alors que le deuxième Erlenmeyer est utilisé comme contrôle négatif. Les 13 Erlenmeyers sont ensuiteensemencés par les spores de la souche CG3 puis incubés en agitation (150 rpm) à la température de 37° C.

Après 14 jours d'incubation, le contenant de chaque Erlenmeyer est versé séparément dans des tubes Falcons de 50 ml de volume, qui contient 20 ml d'acétate éthylique. Les tubes sont ensuite

incubés sous agitation à la température ambiante pendant 30 minutes, pour l'extraction des métabolites secondaires. Ensuite, les tubes sont centrifugés, et la phase organique de chaque tube est récupérée par pipetage, dans des ballons qui sont évaporés à sec à la température de 40°C. L'extrait sec de chaque ballon est récupéré dans 500 µl de méthanol.

2 µl de chaque extrait, qui correspond à un acide aminé différent, sont analysés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). La présence des pics qui correspondent aux différents kenalactams est notée dans l'extrait brut préparé à partir de chaque acide aminé.

Après avoir déterminé l'acide aminé starter utilisé par la souche CG3 pour la biosynthèse des kenalactams, une confirmation de ces résultats est réalisée par l'alimentation de la souche CG3 par le même acide aminé starter mais avec un atome d'azote N¹⁵ (isotope).

Résultats et Discussions

I. Résultats d'isolement des actinomycètes à partir de différents échantillons du sol.

Après 7 à 90 jours d'incubation, les colonies d'actinomycètes sont détectées dans les boîtes d'isolement par leurs aspects macroscopiques : colonies sèches incrustées dans la gélose, qui possèdent ou non un mycélium aérien (Anandan et al, 2016).

Les résultats de l'isolement des actinomycètes à partir des différents échantillons de sols sont représentés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Résultats d'isolement des actinomycètes à partir de chaque échantillon du sol enrichi et non enrichi.

Régions de prélèvement d'échantillon	Sol non enrichi			Sol enrichi		
	CAA	CH-B	HVB	CAA	CH-VB	HVB
Kenadsa	15	8	10	1	0	4
Bougtob	7	1	4	0	0	3
Tadjrouna	4	0	1	0	0	1
Hassi bahbah	16	10	17	3	1	5
Ain ouarka	8	2	6	4	2	7
Ain salah	22	18	25	11	7	17
Total	72	93	63	19	10	37

CAA : caséine amidon agar ; CH-B: chitine vitamine B ; HVB: Humic Acid Vitamin B.

Selon les résultats du **tableau 4**, le nombre d'actinomycètes obtenus varie en fonction de l'origine de l'échantillon, du milieu de culture utilisé ainsi que l'enrichissement ou non des échantillons du sol.

En général, le but d'isolement des actinomycètes à trois principaux objectifs :

- Le premier but est d'étudier la biodiversité des actinomycètes dans un environnement, pour cela tous les actinomycètes présents dans cet environnement doivent être isolés et identifiés. Pour atteindre cet objectif, les milieux de culture utilisés doivent permettre la croissance de la plupart des actinomycètes. Des antibiotiques et des antifongiques sont ajoutés aux milieux de cultures afin de stopper la croissance des microorganismes indésirables (Barka et al, 2016 ; Boonsongcheep et al 2017 ; Buedenbender et al, 2017).
- Le deuxième but, est l'isolement des actinomycètes qui possèdent des caractères physiologiques ou biochimiques spécifiques, comme la dégradation de certains polluants chimiques (Lin et al, 2011), la résistance à la salinité ou à l'acidité (Poomthongdee et al, 2014), la croissance à une grande température (Mohamedin et al, 1999). Pour l'obtention de ce genre d'actinomycètes, le milieu de culture, ainsi que les conditions de cultures, doivent être adaptés par rapport aux caractères recherchés. Par exemple, pour l'isolement

des actinomycètes qui dégrade un polluant chimique, le milieu de culture doit contenir ce polluant chimique comme seule source de carbone, donc toutes les colonies qui apparaissent correspondent aux actinomycètes qui dégradent ce polluant (**Mukhtar et al, 2017**).

- Le troisième but, est l'isolement de nouveaux taxons d'actinomycètes, qui peuvent être la source de nouvelles molécules bioactives (**Cumsille et al 2017 ; Lee et al 2018**). Cela nécessite la restriction de la croissance non seulement des bactéries à Gram négatif, et de certaines bactéries à Gram positif, ainsi que les champignons, mais aussi de la plupart des actinomycètes communs, en particulier les *Streptomyces* (**Dhakal et al, 2017**). Donc les échantillons utilisés pour l'isolement des actinomycètes doivent subir un enrichissement pour sélectionner un groupe d'actinomycètes recherché et éliminer les autres. Par exemple, **Hayakawa et al. (1991)** ont proposé une méthode sélective pour l'isolement des actinomycètes qui appartiennent aux genres *Streptosporangium* et *Dactylosporangium* qui consiste à chauffer les échantillons du sol pendant 1 h à la température de 100°C suivis par un traitement par le chlorure de benzéthonium.

C'est dans ce troisième but que s'inscrit notre travail de thèse. En effet, 294 colonies d'actinomycètes ont été isolées à partir des échantillons du sol analysés. Les échantillons non enrichis ont donné un nombre de colonies d'actinomycètes clairement supérieurs (228 colonies) par rapport aux échantillons enrichis par la méthode de centrifugation hydratation (66 colonies). Ceci s'explique par le fait que la méthode d'enrichissement par hydratation-centrifugation permet un isolement sélectif des actinomycètes qui libèrent des spores mobiles par des flagelles (**Hayakawa et al, 2000**). Généralement ce genre d'actinomycètes est en nombre faible dans le sol, par rapport aux autres actinomycètes à croissance rapide qui sont abondants. De ce fait, on peut prédire que les 228 colonies d'actinomycètes obtenues à partir de sol non enrichi correspondent pour la plupart aux actinomycètes à croissance rapide tel que : *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Micromonospora*, tandis que les 66 colonies obtenues à partir de sols enrichi correspondent aux actinomycètes à croissance lente qui ont des spores flagellées (*Planomonospora*, *Actinoplan*, *Spirillospora...*), et qui sont difficiles à obtenir par les méthodes conventionnelles.

Plusieurs chercheurs ont signalé l'efficacité de la méthode de réhydratation-centrifugation, pour l'obtention des actinomycètes rares. En effet, l'identification moléculaire des 40 souches d'actinomycètes isolés à partir des grottes, par la méthode de réhydratation-centrifugation, par **Adam et al. 2018**, indique la présence d'une très bonne diversité d'actinomycètes dont certains appartiennent à des genres rares *Agromyces*, *Amycolatopsis*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nocardia* et *Rhodococcus*, bien que l'isolement des actinomycètes à partir de la même grotte par les

méthodes conventionnelles, n'ont abouti qu'à l'isolement de *Streptomyces*. Donc on peut conclure que la méthode d'enrichissement, hydratation centrifugation, influe fortement sur la qualité des actinomycètes isolées et non plus sur leurs quantités.

Les travaux ultérieurs sur l'isolement des actinomycètes à partir du sol algérien, ont montré toute sa richesse en actinomycètes surtout ceux qui appartiennent aux genres rares. En effet, **Saker et al, (2015a)**; **Saker et al, (2015b)** et **Saker et al, (2015c)**, ont obtenu 69 souches d'actinomycètes à partir du sol algérien, qui appartiennent aux six différents genres : *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Prauserella*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* et *Streptomonospora*, dont trois nouvelles espèces.

La variation en nombre de colonies d'actinomycètes obtenue à partir de chaque échantillon du sol est due à plusieurs facteurs physicochimiques, dont le pH, la matière organique, l'humidité et la salinité du sol, ainsi qu'à la présence ou non du couvert végétal, le taux de pluviométrie et la saison dont les échantillons ont été prélevés (**Qin et al, 2016**).

II. Identification moléculaire et étude phylogénétique des souches d'actinomycètes isolées.

L'objectif principal de la thèse est l'isolement de nouvelles molécules bioactives à partir des souches d'actinomycètes isolées du sol algérien. Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à une première sélection des souches d'actinomycètes, sur la base des critères fixés dans la partie « **observation et sélection des souches d'actinomycètes** » du chapitre matériels et méthodes. Cela nous a permis, d'une part, d'éviter l'identification moléculaire de toutes les souches d'actinomycètes isolées (294 isolats), et d'autre part d'éliminer les isolats qui se ressemblent par leurs morphologies, macroscopiques et microscopiques, au genre *Streptomyces*, et de sélectionner les isolats qui appartiennent aux genres rares d'actinomycètes, dont leur métabolisme secondaire est peu exploité.

Ensuite, les souches sélectionnées subissent une identification moléculaire, sur la base de séquençage de l'ADNr16s. Seules les nouvelles souches d'actinomycètes qui appartiennent aux genres rares ont été retenues pour le reste du travail.

41 isolats ont été retenus, parmi les 294 souches isolées, qui sont ensuite identifiées sur la base du séquençage de l'ADNr16S. Les résultats de l'identification moléculaire des souches d'actinomycètes sélectionnées sont représentés dans **le tableau 5**.

Tableau 5 : Résultat de l'identification moléculaire des isolats d'actinomycètes sélectionnés.

Code des souches	Cluster	Espèce de référence la plus proche	Similarité (%)	Longeurs de la séquence d'ADNr16S
C56	Cluster I	<i>Streptomyces olivaceus</i>	99.93	785 pb
C119		<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	100.00	885 pb
V17		<i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	99.72	720 pb
RH94		<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	99.86	730 pb
CS44		<i>Streptomyces hydrogenans</i>	99.46	750 pb
S29		<i>Streptomyces artemisiae</i>	99.65	725 pb
C7		<i>Streptomyces peucetius</i>	99.72	715 pb
V11		<i>Streptomyces albogriseolus</i>	100	700 pb
V12		<i>Streptomyces lavendofoliae</i>	99.88	715 pb
V9		<i>Streptomyces pactum</i>	100	730 pb
V5		<i>Streptomyces hydrogenans</i>	99.49	785 pb
V3		<i>Streptomyces qinglanensis</i>	99.67	700 pb
CAC512		<i>Streptomyces qinglanensis</i>	99.25	710 pb
A34		<i>Streptomyces afghaniensis</i>	100	715 pb
A28		<i>Streptomyces levis</i>	99.68	720 pb
A5		<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	99.68	933 pb
A1		<i>Streptomyces flavotricini</i>	100	810 pb
A108		<i>Streptomyces levis</i>	99.66	900 pb
O2		<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	100	850 pb
A36		<i>Streptomyces erythrogriseus</i>	100	760 pb
A34	<i>Streptomyces afghaniensis</i>	100	780 pb	
A16	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i>	100	815 pb	
A10	<i>Streptomyces globosus</i>	100	870 pb	
C10	Cluster II	<i>Nocardiopsis terrae</i>	99.65	750 pb
CG3		<i>Nocardiopsis rosea</i>	99.20	1507pb
T1		<i>Nocardiopsis terrae</i>	99.72	780 pb
C19		<i>Nocardiopsis terrae</i>	99.65	780 pb
M23		<i>Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei</i>	99.74	775 pb
CHB2		<i>Nocardiopsis terrae</i>	99.46	750 pb
T14		<i>Nocardiopsis halotolerans</i>	100	730 pb
S4		<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	99.89	700 pb
BO15		<i>Nocardiopsis terrae</i>	99.72	770 pb
A58		<i>Nocardiopsis arvandica</i>	100	790 pb
S27	Cluster III	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	100.00	1400 pb
S26		<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	99.87	785 pb
A23	Cluster IV	<i>Actinocorallia libanotica</i>	99.86	1475 pb
A112		<i>Actinomadura montaniterrae</i>	99.33	900 pb
A15		<i>Micromonospora yasonensis</i>	99.38	815 pb
A111	Cluster V	<i>Couchioplanes caeruleus subsp. azureus</i>	98.74	1485 pb
A93		<i>Verrucosispora maris</i>	97.77	1485 pb
A79	Cluster VI	<i>Planomonospora alba</i>	99.11	1120 pb

Sur la base des résultats de l'identification moléculaire représentée dans le **tableau 5**, nous avons subdivisé les 41 isolats d'actinomycètes sélectionnés en 6 clusters qui appartiennent aux neuf genres différents.

1. Actinomycètes du cluster I.

C'est le plus grand groupe en nombre d'isolats d'actinomycètes. En effet dans ce cluster on retrouve 23 isolats, C56, C119, V17, RH94, CS44, S29, C7, V11, V12, V9, V5, V3, CAC512, A34, A28, A5, A1, A108, O2, A36, A34, A16, A10. Les résultats du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de ces 23 isolats indiquent quels appartiennent tous au genre *Streptomyces*. Huit isolats, C119, A34, A1, O2, A36, A34, A16, A10, ont donné un pourcentage de similarité de 100 % avec des espèces de références connues du genre *Streptomyces*. Alors que le pourcentage de similarité pour les 15 autres isolats, varie entre 99.25 %, pour l'isolat CAC512 avec l'espèce *Streptomyces qinglanensis*, et 99.93 % entre la souche C56 avec l'espèce *Streptomyces olivaceus*.

Certaines souches ont donné des pourcentages de similarité très proche avec la même espèce de *Streptomyces*, et pourraient peut-être appartenir à la même espèce, c'est le cas par exemple des souches CS44 et A5 qui sont proches de l'espèce *Streptomyces hydrogenans* avec une similarité de 99.46% et 99.49% respectivement, ou les deux souches A108 et A28 qui partagent respectivement une similarité de 99.66% et 99.68% avec l'espèce *Streptomyces levis*.

Les relations entre les souches isolées ainsi que les espèces types du genre *Streptomyces* sont représentées dans l'arbre phylogénétique de la **figure 24**.

Les 23 isolats obtenus appartiennent au genre *Streptomyces*, qui est membre de la famille *Streptomycetaceae*, ordre de *Streptomycetales* et phylum d'*Actinobacteria* (**Chen et al, 2016**). Ces souches partagent certaines caractéristiques communes du genre *Streptomyces* : la formation d'un mycélium de substrat très ramifié et stable, rarement fragmenté. À maturité, le mycélium aérien forme des chaînes de trois à plusieurs spores. Quelques espèces peuvent même avoir une courte chaîne de spores sur le mycélium de substrat. Les espèces du genre *Streptomyces* sont caractérisées par la production d'une large gamme de pigments responsables de la coloration de mycéliums aériens et de substrat (**Anandan et al, 2016**).

Les membres du genre *Streptomyces* représentent la première source naturelle de métabolites secondaires d'origine microbienne (**Čihák et al, 2017**). En effet, selon la base de données 'dictionnaire des produits naturels' (CRC press ; Taylor et Francis group), 7953 molécules ont été isolées et identifiées à partir du genre *Streptomyces* jusqu'à maintenant.

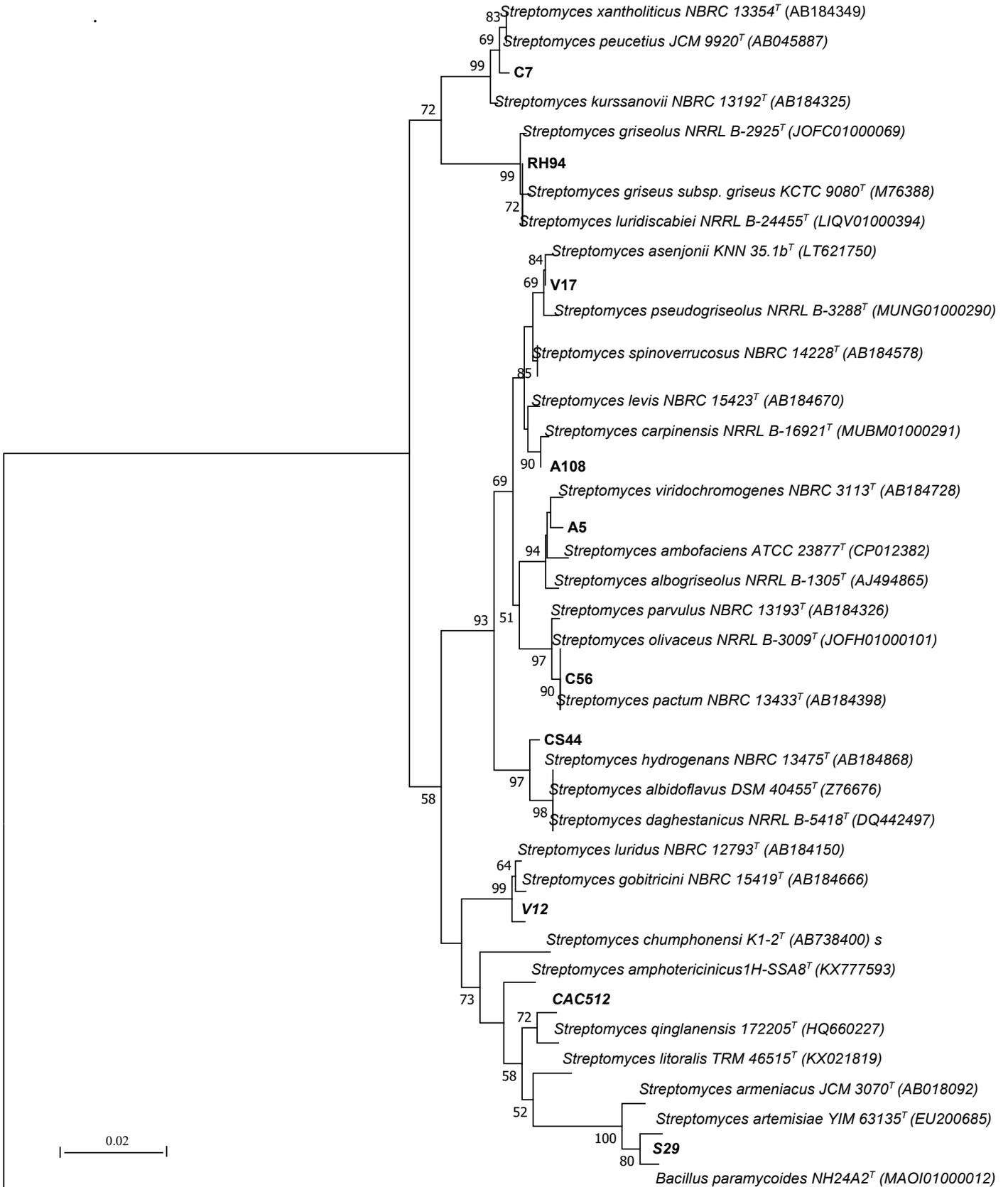


Figure 24 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster I et les souches-types des espèces les plus proches de genre *Streptomyces*.

De ce fait, la probabilité d'obtenir des nouvelles molécules à partir des espèces du genre *Streptomyces* est devenue de plus en plus faible à cause du mécanisme d'échange génétique entre les souches dans l'environnement.

Comme les résultats de l'identification moléculaire affirment que tous les isolats qui appartiennent au cluster I sont membres dans le genre *Streptomyces* avec des pourcentages de similarités supérieurs à 99.25 %, ce qui indique que ces isolats ont très peu de chances d'être des nouvelles espèces. Pour toutes ces raisons, est comme notre objectif principal est l'isolement de nouvelles souches d'actinomycètes, qui produisent des nouvelles molécules bioactives, aucun isolat n'a été sélectionné à partir de ce cluster pour le reste du travail.

2. Actinomycètes du cluster II.

Ce cluster est représenté par dix isolats, C10, CG3, T1, C19, M23, CHB2, T14, S4, BO15, et A58. Selon les résultats de l'identification moléculaire basée sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16s, ces isolats appartiennent tous au genre *Nocardiopsis* (**tableau 5**). Les relations phylogénétiques entre ces isolats et les espèces du genre *Nocardiopsis* sont représentées dans l'arbre phylogénétique de la **figure 25**.

Tous ces isolats ont été isolés à partir des différentes sebkhas. En effet, les espèces du genre *Nocardiopsis* sont connues par leurs tolérances à des concentrations très élevées en NaCl, et sont très abondantes dans les endroits salins (**He et al, 2015**).

Cinq isolats, sont proches de l'espèce *Nocardiopsis terrae* avec une similarité variable, dont deux isolats (T1 et BO15) ont une similarité de 99.72% alors que les deux isolats, C10 et C19, ont une similarité de 99.65%, tandis que l'isolat CHB2 a une similarité de 99.46% avec la même espèce. Les deux isolats T14 et A58 sont identiques à 100% avec les deux espèces, *Nocardiopsis halotolerans* et *Nocardiopsis arvandica*, respectivement.

L'isolat, CG3, a attiré notre attention, en effet, le séquençage de l'ADNr16S de cet isolat à donner un pourcentage de similarité faible (99.20%) avec l'espèce *Nocardiopsis rosea*, en plus, l'arbre phylogénétique (**figure 25**) montre que cet isolat se détache des autres espèces du même clade du genre *Nocardiopsis*, donc cette souche peut représenter une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiopsis* d'où une hybridation ADN-ADN est nécessaire entre l'isolat CG3 et l'espèce *Nocardiopsis rosea* pour confirmer ce constat.

Le genre *Nocardiopsis*, appartient à la famille de *Nocardiopsaceae*, ordre d'*Actinomycetales* et phylum d'*Actinobacteria* (**Ibrahim et al, 2018**). Les espèces du genre *Nocardiopsis* forment un mycélium de substrat bien développé dense et ramifié qui se fragmente, à maturité, en éléments coccoïdes et bacillaires. Le mycélium aérien se fragmente en chaînes de spores droites, ramifié ou en zigzag. Le peptidoglycane des *Nocardiopsis* contenant de l'acide méso-diaminopimélique mais

pas de glycine. Alors que l'extrait cellulaire ne contient aucun sucre caractéristique. Les phospholipides membranaires majeurs sont la phosphatidylcholine, la phosphatidylméthyléthanolamine, le phosphatidylglycérol et le phosphatidylinositol, avec de petites quantités de diphosphatidylglycérol. Les ménaquinones sont principalement (MK-10) (Bennur et al, 2015).

Le *Nocardiopsis* est un genre d'actinomycètes peu exploité en matière de métabolites secondaires par rapport aux *Streptomyces* et *Micromonospora*, en effet, selon la base de données 'dictionnaire des produits naturels' (CRC press ; Taylor et Francis group), 124 molécules ont été purifiées et identifiées, jusqu'à présent, à partir de ce genre.

En prenant compte que la souche CG3 peut être une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiopsis*, cet isolat a été sélectionné, à partir du cluster II, pour le reste du travail.

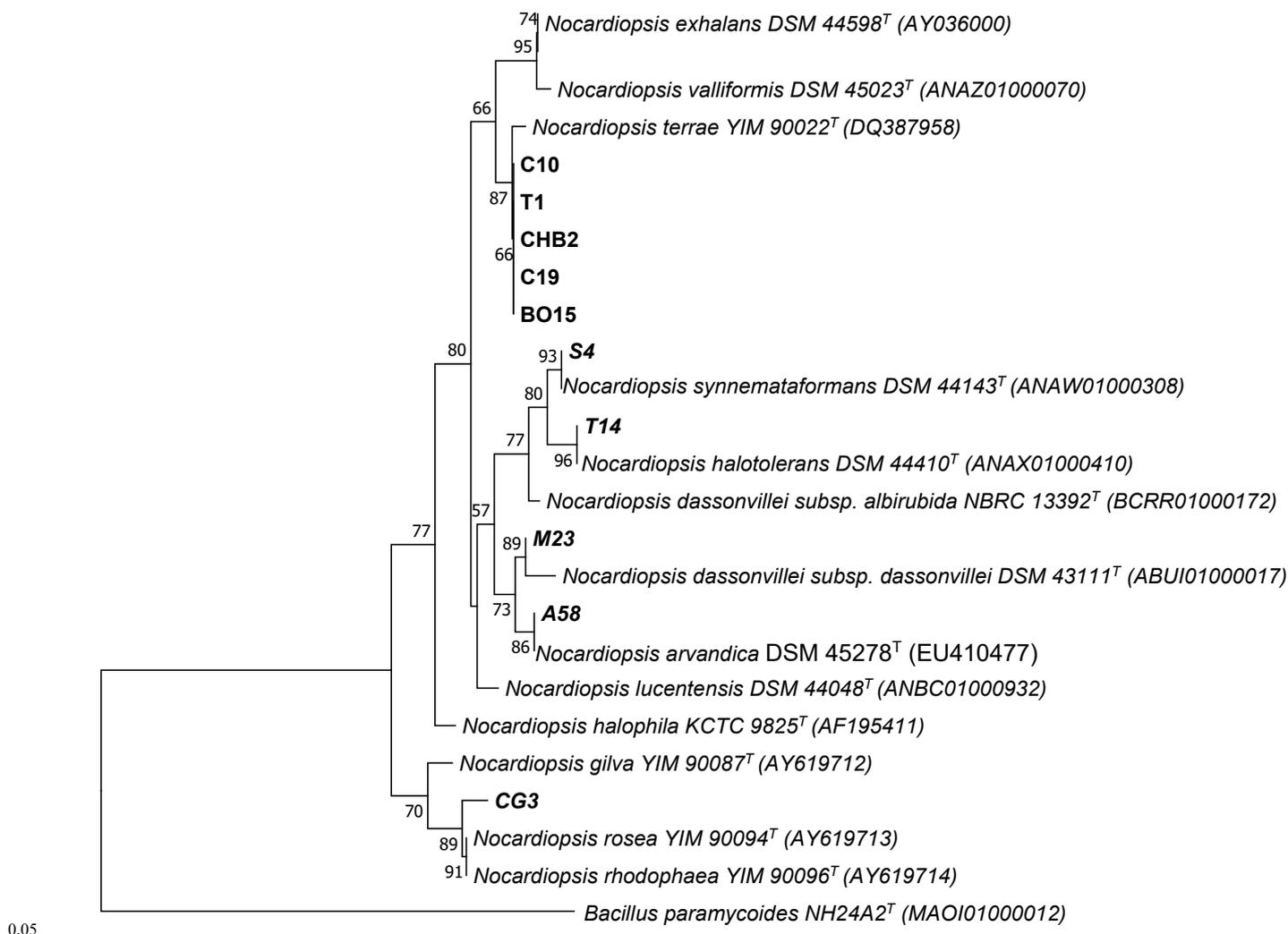


Figure 25 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster II et les souches-types des espèces les plus proches de genre *Nocardiopsis*.

3. Actinomycètes du cluster III.

L'identification moléculaire basée sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16s, indique que les deux membres du cluster III, S26 et S27, sont proches de 99.87% et 100%, respectivement, à l'espèce *Saccharopolyspora erythraea*. L'analyse phylogénétique a confirmé que les deux isolats s'alignent sous l'espèce *Saccharopolyspora erythraea* (figure 26).

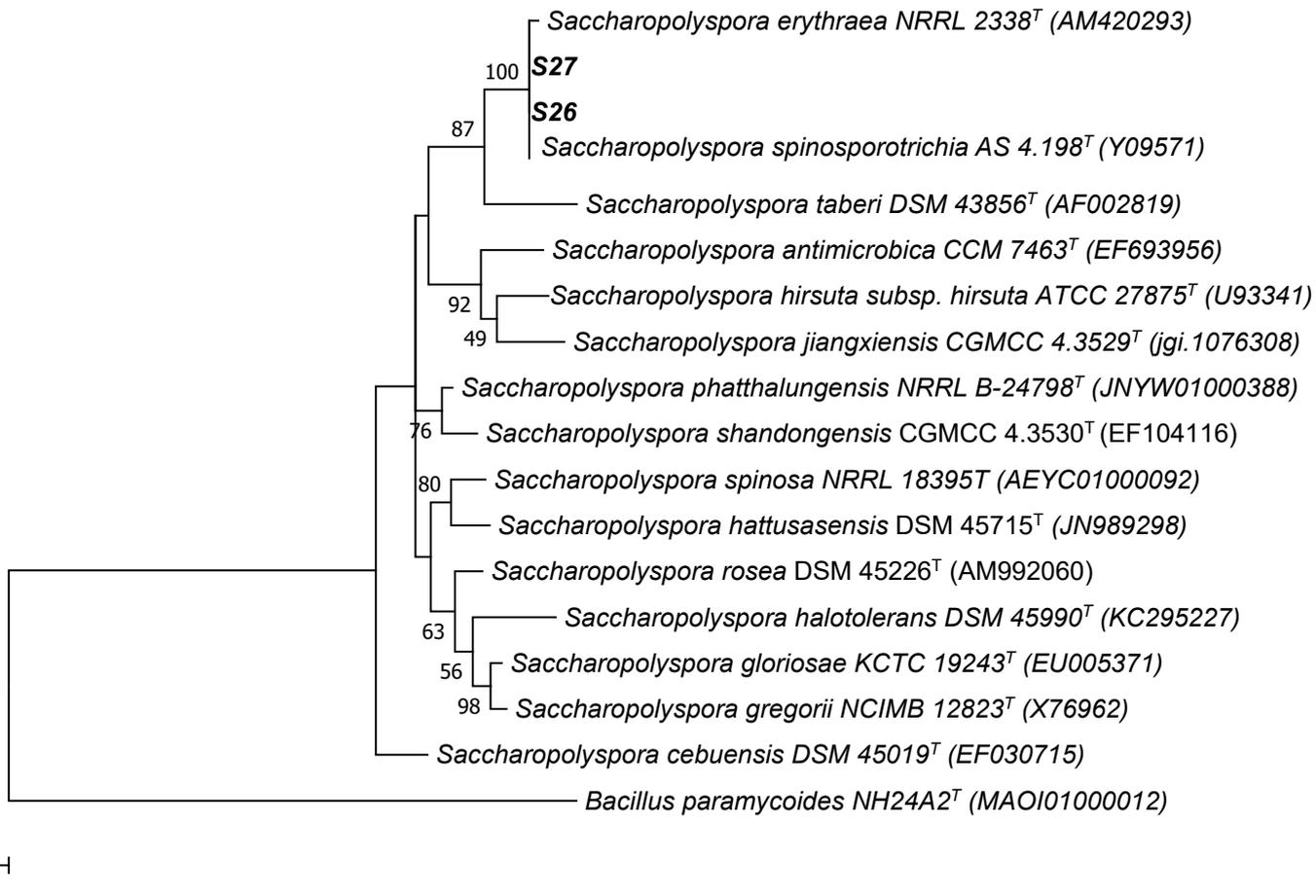


Figure 26 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de Neighbor-Joining, qui montrent les relations des souches appartenant au cluster III et les souches-types des espèces les plus proches de genre *Saccharopolyspora*.

Le genre *Saccharopolyspora*, est membre dans la famille de *Pseudonocardiaceae*, ordre d'*Actinomycétales*, et phylum d'*Actinobacteria*. Les espèces du genre *Saccharopolyspora* partageant certains caractères en commun, ce sont des aérobies à Gram positif, non mobile et catalase positive. Le mycélium de substrat est fragmenté à maturité en forme coccoïde, alors que le mycélium aérien, s'il est présent, porte des chaînes de spores. La paroi cellulaire contient de l'acide méso-diaminopimélique, alors que l'arabinose et le galactose sont des sucres caractéristiques. Les acides gras dominants sont l'acide iso- et anteiso-ramifiés et la ménaquinone major est le MK-9 (H4) (Yang et al, 2018).

L'espèce *Saccharopolyspora erythraea* est connue par la production de l'antibiotique érythromycine qui est un macrolide, de 14 carbones dans le cycle macrolactone, actif contre certaines bactéries à Gram positif et négatif (Wu et al, 2011).

L'espèce *Saccharopolyspora erythraea* est caractérisée par sa morphologie microscopique distinctive par rapport aux autres espèces du genre *Saccharopolyspora*. En fait, les chaînes de spores de cette espèce sont entourées par une gaine de surface épineuse à la différence d'autres espèces du même genre, qui se caractérisent par une gaine de surface lisse (Kim et al, 2015). Comme notre objectif est la sélection des nouvelles souches d'actinomycètes, nous avons retenu l'isolat S26 pour le reste du travail, afin de vérifier si cet isolat représente une nouvelle espèce dans le genre *Saccharopolyspora* ou il est identique avec l'espèce *Saccharopolyspora erythraea*, sur la base de sa morphologie microscopique.

4. Actinomycètes du cluster IV.

Ce cluster est représenté par deux isolats, A23 et A112. Le séquençage de l'ADNr16S indique que l'isolat A23 se rapproche à l'espèce *Actinocorallia libanotica* avec une similarité de 99.86%, alors que la similarité entre l'isolat A112 et l'espèce la plus proche, *Actinomadura montaniterrae*, est de 99.33%. La figure 27 montre les relations phylogénétiques entre les deux isolats, A23 et A112, avec les espèces types des genres, *Actinocorallia* et *Actinomadura*. L'isolat A23 s'aligne exactement sous l'espèce *Actinocorallia libanotica* ce qui indique que les deux sont identiques. Cependant, l'isolat A112 s'aligne dans le même clade avec l'espèce, *Actinomadura rudentiformis*.

Les deux genres, *Actinocorallia* et *Actinomadura*, sont membres dans la famille de *Thermomonosporaceae*, subordre de *Micromonosporineae* ordre d'*Actinomycetales*, sous-classe d'*Actinobacteridae*, et phylum d'*Actinobacteria* (Zhi et al, 2009).

Les genres de la famille de *Thermomonosporaceae*, dont les deux isolats A23 et A112 sont membres, forment un mycélium de substrat stable qui porte un mycélium aérien, ce dernier porte, soit, des spores immobiles organisées sous forme d'une chaîne, ou des sporanges qui renferment des spores mobiles par des flagelles. Certains genres de cette famille sont des thermophiles alors que les autres sont mésophiles. Les acides aminés caractéristiques sont le méso-DAP, alors aucun sucre caractéristique n'est détecté dans l'extrait cellulaire. MK-9 est la ménaquinone major (Kroppenstedt et al, 2006).

Aucun des deux isolats, A23 et A112, n'a été sélectionnés pour la suite du travail.

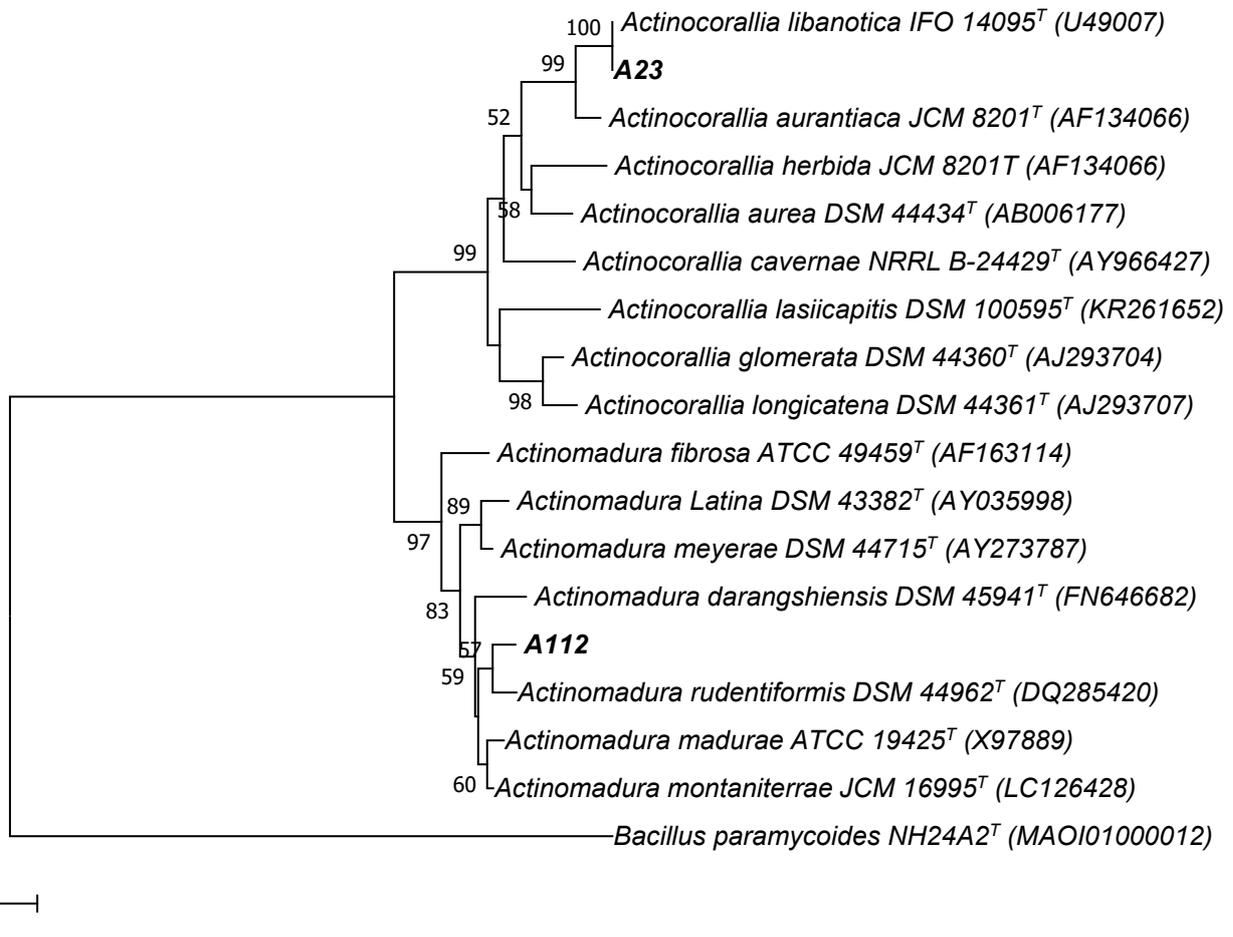


Figure 27 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montrent les relations des souches appartenant au cluster IV et les souches-types des espèces les plus proches de genre *Actinomadura* et *Actinocorallia*.

5. Actinomycètes du cluster V

Ce cluster est représenté par trois isolats, A15 A111 A93, qui appartiennent tous à la famille de *Micromonosporaceae*, ordre de *Micromonosporales*, et phylum d'*Actinobacteria* (Liu et al, 2017).

La comparaison des séquences du gène codant pour l'ADNr16S des trois souches représentatives du cluster V avec celles des espèces connues les plus proches a permis de rapprocher l'isolat A15 à l'espèce *Micromonospora yasonensis* avec une similarité de 99.33%, alors que l'isolat A111 est proche de l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus* avec une similarité de 98.74%, tandis que l'isolat A93 est proche à l'espèce *Verrucosipora maris* avec une similarité de 97.77%.

L'arbre phylogénétique représenté dans la **figure 28** montre la position taxonomique des isolats A15, A111 et A93 par rapport aux espèces les plus proches de la famille

Micromonosporaceae. On remarque clairement que l'isolat A15 se détache des autres espèces du genre *Micromonospora* et forme un clade à part, ce qui indique que cet isolat peut représenter une nouvelle espèce dans ce genre, mais sous réserve des résultats de l'hybridation ADN-ADN. La même étude phylogénétique a montré que l'isolat A93 se détache aussi des espèces proches représentatives du genre *Verrucosispora*, et forme nettement un nouveau clade dans l'arbre phylogénétique, ce qui favorise la probabilité que l'on est en présence d'un nouveau genre. Donc une analyse phylogénétique approfondie est nécessaire pour trancher sur la position taxonomique incertaine de cette souche.

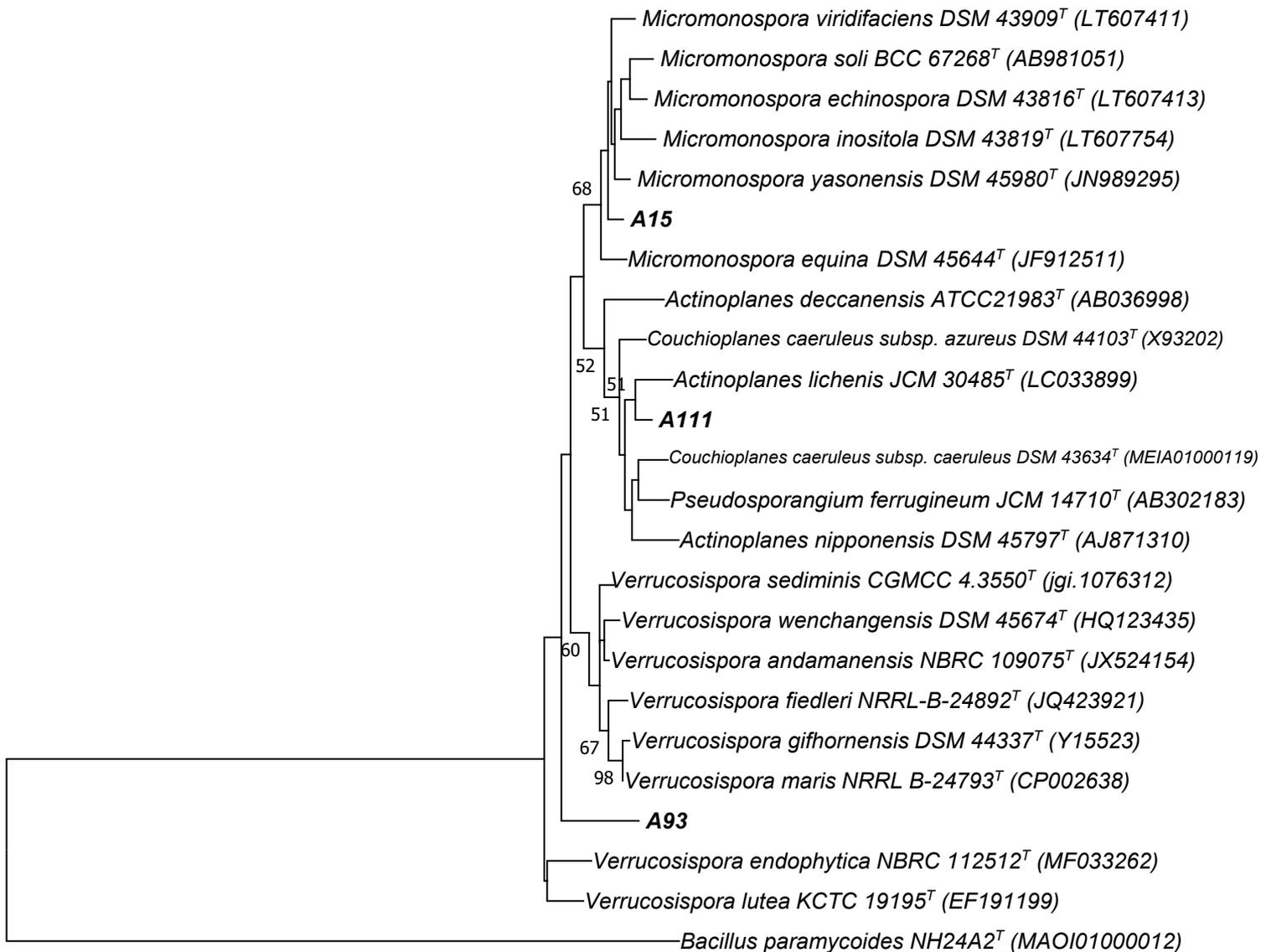
L'identification moléculaire a montré que l'isolat A111 est proche de l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus*, alors que l'analyse phylogénétique, **figure 28**, a indiqué que cet isolat s'aligne dans le même clade que l'espèce *Actinoplanes lichenis*.

Les deux genres *Actinoplanes* et *Couchioplanes* sont très proches génétiquement. Pour trancher sur la position taxonomique de l'isolat A111, d'autres informations sont nécessaires, surtout sur la morphologie microscopique de l'isolat A111 ; en particulier la présence ou l'absence des sporanges, qui caractérisent le genre *Actinoplanes*, la présence ou non des arthrospores qui caractérisent le genre *Couchioplanes*, ainsi que des informations sur la chimiotaxonomie en particulier la présence de l'acide *meso*-diaminopimelique, qui caractérise le genre *Actinoplanes*, ou bien le L-lysine, qui caractérise le genre *Couchioplanes*, dans le peptidoglycane de la paroi cellulaire.

La famille de *Micromonosporaceae* regroupe les bactéries à coloration de Gram positif, formant un mycélium de substrat non fragmenté et branché. Le mycélium aérien est rarement formé. Les membres de cette famille possèdent une température de croissance entre 20 et 30°C, avec un pH égal à 7, les colonies formées sont généralement de couleur orange. Certains genres formant, dans le mycélium de substrat, soit des spores uniques ou groupés en chaînes, alors que d'autres formant des sporanges, qui renferment soit des spores mobiles ou immobiles. L'acide aminé caractéristique est le *meso*-DAP, tandis que le phosphatidylethanolamine est le phospholipide majeur, alors que les deux ménaquinones majeures sont MK-9 et MK-10 (**Trujillo et al, 2014**).

D'après les résultats de l'identification moléculaire et l'analyse phylogénétique de cluster V on peut dire que les trois isolats représentatifs de ce cluster sont intéressants, d'une part, parce que les trois souches peuvent représenter de nouveaux taxons (nouvelle espèce ou même nouveau genre) et d'autre part, parce qu'ils appartiennent à des genres rares. Surtout les deux genres *Verrucosispora*, et *Couchioplanes*, dont les deux isolats, A111 et A93, sont membres, en effet, le métabolisme secondaire de ces deux genres est peu exploité, ce qui favorise la probabilité de la

purification de nouvelles molécules à partir de ces souches, c'est la raison par laquelle que les deux isolats, A111, A93, ont été sélectionnés pour la suite du travail.



0.020

Figure 28 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster V et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Micromonospora*, *Verrucosispora*, *Actinoplanes* et *Couchioplanes*.

6. Actinomycètes du cluster VI

Dans ce cluster on trouve un seul isolat, A79, le séquençage d'ADNr 16S a indiqué que cette souche est proche de l'espèce *Planomonospora alba* avec une similarité de 99.11 %.

Ce pourcentage de similarité faible entre l'isolat A79 et l'espèce *Planomonospora alba*, indique que cette souche est une nouvelle espèce dans le genre *Planomonospora*, sous réserve d'hybridation ADN-ADN.

La **figure 29**, représente les relations phylogénétiques entre l'isolat A79 et les espèces les plus proches, selon cet arbre phylogénétique, l'isolat A79 s'aligne dans le même clade avec l'espèce, *Planomonospora alba*.

Le genre *Planomonospora* est un membre dans la famille de *Streptosporangiaceae*, suborder de *Streptosporangineae*, ordre d'*Actinomycetales*, subclass d'*Actinobacteridae*, et le phylum d'*Actinobacteria* (Goodfellow et al, 2015 ; Goodfellow et al, 2012a).

Le genre *Planomonospora*, se caractérise par la formation des sporanges cylindriques qui libèrent des spores mobiles (Chaabane et al. 2017). L'acide aminé majeur est le meso-DAP, tandis que le madurose est le sucre caractéristique, les ménaquinones majeures sont MK-9(H2) et MK-9(H4), alors que le phospholipide majeur est la phosphatidylethanolamine (Zhou et al 2012, Vobis et al. 2012).

Le genre *Planomonospora* est un genre d'actinomycète rare (Jami et al, 2015). Les métabolites secondaires sécrétés par ce genre sont très peu connus. En effet, jusqu'à maintenant, une seule molécule, planosporicin (Sherwood et al, 2013), a été purifiée et caractérisée à partir du genre *Planomonospora*.

Comme la souche A79 appartient à un genre rare, et afin de vérifier les métabolites secondaires sécrétés par cette souche, nous avons décidé de la retenir pour la suite de notre travail.

En conclusion sur un total de 294 isolats d'actinomycètes, 41 souches ont été sélectionné sur la base de leurs morphologies macroscopiques et microscopiques. L'identification moléculaire des 41 isolats retenus, nous a permis de sélectionner 5 souches d'actinomycètes : CG3, S26, A111, A93, et A79. Ces isolats ont été sélectionnés, parce que d'une part ils appartiennent tous à des genres rares d'actinomycètes et peu exploité, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Couchioplanes*, *Planomonospora* et *Verrucosipora* et d'autre part, plusieurs d'entre eux ont de forte probabilité qu'ils soient de nouveaux taxons.

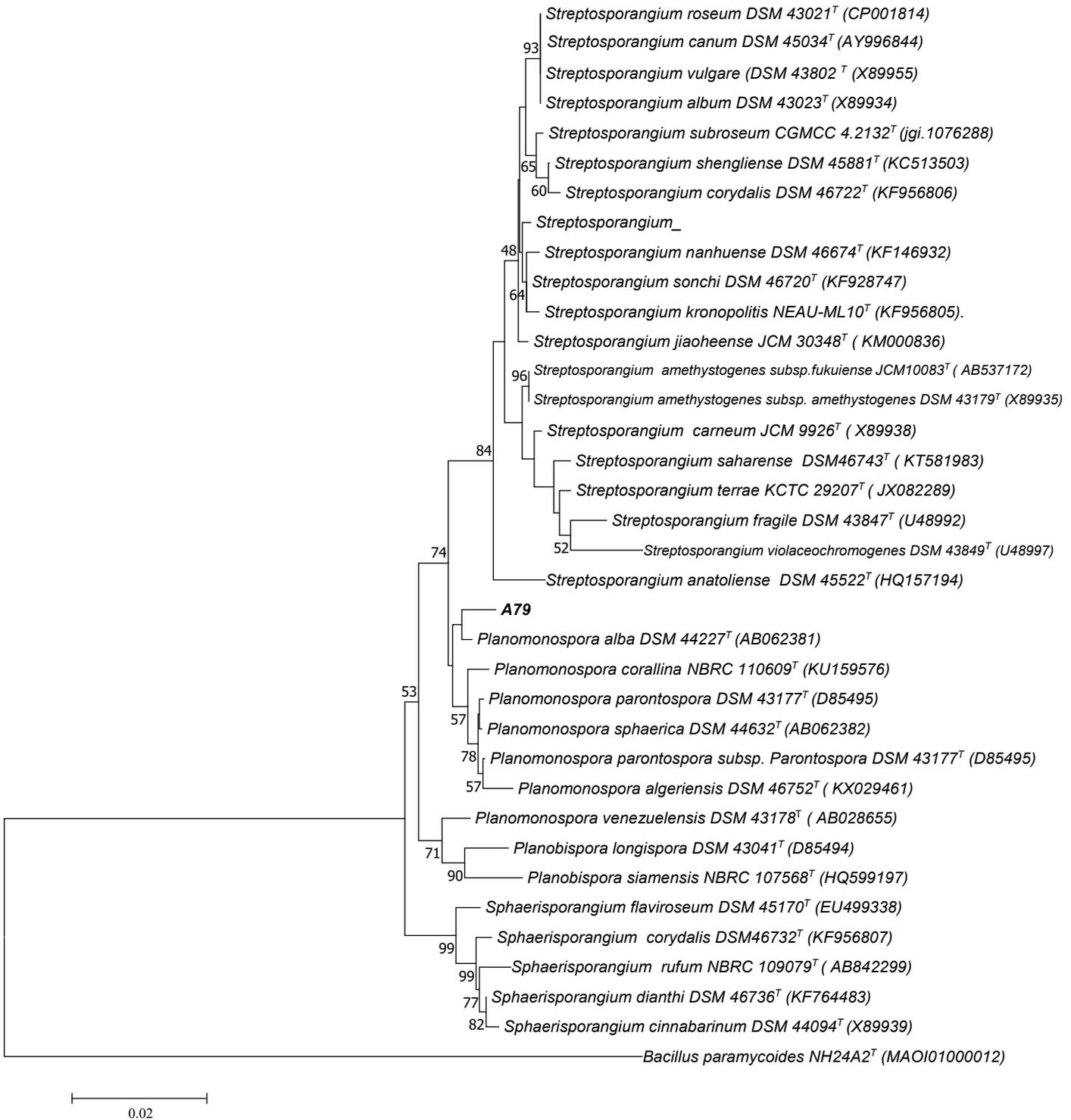


Figure 29 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr16s, calculé par la méthode de neighbor joining, qui montre les relations des souches appartenant au cluster VI et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Planomonospora*, *Sphaerisporangium*, *Planobispora* et *Streptosporangium*.

III. Description morphologique, physiologique et biochimique des souches d'actinomycètes sélectionnées.

Cette étude ne concerne que les cinq souches d'actinomycètes sélectionnées (CG3, S26, A111, A93, et A79). Elle consiste à comparer quelques caractères, morphologique, biochimique et physiologique des 5 isolats sélectionnés avec ceux des espèces les plus proches, dans le but de soulever les différences entre eux et de donner une description des nouveaux taxons.

Les caractères utilisés pour la comparaison sont ceux décrits dans le compendium des Actinobactéria de DSMZ : <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/special-groups-of-organisms/compendium-of-actinobacteria>. En effet, dans ce compendium chaque espèce d'actinomycètes est décrite en fonction de :

- La morphologie macroscopique sur les différents ISP : cela inclut la couleur du mycélium aérien et du substrat, la production des pigments diffusibles et les pigments mélanoides.
- La morphologie microscopique : observation par microscopie électronique à balayage.
- Des caractères physiologiques : qui incluent surtout la croissance aux différentes concentrations de NaCl.
- Des caractères biochimiques : qui incluent l'utilisation de 10 sources de carbones différentes, en plus des tests biochimiques supplémentaires réalisés sur des plaques API Campy et API Zym.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats sélectionnés.

Isolats	CG3	S26	A79	A111	A93
Genres	<i>Nocardioopsis</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Planomonospora</i>	<i>Couchioplanes</i>	<i>Verrucosisporea</i>
Morphologies					
ISP 2- G	++	++	-	++	++
ISP 2- R	Jaune doré	Marron beige	-	Orange	Jaune narcisse
ISP 2 - A	Blanc	Beige	-	-	-
ISP 2 - S	-	Brun orangé	-	-	-
ISP 3 - G	++	++	+	++	++
ISP 3 - R	Jaune zinc	Marron beige	Blanc	Orange	Incolore
ISP 3 - A	Blanc	Beige	Crème	-	-
ISP 3 - S	-	Brun jaunâtre	-	-	-
ISP 4 - G	++	++	+	++	-
ISP 4 - R	Jaune zinc	Marron beige	Incolore	Orange	-
ISP 4 - A	Blanc	Beige	-	-	-
ISP 4 - S	-	Brun orangé	-	-	-
ISP 5 - G	++	++	-	++	-
ISP 5 - R	Crèm	Marron beige	-	Incolore	-
ISP 5 - A	Blanc	Beige	-	-	-
ISP 5 - S	-	-	-	-	-
ISP 6 - G	+	+	-	++	++
ISP 6 - R	Jaune doré	Marron beige	-	Jaune miel	Incolore
ISP 6 - A	Blanc	Beige	-	-	-
ISP 6 - S	-	Brun orangé	-	Jaune miel	-
ISP 7 - G	++	++	+	++	++
ISP 7 - R	Jaune doré	Marron beige	Incolore	Cuivre nacré	Incolore
ISP 7 - A	Blanc	Beige	Incolore	-	-
ISP 7 - S	-	Brun orangé	-	Cuivre nacré	-
Tolérance en NaCl	(0 à 18)%, Opt (3 à 8)%	(0 à 5)%, Opt 0	(0 à 2.5)%, Opt 0	(0 à 2.5)%, Opt 0	(0 à 2.5)%, Opt 0
Source de carbone					
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	-	+	+	+	-
Saccharose	+	+	++	+	-
Xylose	-	+	+	+	+
Inositol	+	+	-	++	+
Mannose	-	+	++	++	(+)
Fructose	+	+	++	+	++
Rhamnose	-	+	-	+	++
Raffinose	-	-	-	+	+
Cellulose	-	-	-	(+)	-
Api zym					
Phosphatase alcaline	4/5	5	5	5	5
Estérase (C4)	3	1	3	3	2

Estérase Lipase (C8)	3	2	3	3	2
Lipase (C14)	1	0	0	1	1
Leucine arylamidase	4	5	5	5	5
Valine arylamidase	4	3	5	2	3
Cystine arylamidase	2	1	2	2	1
Trypsine	1	4	5	2	3
Chymotrypsine	4/5	3	5	5	2
Phosphatase acid	4	4	5	5	5
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	4/5	4	1	4	2
α -galactosidase	0	5	0	3	1
β -galactosidase	0	4	5	5	5
β -glucuronidase	0	0	0	1	0
α -glucosidase	5	4	5	5	5
β -glucosidase	4	5	5	4	5
N-acetyl-beta-glucoseamidase	4/5	5	5	4	5
α -mannosidase	3	4	0	0	2
α -fucosidase	0	0	0	0	1
Api coryne					
Nitrate reductase	+	-	+	+	+
Pyraziamidase	-	+	-	-	-
Pyrrolidonyl arylamidase	-	+	-	+	+
Phosphatase alcaline	+	+	+	+	+
β -glucuronidase	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	+	-	+	+
α -glucosidase	+	-	+	+	+
N-acetyl -beta glucoseamidase	+	+	+	-	-
Esculin (β -glucosidase)	-	+	+	+	+
Uréase	+	+	-	-	-
Gélatine	+	+	-	+	-

G : croissance ; **R** : couleur de mycélium de substrat; **A** : couleur de mycélium aérien; **S** : Pigment soluble. Croissance sur les ISP: ++ = bonne; + = clairsemée; - = nulle. Croissance sur les différentes sources de carbones et d'azotes (voir : matériels et méthode, III.2.4).

1. Description de l'isolat CG3.

L'isolat CG3 a été obtenu à partir du sol de la sebkha de Kenadsa, wilaya de Béchar (sud-ouest Algérien), par l'utilisation du milieu caséine amidon agar. La similarité entre l'isolat CG3 et l'espèce la plus proche, *Nocardiosis rosea*, est de 99.20%, après le séquençage complet de gène qui code pour l'ARNr 16s. La comparaison entre les deux souches a soulevé plusieurs différences morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Le mycélium aérien de l'isolat CG3 est de couleur blanche sur tous les ISP utilisés, alors que le mycélium de substrat est de couleur jaune sur les ISP (2, 3, 4 et 6), tandis qu'il est crème sur le milieu ISP5 (**tableau 5**). Cependant, l'espèce *Nocardiopsis rosea*, forme un mycélium aérien de couleur rose blanc à rose pâle, alors que le mycélium de substrat est de couleur rose pâle sur tous les milieux testés (**voir annexe 3**) (Li et al, 2006).

L'isolat CG3 forme un mycélium de substrat stable à la différence de la plupart des espèces du genre *Nocardiopsis* où il est fragmenté. Le mycélium aérien, formé par l'isolat CG3, est bien développé et porte des courtes chaînes de spores avec une surface lisse (**figure 30**).

Parmi les 10 sources de carbones testées, l'espèce *Nocardiopsis rosea* utilise le rhamnose et l'arabinose (Li et al, 2006), à la différence de notre isolat CG3 qui ne les utilise pas. Cependant l'isolat CG3 et l'espèce *Nocardiopsis rosea* ont un métabolisme similaire vis-à-vis des autres sources de carbones testées. D'autres différences biochimiques ont été signalées dans les plaques API, par exemple, la souche CG3 est uréase positif et peut liquéfier la gélatine à la différence de l'espèce *Nocardiopsis rosea*, qui est uréase négatif et ne peut pas liquéfier la gélatine (**voir annexe 3**).

D'après ces différences, morphologiques, physiologiques et biochimiques, qui existent entre l'isolat CG3 et l'espèce la plus proche *Nocardiopsis rosea*, on peut conclure que l'isolat CG3 représente une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiopsis*, mais sous réserve d'hybridation ADN-ADN.

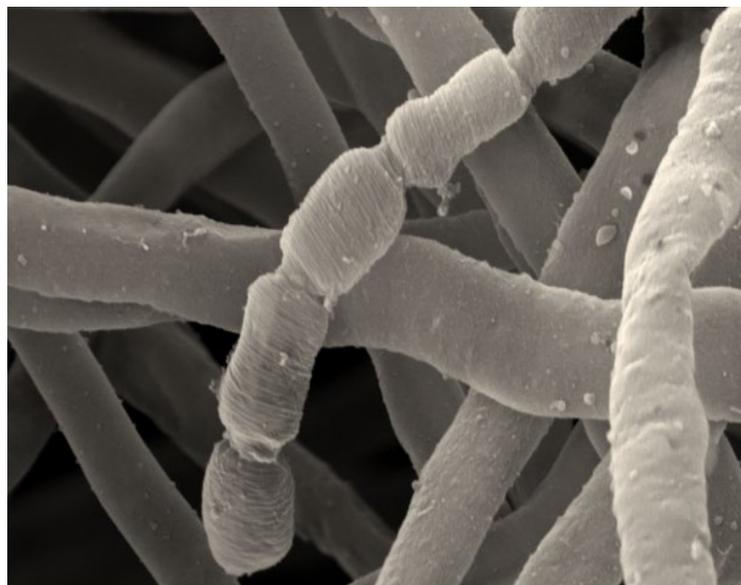


Figure 30: Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de la souche CG3, montrant des chaînes de spores courtes et droites à surface lisse, après croissance sur le milieu ISP3 additionnée de 3% de NaCl et incubé pendant 18 jours à 37 ° C. échelle : 200 nm.

2. Description de l'isolat S26.

La souche S26, a été isolée à partir de sédiments du lac d'Ain-ourka (wilaya de Naama) en utilisant le milieu caséine amidon agar. Cet isolat appartient au genre *Saccharopolyspora*, avec une similarité élevée de 99.87%, avec l'espèce *Saccharopolyspora erythraea*.

L'isolat S26 et l'espèce *Saccharopolyspora erythraea* présentent beaucoup de similitudes entre eux, en effet, l'utilisation des différentes sources de carbone par l'isolat S26 est similaire avec l'espèce la plus proche, *Saccharopolyspora erythraea*, sauf que l'isolat S26 n'utilise ni la raffinose ni la cellulose alors que l'espèce *Saccharopolyspora erythraea* utilise ces deux sucres.

L'isolat S26 partage la même morphologie microscopique avec l'espèce *Saccharopolyspora erythraea*, puisque les deux forment un mycélium de substrat ramifié qui se fragmente, à maturité, en éléments coccoïdes et bacillaires. Alors que le mycelium aérien est formé par une chaîne de spores entourée par une gaine épineuse (**figure 31**). Cette micromorphologie est typique pour les souches qui appartiennent à l'espèce *Saccharopolyspora erythraea*, cependant, les autres espèces du genre *Saccharopolyspora* forment une chaîne de spores entourée par une gaine lisse.

