

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**Université de Saida "Dr. Moulay Tahar"**



**FACULTE DES SCIENCES**

**Laboratoire biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation  
biologique des plantes**

**Département de Biologie**

# **Mémoire**

**En Vue de l'Obtention du Diplôme :**

## **Master**

**Option : Microbiologie Appliquée**

## **Thème**

**Isolement à partir de différents écosystèmes naturels  
d'Algérie des actinomycètes éventuellement  
productrice de substances antifongique**

**Présenté par:**

**Itt Imane & Alilat Halima**

**Soutenu le : 17/09/2020**

**Devant le jury composé de :**

**Mr. Si Tayeb Tayeb**

**Pr**

**Président**

**Mr. Benreguieg Mokhtar**

**MCA**

**Encadreur**

**Mr. Ziani Kaddour**

**MCA**

**examinateur**

*2019/2020*

# *Remerciement*

***Avant tout nous remercions ALLAH le tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la patience pour réaliser ce travail.***

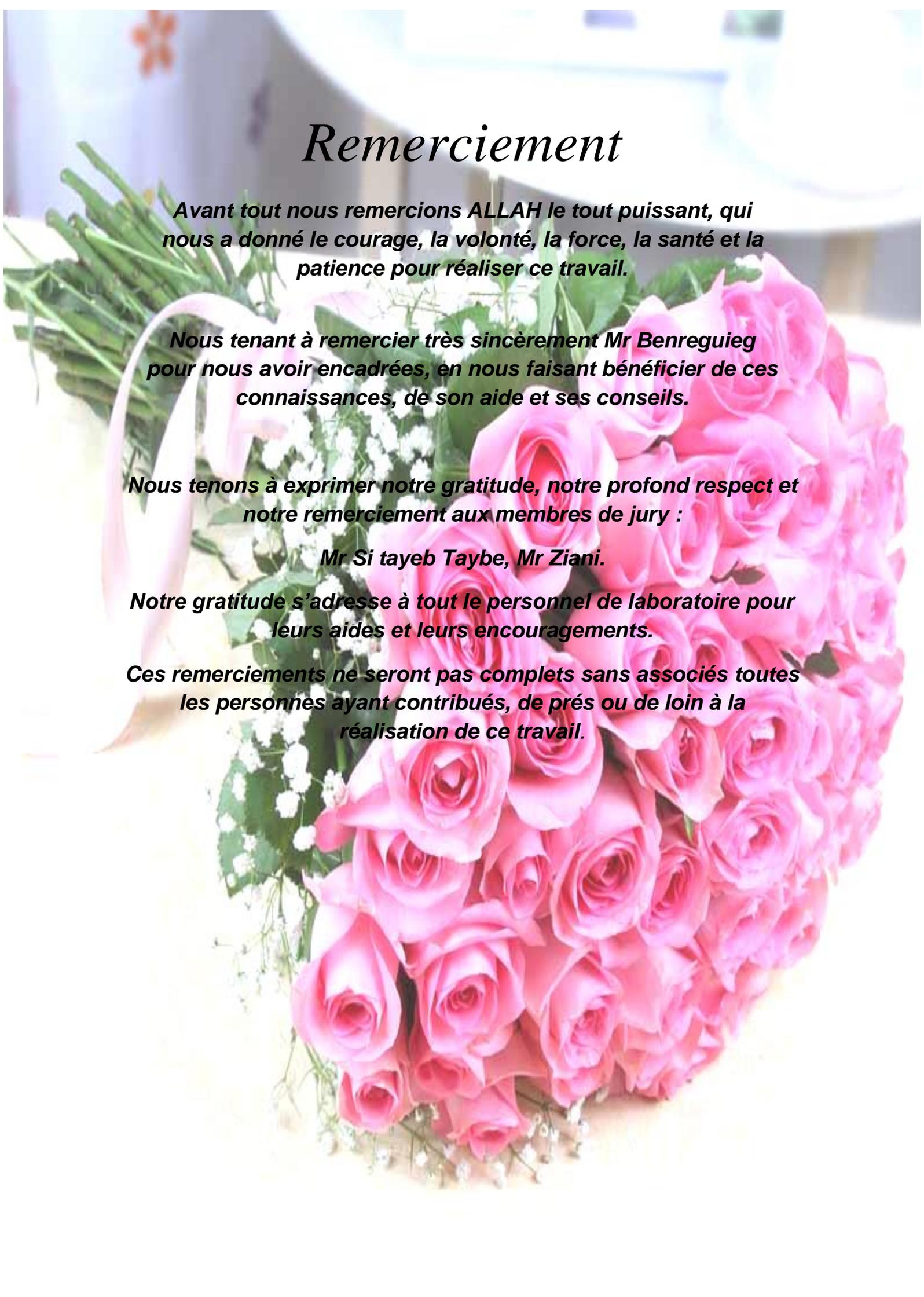
***Nous tenant à remercier très sincèrement Mr Benreguiég pour nous avoir encadrées, en nous faisant bénéficier de ces connaissances, de son aide et ses conseils.***

***Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et notre remerciement aux membres de jury :***

***Mr Si tayeb Taybe, Mr Ziani.***

***Notre gratitude s'adresse à tout le personnel de laboratoire pour leurs aides et leurs encouragements.***

***Ces remerciements ne seront pas complets sans associés toutes les personnes ayant contribués, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.***





# Dédicace

*A mon très chère père Taher, mon exemple dans cette vie, qui ma toujours soutenu et encourager et qui est toujours présent pour moi.*

*A la plus chère au monde, ma mère Saadia qui a toujours encouragé durant mes études, je demande a dieu de les protéger et leur réserver une longue vie.*

*A mes Très chères frères : Gacem et Sa femme, Ahmed et Sa femme, maamer, Nacer et sa femme.*

*Les poussins : Hanaa, Malek, raghed, Assil, Hanin, Imen, Taher, Mohamed, Fares*

*A mon mari Djeloul qui ma toujours soutenu m'encourage*

*A mes Très chères amies Bouchra, Amina*

*A ma binôme et toute sa famille*

*A toute ma famille Itt*

**IMENE**



*Dédicace*

*Avant tout, je remercie 'Dieu'  
de m'avoir donné le courage et la volonté pour réaliser  
ce modeste travail*

*Je dédie ce travail :  
À mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde et à  
lesquelles je dois toute ma vie et toutes mes réussites.*

*À mon très cher mari Mohamed pour son aide et ses  
encouragements et à toute sa famille.*

*À mes sœurs Asmaa et Sara*

*À mon frère Abdelghani et sa femme et sa fille Lyna*

*À toute ma famille et toutes mes amies  
A ma très chère amie Badra*

*À tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la  
réalisation de ce mémoire.*

**HALIMA**

## **Résumé**

La recherche de nouvelles molécules antifongiques est devenue une nécessité suite à l'apparition de nouvelles maladies infectieuses dû à des pathogènes et l'augmentation de microorganismes résistants à ces molécules. Dans ce contexte, notre travail a pour objectif d'isoler, à partir des écosystèmes variés de l'Algérie, des actinomycètes et la recherche d'une éventuelle activité antifongique chez les souches obtenus. Trois milieux de cultures (GYM, Bennet et ISP2) de compositions différentes sont utilisés pour réaliser l'isolement afin d'avoir une grande diversité des souches. Au total 20 isolats actinomycétales sont obtenus à partir de

six sites de prélèvement différents. Les bactéries isolées ont subi par la suite une purification et une identification macro et micro morphologique pour confirmer leur appartenance au groupes des actinomycètes.

Le pouvoir inhibiteur est évaluée chez 14 isolats par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis de cinq espèces fongiques à savoir : *Aspergillus flavus*, *phytophthora infestans*, *Endosporium sp.*, *Aspergillus Niger*, et *Candida albicans*. 13 isolats sur les 14 testés (soit 93%) ont montré une activité contre au moins une souche fongique indicatrice. Une souche codée E4 a inhibée la croissance de 4 champignons sur les 5 testés y compris *Candida albicans* et une codée B1 a montré une activité chez 3 souches fongiques sur 5. Ces deux isolats peuvent êtres des bons candidats pour des travaux de production et purification des agents bioactifs.

**Mots clés :** *actinomycètes*, isolement, écosystèmes naturels, activité antifongique.

## ملخص

أصبح البحث عن جزيئات جديدة مضادة للفطريات أمرًا ضروريًا بعد ظهور أمراض معدية جديدة بسبب مسببات الأمراض وزيادة الكائنات الحية الدقيقة المقاومة لهذه الجزيئات. في هذا السياق ، يهدف عملنا إلى عزل الفطريات الشعاعية عن النظم البيئية المتنوعة في الجزائر والبحث عن نشاط محتمل مضاد للفطريات في السلالات التي تم الحصول عليها. يتم استخدام ثلاث وسائط استزراع (ISP2 و Bennet و GYM) من التركيبات المختلفة لإجراء العزل من أجل الحصول على تنوع كبير من السلالات. تم الحصول على ما مجموعه 20 عزلة شعاعية من ستة مواقع تجميع مختلفة. تم إخضاع البكتيريا المعزولة بعد ذلك للتنقية والتعريف المورفولوجي الكلي والجزئي لتأكيد عضويتها في مجموعة الأكتينومييسيت.

تم تقييم القدرة المثبطة في 14 عزلة بتقنية اسطوانات الأجار ضد خمسة أنواع من الفطريات وهي: *Aspergillus flavus* و *phytophthora infestans* و *Endosporium sp* و *Aspergillus Niger* و *Candida albicans*. أظهرت 13 عزلة من أصل 14 (93%) نشاطاً ضد سلالة فطرية مؤشر واحد على الأقل. سلالة تم ترميزها لـ E4 حالت دون نمو 4 من أصل 5 فطريات تم اختبارها بما في ذلك *Candida albicans* و B1 أظهر نشاطاً في 3 من أصل 5 سلالات فطرية ، ويمكن أن تكون هاتان العزلتان مرشحتين جيداً لأعمال الإنتاج والتنقية. العوامل النشطة بيولوجياً.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الشعاعية ، العزلة ، النظم البيئية الطبيعية ، النشاط المضاد للفطريات

# Abstract

The search for new antifungal molecules has become a necessity following the emergence of new infectious diseases due to pathogens and the increase of microorganisms resistant to these molecules. In this context, our work aims to isolate, from the varied ecosystems of Algeria, *actinomycetes* and the search for possible antifungal activity in the strains obtained. Three culture media (GYM, Bennet and ISP2) of different compositions are

used to perform the isolation in order to have a wide variety of strains. A total of 20 *actinomycetal* isolates are obtained from six different collection sites. The isolated bacteria were subsequently subjected to purification and macro and micro morphological identification to confirm their membership in the actinomycetes group.

The inhibitory power is evaluated in 14 isolates by the agar cylinder technique against five fungal species, namely: *Aspergillus flavus*, *phytophthora infestans*, *Endosporium sp.*, *Aspergillus Niger*, and *Candida albicans*. 13 of the 14 isolates tested (i.e. 93%) showed activity against at least one indicator fungal strain. A strain coded for E4 inhibited the growth of 4 out of 5 fungi tested including *Candida albicans* and a B1 coded showed activity in 3 out of 5 fungal strains. These two isolates may be good candidates for production and purification work. bioactive agents.

**Key words:** actinomycetes, isolation, natural ecosystems, antifungal activity

# Table des matières

Remerciement.....	
Dédicace.....	
Résumé.....	
ملخص.....	
Abstract .....	
Table des matières.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction.....	01
<b>Synthèse Bibliographique</b>	
<b>CHAPITRE I : actinomycètes</b>	
I. 1 Historique.....	05
I.2 définition.....	06
I.3 croissance des actinomycètes sur milieu solide et sur milieu liquide.....	07
I.4 Morphologie .....	07
I.5 Importance des actinomycètes.....	12
I.5.1 En agronomie.....	12
I.5.2 En biotechnologie.....	12
I.5.3 En pathologie.....	13
I.5.4 Autre Role .....	14
I.6 Le cycle de développement des actinomycètes.....	14
I.6.1 Type des spores.....	16
I.6.2 formation des spores.....	17
I.6.2.1 Les exospores.....	17
I.6.2.2 Les endospores.....	17
I.6.2.3 Germination des spores.....	18
I.6.2.4 Mycélium du substrat et mycélium aérien.....	18
I.6.2.5 Thermo-résistance des spores.....	18
I.6.2.6 Structures particulières.....	19
I.7 Ecologie.....	19

I.8 Classification des actinomycètes.....	20
I.9 Identification des actinomycetes.....	22
I.9.1 Identification morphologique des actinomycètes.....	22
I.9.2 Identification chimio-taxonomique des actinomycètes.....	22
I.9.3 Identification génomique des actinomycètes.....	23
I.10 Physiologie et métabolisme.....	23
I.10.1 Physiologie.....	23
I.10.1.1 Le taux d'humidité.....	23
I.10.1.2 La température.....	23
I.10.1.3 Le PH.....	24
I.10.1.4 Rapports avec l'oxygène.....	24
I.10.1.5 Matière organique.....	24
I.10.2 Diversité métabolique.....	24
I.11 Génétique.....	25
I.12 Culture des actinomycètes.....	25

## CHAPITRE II Antifongique

II.1 Définition.....	27
II.2 Historique.....	27
II.3 La chimiothérapie antifongique .....	28
II.3.1 Origine des antifongiques .....	28
II.3.2 Principaux traitements par antifongiques e limites.....	28
II.4 Classification des antifongiques selon l'origine et la structure.....	28
II.4.1 Antifongiques de synthèse chimiques.....	29
II.4.1.1. Les azolés.....	29
II.4.1.2. Les fluoropyrimidines.....	30
II.4.2 Antifongiques naturels.....	31
II.4.2.1. Les polyènes.....	31
II.4.2.1.1. La nystatine.....	31
II.4.2.1.2. L'Amphotéricine B .....	31
II.4.2.2. Les échinocandines.....	32
II.4.3 Nouvelle classe d'antifongiques.....	33
II.4.3.1. La sordarine.....	33
II.4.3.2. La nikkomycine.....	33

II.4.3.3. Les allylamines.....	34
II.4.3.4. Les morpholines.....	34
II.5 Modes d'action des principaux antifongiques utilisés en thérapeutiques	34
II.5.1 Les polyènes .....	34
II.5.2 Le fluoro-cytosine.....	34
II.5.3 Les azolés.....	35
II.5.4 Les échinocandines.....	35
II.6 Mécanismes de résistance aux principaux antifongiques.....	36
II.6.1 Les polyènes.....	36
II.6.2 Les fluoropyrimidines.....	37
II.6.3 Les azolés.....	38
II.6.4 Les échinocandines.....	39
II.7 Levure .....	41
II.8 Les infections fongiques .....	41
II.8.1 Les mycoses cutanées ou superficielles .....	41
II.8.2 Les mycoses profondes ou viscérales .....	41
II.9 Spectre clinique .....	41
II.9.1 Infection à <i>Candida albicans</i> .....	41
II.9.2 Infection à <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	43
II.10 Technique d'étude et de caractérisation d'un antifongique.....	44
II.10.1 Production de métabolites secondaires.....	44
II.10.1.1 Effet de la composition du milieu de culture.....	45
II.10.2 Extraction des antifongiques.....	45
II.10.3 Purification des antifongiques.....	45
A. Purification par chromatographie sur couches minces et sur colonne.....	45
B. Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)....	46
C. Identification des molécules par des méthodes spectrales.....	

## MATÉRIEL et MÉTHODE

III.1 objectif.....	49
III.2 Echantillonnage.....	50
III.3 Analyse physicochimique du sol.....	50
III.3.1 Mesure de pH.....	50
III.3.2 Dosage d'humidité.....	51

<b>III.3.3 Détermination du taux de la matière organique.....</b>	<b>51</b>
<b>III.4 Isolement des actinomycètes à partir le sol .....</b>	<b>51</b>
<b>III.4.1 Prétraitement des échantillons .....</b>	<b>51</b>
<b>III.4.2 Préparation de la suspension de la dilution et ensemencement.....</b>	<b>52</b>
<b>III.5 Identification des actinomycètes.....</b>	<b>54</b>
<b>III.5.1 Observation macroscopique.....</b>	<b>54</b>
<b>III.5.2 Observation microscopique .....</b>	<b>54</b>
<b>III.5.3 Morphologie des mycéliums aériens et de substrat .....</b>	<b>54</b>
<b>III.6 Purification des souches.....</b>	<b>55</b>
<b>III.7 conservation des souches.....</b>	<b>55</b>
<b>III.8 Etude phénotypique .....</b>	<b>56</b>
<b>III.8.1 Recherche de catalase .....</b>	<b>56</b>
<b>III.8.2Recherche de la cellulase .....</b>	<b>56</b>
<b>III.8.3 Hydrolyse d'amidon .....</b>	<b>56</b>
<b>III.8.4 Hydrolyse de la caséine .....</b>	<b>56</b>
<b>III.8.5. Hydrolyse de la gélatine.....</b>	<b>56</b>
<b>III.9 Microorganismes cibles.....</b>	<b>57</b>
<b>III.9.1 Identification des champignons.....</b>	<b>57</b>
<b>III.9.2 Caractères macroscopique .....</b>	<b>57</b>
<b>III.9.3 Caractères microscopique .....</b>	<b>57</b>
<b>III.10 Méthode de cylindre d'agar.....</b>	<b>57</b>
<b>III.11 Recherche de l'activité en milieu solide .....</b>	<b>58</b>
<b>III.11.1 Technique de stries croisées.....</b>	<b>58</b>
<b>III.11.2 Technique de la double couche.....</b>	<b>59</b>
<b>III.11.3 Production des molécules bioactives en milieu liquide.....</b>	<b>59</b>
<b>III. 12. Détection des antifongiques non polyéniques par Spectroscopie UV- visible</b>	<b>60</b>
<b>III.13. Etude des antifongiques produits.....</b>	<b>60</b>
<b>III.13.1. Extraction des antifongiques par des différents solvants d'extraction.....</b>	<b>61</b>
<b>III.14. Antifongigramme des souches.....</b>	<b>61</b>

## **RESULTAT ET DISCUSSION**

<b>IV Isolement des souches des actinomycètes.....</b>	<b>64</b>
<b>IV.1 Caractérisation des souches d'actinomycètes isolées.....</b>	<b>64</b>
<b>IV.1.1 morphologique.....</b>	<b>64</b>

IV.1.2 Etude Micro morphologique.....	68
IV.2 Etude phénotypique.....	70
IV.2.1 Recherche de catalase.....	70
IV.3 Identification des champignons.....	72
IV.3.1 Caractères macroscopique .....	72
IV.3.2 Caractère microscopique.....	73
IV.4 l'activité antifongique.....	75
IV.4.1 Méthode des cylindres d'agar.....	75
IV.5 production et Extraction des métabolites secondaire.....	78
IV.5.1 Recherche de l'activité en milieu solide.....	78
IV.5.2 Production des molécules bioactives en milieu liquide.....	78
IV.6 Détection des antifongiques non polyéniques par Spectroscopie UV- visible...	79
IV.7 Etude des antifongiques non polyéniques produits.....	79
IV.7.1 Détermination du meilleur solvant d'extraction.....	80
IV.8 Antifongigramme des souches.....	80
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>83</b>
<b>RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>86</b>
<b>ANNEXES.....</b>	

# Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Coupe transversale d'une colonie d'actinomycete, le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec les chaines de conidiospores y sont représentés .....	06
<b>Figure 02 :</b> Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) Bactéries du genre <i>Nocardia</i> qui se fragmente, (B) Bactéries du genre <i>Streptomyces</i> en sporulation. Barre d'échelle : 1 µm.....	08
<b>Figure 03:</b> Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface des spores chez le genre <i>Streptomyces</i> .....	09
<b>Figure 04:</b> Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes.	10
<b>Figure 05 :</b> Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides.....	11
<b>Figure 06 :</b> Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes.....	13
<b>Figure 07 :</b> Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide.....	15
<b>Figure 08 :</b> Cycle de développement de streptomycète.....	16
<b>Figure 09 :</b> morphologie des différentes chaines de spores chaines de spores chez les streptomycètes .....	17
<b>Figure 10 :</b> Système de classification hiérarchique proposé de la classe Actinobactéries basé sur des analyses phylogénétiques des données de séquence ADNr 16S .....	21
<b>Figure 11:</b> Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques. ....	27
<b>Figure 12:</b> Structure imidazole .....	30
<b>Figure 13 :</b> Structure triazole.....	30
<b>Figure 14 :</b> Comparaison des structures de la cytosine et de la 5-Fluoro-Cytosine.....	30
<b>Figure 15:</b> structure chimique des trois antifongiques polyénique majeurs .....	32
<b>Figure 16 :</b> cible d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote	35
<b>Figure 17 :</b> Mécanismes de résistance aux polyènes chez <i>C. albicans</i> .....	37
<b>Figure 18 :</b> Mécanisme de résistance aux 5-fluorocytosine .....	37
<b>Figure 19 :</b> Mécanismes de résistance aux azolés chez <i>C. albicans</i> .....	38
<b>Figure 20 :</b> Mécanismes de résistance aux échinocandines chez <i>C. albicans</i> .....	39
<b>Figure 21 :</b> Aspect d'un intertrigo candidosiques palmaire .....	42
<b>Figure 22 :</b> aspect clinique d'une candidose buccale .....	42
<b>Figure 23 :</b> Aspect clinique d'un onyxis candidosiques avec périonyxis .....	43
<b>Figure 24 :</b> Aspect radiologique (A) et histologique (B) d'une aspergillose pulmonaire	44

invasive.....	
<b>Figure 25</b> : plan d'étude de l'activité antifongique.....	49
<b>Figure 26</b> : préparation le milieu Isp2 .....	52
<b>Figure 27</b> : préparation le milieu PDA.....	52
<b>Figure 28</b> : Préparation des dilutions de sol.....	53
<b>Figure 29</b> : Les étapes suivies pour l'isolement des actinomycètes à partir le sol.....	53
<b>Figure 30</b> : Technique de culture sur lamelle.....	55
<b>Figure 31</b> : technique de conservation.....	55
<b>Figure 32</b> : technique de cylindre d'agar.....	58
<b>Figure 33</b> : Recherche d'activité en milieu liquide .....	60
<b>Figure 34</b> : plaque « sensitive « Yeastone » montrant les CMI de chaque antifongique.	62
<b>Figure 35</b> : Aspect microscopique de différentes souches d'actinomycètes après coloration de Gram.....	69
<b>Figure 36</b> : l'activité antifongique.....	76
<b>Figure 37</b> : Activité antifongique des actinomycetes contre A. flavus.....	76
<b>Figure 38</b> :Activité antifongique des actinomycetes contre A.niger.....	77
<b>Figure 39</b> : Activité antifongique conte endosporium.....	77
<b>Figure 40</b> : activité antifongique contre candida albicans.....	77

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Distribution des actinomycètes dans la nature .....	20
<b>Tableau 2</b> : mécanismes génétiques et fonctionnels de la résistance aux antifongiques..	40
<b>Tableau 3</b> : Situation géographique des sites d'échantillonnage.....	50
<b>Tableau 04</b> : caractéristique culturelle macromorphologiques de différentes souches d'actinomycètes.....	65
<b>Tableau 05</b> : Résultats obtenus de test catalase sur 20 souches.....	70
<b>Tableau 06</b> : Résultats des activités de dégradation des différents substrats des 20 souches étudiées.....	71
<b>Tableau 07</b> : les caractères macroscopique des champignons.....	72
<b>Tableau 08</b> : observation microscopique.....	74
<b>Tableau 09</b> : activité antifongique des actinomycètes.....	75

# Liste des abréviations

**5-FC:** 5-fluorocytosine

**5-FU:** 5-fluorouracile

**A. flav :** *aspergillus flavus*

**A. Niger:** *Aspergillus niger*

**A.E:** Acétate d'éthyle

**A.M:** Acétate d'éthyle – Méthanol

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**AMP B:** l'Amphotéricine B

**ARN:** Acide ribonucléique

**B.A.E:** *n*-butanol-acide acétique-eau

**BPCO:** broncho-pneumopathie chronique obstructive

**C.A:** *candida albicans*

**C°:** degrécalculs

**C14:** carbone 14

**CCM:** Chromatographie sur couche mince

**Chs:** la chitine synthéases

**CMI:** concentration minimale inhibitrice

**DM:** Dichlorométhane

**EF2:** facteur d'élongation 2

**Endo:** *Endosporium*

**ERG:** Ergostérol

**HPLC:** Hight Performance Liquide Chromatography

**Hsp90:** Heath stock protéine

**IC:** ionisation chimique

**IR:** Infrarouge

**ND:** Non déterminé

**P.infes :** phttophthora infestant

**RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire

**UPRT:** l'uridine phosphoribosyl-transférase

**UV-VIS:** Ultraviolet-Visible.

**VIH:** virus de l'immunodéficience humaine

**µl:** micro litres



# Introduction Générale

## Introduction Générale

---

Les produits naturels issus du métabolisme de microorganisme constituent l'une des principales sources des bioindustries de fermentation dans diverse domaine. Reconnu comme des agents performants de transformation, de dégradation et de production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologique très importantes. Parmi ces molécules, on peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotique, les antifongique ect.

( **Morakchi, 2011**).

Les produits naturels bioactifs sont essentiellement bio synthésés par microorganisme filamenteux. Ces derniers sont les actinomycètes, ils sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive qui subissent des différenciations morphologique durant leur cycle de vie. En réponse à des conditions défavorables, tel qu'un déficit en nutriments et en eau, les actinomycètes sporulent. Ce n'est que lorsque les conditions redeviennent favorables que les spores peuvent germer et former de nouveau le mycélium végétatif. Cette propriété joue un rôle important dans leur large distribution par le vent. (**Djaballah, 2010**).

Les actinomycètes habitent dans le sol et sont d'importantes décompositions de la matière organique, ce qui rend le sol fertile et par conséquent l'amélioration des récoltes. En plus du sol, Ils ont été isolés dans de nombreux environnements aquatique ; à savoir les écosystèmes marins, l'eau douce et les marécages salés. (**Boughachiche et al., 2005**).

Ils sont capable de métaboliser plusieurs et différents composés y compris les sucres (polysaccharides) , Les alcools, Les acides aminés et les composés aromatique par production d'enzymes extracellulaires. Leur aptitude à dégrader les pesticides, les herbicides et les hydrocarbures avait également été signalée (**Benimeli et al, 2003**). Cette diversité métabolique est due à leur génome extrêmement large qui a une centaine de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes qui leur permettent de répondre leurs besoins. Actuellement des recherches visent l'utilisation de ces bactéries dans l'agriculture en tant qu'agents de bio-contrôles dans l'espoir de diminuer l'utilisation néfaste des pesticides. Certaines caractérisation des actinomycètes les rendent agents de bio-contrôle importants, principalement contre les mycètes phyto-pathogènes dans le sol. Ces caractéristiques comprennent la production de différents types de métabolisme secondaires et de substances biologiquement actives, qui sont d'une valeur commerciale élevée : à savoir les enzymes qui visent directement la paroi des mycètes et les antibiotiques. Les actinomycètes sont aussi connus par leur production d'autres métabolites

## Introduction Générale

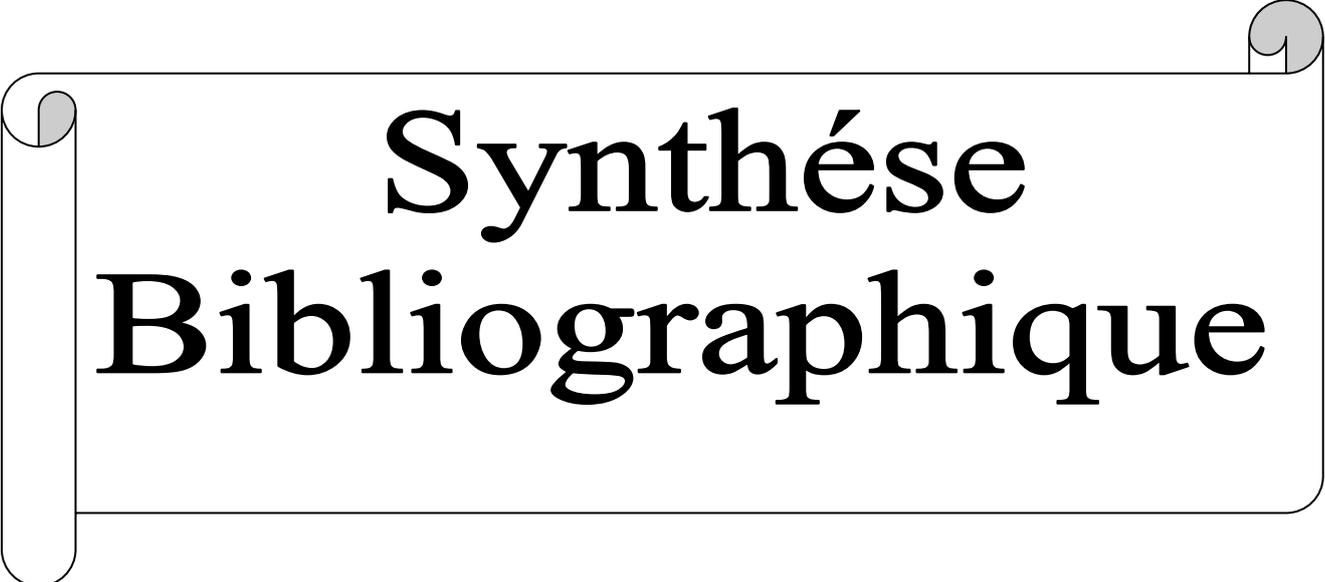
---

secondaires tels que les antibactériens, les antiparasitaires ect.(**Angehrn et al ., 2004 ; Imada,2005**).

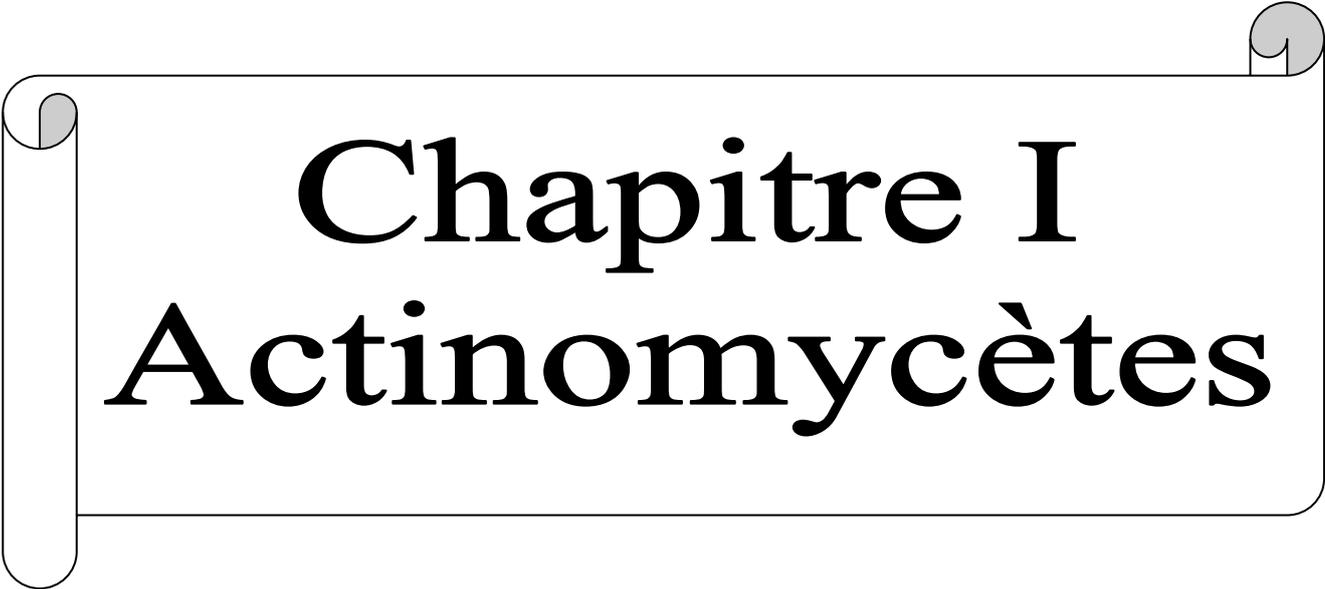
L'application de procédés biotechnologique de production de tous les métabolites synthétique par les actinomycètes et qui sont d'un intérêt pour l'homme serait beaucoup plus intéressante si ces mêmes bactéries productrices de ces métabolites étaient des halophiles (**Oren, 2001**).

L'incidence des infections fongique invasives a considérablement augmenté, conséquence de l'amélioration des techniques médicales, l'industrie pharmaceutique se voit mesuré à une demande thérapeutique considérable et croissant, elle doit rechercher de nouvelles molécules antifongique plus efficace ayant toxicité possible, le choix thérapeutique repose sur plusieurs critères à savoir l'état des patients, la durée du traitement, le caractères récidive de la pathologie, et enfin le prix couteux de certaines molécules (**Benouagueni,2015**).

L'objectif principal de notre étude consiste en l'isolement de souches d'actinomycètes à partir de divers écosystèmes et la recherche d'une éventuelle activité antifongique chez les isolats obtenus.



# Synthèse Bibliographique



# Chapitre I

# Actinomycètes

## I.1 Historique :

**Waksman (1959)** divise en quatre grandes périodes l'histoire des actinomycètes.

➤ **La première (1874-1900)**, est celle de la découverte de leurs rôles dans la pathologie : Cohn en 1875 découvre le premier actinomycète qu'il appela *Streptothrix foeresteri* ; Harz en 1877, isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis*.

➤ **Seconde période (1900-1919)** se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol : avec les travaux d'Orla Yensen (1909) qui créa la famille des Actinomycétacées qui comprend un seul genre *Actinomyces*, par la suite, de nombreuses espèces telluriques furent isolées et décrit, Buchanan (1917) créa l'ordre des Actinomycétales.

Les espèces qui composent le genre *Actinomyces*, étaient très différentes, certains auteurs ont commencé par scinder ce genre en plusieurs autres.

➤ **Troisième période (1919-1940)** : au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise, grâce aux recherches de Orskov (1923) qui créa le genre *Micromonospora*. Ce genre regroupe les actinomycètes qui ne produisent pas de mycélium aérien. Jensen (1932) regroupe dans le genre *Paraactinomyces* (actuellement *Nocardia*) les actinomycètes dont le mycélium de substrat se fragmente.