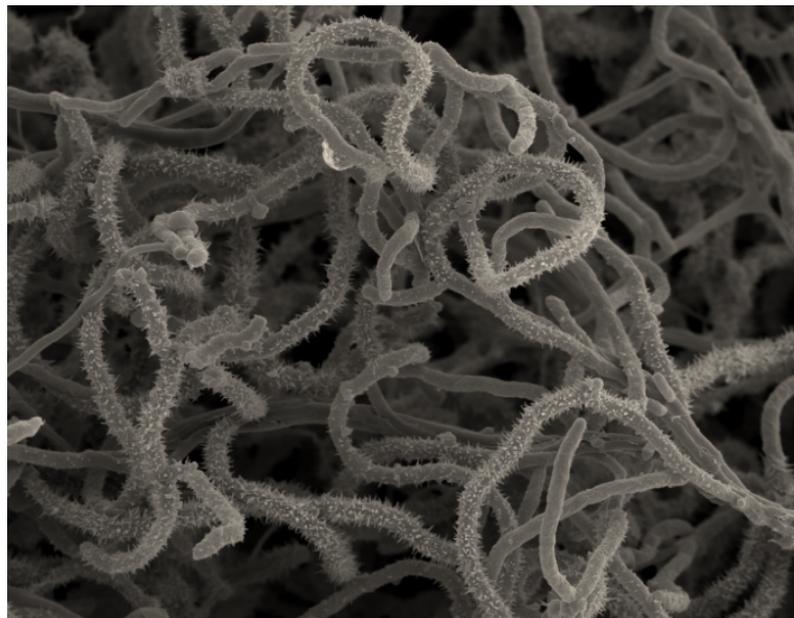


Figure 31 : Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat S26 montrant les chaînes de spores entourées par une gaine épineuse. Échelle : 200 nm.

Certaines différences macromorphologiques entre l'isolat S26 et l'espèce *Saccharopolyspora erythraea* ont été soulevées, le mycélium aérien de l'isolat S26 est de couleur marron beige, alors que le mycélium de substrat est de couleur beige sur les différents ISP utilisés. La couleur de mycélium aérien de l'espèce *Saccharopolyspora erythraea* varie du rose pâle à modérément marron grisâtre, parfois il est blanc, en fonction du milieu de culture utilisé (**Labeda et al, 1987**). En ce qui

concerne les pigments mélanoides et diffusibles, les deux souches sécrètent des pigments solubles de couleur brun jaunâtre à brun orangé pâle sur la plupart des milieux de culture utilisés, de même les deux souches ne produisent pas de pigment mélanoïde (**annexe 3**).

D'après les résultats de l'identification moléculaire, ainsi que la comparaison, entre l'isolat S26 et l'espece *Saccharopolyspora erythraea*, on peut dire, que l'isolat S26 est identique à l'espece *Saccharopolyspora erythraea*,

3. Description de l'isolat A79.

La souche A79 a été isolée à partir des palmiers d'Ain-Salah, en utilisant le milieu acide humique vitamine B, après l'enrichissement du sol par la méthode de réhydratation-centrifugation. L'identification moléculaire a montré que l'isolat A79 est proche de l'espece *Planomonospora alba* par une similarité de 99.11%.

Les membres du genre *Planomonospora* sont faciles à reconnaître sous microscope optique par la formation des sporanges cylindriques qui libèrent des spores mobiles par des flagelles (**Chaouch et al, 2017**). On distingue deux groupes de *Planomonospora* en fonction du type d'arrangement des sporanges cylindriques : le groupe de *P. parontospora*, dont les sporanges sont disposés en deux rangées parallèles ressemblant à des bananiers, et le groupe *P. venezuelensis*, dont les sporanges sont disposés en deux rangées parallèles sous la forme de feuilles de palmier (**Suriyachadkun et al. 2016**).

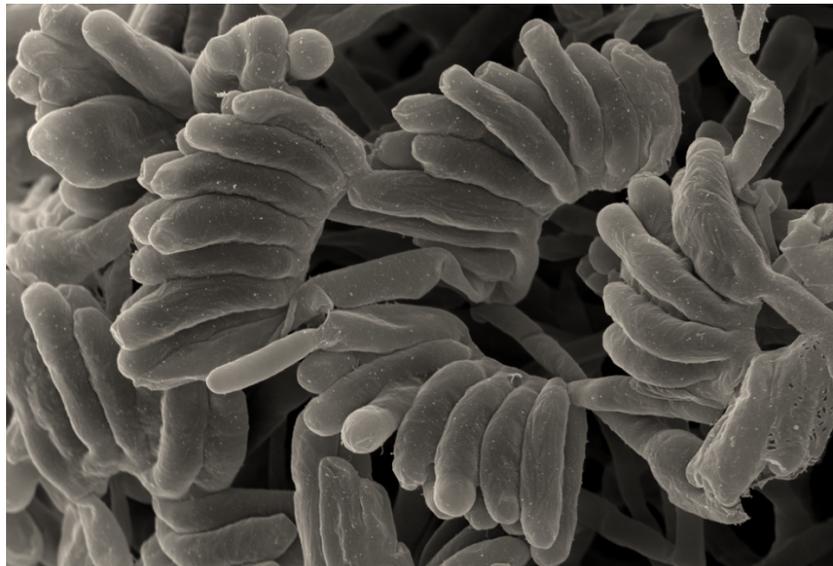


Figure 32: Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat A79 montrant les sporanges disposés en deux rangées parallèles ressemblant à des bananiers (groupe de *P. parontospora*). Échelle : 200 nm.

La microscopie électronique à balayage a montré que la souche, A79 et l'espèce *Planomonospora alba*, (**figure 32**) partage la même morphologie microscopique, en effet, les deux forment des sporanges cylindriques attachés en deux rangées parallèles à un mycélium aérien, sous la forme de bananier, de ce fait, ils appartiennent au groupe de *P. parontospora*.

La comparaison des caractères cultureux de l'isolat A79 avec l'espèce *Planomonospora alba* a montré l'existence de plusieurs différences macromorphologiques entre eux, en effet, l'isolat A79 ne peut croître que sur les ISP 3, 4 et 7, à la différence de l'espèce *Planomonospora alba* qui possède une bonne croissance sur tous les ISP (de 2 à 7) (**Mertz, 1994**). Le mycélium aérien de l'isolat A79 est de couleur crème sur le milieu ISP3, incolore sur le milieu ISP7, tandis qu'il est absent sur le milieu ISP4, alors que l'espèce *Planomonospora alba* forme un mycélium aérien de couleur blanche sur les milieux ISP 2, 3, 4 et 5, tandis que sur les milieux ISP 6 et 7 le mycélium aérien est absent. Les pigments diffusibles et mélanoides ne sont pas produits par les deux (l'isolat A79 et l'espèce *Planomonospora alba*) (**Mertz, 1994**) (**annexe 3**).

Les différences entre l'isolat A79 et l'espèce *Planomonospora alba* s'étend aux caractères biochimiques, en effet, l'espèce *Planomonospora alba* est pauvre métaboliquement, puisqu'elle ne peut utiliser que trois sucres, glucose arabinose et rhamnose, sur les dix sucres testés, à la différence de l'isolat A79 qui peut utiliser sept sucres, parmi les dix sucres testés : glucose – arabinose – saccharose – xylose – inositol – mannose - fructose. La nitrate réductase est positive pour l'isolat A79 mais négative pour l'espèce *Planomonospora alba*, alors que la liquéfaction de gélatine est négative pour l'isolat A79 tandis qu'elle est positive pour l'espèce *Planomonospora alba* (**annexe 3**).

D'après cette comparaison on peut conclure que l'isolat A79 représente une nouvelle espèce dans le genre *Planomonospora* sous la réserve de l'hybridation ADN-ADN.

4. Description de l'isolat A111.

La souche A111 a été isolée à partir des palmiers d'Ain-Salah, en utilisant le milieu acide humique vitamine B, après l'enrichissement du sol par la méthode de réhydratation-centrifugation. L'identification moléculaire a montré que l'isolat A111 est proche de l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus* par une similarité de 98.74%, alors que l'analyse phylogénétique, **figure 28**, a montré que l'isolat A111 s'aligne sous le même clade avec l'espèce *Actinoplanes lichenis*.

Le genre *Couchioplanes*, proposé par **Tamura et al 1994**, appartient à la famille de *Micromonosporaceae*, ordre de *Micromonosporales*, et phylum d'*Actinobactéria*. Il est considéré comme un genre rare puisque, jusqu'à maintenant, il ne regroupe qu'une seule espèce, *Couchioplanes caeruleus*, avec deux sous-espèces.

Le genre *Couchioplanes* se distingue morphologiquement par rapport au genre le plus proche, *Actinoplanes*, par l'absence de la formation des sporanges, et les chaînes de spores formées s'agrègent sous forme de grappe qui ressemblent aux sporanges sous microscope optique. Les spores, formées par fragmentation de mycélium aérien (arthrospores), sont mobiles par des flagelles.

L'observation par microscopie électronique à balayage de mycélium aérien de l'isolat A111 (**figure 33**), indique que cette souche ne forme pas de sporange, mais elle forme de courtes chaînes d'arthrospores mobiles (3 à 5 spores) de surfaces lisses. Cette description corrobore parfaitement avec la morphologie microscopique du genre *Couchioplanes*.

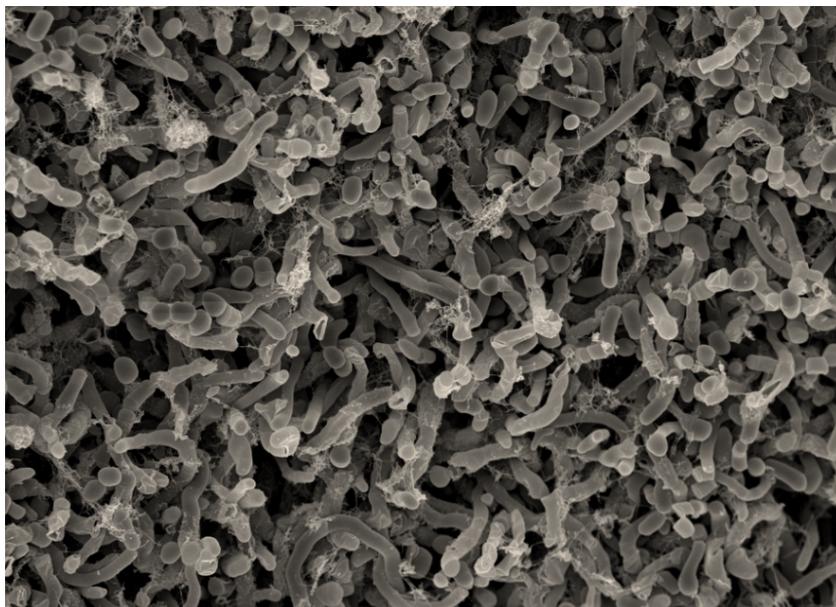


Figure 33: micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat A111 montrant des courtes chaînes d'arthrospores (3 à 5 spores) de surfaces lisses. Échelle : 200 nm.

L'isolat A111 diffère beaucoup par rapport à l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus*, en effet, le mycélium de substrat de l'isolat A111 est de couleur orange sur les ISP (2, 3 et 4), incolore sur ISP5, jaune miel sur ISP6, ou cuivre nacré sur ISP7, à la différence de l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus* où la couleur de mycélium de substrat varie de la couleur vert foncé au bleu foncé. L'isolat A111 produit des pigments solubles de couleur jaune miel sur le milieu ISP6 et cuivre nacré sur le milieu ISP7, alors que l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus* ne produit aucun pigment soluble. À noter que l'isolat A111 et l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus*, ne produisent ni mycélium aérien ni pigments mélanoïde. D'autres différences biochimiques sont observées, en effet, l'isolat A111 utilise les dix sucres testés comme

seule source de carbone, alors que l'espèce, *Couchioplanes caeruleus subsp. azureu*, n'utilise que le glucose, le fructose l'inositol et le saccharose. La production de nitrate réductase et la liquéfaction de gélatine est positive pour les deux souches (**voir annexe 3**) (**Tamura et al, 1994**).

L'identification moléculaire, et la comparaison entre l'isolat A111 et l'espèce *Couchioplanes caeruleus subsp. azureus*, révèle l'existence de plusieurs différences morphologiques et biochimiques, donc on peut dire que l'isolat A111 représente une nouvelle espèce dans le genre *Couchioplanes* sous la réserve de l'hybridation ADN-ADN.

5. Description de l'isolat A93.

La souche A93 a été isolée à partir des palmiers d'Ain-Salah, en utilisant le milieu acide humique vitamine B, après l'enrichissement du sol par la méthode de réhydratation-centrifugation. L'identification moléculaire à montrer que l'isolat A93 est proche de l'espèce *Verrucosispora maris* par une similarité de 97.77%. Alors que l'analyse phylogénétique de la **figure 28** a montré que l'isolat A93 se détache nettement des espèces des genres les plus proches, et forme un clade séparé, ce qui favorise la probabilité que l'on est en présence d'un nouveau genre.

Le genre *Verrucosispora*, proposé par **Rheims et al 1998**, appartient à la famille de *Micromonosporaceae*, ordre de *Micromonosporales*, classe et phylum d'*Actinobactéria*. Actuellement on compte huit espèces dans ce genre, et il est considéré comme un genre rare (**Xie et al, 2018**).

Le genre *Verrucosispora* se ressemble, morphologiquement, aux genres *Micromonospora* et *Salinospora*, par la formation des spores uniques et immobiles, dans le mycélium de substrat (**Goodfellow et al, 2012b**). La morphologie microscopie de l'isolat A93 est différente par rapport à la morphologie du genre *Verrucosispora*. En effet les spores uniques n'ont pas été observées dans le mycélium de substrat, par contre de courtes chaînes de spores entourées par une gaine, sont formées par le mycélium de substrat de l'isolat A93 (**figure 34**), ce qui renforce la probabilité que l'isolat A93 n'appartient pas au genre *Verrucosispora*, et que cette souche peut être affiliée à un genre différent.

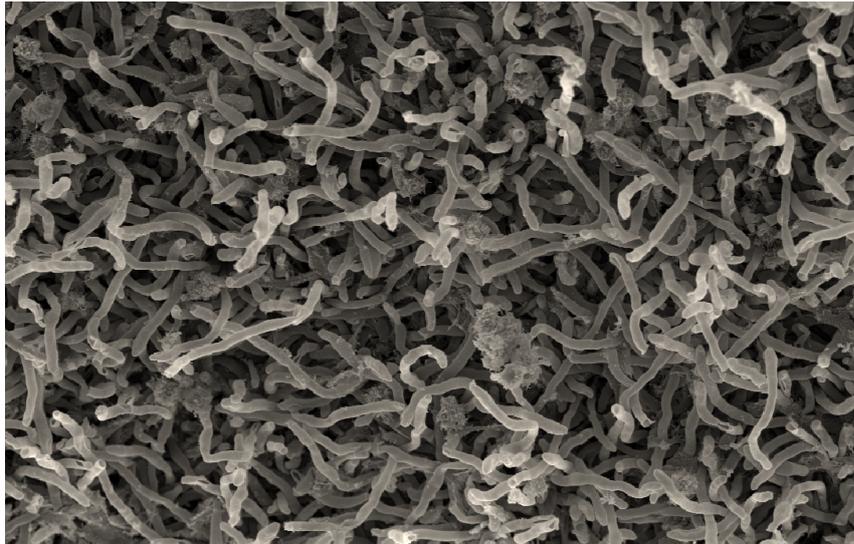


Figure 34 : Micromorphologie de mycélium aérien, vue par microscopie électronique à balayage, de l'isolat A93, montrant de courtes chaînes d'arthrospores entourées par une gaine. Échelle : 200 nm.

Pour les caractères cultureux, l'isolat A93 peut croître sur les ISP (2, 3, 6 et 7). Le mycélium aérien de l'isolat A93 est absent sur tous les ISP utilisés, alors que le mycélium de substrat est soit de couleur jaune narcisse sur l'ISP2 ou incolore sur les ISP (3, 6 et 7). L'isolat A93 peut utiliser, le glucose, le xylose, l'inositol, le mannose, le fructose, le rhamnose, et la raffinose comme seule source de carbone, alors que la cellulose, l'arabinose, et le saccharose ne peuvent pas être utilisées. La nitrate réductase est positive, tandis que la liquéfaction de gélatine et l'uréase sont négatives pour l'isolat A93.

D'après les différences morphologiques, biochimiques et physiologiques, observées entre l'isolat A93 et les espèces les plus proches du genre *Verrucosispora*, ainsi que l'étude phylogénétique, on peut dire que l'isolat A93 représente un nouveau taxon dans la famille de *Micromonosporaceae*, cependant une étude taxonomique plus détaillée est nécessaire pour trancher sur la position taxonomique exacte de l'isolat A93.

IV. Etude des propriétés antagonistes des cinq isolats d'actinomycètes sélectionnés.

Après la caractérisation partielle des cinq isolats d'actinomycètes intéressants sélectionnés, nous avons procédé à l'étude de leurs propriétés antagonistes, afin de sélectionner la souche la plus active qui subit, ensuite, une caractérisation complète puis une extraction et une purification de ces métabolites secondaires. L'activité antimicrobienne des cinq isolats sélectionnés a été étudiée contre dix microorganismes dont quatre bactéries à Gram positif, trois bactéries à Gram négatif et trois champignons. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Propriétés antimicrobiennes des six souches d'actinobactéries sélectionnées (CMI : µg/ml).

Souches d'actinomycetes	CG3	S26	A79	A111	A93	Témoin positif
Gram positif						Oxytétracycline
<i>Bacillus subtilis</i>	0.52	0.52	-	-	-	2.08
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.08	0.52	66.66	8.33	-	0.05
<i>Micorococcus luteus</i>	2.08	0.52	-	-	-	0.52
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	66.66	-	-	-	-	1.66
Gram négatif						
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1.04	2.08	33.33	66.66	-	0.52
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66.66	-	-	-	-	1.66
<i>Escherichia coli TolC</i>	2.08	1.04	33.33	-	-	1.66
Champignons						Nystatin
<i>Mucor hiemalis</i>	16.66	16.66	66.66	-	-	4.16
<i>Candida albicans</i>	66.66	-	-	-	-	8.8
<i>Pichia anomala</i>	66.66	-	-	-	-	4.16

-: pas d'activité.

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que sur les cinq isolats sélectionnés, quatre souches ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un microorganisme test utilisé, alors que l'isolat A93 est dépourvu d'activité contre les 10 germes cibles

Les deux isolats A79 et 111 ont montré une activité antimicrobienne faible. En effet, l'isolat A111 a été actif contre deux bactéries, *Staphylococcus aureus* et *Chromobacterium violaceum*, avec des valeurs de CMI de 8.33 µg/ml et 66.66 µg/ml respectivement, tandis que l'isolat A79 a été actif contre trois bactéries, dont deux à Gram négatif (*Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli TolC*, avec la même CMI de 33.33 µg/ml), une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus* avec une CMI de 66.66 µg/ml) et un champignon, *Mucor hiemalis*, avec une CMI de 66.66 µg/ml.

Les deux isolats, S26 et CG3, ont enregistré une bonne activité antimicrobienne. En effet, l'isolat CG3 a été actif contre tous les germes cibles utilisés, avec des valeurs de CMI variant entre 0.52 µg/ml contre l'espèce *Bacillus subtilis*, 2.08 µg/ml contre *Staphylococcus aureus*, *Micorococcus luteus* et *Escherichia coli TolC* et 66.66µg/ml contre les espèces : *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Pichia anomalas*.

Aussi, l'isolat S26 a montré une très bonne activité contre les bactéries à Gram positif, sauf *Mycobacterium smegmatis*, avec une CMI de 0.52 µg/ml, et une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif, sauf contre *Pseudomonas aeruginosa*, avec une CMI de 2.08 µg/ml (contre *Chromobacterium violaceum*) et 1.04 µg/ml (contre *Escherichia coli TolC*), tandis que l'activité antifongique a été observée que contre la moisissure, *Mucor hiemalis* (CMI : 16.66 µg/ml).

La souche S26 est identique avec l'espèce *Saccharopolyspora erythrea*, selon les résultats de l'identification moléculaire. En effet cette espèce est connue par la sécrétion de l'antibiotique érythromycine qui possède un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et négatif (Karničar et al, 2016). De ce fait, l'isolat S26 pourrait donc sécréter aussi des érythromycines, au vu de leur activité similaire avec l'espèce *S. erythrea*. En plus des érythromycines, la souche S26 peut sécréter aussi d'autres molécules puisqu'elle a montré une activité antifongique contre la moisissure *Mucor hiemalis*.

En ce qui concerne l'isolat CG3, cette souche appartient au genre *Nocardiopsis*, qui est connu par la production de diverses molécules bioactives, (Kim et al, 2017). Par exemple, les deux molécules nocapyrones et griseusins ont une activité antimicrobienne (Kim et al, 2014 ; Zhang et al, 2015), alors que, la kalafungin, fijiolides, et l'apoptolidins sont des molécules anticancéreuses (Lu et al, 2015 ; Kurzawa et al, 2018 ; Serrill et al, 2015), tandis que la molécule, la nocardiosins, est un immunomodulateur (Raju et al, 2013).

L'isolat A93 est inactif alors que les isolats A79 et A111 ont montré une faible activité antimicrobienne. Ces trois isolats (A79, A111 et A93) appartiennent tous à des genres d'actinomycètes rares qui sont très rarement mentionnés dans la bibliographie comme source de métabolites secondaires bioactifs. En effet, à partir du genre *Planomonospora* (dont l'isolat A79 est membre), une seule molécule (planosporicin), jusqu'à présent, a été isolée et caractérisée (Sherwood et al, 2013), de même, l'isolat A111, qui appartient au genre *Couchioplanes*, à donner, jusqu'à maintenant, qu'une seule molécule antifongique, antibiotique 67-121D (Wright et al, 1977). Les molécules bioactives sont, pour certains genres rares d'actinomycètes, codées par des gènes silencieux qui ne s'expriment pas dans les conditions de cultures normales (Okada et al, 2017), de ce fait une induction d'expression de ces gènes est nécessaire (Mao et al, 2018). Cette induction peut être réalisée par différentes manières, dont le changement des conditions de cultures (température, pH, NaCl), l'ajout de certains agents inducteurs (métaux lourds, vitamines...) ou l'application de la coculture (Athira et al, 2017).

D'après les résultats de l'identification moléculaire, ainsi que les résultats de l'activité antimicrobienne, en plus de l'analyse des extraits bruts des cinq souches d'actinomycètes sélectionnées, nous avons retenu pour la suite du travail que l'isolat CG3, pour les critères suivants :

- Il représente une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiopsis*.
- Possède une très bonne activité antimicrobienne.
- Produit plusieurs métabolites, dont certains ne correspondent à aucune molécule enregistrée dans la base de données des molécules chimiques, dictionnaire des produits naturels (CRC press ; Taylor et Francis group), (voir la section VI.2, partie resultats et discussions).

V. Hybridation ADN-ADN et description de *Nocardiopsis becharensis* nov sp.

1. Hybridation ADN-ADN.

Cette analyse a été entreprise afin de confirmer que l'isolat CG3 représente une nouvelle espèce dans le genre, *Nocardiopsis*. Selon **Stackebrands et Gobel, 1994**, quand le pourcentage de similarité entre deux souches est inférieur ou égale à 97%, le pourcentage de réassociation ADN/ADN ne correspond jamais à des pourcentages supérieurs à 70%. Ce seuil (70%) permet le placement ou non des deux souches dans une même espèce. Récemment ce seuil de similarité a été relevé d'abord à 98,2% par **Meier-Kolthoff et al. (2013)**, puis, par la suite à 98.65% par **Kim et al. (2014)**.

Les résultats de l'identification moléculaire de l'isolat CG3 a indiqué qu'elle est proche de, *Nocardiopsis rosea* YIM 90094^T (99.2%), *Nocardiopsis gilva* YIM 90087^T (98.5 %) et *Nocardiopsis rhodophaea* YIM 90096^T (98.2 %). D'après le seuil fixé par **Kim et al. (2014)** (98.65 %), une hybridation ADN-ADN est nécessaire entre l'isolat CG3 et l'espèce la plus proche, *Nocardiopsis rosea* YIM 90094^T, afin de vérifier si les deux sont identiques.

Les résultats de cette hybridation ont indiqué un pourcentage de réassociation ADN/ADN égale à (18.0-53.2) %. Donc on peut dire que l'isolat CG3 représente une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiopsis*.

2. Etude taxonomique de l'isolat CG3 et description de *Nocardiopsis becharensis* sp. nov.

Afin de compléter l'étude taxonomique partielle de la souche CG3 donnée dans la description des nouveaux taxons d'actinomycètes isolés à partir du sol algérien (**section III, partie : resultats et discussions**), une caractérisation polyphasique complète portée sur l'étude approfondie des caractères chimiotaxonomiques, physiologiques et biochimiques, a été réalisé.

La comparaison entre l'isolat CG3 et les espèces types les plus proches, *Nocardiopsis rosea* YIM 90094^T, *Nocardiopsis gilva* YIM 90087^T, *Nocardiopsis rhodophaea* YIM 90096^T, est donnée dans le **tableau 8**.

L'isolat CG3 est un actinomycète à Gram positif, formant un mycélium de substrat stable filamenteux et ramifié, sur lequel un mycélium aérien de couleur blanche est formé, qui porte de courtes chaînes de spores de surface lisse, après 18 jours d'incubation à 37°C sur le milieu ISP3 (**figure 30**).

Le mycélium de substrat à une couleur jaune d'or, sur les milieux Czapek, ISP2 et PDA, jaune zinc sur les milieux ISP3 et ISP4, alors que sur le milieu ISP5 la couleur est crème. Les pigments mélanoides ainsi que les pigments diffusibles ne sont pas sécrétés sur tous les milieux de culture utilisés.

L'étude chimotaxonomique indique que la paroi cellulaire de la souche CG3 est caractérisée par la présence de l'acide meso-diaminopimelique, alors que le ribose et le galactose sont les sucres caractéristiques (**figure 35**).

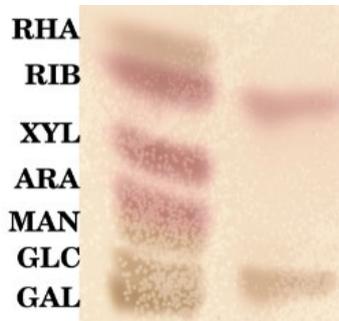


Figure 35 : résultat de l'analyse des sucres de l'isolat CG3.

Les phospholipides détectés dans la membrane plasmique de l'isolat CG3 sont : le diphosphatidylglycérol (DPG), la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidyléthanolamine, (PE), le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylméthyléthanolamine (PME) et le phosphatidylinositol mannosides (PIM), ainsi que trois phospholipides non déterminés (PL5, PL10) et deux glycolipides inconnus (GL3, GL4) (**figure 36**). Alors que les acides gras dominants dans la membrane plasmique de l'isolat CG3 sont : iso-C_{16:0} (17,1 %), iso-C_{17:0} (13,5 %), C_{18:0} (11,4 %), C_{18:0} 10-methyl (TBSA) (11.0%) (**Tableau 8**). Les principales quinones respiratoires sont : MK-11(H0) MK-11(H2), MK-11(H4), MK-11(H6) et MK- 11(H8) (**Tableau 8**).

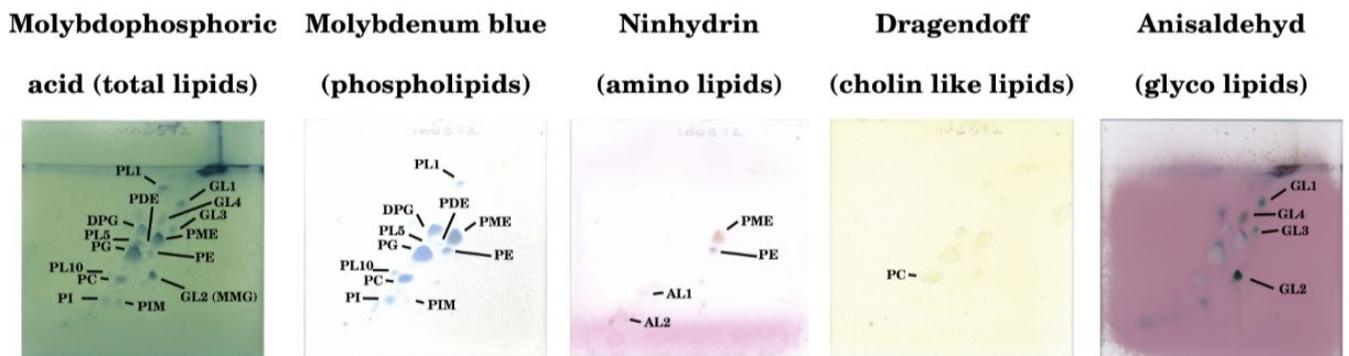


Figure 36 : résultats de l'analyse des phospholipides de l'isolat CG3.

DPG : diphosphatidylglycerol. **PG** : phosphatidylglycerol. **PC** : phosphatidylcholine. **PI** : phosphatidylinositol. **PE** : phosphatidyléthanolamine. **PME** : phosphatidylméthyléthanolamine. **PIM** : phosphoinositol mannoside. **PL** : phospholipides non déterminé. **GL** : glycolipide non déterminé. **APL** : aminophospholipide non déterminé. **AL** : amino lipide non déterminé.

L'intervalle de la croissance pour la température variée entre 20 à 50 °C, avec un optimal de 37°C. La souche CG3 tolère des valeurs de pH entre 6 à 12 avec un optimum à 7.5. Alors que la tolérance vis-à-vis le NaCl est entre 0-18% avec un optimum entre 3 à 7%.

L'isolat CG3 peut utiliser, le D-fructose, le myo-Inositol, le D-maltose, le D-ribose, le saccharose, le glycérol, l'acétate de sodium et l'amidon comme seule source de carbone, alors que le D-galactose, le D-mannose, le L-rhamnose, le D-xylose, l'arabinose, le D-cellobiose, le D-lactose, le D-mannitol, le D-raffinose, le D-sorbitol et le D-xylitol, ne peuvent pas être utilisés. L'alanine, l'arginine, la glycine, l'histidine, l'adénine, l'acide glutamique, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine et la valine peuvent être utilisés comme seule source d'azote, alors que, l'arginine, la cystéine, l'hydroxyproline et le tryptophane ne peuvent pas être utilisés. L'isolat CG3 est nitrate réductase positive et uréase positif. Elle peut liquéfier la gélatine (**Tableau 8**).

D'après les différences, génotypique, phénotypique, biochimique et chimotaxonomique, entre l'isolat CG3 et les espèces type du genre *Nocardiopsis* les plus proches, on peut conclure que l'isolat CG3 représente une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiopsis*, et le nom *Nocardiopsis becharensis* sp. nov. a été proposé (**Be. Cha. r. en'sis**. N.L. fem. adj. *becharensis* par rapport à Bechar, la source de l'échantillon à partir de laquelle cette souche a été isolée).

La séquence de l'ADNr16s de la souche CG3 a été déposée dans la GenBank sous le numéro d'accèsion MG972881 (**annexe 4**). Alors que la souche, quant à elle, a été déposée dans deux collections, la DSMZ, sous le numéro DSM 106572^T, et la NCCB (The Netherlands Culture Collection of Bacteria) sous le numéro NCCB100649^T (**voir annexe 4**).

Tableau 8: Les caractères qui différencient la souche CG3 des autres espèces les plus proches du genre *Nocardioopsis*. souches: **1**, CG3; **2**, *Nocardioopsis rosea* YIM 90094^T; **3**, *Nocardioopsis gilva* YIM 90087^T; **4**, *Nocardioopsis rhodophaea* YIM 90096^T (Li et al, 2006).

Caractéristiques	1	2	3	4
Mycelium de substrate	Stable	fragmenté	fragmenté	fragmenté
Température de croissance (°C)	25–50	20–60	10–40	20–60
Température optimale de croissance (°C)	37–40	37–40	28–30	37–40
pH de croissance/ pH optimal de croissance.	6-12/ Opt : 7.5	6-9/ Opt : 7.2	6-9/ Opt : 7.2	6-9/ Opt : 7.2
Nitrate réductase	+	+	+	–
Liquéfaction de gélatine	+	–	–	–
Uréase	+	–	–	–
Utilisation de différentes sources de carbones				
D-Galactose	–	–	+	–
D-Maltose	+	+	–	–
L-Rhamnose	–	+	–	–
D-Ribose	+	+	–	+
D-Xylose	–	–	+	–
L Arabinose	–	+	+	+
D-Cellobiose	–	–	+	–
D-Lactose	–	+	+	–
D-Mannitol	–	–	+	–
D-Raffinose	–	–	+	–
D-Sorbitol	–	–	+	–
Chimiotaxonomie				
Lipides polaires	DPG, PG, PC PME, PE, PIM, PI, PL5, PL10, GL3, GL4.	DPG, PG, PC PME, PE, PI, PL4, GL4 AL3, APL1.	DPG, PG, PC PME, PE, PI, PL4, AL3, PL9, GL3.	DPG, PG, PC PME, PE, PIM, PL4, GL4, AL3, PLx, APL1.
Menaquinones	MH-11 (H0, H2, H4, H6, H8).	MK-11 (H0, H2, H4), MK-10 (H0, H2).	MK11- (H0, H2, H4, H6).	MK-11 (H0, H2, H4, H6); MK-10 (H2).
Acide gras	i-C16:1 G, i-C16:0, i-C17:0, ai-C17:0, C18:0, 10 Met C18:0.	i-C16:0, ai-C17:0, 10-Met C17:0.	i-C16:1 G, 10-Met C18:0	i-C16:0, ai-C17:0, 10-Met C18:0.

VI. Etude des métabolites secondaires sécrétés par l'isolat CG3.

1. Fractionnement de l'extrait brut méthanolique et localisation des métabolites bioactive sécrétés par l'isolat CG3.

L'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3 préparé à partir du milieu SM+3% de NaCl, subit un fractionnement par HPLC muni d'un collecteur de fraction sur des microplaques de 96 puits, dans le but de repérer la ou les pics qui correspond aux molécules actives. Les résultats du fractionnement contre la bactérie *Staphylococcus aureus*, et la moisissure, *Mucor hiemalis*, sont montrés dans la **figure 37**.

Selon les résultats du fractionnement représentés dans la **figure 37**, on remarque qu'il existe trois zones d'activités, (1D, 1F), (3F, 3H), (4B, 4D), par corrélation avec le spectre d'HPLC obtenu, les pics des molécules actives se localisent dans les intervalles des temps de rétention : (1.5, 3) min, (10.5, 12) min et (14, 15.5) min, respectivement.

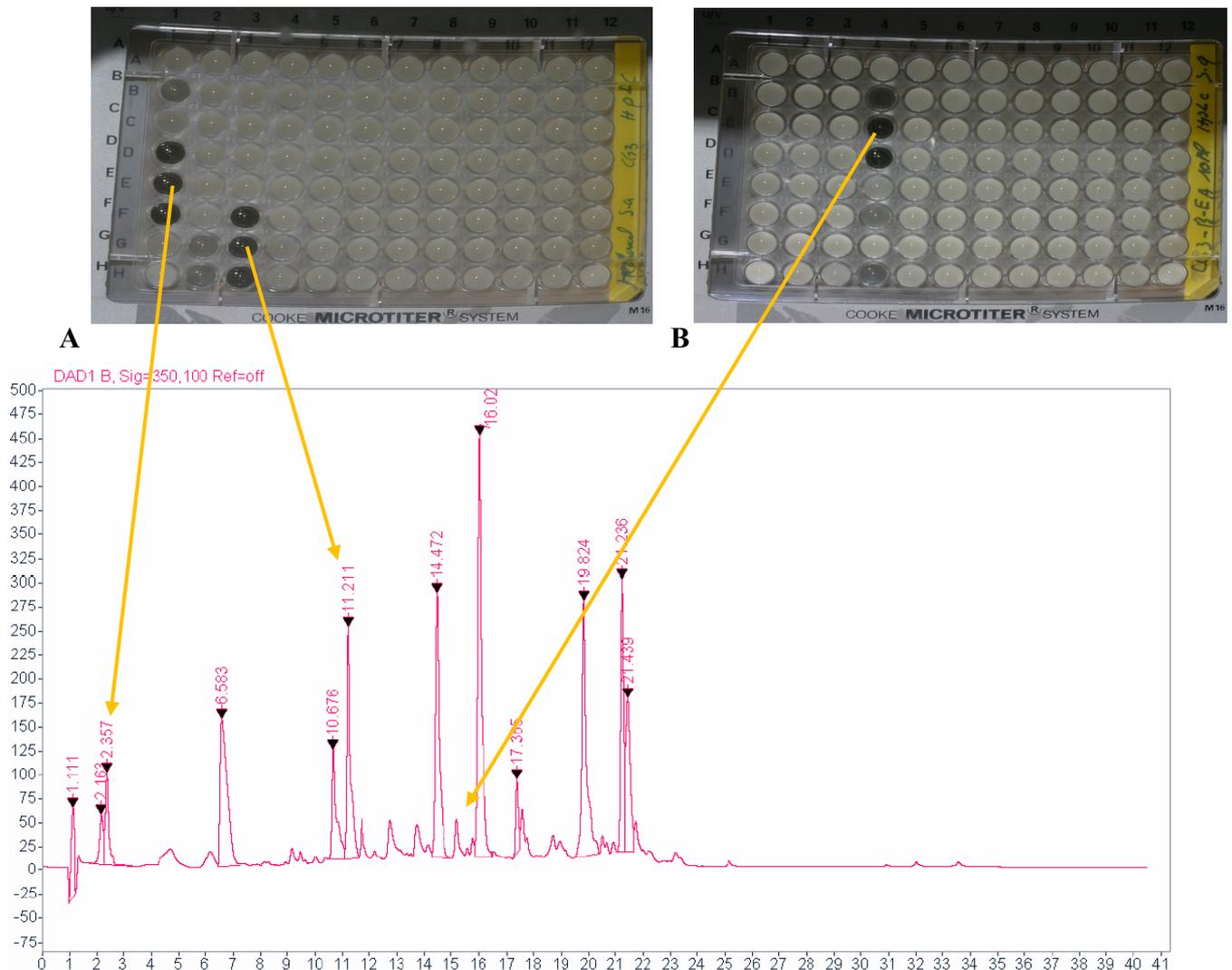


Figure 37: profile de fractionnement par HPLC de l'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3, préparé à partir de milieu SM+ 3 % NaCl, contre, A : *Staphylococcus aureus* ; B : *Mucor hiemalis*.

2. Détermination des formules brutes des métabolites secrétées par l'isolat CG3 par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HRESIMS).

Afin de déterminer les poids moléculaires ainsi que les formules brutes des molécules intéressantes, l'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3 est analysé par HPLC couplé aux spectroscopies de masse de type maXis (Spectrométrie de masse à haute résolution en mode d'ionisation électrospray ou HRESIMS).

La **figure 38** montre les résultats obtenus de cette analyse.

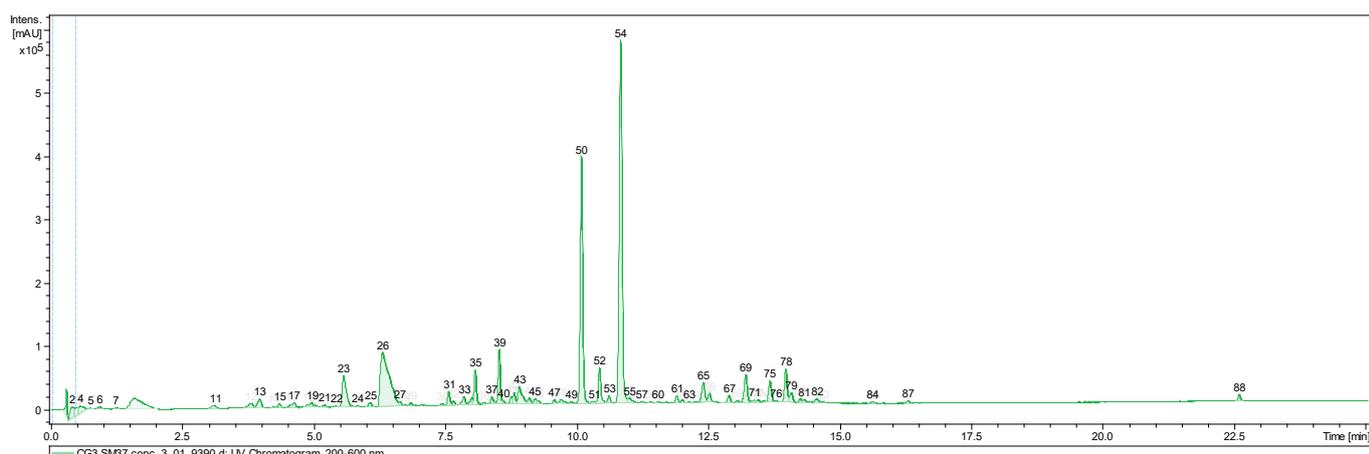


Figure 38 : Profil de l'analyse de l'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3, par HPLC couplé aux spectrométries de masse (HRESIMS).

Par comparaison entre les figures **38** et **37**, la première zone d'activité dans la **figure 37**, (1D, 1F), correspond aux deux pics numéros 12 et 13 dans la **figure 38**. Ces pics ont un temps de rétention de 2.77 min et 2.8 min respectivement, enregistrés sur HRESIMS.

Les résultats de HRESIMS indiquent que les deux pics 12 et 13, ont le même poids moléculaire (m/z : 334), et la même formule brute ($C_{15}H_{18}N_4O_5$) (**figure 39**). Ainsi, les deux molécules possédant les mêmes valeurs de maximales d'absorbance d'UV-visible enregistrée à (216, 245, 362) nm (**figure 39**).

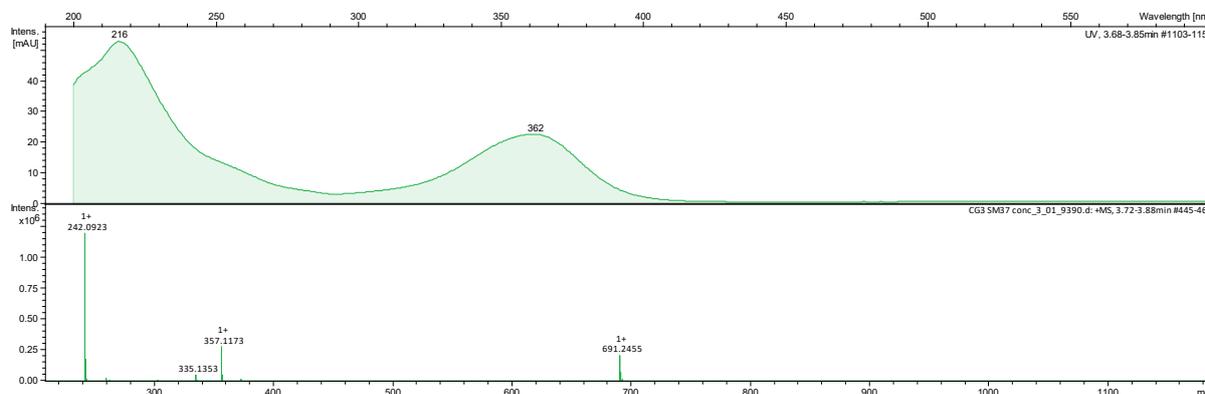


Figure 39 : spectre de HRESIMS du pic numéro 13.

La recherche dans la base de données des molécules chimiques naturelles, dictionnaire des produits naturels (CRC press ; Taylor et Francis group), révèle l'existence de quatre molécules qui partagent la même formule brute, ($C_{15}H_{18}N_4O_5$), que celles des deux métabolites qui correspondent aux pics numéros 12 et 13 (**tableau 9**). Ces quatre molécules sont des dérivées de mitomycine.

Parmi ces quatre molécules, la mitomycine C ainsi que son stéréoisomère, partageant les mêmes valeurs maximales d'absorbance d'UV-visible que celles des deux molécules numéros 12 et 13, ce qui indique que ces deux dernières sont des molécules connues, et sont identiques aux deux molécules la mitomycine C et le stéréoisomère de la mitomycine C.

Tableau 9 : Résultat de la recherche de la formule brute, $C_{15}H_{18}N_4O_5$, dans le dictionnaire des produits naturels, qui correspond aux deux métabolites numéros 12 et 13 sécrétés par la souche CG3.

Nom chimique	Formule brute
Albomitomycin A ;	$C_{15}H_{18}N_4O_5$
Mitomycin C	$C_{15}H_{18}N_4O_5$
Mitomycin C ; O- De-Me, N-Me	$C_{15}H_{18}N_4O_5$
Mitomycin C ; Stereoisomer	$C_{15}H_{18}N_4O_5$

Les mitomycines sont des molécules utilisées dans le traitement de certains types de cancer, issue de l'espèce *Streptomyces caespitosus* (**Bhattacharya et al, 2015**).

Les deux pics numéros 39 et 43, qui ont un temps de rétention de 7.70 min et 7.79 min respectivement (**Tableau 9**), correspondent à la deuxième zone d'activités (3F, 3H) de la **figure 37**. Les résultats de l'analyse par HPLC couplé aux spectrométries de masse (HRESIMS), indique que ces deux métabolites ont le même poids moléculaire, la même formule brute ($C_{23}H_{29}NO_3$), ainsi que les mêmes valeurs maximales d'absorbances d'UV-Visible (220, 285, 298, 340 et 360) nm (**figure 40**).

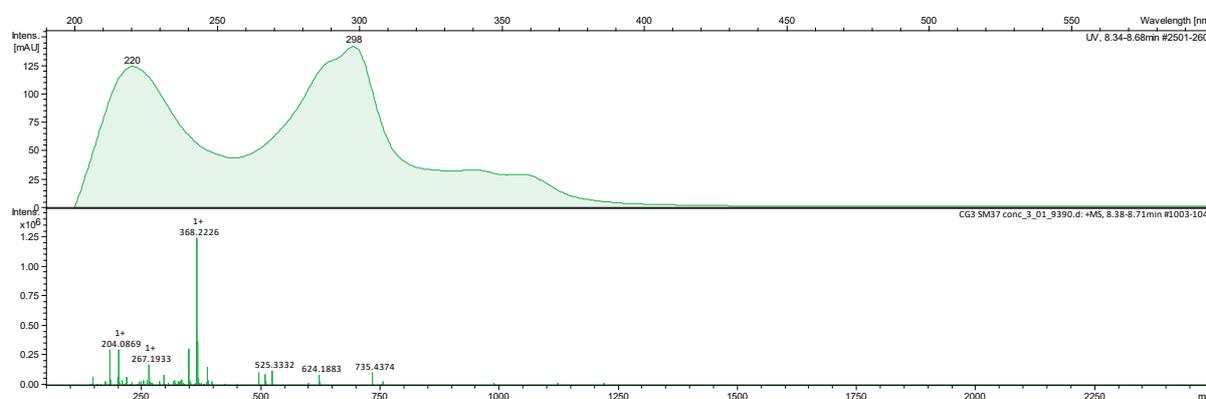


Figure 40: spectre de HRESIMS du pic numéro 39.

La recherche dans la base de données ‘dictionnaire des produits naturels’ (CRC press ; Taylor et Francis group), des molécules qui partagent la même formule brute ($C_{23}H_{29}NO_3$) avec les deux métabolites 39 et 43, révèle l’existence de 13 molécules (**Tableau 10**), dont huit alcaloïdes, obtenues tous à partir des plantes et qui possèdent une absorbance d’UV-Visible très éloignée des deux molécules numéros 39 et 43. Les deux molécules, chartarutine G et H (**Tableau 10**), isolées à partir de moisissure *Stachybotrys chartarum* (**Indraningrat et al, 2016**), possèdent un maximum d’absorbance d’UV-visible différent par rapport aux deux métabolites 39 et 42. De même, les molécules, l’indosespene (**Li et al, 2012**) et l’epipyridone (**Kemami et al, 2007**), obtenues à partir de l’actinomycète *Streptomyces HKI059* (**Li et al, 2012**), et le champignon *Epicoccum sp* (**Kemami et al, 2007**), respectivement, ne partagent pas les mêmes valeurs d’absorbance maximales d’UV-Visible avec les métabolites numéros 39 et 43, ce qui indique qu’elles sont différentes de ces deux dernières.

La dernière molécule, la carbazomadurine B (**Tableau 10**), est un carbazole alcaloïde, obtenu à partir de l’actinomycète *Actinomadura madurae* (**Kotoda et al, 1997**), cette molécule a les mêmes valeurs de maximales d’absorbance d’UV-Visible que les deux métabolites 39 et 43, mais avec un profil d’absorbance d’UV-Visible différent.

Tableau 10 : Résultat de la recherche de la formule brute, $C_{23}H_{29}NO_3$, dans le ‘dictionnaire des produits naturels’, qui correspond aux deux métabolites numéros 39 et 43, sécrétés par la souche CG3.

Nom chimique	Formule brute
Caldaphnidine A	$C_{23}H_{29}NO_3$
Carbazomadurine B	$C_{23}H_{29}NO_3$
Chartarutine G	$C_{23}H_{29}NO_3$
Chartarutine h	$C_{23}H_{29}NO_3$
Cycloquineense A	$C_{23}H_{29}NO_3$
Cycloquineense A ; 1,8 a-diepimer	$C_{23}H_{29}NO_3$
Daphnilongeranine C ; 14, 15- Didehydro, Me ester	$C_{23}H_{29}NO_3$
Epipyridone	$C_{23}H_{29}NO_3$
Holadiénine ; 11-Acetoxy, 17,20-didehydro, N-de-Me	$C_{23}H_{29}NO_3$
Indosespene	$C_{23}H_{29}NO_3$
Lycopurine ; 2 Benzoyloxy	$C_{23}H_{29}NO_3$
Mycoleptodiscin A ; 9-Hydroxy	$C_{23}H_{29}NO_3$
Piperundecalidine	$C_{23}H_{29}NO_3$

D’après ces résultats, les deux métabolites 39 et 43, peuvent représenter de nouvelles molécules, qui doivent être confirmées par la purification et la détermination de leurs structures.

La troisième zone d'activités dans la **figure 38** correspond aux pics numéros 50, 52, 54 dans la **figure 39**. Ces trois pics ont un poids moléculaire (m/z) de 312, 312 et 283 respectivement (**figure 41**), et les trois métabolites possèdent les mêmes valeurs de maximales d'absorbance d'UV-Visible, enregistrés à 220, 254 et 310 nm. La recherche dans la base de données 'dictionnaire des produits naturels' (CRC press ; Taylor et Francis group), des molécules qui partagent la même formule brute que les métabolites numéros 50, 52 et 54, révèle l'existence de plusieurs molécules qui appartiennent à la classe des flavonoïdes et dont les valeurs maximales d'absorbance d'UV-Visible est similaire à ces trois métabolites, ce qui indique que ces trois dernières molécules sont aussi des flavonoïdes.

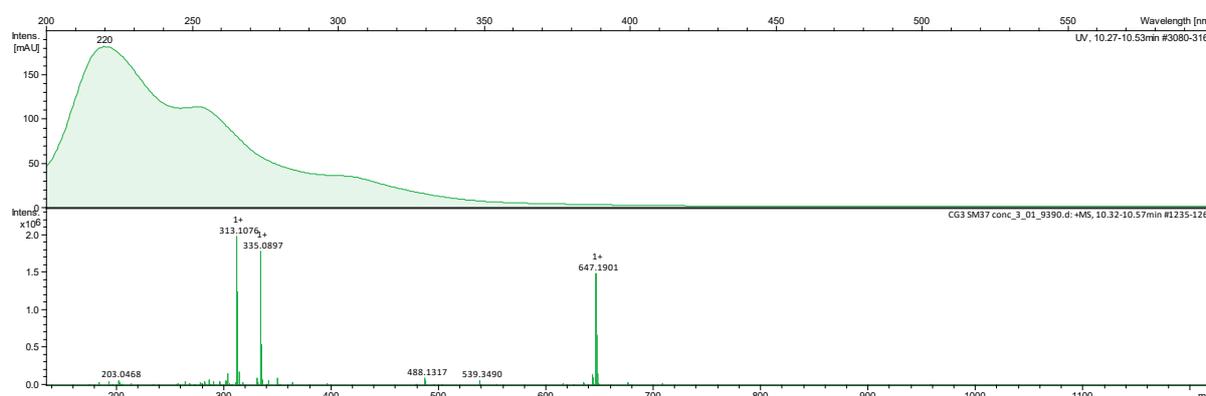


Figure 41 : spectre de HRESIMS du pic numéro 50.

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires généralement sécrétés par les plantes (**Panche et al, 2016**). L'extrait méthanolique de la souche CG3, analysé par HPLC couplé à la spectrométrie de masse (HRESIMS), a été préparé après incubation de la souche CG3 pendant 14 jours dans le milieu SM+3% NaCl, ce dernier contient le tourteau de soja (soybean meal) qui est très riche en flavonoïdes. Donc les métabolites 50, 52 et 54 peuvent avoir comme origine le milieu de culture et non plus la souche CG3. Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons incuber le milieu SM+3%NaCl, sans la souche CG3, à 37°C pendant 14 jours. L'analyse, par HPLC couplé à la spectrométrie de masse (HRESIMS), de l'extrait brut méthanolique préparé à partir du milieu de culture (SM+3%NaCl), à indiquer l'absence des métabolites similaires aux trois flavonoïdes numéros (50, 52 et 54) dans le milieu de culture, donc ces trois derniers ont, probablement, comme origine le métabolisme de la biotransformation des flavonoïdes déjà existant dans le milieu de culture, SM+3% NaCl, en métabolites numéros 50, 52 et 54.

L'analyse par HPLC couplé à la spectrométrie de masse (HRESIMS) de l'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3, a révélé l'existence d'autres molécules qui ont attiré notre attention. En effet, les formules brutes $C_{30}H_{38}N_2O_2$ (**figure 42**), $C_{33}H_{42}N_2O_2$ (**figure 43**), $C_{36}H_{46}N_2O_2$ (**figure 44**), qui correspondent aux métabolites numéros 61 (12 min), 69 (13.25 min) et 78 (14 min) (**figure**

38) respectivement, ne correspond à aucune molécule enregistrée dans la base de données 'dictionnaire des produits naturels', ce qui indique que ces trois métabolites (61, 69 et 78) sont des nouvelles molécules.

Le fractionnement par HPLC analytique ainsi que l'analyse de l'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3 par HPLC couplé à la spectrométrie de masse (HRESIMS), nous ont permis de mettre en évidence, cinq métabolites intéressants (numéros : 39, 43, 61, 69 et 78).

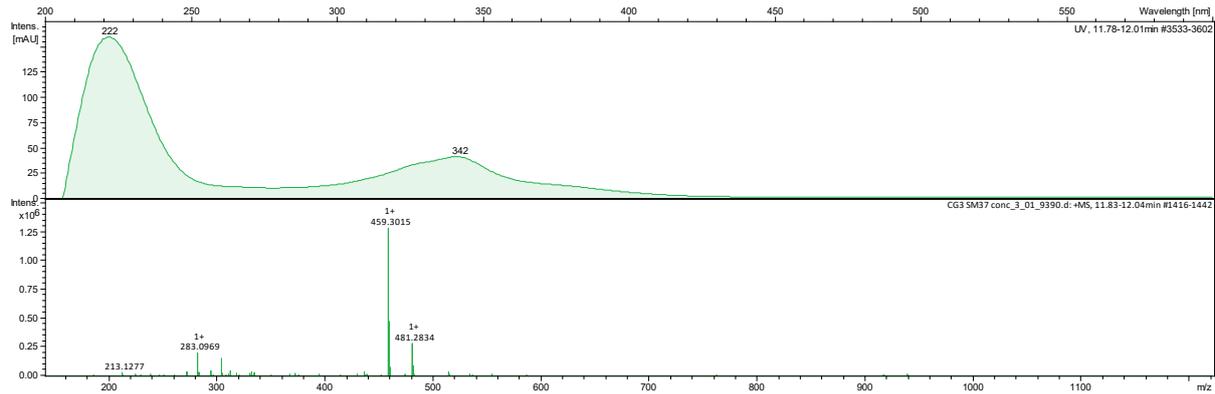


Figure 42 : spectre de HRESIMS de la molécule numéro 61.

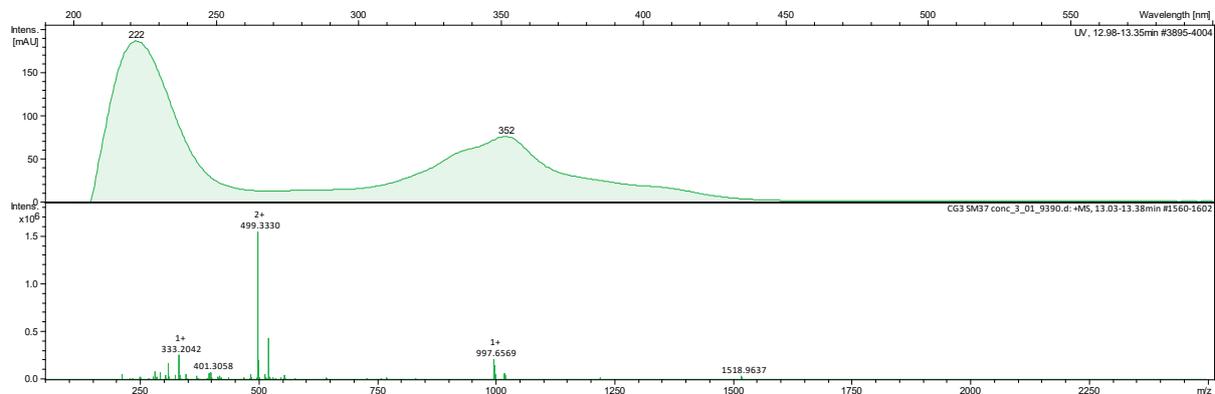


Figure 43 : spectre de HRESIMS de la molécule numéro 69.

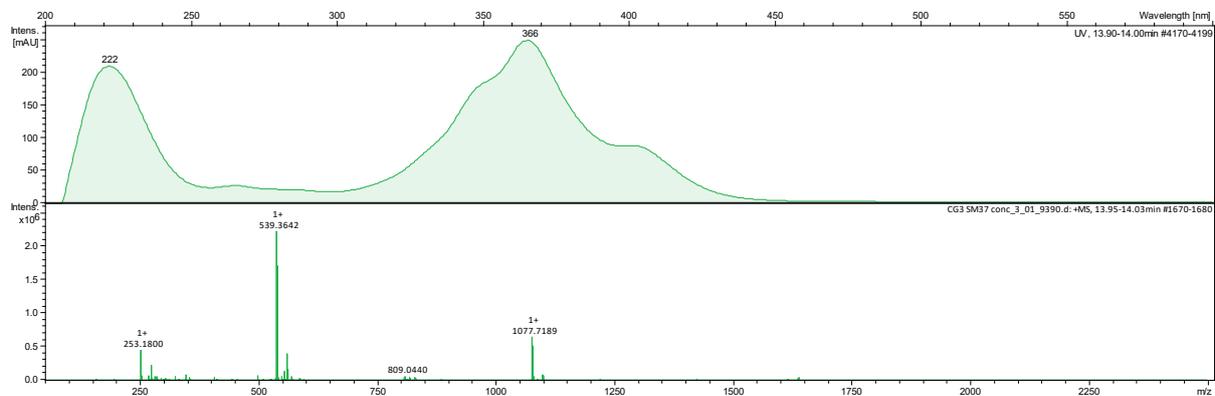


Figure 44 : spectre de HRESIMS de la molécule numéro 78.

3. Détermination de la structure des cinq nouveaux métabolites.

Après la détermination du poids moléculaire ainsi que les formules brutes des cinq métabolites intéressants, numéros 39, 43, 61, 69 et 78, détectés dans l'extrait brut méthanolique de l'isolat CG3, nous allons procéder à la détermination de leurs structures par la technique de la résonance magnétique nucléaire (RMN).

3.1. Détermination de la structure de la molécule numéro 43.

La molécule numéro 43 a été isolée sous forme solide de couleur crème, son poids moléculaire correspond au cluster $[M + H]^+$ égale à $m/z = 368.2390$, sa formule brute a été déterminée comme $C_{23}H_{29}NO_3$. Le temps de rétention enregistré sur HRESIMS, est égal à ($t_R = 8.6$ min) (**figure 45**).

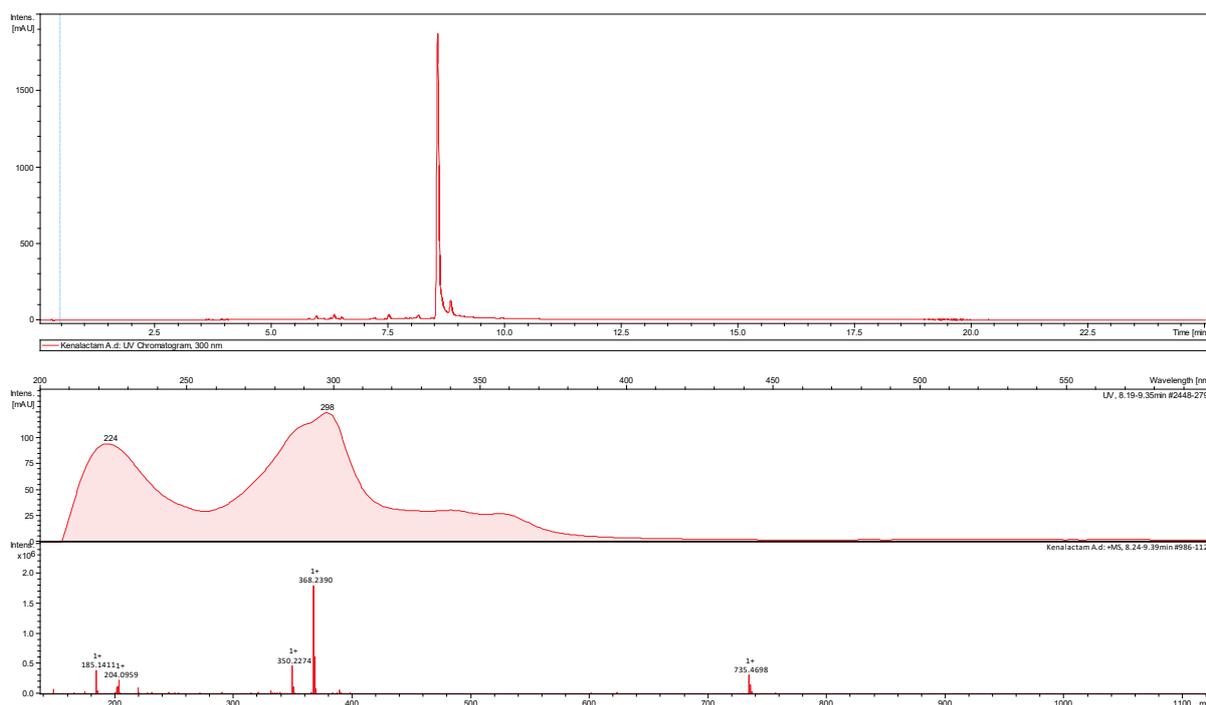


Figure 45 : Spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 43.

Cette molécule possède un degré d'insaturation qui correspond à 10 Double Bond Equivalent (DBE), calculé à partir de la formule :

$$DBE = C + 1 - \frac{H}{2} - \frac{X}{2} + \frac{N}{2}$$

C : signifie le nombre de carbone dans la molécule ;

H : signifie le nombre d'hydrogènes dans la molécule ;

N : désigne le nombre d'azote dans la molécule ;

X : correspond au nombre d'halogène dans la molécule .

Le spectre d'UV-Visible (**figure 45**), indique que cette molécule possède trois bandes d'adsorption enregistrées à 297, 339 et 355 nm, ce qui suggère que la molécule est de nature polyénique (**Lindenfelser et al, 1964**).

Les valeurs de déplacement chimique relatives aux spectres de RMN du carbone (^{13}C ; 176.1 MHz) et de protone (^1H ; 700.4 MHz), sont représentés dans le **tableau 11**.

RMN ^{13}C a confirmé que la molécule numéro (43) possède 23 carbones, dont un carbonyle (δ_{C} 165.1), et un carbone oléfinique quaternaire (δ_{C} 132.2). Les 21 carbones restants, par combinaison entre les données de HSQC, RMN ^1H et RMN ^{13}C , sont identifiés comme 15 méthines oléfiniques ($\text{R}_1=\text{CH}-\text{R}_2$) (δ_{H} 5.10 – 6.67, δ_{C} 142.1 – 125.3), deux alcools secondaires ($\delta_{\text{H/C}}$ 4.53/72.5 and 4.37/69.5), un atome de nitrogène attaché avec un groupe de méthylène (δ_{H} 2.86 and 3.18, δ_{C} 44.5), deux groupes de méthyles ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.78/12.9 et 0.95/18.1) est un groupe de méthine ($\delta_{\text{H/C}}$ 2.69/33.1). Le spectre RMN ^1H indique la présence des signaux supplémentaires qui correspond à un proton amide (δ_{H} 7,62) et de deux hydroxyles (OH) (δ_{H} 5,01 et 4,84) (**tableau 11**).

Afin de déterminer la structure complète de la molécule numéro 43, d'autres expériences spectrales de RMN multidimensionnel sont nécessaires, qui vont nous permettre de corréler les hydrogènes et les carbones entre eux. En effet, le spectre COSY H-H nous permettra de corréler les protons entre eux par couplage scalaire, ainsi que les deux techniques spectraux (HSQC, HMBC) qui permettent de corréler les hydrogènes avec les carbones entre eux.

La configuration des doubles liaisons (cis ou trans) ainsi que la configuration relative de la molécule 43, a été déterminée par la technique de *J*-resolved RMN ^1H et ROESY $^1\text{H}, ^1\text{H}$ corrélations. Les résultats indiquent que cette molécule a une configuration cis (E) au niveau des doubles liaisons $\Delta^{2,3}$, $\Delta^{4,5}$, $\Delta^{12,13}$ et $\Delta^{14,15}$, alors que les doubles liaisons $\Delta^{6,7}$, $\Delta^{10,11}$, $\Delta^{16,17}$, et $\Delta^{18,19}$ ont une configuration trans (Z).

La configuration absolue au tour des carbones asymétrique C8, C9 et C20 de la molécule 43 a été déterminé par la méthode de Mosher. Les résultats montrent que cette molécule à une configuration en S pour le carbone 8, R pour le carbone 9 et S pour le carbone 20 (**figure 46**).

La rotation optique de la molécule 43, calculé à 20°C pour la concentration de 0.12 g/100ml dans le DMSO, est égale à : $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +425$, les maximums d'absorbance d'UV/Vis (dans le méthanol) calculé pour la concentration de $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, sont λ_{max} ($\log \epsilon$) 248 (3.88), 297 (4.57), 339 (3.94), 355 (3.90) nm. Le temps de rétention enregistré dans (HRESIMS) est égal à $t_{\text{R}} = 8.6$ min.

Tableau 11 : les données de RMN ^1H (700.4 MHz) et ^{13}C (176.1 MHz) des deux molécules 43 et 69 dans le DMSO.

Pos.	43		69	
	δ_{C} , type	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)
1	165.1, C	-	168.3, C	-
2	125.3, CH	5.66, d (15.0)	131.3, C	-
3	138.5, CH	6.66, dd (15.0, 10.5)	132.4, CH	6.66, d (11.4)
4	125.4, CH	6.08, dd (15.0, 10.5)	129.1, CH	6.34 ^a , dd (14.5, 11.4)
5	142.1, CH	6.14 ^a , d (15.0)	136.5, CH	6.59, dd (14.5, 11.4)
6	132.2, C	-	134.7, CH	6.24 ^b , dd (14.5, 11.4)
7	137.9, CH	5.15, d (7.5)	129.1, CH	7.00, dd (14.5, 11.4)
8	72.5, CH	4.53, ddd (7.5, 3.4, 3.0)	129.9, CH	5.88, t (11.4)
8-OH		4.84, br. d (3.0)		
9	69.5, CH	4.37, ddd (9.0, 4.7, 3.4)	125.1, CH	6.01, t (11.4)
9-OH		5.01, br. d (4.7)		
10	132.8, CH	5.45, dd (11.0, 9.0)	124.7, CH	6.73, t (11.4)
11	128.2, CH	6.03 ^b , t (11.0)	137.6, CH	5.32, dd (11.4, 10.4)
12	130.2, CH	6.01 ^b , dd (14.5, 11.0)	31.6, CH	2.88, m
13	131.5, CH	6.12 ^a , dd (14.5, 11.0)	44.6, CH ₂	(a) 2.41, ddd (13.0, 11.0, 5.6) (b) 3.49, ddd (13.0, 7.1, 3.9)
14	134.4, CH	6.02 ^b , dd (14.5, 11.4)	NH	7.84, dd (7.1, 5.6)
15	127.6, CH	6.49, dd (14.5, 11.4)	171.2, C	-
16	129.2, CH	5.81, t (11.4)	134.0, C	-
17	125.4, CH	6.11, t (11.4)	137.2, CH	6.31, s
18	125.5, CH	6.36, t (11.4)	130.2, C	
19	135.7, CH	5.10, dd (11.4, 10.2)	136.8, CH	5.93 ^c , d (11.4)
20	33.1, CH	2.69, ddqd (11.6, 10.2, 6.5, 3.7)	128.3, CH	6.49, dd (14.5, 11.4)
21	44.5, CH ₂	(a) 2.86, ddd (13.0, 3.7, 3.3) (b) 3.18, ddd (13.0, 11.6, 9.3)	136.1, CH	6.18, dd (14.5, 11.4)
22	NH	7.62, br. dd (9.3, 3.3)	133.2, CH	6.26 ^b , dd (14.5, 11.4)
23	12.9, CH ₃	1.78, s	129.8, CH	6.44, dd (14.5, 11.4)
24	18.1, CH ₃	0.95, d (6.5)	129.0, CH	5.92 ^c , t (11.4)
25			125.8, CH	6.09, dd (11.4, 11.0)
26			125.2, CH	6.35 ^a , t (11.0)
27			137.5, CH	5.21, t (11.0)
28			33.0, CH	2.86, m
29			44.7, CH ₂	(a) 2.94, ddd (13.0, 11.4, 7.5) (b) 3.13, ddd (13.0, 5.0, 4.5)
30			NH	7.49, dd (7.5, 5.0)
31			12.8, CH ₃	1.71, d (6.8)
32			18.1, CH ₃	0.94, d (6.5)
33			14.3, CH ₃	1.95, br. s
34			15.6, CH ₃	1.99, d (6.5)
35			17.4, CH ₃	0.95, d (6.5)

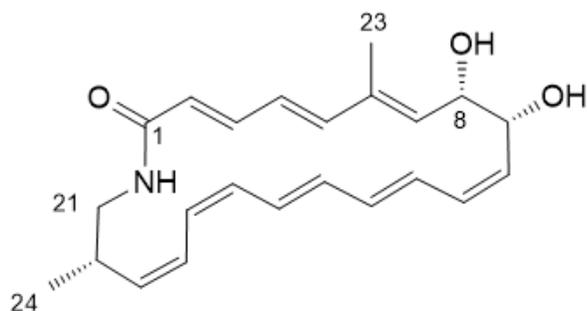


Figure 46 : structure complète de la molécule numéro 43.

3.2. Détermination de la structure de la molécule numéro 39.

La molécule numéro 39 a été isolée sous forme solide de couleur crème, son poids moléculaire correspond au cluster d'ions $[M + H]^+$ égale à $m/z = 368.2220$. Cette molécule partage la même formule brute ($C_{23}H_{29}NO_3$) et le même spectre UV-vis que celle de la molécule numéro 43 ($C_{23}H_{29}NO_3$). Le temps de rétention enregistré sur HRESIMS, est égal à ($t_R = 8.9$ min) (**figure 47**).

Le spectre RMN complet de la molécule numéro 39 est similaire avec celui de la molécule numéro 43. Ce qui indique que les deux molécules (numéros 39 et 43) sont des isomères. En effet, la détermination de la structure de la molécule numéro 39 à partir des données de RMN a conduit à l'obtention du même squelette carboné que la molécule numéro 43 (**figure 48**).

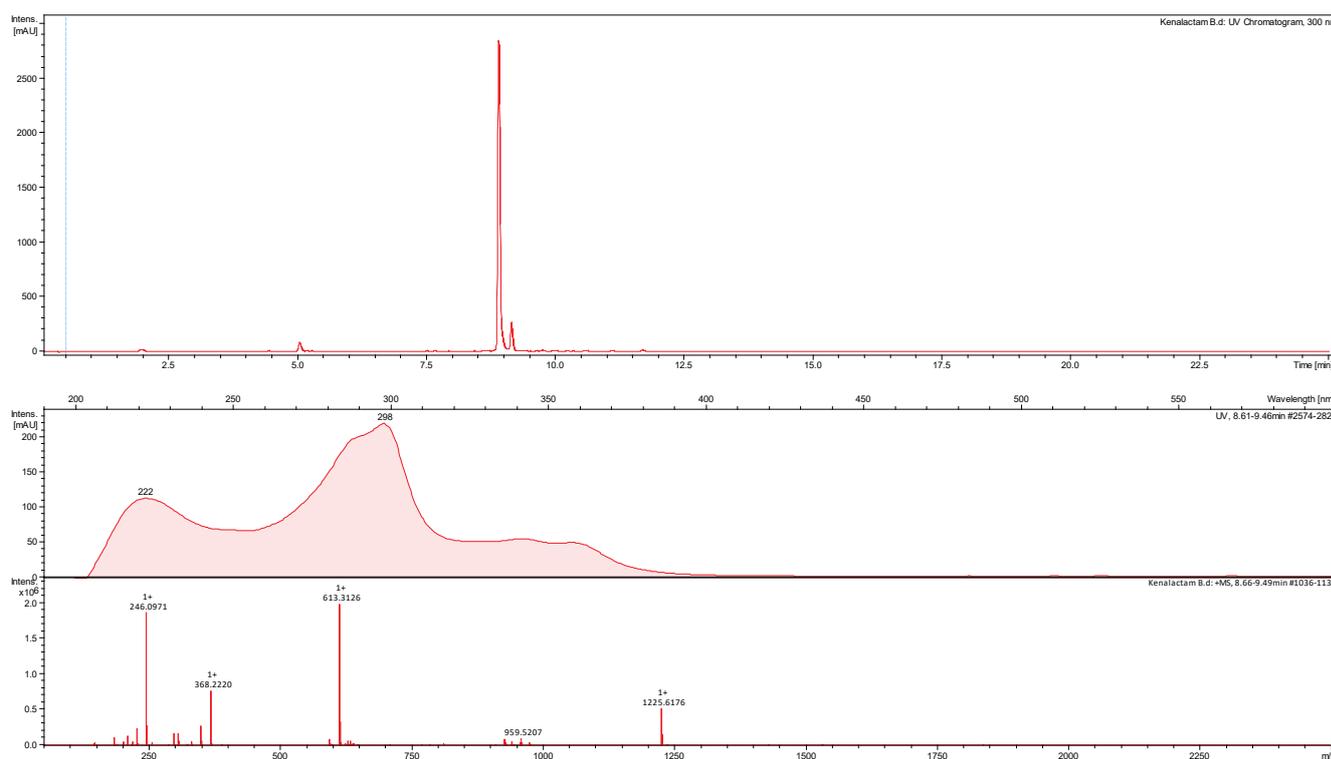


Figure 47: spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 39.

La seule différence entre les deux molécules 39 et 43, a été observée dans la configuration absolue des deux carbones asymétriques (C8 et C9). En effet pour la molécule 43, les deux stéréocentres ont la configuration S, alors que la molécule 39 possède une configuration R pour le carbone numéro 8 (C8) et S pour le C 9 (**figure 48**).

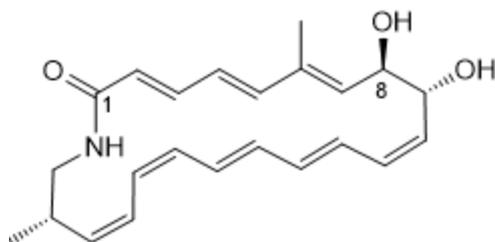


Figure 48 : structure complète de la molécule numéro 39.

La rotation optique de la molécule 39, calculé à 20 °C pour la concentration de 0.1 g/100 ml dans le méthanol est égale à : $[\alpha]^{20}_D = +33.8$, les valeurs maximales d'absorbance d'UV/Vis (dans le méthanol) calculé pour la concentration de $2,7 \cdot 10^{-4}$ mol/l, sont λ_{max} ($\log \epsilon$) 246 (3.43), 296 (3.71), 338 (3.21), 355 (3.17) nm. Le temps de rétention enregistré dans (HRESIMS) est égal à $t_R = 8.6$ min.

3.3. Détermination de la structure de la molécule numéro 61.

La molécule numéro 61 a été isolée sous forme solide de couleur jaune verte, sa formule brute a été déterminé par HREIMS en tant que $C_{30}H_{38}N_2O_2$, ceci correspond au cluster d'ions moléculaire $[M + H]^+$ égale à $m/z = 459,3012$, le temps de rétention enregistré sur HRESIMS est égal à ($t_R = 11.00$ min) (**figure 49**).

La molécule numéro 61 possède 13 doubles liaisons équivalentes. les valeurs maximales d'absorbance d'UV-visible (λ_{max} : 325, 329 et 338 nm) suggèrent la nature polyénique de la molécule 61.

RMN 1H et ^{13}C (**tableau 12**) indique que la molécule numéro 61 est symétrique et il s'agit bien d'un dimère cyclique de macrolactam (la moitié de signal se répète deux fois), en effet RMN 1H montre que la molécule contient, deux fonctions amides (δ_H 7.62), 9 paires de protons oléfiniques (δ_H 5.25 – 6.77) et deux paires du groupe méthyle (δ_H 0.95 and 1.75).

La rotation optique de cette molécule, calculé dans le méthanol, est égale à : $[\alpha]^{20}_D +104.7$ ($c= 0.1$ g/100 ml).

La molécule 61 à une configuration E pour les doubles liaisons $\Delta^{4,5}$ et $\Delta^{6,7}$, alors que les doubles liaisons, $\Delta^{2,3}$, $\Delta^{8,9}$ and $\Delta^{10,11}$ ont une configuration Z. Cette molécule possède deux paires de carbones asymétriques C (2, 2') et C (12, 12'), ce dernier à une configuration S (**figure 50**).

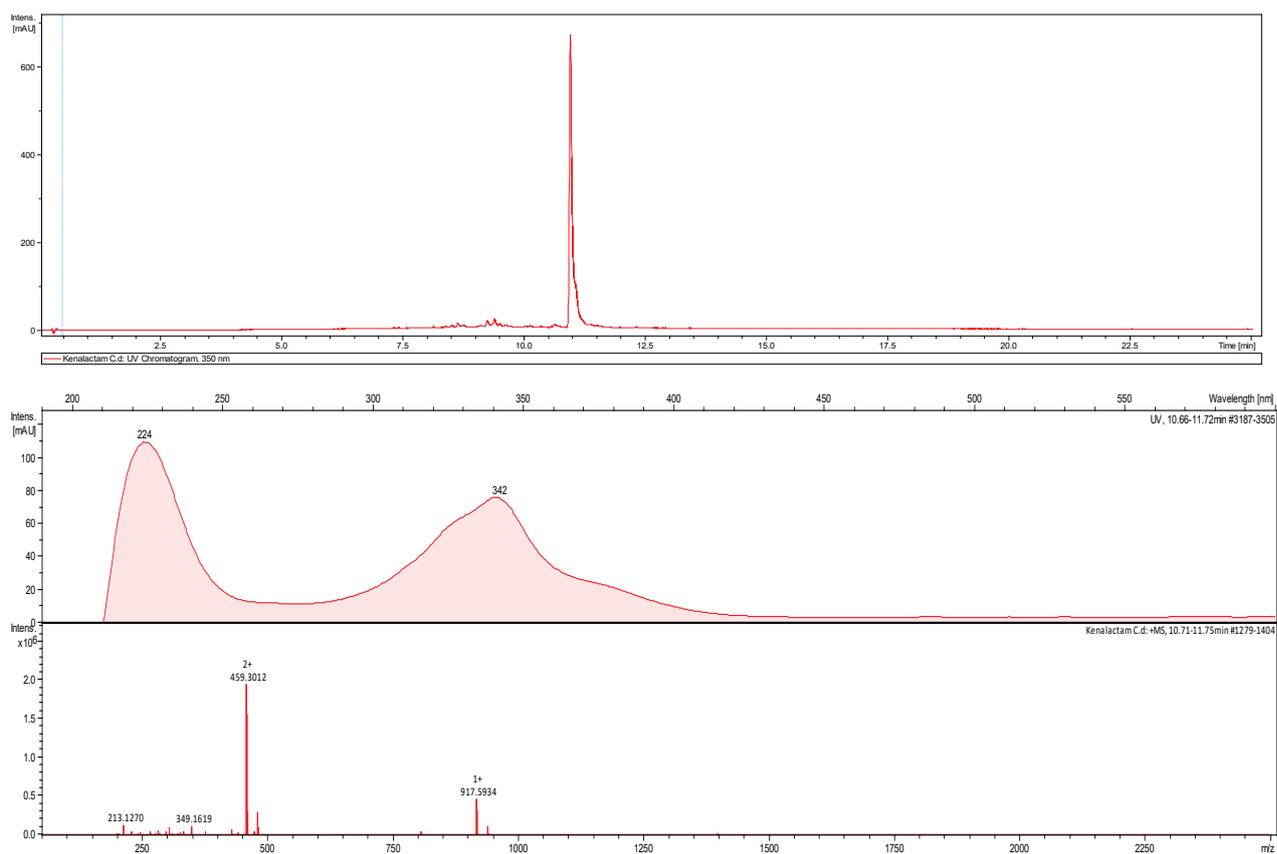


Figure 49 : spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 61.

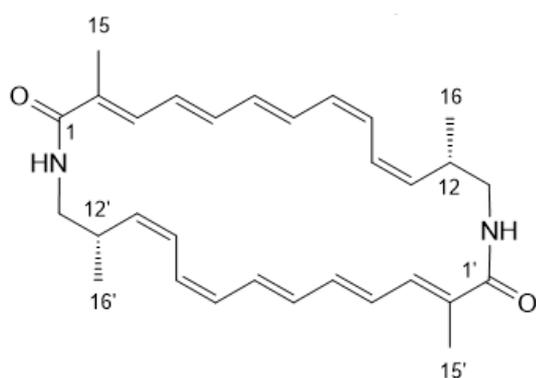


Figure 50 : structure complète de la molécule numéro 61.

Tableau 12 : les données de RMN ^1H (700.4 MHz) et ^{13}C (176.1 MHz) des deux molécules 61 et 78 dans le DMSO.

pos.	61		78	
	δ_{C} , type	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} , mult. (J in Hz)
1, 1'	169.2, C		171.4, C	
2, 2'	131.2, C		130.6, C	
3, 3'	132.6, CH	6.42 ^a , d (11.4)	136.8, CH	6.27, d (14.5)
4, 4'	128.2, CH	6.36 ^a , dd (14.0, 11.4)	129.0, CH	6.48 ^a , d (14.5, 10.0)
5, 5'	137.2, CH	6.38 ^a , dd (14.0, 10.0)	136.6, CH	6.01 ^b , d (10.0)
6, 6'	133.6, CH	6.23, dd (14.5, 10.0)	134.3, C	
7, 7'	130.0, CH	6.77, dd (14.5, 11.4)	135.5, CH	6.49 ^a , d (10.0)
8, 8'	129.2, CH	5.86, t (11.4)	134.5, CH	6.29, dd (14.5, 10.0)
9, 9'	125.4, CH	6.03, t (11.4)	128.7, CH	6.90, dd (14.5, 11.4)
10, 10'	125.2, CH	6.57, dd(11.4, 11.0)	129.9, CH	5.92, t (11.4)
11, 11'	137.3, CH	5.25, t (11.0)	124.5, CH	6.02 ^b , t (11.4)
12, 12'	31.7, CH	2.91, dqdd (11.0, 6.5, 6.1, 4.9)	124.9, CH	6.71, t (11.4)
13, 13'	44.6, CH ₂	(a) 2.59, ddd (13.0, 6.4, 6.1) (b) 3.36, ddd (13.0, 6.4, 4.9)	137.5, CH	5.31, t (11.4)
14, 14'	NH	7.62, t (6.4)	31.4, CH	2.96, tqd (11.4, 6.5, 4.3)
15, 15'	12.8, CH ₃	1.75, br. s	44.4, CH ₂	(a) 2.41, ddd (13.0, 11.4, 6.4) (b) 3.48, ddd (13.0, 6.4, 4.3)
16, 16'	17.6, CH ₃	0.95, d (6.5)	NH	7.74, t (6.4)
17, 17'			14.3, CH ₃	1.93, s
18, 18'			15.6, CH ₃	1.96, s
19, 19'			17.8, CH ₃	0.93, d (6.5)

3.4. Détermination de la structure de la molécule numéro 69.

La molécule numéro 69 a été isolée sous forme solide de couleur jaune, cette molécule à un cluster d'ions moléculaire $[\text{M} + \text{H}]^+$ égale à $m/z = 499, 3323$, qui correspond à la formule brute $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_2$ (**figure 51**), avec 14 Doubles Bond Equivalente, le temps de rétention enregistré sur HRESIMS est égal à ($t_R = 12.03$ min) (**figure 51**).

Le spectre d'UV-Visible de la molécule numéro 69 est similaire à celle de la molécule 61. Par comparaison avec la molécule numéro 61, le spectre de RMN ^1H de la molécule 69 présentait deux protons oléfiniques et un groupe méthyle supplémentaires (**tableau 11**).

Les doubles liaisons, $\Delta^{2,3}$, $\Delta^{4,5}$, $\Delta^{6,7}$, $\Delta^{16,17}$, $\Delta^{18,19}$, $\Delta^{20,21}$, $\Delta^{22,23}$, ont été établie qu'ils ont la configuration E, alors une configuration Z a été déterminé pour les doubles liaisons, $\Delta^{8,9}$, $\Delta^{10,11}$, $\Delta^{20,21}$, $\Delta^{22,23}$.

Le carbone asymétrique C28, de la molécule 69, a été déterminé qu'il a la configuration S (**Figure 52**).

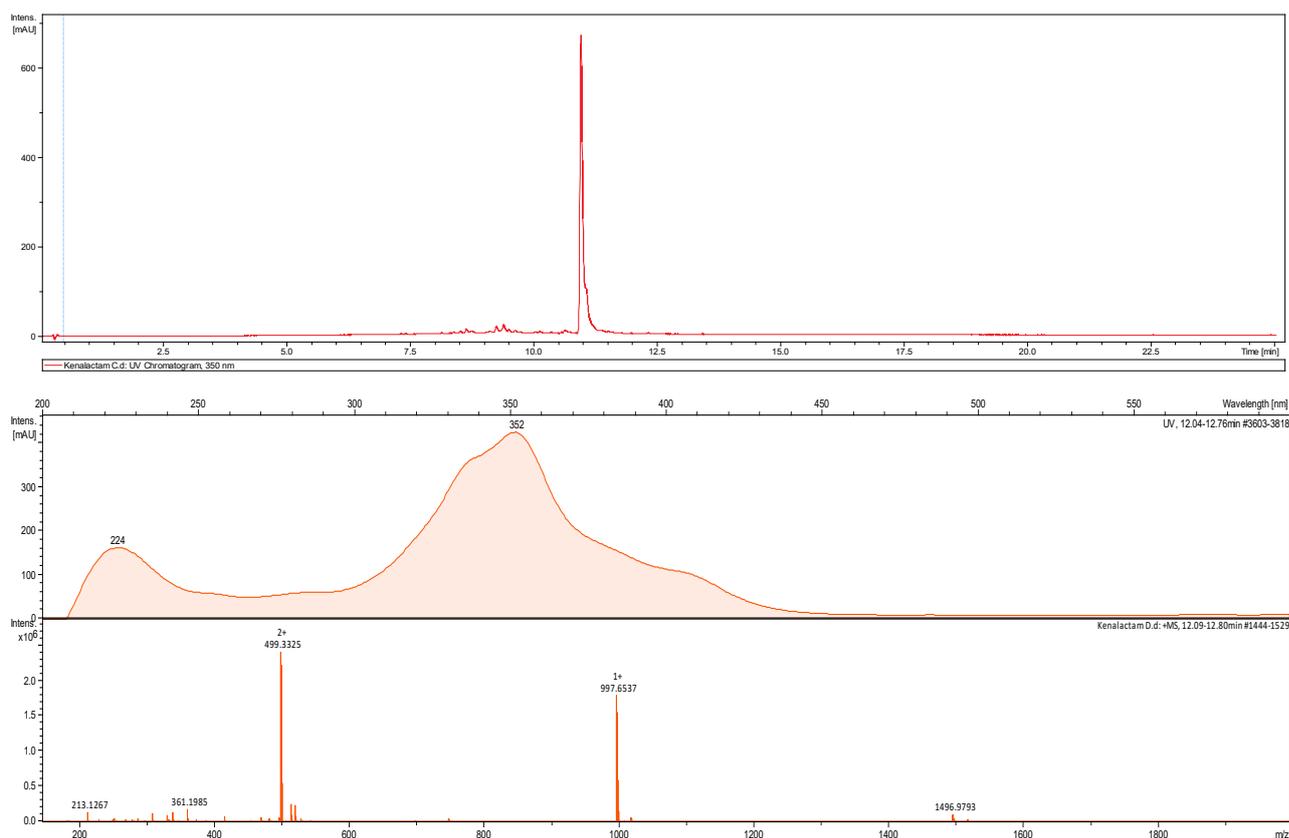


Figure 51 : spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 69.

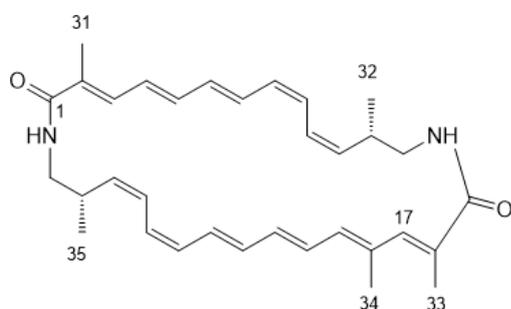


Figure 52 : structure complète de la molécule numéro 69.

3.5. Détermination de la structure de la molécule numéro 78.

La formule brute de la molécule numéro 78 ($C_{36}H_{46}N_2O_2$) a été déterminée par HRESIMS, ceci correspond au cluster d'ions moléculaires $[M+H]^+$ égale à $m/z = 539.3634$ (figure 53). Le temps de rétention enregistré sur HRESIMS est égal à ($t_R = 11.00$ min) (figure 53).

Cette molécule, isolée sous forme solide de couleur jaune, possède 15 Double Bond Equivalent, et sa structure a été déterminée par RMN.

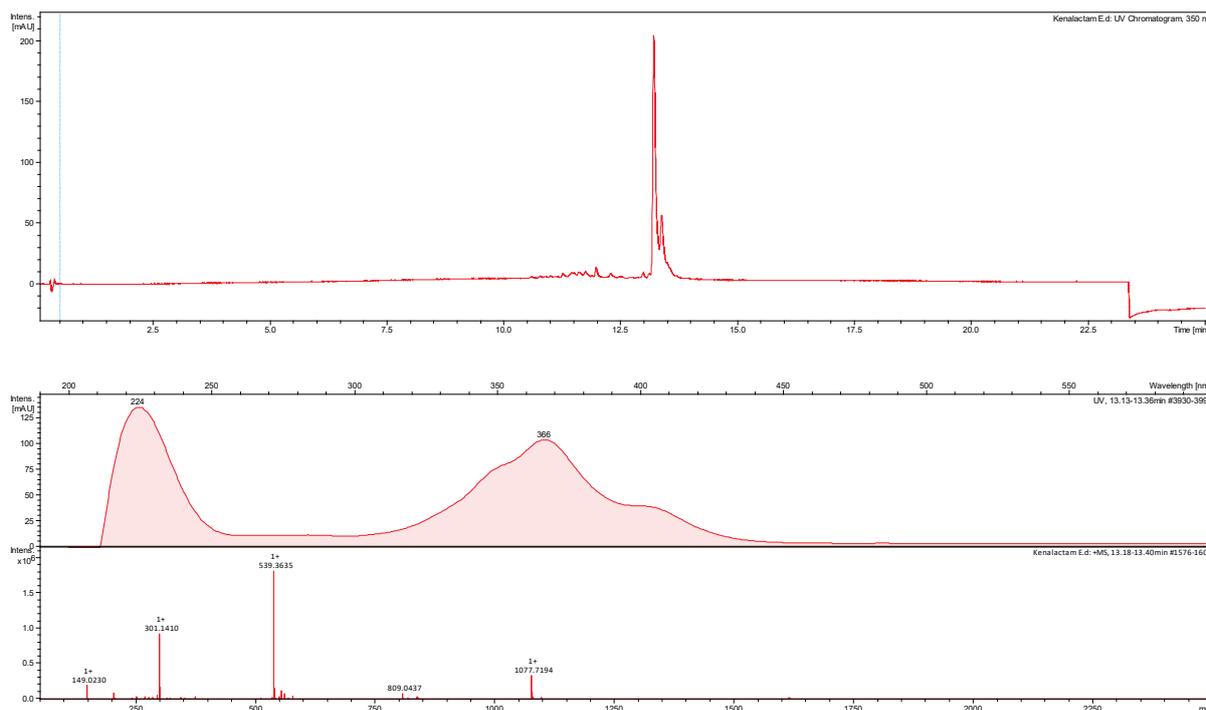


Figure 53 : spectre de HRESIMS de la molécule pure numéro 78.

Le spectre RMN de la molécule numéro 78 (**tableau 12**) contient tous les éléments chimiques de dimère macrolactam numéro 69, avec une paire de méthine ($\delta_{H/C}$ 6.29/134.5), et un groupe méthyle supplémentaire ($\delta_{H/C}$ 6.29/134.5 and 1.96/15.6 ppm) plus un carbone (δ_C 134,3 ppm). La configuration absolue en C-14 de la molécule 72 est S (**Figure 54**).

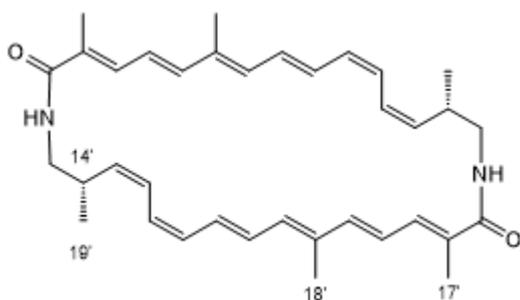


Figure 54 : structure de la molécule numéro 78.

Comme la molécule 69, la molécule numéro 78 est aussi un dimère cyclique de macrolactam polyénique (**figure 54**).

La molécule numéro 78 possède des valeurs de maximums d'absorbance d'UV-Visible, mesuré dans le méthanol et calculé à la concentration de 0.1 mol/l, égale à λ_{max} : (log ϵ) 287 (3.76), 362 (4.69) nm, alors que la rotation optique de cette molécule, déterminé dans le méthanol et calculé pour la concentration de 0.1g/100ml, est égale à $[\alpha]_D^{20} +70.8$.

Pour plus de détail sur la détermination de la structure des molécules 43, 39, 61, 69 et 78, voir la publication de **Messaoudi et al ; 2019**

La détermination de la structure complète des métabolites numéros, (43, 39, 61, 69, 78), purifié à partir de la souche CG3, par l'utilisation des données combinées de RMN H1, C13, COSY H-H, HMBC et HSQC, montrent que ces molécules appartiennent tous à la classe des macrolactams polyéniques.

La recherche des structures similaires des cinq macrolactams polyénique numéros : 43, 39, 61, 69, 78, dans les bases de données des molécules chimiques, indique que ces métabolites sont nouveaux. Pour cela nous avons proposé le nom trivial : Kenalactams (A-E) (kena : pour Kenadsa (wilaya de Bechar) dont la souche CG3 a été isolée, et lactams : pour macrolactams) pour nommer ces nouvelles molécules :

- **Kenalactam A pour la molécule numéro 43,**
- **Kenalactam B pour la molécule numéro 39,**
- **Kenalactam C pour la molécule numéro 61,**
- **Kenalactam D pour la molécule numéro 69,**
- **Kenalactam E pour la molécule numéro 78.**

La comparaison entre la souche CG3 et les espèces les plus proches, indique que *Nocardiosis gilva*, produit une seule nouvelle molécule, p-terphenyl qui a une activité antifongique et antibactérienne (**Tian et al, 2013**). Cependant, aucune nouvelle molécule n'a été obtenue à partir des deux autres espèces, *Nocardiosis rosea* et *Nocardiosis rhodophae*.

Du point de vue structurel, les macrolactams polyéniques, dont les kenalactams A-E, se caractérisent tous par un macrocycle polyénique attaché par une fonction amide (**Li et al, 2016**).

Les macrolactams polyéniques représentent une petite famille de molécules, au sein de la classe des polycétides (**Low et al, 2018**). En effet, ces molécules n'ont jamais été isolées à partir d'un autre microorganisme, à part les actinomycètes (**Ammermann et al, 2017**).

Les macrolactams polyéniques possèdent différentes activités biologiques, par exemple, la sceliphrolactam, isolée à partir d'une espèce de *Streptomyces sp*, est un polyène macrolactame qui inhibe les souches de *Candida albicans* résistantes à l'amphotéricine B (**Oh et al, 2011**). Cependant, **Schulze et al, 2015**, ont isolés, à partir d'une nouvelle souche marine, *Micromonospora sp*, une nouvelle famille de macrolactams polyénique, lobosamide A- C, qui inhibe la croissance du protozoaire, *Trypanosoma brucei*, à une concentration très faible égale à ($IC_{50} = 0.8 \mu\text{M}$).

Les deux molécules, kénalactams A et B, sont des stéréoisomères, les deux ont un macrocycle de 22 membres. Les molécules structurellement apparentées à ces deux macrolactams sont, la cyclamenol A, qui est un maclactam polynénique avec un macrocycle de 20 membres (**figure 55**), isolé à partir de la souche *Streptomyces* MHW 846, et qui possède une activité anti-inflammatoire (**Nazaré et al, 2000**). Ainsi que les molécules, lobosamide A, mirilactam A, micromonolactam, salinilactam et la sceliphrolactam, qui sont tous des macrolactams polyéniques avec un macrocycle de 26 membres (**figure 58**) (**Thawai et al, 2004 ; Udwary et al, 2007 ; Oh et al, 2011 ; Skellam et al, 2013; Schulze et al, 2015**).

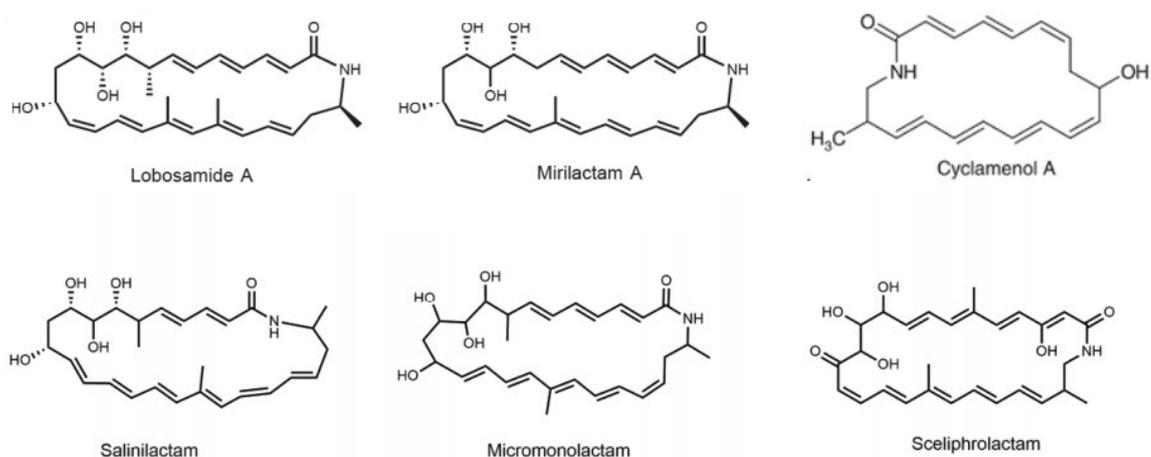


Figure 55 : structure des macrolactams structurellement apparentés avec les kénalactams A et B.

Les deux kénalactams C et E, sont des dimères polyéniques de macrolactams, avec deux fonctions amides. Alors que le kénalactam D est un dimère polyénique de macrolactams déformé par un groupe de méthyle en position 34 (**figure 52**). Cette structure en dimère polyénique de macrolactams, n'a jamais été reportée dans la bibliographie, et on peut dire qu'elle représente une nouvelle structure de base, et les trois molécules, kénalactams C, D et E, sont les premiers dimères macrolactam polyénique identifié jusqu'au jour d'aujourd'hui.

VII. Mise en évidence de l'activité biologique des nouvelles kénalactams A-E.

Les résultats de l'activité antimicrobienne et cytotoxiques (anticancéreuse) des kénalactams A et C-D sont représentés dans le **tableau 13**. Cependant, en raison de la faible quantité obtenue pour le kénalactam B (0.4 mg), l'évaluation de l'activité biologique de cette molécule n'été pas réalisé.

Tableau 13 : activité antimicrobienne et cytotoxique des kenalactams A et C-E.

Les lignées cellulaires	IC ₅₀ (µM)				
	A	C	D	E	Epothilone B
Mouse fibroblasts L929	-	32.8	42.2	-	7.5 10 ⁻⁴
HeLa cells KB3.1	-	6.8	5.4	2.4	5.3 10 ⁻⁵
Human breast adenocarcinoma MCF-7	nt	16.4	18.1	nt	7.4 10 ⁻⁵
Human prostate cancer PC-3	nt	6.3	5.0	2.1	2.2 10 ⁻³
Human lung carcinoma A549	nt	16.3	32.1	6.5	4 10 ⁻³
Ovarian carcinoma SKOV-3	nt	14.2	10.0	5.5	2.4 10 ⁻⁴
Microorganismes		CMI (µg/mL)			Oxytetracycline
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	-	66.7	16.7	66.7	0.05
<i>Escherichia coli</i> DSM1116	-	-	-	-	1.66
<i>Bacillus subtilis</i> DSM10	-	-	-	-	2.08
					Nystatin
<i>Mucor hiemalis</i> DSM2656	-	66.7	-	-	4.16
<i>Candida albicans</i> DSM1665	-	66.7	-	-	8.8

-: pas d'activité nt: non testé.

Les trois kenalactams C, D et E ont montré une activité antibactérienne moyenne contre la bactérie *Staphylococcus aureus*, avec des valeurs de CMI variant entre (16.7 à 66.7) µg/mL, tandis que seul, kenalactam C, qui a montré une activité antifongique contre la levure *Candida albicans* (CMI 66.66 µg/mL) et la moisissure *Mucor hiemalis* (CMI 66.66 µg/mL). Cependant, aucune activité antimicrobienne ou antifongique n'a été détectée pour le kenalactam A, à des concentrations inférieures ou égales à 66.66 µg/mL.

Pour l'activité anticancéreuse (cytotoxique), les deux kenalactams C et D, montrent une activité moyenne à faible contre les différentes lignées cellulaires testées (**tableau 13**). Le kenalactam E a montré l'activité cytotoxique la plus forte, en effet, à part la lignée cellulaire normale, fibroblastes de souris (L929), où l'activité a été nulle, cette molécule a montré une activité anticancéreuse contre les quatre lignées cellulaires testées (KB3.1, PC-3, SKOV-3 et A549). L'activité la plus forte a été remarquée contre la lignée, PC-3 ou 'Human prostate cancer' avec une valeur de IC₅₀ de 2.1 µM, tandis que l'activité la plus faible a été observé contre la lignée, A549 (Human lung carcinoma) avec une valeur de IC₅₀ de 6.5 µM.

Les nouvelles molécules obtenues, surtout le kenalactam E, possèdent une activité anticancéreuse beaucoup plus importante par rapport aux autres macrolactams polyéniques.

En effet, les dracolactams A et B ainsi que les heronamides G–L (Hoshino et al, 2017), ne présentent pas une activité cytotoxiques, alors que le macrolactames dérivés de la naphtyomycine, obtenu à partir de l'actinomycète endophytique, *Streptomyces* KIB-H2054, présente une activité cytotoxique faible contre cinq lignées cellulaires (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7, et SW480), avec des valeurs de IC50 qui vont de 10.68 à 32.55 μM (Zhouxin et al, 2019).

VIII. Détermination des acides aminés starters utilisés par la souche CG3 pour la biosynthèse des kenalactams A-E, par l'expérience d'alimentation.

La biosynthèse des macrolactams, dont la nouvelle famille des molécules (kenalactams A-E), implique des PKS modulaires qui ne contiennent que le domaine ACP dans le module de départ (Loading module). Ces enzymes utilisent différents acides aminés comme starters pour la biosynthèse des macrolactams, (Kudo et al, 2014 ; Miyanaga et al, 2016). Chaque famille de macrolactams à son propre acide aminé starter, et sans la présence de cet acide aminé, la biosynthèse de la molécule ne peut pas avoir lieu (Low et al, 2018). Par exemple, le macrolactam leinamycine, à comme acide aminé starter le D-alanine (Tang et al, 2007). Ces acides aminés starters, sont à l'origine de l'amine secondaire (-NH-) de la fonction amide présente à l'intérieur de cycle de macrolactam.

Afin de déterminer l'acide aminé starter utilisé pour la biosynthèse des kenalactams A-E par la souche CG3, 11 acides aminés différents ont été ajouté séparément au milieu ISP2 modifié liquide (ISP2 sans l'extrait de malt, plus 3% NaCl). Après incubation à 37°C, pendant 14 jours, la biosynthèse des différents kenalactams A-E a été vérifiée dans l'extrait brut méthanolique préparé à partir de chaque acide aminés, par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (Electrospray Ionisation Masse Spectrométrie ou ESIMS). Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 14**.

D'après les résultats représentés dans le **tableau 14**, aucun kenalactams (A-E) n'a été détecté dans l'extrait brut du contrôle négatif (ISP2 sans l'extrait de malt), ce qui indique que l'extrait de malt représente la source des acides aminés starters dans le milieu de culture pour la biosynthèse des kenalactams. Alors que dans le contrôle positif (ISP2 avec l'extrait de malt plus 3% NaCl), les cinq kenalactams (A-E) ont été détectés.

Les deux kenalactams (A et B) apparaissent ensemble quand on utilise les trois acides aminés (lysine, alanine et méthionine) comme seule source d'azote dans le milieu ISP2 modifié, alors quand on utilise l'acide aminé phénylalanine comme seule source d'azote, seul

le kenalactam A est produit. Pour les sept acides aminés restants, aucune des deux kenalactams (A et B) n'a été détectés. Cela implique que les enzymes de biosynthèse des macrolactams de la souche CG3 utilisent les acides aminés (alanine, lysine et méthionine) comme starter pour la biosynthèse des deux kénalactams (A et B).

Les kenalactams C-E, sont biosynthétisés uniquement quand on utilise les deux acides aminés, méthionine et phénylalanine, comme seule source d'azote dans le milieu ISP2 (**figure 57**).

L'acide aminée méthionine est un starter commun entre tous les kénéalactams (A-E), tandis que tous les kenalactams sont produits quand on utilise l'acide aminée phénylalanine, sauf le kenalactam B.

Tableau 14: Résultats de la biosynthèse des kenalactams (A-E) en fonction de l'acide aminé ajouté au milieu ISP2 sans source d'azote.

	Kenalactam A	Kenalactam B	Kenalactam C	Kenalactam D	Kenalactam E
Lysine	+	+	-	-	-
Alanine	+	+	-	-	-
Histidine	-	-	-	-	-
Phénylalanine	+	-	+	+	+
Méthionine	+	+	+	+	+
Proline	-	-	-	-	-
Acide glutamique	-	-	-	-	-
Glycine	-	-	-	-	-
Thréonine	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-
Valine	-	-	-	-	-
Contrôle + : ISP2 avec extrait de malt	+	+	+	+	+
Contrôle - : ISP2 sans extrait de malt	-	-	-	-	-

La souche CG3 a été alimenté par L-Alanine-¹⁵N, afin de confirmer que l'alanine est utilisée comme starter par cette souche pour la biosynthèse de kenalactams A et B. Les résultats de ESIMS obtenus sont représentés dans la **figure 56**.

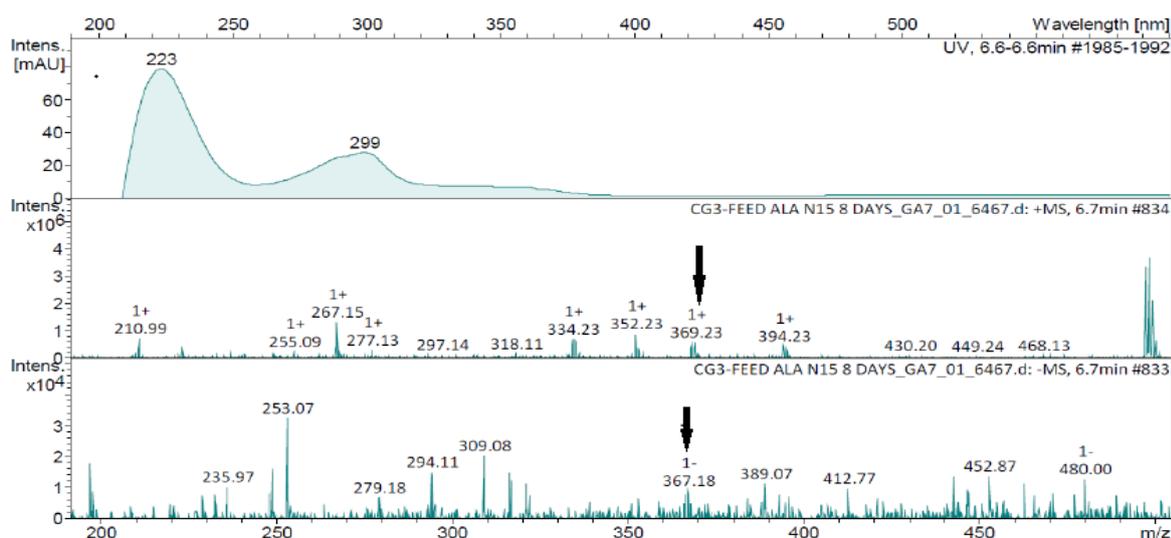
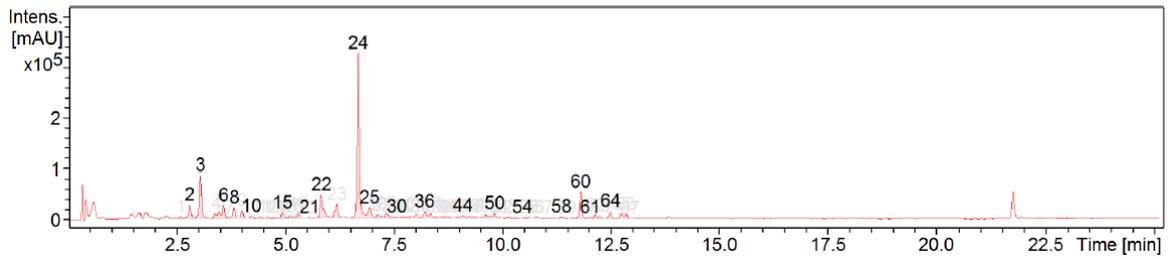


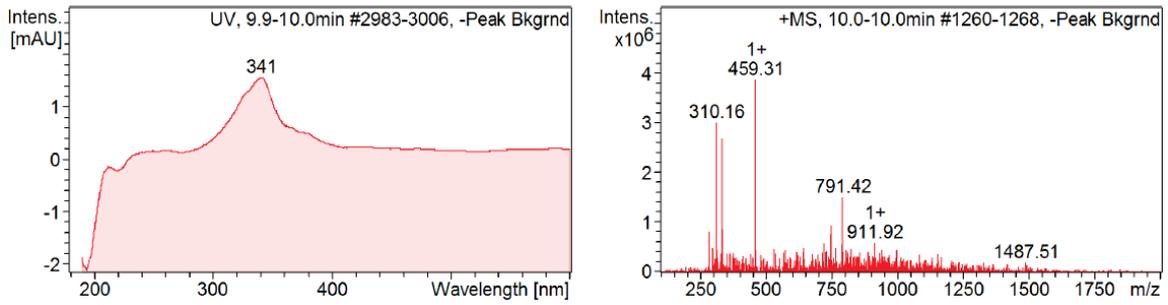
Figure 56 : le spectre de ESIMS de l'expérience de l'alimentation de la souche CG3 par L-alanine- ^{15}N comme seule source d'azotes, qui indique l'augmentation du poids moléculaire de kenalactam A de $m/z = 367$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}^{14}\text{NO}_3$) à $m/z = 368$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}^{15}\text{NO}_3$) (dans le mode positif) ; alors que dans le mode négatif, le poids moléculaire de kenalactam A devient $m/z = 367.18$ $[\text{M}+\text{H}]^-$ pour $\text{C}_{23}\text{H}_{28}^{15}\text{NO}_3$.

D'après la **figure 56**, on remarque une augmentation du poids moléculaire de kenalactam A de $m/z = 367$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}^{14}\text{NO}_3$) à $m/z = 368$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}^{15}\text{NO}_3$), cela est due à l'insertion de ^{15}N de l'alanine- ^{15}N , par les enzymes de la biosynthèse de cette molécule, dans l'amine secondaire (-NH-) de la fonction amide du kenalactam A, donc on peut confirmer par certitude que la souche CG3 utilise l'acide aminé, L-alanine, comme starter pour la biosynthèse de kenalactam A.

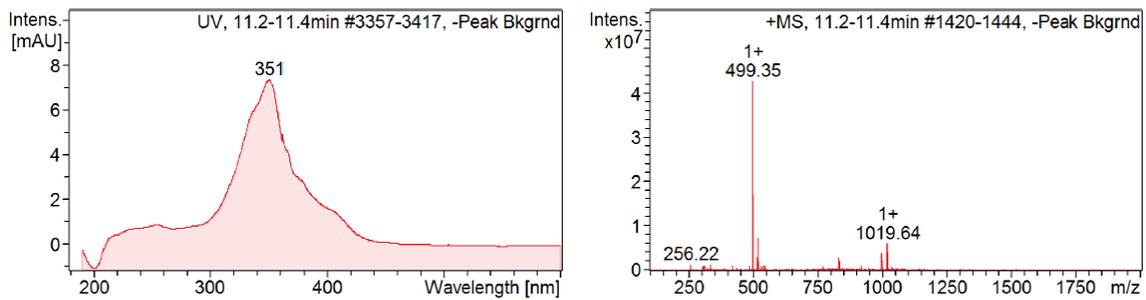
Un autre point qui a attiré notre attention, un métabolite qui possède un poids moléculaire de $m/z = 351$, a été détecté, quand on utilise l'alanine ou la lysine comme seul source d'azote. Cette molécule possède un spectre d'UV-Visible semblable à celle des kenalactams A et B (**figure 58**), et cette molécule doit appartenir à la même famille des kenalactams. La vérification dans la base des données, 'dictionnaire des produits naturels' (CRC press ; Taylor et Francis group), indique qu'il s'agit d'un nouveau métabolite.



Pic numéro 52 : kenalactam C



Pic numéro 58 : kenalactam D



Pic numéro 62 : kenalactam E

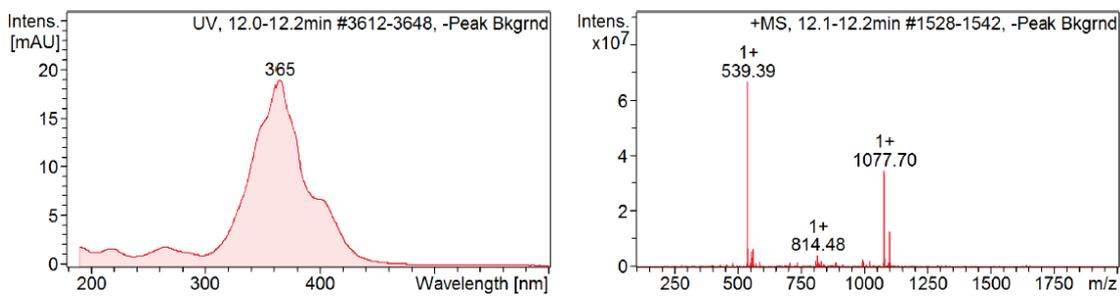


Figure 57: résultats de LC-MS, de l'extrait brut de la souche CG3, préparé après croissance sur le milieu ISP2 avec la méthionine comme source d'azote.

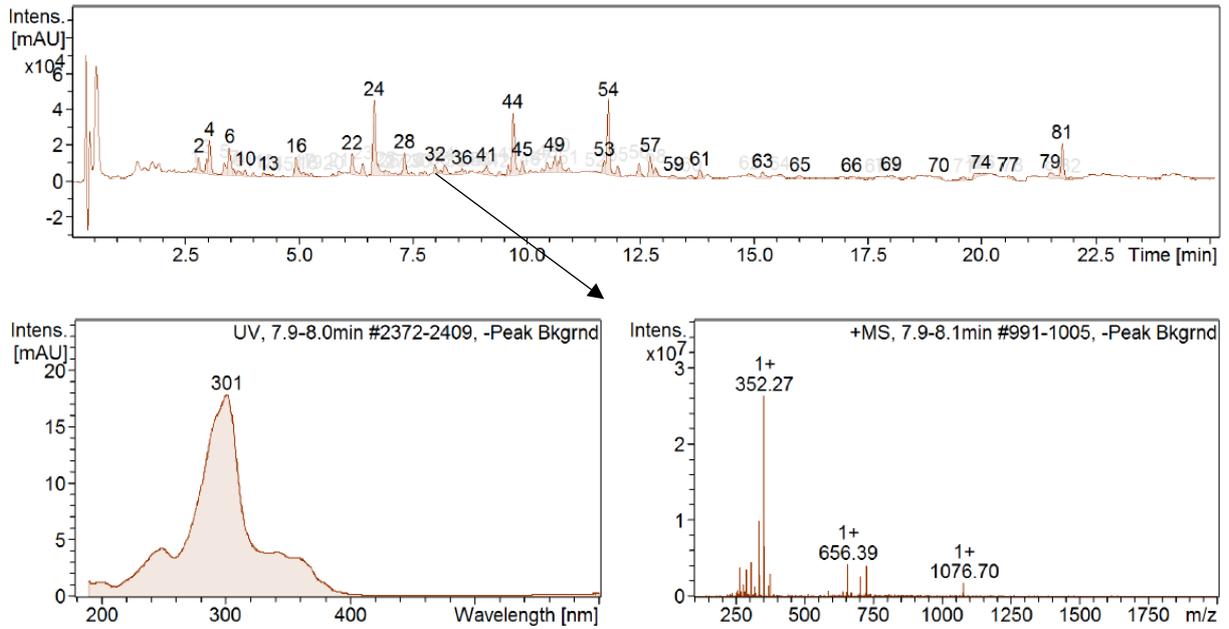


Figure 58: un nouveau kenalactam avec le poids moléculaire de 351 g/mol détecté dans l'extrait brut de milieu ISP2 avec l'alanine comme seul source d'azote.

Pour conclure, on peut dire que la biosynthèse des kenalactams A et B, implique trois acides aminés starter, lysine, alanine et méthionine. Alors que les acides aminés starters utilisés dans la biosynthèse des kenalactams C-D sont soit la méthionine soit la phénylalanine.

Conclusion générale et perspectives

Dans le cadre de notre recherche qui vise à obtenir de nouvelles souches d'actinomycètes qui sont une source de nouvelles molécules bioactives, des échantillons du sol ont été prélevés à partir de deux types d'environnement, les sebkhas et les palmiers dattiers, localisés dans différentes régions de l'Algérie.

Après séchage des échantillons du sol, l'isolement des actinomycètes a été réalisé par l'utilisation de trois milieux de cultures différentes, le milieu caséine amidon agar, le milieu chitine vitamine B et le milieu acide humique vitamine B, avec ou sans l'enrichissement des échantillons du sol par la méthode de réhydratation-centrifugation.

Un totale de 294 colonies d'actinomycètes ont été obtenues à partir des différents échantillons du sol. Le nombre des colonies d'actinomycètes obtenues à partir des échantillons non enrichis est nettement supérieurs (228 colonies) par rapport à celui obtenu à partir des échantillons enrichis par la méthode de centrifugation-hydratation (66 colonies). Cette différence en nombre de colonies est due à la sélectivité de la méthode d'enrichissement appliquée (centrifugation-hydratation) vis-à-vis des actinomycètes qui libèrent des spores mobiles (zoospores).

41 isolats d'actinomycètes ont été sélectionnés, sur la base des critères morphologiques, pour subir une identification moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr16S. Les résultats obtenus ont permis de subdivisé les 41 souches d'actinomycètes sélectionnées en 6 clusters qui appartiennent à neuf (9) genres différents.

Sur la base des résultats de l'identification moléculaire, basée sur le séquençage de l'ADNr16s, nous avons subdivisé les 41 isolats d'actinomycètes sélectionnés en 6 clusters qui appartiennent à neuf (9) genres différents.

- Le premier cluster, regroupe 23 isolats qui appartiennent tous au genre *Streptomyces*.
- Le deuxième cluster, regroupe 10 isolats qui appartiennent tous au genre *Nocardiopsis*.
- Le troisième cluster regroupe 2 isolats qui sont affiliés aux genres *Saccharopolyspora*.
- Le quatrième cluster, regroupe 2 isolats, qui appartiennent aux genres *Actinomadura* et *Actinocorallia*.
- Le cinquième cluster, regroupe 3 isolats qui appartiennent aux genres, *Micromonospora*, *Verrucosipora* et *Couchioplanes*.
- Le sixième cluster, regroupe un seul isolat qui appartient au genre *Planomonospora*.

Parmi les 41 isolats d'actinomycètes identifiés, cinq isolats ont été sélectionnés, CG3, S26, A111, A93, et A79. Ces souches appartiennent respectivement aux genres : *Nocardiosis*, *Saccharopolyspora*, *Couchioplanes*, *Verrucosispora* et *Planomonospora*. Ces isolats ont été sélectionnés pour deux raisons :

- (i) ils appartiennent tous à des genres rares d'actinomycètes, et leur métabolisme secondaire est peu exploité.
- (ii) ils sont probablement de nouveaux taxons (nouvelles espèces ou même, nouveau genre), puisque leur pourcentage de similarité est relativement bas avec les espèces les plus proches, excepté l'isolat S26.

L'étude taxonomique partielle, ainsi que l'analyse des extraits bruts méthanoliques, par HPLC couplé à la spectrométrie de masse (HRESIMS), des cinq isolats (CG3, S26, A111, A93, A79), nous a permis de sélectionner la souche CG3, parce qu'elle remplit tous les critères recherchés. Cette souche a été isolée à partir du sol de la sebkha de Kenadsa, wilaya de Béchar (sud-ouest Algérien), par l'utilisation du milieu caséine amidon agar.

Les résultats de l'hybridation ADN-ADN, entre l'isolat CG3 et l'espèce la plus proche, *Nocardiosis rosea*, indiquent que cette souche est une nouvelle espèce dans le genre *Nocardiosis*. Pour cela une caractérisation complète, par l'approche polyphasique, a été effectuée pour l'isolat CG3. Le nom *Nocardiosis becharensis* **sp. nov** a été proposé pour nommer la nouvelle souche CG3.