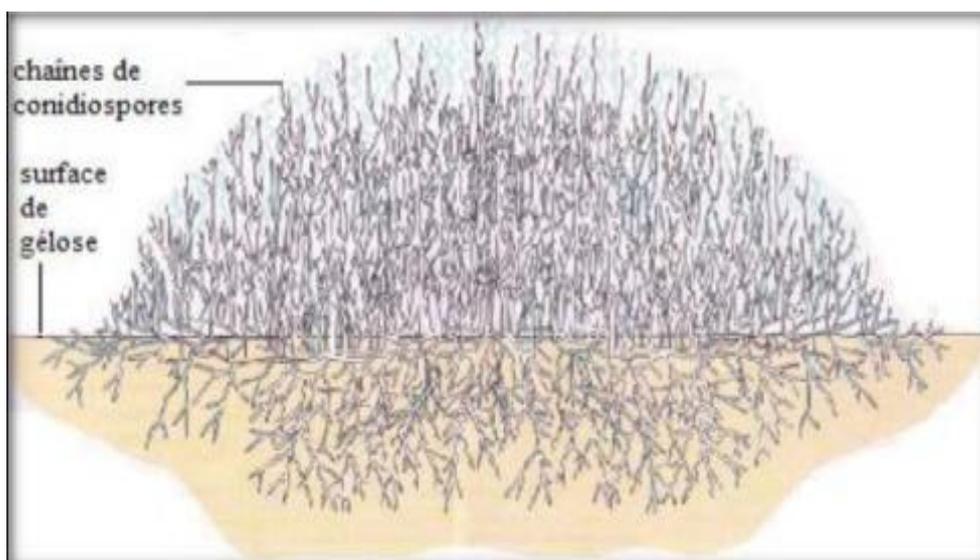
➤ **Quatrième période** : commence en 1940, et correspond à l'époque des antibiotiques produits par les actinomycètes, avec la création du genre *Streptomyces* (en combinant les noms des genres *Streptothrix* et *Actinomyces*) par **Waksman et Henrici en 1943** qui regroupe les actinomycètes dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores, En **1958 Pridham et al**, proposa un système de classification des *Streptomyces* basé sur la morphologie des chaînes de spores et la couleur du mycélium aérien ; Ettlting et al (1958) introduit un critère important dans la différenciation des espèces : la production des pigments mélanoides.

## I.2 Définition

Les Actinomycètes sont des bactéries connues pour leur capacité à produire de nombreux métabolites ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses (Ouhdouch et al., 2001).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Rastogi et Kishore, 1997). Cela explique leurs dénominations en grec « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants », expression utilisée pour les désigner en anglais (*Ray fungi*) et aussi en allemand et en russe. Les actinomycètes appartiennent à la classe des Actinobacteria. Ce sont des bactéries à Gram positif de haut GC % généralement compris entre 60 et 75 %. Le phylum des Actinobacteria est grand et complexe (Stackebrandt, 1997) il regroupe 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens.

Caractérisés par une croissance lente et souvent par une production importante d'antibiotiques. Plusieurs d'entre eux produisent des spores non mobiles (Streptosporangium) La plupart sont aérobies et neutrophiles. Leur morphologie, cependant, varie entre les différents genres, de forme cocci (*Micrococcus*), bâtonnets (*Mycobacterium*) et polymorphes (*Nocardia*) jusqu'aux filaments ramifiés qui se décomposent en cellules sphériques ou qui donnent un mycélium aérien avec de longues chaînes de spores (Yous, et Bendris, 2017).



**Figure 1 :** Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète, le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec les chaînes de conidiospores y sont représentés (Prescott et al., 2003).

Les actinomycètes constituent un groupe très étendue et variée de Gram positif, les bactéries aérobies, mycéliens qui jouent un rôle écologique important dans les cycles du sol. Beaucoup sont bien connus pour leur importance économique en tant que producteurs de substances biologiquement actives, comme les antibiotiques, les vitamines et des enzymes (Basilio, et al.,2003).

### I.3 Croissance des actinomycetes sur milieu solide et sur milieu liquide

Sur un substrat solide comme la gélose, le réseau ramifié d'hyphe formé par les actinomycetes se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former un mycélium végétatif (Prescott et al., 2003).

La croissance du mycélium aérien est influencée par plusieurs facteurs, notamment : la composition du milieu de croissance, la température d'incubation et la présence de composés stimulant spécifiquement le mycélium aérien est aérobie strict. Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphe dressés sur le mycélium du substrat. Ces hyphes aériens sont plus épais beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat, ils sont en générale pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe (Prescott et al., 2003).

La croissance en milieu liquide nécessite une aération du milieu par agitation et/ou par injection d'air ou oxygène. Les *streptomycetes* exposés à ces conditions, peuvent croître par élongation des filaments et présenter par la suite trois types de morphologie soit : sous forme de pelotes, ou bien sous forme mycélium libre ou encore par enchevêtrement du mycélium.

### I.4 Morphologie

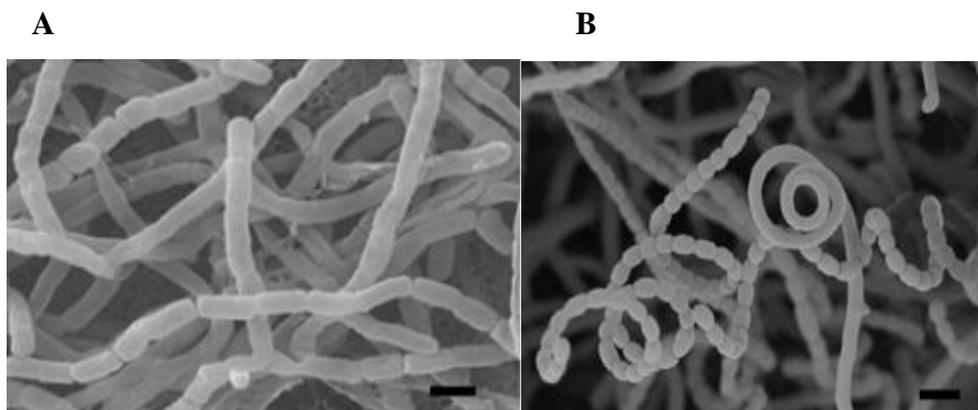
Ce sont des bacilles à Gram positif de 0.2 à 1 de large dont longueur varie de 1.5 à 50 pouvant se varier sous forme de filaments, bacilles ou forme de filaments, bacilles ou coccobacilles. Certaines espèces retiennent le Gram soit uniformément, soit irrégulière.

La coloration au bleu de méthylène permet d'observer plus facilement la morphologie des filaments, branchement, (notamment pour *D. congolentis*) organes de sporulation. Certaines espèces sont acido-résistantes quand on utilise une variante de la coloration de Ziehl neelsen .

Les différents *Actinomycetes* présentent des différences de composition de leur paroi.

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes. Toutefois, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1 µm, est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5 µm).

Le mycélium des actinomycètes présente une grande diversité de morphologies. On rencontre (i) des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), (ii) d'autres au mycélium fugace, qui se fragmente (certaines *Nocardia*), et enfin (iii) des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*. Les mycéliums fragmentaire et permanent sont illustrés sur la figure 2. (Belyagoubi, 2014).



**Figure 2 :** Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1 µm.

Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif (appelé aussi mycélium de substrat ou mycélium de base) et/ou en mycélium aérien. On distingue trois cas :

- Soit seul le mycélium végétatif est formé (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*).

La croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu.

Le mycélium est coénocytique : il renferme un cytoplasme commun multi-nucléoïde, et est donc dépourvu de septum.

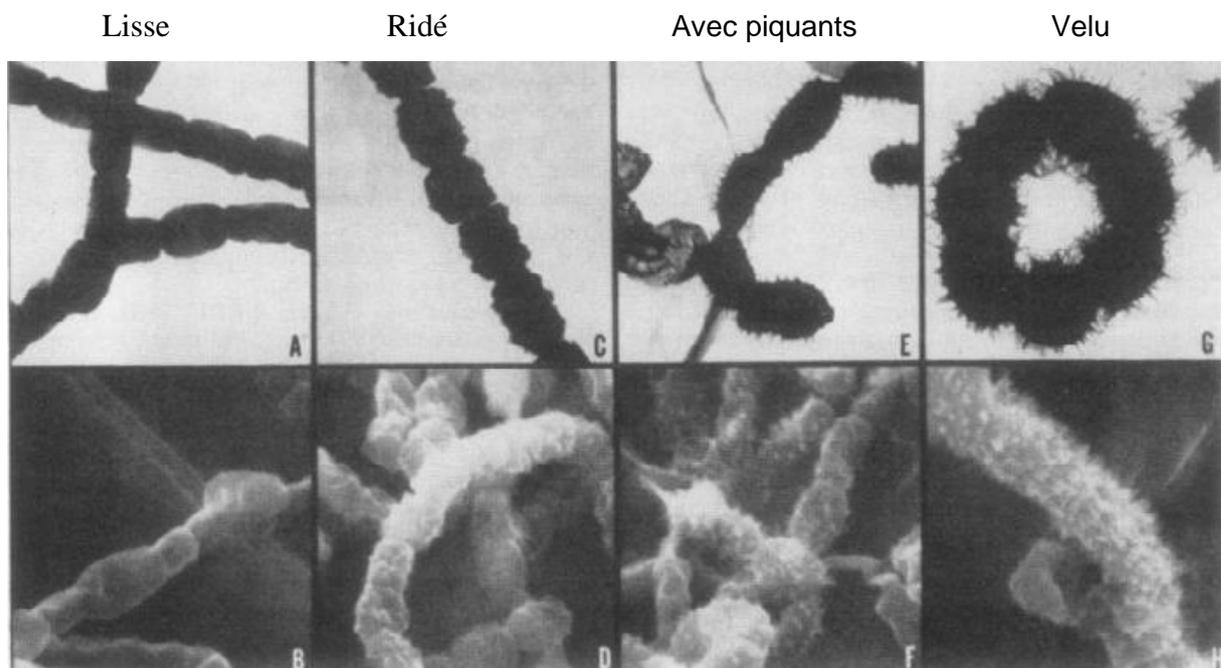
- Soit il y a formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien mûré en conidies (exemple : *Streptomyces*). Le mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat.

Soit, seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que pour le genre *Sporichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachées au substratum par des crampons (Djaballah, 2010).

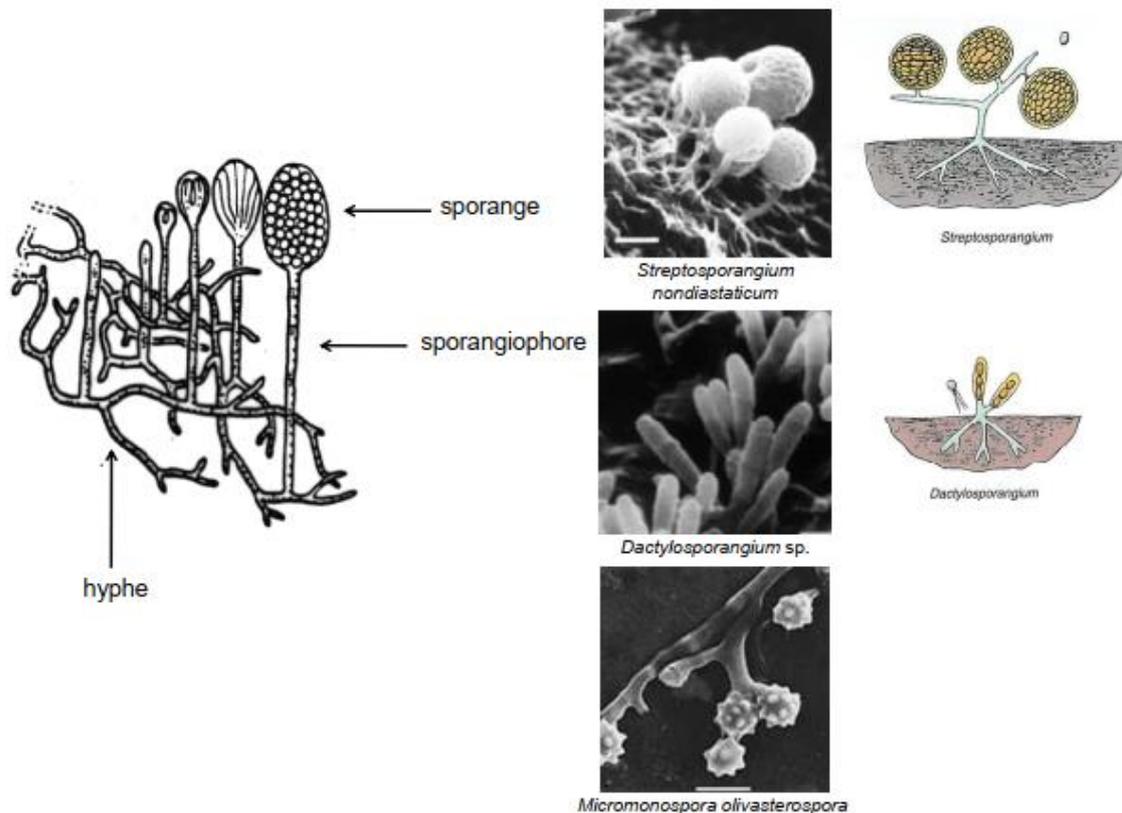
La plupart des actinomycètes sont immobiles. Cependant, certains produisent des spores flagellées, appelées zoospores, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques. Les spores d'actinomycètes présentent une grande variété d'arrangements. Les spores peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînettes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*).

Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. Elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. On rencontre également une importante diversité au niveau de la surface des spores : lisse, ridée, avec piquants ou d'aspect velu (**Figure 3**).

Chez certains genres, les spores sont contenues dans un sporange : compartiment qui se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore (**Figure 3**). Les sporanges contiennent quelques à plusieurs milliers de spores, formant des chaînes enroulées ou parallèles.



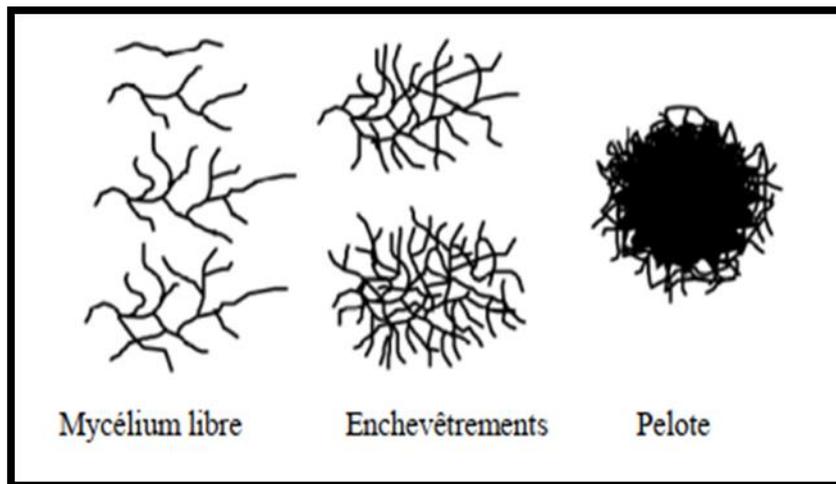
**Figure 3 :** Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre *Streptomyces* (Lyons et Pridham, 1971; Dietz et Mathews, 1971).



**Figure 4 :** Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes.

Les colonies formées sur milieu solide par les actinomycètes sont très particulières. Elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est variable de 1 à 10 mm.

L'aspect des colonies peut être compact, sec, lisse, rugueux à contours lisse ou échancrés. Les colonies sont souvent pigmentées (blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc... . En culture liquide sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air. Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'entremêlent pour former des agrégats (**Figure 5**). Ces derniers, généralement sphériques sont composés d'une masse dense d'hyphes enroulés. Les cellules du centre étant privées de nutriment, les agrégats grossissent seulement par la formation de cellules à la surface de la sphère (belyagoubi,2014).



**Figure 5:** Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

Enfin, il existe d'autres structures morphologiques plus atypiques. Certains actinomycètes forment des structures particulières qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie.

Ainsi les **sclérotés** trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés. Les Synnemata, appelés également corémies sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

Des vésicules appelés sporanges, contenant des spores. Ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développé ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien peu développé. Ils sont présents chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium* (Theilleux, 1993).

Les **conidies** sont des spores asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations :

- une seule conidie tel que le genre *Micromonospora* ;
  - une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
  - chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
  - longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;
  - conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées)
- (Belyagoubi, 20014).

## I.5 Importance des actinomycètes

### I.5-1 En agronomie

Les actinomycètes ont un rôle important dans le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité de dégrader des substances complexes et incapables d'être décomposées par les autres bactéries non mycéliennes et les champignons, telles que la lignine, la cellulose, la chitine, la kératine. Ils participent donc activement à la fertilisation des sols et décomposent les déchets urbains à haute teneur en produits chimiques (**Lamari, 2006**).

Les actinomycètes exercent une influence sur la croissance des plantes, et protègent les racines contre les invasions des champignons (**Yilma et al., 2008**). Certains antibiotiques sécrétés par les actinomycètes ont trouvé une application dans la lutte contre quelques maladies des plantes, comme c'est le cas de la kasugamycine, les polyoxines et la blasticidine. Ces derniers ont été isolés grâce à leur très forte activité contre

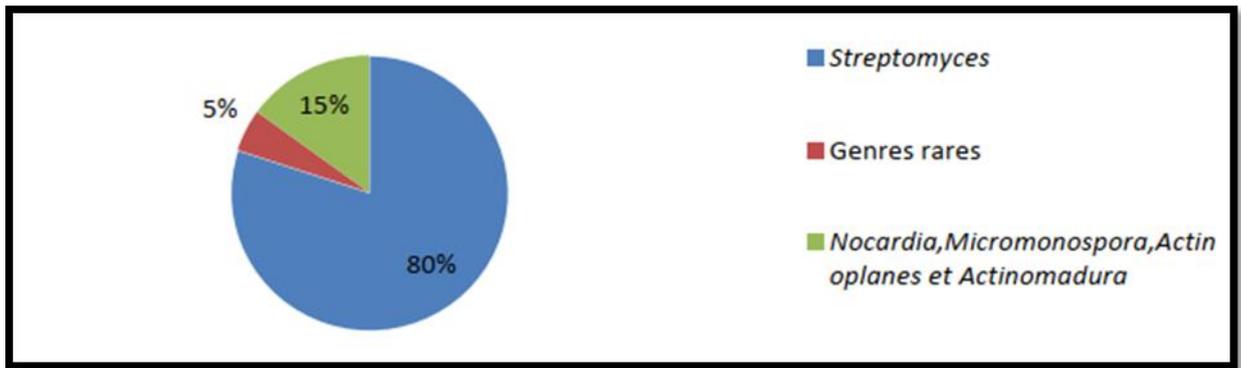
certaines maladies du riz et sont utilisés depuis longtemps et à grande échelle dans l'agriculture japonaise (**Lamari, 2006**).

Frankia est un genre fixateur de l'azote atmosphérique vivant en symbiose dans les racines de plantes dicotylédones arbustives autres que les légumineuses, comme le Casuarina, l'aulne, l'orme etc..... La plupart d'entre eux sont saprophytes mais quelques uns peuvent être pathogènes ou symbiotes de plantes (**Zaitlin et Watson, 2006**).

### I.5-2 En biotechnologie

Ce sont des microorganismes d'intérêt industriel par excellence, un producteur important des antibiotiques et d'autres molécules et substances bioactives. Jusqu'ici, environ deux tiers des antibiotiques connus ont été sécrétés par les actinomycètes,

le genre Streptomyces sécrète plus de 80% de ces molécules est très exploité (**Badji et al., 2009**).



**Figure 6:** Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes (Cité par Bakour, 2006).

La majorité des antifongiques naturels est d'origine microbienne et près de la moitié est synthétisé par les actinomycètes, en particulier, par *Streptomyces* (Badji *et al.*, 2005). En ce qui concerne l'activité antifongiques des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans*, et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis le dermatophyte *Trichophyton rubrum*.

Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinomycètes. Certains sont utilisés en industrie agro-alimentaire (glucose isomérase), en thérapeutique (cholestérol oxydase), dans le domaine vétérinaire, comme additif pour l'élevage (Zitouni, 2005), ou encore en industrie chimique comme les protéases ajoutés au détergents, les cellulases et les xylanases utilisés dans le traitement des déchets, ainsi que les vitamines (B1, B2, B6, B12, acide folique).

Ces microorganismes produisent aussi un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activité tel que : les inhibiteurs d'enzymes, les immunosuppresseurs, des toxines et des pesticides, des antiparasitaires, des antitumoraux et les herbicides.

### I.5-3 En pathologie

Contrairement aux bactéries et aux champignons, seuls quelques espèces d'actinomycètes sont pathogènes (Badji, 2006). Par exemple *Mycobacterium tuberculosis* est le principal agent de la tuberculose, *Mycobacterium leprae* est le bacille de la lèpre, *Nocardia asteroides* est responsable de la nocardiose; infection pulmonaire sévère de l'Homme et de l'animal, le genre *Rhodococcus* d'origine animal est un pathogène

opportuniste pour l'Homme et *Streptomyces somaliensis* est responsable de mycétomes; pseudotumeurs affectant les tissus sous-cutanés et éventuellement l'os. Les actinomycètes phytopathogènes sont peu nombreux et appartiennent en grande majorité au genre *Corynebacterium* et à un degré moindre au genre *Streptomyces* (Zitouni, 2005).

### I.5-4 Autre rôle

De nombreux actinomycètes peuvent dégrader différents polluants, y compris plusieurs pesticides, par exemple, des membres du genre *Arthrobacter* dégradent le chlorophénol (Pizzul, 2006) et certains genres comme *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*,

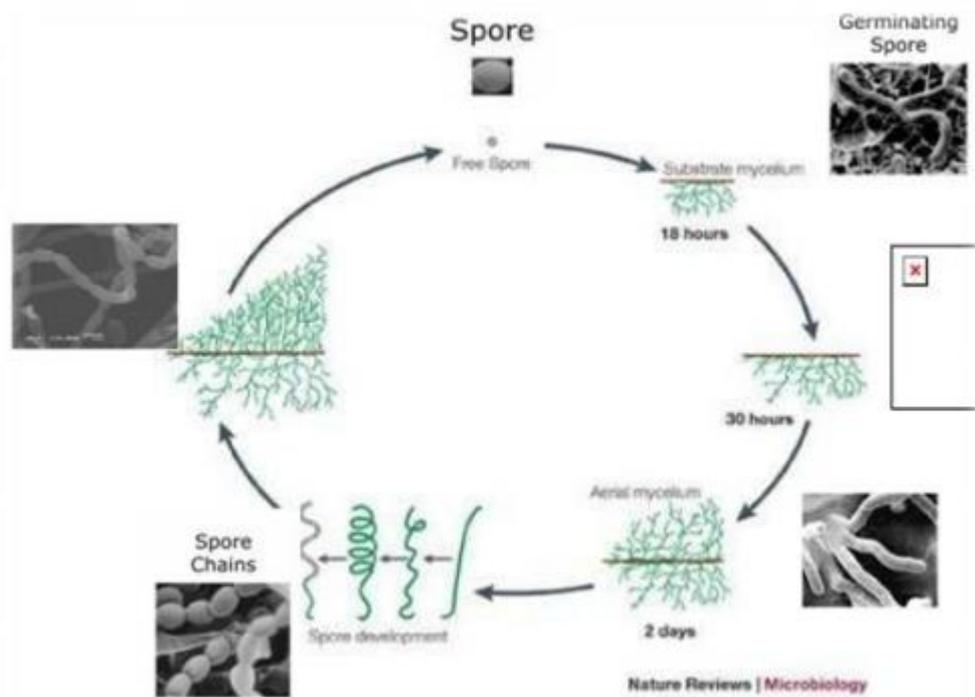
*Mycobacterium* et *Corynebacterium* se révèlent être d'une grande importance dans la dégradation des hydrocarbures.

Certaines espèces d'actinomycètes se sont révélées capables de dégrader ou de transformer des toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines), certaines substances, comme la piramicine sont utilisées pour le traitement, les emballages et d'autres pour la protection de certains fromages (Boudjella, 2007).

La géosmine qui donne à la terre une odeur de moisi (terreux) et à l'eau des réservoirs un goût et une odeur désagréables, est produite par certaines espèces d'actinomycètes appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardioopsis*, etc. (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983).

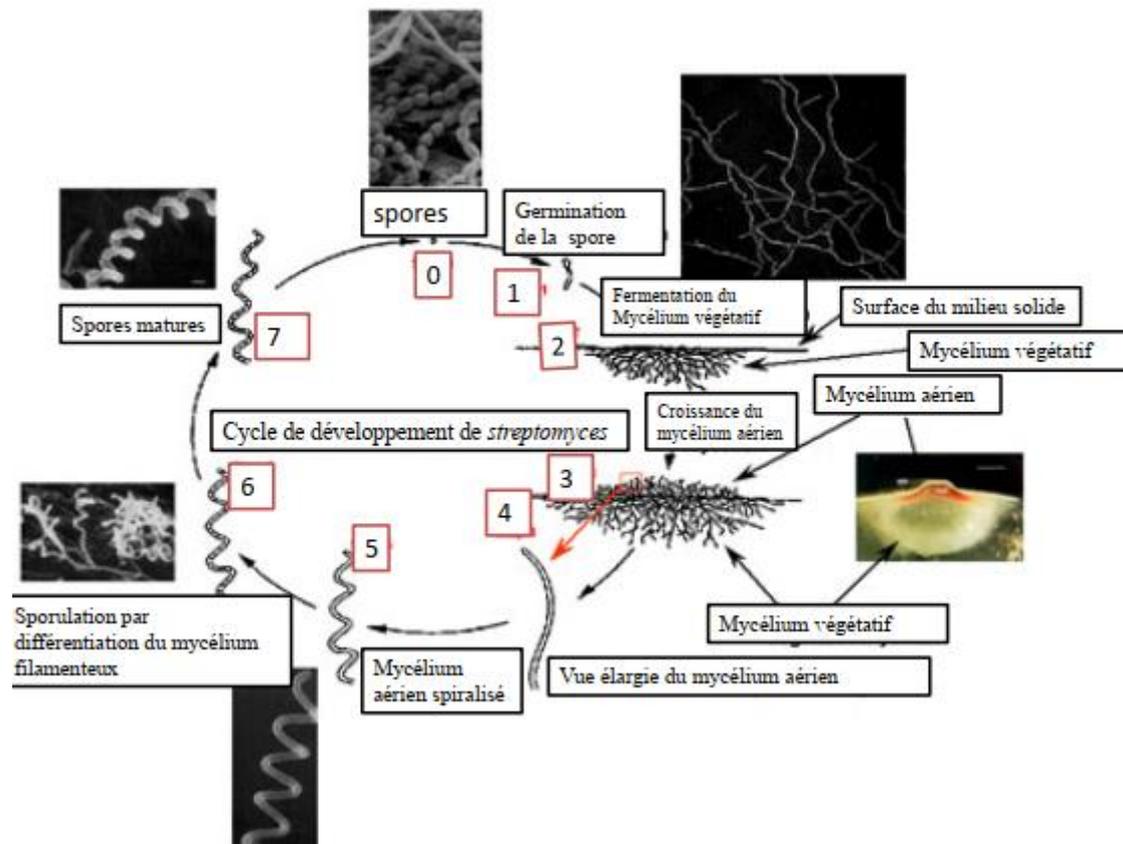
### I.6 Le cycle développement des actinomycètes

Le cycle de vie de nombreux actinomycètes commence par la germination des spores (Figure 7), processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié. Un mycélium aérien vient de se dresser au-dessus du mycélium de substrat. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment là que les composés médicalement utiles sont synthétisés, et on les appelle métabolites secondaires. A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement (manque de nutriment). Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, les actinomycètes sont immobiles, excepte pour les spores de certains genres (*Actinoplan*, *Spirillospora*...etc. (Prescott et al, 2010).



**Figure 7:** Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton & al, 1989).

Le cycle de développement de *streptomyces* début par la germination des spores donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphe non séptés et plurinucléés, ancré dans le solide milieu (étape 0\_1). Sur le mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium végétatif développé formé des sporophores qui s'étendent verticalement vers la surface au-dessus de la colonie. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient (étapes 6) pour former des chaînes de spores uninucléées (étape 7), et un autre cycle commencera (Flardh et Bruttner, 2009).

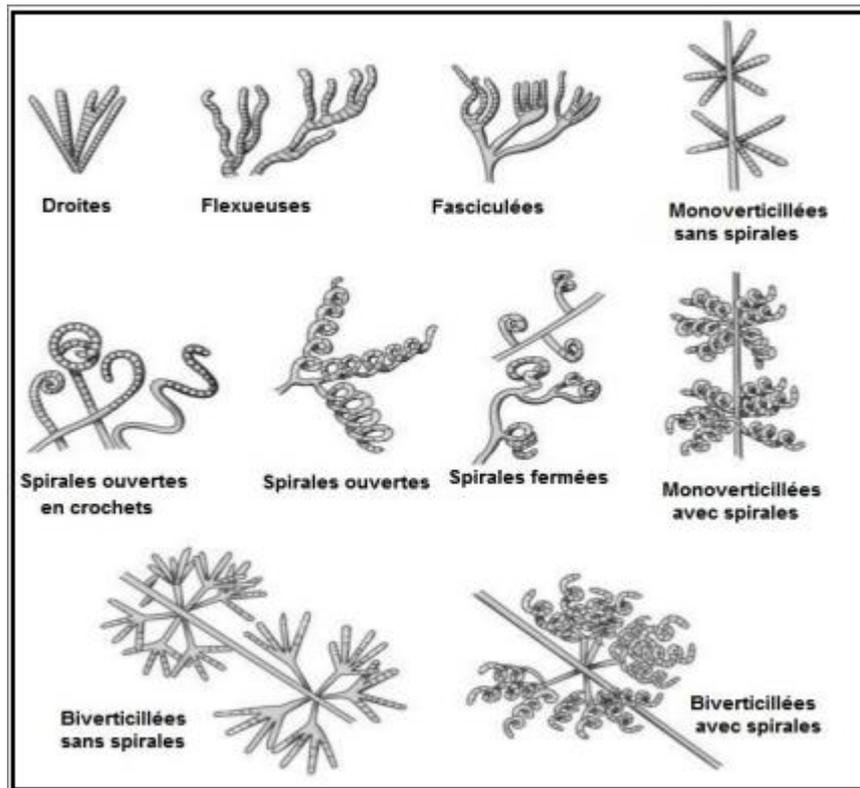


**Figure 8** : Cycle de développement de streptomycète ( Maguel ez et al., 2000)

### I.6.1 Types de spores

Les actinomycètes sont particuliers par la formation de différents types de spores, leurs différenciations rentrent dans leurs critères de classification, pour les streptomycètes filamenteux, les spores sont disposées sur le mycélium aérien, les chaînes de spores peuvent être droites, flexueuses ou en spirales, elles sont résumées dans la figure 7. Leur disposition peut être en spores libres, ou attachées les unes aux autres pour atteindre jusqu'à 50 spores sur un seul hyphes ou dans des sacs appelés sporanges, cette formation peut résulter d'une segmentation ou désarticulation de ces hyphes (**Benouagueni, 2015**).

La surface des spores peut être lisse, verruqueuse ( se réfère aux verrues), épineuse, rugueuse, ou bien poilue, la plupart de ces spores sont ovoïdes sphériques et non mobiles mais il existe également d'autres types de spores comme les formes flagellées mobiles présente chez *Actinoplanes* (**Benouagueni, 2015**).



**Figures 9** : morphologie des différentes chaînes de spores chez les streptomycètes (Madigna et al, 2011)

## I.6.2 Formation des spores

### I.6.2.1 Les exospores

Les actinomycètes forment généralement des exospores qui peuvent avoir des formes très variables. Elles se développent par septation des extrémités du filament, habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs. La plupart ne seront pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative (proscott et al., 2017).

### I.6.2.2 Les endospores

Les endospores sont produites par les actinomycètes thermophiles. Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe.

Tout comme les endospores bactériennes du genre *bacillus* (une bactérie à coloration de gram positive qui a des spores très résistantes à la chaleur), les spores des *thermoactinomyces* contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6.5 à 7% (poids/poids), ce qui est inférieur à la concentration retrouvée dans les spores de *bacillus*.

Cet acide, probablement situé dans la partie centre de la spore, est un composé unique qui a été trouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans

résistance des spores à la chaleur. De grandes quantités d'ions calcium et magnésium sont également associés à la présence de cet acide dans la spore. Les endospores des thermoactinomycètes peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (**Sykes et Skinner, 1973**).

#### **I.6.2.3 Germination des spores**

C'est une séquence de changement morphologique de la spore en structure végétative. Etapes distinctes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et enfin la croissance.

#### **I.6.2.4 Mycélium du substrat et mycélium aérien**

Le mycélium du substrat, également dénommé mycélium végétatif ou primaire, se développe à partir du tube de germination issu de spore (**Theilleux, 1993**). La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées. La largeur des filaments mycélium varie de 0.5 à 2  $\mu m$ . Le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments. Cette habitude de formation de mycélium de substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (**Locci, 1976**).

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, ces hyphes aériens sont plus épaisses et beaucoup moins ramifiées que les hyphes du substrat. Elles sont en général pigmentées et enfermées dans une enveloppe externe hydrophobe.

Le mycélium du substrat est aérobic facultatif, par contre le mycélium aérien est aérobic strict (**Silvey et Roach, 1975**). Les actinomycètes aquatiques sont habituellement dépourvus de ce type de croissance (mycélium aérien).

Divers mutants de streptomycètes sans mycélium aérien ou incapables de sporuler ont été décrits.

#### **I.6.2.5 Thermo-résistance des spores**

Comme chez les bactéries sporulées, les spores d'actinomycètes résistent à la température, l'acquisition de la thermo-résistance des spores, en plus de sa réfrigérance, les deux variables selon les souches, est dépendante de la synthèse du dipicolinate de calcium, composé qui assure à la cellule son imperméabilité et son état de déshydratation (**Leclerc et al., 1994**).

## I.6.2.6 Structures particulières

Certains actinomycètes forment des structures particulières (sclérotés, sporanges, synnemata,...) qui ne correspondent ni au mycélium ni aux et dont la fonction n'est pas toujours définie.

### ✓ Les sclérotés

troués chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnées dont les vacuoles sont chargées de glycérides et d'acide gras ramifiés.

### ✓ Les sporanges

sont des sacs contenant des spores. Ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développée ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien bien développé.

### ✓ Les synnemata

appelés également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressées, parfois fusionnées et portant des conidies apicales ou latérales (**Thelleux, 1973**).

## I.7 Ecologie

Les actinomycètes sont aussi importants en écologie qu'en médecine, le sol constitue un biotope naturel pour la plupart, ils sont capable en effet de dégrader plusieurs molécules comme la pectine, la kératine ou encore certaines molécules aromatique, ils contribuent ainsi à la minéralisation et la fertilisation des sols.

Quelque souche ont la capacité de décomposer certaines molécules comme le caoutchouc et se développer ainsi dans les usines de traitement des eaux usée créés créent de véritables mousses colmatantes (**Benouagueni, 2015**).

Elles produisent également une molécule appelée Géosmine qui donne au sol son odeur caractéristique, et qui joue également un rôle de minéralisation du sol (**Benouagueni, 2015**).

Certaines sont symbiotique de certaines plantes légumineuse, notamment le genre *Frankia*, qui infecte les racines, ou parfois les tiges formant des nodules qui sont capable de fixer l' azote atmosphérique (**Benouagueni, 2015**).

La distribution des actinomycètes des écosystèmes extrêmes a également été rapportée par plusieurs auteurs, dans le but d' étudier leurs métabolismes secondaires suggérant que ces niches abiotique rares renferment de nouvelles souches et/ou de nouvelles molécules d' intérêt pharmaceutique (**Benouagueni, 2015**).

Tableau 1 : Distribution des actinomycètes dans la nature (Larpent, 1989)188

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

### I.8 Classification des actinomycètes

Selon le système de classification de Murray qu'on retrouve dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986, 1989), les Actinomycètes appartiennent au règne des *Procaryotes* (organismes cellulaires sans noyau), à la division des *Firmicutes* (Bactéries Gram-positif) et à la classe des *Thallobacteria* (Bactéries Gram-positif ramifiées) contenant l'ordre des *Actinomycetales* (Ouhdouch, 2003; Alauzet, 2009).