L'extraction, purification et la caractérisation des métabolites secondaires sécrétés par la nouvelle espèce **CG3**, par l'utilisation des différentes techniques chromatographiques (LH20 et HPLC préparatif) et spectrales (spectrométrie de masse et RMN), a permis l'obtention de cinq nouvelles molécules, nommées **kenalactams A-E**. Ces nouvelles molécules appartiennent à la classe de **macrolactams polyéniques**.

Les nouvelles kenalactams A-E, ont été testé pour évaluer leur activité biologique. En effet, les kenalactams C et D ont montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, avec des valeurs de CMI variant entre (16.7 à 66.7) µg/ml, alors que seul le kenalactam C qui a montré une activité antifongique contre la levure *Candida albicans* (CMI 66.66 µg/mL) et la moisissure *Mucor hiemalis* (CMI 66.66 µg/mL).

Pour l'activité cytotoxique, les deux kenalacams C et D, ont montré une modeste activité contre les différentes lignées cellulaires testées.

Par contre, le kenalactam E a montré une activité cytotoxique contre les quatre lignées cellulaires testées (KB3.1, PC-3, SKOV-3 et A549). L'activité la plus forte a été enregistré contre la lignée PC-3 ou 'Human prostate cancer' avec une valeur de IC50 de 2.1 μ M.

Les enzymes de la biosynthèse des différents macrolactams, dont la nouvelle famille des molécules (kenalactams A-E), utilisent différents acides aminés comme starters. Afin de déterminer l'acide aminé starter utilisé dans la biosynthèse de la nouvelle famille de macrolactam, kenalactams A-E, 11 acides aminés différents ont été testés comme seule source d'azotes dans le milieu ISP2 (sans source d'azotes) +3 % NaCl. Les résultats indiquent que les kenalactams A et B sont synthétisés uniquement quand on utilise les acides aminés, lysine, alanine et méthionine comme source d'azote. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation de l'acide aminé L-alanine -¹⁵N comme seule source d'azote, après extraction et analyse de l'extrait brut, le poids moléculaire de kenalactam A est passé de m/z (367) à m/z (368).

Cependant, les kenalactams C-E, sont biosynthétisés uniquement quand on utilise les deux acides aminés, méthionine et phénylalanine, comme seule source d'azote dans le milieu ISP2.

Comme perspective de notre travail :

- Poursuive l'isolement et le criblage des souches d'actinomycetes isolées du sol de Sahara algérien, afin de trouver d'autres nouveaux taxons, qui peuvent être la source de nouvelles molécules bioactives.
- Poursuivre la caractérisation taxonomique complète des souches, A111, A93, A79, qui ont montré un pourcentage de similarité relativement bas, après séquençage de leur ADNr16s, par rapport aux espèces de références les plus proches.
- Il serait intéressant d'améliorer la structure de kenalactam E, par l'ajout de certains radicaux au squelette carboné de cette molécule, dans le but d'améliorer leur activité surtout contre la lignée cellulaire cancéreuse, PC-3 ou 'Human prostate cancer'. Ainsi, il faut approfondir les études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, de kenalactam E, dans le but de développer cette molécule comme médicament pour le traitement de cancer de prostate.
- Il serait important d'exploiter l'activité biologique des kenalactams A-E, surtout contre des parasites qui provoquent des maladies humaines (par exemple, *Leishmania major*, ou *Trypanosoma brucei*), ainsi que contre des virus ou même contre les insectes qui touchent les plantes, dans le but de chercher d'autre activité biologique.

Références Bibliographiques

A

1. Adam, D; Maciejewska, M; Naômé, A; Martinet, L; Coppieters, W; Karim, L; Baurain, D, Rigali, S. Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Hard-to-Culture Actinobacteria from Cave Moonmilk Deposits. *Antibiotics*. 2018; 7(2): 28.
2. Ahmad, M.S; El-Gendy, A.O; Ahmed, R.R; Hassan, H.M; ElKabbany, H.M; Merdash, A.G. Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AGM12-1 isolated from Egyptian soil. *Front. Microbiol.* 2017; 13: 438.
3. Al-Dhabi, N.A; Ghilan, A.-K.M; Arasu, M.V. Characterization of Silver Nanomaterials Derived from Marine *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-87 and Its In Vitro Application against Multidrug Resistant and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Clinical Pathogens. *Nanomaterials*. 2018; 8: 279.
4. Alharbi, N.S. Novel bioactive molecules from marine actinomycetes. *Biosci Biotech Res Asia*. 2016; 13 (4): 1905–1927.
5. Alyaa , I; Attia E. Z; Hajjar, D; Anany, M. A; Desoukey, S. Y; Fouad, M. A; Kamel, M. S; Wajant, H; Gulder, T; Abdelmohsen, U. New cytotoxic cyclic peptide from the marine sponge-associated *Nocardiosis* sp. UR67. *Mar Drugs*. 2018. 16:9.
6. Ammermann, J; Schmidt, T; Donner, J; Reck, M; Dalton, M; Stumpp, N; Stiesch, M; Wagner-Döbler, I; Kirschning, A. The carolactam strategy is ineffective: synthesis and biological evaluation of carolactam. *Org. Biomol. Chem.* 2017; 15: 8553.
7. Anandan, R; Dharumadurai, D; Manogaran, G. P. An Introduction to Actinobacteria. In: Dhanasekaran D, Jiang Y (eds) *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. Rijeka: Intech; 2016. p. 3-37.
8. Anwar, S; Ali, B; Sajid, I. Screening of rhizospheric actinomycetes for various in-vitro and in-vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Front Microbiol.* 2016; 7:1334.
9. Aouiche, A; Bouras, N; Mokrane, S; Zitouni, A; Schumann, P; Spröer, C; Sabaou, N; Klenk, H.P. *Actinokineospora mzabensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015; 107: 291–296.
10. Arocha-Garza, H. F; Castillo, R. C.-D; Eguiarte, L. E; Souza, V; De la Torre-Zavala, S. High diversity and suggested endemicity of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ* 5:e3247. 2017.
11. Aslam, B; Wang, W; Arshad, M.I; Khurshid, M; Muzammil, S; Rasool, M.H, et al. Antibiotic 329 resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018; 11: 1645-58.
12. Athira, K; Keerthi, T. Co-Culture as the Novel Approach for Drug Discovery from Marine Environment. *Nov Appro Drug Des Dev.* 2017; 2 (4): 1-4.

B

13. Bachmann, B.O; Ravel, J. Methods for In Silico Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data. *Methods in Enzymology*. 2009; 458: 181-217.
14. Badji, B; Zitouni, A; Mathieu, F; Lebrihi, A; Sabaou, N. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104, isolated from an Algerian Saharan soil. *Can J Microbiol*. 2006 ; 52: 373– 382.
15. Bambeke Van, F. J; Verhaegen, D; Tyteca, R; Auckenthaler, P.M. *Tulkens*, louv.med, 2000; 119: 259.
16. Barajas. J.F; Blake-Hedges, J.M; Bailey, C.B; Curran. S; Keasling, J.D. Engineered polyketides: synergy between protein and host level engineering. *Synth. Syst. Biotechnol*. 2017 ; 2 : 147-166.
17. Barka, E.A; Vatsa, P. Sanchez, L; Gaveau-Vaillant, N; Jacquard, C; Meier-Kolthoff, J. P. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2016; 25 (80) 1–43.
18. Barke, J; Seipkel, R.F; Gruschow, S; Heavens, D; Drou, N; Bibb, M.J; Goss, R.J; Yu, D.W; Hutchings, M.I. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol*. 2010; 8:109.
19. Becker, B; Lechevalier, M.P; Gordon, R.E; Lechevalier, H.A. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol*. 1964; 12: 421–423.
20. Beemelmans, C; Ramadhar, T.R; Kim, K.H; Klassen, J.L; Cao, S; Wyche, T.P; Hou, Y; Poulsen, M; Bugni, T.S; Currie, C.R; et al. Macrotermycins A–D, glycosylated macrolactams from a termite-associated *Amycolatopsis* sp. M39. *Org. Lett*. 2017; 19: 1000–1003.
21. Behie, S. W; Bonet, B; Zacharia, V. M; McClung, D. J; Traxler, M. F. Molecules to ecosystems: actinomycete natural products *in situ*. *Front. Microbiol*. 2017. 7: 2149.
22. Belchior, E; Henry, S; Badell, E; Collet, L; Benoit-Cattin, T; De Montera, A, et al. Diphtheria in Mayotte, 2007-2015. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 1218–20.
23. Bender, C. L; Alarcon-Chaidez, F; Gross, D. C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, biosynthesis by peptide and polyketide synthases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 1999; 63: 266–292.
24. Bennur, T; Kumar, A. R; Zinjarde, S; Javdekar, V. *Nocardiosis* species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiol Res*. 2015; 174: 33–47.
25. Bhattacharya, B; Mukherjee, S. Cancer Therapy Using Antibiotics. *Journal of Cancer Therapy*. 2015; 6: 849-858.

26. Boonsongcheep, P; Nakashima, T; Takahashi, Y; Prathanturarug, S. Diversity of endophytic actinomycetes isolated from roots and root nodules of *Pueraria candollei* Grah. ex Benth. and the analyses of their secondary metabolites. *Chiang Mai. J. Sci.* 2017; 44: 1–14.
27. Boubetra, D; Zitouni, A; Bouras, N; Schumann, P; Spröer, C; Klenk, H.P; Sabaou, N. *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65: 1316–1320.
28. Boudjelal, F; Zitouni, A; Bouras, N; Schumann, P; Spröer, C; Sabaou, N; Klenk, H, P. *Actinoalloteichus hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015 ; 65: 2006–2010.
29. Boudjella, H; Zitouni, A; Coppel, C; Mathieu, F; Monje, M.C; Sabaou, N; Lebrihi, A. Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J Antibiot.* 2010; 63: 709–711.
30. Bouras, N; Meklat, A; Zitouni, A ; Mathieu, F; Schumann, P; Spröer, C; Sabaou, N; Klenk, H, P. *Nocardiopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2015; 107: 313–320.
31. Bouznada, K; Bouras, N; Mokrane, S; Chaouch, F.C; Zitouni, A; Pötter, G; Spröer, C; Klenk, H.P; Sabaou, N. *Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2017; 110: 399–405.
32. Braña, A.F; Sarmiento-Vizcaíno, A; Pérez-Victoria, I; Otero, L; Fernández, J; Palacios, J.J; Martín, J; De La Cruz, M; Díaz, C; Vicente, F; et al. Branimycins B and C, antibiotics produced by the abyssal actinobacterium *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227. *J. Nat. Prod.* 2017 ; 80 : 569–573.
33. Brinkmann, C; Marker, A; Kurtböke, D. An Overview on Marine Sponge-Symbiotic Bacteria as Unexhausted Sources for Natural Product Discovery. *Diversity.* 2017; 9: 40.
34. Buedenbender, L; Carroll, A.R; Ekins, M; Kurtböke, D.Í. Taxonomic and Metabolite Diversity of Actinomycetes Associated with Three Australian Ascidians. *Diversity.* 2017; 9: 53.

C

35. Caboche, S; Leclere, V; Pupin, M; Kucherov, G; Jacques, P. *Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity.* *J. Bacteriol.* 2010; 192: 5143–5150.
36. Cane D. E; Walsh C. T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol.* 1999; 6 (12): R319-25.
37. Cane, D.E. Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 27517–27523.
38. Cataland, S.R; Kourlas, P.J; Yang, S. Cyclosporine or steroids as an adjunct to plasma exchange in the treatment of immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv.* 2017; 1:2075.

39. Chaabane, C.F; Bouras, N; Mokrane, S; Bouznada, K; Zitouni, A; Potter, G; et al. *Planomonospora algeriensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a Saharan soil of Algeria. *Anton. Van Leeuw.* 2017; 110 (2): 245-252.
40. Chaurasia, A; Meena, B.R; Tripathi, A.N; Pandey, K.K; Rai, A.B; Singh, B. Actinomycetes: An unexplored microorganism for plant growth promotion and biocontrol in vegetable crops. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 34: 132.
41. Chen, H; Du, L. Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100 (2): 541–557.
42. Chen, P; Zhang, L; Guo, X; Dai, X; Liu, L ; Xi, L ; et al. Diversity, biogeography, and biodegradation potential of actinobacteria in the deep-sea sediments along the deep sea sediments along the Southwest Indian Ridge. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1340.
43. Čihák, M; Kameník, Z; Šmídová, K; Bergman, N; Benada, O; Kofroňová, O; Petříčková, K; Bobek, J. Secondary metabolites produced during the germination of *Streptomyces coelicolor*. *Front Microbiol.* 2017.
44. Cissoko M; Hocher. V; Gherbi, H. Actinorhizal signaling molecules: Frankia root hair deforming factor shares properties with NIN inducing factor. *Front Plant Sci.* 2018.
45. Cornejo, J; Pokrant, E; Krogh, M; Briceño, C; Hidalgo, H; Maddaleno, A. Determination of oxytetracycline and 4-epi-oxytetracycline residues in feathers and edible tissues of broiler chickens using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Food Prot.* 2017; 80: 619–625.
46. Cumsille, A; Undabarrena, A; Gonzalez, V; Claverias, F; Rojas, C; Camara, B. Biodiversity of actinobacteria from the South Pacific and the assessment of *Streptomyces* chemical diversity with metabolic profiling. *Mar. Drugs.* 2017; 15: E286.

D

47. Dhakal, D; Pokhrel, A.R; Shrestha, B; Sohng, J.K. Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1106–1118.
48. Dhakal, D; Sohng, J.K; Pandey, R.P. Engineering actinomycetes for biosynthesis of macrolactone polyketides. *Microb. Cell Fact.* 2019; 18: 137.
49. Ding, T; Yang, L.J; Zhang, W. D; Shen. Y. H. The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. *RSC Advances.* 2019; 38. 9: 21964–21988.
50. Driche, E,H ; Belghit, S ; Bijani, C ; Zitouni, A ; Sabaou, N ; Mathieu, F ; Badji, B. A new *Streptomyces* strain isolated from Saharan soil produces di-(2-ethylhexyl) phthalate, a metabolite active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Microbiol.* 2015; 65: 1341–1350.

51. Duraipandiyan, V; Al-Dhabi, N.A; Ignacimuthu, S. New antimicrobial anthraquinone 6,61-bis (1,5,7-trihydroxy-3-hydroxymethylanthraquinone) isolated from *Streptomyces* sp. isolate ERI-26. Saudi J. Biol. Sci. 2016; 23: 731–735.

E, F

52. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783–791.
53. Fisch, K. M. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS-NRPS. *RSC Adv*. 2013; 3(40):18228–18247.

G

54. Gao, H; Huang, G. Synthesis, anticancer activity and cytotoxicity of galactosylated epothilone B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018; 26 (20): 5578-5581.
55. Gehring, A. M; Mori, I; Perry, R. D; Walsh, C. T. The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*. 1998; 37(33): 11637-11650.
56. Golinska, P; Wypij, M; Agarkar, G; Rathod, D; Dahm, H; Rai, M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015; 108: 267–289.
57. Goodfellow, M. Order XV. *Streptosporangiales* ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012a: 1805. Edited by by M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig & W. B. Whitman. 2nd edn. New York: Springer.
58. Goodfellow, M; Quintana, E. T. *Streptosporangiaceae*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015: 1–10.
59. Goodfellow, M; Stach, J.E; Brown, R; Bonda, A.N; Jones, A.L; Mexson, J; Fiedler, H.P; Zucchi, T.D; Bull, A.T. *Verrucosipora maris* sp. nov., a novel deep-sea Actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012b; 101: 185–193.
60. Goodman, C.D; Useglio, M; Peiru, S; Labadie, G.R; McFadden, G.I; Rodriguez, E, et al. Chemobiosynthesis of new antimalarial macrolides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57: 907–13.
61. Gos, F; Savi, D.C; Shaaban, K.A; Thorson J.S; Aluizio, R; Possiede Y.M., et al. Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Front. Microbiol*. 2017; 8: 1642.
62. Grasso, L; Delia Chillura Martino D.C; Alduina, R. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. In: Dhanasekaran D, Jiang Y, eds. *Actinobacteria - basics and biotechnological applications*. Croatia: InTech (European Union). 2016: 3–37.

H

63. Hasegawa, T; Takizawa, M; Tanida, S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol.* 1983; 29: 319–322.
64. Hayakawa, M; Iino, H; Takeuchi, S; Yamazaki, T. Application of a method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil. *J. Ferm. Bioeng.* 1997; 84: 599–602.
65. Hayakawa, M; Kajiura, T; Nonomura, H. New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil. *J. Ferm. Bioeng.* 1991b; 72: 327–333.
66. Hayakawa, M; Nonomura, H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* 1987; 65: 501–509.
67. Hayakawa, M; Otaguro, M; Takeuchi, T; Yamazaki, T; Iimura, Y. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000; 83: 107–116
68. Hayakawa, M; Sadakata, T; Kajiura, T; Nonomura, H. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil *J. Ferm. Bioeng.* 1991a; 72: 320–326.
69. Hayakawa, M; Tamura, T; Nonomura, H. Selective isolation of Actinoplanes and *Dactylosporangium* from soil by using gamma-collidine as the chemoattractant. *J. Ferm. Bioeng.* 1991c; 72: 426–432
70. He, Song-Tao. et al. Biogeography of *Nocardiosis* strains from hypersaline environments of Yunnan and Xinjiang Provinces, western China. *Sci.Rep.* 2015; 5: 13323.
71. Heine, D, et al. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. *Nature Communications.* 2018; 9.
72. Hopwood, D.A. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem Rev.* 1997; 97 (7): 2465–2498.
73. Hoshino, M; Okada, T; Awakawa, S; Asamizu, H; Onaka. *Org. Lett.* 2017; 19: 4992–4995.
74. Hoza, A.S; Mfinanga, S.G.M; Rodloff, A.C; Moser, I; König, B. Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern, Tanzania: public health and diagnostic implications for control programmes. *BMC Res Notes.* 2016; 9 (1): 109.

I, J

75. Ibrahim, A.H; Desoukey, S.Y; Fouad, M.A; Kamel, M.S; Gulder, T.A; Abdelmohsen, U.R. Natural Product Potential of the Genus *Nocardiosis*. *Mar. Drugs.* 2018; 16: 147.
76. Indraningrat, A; Smidt, H; Sipkema, D. Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. *Mar. Drugs.* 2016; 14: 87.
77. Jami, M; Ghanbari, M; Kneifel, W, Domig, K.J. Phylogenetic diversity and biological activity of culturable actinobacteria isolated from freshwater fish gut microbiota. *Microbiol Res.* 2015; 175: 6–15.

78. Jensen, P.R. et al. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Nat. Prod. Rep.* 2015; 32: 738–751.
79. Jiang, C; Song, J; Zhang, J; Yang, Q. New production process of the antifungal chaetoglobosin A using cornstalks. *Braz J Microbiol.* 2017; 48 (3): 410-418.
80. Jiang, Y; Li, Q; Chen, X ; Jiang, C. “Isolation and cultivation methods of Actinobacteria,” in *Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications*, ed. D. Dhanasekaran (Rijeka: InTech). 2016: 39–57.
81. Jose, P.A; Jebakumar, S.R.D. Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 242.
82. Jukes, T.H; Cantor, C.R. Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian protein metabolism*. Academic: New York. 1969. 21–132.

K

83. Kadiri S. K; Yarla N. S; Vidavalur S. Screening and isolation of antagonistic actinobacteria associated with marine sponges from Indian coast. *J. Microb. Bioch. Technol.* 2014; 8: 1–3.
84. Kamjam, M; Sivalingam, P; Deng, Z; Hong, K. Deep sea actinomycetes and their secondary metabolites. *Front Microbiol.* 2017; 8:7 60.
85. Kang, D; Kirienko, D.R; Webster, P; Fisher, A.L; Kirienko, N.V. Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. *Virulence.* 2018; 9: 804–817
86. Karničar, K; Drobnak, I; Petek, M; Magdevska, V; Horvat, J; Vidmar, R; Baebler, S; Rotter, A; Jamnik, P; Fujs et al. Integrated omics approaches provide strategies for rapid erythromycin yield increase in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microb Cell Fact.* 2016; 15: 93.
87. Keating, T.A; Walsh, C.T. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr Op Chem Biol.* 1999; 3 (5): 598–606.
88. Kemami Wangun, H.V; Hertweck, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridine alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. *Org Biomol Chem.* 2007; 5: 1702-1705.
89. Kim, J; Shin, D; Kim, S.H; Park, W; Shin, Y; Kim, W.K; Lee, S.K; Oh, K.B; Shin, J; Oh, D.C. Borrelidins C–E: New Antibacterial Macrolides from a Saltern-Derived Halophilic *Nocardiopsis* sp. *Mar. Drugs.* 2017; 15: e166.
90. Kim, M; Oh, H.S; Park, S.C; Chun, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64: 346–351.
91. Kim, S.B; Goodfellow, M. *Saccharopolyspora*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015. 1–30.

92. Kim, Y.R; Park, S; Kim, T.S; Kim, M.K; Han, J.H; Joung, Y; Kim, B. Draft genome sequence of *Streptacidiphilus oryzae* TH49T, an acidophilic actinobacterium isolated from soil. *Genome Announc.* 2015; 3: e00703-15.
93. Kim, Y; Ogura, H; Akasaka, K; Oikawa, T; Matsuura, N; Imada, C; Yasuda, H; Igarashi, Y. Nocapyrones: α - and γ -pyrones from a marine-derived *Nocardiopsis* sp. *Mar. Drugs.* 2014; 12: 4110–4125.
94. Kittila, T; Cryle, M. J. An enhanced chemo-enzymatic method for loading substrates onto carrier protein domains. *Biochemistry and Cell Biology.* 2017; 96 (3): 372-379
95. Kononen, E; Wade, W.G. Actinomyces and related organisms in human infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28: 419–42.
96. Kotoda, N; Shin-ya, K; Furihata, K; Hayakawa, Y; Seto, H. Isolation and structure elucidation of novel neuronal cell protecting substances, carbazomadurins A and B produced by *Actinomadura madurae*. *J Antibiot.* 1997; 50: 770–772.
97. Kroppenstedt, R.M; Goodfellow, M. The family *Thermomonosporaceae*: *Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Spirillispota* and *Thermomonospora*. In: Dworkin M, Falkow S, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The prokaryotes*, 3rd edn, vol 3, Archaea and Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer, New York. 2006: 682–72.
98. Kudo, F; Miyanaga, A; Eguchi, T. Biosynthesis of natural products containing β -amino acids. *Natural Product Reports.* 2014; 31: 1056–1073.
99. Kumar, R, R; Jadeja, V, J. Isolation of Actinomycetes: a complete approach. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2016; 5 (5): 606–618.
100. Kurzawa, K; Harms, U; Koert. Stereoselective Synthesis of the Benzodihydropentalene Core of the Fijiolides. *Org. Lett.* 2018; 20: 1388-1391.

L

101. Labeda, D.P. Transfer of the type strain of *Streptomyces erythreus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov. and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythraeus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987; 37: 19–22.
102. Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley. 1991.
103. Lechevalier, H.A; Lechevalier, M.P. A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena. 1970: 393–405.
104. Lee, L.H; Chan, K.G; Stach, J, et al. Editorial: The Search for Biological Active Agent(s) From Actinobacteria. *Front Microbiol.* 2018; 9: 824.

105. Li, H.Q; Zhang, S; Li, Y; Zhu, G; Zhang, H; Zhang, X; Tian, S; Zhang, J; Ju and C. Zhang. Identification and characterization of xiamycin A and oxiamycin gene cluster reveals an oxidative cyclization strategy tailoring indolosesquiterpene biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134: 8996–9005
106. Li, L; Cai, Y; Jiang, Y; Liu, J; Ma, J; Yuan, C; Mu, Y; Han, L; Huang, X. A unique macrolactam derivative via a [4+6]-cycloaddition from *Streptomyces niveus*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26 (6): 1599–604.
107. Li, Q; Chen, X; Jiang, Y; Jiang, C. Morphological identification of actinobacteria. In *Actinobacteria—Basics and Biotechnological Applications*; Dhanasekaran, D., Jiang, Y., Eds.; InTech: Rijeka, 2016.
108. Li, W.J; Kroppenstedt, R. M; Wang, D; Tang, S.K; Lee, J.C; Park, D.J; Kim, C.J; Xu, L.H. Jiang, C.L. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56, 1089–1096.
109. Limaye, L; Patil, R; Ranadive, P; Kamath, G. Application of potent actinomycete strains for bio-degradation of domestic agro-waste by composting and treatment of pulp-paper mill effluent. *Adv Microbiol.* 2017; 7: 94–108.
110. Lin, Q.S; Chen, S.H; Hu, M.Y; Rizwan-ul-Haq, M; Yang, L; Li, H. Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-S-01 from wastewater sludge. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2011 ; 8 : 45–56.
111. Lin, W, S; Mandal, D; Degen, Y; Liu, Y.W; Ebright, S; Li, Y; Feng, Y; Zhang, S; Mandal, Y; Jiang, S; Liu, M; Gigliotti, M; Talaue, N; Connell, K; Das, E; Arnold, R.H; Ebright Structural basis of *Mycobacterium tuberculosis* transcription and transcription inhibition. *Mol Cell.* 2017; 66: 169-179.
112. Lindenfelser, L.A; Shotwell, O.L; Bachler, M.J; Shannon, G.M; Pridham, T.G. Antibiotics against plant disease: VIII. screening for nonpolyenic antifungal antibiotics produced by streptomycetes. *Appl Microbiol.* 1964; 12 (6): 508-12.
113. Liu, S. W ; Tuo, L ; Li, X. J ; Li, F. N ; Li, J ; Jiang, M. G ; et al. Mangrovihabitans endophyticus gen. nov., sp. nov., a new member of the family Micromonosporaceae isolated from *Bruguiera sexangula*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017; 67: 1629–1636.
114. Low, Z. J; Pang, L. M; Ding, Y; Cheang, Q. W ; Le Mai Hoang, K ; Thi Tran, H ; et al. Identification of a biosynthetic gene cluster for the polyene macrolactam sceliphrolactam in a *Streptomyces* strain isolated from mangrove sediment. *Sci. Rep.* 2018; 8: 1594.
115. Lowell, A.N; DeMars MD 2nd; Slocum, S.T; Yu, F; Anand, K; Chemler, J.A; Korakavi, N; Priessnitz, J.K; Park, S.R; Koch, A.A et al. Chemoenzymatic total synthesis and structural diversification of tylactone-based macrolide antibiotics through late-stage polyketide assembly, tailoring, and C-H functionalization. *J Am Chem Soc.* 2017; 139: 7913-7920.

116. Lu, J; He, Q; Huang, L, et al. Accumulation of a Bioactive Benzoisochromanequinone Compound Kalafungin by a Wild Type Antitumor-Medermycin-Producing *Streptomyces* Strain, *PLoS One*. 2015; 10 (2): e0117690.

M

117. Mahmoud, H.M.; Kalendar, A.A. Coral-associated actinobacteria: diversity, abundance, and biotechnological potentials. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 204.
118. Malla, S; Niraula, N.P; Singh, B; Liou, K; Sohng, J.K. Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. *Microbiol. Res.* 2010; 165: 427–435.
119. Mao, D.N; Okada, B.K; Wu, Y, H. F; Xu, M.R. Seyedsayamdost, Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* 2018; 45: 156–163.
120. Martínez-Núñez, M. A; López, V. E. L. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sust. Chem. Proc.* 2016; 4: 13.
121. Matsumoto, A; Takahashi, Y. Endophytic actinomycetes: Promising source of novel bioactive compounds. *J. Antibiot.* 2017; 70: 514–519.
122. Mazkour, S; Hosseinzadeh, S; Shekarforoush, S.S. Evidence of heat-resistant microorganisms with a special emphasis on filamentous Actinomycetes in hyper-arid soils of Gandom Beryan area, Lut Desert, Iran. *IJM.* 2017; 9: 331–337.
123. Meier-Kolthoff, J.P; Göker, M; Spröer, C; Klenk, H.P. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy. *Arch Microbiol.* 2013; 195: 413–418.
124. Meij, A.V.D; Worsley, S.F; Hutchings, M.I; Van Wezel, G.P. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017; 41: 392–416.
125. Merrouche, R; Bouras, N; Coppel, Y; Mathieu, F; Monje, M.C; Sabaou, N; Lebrihi, A. Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Products.* 2010; 73: 1164–1166.
126. Mertz, F.P. *Planomonospora alba* sp. nov. and *Planomonospora sphaerica* sp. nov., two new species isolated from soil by baiting techniques. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44: 274–281.
127. Meslet-Cladière, L ; Delage, L ; Leroux C.J.J et al. Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis. *The Plant Cell.* 2013; 25: 3089-3103.
128. Messaoudi, O; Bendahou, M; Benamar, I; Abdelwouhid, D, E. Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2015, 5, 438–445.

129. Messaoudi, O; Sudarman, E; Bendahou, M; Jansen, R; Stadler, M; Wink, J. Kenalactams A-E, Polyene Macrolactams Isolated from *Nocardiosis* CG3. *J Nat Prod.* 2019; 82 (5): 1081-1088.
130. Miller. B.R, A.M. Gulick Structural biology of non ribosomal peptide synthetases. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1401: 3-29.
131. Minnikin, D. E ; O'Donnell, A. G ; Goodfellow, M. ; Alderson, G ; Athalye, M.; Schaal, A ; Parlett, J. H. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods.* 1984; 2: 233–241.
132. Minnikin, D.E; Collins, M. D. Goodfellow, M. Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J Appl Bacteriol.* 1979; 47: 87–95.
133. Miyanaga, A; Kudo, F; Eguchi T. Mechanisms of β -amino acid incorporation in polyketide macrolactam biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016; 35: 58–64.
134. Mohamed, H; Miloud, B; Zohra, F, et al. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. *Int J Mol Cell Med.* 2017; 6: 109–20.
135. Mohamed, H; Miloud, B; Zohra, F; García-Arenzana, J.M; Veloso, A; Rodríguez-Couto, S. Isolation and characterization of actinobacteria from Algerian Sahara soils with antimicrobial activities. *Int J Mol Cell Med.* 2017; 6 (2): 109-120.
136. Mohamedin, A.H. Isolation, Identification and some cultural conditions of protease producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *Int Biodeterior Biodegradation.* 1999; 43: 13-21.
137. Mootz, H.D; Schwarzer, D; Marahiel, M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, 2002 ; 3 (6): 490-504.
138. Mukhtar, S; Zaheer, A. Aiysha D, Malik, K.A and Mehnaz, S. Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics.* 2017; 10: 12.
139. Müller, C.A; Oberauner-Wappis, L; Peyman, A; Amos, G.C.A; Wellington, E.M.H; Berg, G. Mining for nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase genes revealed a high level of diversity in the Sphagnum bog metagenome. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81: 5064 – 5072.
140. Mulwa, L.S; Jansen, R; Praditya, D.F; Mohr, K.I; Wink, J; Steinmann, E; Stadler, M. *Molecules.* 2018; 23: 542.

N, O, P

141. Nazaré, M; Waldmann, H. Synthesis of the (9S,18R) diastereomer of cyclamenol A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000; 39: 1125-1128.

142. Nguyen, T.B; Kitani, S; Shimma, S; Nihira, T. Butenolides from *Streptomyces albus* J1074 act as external signals to stimulate avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. Appl. Environ. Microbiol. 2018; 84: e02791-17.
143. Oh, D. C; Poulsen, M; Currie, C. R; Clardy, J. Sceliphrolactam, a Polyene Macrocyclic Lactam from a Wasp-Associated *Streptomyces* sp. Org. Lett. 2010; 13: 752–755.
144. Okada, B.K; Seyedsayamdost, M.R. Antibiotic dialogues: induction of silent biosynthetic gene cluster by exogenous small molecules. FEMS Microbiol Rev. 2017; 41: 19–33.
145. Panche, A.N; Diwan, A. D; Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. Journal of nutritional science. 2016; 5: e47.
146. Patel, T; Saraf, M. Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their in vitro plant growth-promoting efficacy. J. Plant Interact. 2017;12.
147. Pochon, J; Tardieux, P. Analytical Techniques of Soil Microbiology. St-Mandé: Tourtoureille. 1962. 111.
148. Poomthongdee, N; Duangmal, K; Pathom- Aree, W. Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants. J Antibiot. 2014; 10: 1038-117.

Q, R

149. Qin, S; Li, W.J; Dastager, S.G; Hozzein, W.N. Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles and Environmental Adaptations. Frontiers Media. 2016; 7: 1415.
150. Raju, R; Piggott, A.M; Quezada, M; Capon, R.J. Nocardiopepsins C and D and nocardiopepsin A: new polyketides from an Australian marine-derived *Nocardiopepsis* sp. Tetrahedron. 2013; 69: 692–698.
151. Ram, L. Optimization of medium for the production of Streptomycin by *Streptomyces griseus*. Int J Pharmaceut Sci Invention. 2014; 3: 1-8.
152. Ranjani, A; Dhanasekaran, D; Gopinath, P.M. An introduction to actinobacteria. In: Dhanasekaran D, Jiang Y, eds. Actinobacteria - basics and biotechnological applications. Croatia: InTech (European Union). 2016: 3–37.
153. Riquelme, C; Hathaway, J. J. M; Dapkevicius, M., de, L. N. E; Miller, A. Z; Kooser, A; et al. Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. Front. Microbiol. 2015; 6: 1342.
154. Romano, I ; Lama, L ; Nicolaus, B ; Poli, A ; Gambacorta, A ; Giordano, A. Halomonas alkaliphila sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). J Gen Appl Microbiol. 2006 ; 52 : 339–348.
155. Rupcic, Z; Chepkirui, C; Hernández-Restrepo, M; Crous, P.W; Luangsa-ard, J.J; Stadler, M. New nematocidal and antimicrobial secondary metabolites from a new species in a new genus, *Pseudobambusicola thailandica*. MycoKeys. 2018; 33: 1–23.

S

156. Saitou, N; Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 406–425.
157. Saker, R; Bouras, N; Meklat, A; Zitouni, A; Schumann, P; Spröer, C; Klenk, H.P; Sabaou, N. *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from northern Sahara. *Curr Microbiol.* 2015b; 70: 423–428.
158. Saker, R; Bouras, N; Meklat, A; Zitouni, A; Schumann, P; Spröer, C; Sabaou, N; Klenk, H.P. *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015c; 65: 1598–1603.
159. Saker, R; Meklat, A; Bouras, N; et al. Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. *Annals of Microbiology.* 2015a; 65: 2241–53.
160. Salimi, F; Hamedi, J; Motevaseli, E; Mohammadipanah, F. Isolation and screening of rare *Actinobacteria*, a new insight for finding natural products with anti-vascular calcification activity. *J App Microbiol.* 2017; 124 (1): 254-266.
161. Sarmiento-Vizcaíno, A.; González, V.; Braña, A.F.; Palacios, J.J.; Otero, L.; Fernández, J.; Molina, A.; Kulik, A.; Vázquez, F.; Acuña, J.L.; et al. Pharmacological potential of phylogenetically diverse actinobacteria isolated from deep-sea coral ecosystems of the submarine Avilés canyon in the cantabrian sea. *Microb. Ecol.* 2017; 73: 338–352.
162. Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC Newsl.* 1990; 20: 16.
163. Saturnino, R.S; Machado, N.M; Lopes, J.C; Nepomuceno, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinogenic, and carcinogenic potential of amphotericin B in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Drug and Chemical Toxicology.* 2017; 41: 9–15.
164. Schulze, C.J; Donia, M.S; Siqueira-Neto, J.L; Ray, D; Raskatov, J.A; Green, R.E; McKerrow, J.H; Fischbach, M.A; Linington, R.G. Genome-directed lead discovery: Biosynthesis, structure elucidation, and biological evaluation of two families of polyene macrolactams against *Trypanosoma brucei*. *ACS Chem. Biol.* 2015; 10: 2373–2381.
165. Serrill, J.D; Tan, M; Fotso, S; Sikorska, J; Kasanah, N; Hau, A.M; McPhail, K.L; Santosa, D.A; Zabriskie, T.M, Mahmud, T; Viollet, B; Proteau, P.J; Ishmael, J.E. Apoptolidins a and C activate AMPK in metabolically sensitive cell types and are mechanistically distinct from oligomycin a. *Biochem Pharmacol.* 2015; 93: 251–265.
166. Sherwood, E. J. & Bibb, M. J. The antibiotic planosporicin coordinates its own production in the actinomycete *Planomonospora alba*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110: E2500–E2509.
167. Shirling, E. B; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int Syst Bacteriol.* 1966; 16: 313–340.
168. Sieber, S.A; Marahiel, M.A. Learning from Nature's Drug Factories: Nonribosomal Synthesis of Macrocylic Peptides. *J Bacteriol.* 2003; 185(24): 7036-7043.

169. Skellam, E.J; Stewart, A.K; Strangman, W.K; Wright, J.L. Identification of micromonolactam, a new polyene macrocyclic lactam from two marine *Micromonospora* strains using chemical and molecular methods: Clarification of the biosynthetic pathway from a glutamate starter unit. *J. Antibiot.* 2013; 66: 431–441.
170. Söhngen, C; Podstawka, A; Bunk, B; Gleim, D; Vetcinina, A; Reimer, L, C; Ebeling, C; Pendarovski, C; Overmann, J. BacDive-the bacterial diversity metadatabase in 2016. . *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: D581—D585.
171. Stachelhaus, T ; Mootz, H. D ; Bergendahl, V ; Marahiel, M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis: Catalytic role of the condensation domain. *Journal of Biological Chemistry.* 1998; 273 (35): 22773-22781.
172. Stachelhaus, T; Marahiel, M. A.. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 125 (1): 3-14.
173. Stackebrandt, E ; Goebel, B. M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 1994. 44:846–849.
174. Stanek, J.L; Roberts. G. D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography *Appl Microbiol.* 1974; 28 (2): 226-23.
175. Stone, N.R; Bicanic, T; Salim, R; Hope, W. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs.* 2016; 76: 485–500.
176. Subramani. D; Sipkema. D. Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine Drugs.* 2019 ; 17 (5) : 249.
177. Sui, T; Zhang, J; Du, S; Su, C; Que, J; Cao, X. Potential risk of mitomycin C at high concentrations on peripheral nerve structure. *Neural Regen Res.* 2014; 9: 821-7.
178. Suriyachadkun, C; Ngaemthao, W; Chunhametha, S. *Planomonospora corallina* sp. nov., isolated from soil *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66: 3224-3229.

T

179. Tamura, T ; Nakagaito, Y ; Nishii, T ; Hasegawa, T ; Stackebrandt, E et al. A new genus of the order actinomycetales, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caeruleus* (Horan and Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1994; 44: 193–203.
180. Tang, G.L; Cheng; Y.Q; Shen,B. Chain initiation in the leinamycin-producing hybrid nonribosomal peptide/polyketide synthetase from *Streptomyces atroolivaceus* S-140: Discrete, monofunctional adenylation enzyme and peptidyl carrier protein that directly load D-alanine. *J Biol Chem.* 2007; 282 (28): 20273–20282.

- 181.** Tata, S; Aouiche, A; Bijani, C. Bouras, N; Pont, F; Mathieu, F; Sabaou, N. . Mzabimycins A and B, novel intracellular angucycline antibiotics produced by *Streptomyces* sp. PAL114 in synthetic medium containing L-tryptophan. Saudi Pharmaceutical Journal. 2019.
- 182.** Thawai, C.; Kittakoop, P.; Tanasupawat, S.; Suwanborirux, K.; Sriklung, K.; Thebtaranonth, Y. Micromonosporin A, a novel 24-membered polyene lactam macrolide from *Micromonospora* sp. isolated from peat swamp forest. Chem. Biodivers. 2004; 1: 640.
- 183.** Thornburg, C.C Mark Zabriskie, T; McPhail, K.L. Deep-sea hydrothermal vents: potential hot spots for natural products discovery?. J Nat Prod. 2010; 73: 489-499.
- 184.** Thornton, A.C; Jose, S; Bhagani, S; Chadwick, D; Dunn, D; Gilson, R, et al. Hepatitis B, hepatitis C and mortality among HIV-positive individuals. AIDS. 2017; 28, 31(18): 2525–2532.
- 185.** Tian, S.Z; Pu, X ; Luo, G; Zhao, L.X; Xu, L.H; Li, W.J ; et al. Isolation and characterization of new p-Terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. J Agric Food Chem. 2013; 61: 3006-3012.
- 186.** Tomino, S; Yamada, M; Itoh, H; Kurahashi, K. Cell-free synthesis of gramicidin S. Biochemistry. 1967; 6(8): 2552-2560.
- 187.** Toumatia, O ; Yekkour, A ; Goudjal, Y ; Riba, A ; Coppel, Y ; Mathieu, F ; Sabaou, N ; Zitouni, A. Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. J Basic Microbiol. 2014 ; 54: 1–8.
- 188.** Trujillo, M. E; Hong, K; Genilloud, O. “Family *Micromonosporaceae*,” in The Prokaryotes, The *Actinobacteria*, eds E. Ronsenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (Heidelberg: Springer). 2014: 499–569.
- 189.** Trujillo, M.E; Riesco, R; Benito, P; Carro, L. Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. Front Microbiol. 2015; 6: 1341.

U, V, W

- 190.** Udvary, D. W. et al. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007; 104: 10376–10381.
- 191.** Van der Meij, A; Worsley, S.F.; Hutchings, M.I.; van Wezel, G.P. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. 2017; 41: 392–416.
- 192.** Vobis, G; Lodders, N; Ka"mpfer, P. Genus VIII. Planomonospora. In: Whitman WB, Goodfellow M, Kampfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K, Parte A (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5, 2nd edn. Springer, New York. 2012: 1811–1873.
- 193.** Walsh C. T. "Antibiotics. Actions, origins, resistance," ASM Press (Washington, D.C.). 2003.
- 194.** Wang, M.; Zhao, H. Characterization and engineering of the adenylation domain of a NRPS-like protein: a potential biocatalyst for aldehyde generation. ACS Catal. 2014; 4: 1219–1225.

195. Wayne, L.G; Brenner, D.J; Colwell, RR; Grimont, PAD; Kandler, O; Krichevsky, M.I; Moore, L.H; Moore, WEC; Murry, R.G.E; Stackebrandt, E; Starr, M.P; Trüper, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 1987; 37: 463–464.
196. Wei, Y. J; Zhang, L; Zhou, Z. H; Yan X. Diversity of gene clusters for polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis revealed by metagenomic analysis of the yellow sea sediment. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 295.
197. Williams, S. T; Goodfellow, M; Alderson, G; Wellington, E. M; Sneath, P. H; Sackin, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol.* 1983; 129: 1743–1813.
198. Wright, J.J; Greeves, D; Mallams, A.K; Picker, D.H. Structural elucidation of heptaene macrolide antibiotics 67-121A and 67-121C. *J Chem Soc Chem Commun.* 1977; 20:710–712.
199. Wu, J; Zhang, Q; Deng, W; Qian, J; Zhang, S; Liu, W. Toward improvement of erythromycin A production in an industrial *Saccharopolyspora erythraea* strain via facilitation of genetic manipulation with an artificial attB site for specific recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77: 7508–7516.

X, Y, Z

200. Xie, Q; Bao, X; Ma, Q; Kong, F; Zhou, M; Yan, B; Zhao, Y. *Verrucosipora rhizosphaerae* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2018; 111: 125–133.
201. Xu, X.N; Chen, L.Y; Chen, C; Tang, Y.J; Bai, F.W; Su, C; Zhao, X.Q. Genome mining of the marine actinomycete *Streptomyces* sp. DUT11 and discovery of tunicamycins as anti-complement agents. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1318.
202. Yang, Z.W; Salam, N; Asem, M.D; Fang, B.Z; Lan, L; Xiao, M; Wadaan, M.A.M; Hozzein, W.N; Li, W.J. *Saccharopolyspora deserti* sp. nov., a novel halotolerant actinobacterium isolated from a desert. 2018; 68 (3): 860-864.
203. Yekkour, A; Meklat, A; Bijani, C; Toumatia, O; Errakhi, R; Lebrihi, A; Mathieu, F; Zitouni, A; Sabaou, N. A novel hydroxamic acid-containing antibiotic produced by a Saharan soil-living *Streptomyces* strain. *Lett Microbiol.* 2015 ; 60: 589–596.
204. Zhang, Y; Ye, Q; Wang, X; She, Q.B; Thorson, J. S. A Divergent Enantioselective Strategy for the Synthesis of Griseusins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015; 54: 11219-22.
205. Zhang, Z; Pan, H..X; Tang, G.L. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis. *F1000Research.* 2017; 6: 172.
206. Zhi, X.Y; Li, W.J; Stackebrandt, E. An update on the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59: 589–608.

207. Zhou, E.M; Yang, L.L; Song, Z.Q; Yu, T.T; Nie, G.X; Ming, H., et al. *Thermocatellispora tengchongensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Streptosporangiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012; 62: 2417–2423.
208. Zhouxin Zhang, Z; Cao, P; Shang, N; Yang, J; Wang, L; Yana, Y; Huang, S. Naphthomycin-derived macrolactams with two new carbon skeletons from endophytic *Streptomyces*. *Organic Chemistry Frontiers.* 2019; 24, 2.
209. Ziemke, F; Höfle, M.G; Lalucat, J; Rosselló-Mora R. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1998; 48, 179–186.
210. Zitouni, A.; Lamari, L.; Boudjella, H.; Badji, B.; Sabaou, N.; Gaouar, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Labeda, D.P. *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. 54 : 1377–1381.

Annexes

Annexe 1

Les milieux de cultures

- **Les milieux d'isolement des actinomycètes.**

Milieu "chitine-vitamines B "

Chitine : 2 g/L; K₂HPO₄: 0,35 g/L; KH₂PO₄: 0,15 g/L; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g/L; NaCl: 200 g/L, CaCO₃: 0,02 g/L; FeSO₄, 7H₂O: 0.01 g/L; ZnSO₄, 7H₂O: 0.001 g/L; MnCl₂, 4H₂O: 0.001 g/L; agar: 18 g/L; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu "acide humique vitamine agar"

Acide humique : 1g ; Na₂HPO₄ : 0.5g ; KCl : 1.71g ; MgSO₄. 7H₂O: 0.05g; FeSO₄. 7H₂O : 0.01g; CaCO₃: 0.02g; B-vitamines; agar: 18 g; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu caséine amidon agar

Amidon : 10 g/L; caséine: 0.3 g/L; KNO₃: 2 g/L; NaCl: 2 g/L; K₂HPO₄: 2 g/L; MgSO₄·7H₂O: 0.05 g/L; CaCO₃: 0.02 g/L; FeSO₄·7H₂O: 0.01 g/L ; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

NB : l'antifongique cycloheximide (actidione) est ajouté à raison de 50 mg/l dans les trois milieux de cultures d'isolement. Les vitamines (thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine-HCl, inositol, panthoténate de calcium) sont ajoutées dans les deux milieux de culture, chitine-vitamines B agar et acide humique vitamine agar, après stérilisation par filtration, à raison de 0,5 mg/L, sauf pour la biotine qui est ajouté à raison de 0,25 mg/L.

- **Les milieux de caractérisation morphologiques des actinomycètes.**

Milieu ISP2

Glucose : 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; agar: 20 g; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu ISP3

L'avoine : 20,0 g/l; agar 18,0 g/l ; solution saline 1 : eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu ISP4

Amidon : 10 g; K₂HPO₄: 1 g; MgSO₄,7H₂O: 1 g; (NH₄)₂SO₄: 2 g; CaCO₃: 2 g; solution saline standard: 1 ml; agar: 20 g; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu ISP5

L'asparagine : 1,0 g/l; glycérol: 10,0 g/l; K₂HPO₄: 1 g/l; solution salines 1: 1ml/l; agar: 20 g/l; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu ISP6

Peptone : 15,0 g/l; proteose peptone: 5,0 g/l; citrate d'ammonium ferrique: 0,5 g/l; sodium de glycérophosphate: 1,0 g/l; thiosulfate de sodium-5-hydraté : 0,126g/l ; extrait de levure : 1,0 g/l ; agar : 20 g/l ; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu ISP7

Glycérol : 15 g/l; L-tyrosine: 0,5 g/l; L-asparagine: 1,0 g/l; K₂HPO₄: 0,5 g/l; NaCl: 0,5 g/l; FeSO₄.7 H₂O: 0,01 g/l; solution saline 3: 1,0 ml/l; agar: 20,0 g/l; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Gélose nutritive

Peptone : 5 g/l; extrait de viande: g/l; extrait de levure: 2 g/l; NaCl: 5 g/l; agar: 15 g/l; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Czapek

NaNO₃: 3 g/l ; K₂HPO₄: 1 g/l; KCl: 0,5 g/l ; MgSO₄ : 0,5 g/l; FeSO₄. 7H₂O: 0,01 g/l; saccharose: 30 g/l; agar: 20 g/l; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

ISP9

(NH₄)₂SO₄: 2,64 g/l; KH₂PO₄: 2,38 g/l; K₂HPO₄: 4,31 g/l; MgSO₄. 7 H₂O: 1,0 g/l; agar: 15,0 g/l; solution saline 2: 1,0 ml/l; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

- **Les milieux de production des métabolites secondaires.**

Milieu Soya bean

Soybean (soja): 20,0 g/l; mannitol: 20,0 g/l; glucose 4,0 g/l; agar: 20 g/l; eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Milieu 5254

Glucose : 15,0 g/l ; Soymeal 15,0 g/l ; Corn steep 5,0 g/l ; CaCO₃ 2,0 g/l ; NaCl 5,0 g /l ; Eau distillée: 1000 ml. pH = 7,2.

Annexe 2

Solution salines et révélateurs chimiques utilisés dans l'analyse des phospholipides

- **Solution saline 1**

FeSO₄. 7 H₂O: 0.1 g/100ml; MnCl₂. 4 H₂O: 0.1 g/100ml; ZnSO₄. 7 H₂O : 0.1 g/100ml; eau distillée : 100ml.

- **Solution saline 2**

CuSO₄. 5 H₂O: 0,64 g/l; FeSO₄. 7H₂O: 0,11 g/l; ZnSO₄. 7H₂O: 0,15 g/l; MnCl₂. 4 H₂O: 0,79 g/l; eau distillée: 1000ml.

- **Solution saline 3**

FeSO₄. 7H₂O: 1 g/l; ZnSO₄. 7H₂O: 1 g/l; MnCl₂. 4 H₂O: 1 g/l; eau distillée: 1000ml.

Les révélateurs chimiques utilisés dans l'analyse chimiotaxonomique des phospholipides membranaires

- **Anisaldéhyde pour la révélation des glycolipides.**

Dissoudre 0,5 ml d'anisaldéhyde dans 50 ml d'acide acétique cristallisable plus 1 ml de H₂SO₄ concentré.

- **Bleu de molybdène**

Pour la révélation des phospholipides (Sigma) solution prête à l'emploi.

- **Acide phosphomolybdique**

Pour la révélation des lipides (Sigma) solution prête à l'emploi.

- **Ninhydrine pour la révélation des phospholipides azotés.**

Dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol.

- **Réactif de Dragendorff**

Pour la révélation de phosphatidylcholine (Sigma) solution prête à l'emploi.

Annexe 3

Description de l'espèce *Nocardiopsis rosea* selon le compendium des *Actinobactéria*.

Genus: <i>Nocardiopsis</i>		FH 6803							
Species: <i>rosea</i>									
Numbers in other collections: DSM 44842									
<u>Morphology:</u>									
<u>ISP 2</u>	G good A none	R daffodi yellow SP none							
<u>ISP 3</u>	G good A none	R zinc yellow SP none							
<u>ISP 4</u>	G good A none	R zinc yellow SP none							
<u>ISP 5</u>	G good A none	R zinc yellow SP none							
<u>ISP 6</u>	G good A none	R zinc yellow SP none							
<u>ISP 7</u>	G good A none	R zinc yellow SP none							
Melanoid pigment: - - - -									
NaCl resistance: %									
Lysozyme resistance:									
pH: Value-		Optimum-							
Temperature : Value-		Optimum- 28°C							
Carbon utilization:									
Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Enzymes:									
2+	3+	4(+)	5-	6+	7+	8-	9-	10-	11+
12+	13-	14-	15-	16+	17-	18+	19-	20-	
Comments:									

Description de l'espèce *Saccharopolyspora erythraea* selon le compendium des *Actinobactéria*.

Genus: *Saccharopolyspora* FH 1556
Species: *erythraea*
Numbers in other collections: DSM 40517

Morphology:

<u>ISP 2</u>	G	R
	good	red
	A	SP
	white	none
<u>ISP 3</u>	G	R
	good	bright red
	A	SP
	rose	none
<u>ISP 4</u>	G	R
	good	bright
	A	SP
	rose	none
<u>ISP 5</u>	G	R
	good	bright red
	A	SP
	rose	none
<u>ISP 6</u>	G	R
	good	colorless
	A	SP
	none	none
<u>ISP 7</u>	G	R
	good	red
	A	SP
	rose	none

Spore chains: RFSpore surface: hairySporangia:Fragmentation:**Melanoid pigment:** - - - -**NaCl resistance:** 2,5 %**Lysozyme resistance:****pH:** Value-

Optimum-

Temperature : Value-

Optimum- 30 °C

Carbon utilization:

Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Enzymes:

Gel	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	VP	Ind	H2S
+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2+	3-	4+	5-	6-	7+	8+	9+	10+	11+	12+
13-	14+	15-	16+	17-	18+	19-	20-			

Description de l'espèce *Planomonospora alba* selon le compendium des *Actinobactéria*.**Genus:** *Planomonospora*

FH 2705

Species: *alba***Numbers in other collections:** ATCC 51588Morphology:

<u>ISP 2</u>	G	R
	good	sand yellow
	A	SP
<u>ISP 3</u>	white	none
	G	R
	good	beige
<u>ISP 4</u>	A	SP
	white	none
	G	R
<u>ISP 5</u>	good	colorless
	A	SP
	white	none
<u>ISP 6</u>	G	R
	good	colorless
	A	SP
<u>ISP 7</u>	none	none
	G	R
	good	colorless
	A	SP
	none	none

Spore chains:Spore surface: smoothSporangia: +Fragmentation: -**Melanoid pigment:** - - - -**NaCl resistance:** 0 %**Lysozyme resistance:** -**pH:** Value-

Optimum-

Temperature : Value-

Optimum- 28 °C

Carbon utilization:

Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Enzymes:

Gel	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	VP	Ind	H ₂ S
+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
2+	3-	4+	5-	6+	7+	8+	9+	10+	11+	12+
13-	14+	15-	16+	17+	18+	19-	20-			

Description de l'espèce *Couchioplanes caeruleus* selon le compendium des *Actinobactéria*.

Genus:	Couchioplanes	FH 2245																
Species:	caeruleus																	
Numbers in other collections: ATCC 33937																		
<u>Morphology:</u>																		
<u>ISP 2</u>	G good A none	R orange yellow/ blue SP none																
<u>ISP 3</u>	G good A none	R orange yellow/ blue SP none																
<u>ISP 4</u>	G good A none	R orange yellow/ blue SP none																
<u>ISP 5</u>	G good A none	R orange yellow SP none																
<u>ISP 6</u>	G sparse A none	R orange yellow SP none																
<u>ISP 7</u>	G good A none	R orange yellow SP none																
<u>Spore chains:</u>		<u>Spore surface:</u> smooth																
<u>Sporangia:</u> +		<u>Fragmentation:</u>																
<u>Melanoid pigment:</u> + - + -																		
<u>NaCl resistance:</u> 0 - 2,5 %																		
<u>Lysozyme resistance:</u>																		
<u>pH:</u>	Value-	Optimum-																
<u>Temperature :</u>	Value-	Optimum- 28 °C																
<u>Carbon utilization:</u>																		
Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel									
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
<u>Enzymes:</u>																		
Gel	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	VP	Ind	H2S								
+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-								
2+	3+	4+	5+	6+	7+	8+	9+	10+	11+	12+	13(+)	14(+)	15+	16+	17+	18+	19(+)	20(+)
<u>Comments:</u>																		

Annexe 4

Nocardiosis sp. CG3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MG972881.1

[FASTA](#) [Graphics](#)Go to: 

LOCUS MG972881 1502 bp DNA linear BCT 19-NOV-2018
 DEFINITION Nocardiosis sp. CG3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION MG972881
 VERSION MG972881.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Nocardiosis sp. CG3
 ORGANISM [Nocardiosis sp. CG3](#)
 Bacteria; Actinobacteria; Streptosporangiales; Nocardiosaceae;
 Nocardiosis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1502)
 AUTHORS Messaoudi,O., Bendahou,M., Kaempfer,P., Hahnke,R., Rohde,M. and Wink,J.
 TITLE Nocardiosis becharensis sp. nov. isolated from saltpan of Kenadsa (Algeria)
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1502)
 AUTHORS Messaoudi,O., Bendahou,M., Kaempfer,P., Hahnke,R., Rohde,M. and Wink,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2018) Microbial Strain Collection, Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstrasse 7, Braunschweig 38124, Germany

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1502
 /organism="Nocardiosis sp. CG3"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="CG3"
 /culture_collection="DSM:106572"
 /culture_collection="NCCB:100649"
 /db_xref="taxon:2487018"
 /country="Algeria: saltpan of Keandsa, Bechar, south east"
 rRNA
 <1..>1502
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
 1 tcatggctca ggacgaacgc tggcggcgtg cttaacacat gcaagtcgag cgtaaggcc
 61 ccttcggggg tacacgagcg gcgaacgggt gagtaacacg tgagcaacct gccctgact
 121 ctgggataag ccgtggaaac gcggtctaata accggatacg acgcgcctcc gcatgggggt
 181 gtgtggaag ttgtgctggg tgggatggg ctcgcccct atcagcttgt tgggggggtg
 241 atggcctacc aaggcgatta cgggtagccg gcctgagagg gcgaccggcc aactggggac
 301 tgagacacgg cccagactcc tgcgggaggc agcagtgggg aatattgcgc aatggcgga
 361 agcctgacgc agcgacgccg cgtgggggat gacggccttc gggttgtaaa cctctttac
 421 cactcacgca ggccctgggt gttcccggg ttgacggtag gtggggaata aggaccggct
 481 aactacgtgc cagcagccgc ggtataactg agggctccgag cgtgtcccgg aattattggg
 541 cgtaaaagac tcgtaggcgg tgtgtcgcgt ctgctgtgaa aggctggggc ttaaccctgg
 601 ttttcagtg gatacgggca tgctagaggt aggtagggga gactggaatt cctggtgtag
 661 cggtgaaatg cgcagatata aggaggaaca ccggtggcga agcggggtct ctgggcctta
 721 cctgacgctg aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataacct ggtagtccac
 781 gccgtaaacg ttgggcgcta ggtgtggggg cttccacgg tcccgtgcc gtagctaacg
 841 cattaagcgc cccgcctggg gactacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg
 901 ggcccgcaca agcggcggag catgttctt aattcgacgc aacgcgaaga acctaccaa
 961 ggtttgacat caccggtaat ccactcggaga cgggtgggtcc tttgggate ggtgacaggt
 1021 ggtgcatggt tctgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcgcc caacgagcgc
 1081 aacccttgtt ccatgttgc agcacgtggt ggtggggact catgggagac tggcgggtc
 1141 aactcggagg aagggtggga tgacgtcaag tcatcatgcc cttatgtct tgggctgcaa
 1201 acatgctaca atggccgta cagtggcgt gcgatccgt gagggtggagc gaatccctaa
 1261 aagccggtct cagttcggat tggggtctgc aactcagacc catgaagggt gagtcgctag
 1321 taatcgcgga tcagcagtc gcgggtgat acgttcccgg gccttgtaca caccgccctg
 1381 cactcatgaa aagtcggcaa caccgaaac ctgccccta acccttcggg gaggaggtgg
 1441 gtgaagggtg ggctggcgat tgggacgaag tcgtaacaag gtagccgtac cgaagggtc
 1501 gg



**Confirmation of the availability of a strain for the purpose of valid publication
of a new name according to the Bacteriological Code**

The following information is confidential and serves only to allow the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology to confirm that a strain has been deposited and will be available from the DSMZ in accordance with the Rules of the Bacteriological Code (1990 revision) as revised by the ICSP at the plenary sessions in Sydney and Paris.

Strain *Nocardiopsis* sp. CG3 has been deposited in the DSMZ under the number
DSM 106572

This strain is available in the publicly accessible section of the DSMZ and restrictions have not been placed on access to information concerning the presence of this strain in the DSMZ. It will be included in published and online catalogues after publication of this number by the authors.

This strain has been checked for viability in the DSMZ and is stored using one of the standard methods used in the DSMZ.

The depositor of this strain has also carried out a "depositor's check" and confirmed the identity of the strain held under this DSM number.

!! The DSMZ is not responsible for differences between the properties of the strain deposited in the DSMZ and properties given in the literature/databases !!

It is the sole responsibility of the depositor to ensure that type strains deposited in the DSMZ conform to the requirements of the appropriate Rules governing prokaryotes nomenclature and the deposition of type strains (Rules 18a, 27, & 30 of the ICNB/ICNP, including changes made at plenary sessions of the JC/ICSP).

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Dr. R. Hahnke'.

Dr. R. Hahnke, Curator Actinomycetales



Utrecht, March 13, 2018

Declaration of deposit in the NCCB Public Collection

Herewith it is declared that in the public NCCB collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (formerly CBS-KNAW) the following microbial resource has been deposited on March 13, 2018.

NCCB accession no.	Depositor strain no.	Proposed name
NCCB 100649 ^T	strain CG3 ^T	<i>Nocardiopsis becharensis</i> sp.nov.,

The above strain is stored in the NCCB collection for an indefinite period, and will be freely available for research.

Yours sincerely,



Marian Figge BSc
Netherlands Culture Collection of Bacteria
Westerdijk Institute
m.figge@westerdijkinstituut.nl

The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, an institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW), has been certified for accession, preservation, storage and supply of micro-organisms (public deposits, safe deposits and patent deposits) and related information.