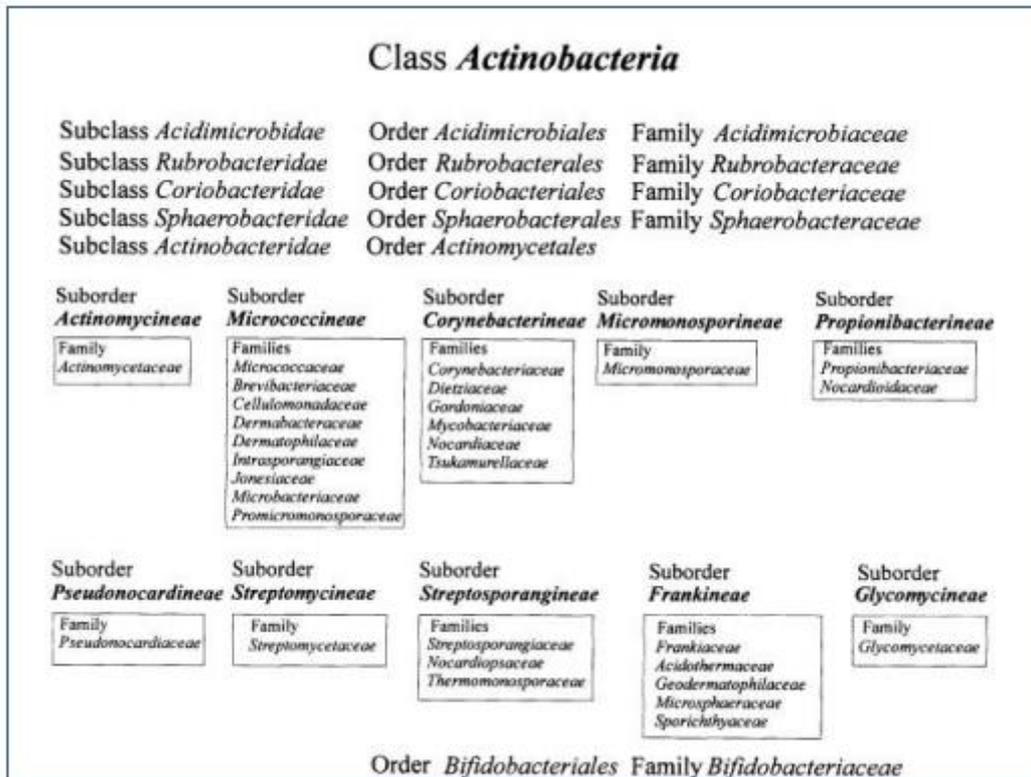
La classification des actinomycètes a évolué en fonction du développement des connaissances, durant ces 30 dernières années elle fut marquée par quatre périodes dont chaque une à apporter des nouveaux critères de classification :

**-Premier période.** C'est la période classique, où seuls les critères macro et micro morphologiques, permettaient de différencier les genres entre eux.

**-Seconde période.** C'est la période d'utilisation de la chimio-taxonomie. Selon Goodfellow et Minnikin, (1985), la chimio-taxonomie est l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Selon les travaux de Becker *et al.*, 1964 ; Lechevalier (1970), certains constituants cellulaires (les acides aminés pariétaux, les lipides es enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires) ont une grande importance taxonomique dans la classification des actinomycètes, ces constituent on les retrouve généralement soit dans la paroi ou dans la cellule entière (Sabaou, 1988).

**-Troisième période.** Durant la troisième période naissait la taxonomie numérique, qui a débuté dans les années 70, et qui combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles (Smaoui, 2010).

Sneath et Sokal ont défini la taxinomie numérique comme "le groupement d'unité taxonomique, en taxons à l'aide de méthodes numériques sur la base des états de leurs caractères" (Prescott *et al.*, 2003).



**Figure 10 :** Système de classification hiérarchique proposé de la classe Actinobactéries basé sur des analyses phylogénétiques des données de séquence ADNr 16S (Stackbrand *et al.*, 1997).

Le procédé consiste à déterminer la présence ou l'absence des caractères sélectionnés dans le groupe d'organisme étudié. Pour faire une classification précise et fiable, il faut comparer de nombreux caractères, au moins 50 et il est également préférable d'inclure de nombreux types de données différents : morphologique, biochimiques et physiologiques.

Chacun des caractères est codés **1** pour présence du caractère, ou **0** pour absence du caractère. Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogramme, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables (Kitouni, 2007 ; Prescott *et al.*, 2003). Actuellement et selon la classification du « Taxonomic Outline of The Procarvates, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », seconde édition 2004 , le phylum *Actinobacteria* (bactéries à Gram positif et G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « *Actinobacteria* ». Cette classe est divisée en 5 sous-classes

(figure10) : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, *Actinobacteridae*. Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués

d'une ou de plusieurs familles.

Dans La sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae* et *Glycomycineae* (Labeleda, 2006).

## I.9 Identification des actinomycetes

Les actinomycetes constituent un group bactérienne très varie dont l' appartenance ou non à un genre donné est très délicate a établir. L' étude des caractères morphologique, les caractères physiologique et la composition chimique de la paroi cellulaire permettent de séparer ces microorganisme avec une grande précision en groupes et genres différents et d' identifier ces bactéries jusqu' au niveau de l' espèce ( Lechevalier et al., 1977).

### I.9.1 Identification morphologique des actinomycètes

Plusieurs critères morphologiques sont étudiés pour identifier les actinomycètes. Il s' agit principalement de :

- Hyphes : présence, abondance et disposition des hyphes du mycélium végétatif ou du mycélium aérien
- Spores : nombre, mobilité, forme, position sur les hyphes
- Présence de sporanges
- Présence de sclérotos ou de synnématas
- Résistance des spores à la chaleur
- Résistance aux traitements acide (Schofieleset Schaal, 1981).

### I.9.2 Identification chimio-taxonomique des actinomycètes

Les caractères chimiques étudiés sont :

- Composition du peptidoglycane
- Composition en sucres cellulaires
- Composition phospholipidique des membranes
- Production d' antibiotique

- Tests biochimique : Réduction de nitrate ; Hydrolyse de l' urée ; Hydrolyse de L'acide hyppurique ; Synthèse de mélanine (*streptomyces*) (**Lechevalier et Lechevalier 1985 ; Larpent et Sanglier 1989**).

### I.9.3 Identification génomique des actinomycètes

Pour les caractères génétiques, il s' agit d' analyser les points suivants :

- % GC de l' ADN
- Digestions de l' ADN et analyse par électrophorèse en champ pulsé
- Séquence de l' ADNr 16S ( **Stackebrandt, 1997 ; Ventura, 2007 ; Zhi 2009**)

### I.10 Physiologie et métabolisme

#### I.10.1 Physiologie

Au niveau du sol, les actinomycètes représentent l'une des principales communautés microbiennes. Leur présence est significativement influencée par les conditions environnantes l'humidité, la température, le ph, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, les faibles taux d'humidité, la nature et l'abondance de la matière organique et végétation du sol (**Sykes et Skinner, 1973 ; Basilio, 2003**).

##### I.10.1.1 Le taux d'humidité

En général, les actinomycètes ont été isolés dans sols contenant des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (**Oskay et al., 2007**).

##### I.10.1.2 La température

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles, principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est entre 50 et 60°C. Ces organismes avaient été distingué de leurs homologues thermophiles appartenant au genre *thermomonospora* grâce à leurs spores qui résistent à une température de 90°C pendant 30 minutes et par la résistance à la novobiocine (25 µg/ml). De plus, l'activité cellulolytique est absente pour le genre *Thermoactinomyces* et commune pour *Thermomonospora* (**Holt et al., 1994**).

Le genre *Streptomyces* comporte aussi des espèces thermophiles comme *Streptomyces thermocophilus* (Kim et al., 2000) et même psychrophiles (**Holt et al., 1994**).

## I.10.1.3 Le pH

La plupart des actinomycètes du sol sont neutrophiles et croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin (Lee et Hwag, 2002). Les procédures d'isolement ont été traditionnellement basées sur ce caractère de neutralité.

Des travaux ont montré l'existence d'une large diversité d'actinomycètes acidophiles qui diffèrent morphologiquement et physiologiquement des espèces neutrophiles. Les souches acidophiles croissent à des valeurs de pH comprises entre 3.5 et 6.5 avec un pH optimal de croissance compris entre 4.5 et 5.5 tel que : *Streptacidiphilus jiangxiensis* et *Streptacidiphilus oryzae* (Wang et al., 2006).

## I.10.1.4 Rapports avec l'oxygène

Les actinomycètes isolés du sol sont généralement aérobies mais certains genres peuvent être anaérobies facultatifs voir même anaérobies strictes comme est le cas du genre *Actinomyces*.

## I.10.1.5 Matière organique

En 1986, Henis a montré que le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de matière organique et que de larges populations d'actinomycètes coïncidaient avec des taux relativement élevés de matière organique, quelque soit le taux de la salinité du sol (Lee et Hwang, 2002).

## I.10.2. Diversité métabolique

La majorité des nutriments présents dans l'environnement des microorganismes sont sous forme de polymères. L'hydrolyse de ces polymères est une étape importante à l'approvisionnement du métabolisme microbien.

C'est grâce à leur diversité métabolique, c'est-à-dire à leur capacité à utiliser une large gamme de sources de carbone et d'énergie, et à croître dans des conditions très variées, que les actinomycètes peuvent vivre dans des habitats très différents. D'ailleurs, grâce à cette diversité métabolique, les actinomycètes jouent un rôle extrêmement important dans la minéralisation de la matière organique par production d'enzymes extracellulaires, ce qui améliore les récoltes par fertilisation du sol.

Ainsi, il a été prouvé que les actinomycètes dégradent de manière intensive la chitine qui rentre dans la constitution de la paroi des moisissures et la carapace des arthropodes.

En outre, certains dégradent activement les pesticides tels que certaines souches du genre *Streptomyces* qui sont capables de croître sur milieux contenant 5-50 µg/l d'aldrine, de chlordane ou de lindane (organochlorines) (Benimeli et al., 2003).

D'autres sont capables de dégrader l'amidon comme est le cas de *Thermoactinomyces vulgaris*, ou la cellulose par *Streptomyces celluloticus*, et le xylane par *Streptomyces mexicanus* (petrosyan et al., 2003).

### I.11 Génétique

Le génome des *Streptomyces* est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que, plus classiquement, des plasmides circulaires. Une revue sur la génétique des Streptomycètes a été publiée par **Hopwood** en **1999**. Par ailleurs, les génomes de *Streptomyces coelicolor* A3(2), souche la plus communément étudiée en laboratoire, et celui de *Streptomyces avermitili*, souche utilisée dans l'industrie, ont été intégralement séquencés (**Bentley et al., 2002 ; Ikeda et al. 2003**).

### I.12 Culture des actinomycètes

Les actinomycètes croissent très lentement en aérobiose, sur de nombreux milieux simples. Les colonies sont le plus souvent desséchées, ridées et effritées, ressemblant à des bacilles acido-résistants, mais elles sont parfois lisses et mucilagineuses.

Les différentes variétés produisent des pigments variables, allant du jaune au rouge. Dans les milieux liquides il se produit une pellicule de surface ridée (**Ernest 1973**).

La plupart des variétés des actinomycètes aérobies en ne fermentent pas les hydrates de carbone ; certaines coagulent le lait et liquéfient la gélatine (**Ernest 19973**).



# **Chapitre II : Antifongiques**

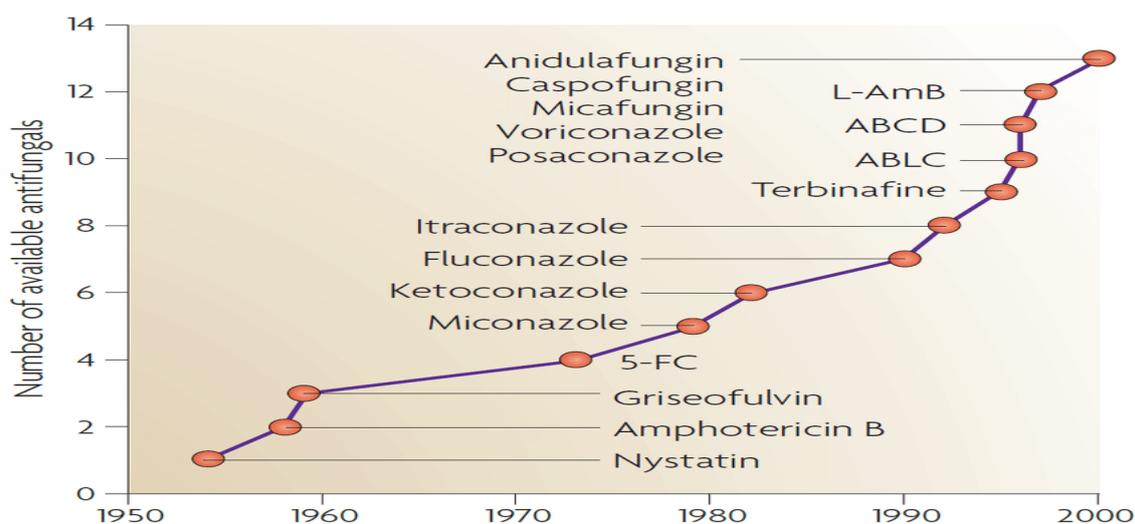
## II.1 Définition

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux. Ces substances antifongiques ont deux origines: ce sont soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse. Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (**Bastide et al., 1986**).

## II.2 Historique

La découverte de la nystatine en 1950 par Hazen et Brown, qui est un polymère à activité antifongique synthétisé par *Streptomyces*, a ouvert l'ère de l'antibiothérapie antifongique (**Drouhet et al., 1978**). Depuis, plus de 200 molécules antibiotiques polyéniques furent découvertes. Mais des problèmes de solubilité, d'absorption et de toxicité n'ont permis l'utilisation que d'un nombre restreint de ces composés en thérapeutique (**Belkherroubi, 2009**).

La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée dans la Figure ci-après (**Figure 11**).



**Figure 11:** Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques. (Ostrosky-

Zeichner et al. 2010).

A l'heure actuelle, quatre grandes classes d'antifongiques sont disponibles pour la prise en charge des infections fongiques : les azolés, les polyènes, les échinocandines, les pyrimidines, et des nouvelles classe : les allylamines et les morpholines et les sordarine et la nikkomycine. Une représentation schématique des cibles thérapeutiques de ces antifongiques est présentée. Toutes n'ont pas une indication pour la prise en charge des candidoses et aspergilloses.

### II.3 La chimiothérapie antifongique

Les molécules antifongiques appartiennent à divers groupes chimiques comme les acides, gras, les ammoniums quaternaires, les azolés, les composés hétérocycliques, des esters, des macrolides polyénique, ou encore des phénols, l'utilisation des antifongiques doit être en générale prolongée pendant plusieurs semaines après guérison apparente des mycoses, de crainte d'une rechute (Euzéby, 2008 ; Fournier et al., 2011)

#### II.3.1 Origine des antifongiques

Ces molécules peuvent être issue d'une voie naturelle, de synthèse chimique ou semi synthétique, ceux d'origine naturelle sont produits par les actinomycètes ou par des champignons, nous pouvons citer l'exemple de l'Amphotéricine B produite par *streptomyces nodosus*, les antifongiques de synthèse sont beaucoup plus nombreux, c'est le cas de la fluor cytosine, les azolés, les dérivés de l'imidazole, et les dérivés triazolés, et les antifongiques semi-synthétiques qui appartiennent aux échinocandines, comme l'acétate de caspofongine qui est un dérivé aminé semi-synthétique de la pneumocandine B, produit naturel de la fermentation de *Glarea lozoyensis* (Ripert, 2013)

#### II.3.2 Principaux traitements par antifongiques et limites

Les principales molécules antifongiques commercialisées appartiennent à quatre familles les polyènes sont des molécules d'origine naturelle ; les analogues nucléotidiques et les azolés qui sont naturelles et d'autres semi-synthétisées par voie chimique au laboratoire ; et les échinocandines dont certaines sont naturelles et d'autres semi-synthétiques (Martin, 2008 ; Mouly et Sellier, 2004).

### II.4 Classification des antifongiques selon l'origine et la structure

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées. Aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les Échinocandines (Vandeputte, 2008).

### II.4.1. Antifongiques de synthèse chimiques

#### II.4.1.1. Les azolés

Cette famille d'antifongiques de synthèse chimique possède un noyau hétérocyclique pentagonal, dont au moins un atome d'azote est lié à un atome d'hydrogène (**Euzéby, 2008**). Les dérivés azolés sont les antifongiques les plus utilisés en clinique. Pour cette raison, ils sont les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leurs propriétés pharmacologiques et de leur mode d'action, que des stratégies de défense adoptées par les micro-organismes. Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, (**figure 12**) et les Triazolés, contenant trois atomes d'azote (**figure 13**) (**Vandeputte, 2008**).

Le noyau triazolé qui a succède rapidement au noyau imidazole, pharmacophore caractérisant les premières molécules, permet d'accroître la spécificité vis-à-vis du cytochrome p450 fongique et de ralentir leur métabolisation (**ostrotsky-zeichner et al., 2010**).

Le fluconazole est le premier triazolé autorisé sur le marché américain en 1990. Ses atouts sont l'existence d'une formulation intraveineuse et sa capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique à la différence du kétoconazole. Il sera suivi peu de temps après, en 1992, par le développement de l'itraconazole dont le spectre est élargi aux champignons filamenteux mais dont l'absorption est variable et la tolérance digestive limitée (**Pound et al., 2011**).