Visiting address: Uppsalalaan 8, 3584 CT, the Netherlands / www.westerdijkinstituut.nl / T: +31(0)50 2122600 / F: +31(0)50 2122601



Annexe 5

Tableau : origines des 41 isolats d'actinomycètes sélectionnés et identifiés sur la base du séquençage de l'ADNr 16 s.

Code des souches	Origines	Code des souches	Origines
C56	Sebkha de Bougtob	A16	Palmier d'Ain Salah
C119	Sebkha de Bougtob	A10	Palmier d'Ain Salah
V17	Sebkha de Hassi Bahbah	C10	Sebkha de Kenadsa
RH94	Sebkha de Kenadsa	CG3	Sebkha de Kenadsa
CS44	Sebkha d'Ain Ouarka	T1	Sebkha de Tadjrouna
S29	Sebkha de Kenadsa	C19	Sebkha de Bougtob
C7	Sebkha de Bougtob	M23	Sebkha de Tadjrouna
V11	Sebkha de Hassi Bahbah	CHB2	Sebkha de Tadjrouna
V12	Sebkha de Hassi Bahbah	T14	Sebkha de Tadjrouna
V9	Sebkha de Hassi Bahbah	S4	Sebkha d'Ain Ouarka
V5	Sebkha de Hassi Bahbah	BO15	Sebkha de Bougtob
V3	Sebkha de Kenadsa	A58	Palmier d'Ain Salah
CAC512	Sebkha d'Ain Ouarka	S27	Sebkha d'Ain Ouarka
A34	Palmier d'Ain Salah	S26	Sebkha d'Ain Ouarka
A5	Palmier d'Ain Salah	A23	Palmier d'Ain Salah
A1	Palmier d'Ain Salah	A112	Palmier d'Ain Salah
A108	Palmier d'Ain Salah	A15	Palmier d'Ain Salah
O2	Sebkha d'Ain Ouarka	A111	Palmier d'Ain Salah
A36	Palmier d'Ain Salah	A93	Palmier d'Ain Salah
A34	Palmier d'Ain Salah	A79	Palmier d'Ain Salah
A5	Palmier d'Ain Salah	A28	Palmier d'Ain Salah
A1	Palmier d'Ain Salah	-	-

Les Publications

JOURNAL OF
**NATURAL
PRODUCTS**

Kenalactams A–E, Polyene Macrolactams Isolated
from *Nocardiosis* CG3

Kenalactams A–E, Polyene Macrolactams Isolated from *Nocardiosis* CG3

Omar Messaoudi,^{†,‡,§} Enge Sudarman,^{⊥,||} Mourad Bendahou,[‡] Rolf Jansen,^{⊥,||} Marc Stadler,^{⊥,||} and Joachim Wink^{*,†,||}

[†]Microbial Strain Collection, Helmholtz Centre for Infection Research GmbH (HZI), Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany

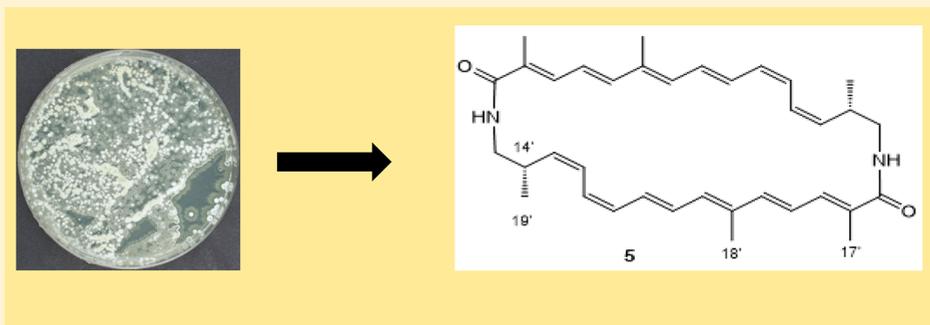
[‡]Laboratory of Applied Microbiology in Food and Environment, Abou bekr Belkaïd University, Tlemcen, Algeria

[§]Department of Biology, Faculty of Science, University of Amar Telidji, Laghouat, Algeria

[⊥]Department Microbial Drugs, Helmholtz Centre for Infection Research GmbH (HZI), Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany

^{||}German Centre for Infection Research Association (DZIF), Partner site Hannover-Braunschweig, Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany

Supporting Information



ABSTRACT: In our screening program for new biologically active secondary metabolites, a new strain, *Nocardiosis* CG3 (DSM 106572), isolated from the saltpan of Kenadsa, was found to produce five new polyene macrolactams, the kenalactams A–E (1–5). Their structures were elucidated by spectral methods (NMR and HRESIMS), and the absolute configuration was derived by chemical derivatization (Mosher’s method). Through a feeding experiment, alanine was proven to be the nitrogen-bearing starter unit involved in biosynthesis of the polyketide kenalactam A (1). Kenalactam E (5) was cytotoxic against human prostate cancer PC-3 cells with an IC₅₀ value of 2.1 μM.

Actinobacteria are one of the most important phyla of microorganisms that produce a wide variety of bioactive secondary metabolites,^{1,2} including many clinically used antibiotics and anticancer drugs.^{3,4} A contemporary strategy for obtaining new bioactive compounds is based on the isolation of rare actinomycetes from neglected environments,⁵ which should contain gene clusters for biosynthesizing novel secondary metabolites.⁶ One of the pharmaceutically and biotechnologically important rare actinomycetes that attracts natural products researchers is the genus *Nocardiosis*.^{7,8} Species of this genus are aerobic, Gram-positive, and non-acid-fast, and their aerial mycelia bear long chains of spores.^{9,10} *Nocardiosis* species were mainly recovered from salty habitats. The members of this genus produce an array of bioactive compounds that may aid their survival under these conditions.¹¹ In recent years many new natural products, belonging to different classes of molecules, including polyketides and peptides,^{12–14} were isolated from *Nocardiosis* species.^{15,16} These classes display cytotoxic,¹⁷ antimicrobial,¹⁸

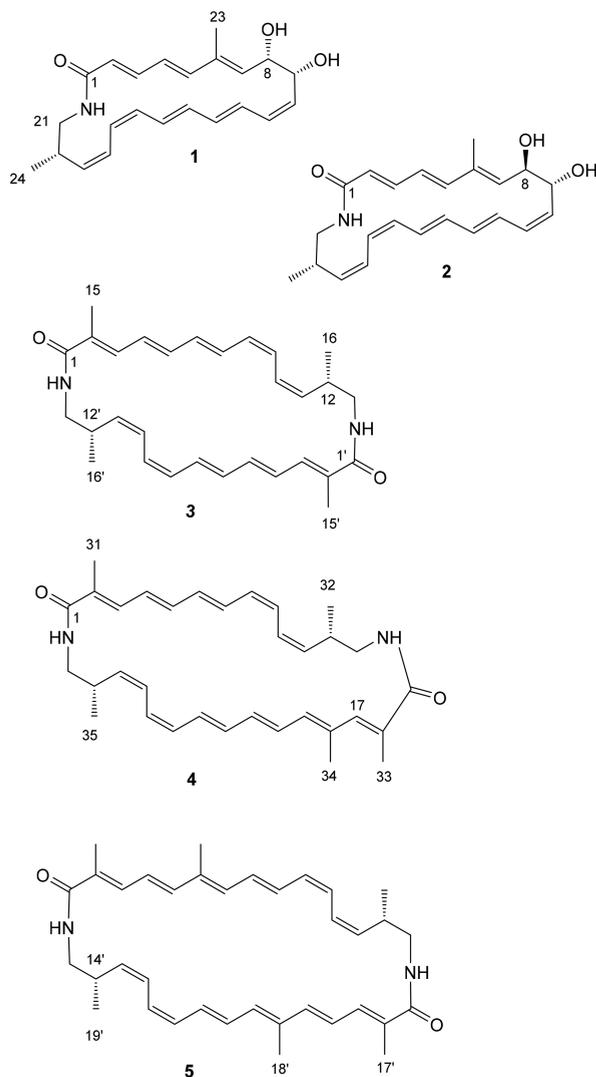
and immunomodulatory activities.¹⁹ Recently, three new angucyclines, nocardiosisistins A–C, with anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity were isolated from marine-sponge-derived *Nocardiosis* sp. HB-J378,²⁰ and a new cytotoxic cyclic peptide was obtained from the marine-sponge-associated *Nocardiosis* sp. UR67.¹⁴

According to the World Health Organization (WHO, 2018), “Cancer is the second leading cause of death globally, and is responsible for an estimated 9.6 million deaths in 2018”; hence it is necessary to continue the discovery of new classes of molecules with cytotoxic activity, which may be further developed as anticancer drugs.¹⁴ In fact, cytotoxicity-guided fractionation of the crude extract of the marine obligate actinomycetes, *Salinispora tropica*, led to the isolation of

Received: August 21, 2018

salinosporamide A, which entered phase I human clinical trials for the treatment of multiple myeloma.²¹

In the course of screening for new bioactive metabolites from our collection of actinobacteria, which had been isolated from different areas of Algeria, *Nocardiopsis* CG3 (DSM 106572) was selected for a detailed study because novel polyene-type compounds had been observed by UV and high-resolution electrospray mass spectrometric (HRESIMS) HPLC analyses of culture extracts. Herein, we describe the isolation, spectroscopic structure elucidation, and biological activities of kenalactams A–E (1–5), which constitute the first polyene macrolactams from the genus *Nocardiopsis*.



RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of the extract of *Nocardiopsis* CG3 (DSM 106572) by HPLC-UV-HRESIMS and a survey of databases (e.g., *Antibase*, *Dictionary of Natural Products*) suggested the presence of five unknown polyene metabolites, the kenalactams A–E (1–5). Consequently, these were isolated using solvent partition and Sephadex LH-20 gel chromatography, followed by preparative reversed-phase HPLC.

The elemental formula $C_{23}H_{29}NO_3$ of the main polyene, kenalactam A (1), was revealed by the molecular ion cluster $[M + H]^+$ at m/z 368.2390 in the HRESIMS spectrum,

indicating 10 double-bond equivalents (DBE). The UV spectrum with characteristic absorption bands at 297, 339, and 355 nm suggested a conjugated polyene structural part in 1. Its complete structure was determined by 1D and 2D NMR spectroscopy. The ^{13}C NMR spectrum confirmed 23 carbons, including one carboxyl carbon (δ_C 165.1) and one olefinic carbon (δ_C 132.2), while the remaining 21 carbons were assigned from the $^1H, ^{13}C$ HSQC NMR data as 15 olefinic methines (δ_H 5.10–6.67, δ_C 142.1–125.3), two secondary alcohols ($\delta_{H/C}$ 4.53/72.5 and 4.37/69.5), one N-bearing methylene group (δ_H 2.86 and 3.18, δ_C 44.5), a methine group ($\delta_{H/C}$ 2.69/33.1), and two methyl groups ($\delta_{H/C}$ 1.78/12.9 and 0.95/18.1). The 1H NMR spectrum in $DMSO-d_6$ provided further signals of an amide proton (δ_H 7.62) and two OH signals (δ_H 5.01 and 4.84).

Analysis of the $^1H, ^1H$ COSY spectrum revealed two contiguous spin systems from H-2 to H-5 and from H-7 to H_N-22 via oxymethines (H-8 and H-9). Both parts were connected from $^1H, ^{13}C$ HMBC correlations of H-5 to C-7 and from methyl H₃-23 to C-5, C-6, and C-7, respectively. Furthermore, the macrolide ring was established from the HMBC correlations of H_N-22 to C-1 and from H₂-21, H-2, and H-3 to C-1 (Figure 1). The configurations of the double bonds

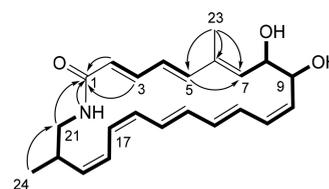


Figure 1. Selected $^1H, ^1H$ COSY (bold lines) and $^1H, ^{13}C$ HMBC (arrows) correlations of 1.

and relative configurations of 1 were assigned from extensive analyses of coupling constants observed in the J -resolved 1H NMR spectrum and ROESY correlations. The E -configurations of the $\Delta^{2,3}$, $\Delta^{4,5}$, $\Delta^{12,13}$, and $\Delta^{14,15}$ double bonds were indicated by their vicinal coupling constants of 14–15 Hz, while ROESY correlations between H-4 and methyl H₃-23, as well as H-5 and H-7, proved the E -configuration of the methyl-substituted $\Delta^{6,7}$ double bond. Coupling constants of 11.0 and 11.4 Hz observed for $\Delta^{10,11}$, $\Delta^{16,17}$, and $\Delta^{18,19}$ double bonds suggested their Z -configuration. Further, the *cis* orientation of the hydroxy groups at C-8 and C-9 was evident from the small coupling constant (<4 Hz) of their methine protons and from strong NOEs between methyl H₃-23 and H-8 and H-9. Furthermore, a significant NOE correlation between H-17 and H-20 placed H-20 *syn* to H-17, whereas NOE correlations of methyl H₃-24 with H-19 and H-21a showed that methyl H₃-24 is on the same face as H-19. Additionally, the large vicinal coupling constant of 10.2 Hz indicated an *anti* orientation between methines H-19 and H-20. To gain additional evidence for these assignments, an energy-minimized conformation of 1 was calculated, initially using the Conformational Search module (MM2 calculation) in HyperChem Prof. (version 8). In the final model, which was optimized by a PM3 calculation, the essential dihedral angles were consistent with the NMR data as summarized in Table 3. Further support for this model was obtained from the NOE observations. The strongest interactions are depicted in Figure 2.

The absolute configuration of 1 was established by application of the modified Mosher method. Esterification of

Table 1. NMR Spectroscopic Data of Kenalactams A (1) and D (4) in DMSO-*d*₆ (¹H 700.4 MHz, ¹³C 176.1 MHz)

pos.	1		4	
	δ_C , type	δ_H , mult. (J in Hz)	δ_C , type	δ_H , mult. (J in Hz)
1	165.1, C		168.3, C	
2	125.3, CH	5.66, d (15.0)	131.3, C	
3	138.5, CH	6.66, dd (15.0, 10.5)	132.4, CH	6.66, d (11.4)
4	125.4, CH	6.08, dd (15.0, 10.5)	129.1, CH	6.34, ^a dd (14.5, 11.4)
5	142.1, CH	6.14, ^a d (15.0)	136.5, CH	6.59, dd (14.5, 11.4)
6	132.2, C		134.7, CH	6.24, ^b dd (14.5, 11.4)
7	137.9, CH	5.15, d (7.5)	129.1, CH	7.00, dd (14.5, 11.4)
8	72.5, CH	4.53, ddd (7.5, 3.4, 3.0)	129.9, CH	5.88, t (11.4)
8-OH		4.84, br d (3.0)		
9	69.5, CH	4.37, ddd (9.0, 4.7, 3.4)	125.1, CH	6.01, t (11.4)
9-OH		5.01, br d (4.7)		
10	132.8, CH	5.45, dd (11.0, 9.0)	124.7, CH	6.73, t (11.4)
11	128.2, CH	6.03, ^b t (11.0)	137.6, CH	5.32, dd (11.4, 10.4)
12	130.2, CH	6.01, ^b dd (14.5, 11.0)	31.6, CH	2.88, m
13	131.5, CH	6.12, ^a dd (14.5, 11.0)	44.6, CH ₂	(a) 3.49, ddd (13.0, 7.1, 3.9) (b) 2.41, ddd (13.0, 11.0, 5.6)
14	134.4, CH	6.02, ^b dd (14.5, 11.4)	NH	7.84, dd (7.1, 5.6)
15	127.6, CH	6.49, dd (14.5, 11.4)	171.2, C	
16	129.2, CH	5.81, t (11.4)	134.0, C	
17	125.4, CH	6.11, t (11.4)	137.2, CH	6.31, s
18	125.5, CH	6.36, t (11.4)	130.2, C	
19	135.7, CH	5.10, dd (11.4, 10.2)	136.8, CH	5.93, ^c d (11.4)
20	33.1, CH	2.69, ddqd (11.6, 10.2, 6.5, 3.7)	128.3, CH	6.49, dd (14.5, 11.4)
21	44.5, CH ₂	(a) 3.18, ddd (13.0, 11.6, 9.3) (b) 2.86, ddd (13.0, 3.7, 3.3)	136.1, CH	6.18, dd (14.5, 11.4)
22	NH	7.62, br dd (9.3, 3.3)	133.2, CH	6.26, ^b dd (14.5, 11.4)
23	12.9, CH ₃	1.78, s	129.8, CH	6.44, dd (14.5, 11.4)
24	18.1, CH ₃	0.95, d (6.5)	129.0, CH	5.92, ^c t (11.4)
25			125.8, CH	6.09, dd (11.4, 11.0)
26			125.2, CH	6.35, ^a t (11.0)
27			137.5, CH	5.21, t (11.0)
28			33.0, CH	2.86, m
29			44.7, CH ₂	(a) 3.13, ddd (13.0, 5.0, 4.5) (b) 2.94, ddd (13.0, 11.4, 7.5)
30			NH	7.49, dd (7.5, 5.0)
31			12.8, CH ₃	1.71, d (6.8)
32			18.1, CH ₃	0.94, d (6.5)
33			14.3, CH ₃	1.95, br s
34			15.6, CH ₃	1.99, d (6.5)
35			17.4, CH ₃	0.95, d (6.5)

^{a-c}Overlapping signals. Chemical shifts were assigned from ¹H,¹³C HSQC spectrum.

Table 2. NMR Spectroscopic Data of Symmetrical Kenalactam C (3) and Kenalactam E (5) in DMSO-*d*₆ (¹H 700.4 MHz, ¹³C 176.1 MHz)

pos.	3		5	
	δ_C , type	δ_H , mult. (J in Hz)	δ_C , type	δ_H , mult. (J in Hz)
1, 1'	169.2, C		171.4, C	
2, 2'	131.2, C		130.6, C	
3, 3'	132.6, CH	6.42, ^a d (11.4)	136.8, CH	6.27, d (14.5)
4, 4'	128.2, CH	6.36, ^a dd (14.0, 11.4)	129.0, CH	6.48, ^a d (14.5, 10.0)
5, 5'	137.2, CH	6.38, ^a dd (14.0, 10.0)	136.6, CH	6.01, ^b d (10.0)
6, 6'	133.6, CH	6.23, dd (14.5, 10.0)	134.3, C	
7, 7'	130.0, CH	6.77, dd (14.5, 11.4)	135.5, CH	6.49, ^a d (10.0)
8, 8'	129.2, CH	5.86, t (11.4)	134.5, CH	6.29, dd (14.5, 10.0)
9, 9'	125.4, CH	6.03, t (11.4)	128.7, CH	6.90, dd (14.5, 11.4)
10, 10'	125.2, CH	6.57, dd (11.4, 11.0)	129.9, CH	5.92, t (11.4)
11, 11'	137.3, CH	5.25, t (11.0)	124.5, CH	6.02, ^b t (11.4)
12, 12'	31.7, CH	2.91, dqdd (11.0, 6.5, 6.1, 4.9)	124.9, CH	6.71, t (11.4)
13, 13'	44.6, CH ₂	(a) 3.36, ddd (13.0, 6.4, 4.9) (b) 2.59, ddd (13.0, 6.4, 6.1)	137.5, CH	5.31, t (11.4)
14, 14'	NH	7.62, t (6.4)	31.4, CH	2.96, tqd (11.4, 6.5, 4.3)
15, 15'	12.8, CH ₃	1.75, br s	44.4, CH ₂	(a) 3.48, ddd (13.0, 6.4, 4.3) (b) 2.41, ddd (13.0, 11.4, 6.4)
16, 16'	17.6, CH ₃	0.95, d (6.5)	NH	7.74, t (6.4)
17, 17'			14.3, CH ₃	1.93, s
18, 18'			15.6, CH ₃	1.96, s
19, 19'			17.8, CH ₃	0.93, d (6.5)

^{a,b}Overlapping signals. Chemical shifts were assigned from ¹H,¹³C HSQC spectrum.

Table 3. Calculated Dihedral Angles and Observed Vicinal Coupling Constants of 1

protons	φ [deg]	³ J _{HH} [Hz]
7, 8	150	7.5
8, 9	67	3.4
9, 10	163	9.0
19, 20	177	10.2
20, 21a	62	3.7
20, 21b	179	11.6

1 with (R)- and (S)-MTPA-Cl yielded (S)- and (R)-MTPA esters at the C-9 alcohol. The observed shift differences ($\Delta\delta$) between these esters are depicted in **Scheme 1**. The $\Delta\delta_{(S-R)}$ values calculated from the ¹H NMR data defined the absolute configuration at C-9 as R. Finally, based on this assignment and on the molecular modeling, which represented all observed coupling constants and NOE interactions, the complete absolute configuration of **1** was defined as 8S, 9R, and 20S.

The molecular formula of kenalactam B (**2**) was also determined as C₂₃H₂₉NO₃ by HRESIMS. The UV, mass, and NMR spectra of compound **2** were very similar to those of **1**, indicating a structurally related isomer of **1**. The structure verified the same carbon skeleton as **1**, which was verified

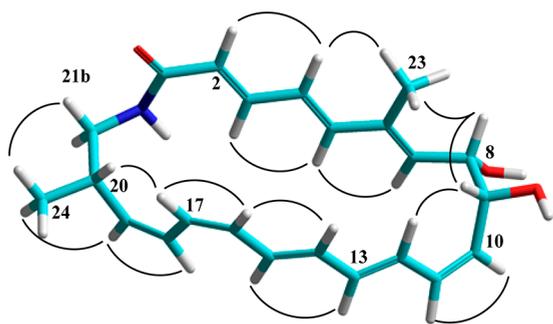
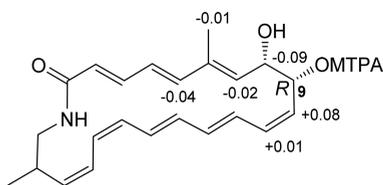


Figure 2. PM3-calculated model of **1** and selected strong NOE contacts.

Scheme 1. $\Delta\delta_{(S-R)}$ Values Calculated from the (S)- and (R)-MTPA Esters of **1**



from the NMR data. The main difference was found in the ^1H NMR spectrum, which revealed a coupling constant of 9.5 Hz between H-8 and H-9, which is a typical vicinal coupling for an *anti* conformation. The vicinal coupling between H-9 and H-10 was unchanged (11 Hz), thus indicating the stereocenter at C-8 was reversed in **2**. This assignment was supported by the ROESY correlations H-9/H-12, H-17/H-20, and H₃-24/H-19/H-21b, whereas no NOE was observed between H-8 and H-9. Consequently, the stereochemistry at C-8 of **2** was assigned as R.

The molecular formula of kenalactam C (**3**) was established as C₃₀H₃₈N₂O₂ by HRESIMS analysis, implying 13 double-bond equivalents. The UV spectrum showed characteristic polyene absorption bands (λ 325, 329, and 338 nm). Since the ^1H and ^{13}C NMR spectra exhibited half the number of expected signals, **3** was recognized as a symmetrical cyclic dimer. The ^1H NMR spectrum showed a set of signals, each representing a pair of amide protons (δ_{H} 7.62), nine pairs of olefinic protons (δ_{H} 5.25–6.77), and two pairs of methyl groups (δ_{H} 0.95 and 1.75). Despite the fact that H-4 and H-5 signals overlapped, the COSY spectrum showed a contiguous sequence of correlations from H-3 to H_N-14. The HMBC correlations of methyl H₃-15 to C-1, C-2, and C-3 and of H-3 to C-1 and C-5 completed the planar structure of the symmetrical half of **3**. HMBC correlations of methylene H₂-13' to C-1 and of H_N-14 to C-1 established the ring closure. The *E*-configuration of the $\Delta^{4,5}$ and $\Delta^{6,7}$ double bonds was assigned from the vicinal coupling constants of 14.5 and 15.0 Hz, whereas the *Z*-configuration of the $\Delta^{8,9}$ and $\Delta^{10,11}$ bonds was evident from their coupling constants of 10–12 Hz. The methyl-substituted $\Delta^{2,3}$ double bond was unambiguously established as *trans* from the ROESY correlation between methyl-15 and H-4, whereas an NOE between methyl-15 and H-3 was absent. ROESY correlations between H-9 and H-12 positioned H-12/H-12' *syn* to H-9/H-9', whereas NOE correlations of methyl-16 with H-11 and H-13a signified that methyl-16/16' is on the same face as H-11/11' (Figure 3).

These correlations were also observed for **1**, thus indicating the same *S*-configuration of the methyl group at this position.

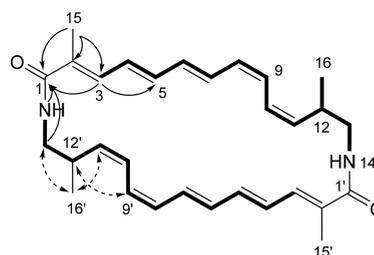


Figure 3. Selected $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY (bold bonds), $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HMBC (plain arrows), and $^1\text{H},^1\text{H}$ ROESY (dashed arrows) correlations of **3**.

Kenalactam D (**4**) exhibited a molecular ion cluster $[\text{M} + \text{H}]^+$ at m/z 499.3323, which provided the molecular formula C₃₃H₄₂N₂O₂ (14 DBE). Its UV/vis spectrum was similar to that of **3**. Compared to **3**, the ^1H NMR spectrum displayed two additional olefinic protons and a methyl group. The gross structure of **4** was elucidated from COSY and HMBC correlations. The $\Delta^{4,5}$, $\Delta^{6,7}$, $\Delta^{20,21}$, and $\Delta^{22,23}$ double bonds were established as *E* and the $\Delta^{8,9}$, $\Delta^{10,11}$, $\Delta^{20,21}$, and $\Delta^{22,23}$ double bonds as *Z* configured. The methyl-substituted $\Delta^{2,3}$, $\Delta^{16,17}$, and $\Delta^{18,19}$ double bonds were assigned as *E* on the basis of ROESY correlations. Strong NOE correlations between H-8/H-9, H-9/12, H-24/25, and H-25/H-28 on one side and between H₃-32/H-11 and H₃-35/H-27 on the other side were observed (Figure 4) and thus suggested an identical configured stereocenter at C-28 in kenalactam D (**4**) compared to C-12 in **3**.

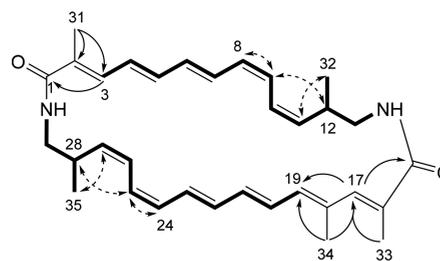


Figure 4. Selected $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY (bold bonds), $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HMBC (plain arrows), and $^1\text{H},^1\text{H}$ ROESY (dashed arrows) correlations of kenalactam D (**4**).

The molecular formula C₃₆H₄₆N₂O₂ (15 DBE) of kenalactam E (**5**) was determined by HRESIMS, which indicated another macrolactam dimer. The NMR spectra of kenalactam E (**5**) contained all structure elements of kenalactam C (**3**) with additional resonances for a pair of methine and of methyl groups ($\delta_{\text{H/C}}$ 6.29/134.5 and 1.96/15.6 ppm) and of sp² carbons (δ_{C} 134.3 ppm) (Table 2). Compared to **3**, the structure of **5** included a pair of C₃H₄ structural units, i.e., a propionate unit $[-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)=]$ in the olefin chain. However, the additional propionate unit was inserted between C-4 and C-5 of **3**, resulting in an enlarged, symmetrical macrolactone. Assuming a largely common biosynthesis, the methyl-substituted stereogenic center (C-12 or C-14) of **1–5** is conserved throughout these polyene macrolactams. Therefore, the absolute configuration at C-14 was assumed to be *S* in concordance with the similarity of the NMR data.

Due to the low amount of **2**, only compounds **1** and **3–5** were tested for their antimicrobial and cytotoxic activities and antiviral activity against HCV (hepatitis-C-virus) in human liver cells. Compounds **3**, **4**, and **5** showed moderate to weak activities against *Staphylococcus aureus*, whereas **3** further exhibited moderate antifungal activity against *Candida albicans* and *Mucor hiemalis*. Compound **1** did not show any antimicrobial activities against our test microorganisms at concentration of $\geq 66.66 \mu\text{g/mL}$. Compounds **3–5** exhibited significant but weak cytotoxicity against various human cancer cell lines. Compound **5** was the most potent derivative, showing inhibition of KB3.1, PC-3, SKOV-3, and A549 cell lines in the IC_{50} range of 2–5.5 μM . Compound **1** had no activity against KB3.1 and L929 cell lines. Weak antiviral activities against HCV were observed for compounds **3–5**, while **1** was not active (Figure S9, Supporting Information).

Kenalactams A (**1**) and B (**2**) are 22-membered macrocyclic lactams. Examples for structurally closely related macrolactams are cyclamenol A (20-membered ring),²² micromonosporin A (24-membered ring),²³ and lobosamide, mirilactam, micromonolactam, and sceliphrolactam (all with 26-membered rings).^{24–26}

Macrolactams, which represent a small class of compounds belonging to the group of polyketides,^{27,28} are characterized by macrocyclic amide rings. Polyene macrolactams are a hitherto underexplored group of natural products that have only been found in actinomycetes.^{29,30} For example, sceliphrolactam, isolated from a *Streptomyces* sp. associated with the mud wasp *Sceliphron caementarium*, is an unusual polyenol and enone macrolactam which inhibited amphotericin B-resistant *Candida albicans* (MIC 4 $\mu\text{g/mL}$).²⁵ A new polyene macrolactam, lobosamide A, recently isolated from a marine actinobacterium of the genus *Micromonospora* inhibited the growth of the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* ($\text{IC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$).²⁶ The nocardiopepsins, prolinyl-macrolactam polyketides isolated from *Nocardiopepsis* sp. (CMB-M0232),¹⁹ and fluvirucin B6, a new macrolactam isolated from a marine-derived *Nocardiopepsis*,³¹ are the only polyene macrolactams reported from the genus *Nocardiopepsis*.

Macrolactams are synthesized by a modular PKS that contains only the ACP domain in the loading module.³² Various β -amino acid starter units are involved in the biosynthesis of macrolactams and contribute to their structural diversity.^{33,34} The majority of these β -amino acid moieties are synthesized from proteinogenic α -amino acids, such as L-glutamate, L-aspartate, L-phenylalanine, and L-alanine.³⁴ For example, leinamycin is synthesized using alanine as a starter unit, while 3-methylaspartate and lysine are presumed to represent the starters units for the biosynthesis of vicenistatin and salinilactam, respectively.³⁵ The incorporation of amino acids into the polyketide skeletons appears to be a critical event because the amino groups of amino acids are necessary to form the macrocyclic structures.³³ To determine which amino acid starter unit might be incorporated in the biosynthesis of kenalactam A (**1**), 11 amino acids were separately evaluated as a nitrogen source. The LC-MS results indicated that kenalactam A (**1**) was synthesized in particular when L-alanine was added as additional nitrogen source. This was confirmed through the feeding of strain *Nocardiopepsis* CG3 (DSM 106572) with L-alanine-¹⁵N. In GYM medium without malt extract, the ¹⁵N of the latter compound was incorporated in the amide group of the polyene ring of kenalactam A, and the molecular

formula of **1**, which was determined by mass spectrometry, became $\text{C}_{23}\text{H}_{29}^{15}\text{NO}_3$ (Figure S8, Supporting Information).

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Fractionation and analytical RP-HPLC were carried out with an Agilent 1260 HPLC system

Table 4. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Kenalactams **1 and **3–5**^a**

cell line	IC_{50} (μM)				
	1	3	4	5	epothilone B
mouse fibroblasts L929	–	32.8	42.2	–	7.5×10^{-4}
HeLa cells KB3.1	–	6.8	5.4	2.4	5.3×10^{-5}
human breast adenocarcinoma MCF-7	nt	16.4	18.1	nt	7.4×10^{-5}
human prostate cancer PC-3	nt	6.3	5.0	2.1	2.2×10^{-3}
human lung carcinoma A549	nt	16.3	32.1	6.5	4×10^{-3}
ovarian carcinoma SKOV-3	nt	14.2	10.0	5.5	2.4×10^{-4}
microorganism	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				oxytetracycline
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	–	66.7	16.7	66.7	0.05
<i>Escherichia coli</i> DSM1116	–	–	–	–	1.66
<i>Bacillus subtilis</i> DSM10	–	–	–	–	2.08
					Nystatin
<i>Mucor hiemalis</i> DSM2656	–	66.7	–	–	4.16
<i>Candida albicans</i> DSM1665	–	66.7	–	–	8.8

^a– not active; nt: not tested. Positive control: epothilone B, oxytetracycline, nystatin.

equipped with a diode-array UV detector (DAD-UV), a fraction collector, or a Corona Ultra detector (Dionex). Analytical HPLC conditions: column $100 \times 2.1 \text{ mm XBridge C}_{18}$, 3.5 μm , (Waters), solvent A: H_2O –acetonitrile (95/5), 5 mmol NH_4OAc , 0.04 mL/L CH_3COOH ; solvent B: H_2O –acetonitrile (5/95), 5 mmol NH_4OAc , 0.04 mL/L CH_3COOH ; gradient system: 10% B increasing to 100% B in 30 min and maintaining 100% for 10 min; flow rate 0.3 mL/min; 40 °C. Preparative RP-HPLC was performed on an Agilent 1100 series preparative HPLC system [ChemStation software (Rev. B.04.03); binary pump system; DAD-UV detection; fraction collector]. HRESIMS data were recorded on a MaXis ESI-TOF-mass spectrometer (Bruker) equipped with an Agilent 1260 series RP-HPLC system: column $50 \times 2.1 \text{ mm Acquity UPLC BEH C}_{18}$ (Waters); solvent A: 0.1% formic acid in H_2O , B: 0.1% formic acid in acetonitrile; gradient system: 5% B for 0.5 min, in 19.5 min to 100% B and maintained for 5 min at 100% B; flow rate 0.6 mL/min; 40 °C; DAD-UV detection at 200–600 nm. Molecular formulas were calculated including the isotopic pattern with the SmartFormula algorithm (Bruker). ESI mass spectra in positive and negative ionization modes were obtained with an ion trap MS (Amazon, Bruker). The mass spectrometer was coupled to a Dionex Ultimate 3000 HPLC system [column $50 \times 2.1 \text{ mm, C}_{18}$ Acquity uPLC BEH, 1.7 μm , (Waters), solvent A: H_2O + 0.1% formic acid; solvent B: acetonitrile (ACN) + 0.1% formic acid, gradient: 5% B for 0.5 min, increasing to 100% B in 20 min, maintaining isocratic conditions at 100% B for 10 min, flow rate 0.6 mL/min, DAD-UV detection 200–600 nm]. NMR spectra were recorded on an Avance III 700 spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) with a 5 mm TXI cryoprobe (¹H 700 MHz, ¹³C 175 MHz) and an Avance III 500 (¹H 500 MHz, ¹³C 125 MHz) spectrometer. Optical rotations were measured on a PerkinElmer 241 MC polarimeter (using the sodium D line and a quartz cuvette with 10 cm path length and 0.5 mL volume). UV spectra were recorded on a Shimadzu UV/vis-2450 spectrophotometer using methanol (Uvasol, Merck).

Strain Origin and Identification. Strain CG3 was isolated from soil samples collected in 2012 from the saltpan of Kenadsa (22 km west of Bechar located in southwest Algeria), by a serial dilution

method using a starch casein agar medium [starch (10 g/L), casein (0.3 g/L), KNO₃ (2 g/L), NaCl (2 g/L), K₂HPO₄ (2 g/L), MgSO₄·7H₂O (0.05 g/L), CaCO₃ (0.02 g/L), FeSO₄·7H₂O (0.01 g/L), and agar (18.0 g) supplemented with 7% NaCl and 50 μg/mL amphotericin B]. For molecular identification, the strain CG3 was cultured in 100 mL of GYM (glucose 4 g/L; yeast extract 4 g/L; malt extract 10 g/L; CaCO₃ 2 g/L) medium supplemented with 3% NaCl and incubated for 5 days (160 rpm, 37 °C). DNA extraction was performed using a Spin Plant mini kit (Invisorb), following the manufacturer's protocol. The 16S rRNA gene region was amplified by PCR using two universal primers; forward primers bind on the position (F27) and reverse primers bind on the position (R1525). For the whole 16S DNA sequencing, five primers were used: F27, R518, F1100, R1100, and R1521. The identification of the strain CG3, using a polyphasic approach, indicated that this strain represents a new species of the genus *Nocardioopsis*. The sequence of 16S rDNA of the strain *Nocardioopsis* CG3 (DSM 106572) is deposited in GenBank with accession number MG972881.

Production, Extraction, and Isolation. Mature spores of strain CG3, grown on ISP3 plus 3% NaCl agar plates, were used to inoculate two 1 L Erlenmeyer flasks, each of which contained 400 mL of seed soybean medium (2% soymeal, 2% mannitol, 0.4% glucose, 3% NaCl, 1 L deionized water, pH 7). The flasks were incubated on a rotary shaker (160 rpm) at 37 °C for 7 days. A 20 L amount of soybean meal medium, distributed in 25 L Erlenmeyer flasks (each 800 mL), was inoculated with 10% of the seed culture. The flasks were incubated on a rotary shaker (160 rpm) at 37 °C for 13 days. Mycelial biomass was separated from the supernatant by centrifugation (7000 rpm, 30 min.) in a Dupont instrument (Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge). Adsorber resin Amberlite XAD-16, 10% (v/v), was added to the supernatant and stirred overnight at 4 °C. The XAD resin was separated from the supernatant by sieving and extracted with methanol–H₂O (3–7 v/v; three portions of 500 mL each), followed by methanol (1 L). The methanol extract was evaporated to dryness, and the residue dissolved in 100 mL of acetone and stored at 4 °C until precipitation occurred. After centrifugation, the precipitate was washed with acetone, dried *in vacuo*, and separated by preparative reversed-phase HPLC [column 250 × 21 mm, 5 μm, Nucleodur Phenyl-hexyl (Macherey Nagel), solvent A: H₂O–acetonitrile (95/5), 5 mmol NH₄OAc, 0.04 mL/L CH₃COOH; solvent B: H₂O–acetonitrile (5/95), 5 mmol NH₄OAc, 0.04 mL/L CH₃COOH; gradient from 25% B to 70% B in 60 min; flow rate 20 mL/min]. Fractions were evaporated, and the residual water was extracted with ethyl acetate and dried *in vacuo* to obtain kenalactam B (2; 0.4 mg). The biomass was extracted with ethyl acetate three times (1.5 L). After evaporation, the residue was redissolved in methanol and partitioned with *n*-heptane to remove the lipophilic components. The methanol layer was evaporated, and the residue (1.15 g) was subjected to Sephadex LH-20 column chromatography (column 3 × 83 cm, flow rate 3.8 mL/min) and eluted with methanol. Four fractions were collected, the solvent was evaporated, and the residue was analyzed by RP-HPLC-MS. Fr. 1 (50 mg), containing kenalactams C–E (3–5), was separated by preparative RP-HPLC [column 250 × 21 mm, Nucleodur Phenyl-hexyl, 5 μm (Macherey Nagel), solvent A: water, solvent B: acetonitrile, gradient from 50% B to 60% B in 60 min, flow rate 20 mL/min, UV detection at 220, 350, and 360 nm] to obtain kenalactam C (3) (1 mg), kenalactam D (4) (2.5 mg), and kenalactam E (5) (1 mg). Fr. 2 (70 mg) was purified by preparative RP-HPLC [column 250 × 21 mm, Nucleodur Phenyl-hexyl, 5 μm (Macherey Nagel) gradient 30% B to 70% B in 60 min, UV detection 220, 300, and 350 nm] to obtain kenalactam A (1) (10 mg).

Kenalactam A (1): light yellow solid; $[\alpha]_D^{20} +425$ (c 0.12, DMSO); UV/vis (CH₃OH) λ_{\max} (log ϵ) 248 (3.88), 297 (4.57), 339 (3.94), 355 (3.90) nm; NMR data (¹H 700 MHz, ¹³C 176 MHz, DMSO) see Table 1; HRESIMS [M + H]⁺ *m/z* 368.2390, calcd 368.2220 for C₂₃H₂₉NO₃, *t_R* = 8.6 min.

Kenalactam B (2): light yellow solid; $[\alpha]_D^{20} +33.8$ (c 0.10, CH₃OH); UV/vis (CH₃OH) λ_{\max} (log ϵ) 246 (3.43), 296 (3.71), 338 (3.21), 355 (3.17) nm; ¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ 1.06 (3H, J

= 6.7 Hz, H₃-24), 1.91 (1H, s, H₃-23), 2.83 (1H, m, H-20), 3.07 (1H, dd, J = 13.0, 3.7 Hz, H-21b), 3.27 (1H, dd, J = 13.0, 11.7 Hz, H-21a), 4.61 (1H, t, J = 10 Hz, H-9), 4.88^a (1H, m, H-8), 5.22 (1H, dd, J = 11.0, 10.0 Hz, H-19), 5.31 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-7), 5.49 (1H, J = 11.0, 10.0 Hz, H-10), 5.77 (1H, J = 15.3 Hz, H-2), 5.92 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-16), 6.07^b (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H-14), 6.08^b (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H-12), 6.15 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-17), 6.22 (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H-13), 6.24^c (1H, dd, J = 15.0, 6.0 Hz, H-14), 6.26^c (1H, d, J = 15.0 Hz, H-5), 6.36 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-11), 6.48 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-18), 6.56 (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H-15), 6.84 (1H, dd, J = 15.3, 9.9 Hz, H-3); ^aoverlapping signal with solvent peak, chemical shift was assigned using HSQC; ^boverlapping signals; ¹³C NMR (176 MHz, CD₃OD) δ 13.4 (C-23), 18.5 (C-24), 34.7 (C-20), 46.4 (C-21), 73.2 (C-8), 74.9 (C-9), 125.9 (C-2), 126.7 (C-17), 127.1 (C-18), 127.4 (C-4), 128.4 (C-10), 129.8 (C-15), 130.6 (C-12), 131.0 (C-16), 134.5 (C-11), 134.7 (C-13), 135.1 (C-6), 135.6 (C-14), 136.8 (C-19), 137.3 (C-7), 141.5 (C-3), 144.3 (C-5), 169.1 (C-1); HRESIMS [M + H]⁺ *m/z* 368.2220, calcd 368.2147 for C₂₃H₂₉NO₃, *t_R* = 8.9 min.

Kenalactam C (3): green-yellow solid; $[\alpha]_D^{20} +104.7$ (c 0.1, CH₃OH); UV/vis (CH₃OH) λ_{\max} (log ϵ) 325 (4.04), 338 (4.07) nm; NMR data (¹H 700 MHz, ¹³C 176 MHz, DMSO) see Table 2; HRESIMS [M + H]⁺ *m/z* 459.3012, calcd 459.3006 for C₃₀H₃₈N₂O₂, *t_R* = 11.0 min.

Kenalactam D (4): yellow solid; $[\alpha]_D^{20} +477$ (c 0.23, CH₃OH); UV/vis (CH₃OH) λ_{\max} (log ϵ) 339 (3.50), 349 (4.54) nm; NMR data (¹H 700 MHz, ¹³C 176 MHz, DMSO) see Table 1; HRESIMS [M + H]⁺ *m/z* 499.3325, calcd 499.3319 for C₃₃H₄₂N₂O₂, *t_R* = 12.3 min.

Kenalactam E (5): yellow solid; $[\alpha]_D^{20} +70.8$ (c 0.1, CH₃OH); UV/vis (CH₃OH) λ_{\max} (log ϵ) 287 (3.76), 362 (4.69) nm; NMR data (¹H 700 MHz, ¹³C 176 MHz, DMSO) see Table 2; HRESIMS [M + H]⁺ *m/z* 539.3636, calcd 539.3632 for C₃₆H₄₆N₂O₂, *t_R* = 13.1 min.

Preparation of the S- and R-MTPA Esters of 1. Kenalactam A (1) (2 mg, 5.4 μmol) was dissolved in 200 μL of anhydrous dichloromethane; then 100 μL of pyridine and 5 μL of R(-)-MTPA-chloride were added and stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was quenched with buffer solution (pH 7), extracted three times with dichloromethane, and concentrated *in vacuo* to dryness. The (S)-MTPA ester was purified by semipreparative RP-HPLC [column: 250 × 10 mm, Nucleodur 100-5 C₁₈ ec, Macherey-Nagel, solvent A: water, solvent B: acetonitrile; gradient: from 40% B to 100% B in 30 min, flow rate: 6 mL/min, UV detection: 220, 350, and 360 nm] to yield 0.3 mg of 9-(S)-MTPA ester 1a: ESIMS *m/z* 584.32 [M + H]⁺. The (R)-MTPA-ester of 1 was prepared analogously from 2 mg (5.4 μmol) of 1 to give 0.3 mg of 9-(R)-MTPA ester 1b. ¹H NMR (Table 21 Supporting Information), COSY, TOCSY, and ROESY data of the products 1a/1b were recorded.

Antimicrobial Assays. Minimum inhibitory concentrations were determined by serial dilution in 96-well plates with EBS medium (0.5% casein peptone, 0.5% glucose, 0.1% meat extract, 0.1% yeast extract, 50 mM HEPES [11.9 g/L] and pH 7.0) for bacteria and MYG medium (1.0% phytone peptone, 1.0% glucose, 50 mM HEPES [11.9 g/L] pH 7.0) for fungi. Twenty microliter aliquots of compounds 1 and 3–5 with a concentration of 1 mg/mL (the final concentration in the first well is 67 μg/mL) were tested against two different Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), one Gram-negative (*Escherichia coli* TolC) bacteria, and two fungi (*Candida albicans*, *Mucor hiemalis*) with methanol as a negative control.³⁶

Cytotoxicity Assay. Cytotoxicity effects (IC₅₀) of compounds 1 and 3–5 were determined against a panel of five human cancer cell lines including HeLa cells KB3.1, human lung carcinoma A549, ovarian carcinoma SKOV-3, human prostate cancer PC-3, human breast adenocarcinoma MCF-7, and normal cell line mouse fibroblasts L929, by using a 5-day MTT assay according to an established procedure.^{37,38}

HCV Infectivity Assay. Huh-7.5 cells were electroporated with reporter viruses Luc-Jc1 in the presence of test compounds. The inoculum was removed 4 h later; then monolayers were washed three times with phosphate-buffered saline and overlaid with fresh medium

in the absence of compounds. Infected cells were lysed 3 days, and their luciferase activity was determined as indicators of viral genome replication and cell viability, respectively, as previously described.^{38,39} The assay was performed in duplicate, and the data are presented as the mean standard deviation. Viability assay results are given in the Supporting Information, Figure S9.

Feeding Experiment. GYM medium (without malt extract, containing yeast extract as sole nitrogen source) was distributed in 11 50 mL Erlenmeyer flasks, each flask containing 20 mL of culture medium. Eleven L-amino acids, Lys, Ala, Met, Val, Arg, Gly, Phe, Pro, His, Thr, and Glu, were added separately to each flask (1%). These flasks were inoculated with strain *Nocardioopsis* CG3 (DSM 106572), incubated at 37 °C, and stirred at 150 rpm. After 14 days, each culture was extracted with ethyl acetate, and the organic solvent was evaporated to dryness. These crude extracts were redissolved in MeOH, and an aliquot thereof was subjected to HPLC-MS analysis to determine which amino acid enabled strain *Nocardioopsis* CG3 (DSM 106572) to biosynthesize kenalactam A (1).

Feeding with L-alanine-¹⁵N was conducted in 20 mL of modified ISP2 medium (0.4% yeast extract; 0.4% glucose, ¹⁵N-L-alanine) in a 50 mL Erlenmeyer flask. After incubation of strain *Nocardioopsis* CG3 (DSM 106572) at 37 °C for 14 days (150 rpm), the culture was extracted with ethyl acetate, evaporated to dryness, and subjected to HPLC-MS analysis.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00708.

1D and 2D NMR and LC/MS data of compounds 1–5, antiviral test results, and morphological and phylogenetic details of the producing organism (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: Joachim.Wink@helmholtz-hzi.de. Tel/Fax: +49 (0) 531 6181-4223/+49 (0)531 6181-2655.

ORCID

Marc Stadler: 0000-0002-7284-8671

Joachim Wink: 0000-0001-9675-0276

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

O.M. acknowledges the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) of Algeria for its financial support. We also thank D. F. Praditya and E. Steinmann for conducting the HCV infectivity assay, C. Kakosche for recording NMR spectra and for kindly providing the Ala-¹⁵N, and W. Collisi for conducting bioassays.

■ REFERENCES

- Banin, E.; Hughes, D.; Kuipers, O. P. *FEMS Microbiology Reviews* **2017**, *41*, 450–452.
- Genilloud, O. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 1203–1232.
- Meij, A. V. M.; Worsley, S. F.; Hutchings, M. I.; Wezel, G. P. V. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 392–416.
- Abd-Elnaby, H.; Abo-Elala, G.; Abdel-Raouf, U.; Abdelwahab, A.; Hamed, M. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2016**, *30*, 180–191.
- Arocha-Garza, H. F.; Castillo, R. C. D.; Eguiarte, L. E.; Souza, V.; De la Torre-Zavala, S. *PeerJ* **2017**, *5*, e3247 10.7717 .
- Jiang, Y.; Li, Q.; Chen, X.; Jiang, C.; Dhanasekaran, D., Eds. *IntechOpen*: London, UK, 2016; pp 39–57.
- Miyanaga, A.; Kudo, F.; Eguchi, T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *35*, 58–64.
- Bennur, T.; Ravi Kumar, A.; Zinjarde, S. S.; Javdekar, V. J. *Appl. Microbiol.* **2016**, *120*, 1–16.
- Gao, G. B.; Luo, X. X.; Xia, Z. F.; Zhang, Y.; Wan, C. X.; Zhang, L. L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 5005–5009.
- Zhang, Y. G.; Liu, Q.; Wang, H. F.; Park, D. J.; Guo, J. W.; Kim, C. J.; Zhang, Y. M.; Li, W. J. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 230–235.
- Bennur, T.; Ravi Kumar, A.; Zinjarde, S. S.; Javdekar, V. J. *Appl. Microbiol.* **2016**, *120*, 1–16.
- Dashti, Y.; Grkovic, T.; Abdelmohsen, U. R.; Hentschel, U.; Quinn, R. J. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 828–836.
- Kim, J.; Shin, D.; Kim, S. H.; Park, W.; Shin, Y.; Kim, W. K.; Lee, S. K.; Oh, K. B.; Shin, J.; Oh, D. C. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 166–176.
- Ibrahim, A. H.; Attia, E. Z.; Hajjar, D.; Anany, M. A.; Desoukey, S. Y.; Fouad, M. A.; Kamel, M. S.; Wajant, H.; Gulder, T. A. M.; Abdelmohsen, U. R. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 290.
- Ibrahim, A. H.; Desoukey, S. Y.; Fouad, M. A.; Kamel, M. S.; Gulder, T. A. M.; Abdelmohsen, U. R. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 147.
- Sun, M. W.; Guo, Z. X.; Lu, C. H. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 1036–1041.
- Du, Y.; Derewacz, D. K.; Deguire, S. M.; Teske, J.; Ravel, J.; Sulikowski, G. A.; Bachmann, B. O. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6568–6575.
- Tian, S. Z.; Pu, X.; Luo, G.; Zhao, L.-X.; Xu, L.-H.; Li, W.-J.; Luo, Y. J. *Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3006–3012.
- Raju, R.; Piggott, A. M.; Conte, M.; Tnimov, Z.; Alexandrov, K.; Capon, R. J. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 3194–320.
- Xu, D.; Nepal, K. K.; Chen, J.; Harmody, D.; Zhu, H.; McCarthy, P. J.; Wright, A. E.; Wang, G. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2018**, *3* (4), 246–251.
- Nikapitiya, C. *Adv. Food Nutr. Res.* **2012**, *65*, 363–387.
- Müller, H.; Bischoff, E.; Fiedler, V. B.; Weber, K.; Fugmann, B.; Rosen, B. German Patent DE4231289A1, 1994. US Patent US5,565,561, 1996.
- Thawai, C.; Kittakoop, P.; Tanasupawat, S.; Suwanborirux, K.; Sriklung, K.; Thebtaranonth, Y. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 640.
- Skellam, E. J.; Steward, A. K.; Strangman, W. K.; Wright, J. L. *J. Antibiot.* **2013**, *66*, 431–441.
- Oh, D. C.; Poulsen, M.; Currie, C. R.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 752–755.
- Schulze, C. J.; Donia, M. S.; Siquera-Neto, J. L.; Ray, D.; Raskatov, J. A.; Green, R.; Mc Kerrow, J. H.; Fischbach, M. A.; Lington, R. G. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (10), 2373–2381.
- Li, L.; Cai, Y.; Jiang, Y.; Liu, J.; Ma, J.; Yuan, C.; Mu, Y.; Han, L.; Huang, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (6), 1599–604.
- Ammermann, J.; Schmidt, T.; Donner, J.; Reck, M.; Dalton, M.; Stumpp, N.; Stiesch, M.; Wagner-Döbler, I.; Kirschning, A. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8553.
- Caffrey, P.; De Poire, E.; Sheehan, J.; Sweeney, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100* (9), 3893–3908.
- Kawahara, T.; Fujiwara, T.; Kagaya, N.; Shin-ya, K. *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 390–392.
- Leutou, A. S.; Yang, I.; Le, T. C.; Hahn, D.; Lim, K. M.; Nam, S. J.; Fenical, W. J. *Antibiot.* **2018**, *71*, 609–612.
- Miyanaga, A. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2017**, *81*, 2227–2236.
- Miyanaga, A.; Kudo, F.; Eguchi, T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *35*, 58–64.
- Kudo, F.; Miyanaga, A.; Eguchi, T. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1056.
- Jørgensen, H.; Degnes, K. F.; Dikiy, A.; Fjærøvik, E.; Klinkenberg, G.; Zotchev, S. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 283–293.
- Rupic, Z.; Chepkirui, C.; Hernández-Restrepo, M.; Crous, P.; Luangsa-ard, J.; Stadler, M. *MycKeys* **2018**, *33*, 1–23.

- (37) Noumeur, S. R.; Helaly, S. E.; Jansen, R.; Gereke, M.; Stradal, T. E. B.; Harzallah, D.; Stadler, M. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (5), 1531–1540.
- (38) Mulwa, L.; Jansen, R.; Praditya, D.; Mohr, K.; Wink, J.; Steinmann, E.; Stadler, M. *Molecules* **2018**, *23*, 542.
- (39) Ciesek, S.; von Hahn, T.; Colpitts, C. C.; Schang, L. M.; Friesland, M.; Steinmann, J.; Manns, M. P.; Ott, M.; Wedemeyer, H.; Meuleman, P.; Pietschmann, T.; Steinmann, E. *Hepatology* **2011**, *54*, 1947–1955.

Supporting information

Kenalactams A–E, Polyene Macrolactams, isolated from

Nocardiosis CG3

Omar Messaoudi,^{†, ‡, §} Enge Sudarman,^{⊥, †} Mourad Bendahou,[‡] Rolf Jansen,^{⊥, †} Marc Stadler,^{⊥, †} and Joachim Wink*,^{†, †}

[†] Microbial Strain Collection, Helmholtz Centre for Infection Research GmbH (HZI), Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany.

[‡] Microbiology Laboratory Applied to Food Biomedical and Environmental (LAMAABE), University of Abou bekr Belkaid, Faculty of SNV-STU-Ex Imama Biomedical Complex, PB 119, Tlemcen 13000, Algeria.

[§] Faculty of Science, Department of Biology, University of Amar Telidji, Laghouat, Algeria.

[⊥] Department Microbial Drugs, Helmholtz Centre for Infection Research GmbH (HZI), Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany.

[†] German Centre for Infection Research Association (DZIF), Partner site Hannover-Braunschweig, Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany.

* Tel: +49-531-61814223. Fax: +49-531-9499. Email: joachim.wink@helmholtz-hzi.de.

Content

	Page
1. Morphological description of strain <i>Nocardioopsis</i> CG3 (DSM 106572)	
Figure S1. A. Optical microscope B. Scanning electron micrographs.	3
2. Phylogenetic study	
Figure S2. Neighbour-joining phylogenetic tree of strain <i>Nocardioopsis</i> CG3 (DSM 106572) and closest strains.	4
3. Spectroscopic data of kenalactams A-E (1-5)	
Figure S3. LC/MS spectrum of 1	5
Figure S4. LC-MS spectrum of 2	6
Figure S5. LC-MS spectrum of 3	6
Figure S6. LC-MS spectrum of 4	7
Figure S7. LC-MS spectrum of 5	7
Figure S8. ESIMS profile of L-alanine- ¹⁵ N feeding to <i>Nocardioopsis</i> CG3 (DSM 106572).	8
Figure S9. ESIMS profile of L-alanine- ¹⁴ N feeding to <i>Nocardioopsis</i> CG3 (DSM 106572).	8
Table S1. $\Delta\delta^{SR}$ data for the 9-(<i>S</i>)- and 9-(<i>R</i>)-MTPA esters of kenalactam A (1a and 1b) in CDCl ₃ .	9
Spectrum S1. ¹ H NNMR spectrum of 1 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	10
Spectrum S2. ¹³ C NMR spectrum of 1 in DMSO- <i>d</i> ₆ (176 MHz).	11
Spectrum S3. ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT spectrum of 1 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz, 176 MHz).	12
Spectrum S4. ¹ H, ¹ H COSY spectrum of 1 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	13
Spectrum S5. ¹ H, ¹³ C HMBC spectrum of 1 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz, 176 MHz).	14
Spectrum S6. ¹ H, ¹ H ROESY spectrum of 1 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	15
Spectrum S7. ¹ H NMR spectrum of 2 in methanol- <i>d</i> ₄ (700 MHz).	16
Spectrum S8. ¹³ C NMR spectrum of 2 in methanol- <i>d</i> ₄ (176 MHz).	17
Spectrum S9. ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT spectrum of 2 in methanol- <i>d</i> ₄ (700 MHz, 176 MHz).	18
Spectrum S10. ¹ H, ¹ H COSY NMR spectrum of 2 in methanol- <i>d</i> ₄ (700 MHz).	19
Spectrum S11. ¹ H, ¹³ C HMBC spectrum of 2 in methanol- <i>d</i> ₄ (700 MHz, 176 MHz).	20
Spectrum S12. ¹ H, ¹ H ROESY spectrum of 1 in methanol- <i>d</i> ₄ (700 MHz).	21
Spectrum S13. ¹ H NNMR spectrum of 3 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	22
Spectrum S14. ¹³ C NMR spectrum of 3 in DMSO- <i>d</i> ₆ (176 MHz).	23
Spectrum S15. ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT spectrum of 3 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz, 176 MHz).	24
Spectrum S16. ¹ H, ¹ H COSY spectrum of 3 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	25
Spectrum S17. ¹ H, ¹³ C HMBC spectrum of 3 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz, 176 MHz).	26
Spectrum S18. ¹ H, ¹ H ROESY spectrum of 3 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	27
Spectrum S19. ¹ H NNMR spectrum of 4 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	28
Spectrum S20. ¹³ C NMR spectrum of 4 in DMSO- <i>d</i> ₆ (176 MHz).	29
Spectrum S21. ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT spectrum of 4 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz, 176 MHz).	30
Spectrum S22. ¹ H, ¹ H COSY spectrum of 4 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	31
Spectrum S23. ¹ H, ¹³ C HMBC spectrum of 4 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz, 176 MHz).	32
Spectrum S24. ¹ H, ¹ H ROESY spectrum of 4 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	33
Spectrum S25. ¹ H NNMR spectrum of 5 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	34
Spectrum S26. ¹³ C NMR spectrum of 5 in DMSO- <i>d</i> ₆ (176 MHz).	35
Spectrum S27. ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT spectrum of 5 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz, 176 MHz).	36
Spectrum S28. ¹ H, ¹ H COSY spectrum of 5 in DMSO- <i>d</i> ₆ (700 MHz).	37

Spectrum S29. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of 5 in DMSO- d_6 (700 MHz, 176 MHz).	38
Spectrum S30. ^1H , ^1H ROESY spectrum of 5 in DMSO- d_6 (700 MHz)	39
4. Assay	
Figure S10. Hepatitis C Virus (HCV) assay	40

1. Morphological description of strain *Nocardiopsis CG3* (DSM 106572)

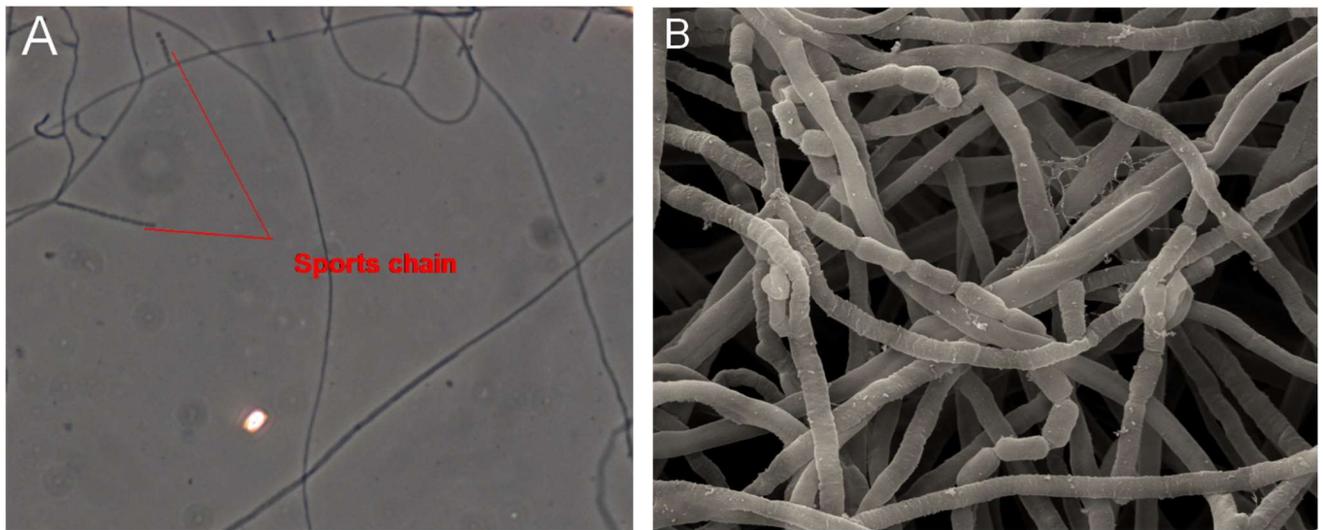


Fig S1: Short spores chains of *Nocardiopsis CG3* (DSM 106572) **A.** Optical microscope **B.** Scanning electron micrographs.

2. Phylogenetic study

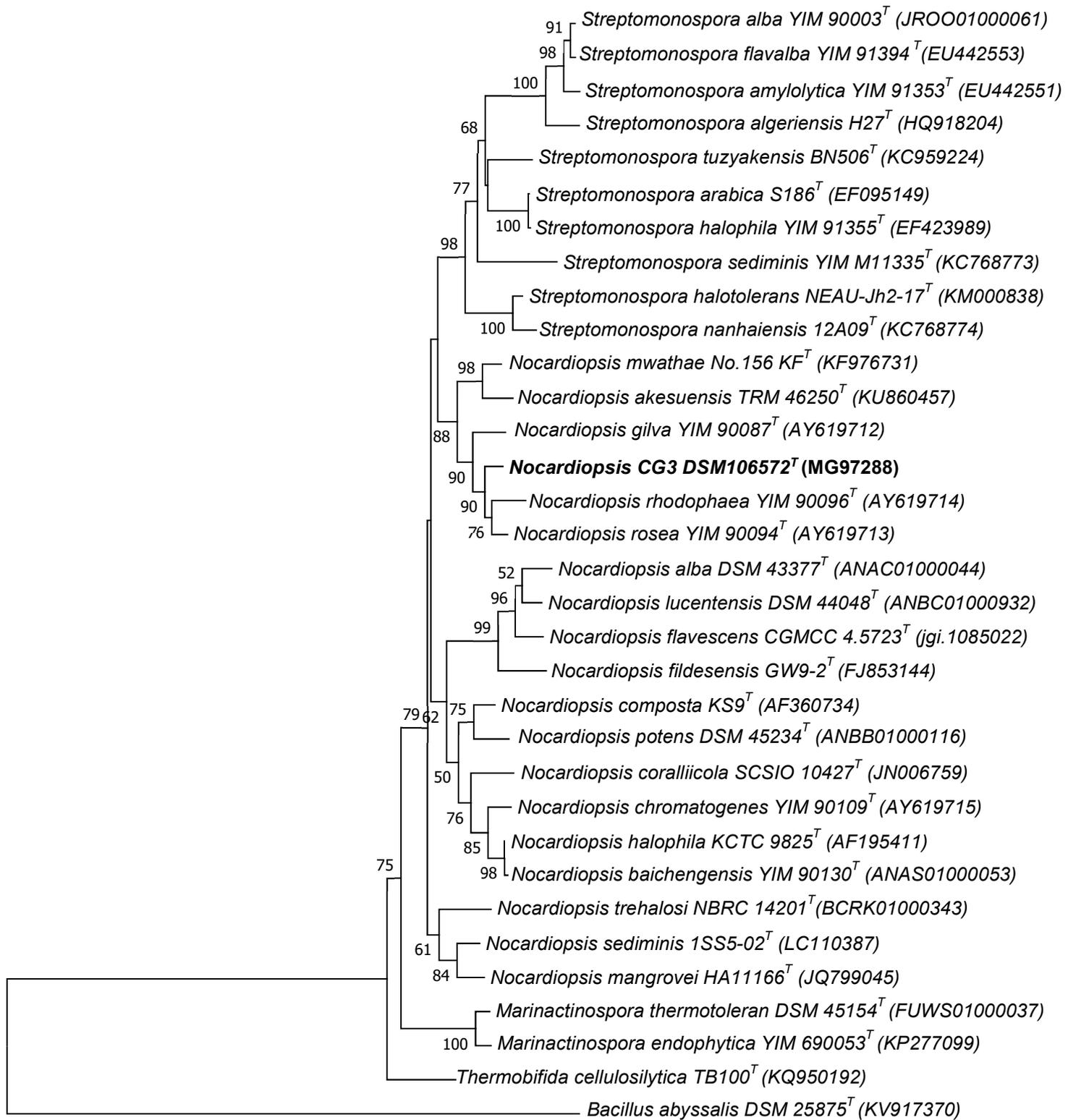


Fig S2: The 16S rRNA gene sequence of the isolate *Nocardioopsis CG3* (DSM 106572) was aligned with those of its closest relatives using the multiple sequence alignment program CLUSTAL W. Phylogenetic analysis was performed using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987), via the software MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Topologies of the resultant trees were evaluated by the bootstrap resampling method of Felsenstein (1985) with 1000 replicates (only values $\geq 50\%$ are shown). *Bacillus abyssalis* DSM 25875^T (KV917370) was used as an outgroup.

3. Spectral data of kenalactams A-E (1-5)

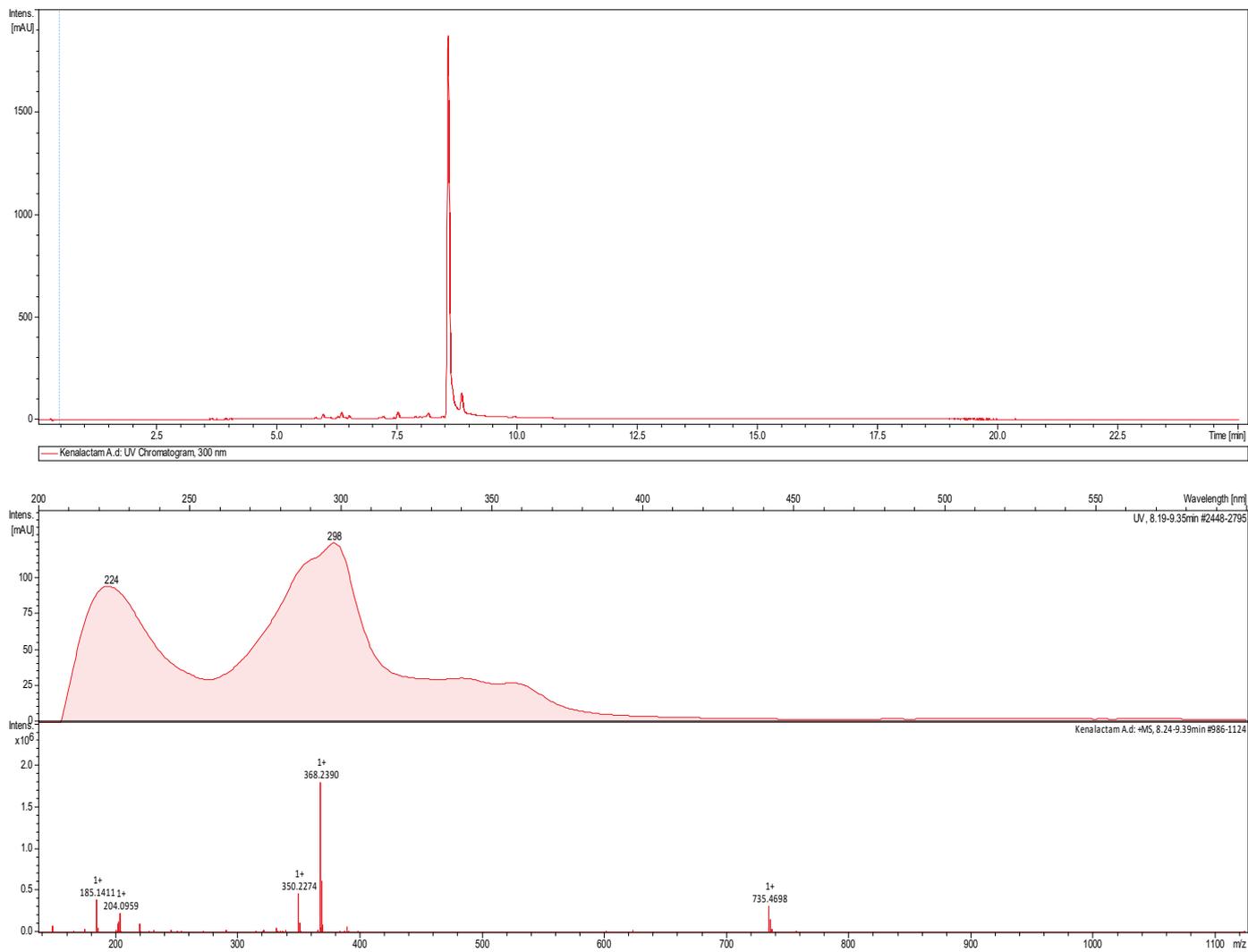


Figure S3. LC/MS spectrum of 1

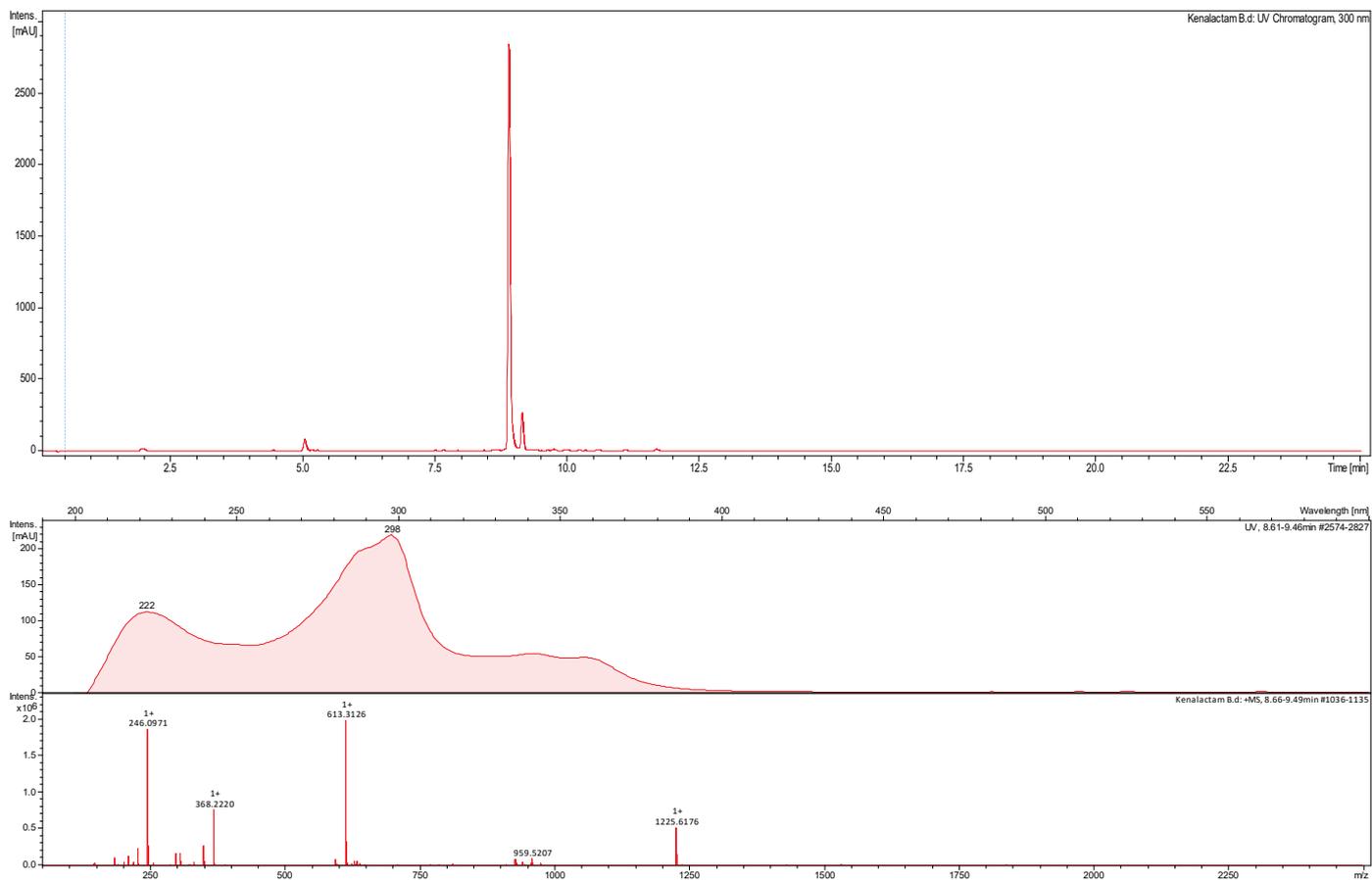


Figure S4. LC/MS spectrum of 2

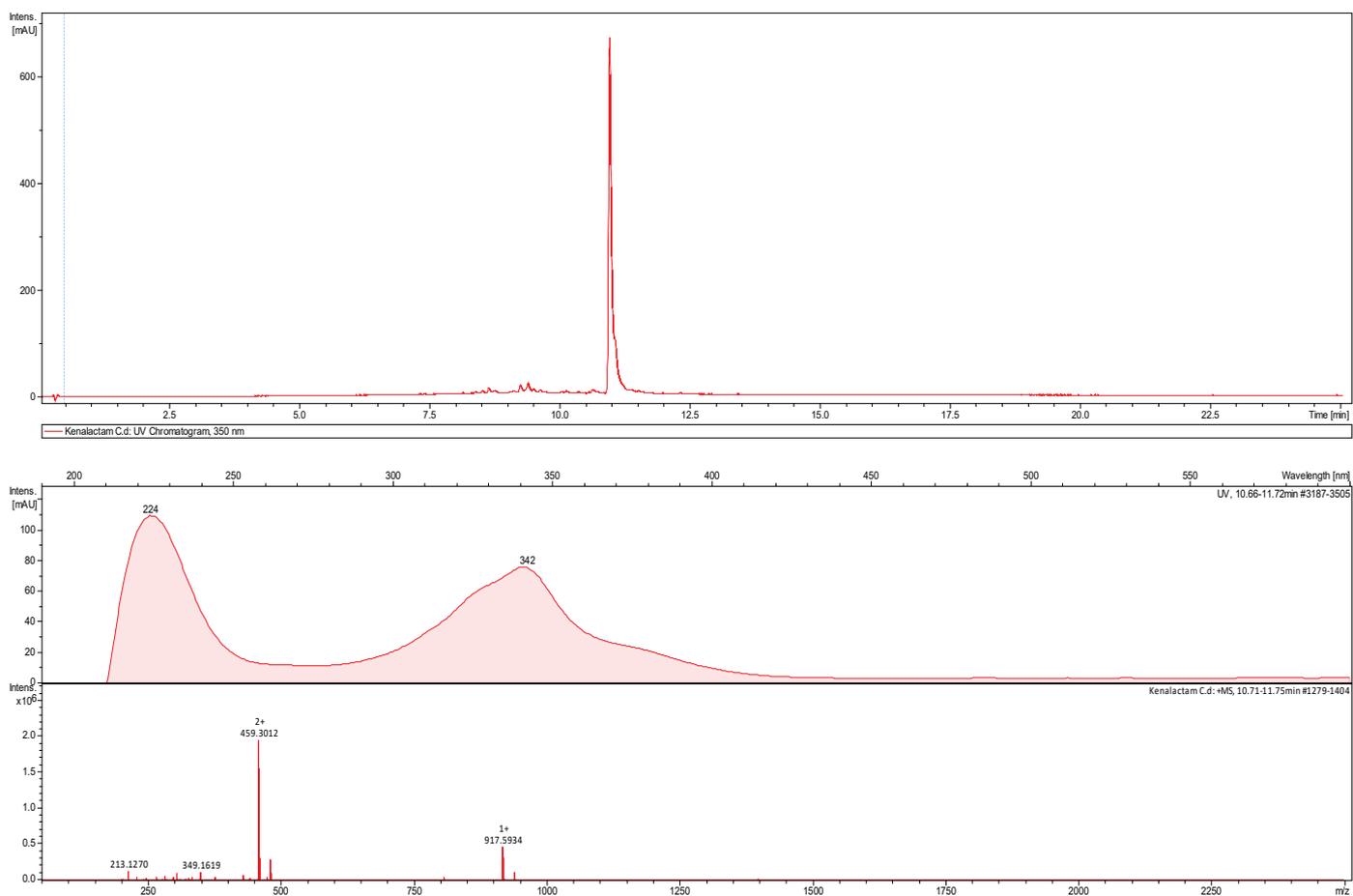


Figure S5. LC/MS spectrum of 3

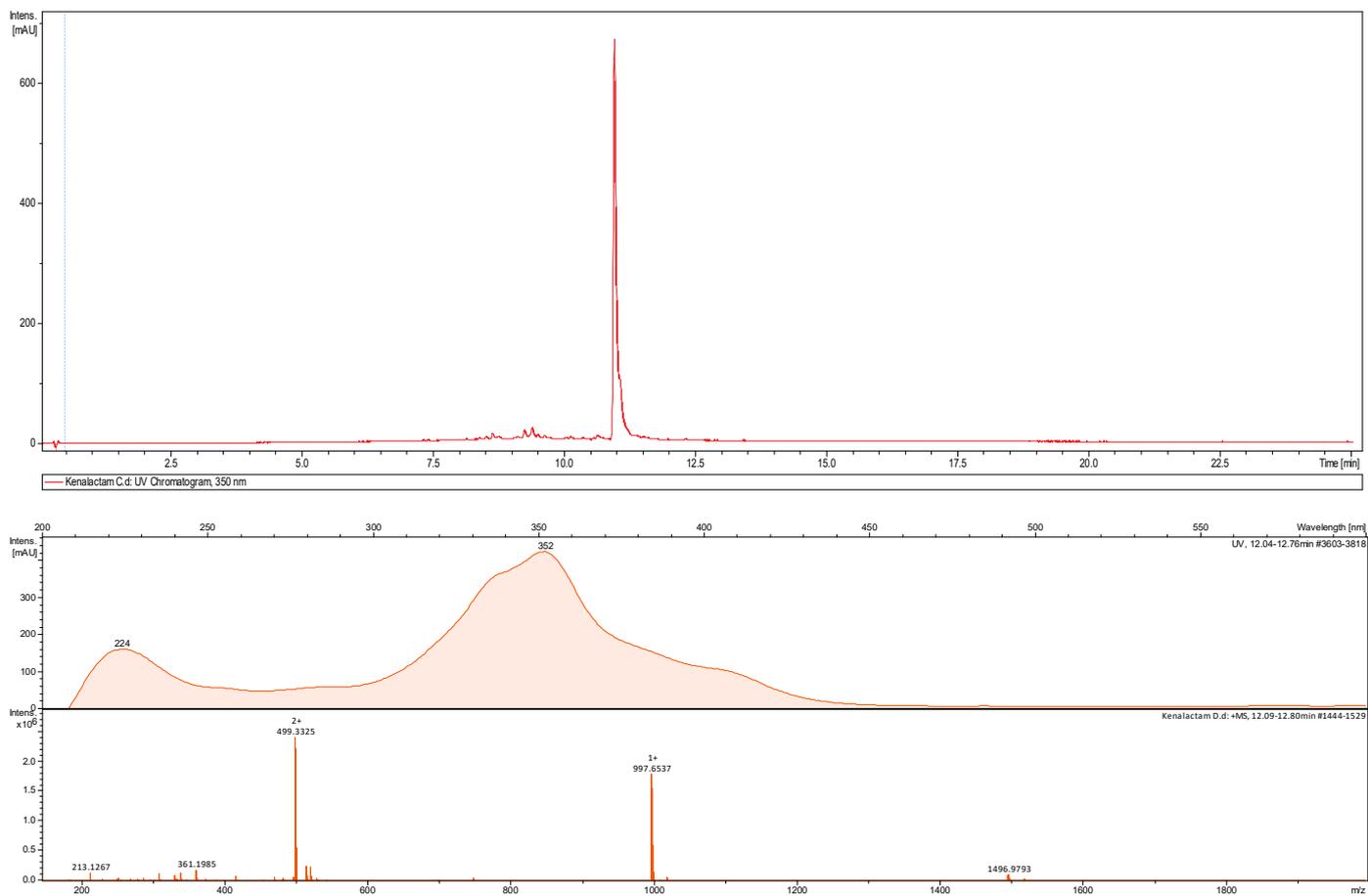


Figure S6. LC/MS spectrum of 4

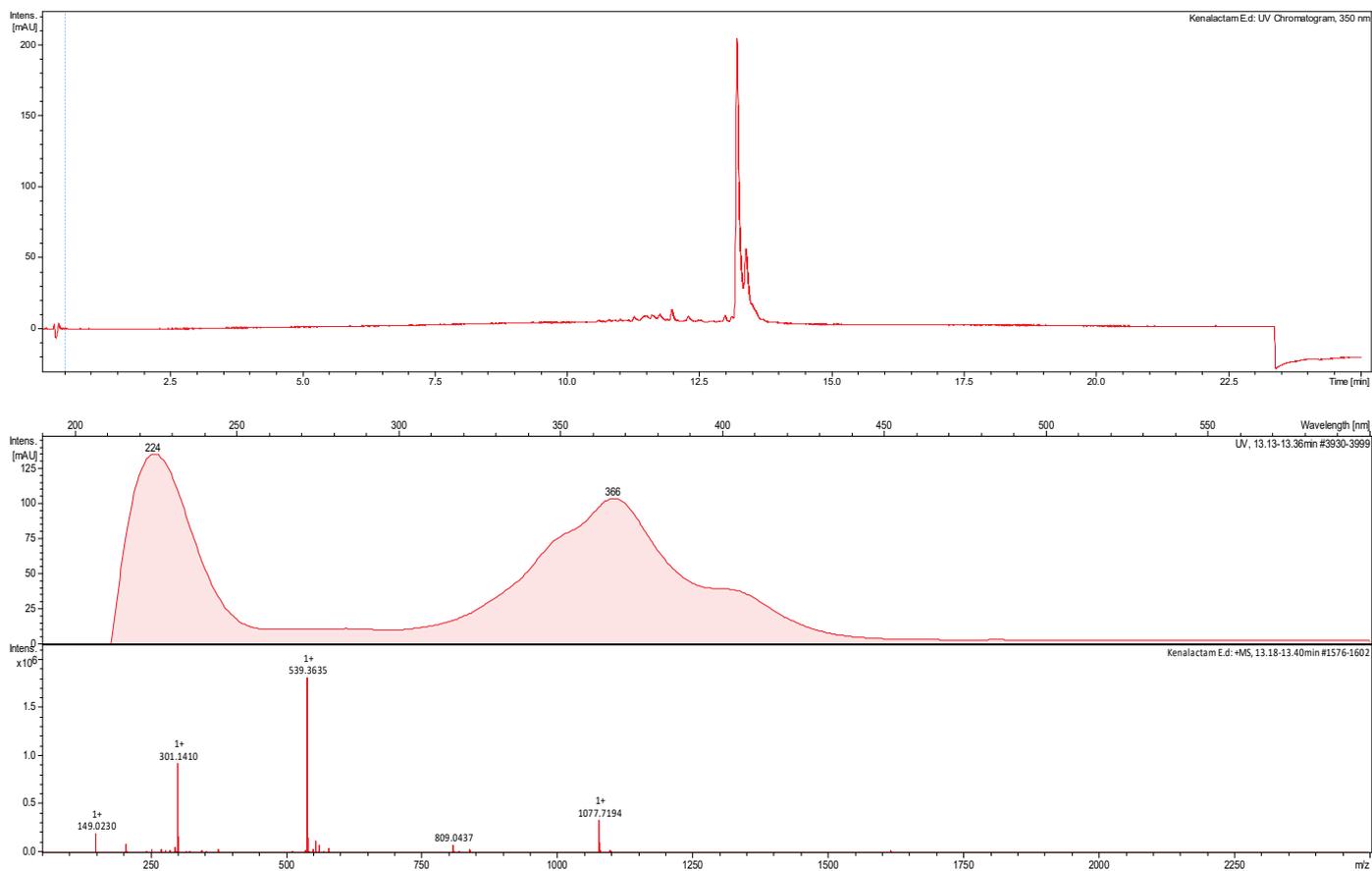


Figure S7. LC/MS spectrum of 5.

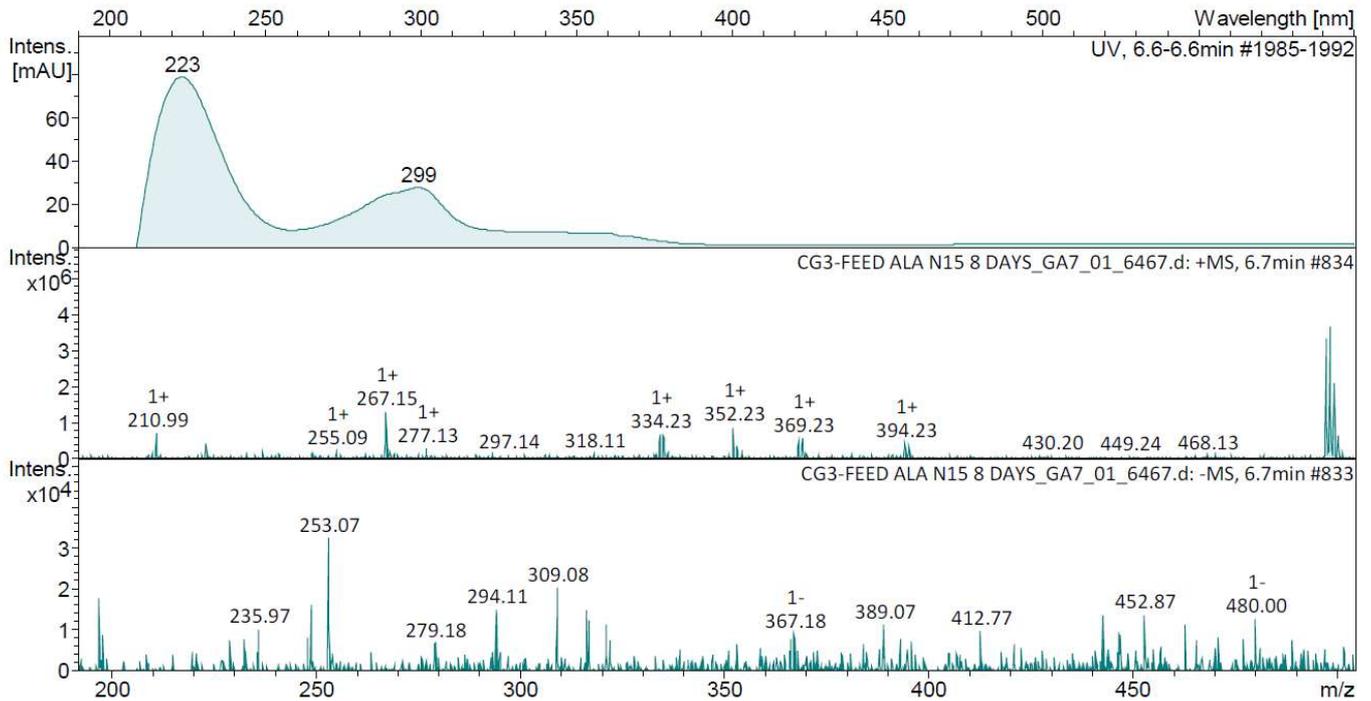


Figure S8. ESIMS profile of L-alanine-¹⁵N feeding to *Nocardopsis* CG3 (DSM 106572). MS profile of kenalactam A (1) peak, m/z 369.23 $[M+H]^+$ of $^{12}C_{23}H_{29}^{15}NO_3$, m/z 367.18 $[M+H]^-$ of $^{12}C_{23}H_{27}^{15}NO_3$.

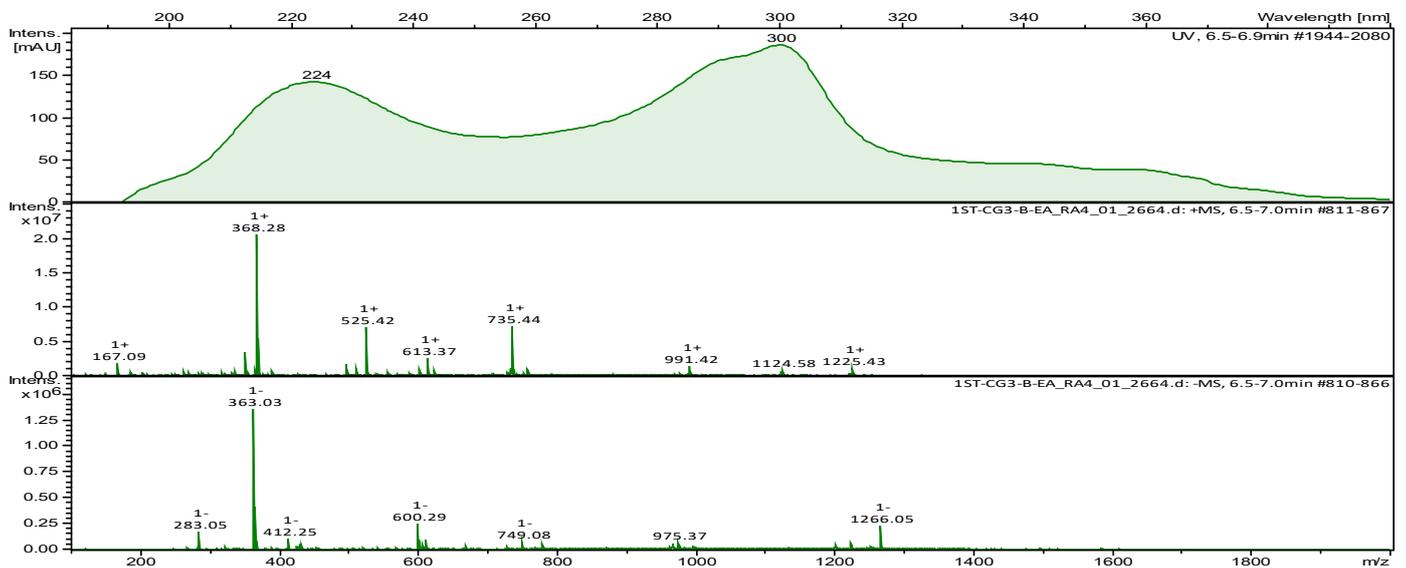
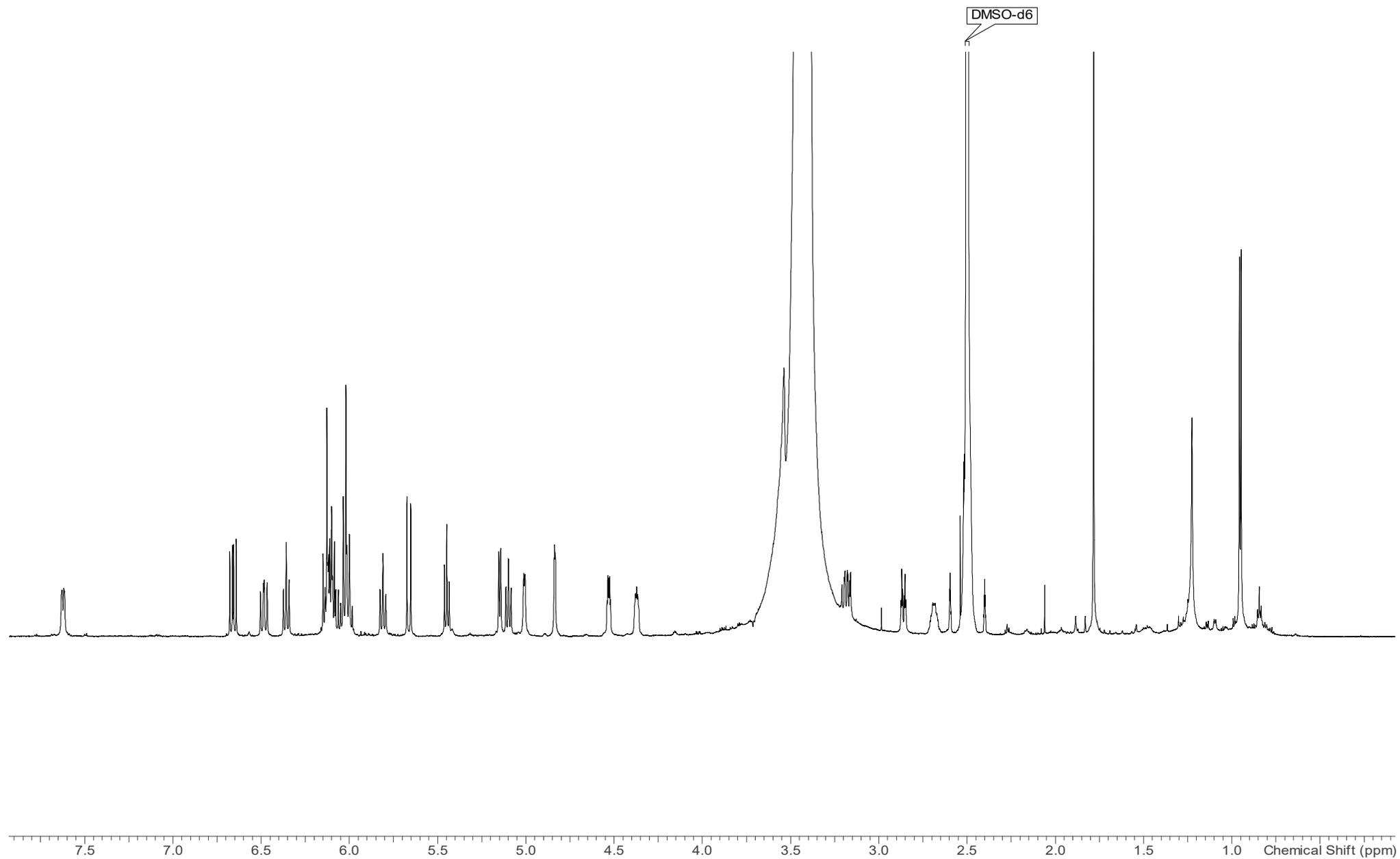


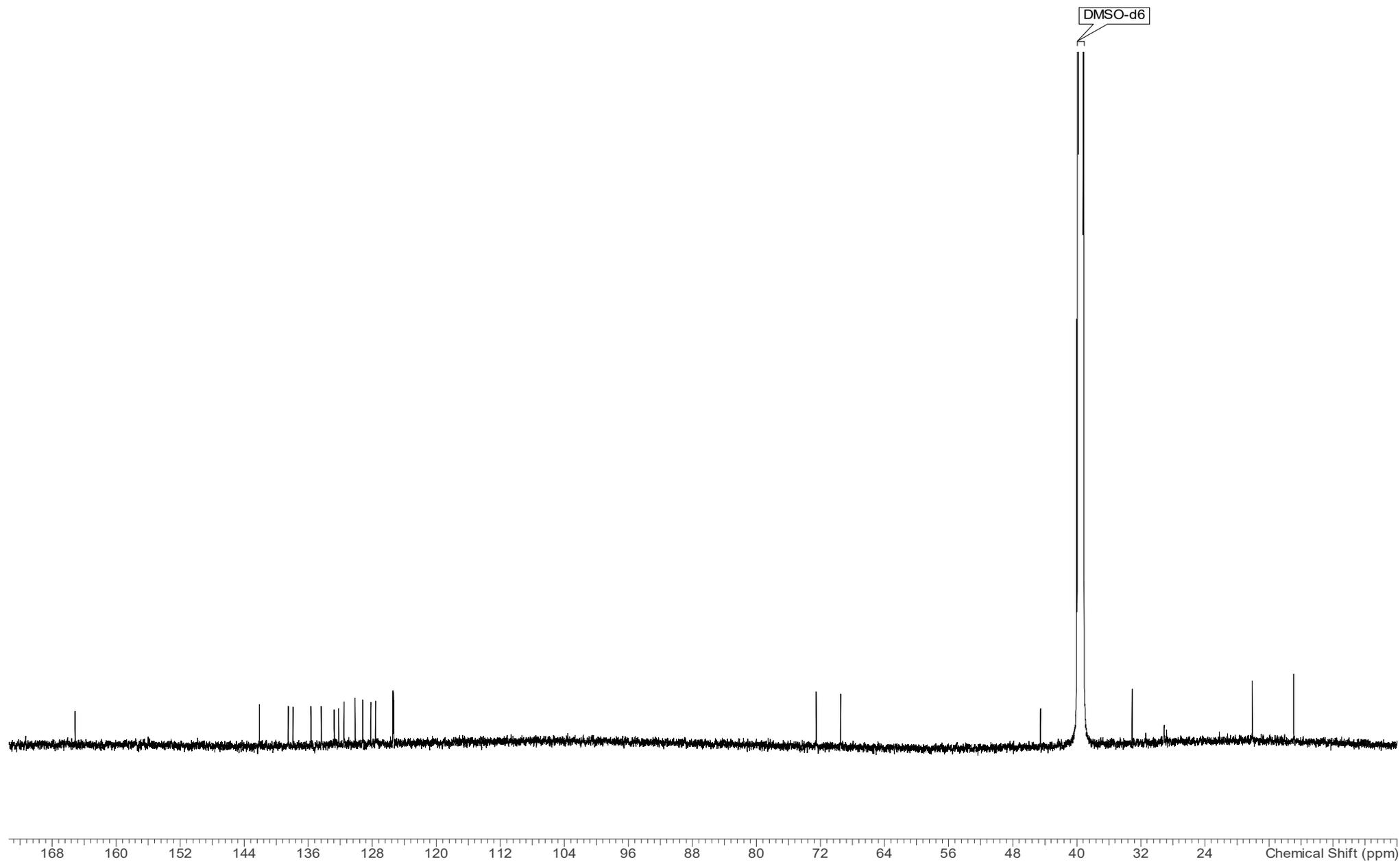
Figure S9: ESIMS profile of L-alanine-¹⁴N feeding to *Nocardopsis* CG3 (DSM 106572). MS profile of kenalactam A (1) peak m/z 368.28 $[M+H]^+$ of $^{12}C_{23}H_{29}NO_3$.

Table S1. $\Delta\delta^{SR}$ data for the 9-(*S*)- and 9-(*R*)-MTPA esters of kenalactam A (**1a** and **1b**) in CDCl₃.

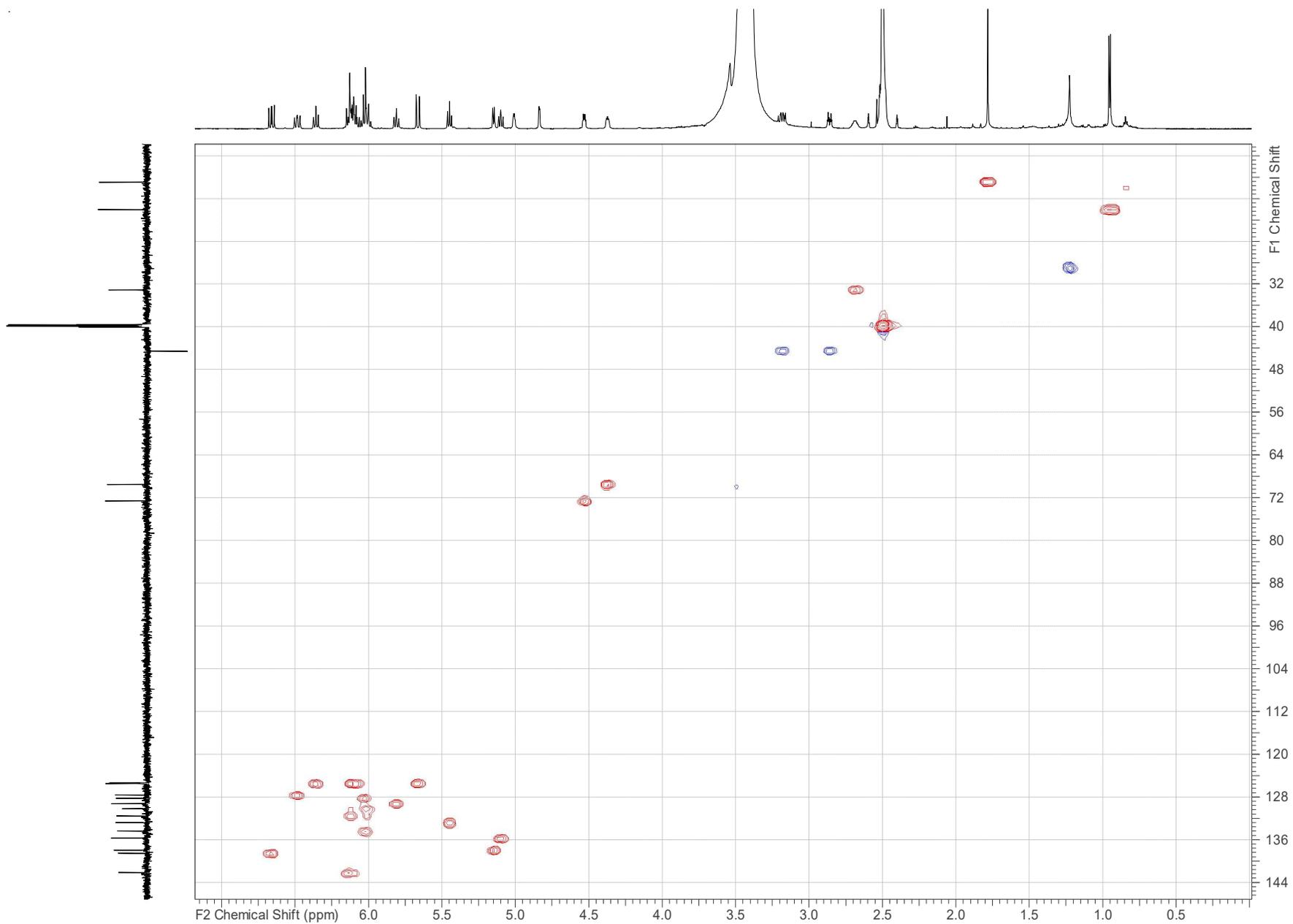
pos.	<i>S</i> -MTPA ester (1a)	<i>R</i> -MTPA ester (1b)	$\Delta\delta^{SR}$ (ppm)
	δ_H	δ_H	
2	5.74	5.75	-0.01
3	6.65	6.64	0.01
4	6.19	6.19	0.00
5	6.18	6.18	0.00
7	5.23	5.25	-0.02
8	4.89	4.98	-0.09
9	5.85	5.80	0.05
10	5.57	5.49	0.08
11	6.33	6.32	0.01
12	6.11	6.11	0.00
13	6.26	6.26	0.00
14	6.06	6.06	0.00
15	6.60	6.60	0.00
16	5.93	5.93	0.00
17	6.10	6.10	0.00
18	6.55	6.56	-0.01
19	5.32	5.32	0.00
20	2.79	2.80	-0.01
21a	3.55	3.55	0.00
21b	2.91	2.91	0.00
22	1.92	1.93	-0.01
23	1.08	1.08	0.00



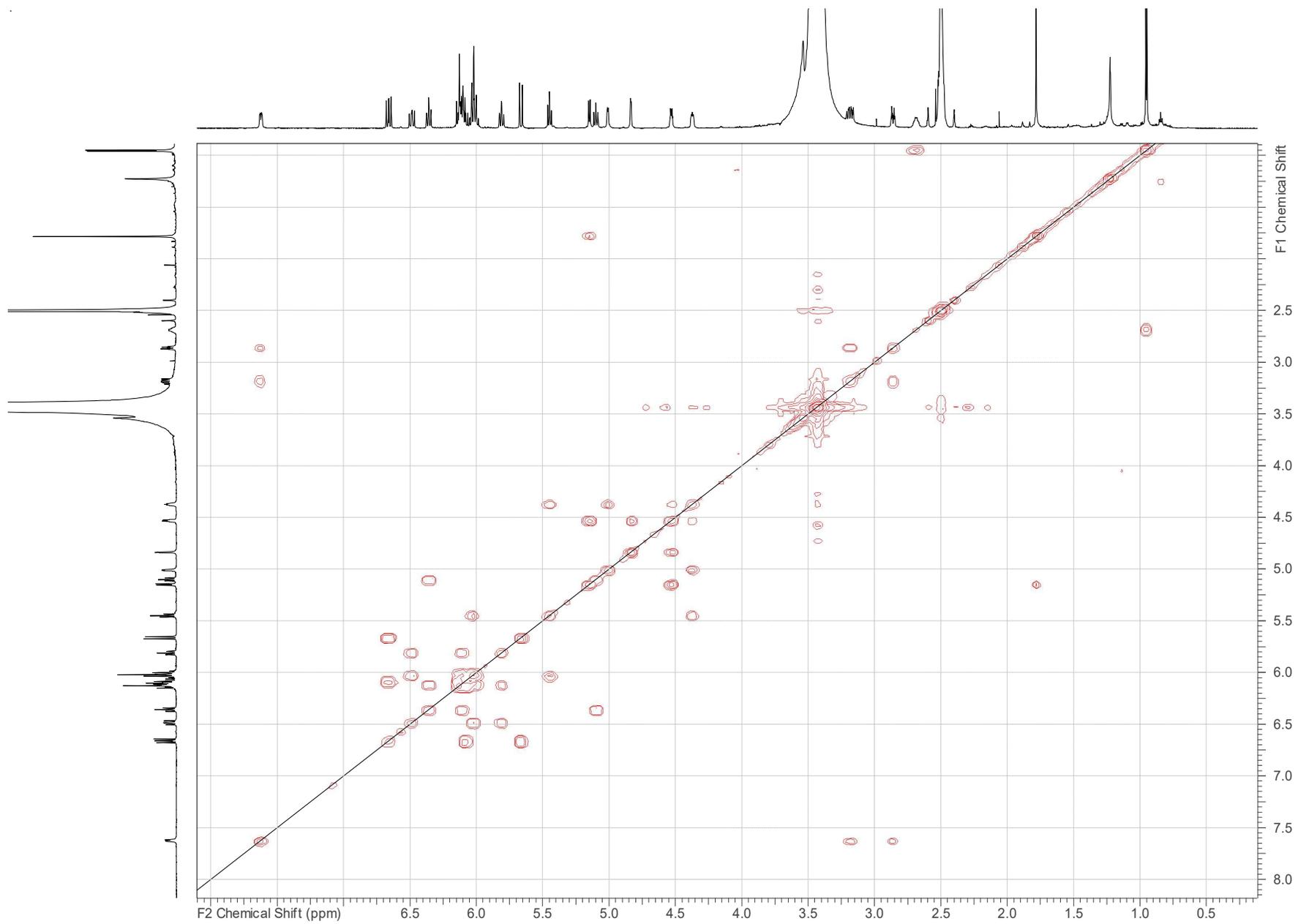
Spectrum S1. ^1H NMR spectrum of kenalactam A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).



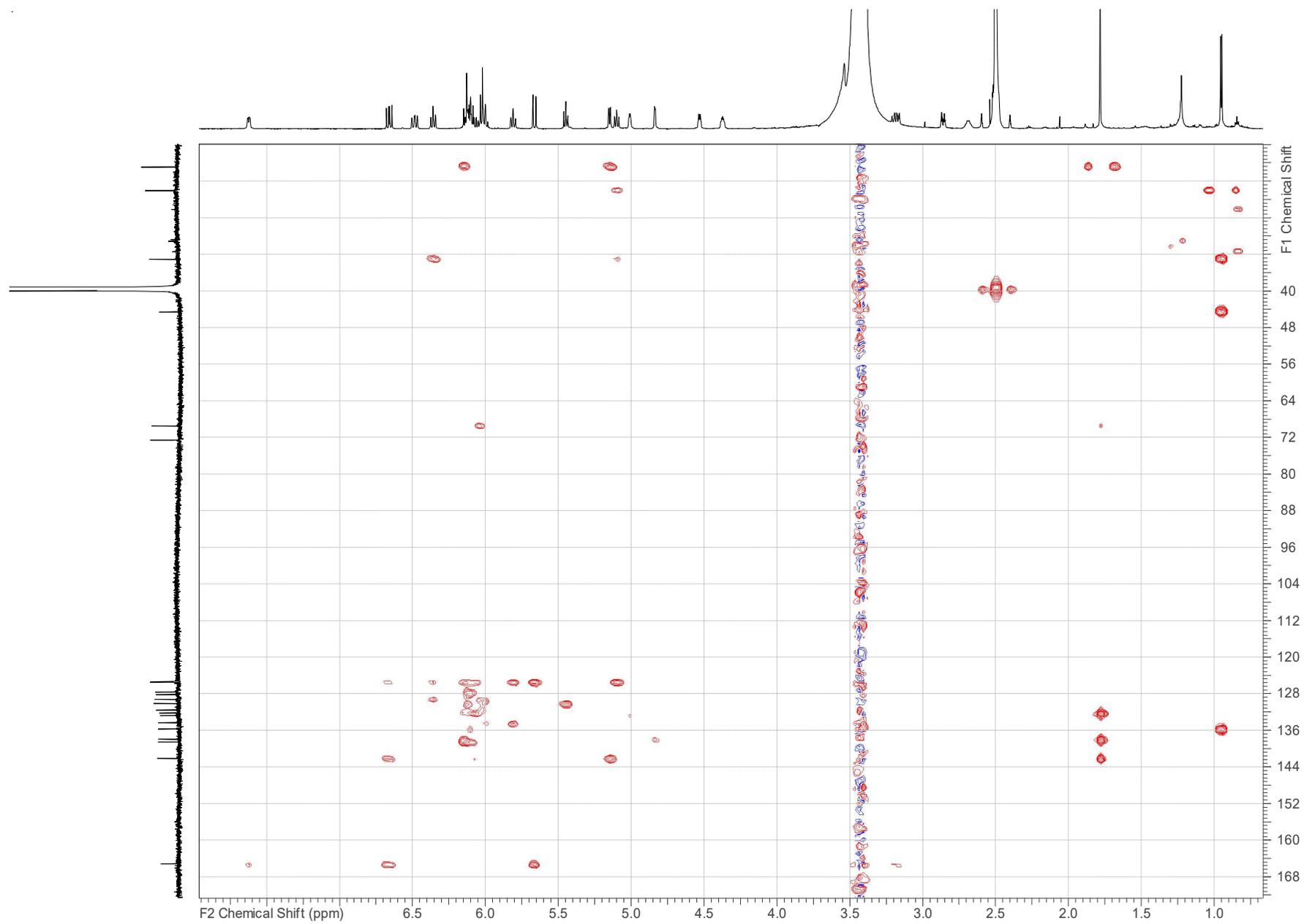
Spectrum S2. ^{13}C NMR spectrum of kenalactam A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$ (176 MHz).



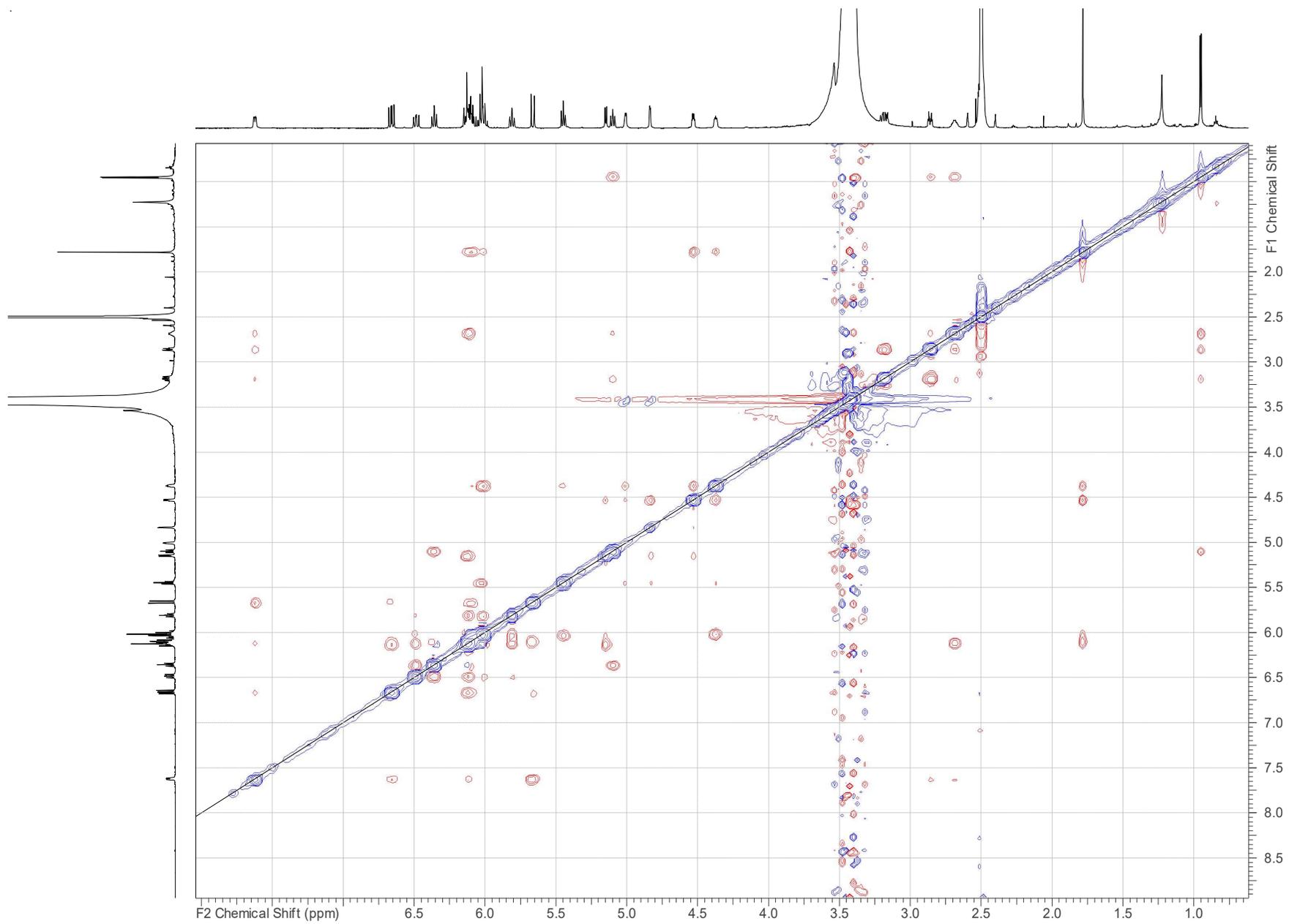
Spectrum S3. ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT spectrum of **1** in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



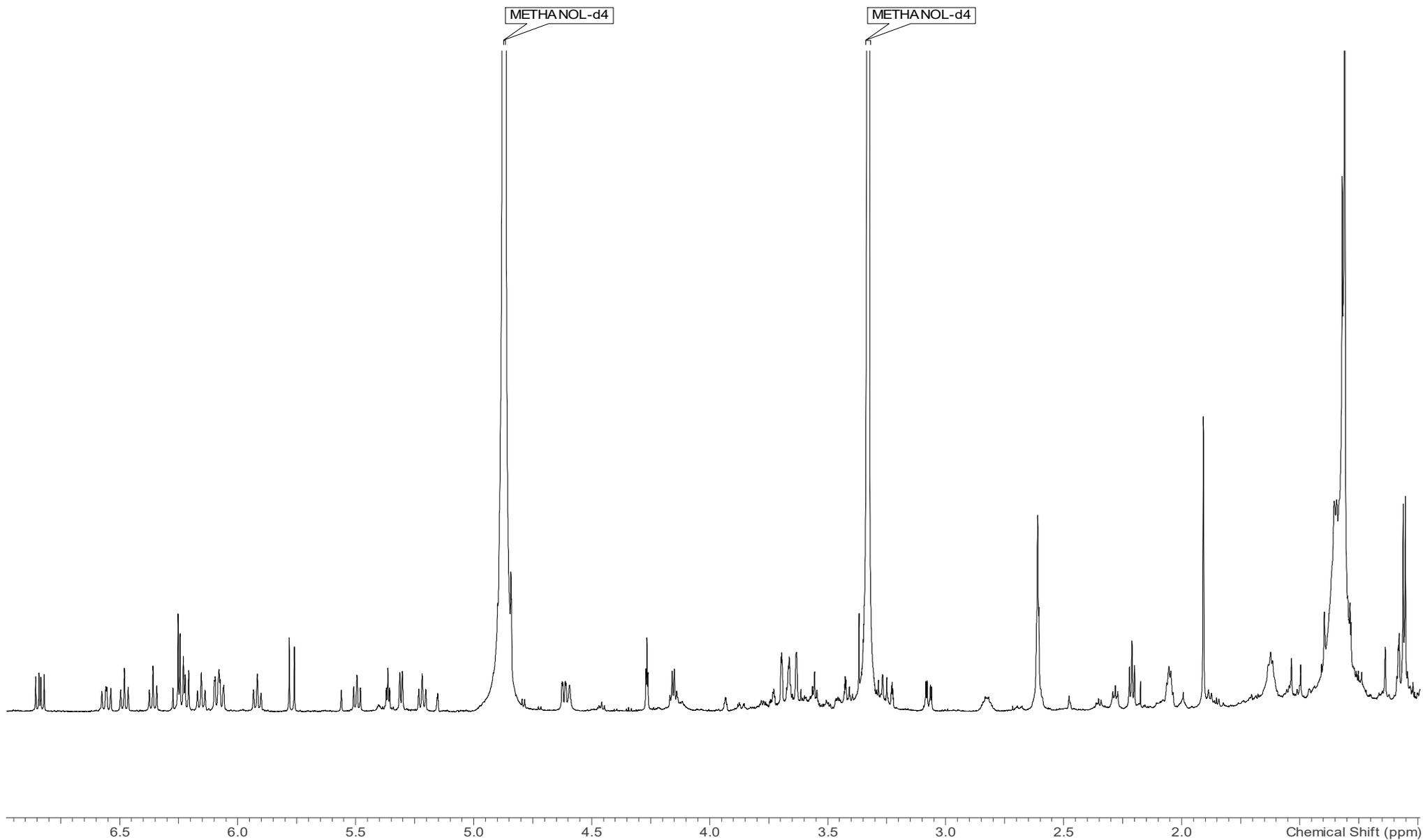
Spectrum S4. ^1H , ^1H COSY spectrum of kenalactam A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).



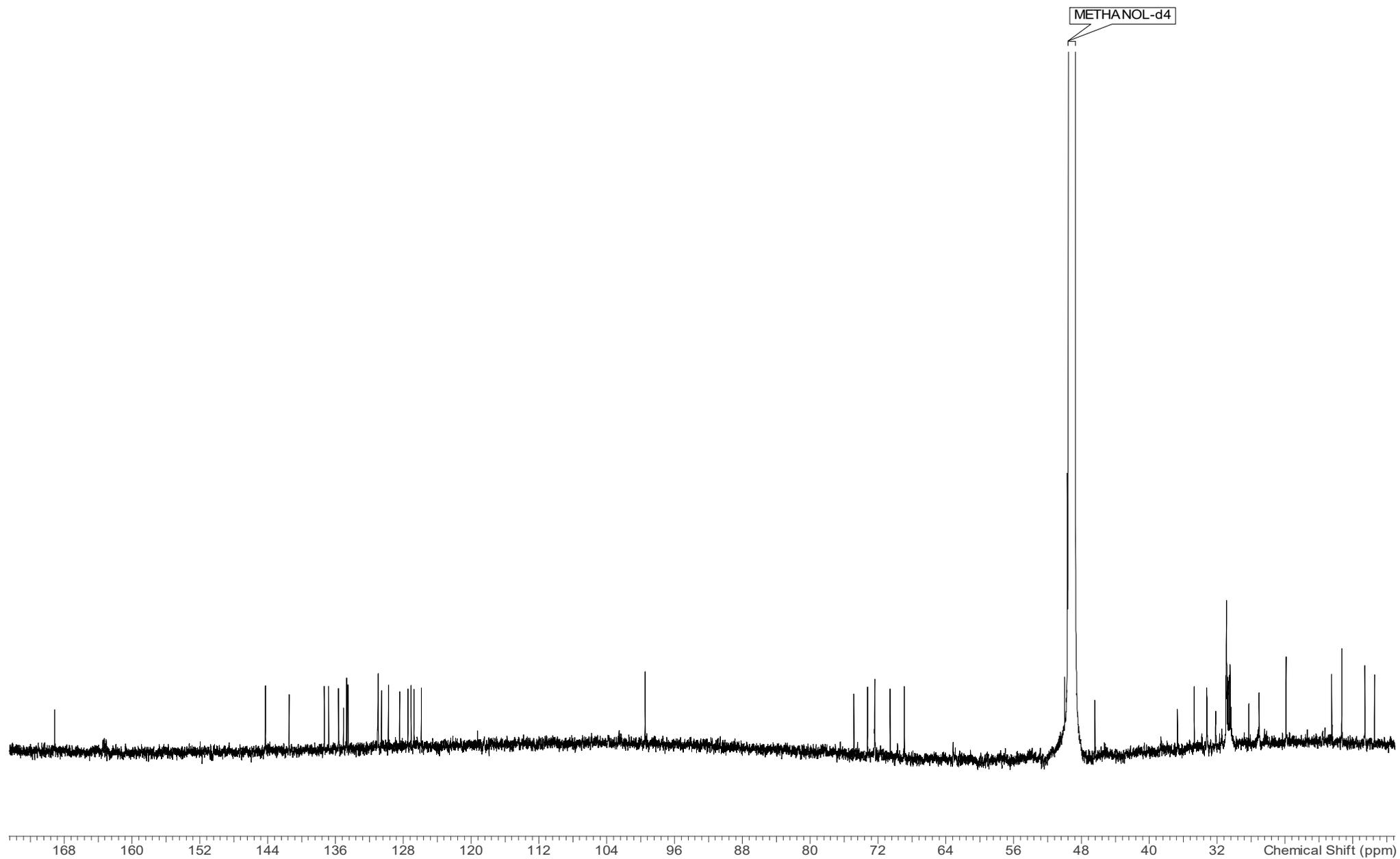
Spectrum S5. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of **1** in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



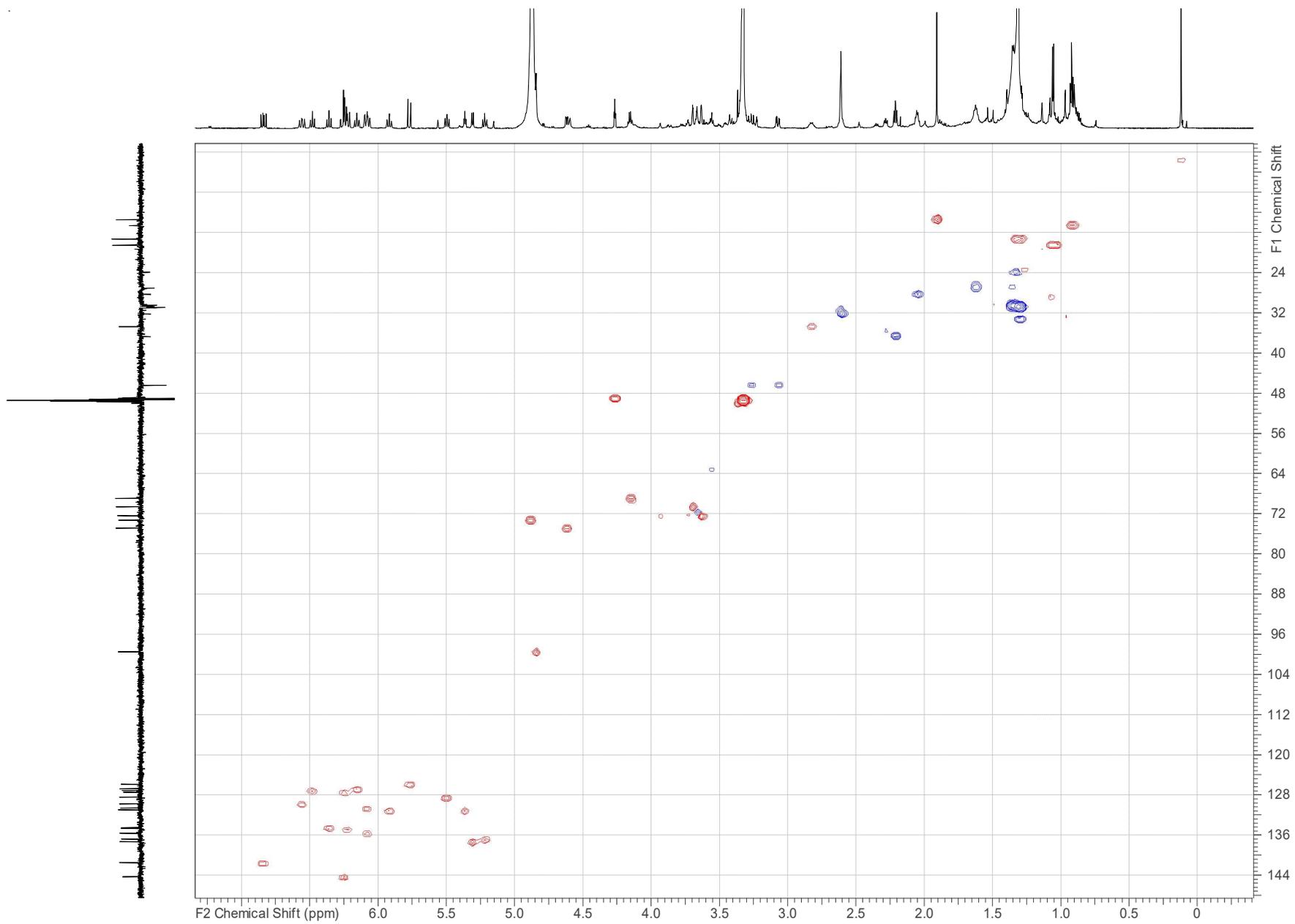
Spectrum S6. ^1H , ^1H ROESY spectrum of kenalactam A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).