Le traitement par les azolés présente également des effets indésirables, c'est le cas du kétoconazole avec une toxicité hépatique non négligeable, il peut interférer avec les vitamines K, aussi avec le métabolisme de la testostérone (d'où la chute de cheveux), on remarque également une irrégularité menstruelle, une hypertension et une rétention liquidienne ; les risques hépatique et hormonaux sont beaucoup moindres avec le fluconazole du fait de sa forte affinité pour les enzymes fongiques que celle des humains, le fluconazole n'a aucune répercussion significative sur les stéroïdes, l'itraconazole est moins utilisé contre les candidoses, le voriconazole est très bien toléré et efficace sur les espèces de candida même celles résistantes au fluconazole, comme les formes lipidiques de l'Amphotéricine B, il représente une alternative au traitement des mycoses (**Pourriat et Martin, 2005**).

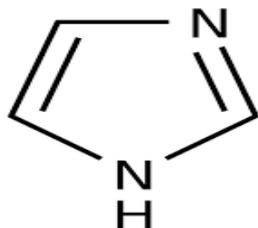


Figure12: Structure imidazole

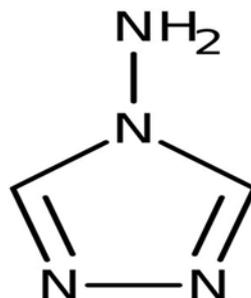


Figure 13 : Structure triazole

#### II.4.1.2. Les fluoropyrimidines

Le 5- fluoro-cytosine est un antifongique de synthèse du groupe des fluoropyrimidines également utilisée pour le traitement des candidoses, il peut être administré par voie générale (voie buccale et perfusion), il présente toutefois de nombreux inconvénients, à savoir, une toxicité essentiellement digestive et hématologique, cette dernière est favorisée par les taux sériques très élevés ( $>100\mu\text{g/ml}$ ), aussi, il favorise l'apparition rapide des mutants résistants (défaut de pénétration de l'antifongique), l'association à un autre antifongique afin d'obtenir une synergie est vivement conseillée, nous pouvons citer l'exemple l'association flucytosine-AmphotéricineB qui retarde le phénomène de résistance tout en diminuant la néphrotoxicité de l'Amphotéricine B (Euzéby, 2008)

Les fluoropyrimidines, dont les seuls représentants actuellement utilisés chez l'homme (Vandeputte, 2008). Sont la 5-fluorocytosine (5-FC) et le 5-fluorouracile (5-FU). Ce sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides Nucléiques, la cytosine (figure14). (Camille, 2013)

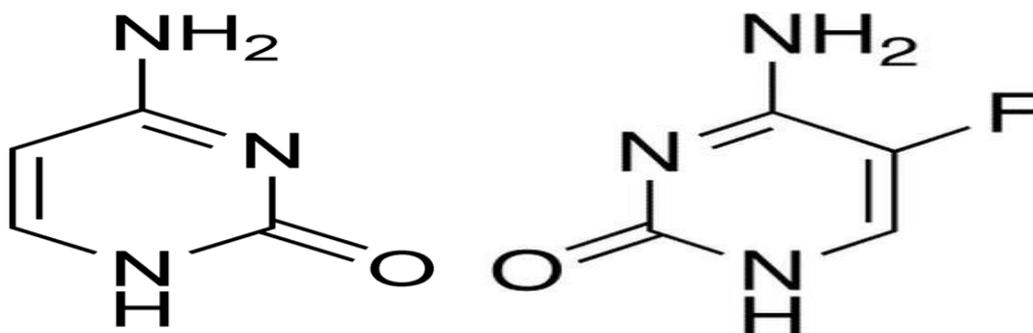


Figure 14 : Comparaison des structures de la cytosine et de la 5-Fluoro-Cytosine

### II.4.2. Antifongiques naturels

#### II.4.2.1. Les polyènes

Les polyènes Produites par des actinomycètes du genre *streptomyces*, sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères (Camille, 2013) qui possèdent une grande affinité pour l'ergostérol (Chapman et al., 2011). La plupart sont constitués d'un cycle macrolactone de 20 à 40 atomes de carbone sur lequel est branché un groupement D-mycosamine. Leur caractère amphotère est lié au regroupement de plusieurs doubles liaisons conjuguées (d'où leur nom de "polyène") sur une face du cycle macrolactone, qui est donc hydrophobe, et de groupements hydroxyles sur l'autre face, qui est hydrophile (Vandeputte, 2008). Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique (Vandeputte, 2008).

Les polyènes (l'Amphotéricine B comme la nystatine) sont des molécules antifongiques d'origine naturelle caractérisées par une structure complexe avec un nombre de doubles liaisons conjuguées HC=CH, ce nombre permet de définir la nature du polyène, l'exemple du diène pour deux doubles liaisons, ou encore triène pour trois doubles liaisons.

##### II.4.2.1.1. La nystatine :

Le plus ancien des antifongiques naturels, a été isolée de *streptomyces noursei* en 1950, elle n'est utilisée que par voie cutanée ou orale en raison de sa toxicité par voie parentérale (injectable), elle est le plus souvent indiquée pour le traitement courant des candidoses digestives, vaginales et cutanées (figure 5) (Mouley et Sellier, 2004 ; Ripert, 2013).

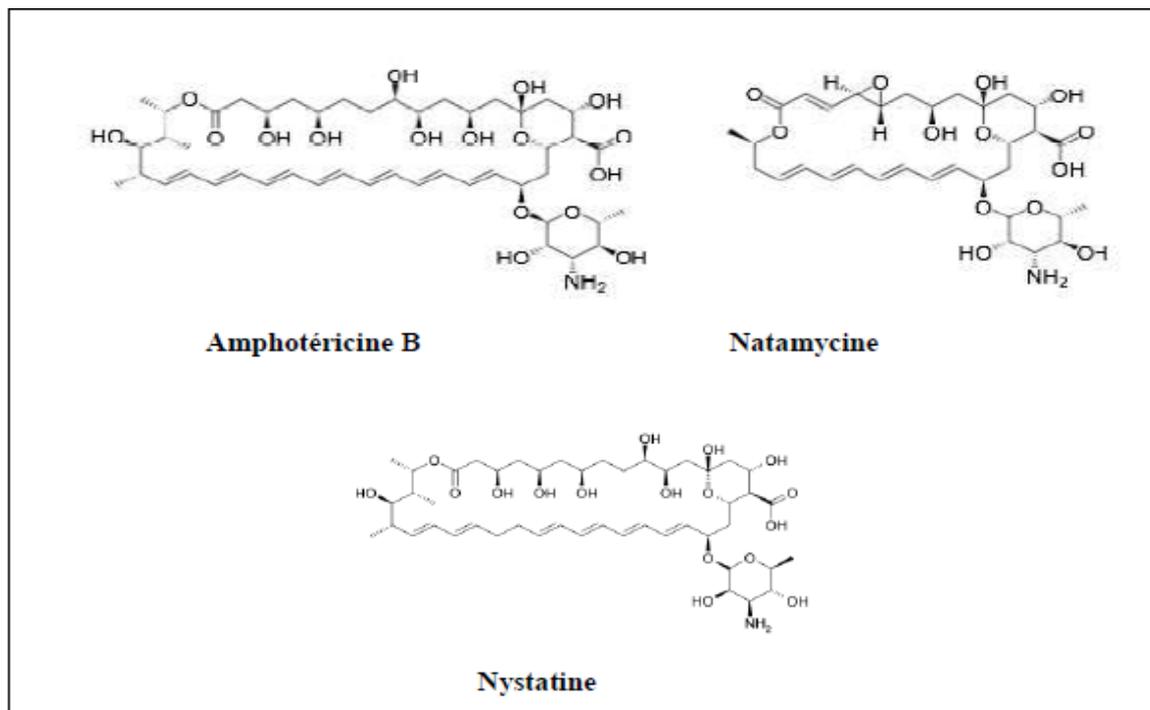
##### II.4.2.1.2. L'Amphotéricine B :

Isolée de *streptomyces nodosus* en 1955, est un macrolide polyénique amphotère (lactone avec 7 doubles liaisons conjuguées), elle est indiquée comme traitement des candidoses vaginales et cutanées, présente une excellente activité sur le candida notamment *C. albicans*, la résistance acquise à cet antifongique reste exceptionnelle (Pfaller et al., 2012) non absorbée par voie digestive, elle doit être administrée par voie veineuse (mycoses profondes) (Pourriat et Martin, 2005).

Les polyènes présentent une toxicité faible à modérée qui dépend de l'état du patient, on remarque comme effets indésirables, une fièvre, des frissons, nausées, vomissements, hypocalcémie, ou encore des troubles hépatiques, l'élévation de la créatininémie (altération de la fonction rénale) est souvent réversible après arrêt du traitement, pour l'Amphotéricine B, la forme lipidique est mieux tolérée par les reins et donc réservée aux patients avec une insuffisance rénale, ces molécules polyéniques sont coûteuses et doivent

également adaptées selon le degré de l'insuffisance rénale, cette toxicité relative rend cette classe d'antifongique de moins désirée (Martin, 2008 ; Mouley et Sellier, 2004 ; Ripert, 2013).

A l'heure actuelle, deux composés sont disponibles, la nystatine (MYCOSTATINE) et l'Amphotéricine B. cette dernière est disponible sous forme conventionnelle (l'Amphotéricine B déoxycholate, FUNGIZONE) ou sous formulations lipidique : liposomes (AMBISOME), complexes lipidiques (ABLECT) ou dispersion colloïdale (AMPHOCIL) (Chapman et al., 2011)



**Figure 15:** structure chimique des trois antifongiques polyénique majeurs (Vandeputte, 2008).

#### II.4.2.2. Les échinocandines

Les échinocandines appartiennent aux antifongiques du groupe des hexa peptides cycliques, autrefois appelé pneumocandine se référant aux deux pathogènes cibles majeurs à savoir *pneumocystis jirovecii* et *candida sp*, la première molécule a été élaborée par *aspergillus sp*, en 1974, la modification de sa structure a donné la clinofungine qui fut vite abandonnée en raison de sa néphrotoxicité (Darty et al., 2005 ; Euzéby, 2008), aujourd'hui, la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine représente les trois échinocandines d'origine semi-synthétique actuellement utilisée en clinique (Fournier et al., 2011 ; Ripert, 2013), Les trois molécules sont actuellement disponibles ou en cours de

développement(**Rautemaa et al., 2008**). Avec un spectre d'activité plus large, elles sont efficaces sur les levures et moisissures notamment sur le genre *candida*, représentant ainsi une alternative de choix pour lutter contre les levures de ce genre(**Ripert, 2013**).

La caspofungine. Cette substance est issue d'un produit de fermentation de *Glearea lozoyensis*. Cette molécule est le premier d'une nouvelle classe d'antifongiques : les inhibiteurs de la synthèse du  $\beta$ \_(1,3) D-glucan, composant essentiel à la paroi cellulaire de plusieurs champignons pathogènes(**Carle et al.; 2003**).

En générale, les effets indésirables des échinocandines sont légers modères et nécessitent rarement l'arrêt du traitement, des anomalies hépatiques ont été observées chez certains patients avec pathologie sous-jacente grave, elles sont utilisées pour le traitement des candidoses invasives chez l'adulte et un nombre limité des candidoses profondes (**Martin, 2008**).

A l'heure actuelle, trois échinocandines sont disponibles : la caspofungine (CANCIDAS), la micafungine (MYCAMINE) et l'anidulafungine (ECALTA) (**Chen et al., 2011**).

### II.4.3. Nouvelle classe d'antifongiques

#### II.4.3.1. La sordarine

Un antifongique d'origine naturelle découvert en 1971, il a été isolé de la moisissure *sordaria araneosa*, par la suite, d'autres dérivés semi-synthétiques ont été développés à partir de cette molécule, comme la molécule FR290581 et la murinafungine, le mécanisme d'action est unique, ils inhibent la synthèse protéique par un mécanisme induisant une liaison sélective au facteur d'élongation 2 (EF2) et les ribosomes des cellules fongiques uniquement. *In vitro*, la sordarine et ses dérivés possèdent une activité sélective contre certaines levures et moisissures et notamment contre *C.lusitaniae*,(**Basilio et al., 2006 ; Hanadate et al., 2009**). Chez les animaux, elle a montré une activité fongicide contre les souches de *candida*, à l'exception de *C. krusei* et *C. lusitaniae*(**Basilio et al, 2006 ; carle, 2003**).

#### II.4.3.2. La nikkomycine

La nikkomycine est un antifongique d'origine naturelle isolé de *streptomyces* sp., cet antifongique induit différents mécanismes d'action selon la composition du milieu de culture, il inhibe la chitine synthétases (Chs) responsable de la formation de chitine de la paroi fongique, cependant, *C. albicans* se trouve être intrinsèquement résistante à cette molécule (**Feng et al., 2014**).

**Feng et al., (2014)** sont parvenues à synthétiser les analogues nikkomycine px et pz semi-synthétiques de la molécule initiale qui possèdent un spectre d'action contre la levure *C.*

*albicans*, *in vitro*, l'interprétation synergétique de la nikkomycine avec les azolés ou d'autres antifongiques contre la levure a également été rapportée (Sandovsky-Losica et al., 2008).

La sordarine et les analogues synthétiques de la nikkomycine appartiennent à une nouvelle classe d'antifongique avec une bonne activité sur *C. albicans* qui n'ont, pour l'instant, pas de pharmacothérapie adaptée (Feng et al., 2014 ; Hanadate et al., 2009).

### II.4.3.3. Les allylamines

Cette classe d'antifongiques, comprend la naftifine et la terbinafine (LAMISIL). Le mode d'action des allylamines repose sur l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol par un mécanisme distinct de celui des azolés qui implique l'inhibition de la squalène époxydase (Pappas, 2011). L'effet antifongique qui en résulte est fongistatique. La terbinafine est quasi exclusivement utilisée pour la prise en charge des infections candidosiques superficielles réfractaires aux traitements habituels en association avec d'autres antifongiques (Pappas, 2011). La naftifine, réservée à la prise en charge des dermatophyties, n'est pas disponible en France.

### II.4.3.4. Les morpholines

Le seul composé de cette famille utilisé en clinique est l'amorolfine (LOCERYL). Elle possède une activité fongistatique qui repose sur l'inhibition de la C14 stérolréductase (erg24) et de C8 stérolisomérase (Erg2), deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol (Polak, 1992). L'utilisation de l'amorolfine est limitée à la prise en charge des infections superficielles (Onyxis).

## II.5. Modes d'action des principaux antifongiques utilisés en thérapeutiques

### II.5.1 Les polyènes

Le spectre d'action des antifongiques polyénique est très large du fait de son mécanisme d'action sur la membrane fongique, ces antifongiques sont utilisés pour le traitement l'ensemble des mycoses profondes, la fixation de l'Amphotéricine B sur l'ergostérol endommage la membrane en entraînant la formation de pores dans celle-ci, provoquant ainsi les lésions irréversibles et la perte des constituants cellulaires (Sheikh et al., 2013).

### II.5.2. Le fluoro-cytosine

Le 5 fluoro-cytosine représente un autre dérivé fluoré de la pyrimidine (base azoté de des molécules ADN et ARN), il pénètre au niveau de la cellule en compétition avec la cytosine grâce à la cytosine perméase, ensuite, il est métabolisé en 5 fluoro-uracile par la cytosine désaminase, puis converti en 5 fluoro-uracile mono phosphate par l'uridine phosphoribosyl-transférase ou UPRT et enfin en 5 fluoro-uracile triphosphate, son mécanisme se situe au

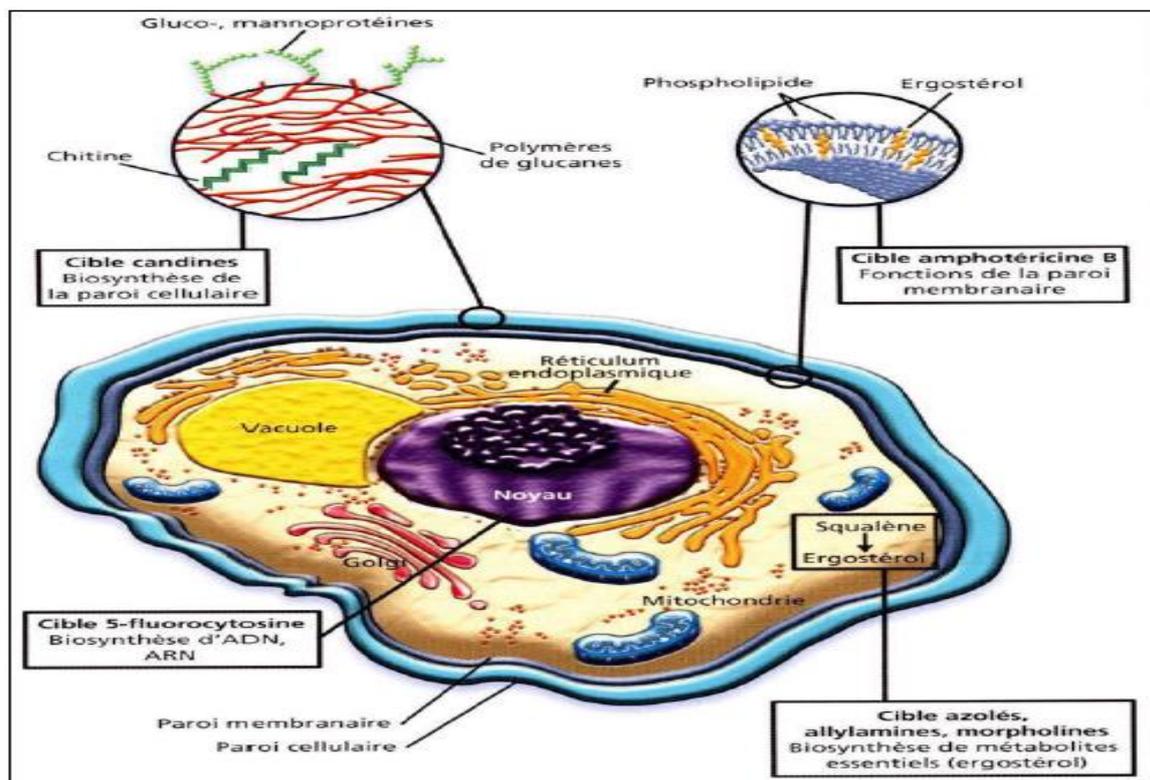
niveau de la synthèse protéique de la levure par substitution du 5 fluoro-uracile triphosphate a l'uracile triphosphate dans la molécule d'ARN inhibant ainsi la thymidylate synthétase et en altération de la biosynthèse de l'ADN fongique (**Ripert, 2013**).