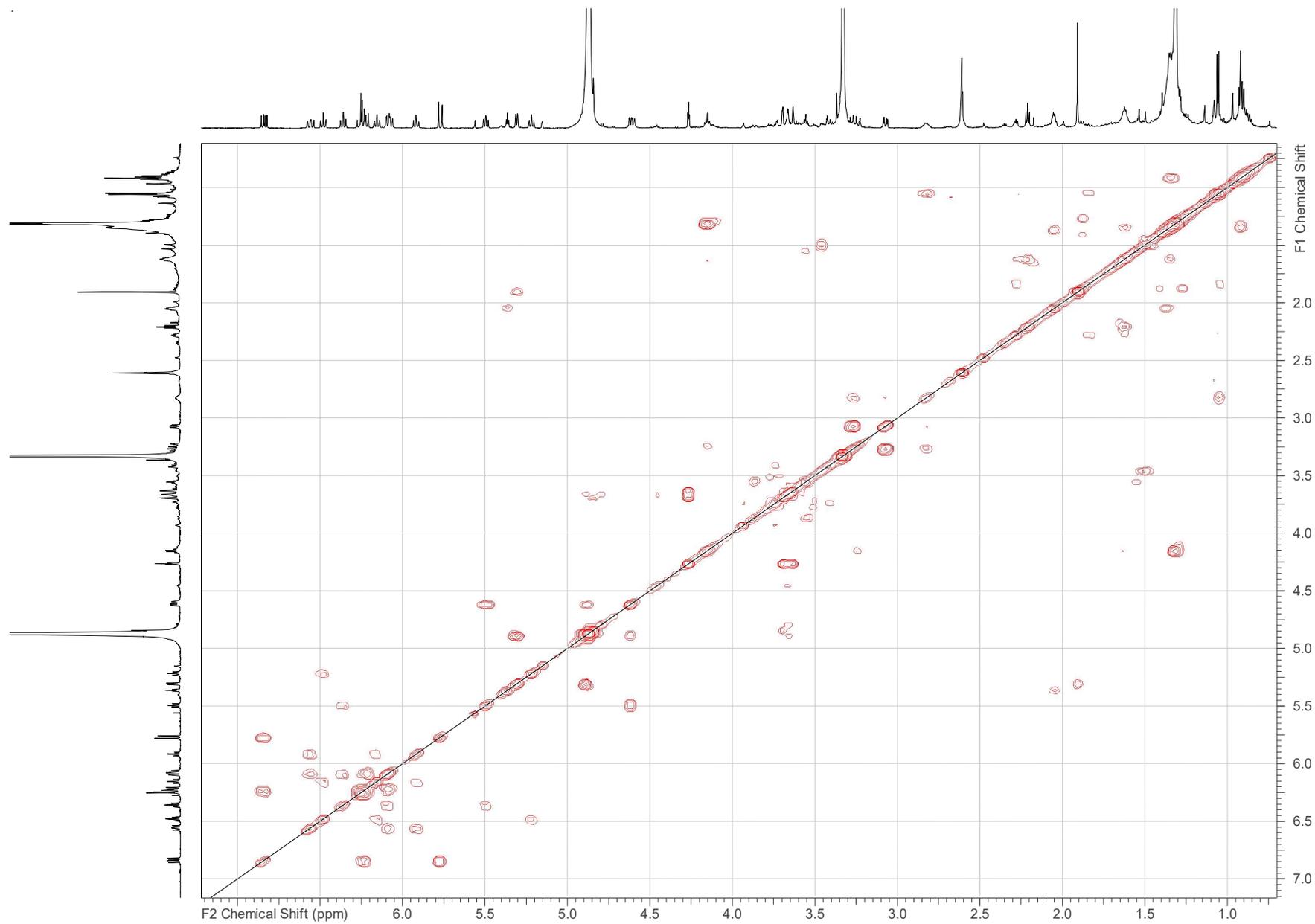
Spectrum S7. ^1H NMR spectrum of kenalactam B (**2**) in methanol- d_4 (700 MHz).



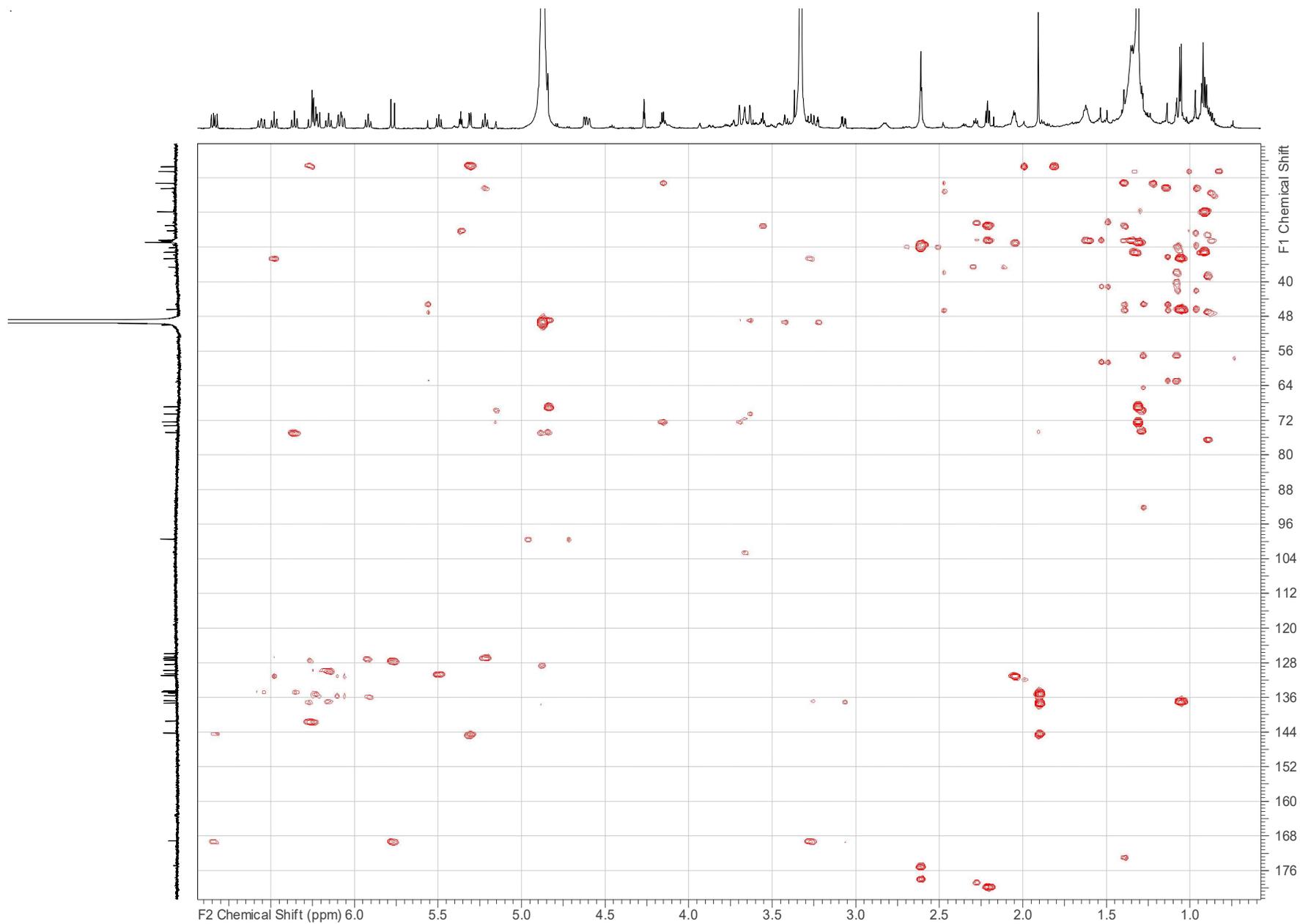
Spectrum S8. ^{13}C NMR spectrum of kenalactam B (**2**) in methanol- d_4 (176 MHz).



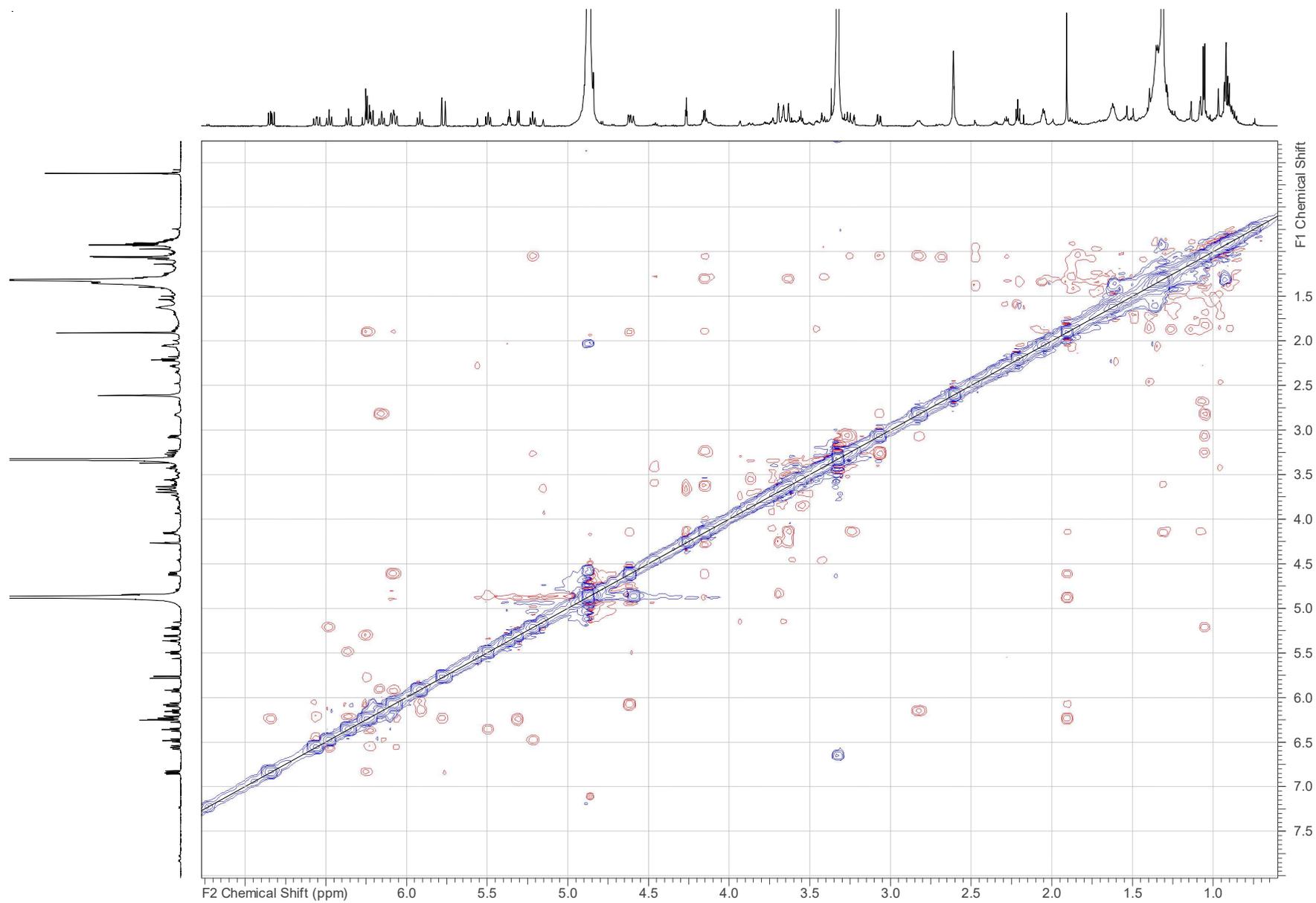
Spectrum S9. ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT spectrum of kenalactam B (**2**) in methanol- d_4 (700 MHz, 176 MHz).



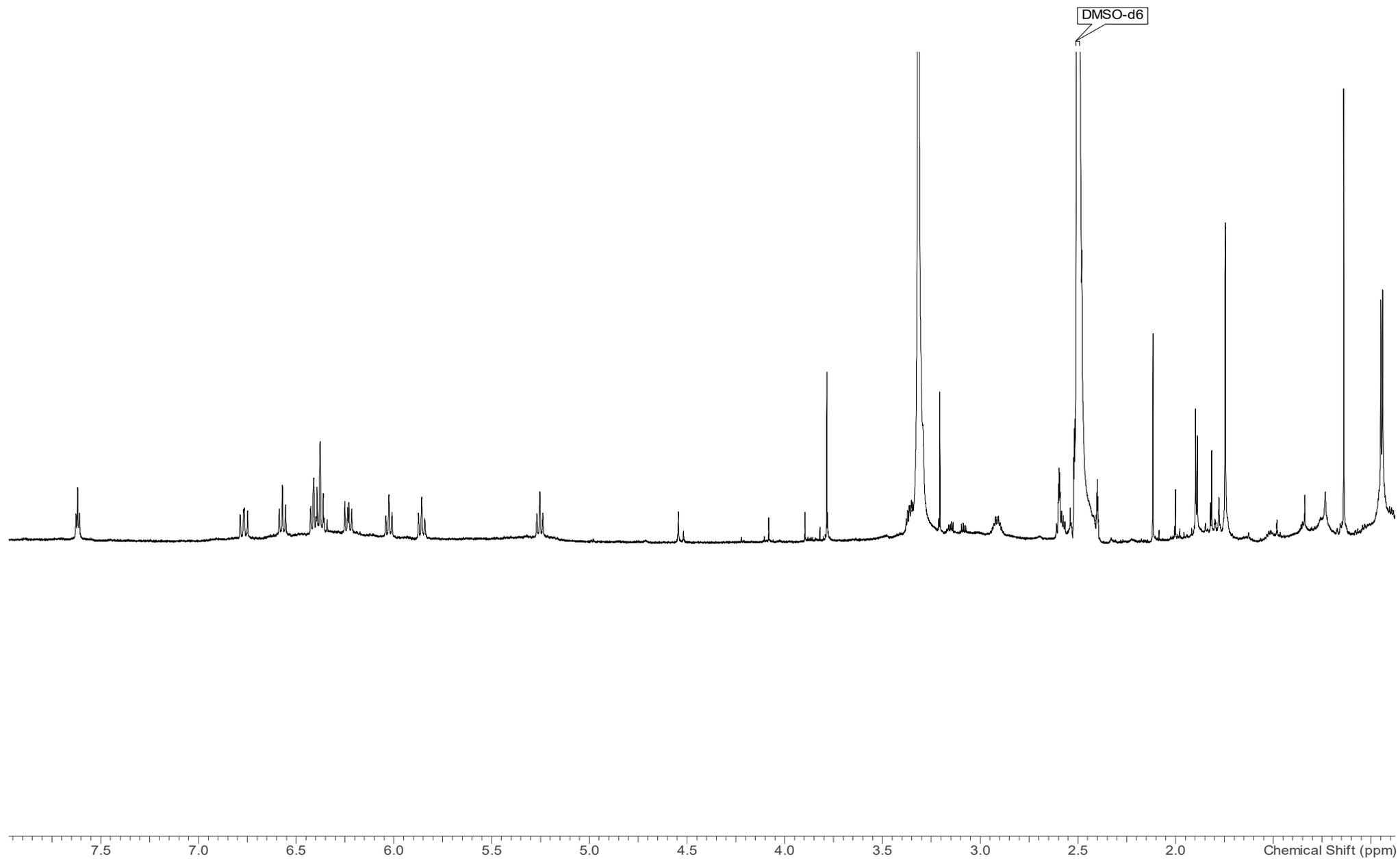
Spectrum S10. ^1H , ^1H COSY NMR spectrum of kenalactam B (**2**) in methanol- d_4 (700 MHz).



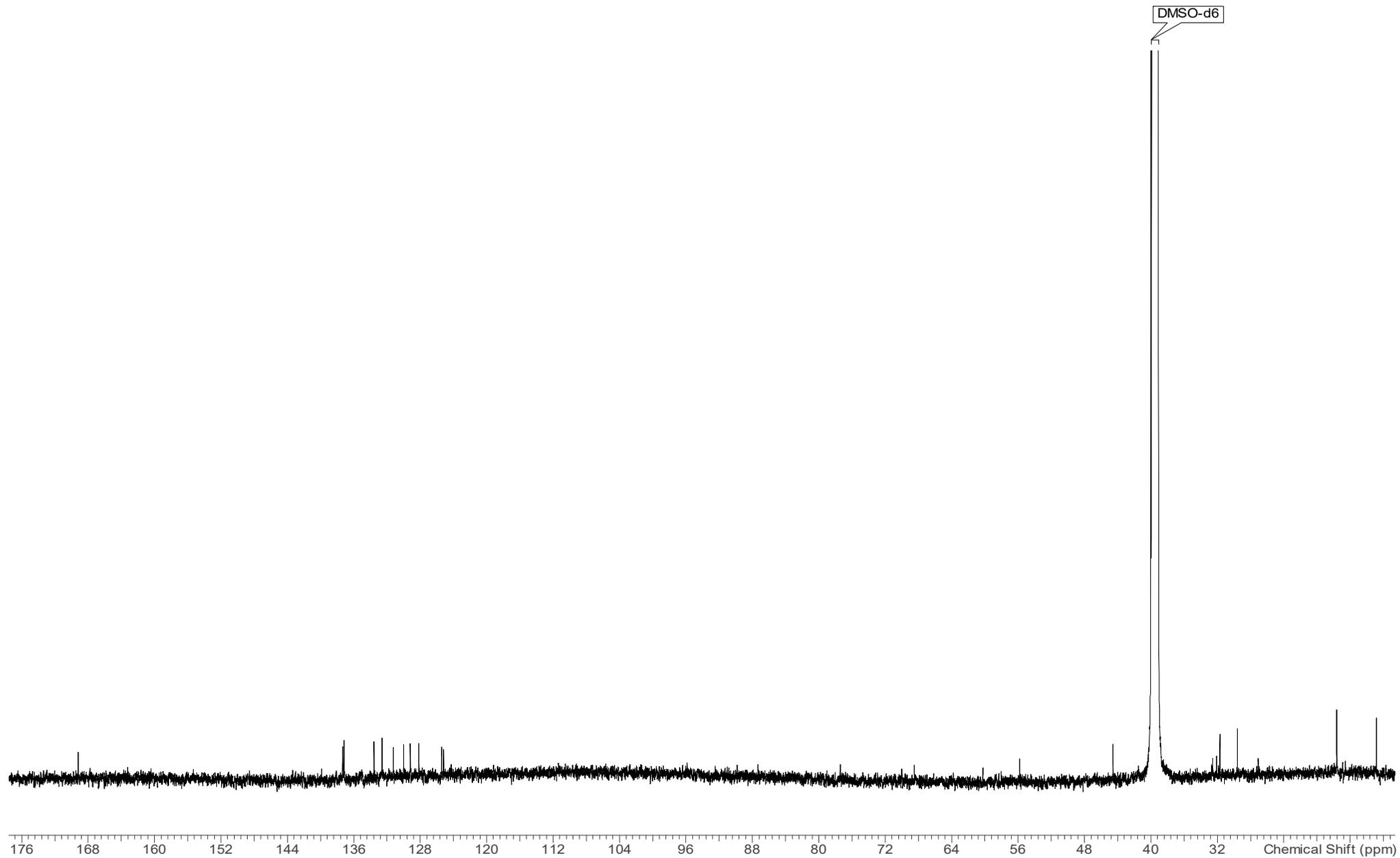
Spectrum S11. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of kenalactam B (**2**) in methanol- d_4 (700 MHz, 176 MHz).



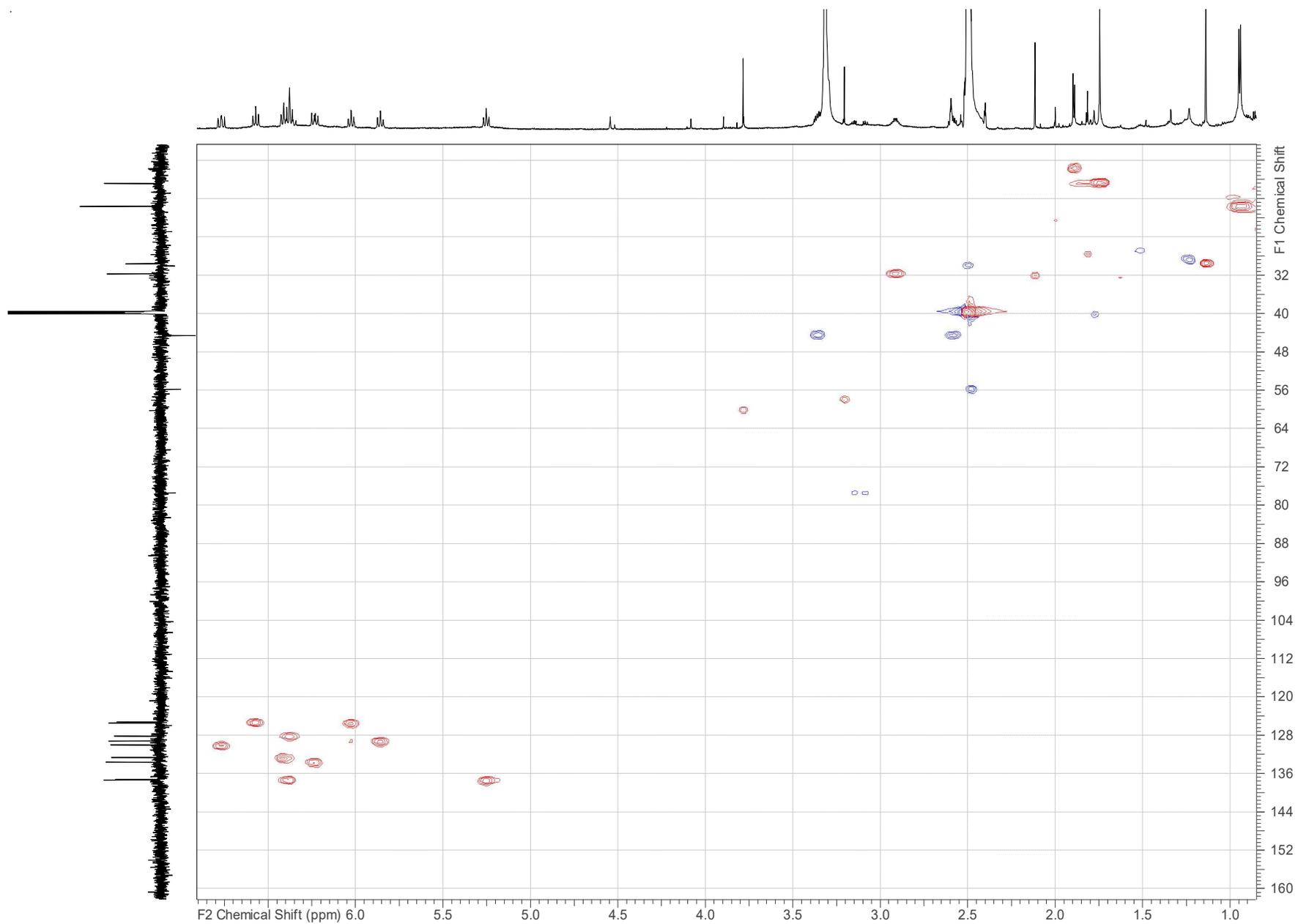
Spectrum S12. $^1\text{H},^1\text{H}$ ROESY spectrum of kenalactam B (**2**) in methanol- d_4 (700 MHz).



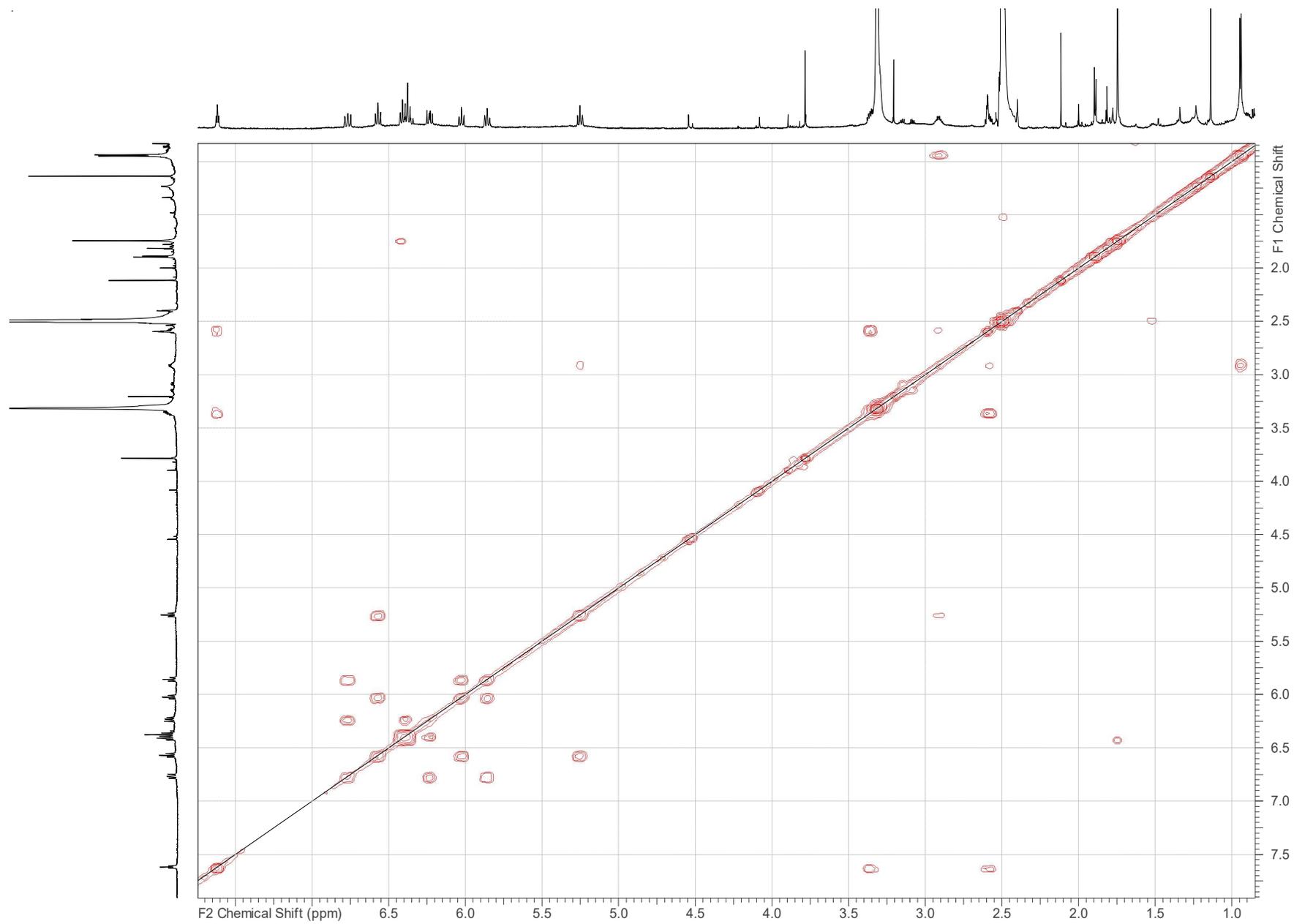
Spectrum S13. ¹H NMR spectrum of kenalactam C (**3**) in DMSO-*d*₆ (700 MHz).



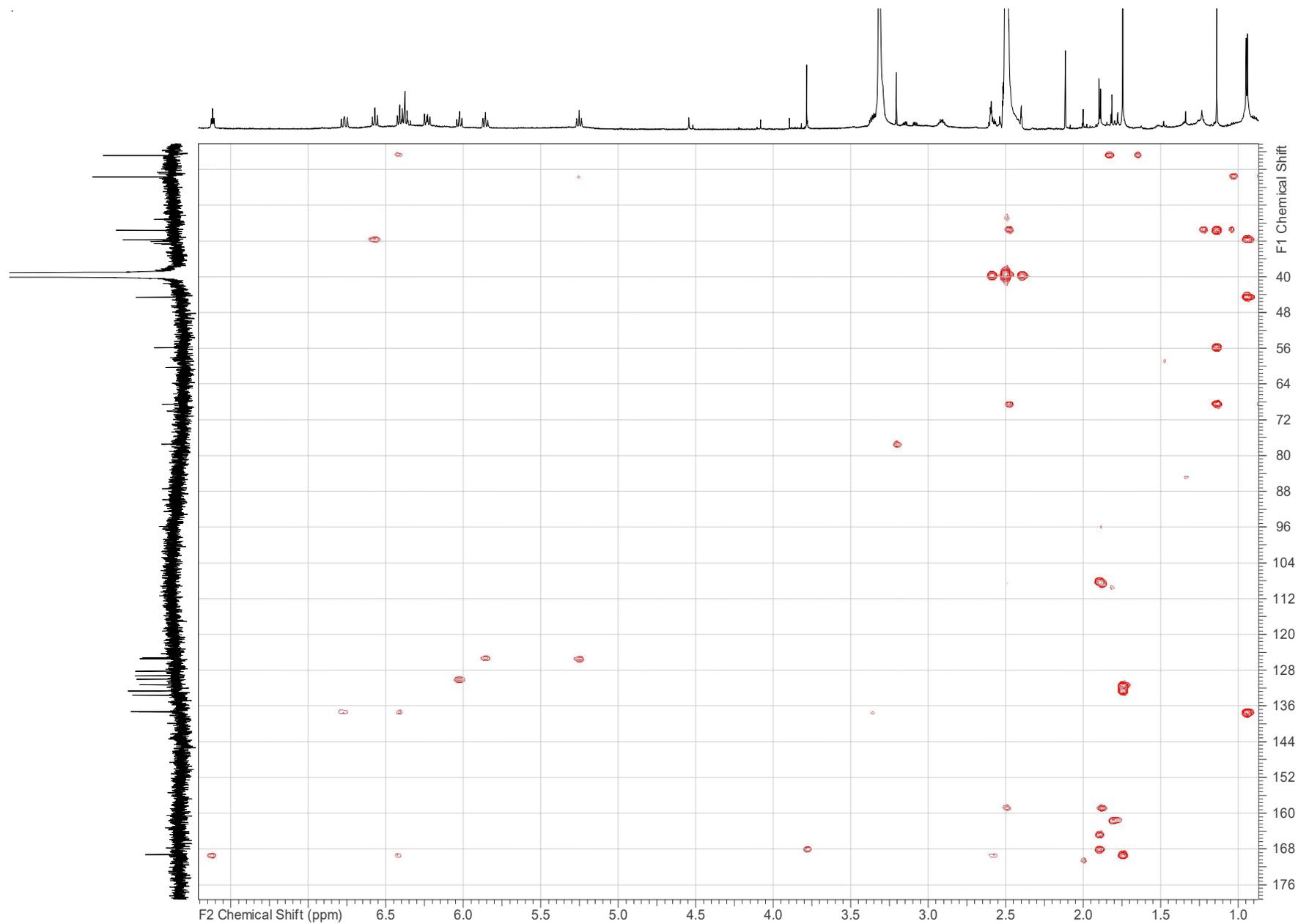
Spectrum S14. ^{13}C NMR spectrum of kenalactam C (**3**) in DMSO- d_6 (176 MHz).



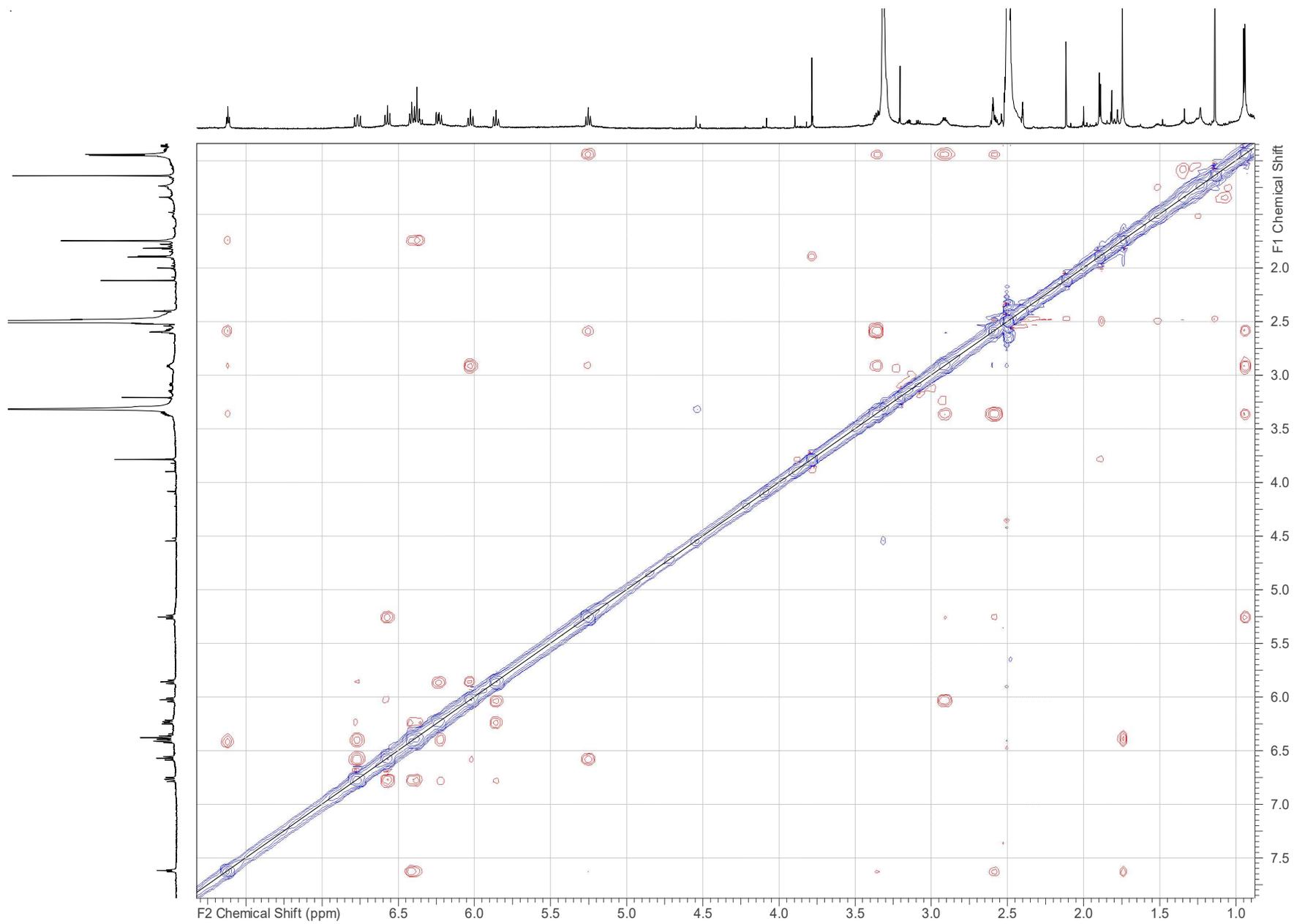
Spectrum S15. ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT spectrum of kenalactam C (**3**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



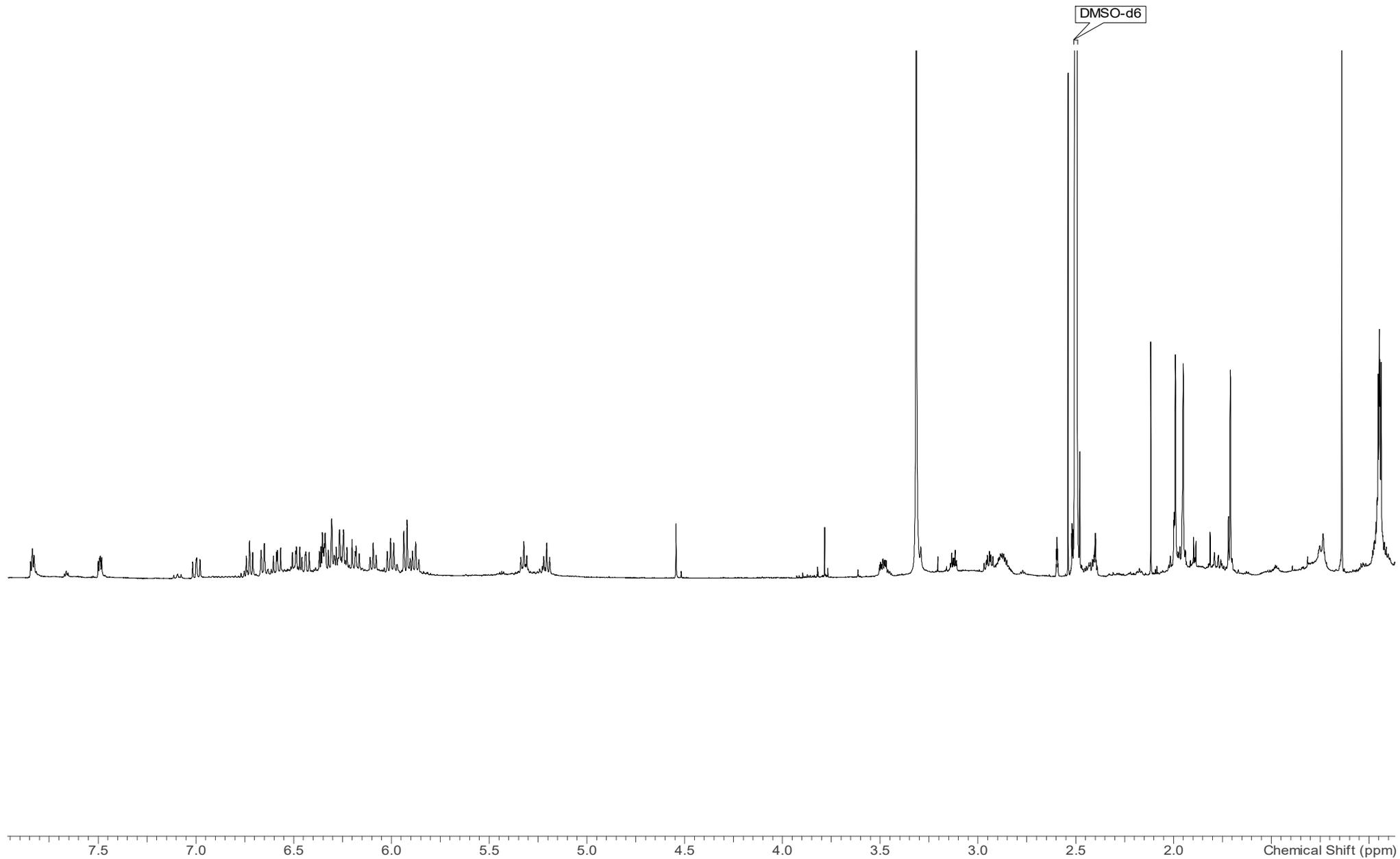
Spectrum S16. ^1H , ^1H COSY spectrum of kenalactam C (**3**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).



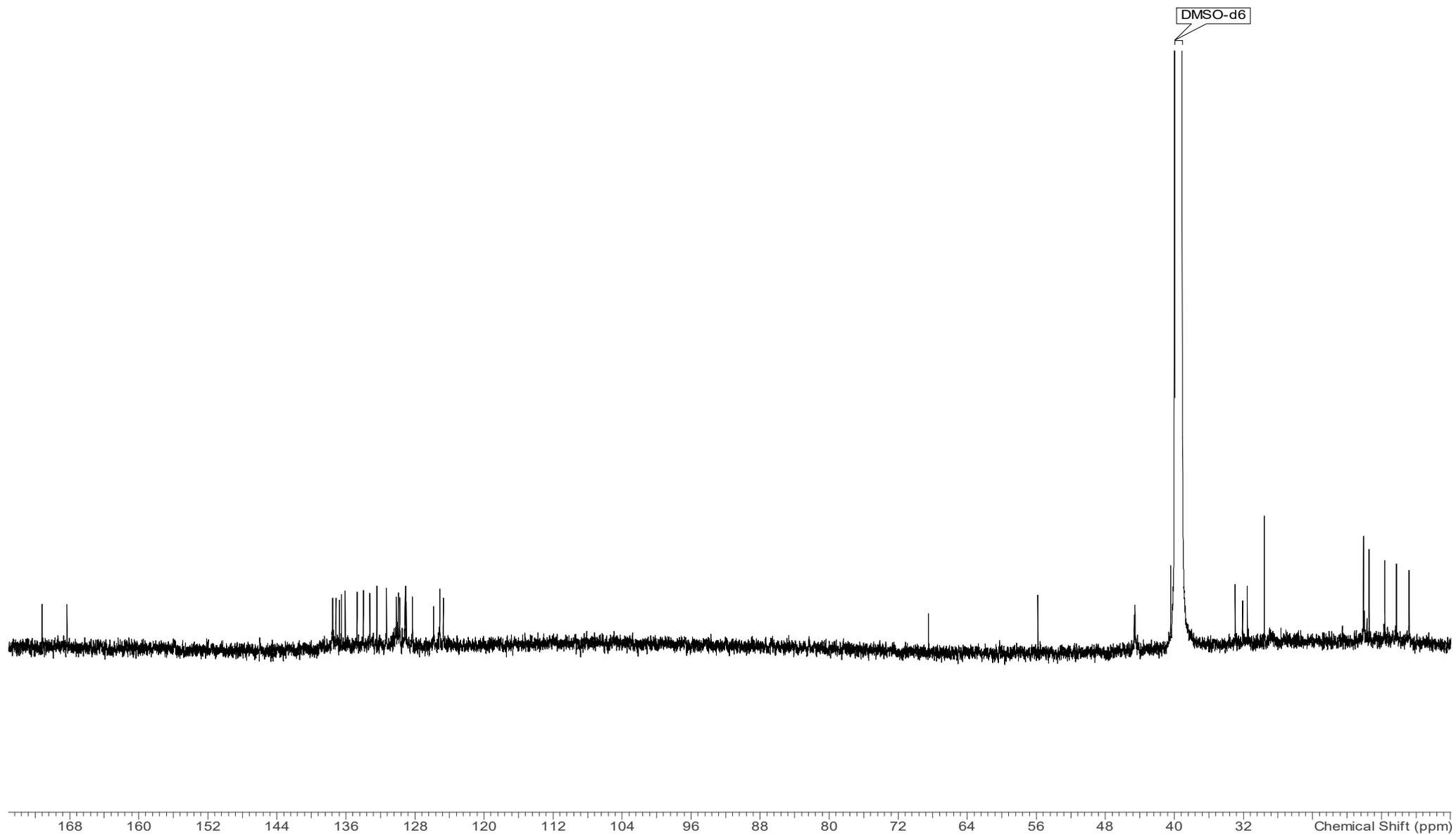
Spectrum S17. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of kenalactam C (**3**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



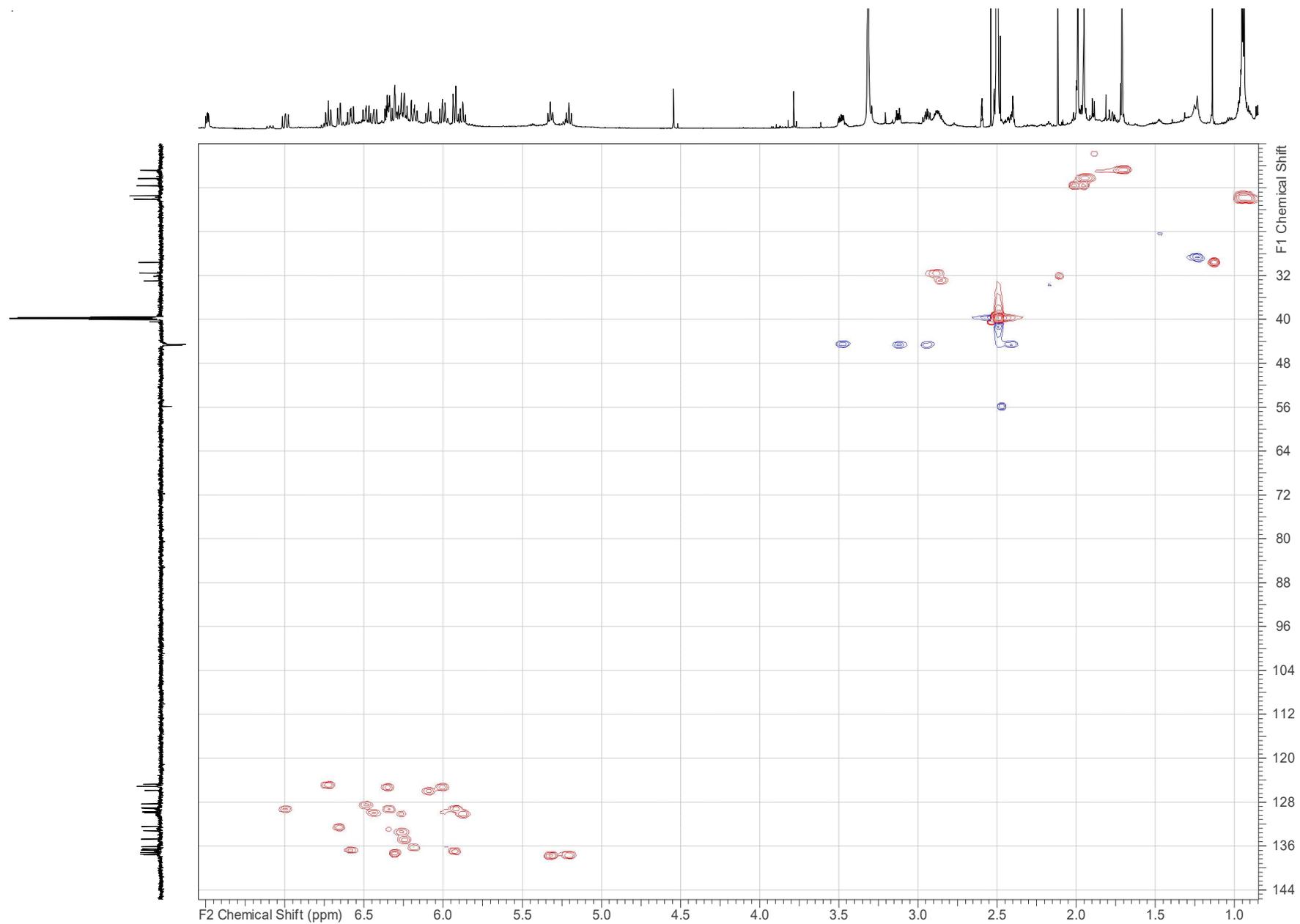
Spectrum S18. ^1H , ^1H ROESY spectrum of kenalactam C (**3**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).



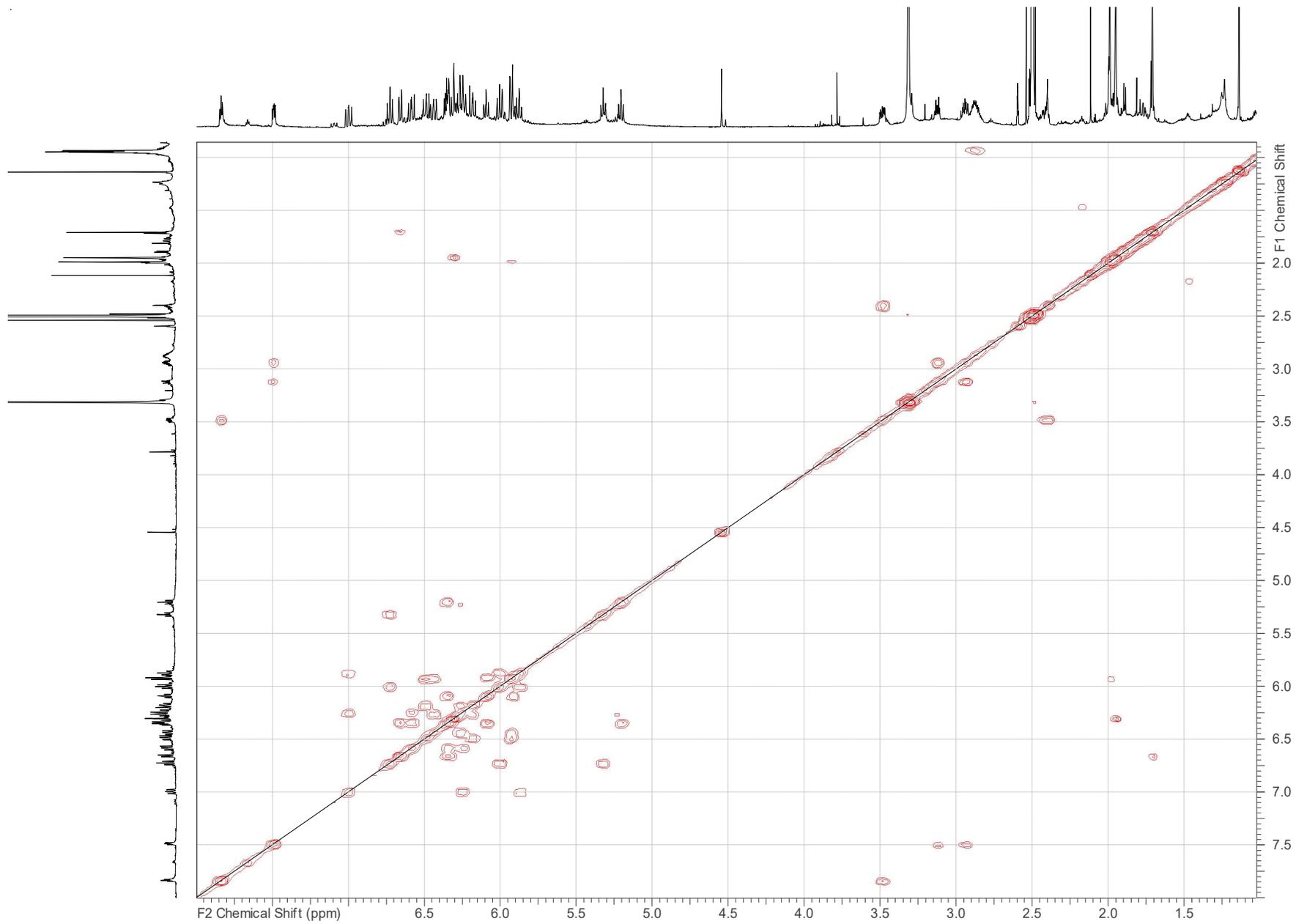
Spectrum S19. ¹H NMR spectrum of kenalactam D (**4**) in DMSO-*d*₆ (700 MHz).



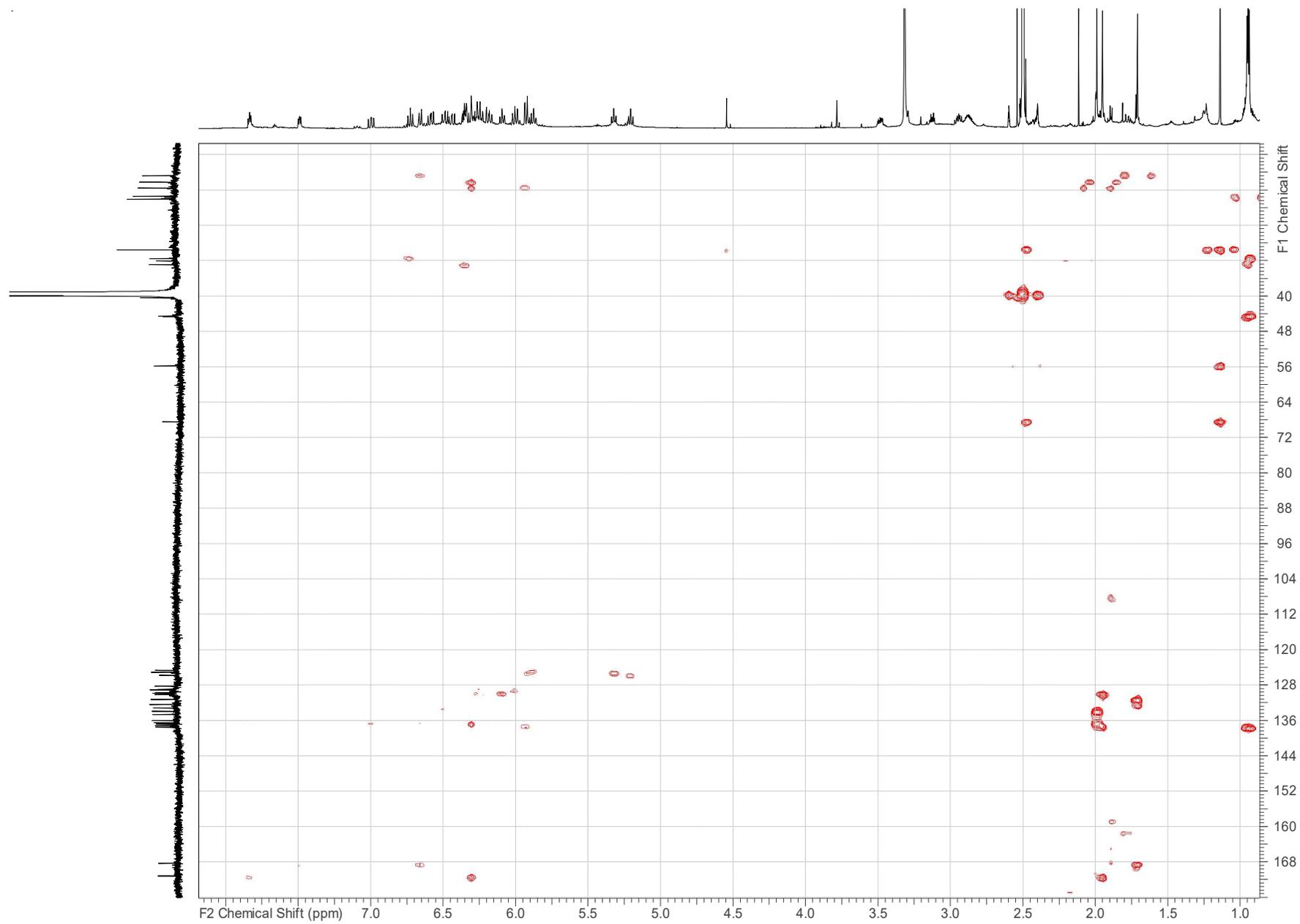
Spectrum S20. ^{13}C NMR spectrum of kenalactam D (**4**) in $\text{DMSO-}d_6$ (176 MHz).



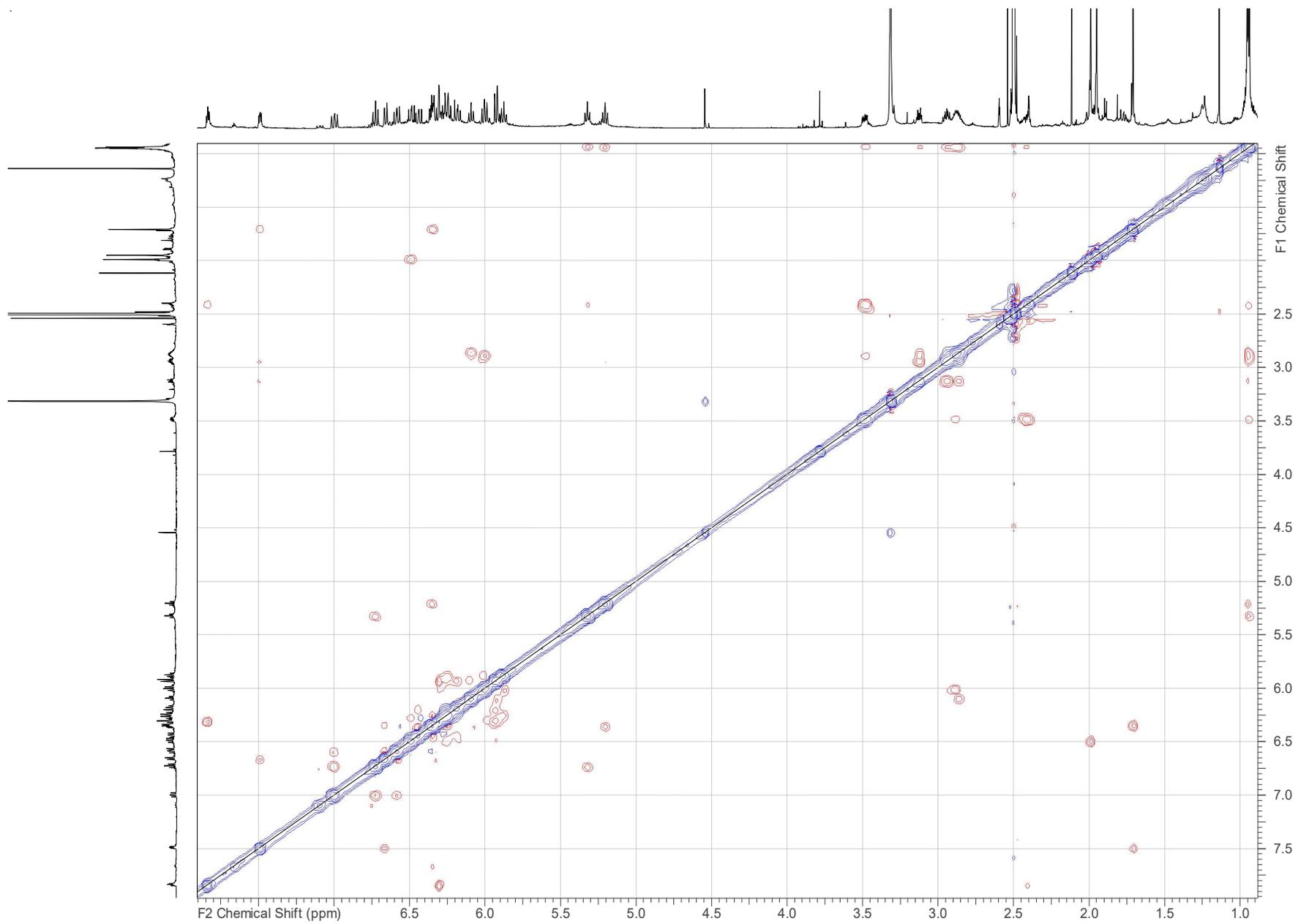
Spectrum S21. ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT spectrum of kenalactam D (**4**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



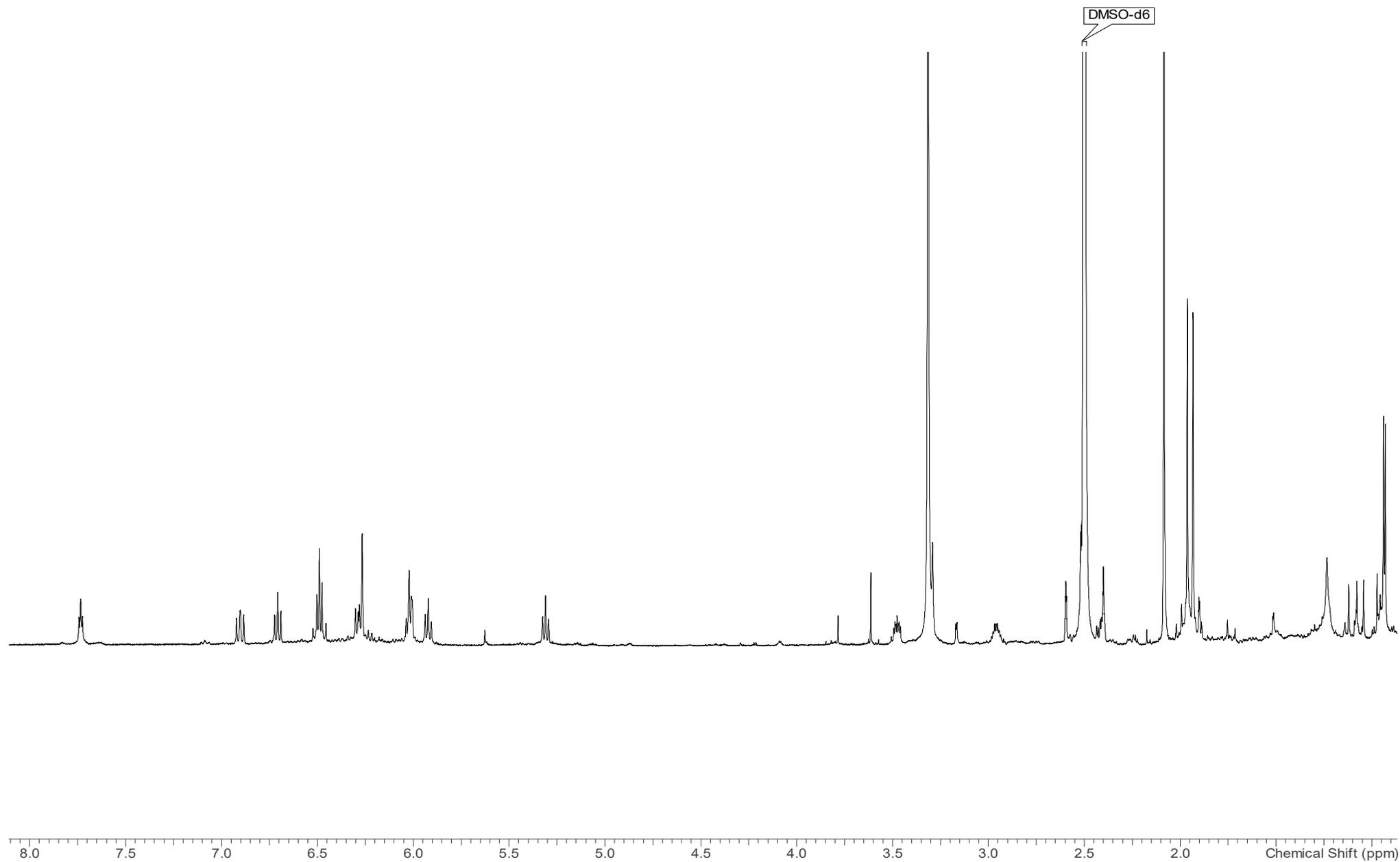
Spectrum S22. ^1H , ^1H COSY spectrum of kenalactam D (**4**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz)



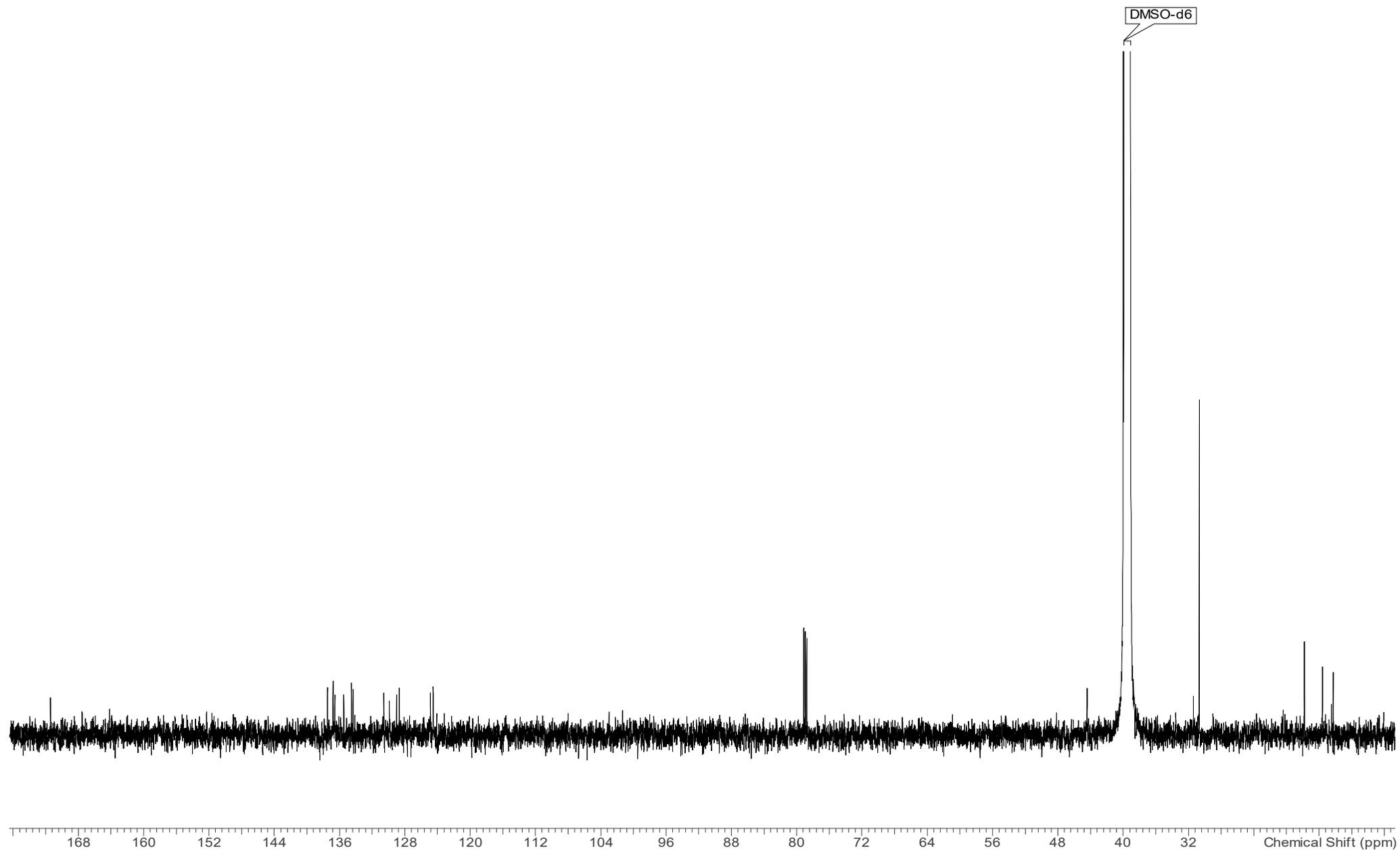
Spectrum S23. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of kenalactam D (**4**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



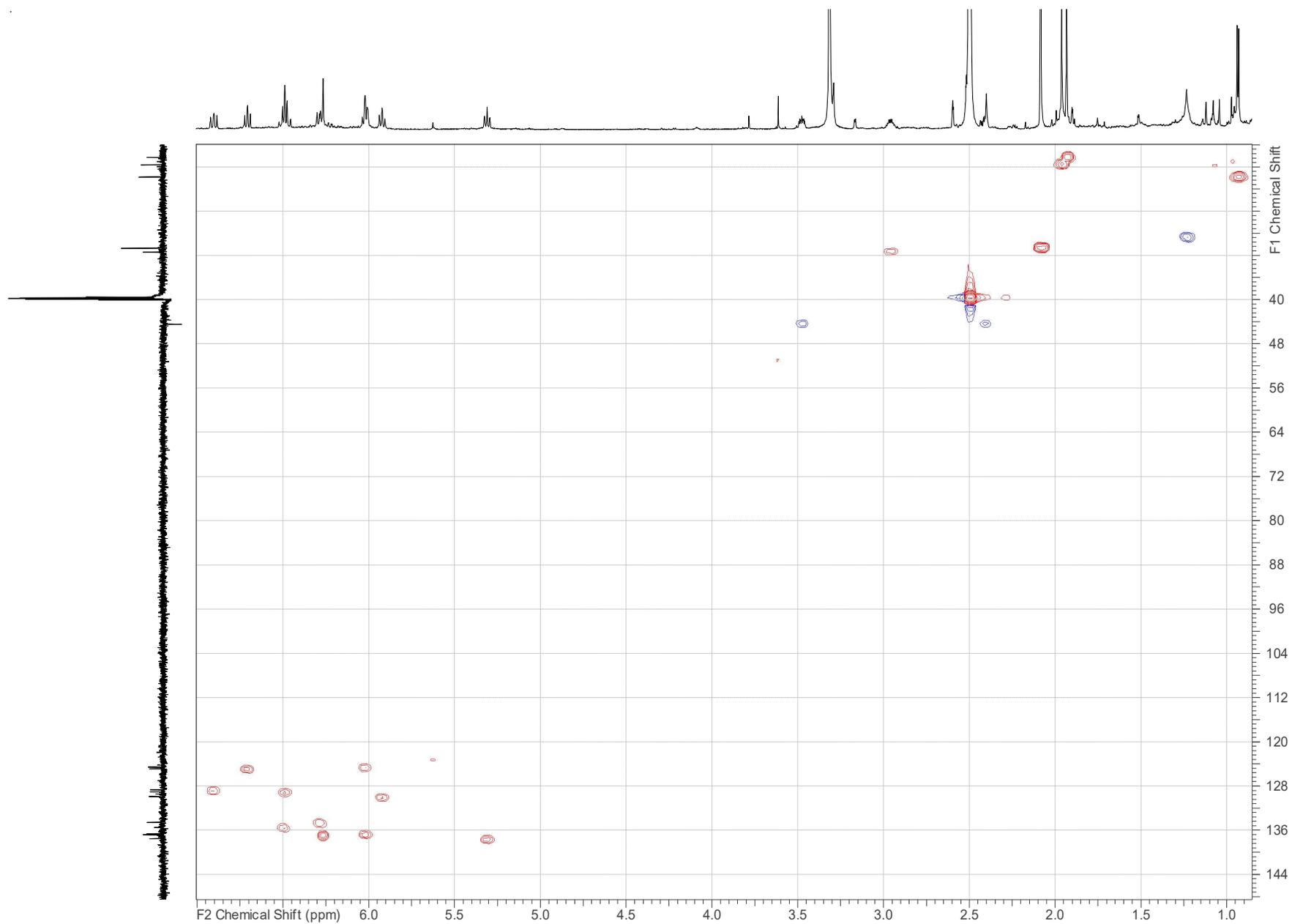
Spectrum S24. ^1H , ^1H ROESY spectrum of kenalactam D (**4**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).



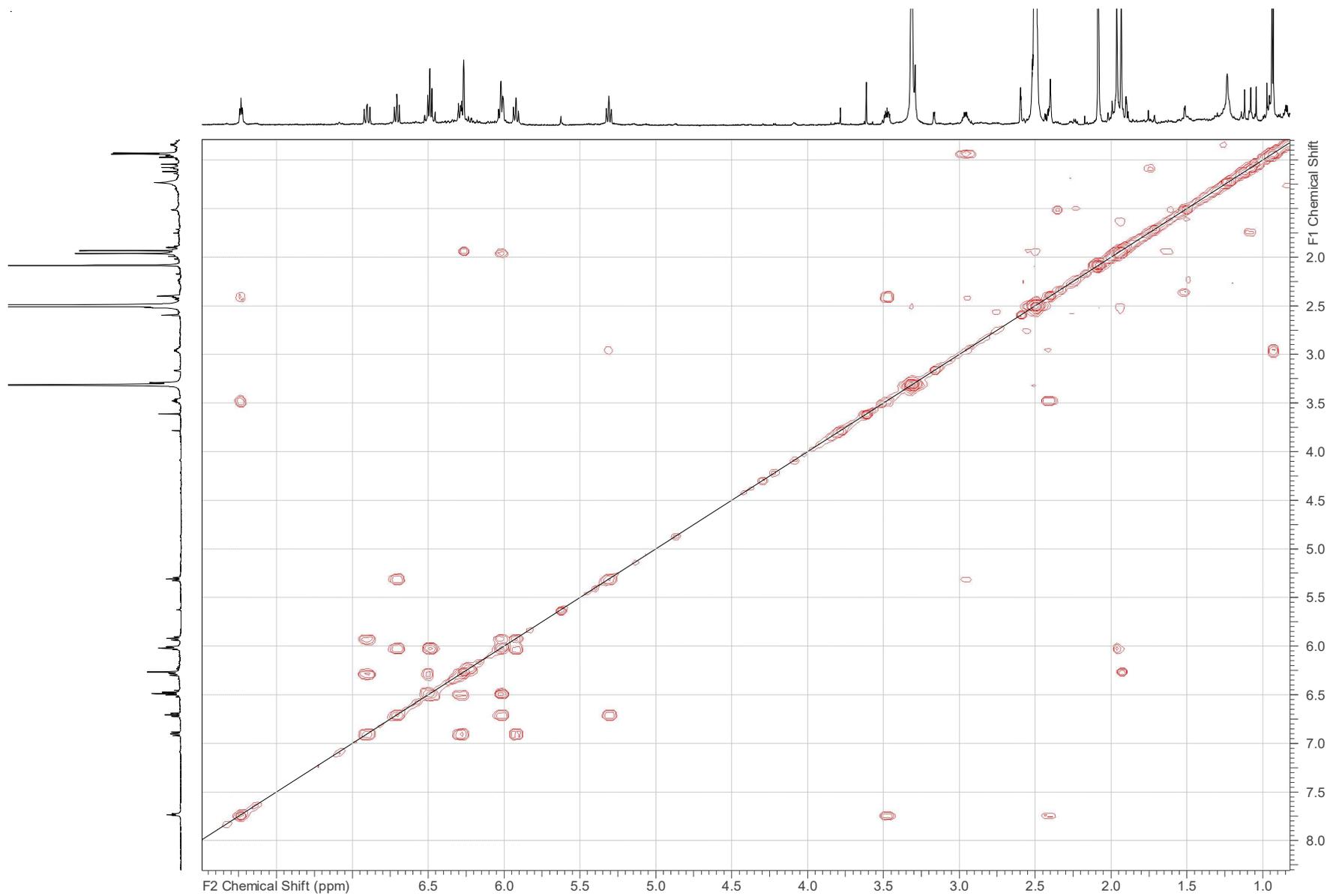
Spectrum S25. ¹H spectrum of kenalactam E (**5**) in DMSO-*d*₆ (700 MHz).



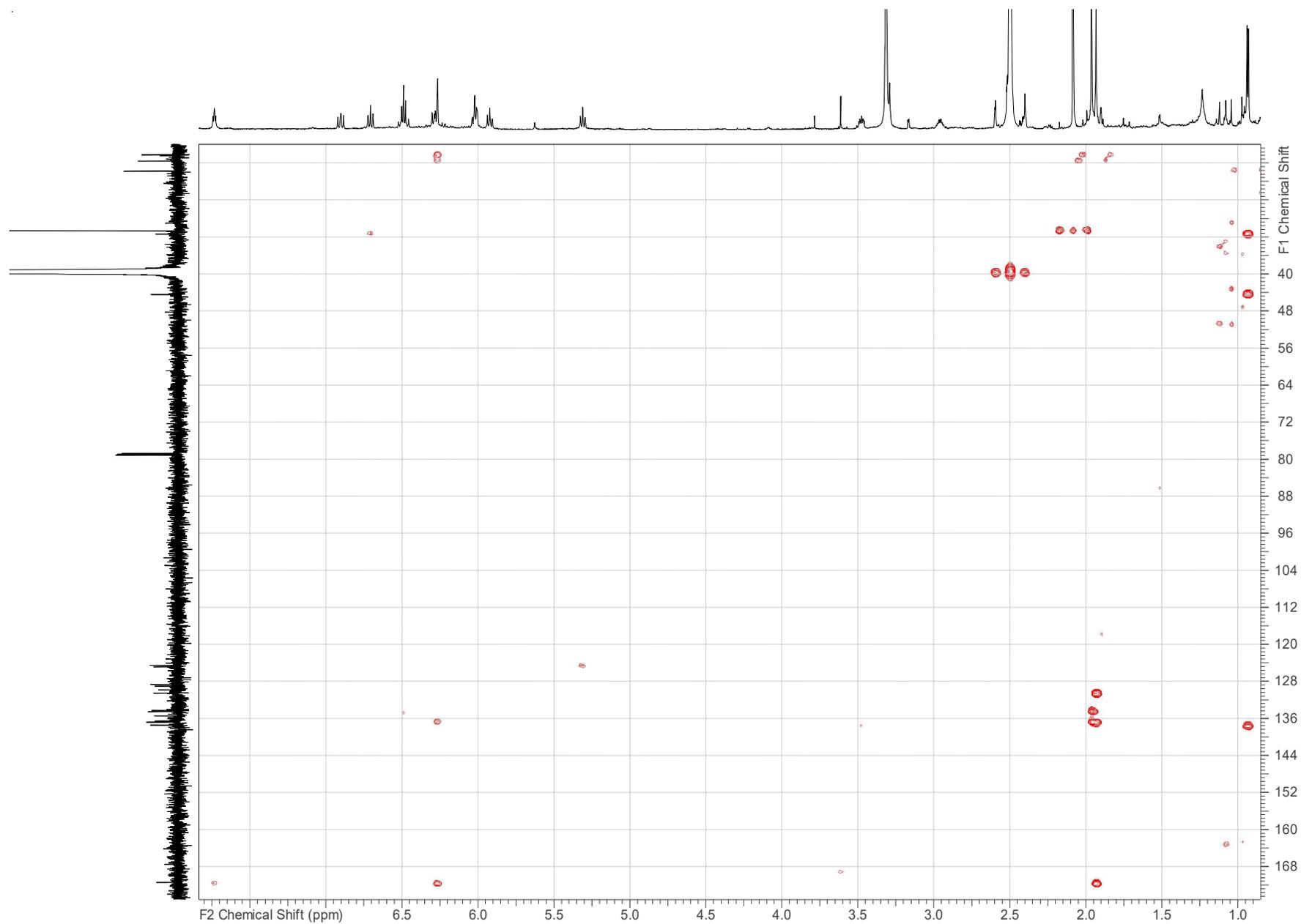
Spectrum S26. ^{13}C spectrum of kenalactam E (**5**) in $\text{DMSO-}d_6$ (176 MHz).



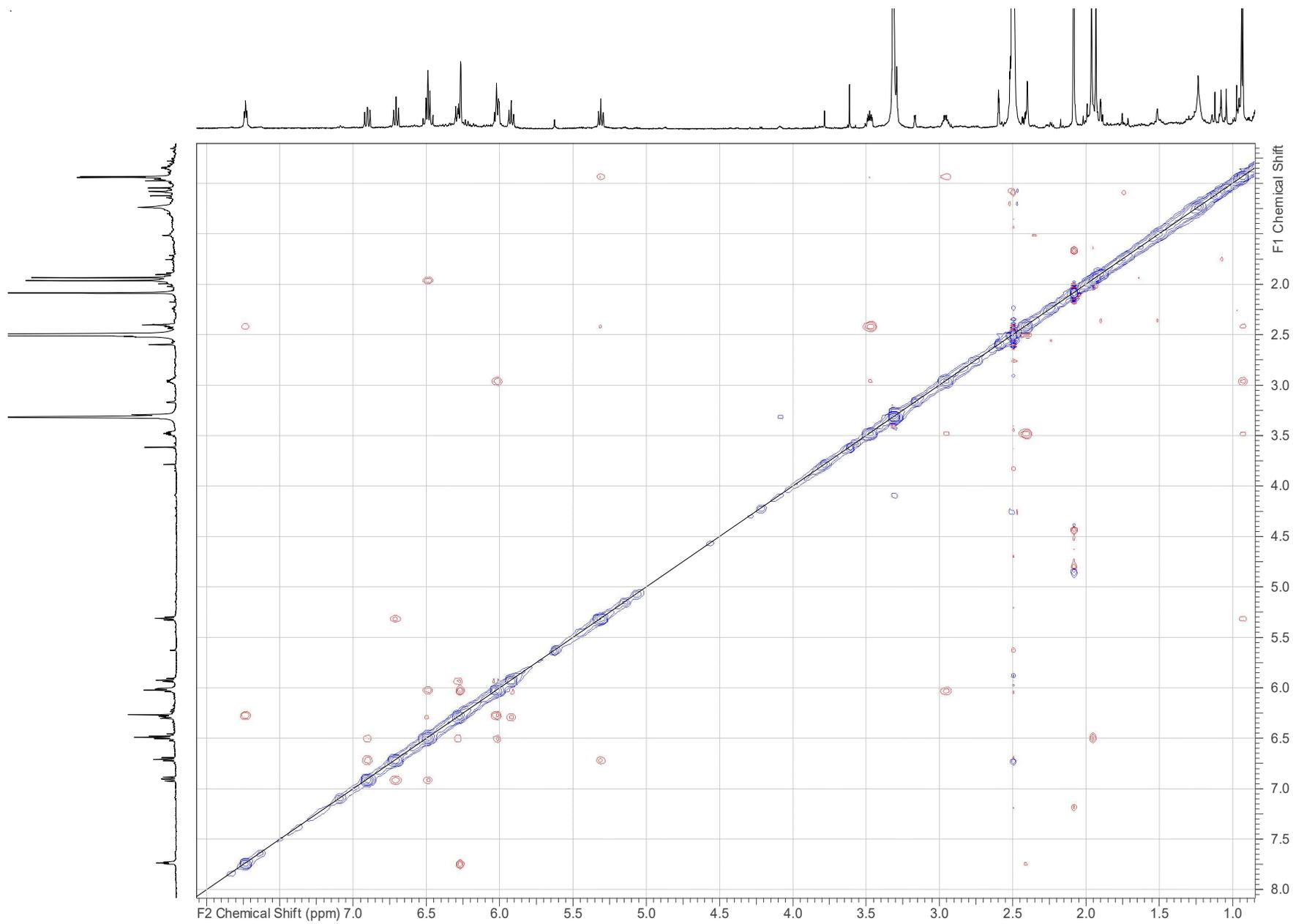
Spectrum S27. ^1H , ^{13}C H HSQC-DEPT spectrum of kenalactam E (**5**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



Spectrum S28. ^1H , ^1H COSY spectrum of kenalactam E (**5**) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).



Spectrum S29. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of kenalactam E (**5**) in $\text{DMSO}-d_6$ (700 MHz, 176 MHz).



Spectrum S30. ^1H , ^1H ROESY spectrum of kenalactam E (5) in $\text{DMSO-}d_6$ (700 MHz).

4. Assay

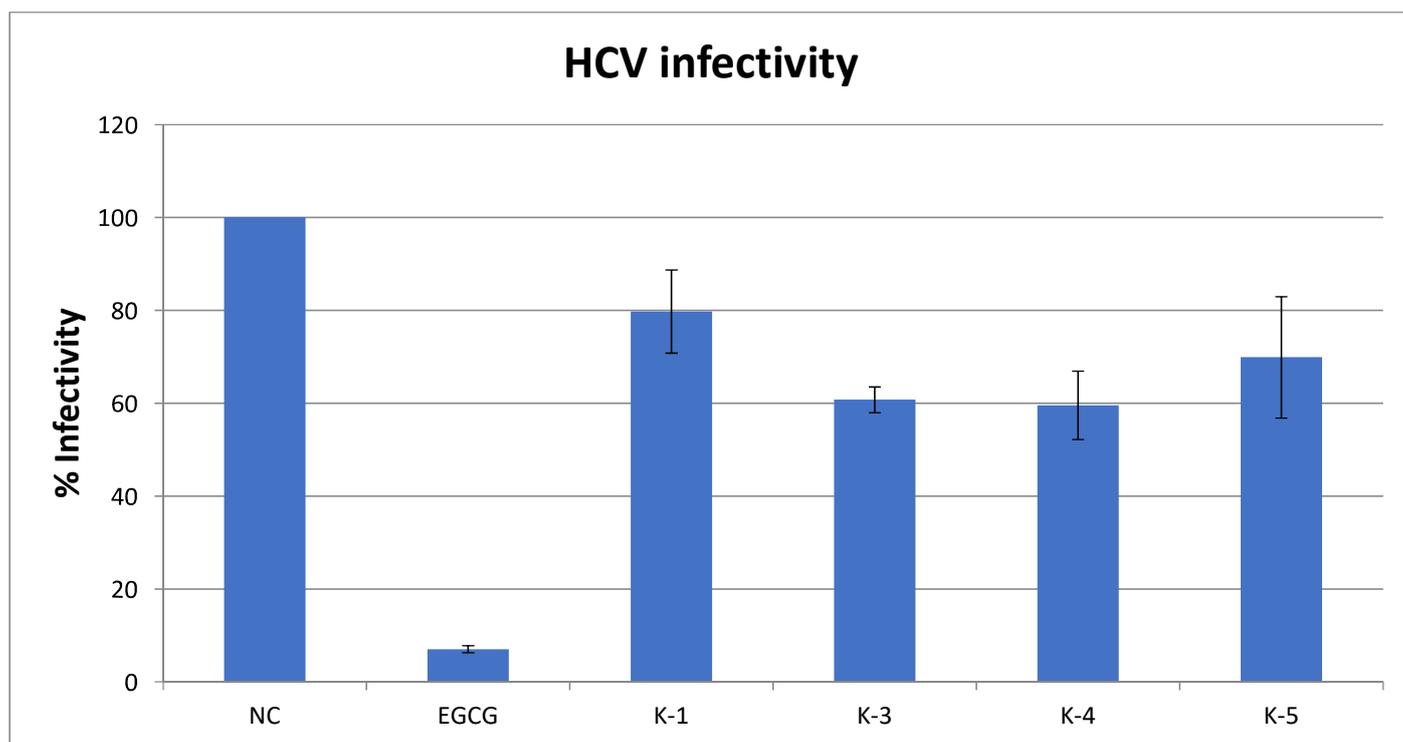
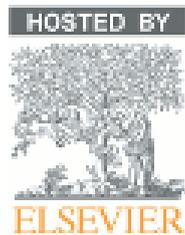


Figure S10. Hepatitis C Virus (HCV) assay: NC: negative control, EGCG: positive control (epigallocatechin-3-gallate), K-1: Kenalactam A, K-3: Kenalactam C, K-4: Kenalactam D, K-5: Kenalactam E. The assay was performed in duplicate and is presented with standard deviation. Huh-7.5 cells were inoculated with Luc-Jc1 reporter viruses in the presence of test compounds. The inoculum was removed 4 hours later, then monolayers were washed three times with PBS and overlaid with fresh medium containing no EGCG. Infected cells were fixed 3 days later, and luciferase activity was determined (Ciesek et al, 2011).

References

- Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **1987**, *4*, 406–425.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729.
- Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **1981**, *17*, 368–376.
- Ciesek, S.; von Hahn, T.; Colpitts, C. C.; Schang, L.M.; Friesland, M.; Steinmann, J.; Manns, M.P.; Ott, M.; Wedemeyer, H.; Meuleman, P.; pietschmann, T.; Steinmann, E.: The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* **2011**, *54* (6), 1947-1955



Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine

Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria



HOSTED BY



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtbOriginal Article <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.04.002>

Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria

Omar Messaoudi^{1,2*}, Mourad Bendahou¹, Ibrahim Benamar¹, Djamel-Elddine Abdelwouhid¹¹Microbiology Laboratory Applied to Food Biomedical and Environmental (LAMAABE), University of Abou bekr Belkaid, Faculty of SNV-STU-Ex Imama Biomedical Complex, PB 119, Tlemcen 13000, Algeria²Faculty of Science, Department of Biology, University of Amar Telidji, Laghouat 03000, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 Jun 2014

Received in revised form 12 Feb, 2nd

revised form 26 Feb, 3rd revised form

24 Mar 2015

Accepted 2 Apr 2015

Available online 23 May 2015

Keywords:

Isolation

Actinomycetes

Sebkha

Kenadsa

Non-polyene

Identification

Spirillospora

ABSTRACT

Objective: To study the antimicrobial activity of actinomycetes isolated from sabkha of Kenadsa and identification of the isolate interesting.**Methods:** Eighteen strains were isolated, using four culture media from sebkha of Kenadsa (Bechar, Southwestern Algeria). Screening of antimicrobial activity consisted of two steps: in primary screening, antibacterial activity was determined by using the agar plug method against test strains; in secondary screening, better isolate which showed a good activity in the first screening was selected to extract antimicrobial substances. The antimicrobial activities of extracts were evaluated by using Kirby–Bauer disc diffusion method. Partial characterization of antimicrobial products was performed on the basis of chemical revelations, UV–vis spectrometry and infrared spectroscopy. The identification of isolate interesting was performed through morphological, chemical, biochemical and physiological characteristics.**Results:** All isolates showed antimicrobial activity against at least one microorganism test. One isolate, LAM143cG3, was selected for its broad spectrum and high antimicrobial activity. The isolate LAM143cG3 was identified as *Spirillospora* sp. The comparison between the species of this genus (*Spirillospora rubra* and *Spirillospora albida*) and our isolate indicated the existence of several physiological and biochemical differences which led us to suppose that this was a new member of this genus. Primary characterization of antimicrobial substances produced by the isolate LAM143cG3 indicated the presence of amines and phenols. The UV–vis spectrum suggested a non-polyenic nature of substances secreted by our isolate, while infrared confirmed the presence of amine groups.**Conclusions:** The result of the present study revealed that sebkha of Kenadsa was rich in rare actinomycetes, that secreted interesting antimicrobial substance.

1. Introduction

The rapid emergence of drug resistance among pathogenic bacteria, especially multi-drug resistant bacteria, underlines the need to look for new antibiotics [1,2]. Filamentous actinomycetes are known to have the ability to produce a wide variety of secondary metabolites [3,4], many of which

have useful applications in human and veterinary medicine and agriculture [5], such as enzyme immuno-modulators, antibiotics, insecticides, herbicides and anticancer agents [6]. Among actinomycetes, *Streptomyces* which has long been recognized as a major source of bioactive molecules covers around 70% of the total antibiotic products [7,8]. Actinomycetes are widely distributed and are next to bacteria in the order of abundance in soil [9]. In the past two decades, there has been a decline in the discovery of new lead compounds from common soil-derived actinomycetes [10], hence the scientists have tried to investigate unexplored habitats for novel actinomycetes as possible candidates of new antimicrobials substances [11,12]. Among them, sebkha is

*Corresponding author: Omar Messaoudi, Faculty of Science, Department of Biology, University of Amar Telidji, Laghouate, Algeria.

Tel: +213 0557084015

E-mails: o.messaoudi@lagh-univ.dz, messaoudiomar78@yahoo.fr

Peer review under responsibility of Hainan Medical University.

Foundation Project: Supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of People's Democratic Republic of Algeria (Grant No. F02020110081).

an extreme environment, which inhabits organisms that survive in very high salinities, high temperatures and withstand severe solar radiations. The aims of the present work were to study the biodiversity of halophilic actinomycetes in sebkha of Kenadsa and to highlight their potential to produce bioactive substances.

2. Materials and methods

2.1. Samples collection

Soil samples were collected at a depth of 15–20 cm below the surface from sebkha of Kenadsa (Bechar, Southwestern Algeria), according to Pochon and Tardieu technic [13]. The samples were packed in sterile polyethylene bags and aseptically transported to the laboratory as quickly as possible for further analysis.

2.2. Samples treatment

The samples were subjected to a pretreatment method in order to facilitate isolation of actinomycetes. The collected samples were air dried for 7 days, and then they were pre-treated with 1% calcium carbonate (CaCO₃) and incubated at 25 °C for 2 weeks [14].

2.3. Isolation of the actinomycetes

Actinomycetes were isolated by the serial dilution method [15,16]. Stock solution was prepared by diluting 1 g of soil sample in 9 mL of sterile saline water and shaken well by using a vortex mixer. From the stock solution, 1 mL was used to prepare the final volume of 10⁻² and 10⁻³ by serial dilution method. About 1 mL of each dilution was sown on the surface of four different mediums: ISP2 (yeast extracts: 4 g/L; malt extract: 10 g/L; glucose: 4 g/L; agar: 20 g) [17]; Bennett (D-glucose anhydrous: 10 g/L; casaminoacids: 2 g/L; yeast extract: 1 g/L; meat extract: 1 g/L; agar: 15 g) [18]; Starch casein (starch: 10 g/L; casein: 0.3 g/L; KNO₃: 2 g/L; NaCl: 2 g/L; K₂HPO₄: 2 g/L; MgSO₄·7H₂O: 0.05 g/L; CaCO₃: 0.02 g/L; FeSO₄·7H₂O: 0.01 g/L and agar: 18.0 g) [19]; Starch yeast extract peptone (starch: 10 g/L; yeast extract: 4 g/L; peptone: 2 g/L; agar: 18 g/L) [20]. About 7% NaCl was added to each culture medium. Amphotericin B (25 µg/mL) and oxytetracycline (10 µg/mL) were added in each medium to inhibit fungal and bacterial contamination respectively. Plates were incubated for 7–20 days at 28 °C, and observed intermittently during incubation [21].

2.4. Preliminary screening of antimicrobial activity using agar piece method

Eight bacteria and one yeast were used as test organisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (ATCC 25212), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) (*B. cereus*), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (*B. subtilis*), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 70603) (*K. pneumonia*), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (*K. pneumonia*), *Escherichia coli* (ATCC 25522) (*E. coli*), *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 12980) (*B. stearothermophilus*) and *Candida albicans* (ATCC 10231) (*C. albicans*). The strains of actinomycetes were inoculated on Bennett medium then incubated at 28 °C

for 14 days. Cylinders agar (6 mm in diameter) of well grown cultures were cut and placed on plates already seeded with the test strains. Plates were kept at 4 °C for 4 h for a good diffusion of the antimicrobial metabolite, and then incubated bacteria at 37 °C for 24 h and *C. albicans* at 30 °C for 48 h. The best isolate which showed a good antimicrobial activity was selected [22].

2.5. Optimization of secretion of secondary metabolites

In the investigation of the culture medium that would enable optimal production of antimicrobial molecules, the selected isolate was inoculated in five culture media: ISP1 (tryptone: 5 g/L; yeast extract: 3 g/L; agar: 18 g) [17]; GYEA (yeast extract: 10 g/L; glucose: 10 g/L; agar: 18 g) [23]; PELG (peptone: 5 g/L; glucose: 10 g; yeast extract 2 g/L; agar: 20 g); Bennett and ISP2 (compositions are mentioned above). The plates were incubated at 30 °C for 14 days. The antimicrobial activity against test organisms was determined by the agar piece method [22].

2.6. Extraction of antimicrobial compounds

The selected antagonistic actinomycetes were inoculated into 250 mL of the best medium for production of antimicrobial substances and incubated at 30 °C in a shaker (150–180 r/min) for 14 days. After incubation the broths were centrifuged at 3000 r/min for 15 min, and the cell-free supernatant was extracted with equal volume of three solvents including: *n*-butanol, chloroform and ethyl acetate [24]. Each organic extract was concentrated at 45 °C for dryness by using a rotary evaporator, and then recuperated in 1 mL of methanol and tested for their antimicrobial activities by using Kirby–Bauer disc diffusion method. The disks were deposited on the surface of Muller–Hinton medium, already sown by the test germs. The plates were incubated at 4 °C for 2 h and later at 37 °C. The diameter of the aureoles of inhibition was measured after 24 h [25].

2.7. Thin layer chromatography (TLC) and bioautography

TLC with silica gel plates was used for primary analysis of the antibacterial substances. A dry crude extract, dissolved in methanol, was spotted and developed in the solvent system: ethanol-ammonia-water (8:1:1, v/v). The developed TLC plates were air dried to remove all traces of solvents. The separated compounds were visualized under UV at 254 nm and at 365 nm and the active spots were detected by bioautography [26].

Chromatogram was placed in a sterile bioassay Petri dish containing Muller–Hinton agar medium inoculated with *B. stearothermophilus* as target organisms and incubated for 24 h at 30 °C. Clear areas due to the inhibition of the growth of target organisms indicated the location of antibiotic compounds, the retention factor (*R_f*) of the active spots was measured [27].

2.8. Partial characterization of products

The active substances were revealed on silica gel TLC plates with several chemical agents including ninhydrin, ferrous iron chloride, formaldehyde-H₂SO₄ and Molish's reagent. UV-visible

absorption spectra were recorded on an SPECTRONIC UNICAM UV 500, while the infrared was determined by Agilent technology Cary 600 series Fourier transform infrared spectroscopy spectrometer.

2.9. Taxonomy of potential actinomycete strain

Taxonomic studies were performed based on morphological, chemical, biochemical and physiological analyses.

2.9.1. Chemotaxonomic analysis

Standard analytical procedures were used to extract and analyse the isomeric forms of diaminopimelic acid [28] and whole-organism sugars [29].

2.9.2. Morphological and cultural characters

Morphology studies were performed by using the methods described by Shirling and Gottlieb [17]. The microscopic characterization was done by cover slip culture method. The cultural characteristics were examined by culturing isolates on different ISP media: yeast extract-malt extract-agar (ISP2), oatmeal-agar (ISP3), inorganic salts-starch-agar (ISP4), and glycerol-asparagines-agar (ISP5). In each medium, color and growth of aerial and substrate mycelium as well as the formation of soluble pigments were noted after incubation at 30 °C for 14 days.

2.9.3. Biochemical and physiological characterization

The ability of the selected isolate to utilize 10 different carbon sources were determined on plates containing basal medium (ISP9) to which carbon sources were added to a final concentration of 1%. The plates were incubated at 28 °C for 14 days [17]. The research of melanoides pigments was carried out by using ISP6 and ISP7. The actinomycete isolate was tested for its ability to grow in different concentrations of NaCl range from 0% to 15%, and temperature range from 25 to 50 °C, on Bennett [17].

3. Results

3.1. Isolation of the actinomycetes

In the present study, 18 isolates of actinomycetes were isolated from soil samples collected in sebkh of Kenadsa by using four culture media. The best medium which allowed the isolation of actinomycetes from extreme area was starch casein agar (9 colonies) (Figure 1).

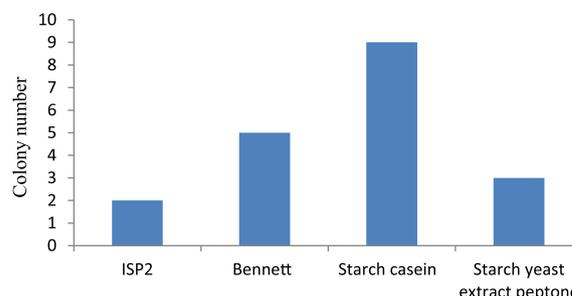


Figure 1. Number of actinomycetes colony isolated from each culture medium.

3.2. Screening of antibacterial activity

All isolates showed antimicrobial activity against at least one microorganism test (Table 1). Two isolates (LAM143dL and LAM142cE) were actives against only Gram-negative bacteria; three isolates (LAM142bH1, LAM142bH3 and LAM153aI2) were actives against Gram-positive bacteria, and twelve isolates were actives against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Seven isolates were actives against *C. albicans*. The isolate LAM143cG3 was selected for its broad spectrum and high antimicrobial activity, as well as its morphology interesting.

Table 1

Antimicrobial activity of actinomycete isolates.

Isolates	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
LAM142cE1	9.33	8.33		15.66	–	13.00	10.00	11.00
LAM143dF	–	–	–	–	–	–	–	23.66
LAM142cE3	–	–	–	–	–	–	7.00	–
LAM143dL	–	–	–	–	12.00	19.66	–	–
LAM142bH1	8.33	16.00	12.00	10.00	–	–	–	–
LAM142bH3	11.66	10.00	9.00	14.00	–	–	–	17.33
LAM142bH2	8.50	8.00	9.16	11.00	–	–	8.50	11.00
LAM143cG2	9.00	8.16	10.50	–	–	–	8.50	11.00
LAM153aI2	8.16	8.00	10.50	–	–	–	–	10.00
LAM192aM	15.00	9.66	–	–	8.00	–	8.33	–
LAM142aK2	9.33	9.33	15.00	–	–	16.00	–	12.00
LAM142cE5	9.00	9.66	9.66	12.33	12.16	11.33	9.33	–
LAM142cE4	8.00	–	8.00	–	9.00	–	–	–
LAM142aK1	8.83	9.66	8.67	10.33	–	14.33	9.33	–
LAM143cG3	12.67	–	12.67	11.67	–	15.00	16.00	–
LAM142cE2	9.83	–	10.66	10.00	–	–	9.33	–
LAM143cG1	9.33	8.00	–	–	–	–	9.33	–
LAM153aI1	9.33	10.33	11.66	–	8.00	10.66	–	–

E. faecalis: *Enterococcus faecalis* (ATCC 25212).

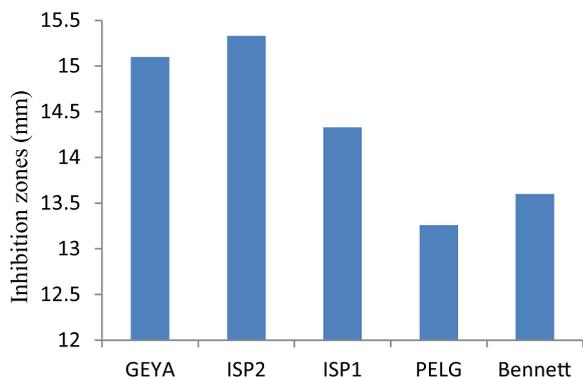


Figure 2. Antibiotic production by the isolate LAM143cG3 on different solid media.

3.3. Optimization of secretion of secondary metabolites secreted by the isolate LAM143cG3

Antibacterial activities were obtained on all media tested (Figure 2). Among the media, which allowed a good antimicrobial production, ISP2 medium was found to be the best for antibacterial activities.

Table 2

Antimicrobial activity of organic extracts of the isolate LAM143cG3 against tests strains.

Souches tests	Ethyl acetate extract	Butanol extract	Chloroform extract
<i>S. aureus</i>	15.00	14.33	–
<i>B. cereus</i>	8.00	9.00	–
<i>B. subtilis</i>	16.33	15.33	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–
<i>K. pneumoniae</i>	15.00	12.00	–
<i>E. coli</i>	–	–	–
<i>B. stearothersophilus</i>	30.00	25.00	–

3.4. Extraction of antimicrobial compounds

Three organic solvents were tested for extraction of antimicrobial products. The results indicated that ethyl acetate and butanol were the most appropriate for antibiotics extractions (Table 2).

3.5. TLC and bioautography

Microbiological revelation, by bioautography, indicated that the ethyl acetate extract allowed us to identify a single active spot on the solvent systems (ethanol-ammonia-water), its $R_f = 0.74$. This spot showed strong antibacterial activities against *B. stearothersophilus*, and it had a brown color to the naked eye, light blue at 256 nm while it was dark at 355 nm.

3.6. Partial characterization of products

Chromogenic reactions were positive with ninhydrin and ferric chloride, while Molish and formaldehyde- H_2SO_4 tests were negative.

The UV-vis spectrum of the butanol extract showed maxima absorption at 240 and 276 nm (Figure 3).

The infrared spectrum of the butanol extract indicated presence of a characteristic band at 3345.562 cm^{-1} (Figure 4).

3.7. Identification of isolate LAM143cG3

The isolate LAM143cG3 was characterized by unfragmented vegetative mycelium (Figure 5A). The aerial mycelium was stable and carried globular sporangia containing spores arranged in a spiral (Figure 5B). Spores were mobiles and had different forms (slightly curved or spiral rods).

The chemotaxonomic study showed the presence of meso-diaminopimelic acid isomer in the cell-wall but not glycine. Revelation sugars indicated the presence of two spots (Figure 6), one

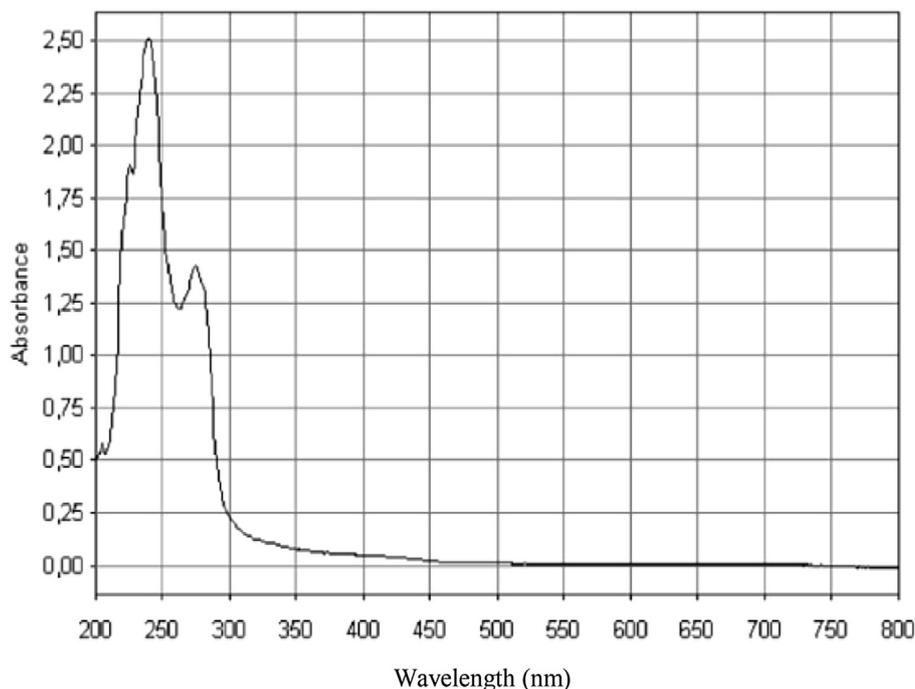


Figure 3. UV-visible spectrum of butanol extract of the isolate LAM143cG3.

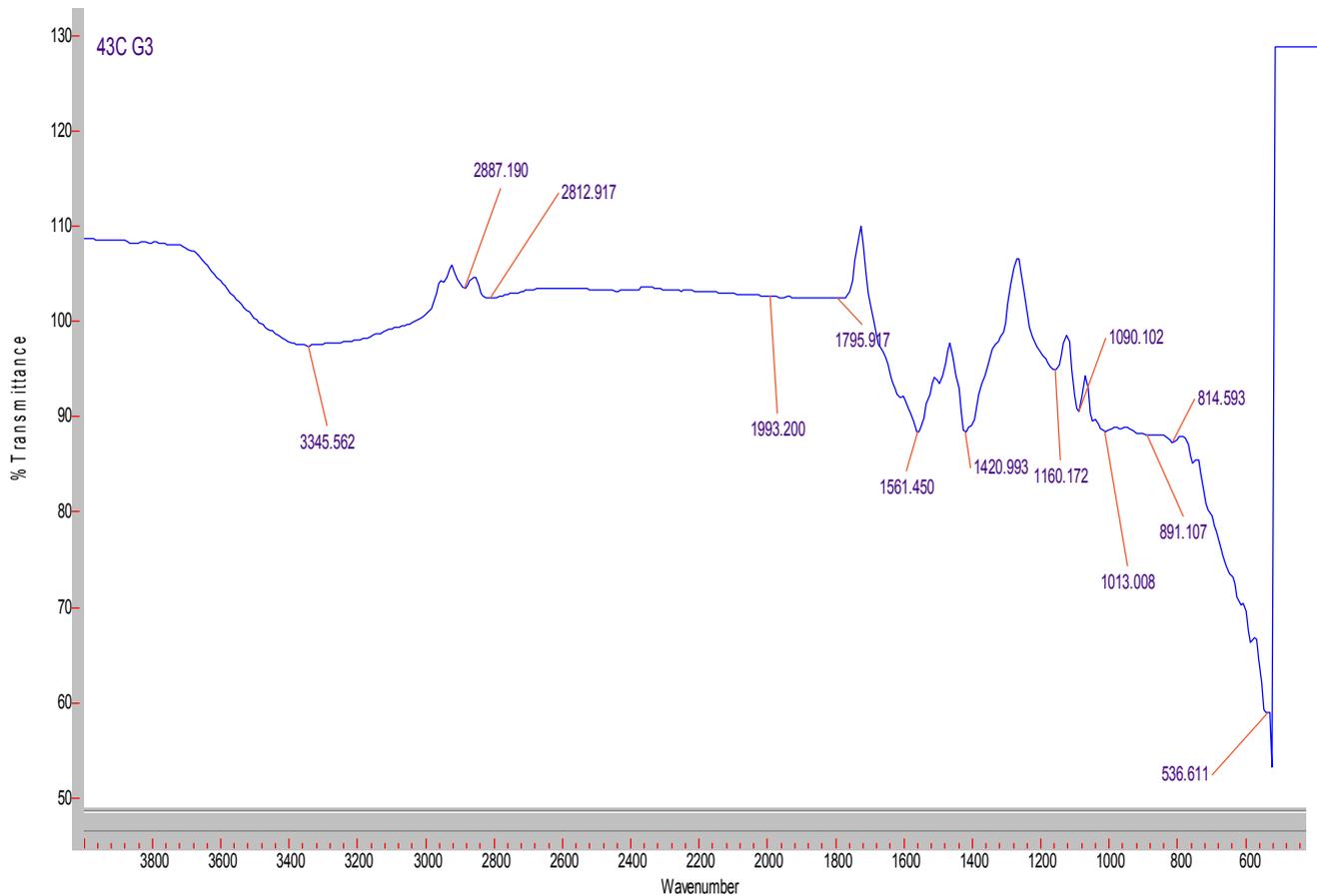


Figure 4. Infrared spectrum of butanol extract of the isolate LAM143cG3.

down, corresponded to glucose, and the other at the top, which did not correspond to any sugar found in the walls of actinomycetes.

3.8. Difference between isolate LAM143cG3 and species of the genus *Spirillospora*

The comparison between the species of *Spirillospora* [*Spirillospora rubra* (*S. rubra*) and *Spirillospora albida* (*S. albida*)] and our isolate was showed in Table 3.

For physiological characteristics, our isolate tolerated up to 15% NaCl and had an optimum growth temperature between

42 and 45 °C, while the species *S. albida* and *S. rubra* tolerated 2.5% NaCl and had optimum temperature growth at 30 °C [30].

For biochemical characteristics, the species *S. rubra* did not use xylose, lactose, galactose and rhamnose [30], while the isolate LAM143cG3 used all carbon sources for growth.

For cultural characteristics, the substrate mycelium of the species *S. albida* was beige while it was red-brown for the species *S. rubra* [30], whereas for the isolate LAM143cG3 it was yellow imperial on ISP2, off white on ISP3, lemon yellow on ISP4 and colorless on ISP5.

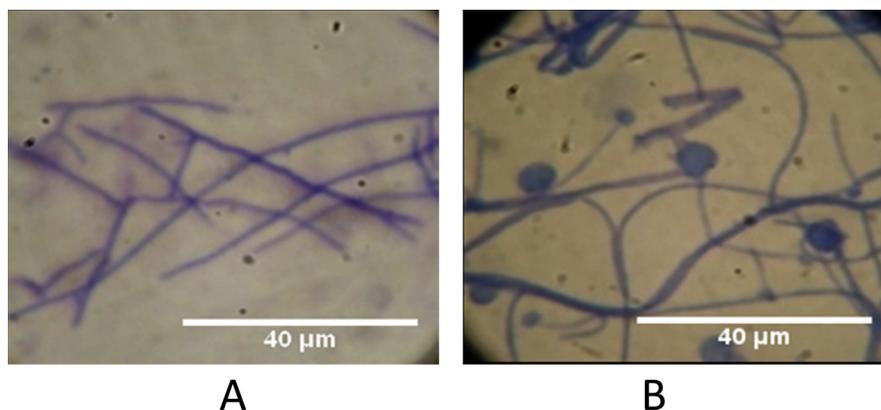


Figure 5. Microscopic observation of the isolate LAM143cG3. A: Vegetative mycelium; B: Aerial mycelium.

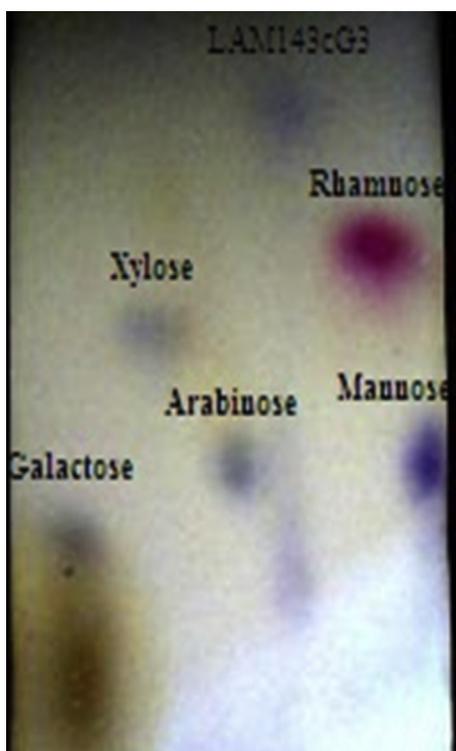


Figure 6. Separation of whole-cell sugars from the cell hydrolyzate of strain LAM143cG3 by TLC.

4. Discussion

Recent research efforts have focused on the exploration of underexplored habitats to discover novel bioactive secondary metabolites from the autochthonous microbiota.

Sebkha is among the extreme environments underexplored. In fact, studies on actinomycetes isolated from the Algeria sebkha are very few [20,31,32].

Among the four used culture media, the best for the isolation of actinomycetes from sebkha of Kenadsa is the medium starch casein agar. This performance can be explained by the presence of starch and casein in the media which stimulate the growth of actinomycetes in preference to other bacteria [33].

The bioactivity of the isolates was dissimilar between Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. The results clearly demonstrate that a Gram-positive bacterium was highly susceptible to the tested crude extracts compared to Gram-negative bacteria. This different sensitivity between Gram-positive and Gram-negative bacteria could be ascribed to morphological differences such as outer membrane of Gram-negative bacteria having lipopolysaccharide which makes the cell wall impermeable to lipophilic extracts. However, a Gram-positive bacterium was more susceptible because of lacking of outer membrane [25,34].

Chromogenic reactions of bioactive substances secreted by the isolate LAM143cG3 have revealed the presence of phenol and amine. In contrast, carbohydrate residues are absent. The presence of amine groups is confirmed by the band 3345.562 cm^{-1} of

Table 3

Characteristics differentiating strain LAM143cG3 from other *Spirillospora* species.

Characteristics	Isolate LAM143cG3	<i>S. albida</i>	<i>S. rubra</i>
Morphologys			
Aerial mycelium	Stable	Stable	Usually absent
Substrate mycelium	Unfragmented	Unfragmented	Unfragmented
Sporangium	Spherical	Spherical to vermiform	Spherical
Physiological characteristics			
NaCl tolerance	15%	2.5%	2.5%
Optimum temperature for growth	42 °C	30 °C	30 °C
Utilization of			
Fructose	+	+	ND
Arabinose	+	+	ND
Xylose	+	–	ND
Lactose	+	–	ND
Glucose	+	+	
Saccharose	+	+	ND
Rhamnose	+	–	ND
Galactose	+	–	ND
Mannitol	+	+	ND
Color of aerial mycelium	Blanc	Blanc	Blanc
Color of substrate mycelium			
ISP2	Yellow imperial	Beige	Red to red-brown
ISP3	Off white		
ISP4	Lemon yellow		
ISP5	Colorless		
Production of melanoid pigments			
ISP6	–	–	–
ISP7	–	–	–

the infrared spectrum which corresponds to the secondary amines (NH).

Analysis of the crude butanol extract by UV–visible spectrophotometry indicates that this sample is not polyenic in nature, which is characterized by the presence of three highly characteristic maxima between 291 and 405 nm [35].

According to the results of the chemotaxonomic study, the isolate LAM143cG3 is affiliated to chimiotype III according to classification of Lechevallier and Lechevallier 1970 [36].

Based on the chemical and morphological characteristics, this isolate was identified as a member of the genus *Spirillospora* according to Bergy's Manual of Systematic (2012) [37]. But this genus is characterized by presence of madurose in cell wall, which is absent in wall of our isolate. This can be explained by the effect of optimum temperature required by this isolate (42–45) °C which can inhibit the synthesis of madurose. This point has already been made for thermophilic *Actinomadura* (madurose synthesized in trace amount) and *Thermomonospora* (lack madurose) [30].

The comparison between our isolate (LAM143cG3) and species of *Spirillospora* suggested a lot of biochemical, physiological and cultural differences, allowing us to suppose that our isolate may be a new member in the genus *Spirillospora*. These results should be confirmed later by sequencing ADN16s.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

References

- [1] Sathish KS, Kokati VB. *In-vitro* antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(10): 787-92.
- [2] Saravana Kumar P, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *Kaohsiung J Med Sci* 2014; **30**(9): 435-46.
- [3] Kumar PS, Raj JP, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(12): 936-43.
- [4] Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Cent Eur J Biol* 2012; **7**(3): 373-90.
- [5] Raja A, Prabakarana P. Actinomycetes and drug-an overview. *Am J Drug Dis Dev* 2011; **1**(2): 75-84.
- [6] Rajeswari P, Jose PA, Amiya R, Jebakumar SRD. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Front Microbiol* 2015; <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00753>.
- [7] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res* 2012; **167**(10): 571-80.
- [8] Singh LS, Sharma H, Talukdar NC. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiol* 2014; <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-014-0278-3>.
- [9] Kishore P, Mangwani N, Dash HR, Das S. Taxonomic study of antibiotic-producing marine actinobacteria. In: Kim SK, editor. *Marine microbiology: bioactive compounds and biotechnological applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2013, p. 37-8.
- [10] Valan AM, Ignacimuthu S, Agastian P. Actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu with its antimicrobial properties. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(Suppl. 2): S830-7.
- [11] Tiwari K, Gupta RK. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol* 2012; **32**(2): 108-32.
- [12] Jose PA, Jebakumar SRD. Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes. *Front Microbiol* 2014; <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00242>.
- [13] Pochon J, Tardieux P. [*Analytical techniques of soil microbiology*]. St-Mandé: Edition de la Tourtourelle. 1962, p. 111. French.
- [14] El-Nakeeb MA, Lechevalier HA. Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol* 1963; **11**(2): 75-7.
- [15] Valli S, Suvathi SS, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(6): 469-73.
- [16] Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK, Gopalan N. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *J Adv Pharm Technol Res* 2013; **4**(2): 118-23.
- [17] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 1966; **16**(3): 313-40.
- [18] Lee EJ, Hwang KY, Lee HS, Chung N. Characterization of a new *Streptomyces* sp. A1022 as a potential biocontrol agent. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2011; **54**(3): 488-93.
- [19] Jose PA, Jebakumar SR. Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin, India. *Aquat Biosyst* 2012; **8**(1): 23.
- [20] Boughachiche F, Reghioia S, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A, et al. [Isolation of actinomycetales producing antimicrobial substances from the Sebkhia Ain Milila]. *Sci Technol* 2005; **23**(1): 5-10. French.
- [21] Bizuye A, Moges F, Andualem B. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. *Asian Pac J Trop Dis* 2013; **3**(5): 375-81.
- [22] Kumar V, Bharti A, Gupta VK, Gusain O, Bisht GS. Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; **28**(3): 871-80.
- [23] Badji B, Mostefaoui A, Sabaou N, Mathieu F, Lebrihi A. Identification of a new strain of *Actinomadura* isolated from Saharan soil and partial characterization of its antifungal compounds. *Afr J Biotechnol* 2011; **10**(63): 13878-86.
- [24] Parthasarathi S, Sathya S, Bupesh G, Durai Samy R, Ram Moham M, Selva Kumar G, et al. Isolation and characterization of antimicrobial compound from marine *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49. *World J Fish Mar Sci* 2012; **4**(3): 268-77.
- [25] Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; **3**(6): 426-35.
- [26] Dasari VR, Muthyala MK, Nikku MY, Donthireddy SR. Novel Pyridinium compound from marine actinomycete, *Amycolatopsis alba* var. nov. DVR D4 showing antimicrobial and cytotoxic activities *in vitro*. *Microbiol Res* 2012; **167**(6): 346-51.
- [27] Couillerot O, Loqman S, Toribio A, Hubert J, Gandner L, Nuzillard JM, et al. Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; **944**: 30-4.
- [28] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 1983; **29**(4): 319-22.
- [29] Stanek JL, Roberts GD. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* 1974; **28**(2): 226-31.
- [30] Kroppenstedt RM, Goodfellow M. The family *Thermomonosporaceae*: *Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Spirillospora* and *Thermomonospora*. In: Dworki M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The prokaryotes*. 3rd ed. New York: Springer; 2006, p. 682-724.
- [31] Meklat A, Sabaou N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A. Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol* 2011; **77**(18): 6710-4.

- [32] Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, et al. *Actinopolyspora mzabensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; **63**(Pt 10): 3787-92.
- [33] Grigorova R, Norris JR. *Methods in microbiology*. London: Academic Press; 1990, p. 538.
- [34] Hozzein WN, Rabie W, Ali Mia. Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. *Afr J Biotechnol* 2011; **10**(12): 2295-301.
- [35] Lindenfelser LA, Shotwell OL, Bachler MJ, Shannon GM, Pridham TG. Antibiotics against plant disease: VIII. screening for nonpolyenic antifungal antibiotics produced by streptomycetes. *Appl Microbiol* 1964; **12**(6): 508-12.
- [36] Lechevalier MP, Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Evol Microbiol* 1970; **20**(4): 435-43.
- [37] Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo M, Ludwig W, et al. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed., vol. 5. New York: Springer; 2012, p. 1750.