### II.5.3. Les azolés

Les imidazoles et les triazolés possèdent un spectre d'activité plus restreint que les polyènes, ils agissent sur la structure membranaire en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol, interférant plus précisément avec l'enzyme 14  $\alpha$ lanostéroidéméthylase, qui entraîne la diminution, voire la suppression de la voie de synthèse de l'ergostérol.

Les azolés interviennent également au niveau des mitochondries en perturbant leurs mécanismes oxydatif ce qui entraîne l'asphyxie de la cellule fongique (**Spampinato et Leonardi, 2013**).

Le mode d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote est représenté par la (**figure 16**)



**Figure 16** : cible d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote (**Hulin et al., 2005**)

### II.5.4. Les échinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides cycliques inhibiteurs létaux de la synthèse de la paroi fongique, elles interrompent la formation du glucane par inhibition non compétitive de

l'enzyme béta-1.3-D-Glucane synthéases qui est présente chez la plupart des champignons et qui est également indispensable à la formation de la paroi fongique, cette enzyme est inexistante chez les cellules humaines éliminant ainsi une potentielle toxicité par ce mécanisme, qui explique également l'absence de la résistance croisée entre les échinocandines et les autres antifongiques (Datry et al., 2005 ; Spampinato et Leonardi, 2013).

### II.6. Mécanismes de résistance aux principaux antifongiques

Durant les années 1980 à 1990 une augmentation considérable du nombre de souches fongiques résistantes a été observée, accompagnée avec une large utilisation des antifongiques polyéniques mais surtout azolés qui a conduit à l'émergence d'espaces naturellement peu sensibles ou résistantes à ces molécules (Pfaller, 2012 ; Sheikh et al., 2013).

Comme dans toutes les conditions environnementales défavorables, l'exposition aux antifongiques active des voies de réponses de stress qui confèrent une protection cellulaire immédiate et favorisent ainsi la survie de la levure. L'un des principaux régulateur des réactions au stress est le Hsp90, localisée à la surface de la cellule ainsi que dans le cytoplasme, cette protéine induite par le stress intervient comme régulateur de la signalisation cellulaire, elle régit la morphogénèse et influence la résistance aux antifongiques (Lucy Xie et al., 2014 ; Shapiro et al., 2012).

#### II.6.1. Les polyènes

Chez *Candida glabrata* ou encore *Aspergillus terreus*, la résistance aux polyènes est dépendante de la dose administrée, il semble également que d'autres aient un fort potentiel pour développer une résistance comme le cas *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, et *Candida krusei* (Ellis, 2002).

Un phénomène qui est qualifié de rare mais existant, il s'agit d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques, voire une absence totale, par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (figure 17), les mécanismes de résistance aux polyènes sont décrits chez *Candida* et *Saccharomyces cerevisiae*, La délétion du gène *ERG3* et *ERG6* est responsable de ce type de résistance chez *C. albicans* (Spampinato et Leonardi, 2013).

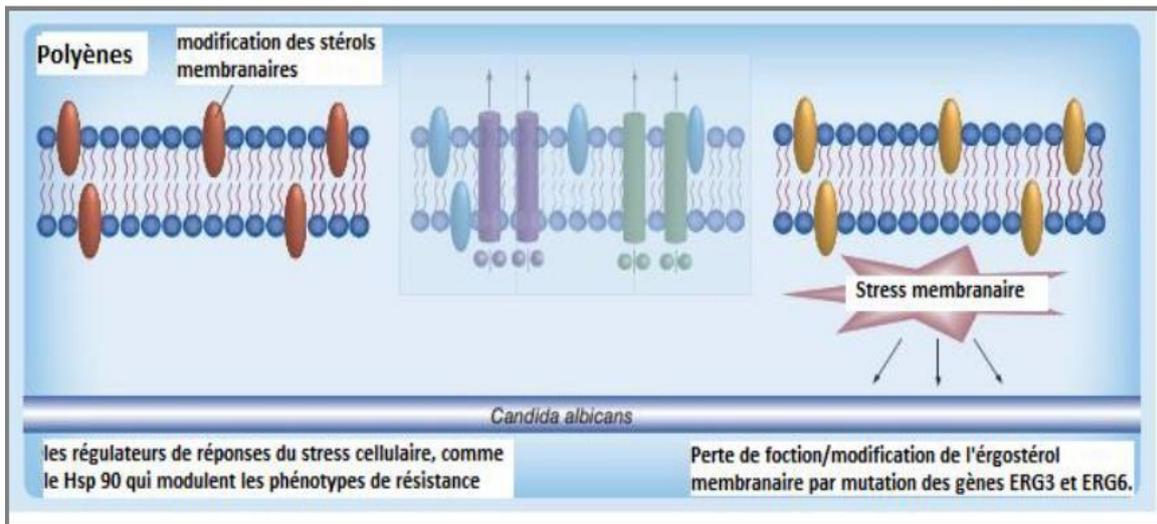


Figure 17 : Mécanismes de résistance aux polyènes chez *C. albicans* (Lucy Xie et al., 2014).

II.6.2. Les fluoropyrimidines

La résistance peut être intrinsèque caractéristiques d'espèces comme chez *Candida tropicalis* ou acquise après exposition à l'antifongique, en raison de la complexité de son mode d'action, la résistance à la 5-fluorocytosine peut être regroupée en deux catégories : La résistance peut survenir par mutation d'un gène codant pour l'enzyme impliquée dans le métabolisme de l'antifongique, ainsi le mécanisme le plus fréquent est une mutation sur le gène *FUR1* qui code pour l'uridine phosphoribosyl transférase (UPRT) (Spampinato et Leonardi, 2013).

Ou encore, à l'induction du métabolisme compétitif des pyrimidines, qui entraîne une compétition avec l'antifongique, ce mécanisme de résistance résulte d'une surexpression du gène *Cdc21* qui code pour la thymidylate synthase (Vandeputte et al., 2010).

Le mécanisme de résistance au 5-fluorocytosine est résumé dans la (figure 18).

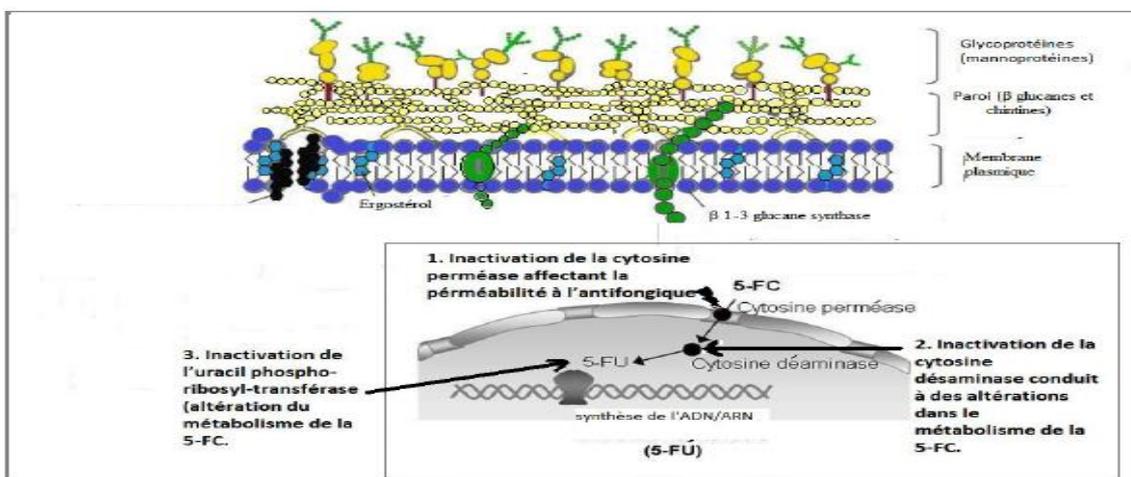


Figure 18 : Mécanisme de résistance aux 5-fluorocytosine (Ben-Ami et al., 2008)

## II.6.3. Les azolés

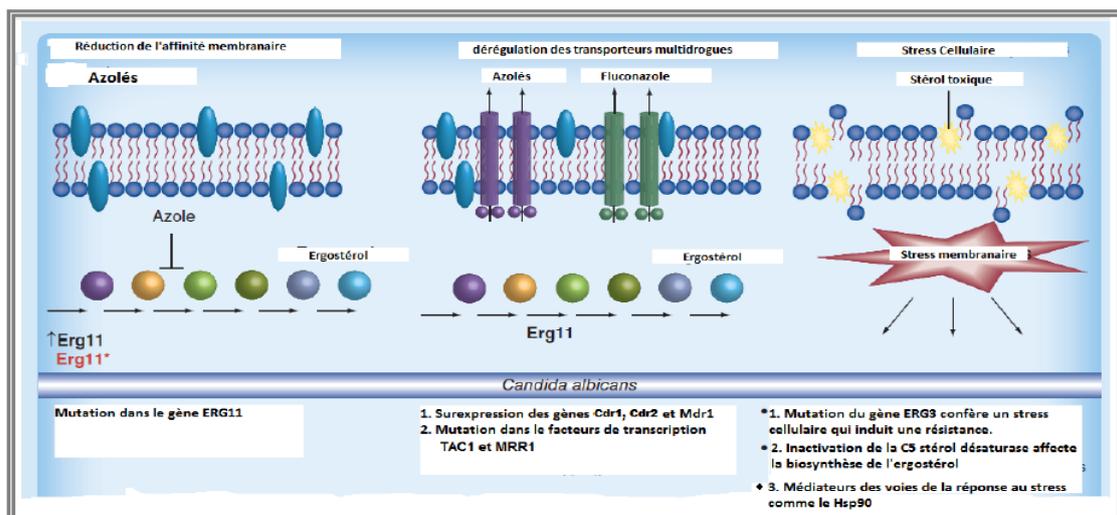
Au début des années 1990 une augmentation considérable de la résistance aux azolés fut observée, en raison de leur large prescription en thérapeutique, de nombreux travaux ont été réalisés dans le but d'étudier les mécanismes de défense des champignons face à ces molécules (**figure9**) (**Pham et al., 2014 ; Sanguintti et al., 2005 ; Tobudic et al., 2012**).

Les espèces du genre *Aspergillus* sont intrinsèquement résistantes au fluconazole, mais sensibles à l'itraconazole, toutefois une résistance acquise peut survenir comme la conséquence de l'administration prolongée et ou de l'immunosuppression de l'hôte (**Granier et al., 2003**).

La résistance aux azolés par surexpression des pompes d'efflux représente le mécanisme le plus retrouvé chez les isolats cliniques des souches de *Candida* notamment *C. glabrata* et *C. albicans* les gènes responsables Crd1, Crd2 et Mdr1 codant pour des ABC protéines ont été identifiés (**Kanafani et Perfec, 2008**).

Un mécanisme moins fréquent observe chez les mutants qui est le bocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol après l'intervention de la C5 stéroïdénaturase qui induit une résistance aux azolés, pour *C. albicans*, c'est la mutation du gène ERG3 qui aboutit à cette résistance (**Tobudic et al., 2012**).

Cette résistance peut également résulter de la multiplication du nombre de copies de la 14  $\alpha$ -déméthylase, de ce fait les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14  $\alpha$ -diméthyle, ainsi la surexpression du gène ERG11 par duplication chromosomique ou modification du promoteur, peut aboutir à la résistance aux azolés (**Pfaller, 2012**).



**Figure 19 :** Mécanismes de résistance aux azolés chez *C. albicans* (**Lucy Xie et al., 2014**)

## II.6.4. Les échinocandines

La résistance aux échinocandines reste un phénomène assez rare (Espinel-Ingroff, 2008), certains travaux ont pu mettre en évidence le mécanisme moléculaire de la résistance (figure 20), il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes FKS1 ou FKS2 gène codant pour la  $\beta$  1,3-glucane synthase chez *S.cerevisiae* *C. albicans* (Balashov et al., 2006 ; Park et al., 2005), le mécanisme de résistance fut également observé chez *C.glabrata* (Park et al., 2005), et *C. Krusei* (kahn et al., 2007)..

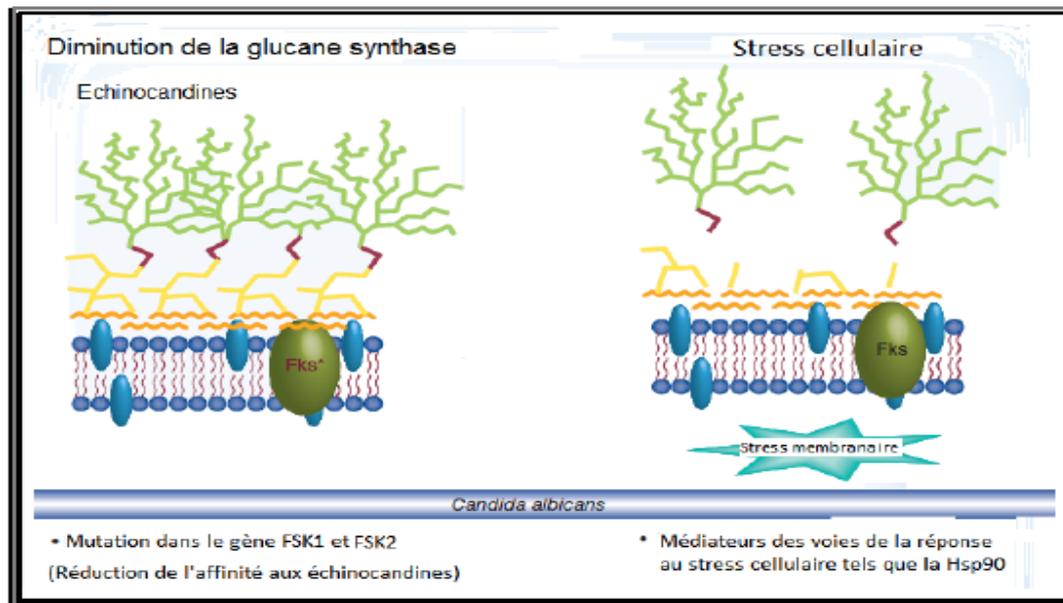


Figure 20 : Mécanismes de résistance aux échinocandines chez *C. albicans* (Lucy Xie et al., 2014)

Le tableau 2 résume les mécanismes de résistance aux antifongiques chez *C. albicans*

**Tableau 2 :** mécanismes génétiques et fonctionnels de la résistance aux antifongiques.

Classe d'antifongique	Mécanisme génétique de la résistance	Mécanisme fonctionnel de la résistance
<b>Polyènes</b> (Espinel-Ingroff, 2008 ; Kelly et al., 1997 ; Vandeputte et al., 2007)	Mutation dans le gène ERG3 et ERG6	Diminuer et/ou, supprimer l'ergostérol de la membrane.
<b>5-Fluorocytosine</b> (Espinel-Ingroff, 2008 ; Peman et al., 2009)	Mutation dans le gène FCY2	Inactivation de la cytosine perméase affectant la perméabilité à l'antifongique
	Mutation dans le gène FCY1	Inactivation de la cytosine désaminase conduit à des altérations dans le métabolisme de la 5-FC
	Mutation dans le gène FUR1	Inactivation de l'uracile phosphoribosyl-transférase altération du métabolisme de la 5-FC
<b>Azolés</b> (Noël, 2012)	Dérégulation du Crd1/Crd2 et Mdr1 par mutation dans les facteurs de transcription TAC1 et MRP1	Dérégulation dans les ABC transporteurs.
	Mutation dans le gène ERG11	Réduction de l'affinité par diminution de la 14- $\alpha$ -déméthylase.
	Mutation dans le gène ERG3	Inactivation de la C5 stérol dénaturase affectant la synthèse de l'ergostérol.
<b>Echinocandines</b> (Balashov et al., 2006 ; Kahn et al., 2007 Park et al., 2005)	Mutation dans le gène FKS1 et FKS2	

### II.7. Les levures

Les levures sont des organismes microscopiques eucaryotes, unicellulaires ou qui présentent dans leur cycle biologique une phase unicellulaire prépondérante, dépourvus de chlorophylle, de formes ovoïdes ou sphériques possédant une paroi cellulaire rigide, la majorité d'entre elles se divisent par bourgeonnement, une minorité par division binaire comme les bactéries, et certaines d'entre elles peuvent donner une forme mycélienne (thalles pluricellulaires) (Meyer et al., 2004).

### II.8. Les infections fongiques

Les mycoses ou infections fongiques sont des maladies causées par des levures ou des moisissures, en pathologies humaines, elles sont classées en trois catégories selon la profondeur des tissus atteints :

#### II.8.1. Les mycoses cutanées ou superficielles

Touchent la couche extérieure de la peau (l'épiderme), les cheveux et les ongles, également appelée dermato-mycoses ou teignes inflammatoires, elles sont cosmopolites, très courantes mais le plus souvent bénignes comparé aux mycoses profondes, généralement causées par les dermatophytes (Liozon, 2010).

#### II.8.2. Les mycoses profondes ou viscérales

Touchent principalement les organes internes, les poumons en premier lieu, elles sont le plus souvent causées par les spores de moisissures inhalées par des sujets dont le système immunitaire est plus au moins affaibli, elles trouvent le terrain favorable, sont disséminées dans l'organisme par voie hématogène (Alagaden, 2011).

### II.9. Spectre clinique

Le spectre clinique des infections dues à *C. albicans* et à *A. fumigatus* est large et dépendant de la présence de nombreux facteurs favorisants.

#### II.9.1. Infection à *Candida albicans*

*Candida albicans* est de loin l'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine, quel que soit le type d'infection considérée (Chai et al., 2010). Le rôle des facteurs favorisants est essentiel car ils peuvent conditionner le type d'infection, superficielle ou profonde. Les atteintes superficielles sont les plus fréquentes et sont généralement bénignes. Il s'agit d'infections cutanées affectant les plis comme l'intertrigo candidosiques (figure 21), d'infections des muqueuses buccales, œsophagiennes, digestives ou bien encore anales. La candidose oropharyngée est en particulier fréquente chez le patient infecté par le VIH, pouvant être révélatrice de l'infection (figure 22). Son extension

à l'œsophage est en lien direct avec la diminution du taux des lymphocytes T CD4+ sous le seuil de 100 éléments/mm<sup>3</sup>(vazquez, 2011). L'atteinte de la muqueuse vaginale est fréquente, ainsi près de 75 % des femmes en âge de procréer ont déjà souffert d'une candidose vulvo-vaginale, *C. albicans* étant encore une fois l'espèce la plus fréquemment impliquée (Brand, 2012).



**Figure 21** : Aspect d'un intertrigo candidosiques palmaire

Source : Cd-Rom ANOFEL4



**Figure 22** : aspect clinique d'une candidose buccale

Source : Cd-Rom ANOFEL4

L'atteinte des angles, ou onyxis, s'accompagne généralement d'un péri onyxis et siège préférentiellement au niveau des mains (**figure 23**), les principaux facteurs favorisant ces infections superficielles sont multiples, locaux (humidité, macération, altération de la barrière cutaneo-muqueuse) et/ou généraux (diabète, âges extrêmes de la vie,

antibiothérapie à large spectre, usage de corticoïdes en topique, immunodépression, etc.)(Ferwerdaet al., 2009).

Dans le cas particulier de la candidose cutaneo-muqueuse chronique, affection rare, le rôle de mutations situées au niveau des gènes impliqués dans l'immunité innée a pu être démontré (Puel et al., 2011 ; van de veerdonk et al., 2011).



**Figure 23** :Aspect clinique d'un onyxis candidosiques avec périonyxis

Source : Cd-Rom ANOFEL4

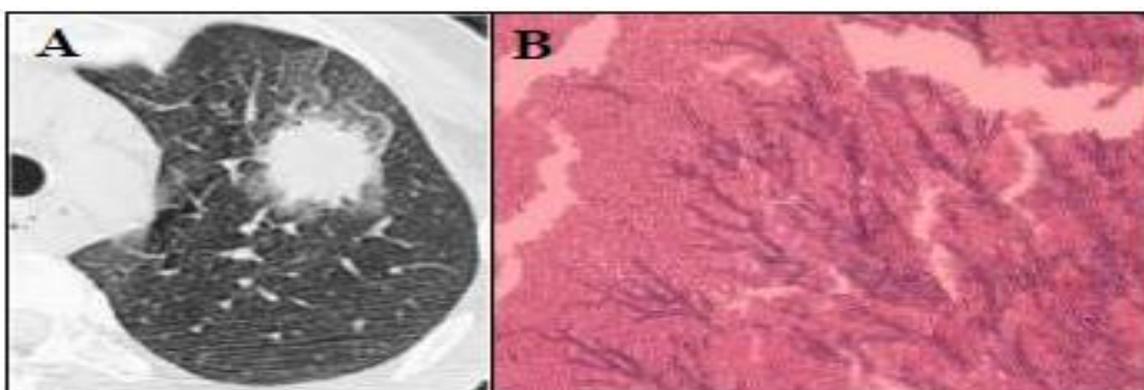
### II.9.2. Infection à *Aspergillus fumigatus*

Parmi le genre *Aspergillus*, l'espèce *A. fumigatus* est de loin la plus fréquente en pathologie humaine, impliquée dans 80 à 90 % des cas, l'implication des autres espèces (dont *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* et *A. nidulans*) étant nettement plus rare. Pathogène opportuniste, son développement chez l'hôte est sous la dépendance de nombreux facteurs favorisants, locaux (caverne tuberculose, broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), dilatation des bronches, mucoviscidose, etc.) et/ou généraux (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, chimiothérapies aplasiantes, etc.). Des facteurs environnementaux comme l'abondance des spores aspergillaires dans l'air inhale mais également liés au champignon comme la petite taille des spores, sa thermotolérance et des facteurs de virulence vont également contribuer à la fréquence de la pathologie aspergillaires.(Kousha et al., 2011).

Le spectre clinique des aspergilloses notamment dues à *A. fumigatus*, concerne principalement l'arbre respiratoire même si des atteintes superficielles sont décrites, les plus fréquentes étant les otomycoses, plus rarement des onyxis voir des kératites, *Aspergillus fumigatus* peut être à l'origine de sinusites, d'alvéolites allergiques extrinsèques résultant de l'inhalation massive et répétée de spores aspergillaires, de

surinfections bronchiques ou cours des BPCO et de la mucoviscidose. Au cours de la mucoviscidose, la colonisation des voies aériennes par *A. fumigatus* est un événement fréquent concernant de 16 à 57 % des patients susceptible de contribuer à la dégradation de la fonction respiratoire même si les données disponibles sont contradictoires (Pihet et al., 2009 ; Amin et al., 2010 ; De Vrankrijker et al., 2011).

Les aspergilloses invasives, formes les plus graves, sont quasi-exclusivement l'apanage des patients profondément immunodéprimés. Le foyer primitif est le plus souvent pulmonaire (figure 24) et résulte de l'invasion du parenchyme pulmonaire par le champignon avec destruction tissulaire et hémorragie conférant dans les stades précoces de l'infection, l'aspect radiologique d'un (ou plusieurs) nodule(s) entouré(s) d'une couronne de verre dépoli ou signe du «<halo>> (Baddley, 2010).



**Figure 24 :** Aspect radiologique (A) et histologique (B) d'une aspergillose pulmonaire invasive

Source : Caillot et al., 2001 ; collection personnelle

## II.10. Technique d'étude et de caractérisation d'un antifongique

### II.10.1. Production de métabolites secondaires (antifongiques)

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. En effet, la composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires. Pour découvrir de nouveaux composés ayant une bioactivité prometteuse, plusieurs méthodes onéreuses comme la recherche de nouveaux microorganismes producteurs par criblage de différentes sources biologiques particulières, ont été utilisées (Mellouli et al., 2003 ; Miao et al., 2006 ; Yu et al., 2008).

Le rendement des composés bioactifs est généralement augmenté suite à l'optimisation des facteurs chimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligoéléments, etc.) et physiques (température, pH, aération, etc.) pour la croissance microbienne.

### II.10.1.1. Effet de la composition du milieu de culture

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. (Gesheva *et al.*, 2005), ont montré que la nature des sources : de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace éléments minéraux (essentiellement  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ ), affectent fortement la production de la molécule antifongique de type macrolide non polyénique, la AK-111-81, par *Streptomyces hygroscopicus*.

La biosynthèse des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes du métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate : induction et répression de la biosynthèse, rétro inhibition et inactivation enzymatique (Martin et Demain, 1980). Les sels minéraux jouent un rôle de régulation non négligeable, mais leur épuisement n'altère pas pour autant l'initiation du métabolisme secondaire.

### II.10.2. Extraction des antifongiques

À l'issue de la fermentation, l'antibiotique est présent à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique complexe comprenant les cellules, des éléments du milieu et de nombreux métabolites. Le choix du solvant est primordial, celui-ci doit avoir non seulement une forte capacité d'extraction et une sécurité d'emploi, mais aussi assurer la stabilité des métabolites lors de l'extraction et de leur concentration par distillation (Badji, 2006).

La localisation des antibiotiques peut être différente selon leur nature et le microorganisme producteur. C'est pour cette raison que les activités antibiotiques sont à rechercher aussi bien dans le filtrat que dans les cellules et même sur les parois de ces dernières (Augustine *et al.*, 2004).

### II.10.3. Purification des antifongiques

#### A. Purification par chromatographie sur couches minces et sur colonne

Après extraction avec le meilleur solvant choisi, il est souvent indispensable d'effectuer une semi purification par filtration sur gel ou par chromatographies préparatives.

➤ La filtration sur gel (séphadex, polyacrylamide, agarose, etc.) est un procédé qui permet de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire.

➤ Les méthodes chromatographiques préparatives sont utilisées pour séparer des molécules qui ont des propriétés physicochimiques voisines. Elles sont réalisées sur

Colonnes ou sur plaques épaisses de gel de silice (Cappuccino et Sherman, 1999).

### **B. Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Badji (2006) rapporte que l'HPLC est une méthode d'analyse très sélective. Elle est utilisée comme dernière étape de purification car elle permet de séparer de nombreux produits, y compris des isomères d'un mélange complexe. Souvent, le travail s'effectue en phase inverse: la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire.

### **C. Identification des molécules par des méthodes spectrales**

La spectroscopie d'adsorption est très utilisée dans les laboratoires pour identifier des substances ou pour les doser. Les mesures sont réalisées dans l'UV (190 à 400nm) et / ou dans le visible (400 à 800 nm).

#### ➤ **Spectroscopie (UV-visible)**

La spectrométrie en UV-visible peut permettre d'identifier la classe de l'antibiotique inconnu par comparaison avec les spectres d'absorption connus et répertoriés. Cette étude permet de détecter les composés aromatiques (absorption entre 240 et 260nm) et les systèmes insaturés dont certains (substances colorées) absorbent même dans le visible. Les polyènes qui absorbent entre 291 et 405 nm (Williams et Fleming, 1989) sont aisément détectés par spectroscopie UV-visible.

#### ➤ **Spectroscopie dans l'infrarouge (IR)**

Les absorptions dans l'infrarouge permettent de déterminer la présence de groupements et fonctions au sein d'une substance inconnue (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH, OH, NH<sub>2</sub>, CHO, COOH, etc.), d'aromatiques, etc. Et ce, à l'aide de tables de corrélations (Williams et Fleming, 1989).

#### ➤ **Spectrophotométrie de masse**

Cette technique permet d'établir les masses molaires et parfois même, la structure des substances analysées après examen très approfondi du pic moléculaire et de ses fragments. Il existe différentes méthodes d'ionisation. Les plus utilisées pour l'étude des antibiotiques sont l'ionisation chimique (IC), l'ionisation par bombardement rapide des atomes (FAB), l'impact électronique et l'électro spray (Deshayes et al., 1989).

#### ➤ **Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Ce type de spectrométrie permet de localiser les atomes, de préciser la formule développée et la stéréochimie du composé étudié ainsi que sa conformation privilégiée (Rouessac, 1992).

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

RMN 2D : Les spectres RMN 2D possèdent des données de déplacement chimique sur deux axes de fréquences. Ils permettent une corrélation des fréquences de résonance de différents noyaux (Smaoui, 2010).

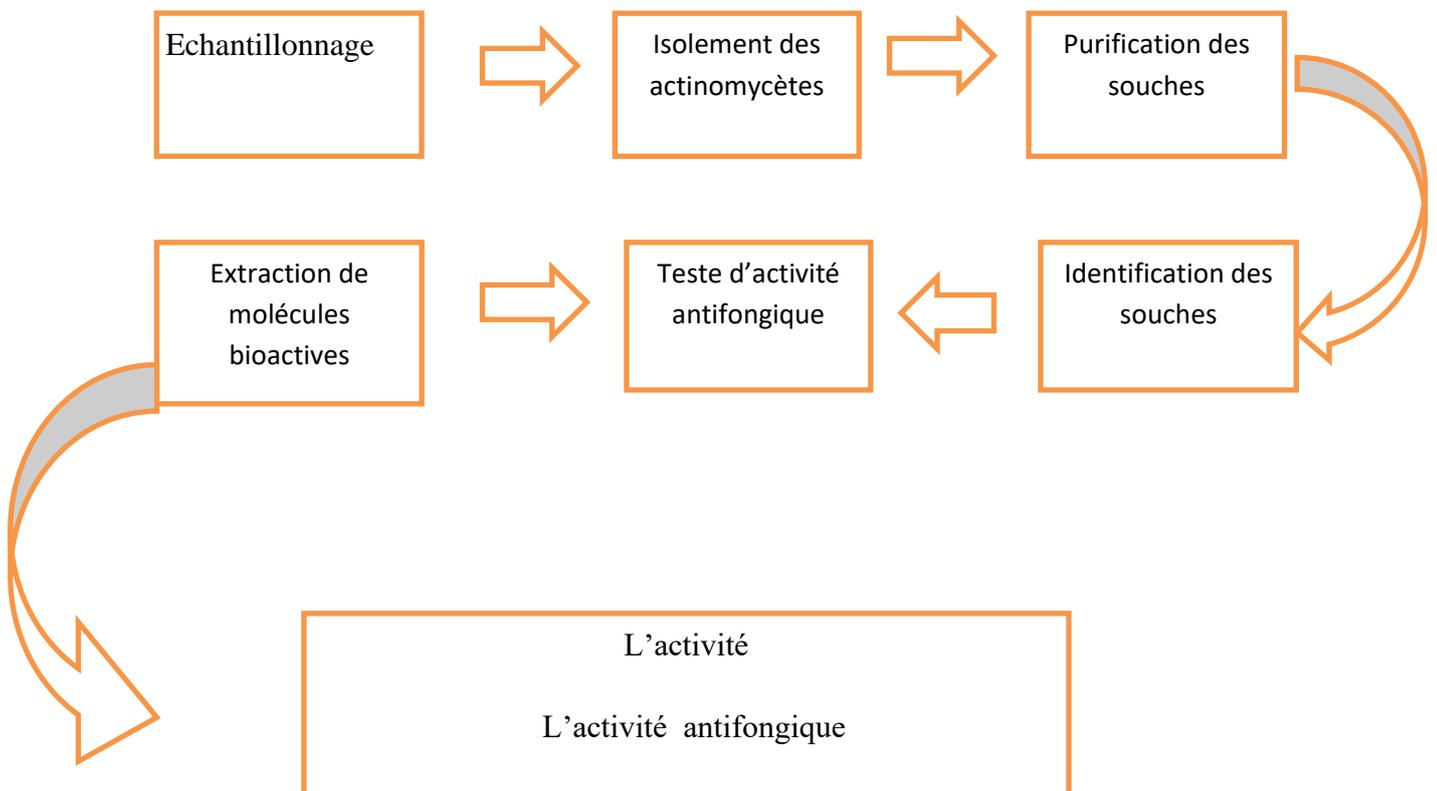
# **Matériel**

## **Et Méthode**

## Matériel et Méthode

### III-1 1 L'objectif

L'objectif principal de notre travail qui débuté en janvier 2020 dans le laboratoire de l'Université de Moulay Tahar Saïda est focalisé sur l'isolement et l'identification de quelques souches des actinomycètes de différents écosystèmes naturels. Ces actinomycètes vont être sélectionnés dans le but de l'étude de leur activité antifongique (**figure 25**).



**Figure 25** : plan d'étude de l'activité antifongique

## Matériel et Méthode

### III-2 Echantillonnage

Six sites de prélèvement répartis sur les différentes zones géographiques de l'Algérie sont utilisés dans cette étude. Le sol salin est prélevé dans deux sites le premier est situé à Tamentit dans la wilaya d'Adrar (**B**) et le deuxième à Bougtob dans la wilaya d'El Bayadh(**S**). Le troisième et le quatrième échantillon sont des sols rhizosphériques de l'arbre Moringa (**M**) d'Adrar et syzium (Sedra) de Saïda (**D**). Le cinquième point d'échantillonnage est situé au niveau d'une grotte dans la wilaya de Saida (**G**) alors que le sixième est une eau thermale (**E**) prélevé dans la région de Sidi Aïssa à Saida (**tableau 3**).

**Tableau 3** : Situation géographique des sites d'échantillonnage

Echantillon	Région	Altitude	Etage bioclimatique
<b>E</b>	Saida-sidi Aïssa	638m	Semi-aride
<b>G</b>	Saida-vieux	868 m	Semi-aride
<b>D</b>	Saida	650 m	Semi-aride
<b>S</b>	Bougtob	1056m	Aride
<b>B</b>	Adrar-Tementit	240 m (790 ft)	Aride -chaud
<b>M</b>	Adrar	279 m	Aride chaud

Le prélèvement des échantillons des sols est réalisé selon la méthode décrite par Pochon et Tardieux (1962). A l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 centimètres de profondeur) 100 à 150 grammes de terre qui sont déposés sur une feuille d'aluminium stérile. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.) et environ 50 grammes sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire.

Pour l'échantillon de l'eau thermale, le prélèvement d'un volume suffisant est réalisé dans un flacon stérile.

### III.3. Analyses physico-chimiques du sol

#### III.3.1 Mesure de pH

Le pH est déterminé à l'aide d'un pH-mètre à électrode, ce dernier est plongé dans une suspension dont le rapport (sol/eau) est de 2/5 (g/ml). (**Kummar et al, 2012**).

## Matériel et Méthode

---

### III.3.2. Dosage d'humidité

Une quantité de 10 gramme de sol de chaque échantillon sont séchée dans un four à moufle jusqu'aux poids constants à la température de 105C°. L'humidité est calculée par la formule (Smith et al, 1998) .

$$\%H = \frac{(P1 - P2) - (Pt - P_t)}{(P1 - Pt)}$$

P1 : poids de l'échantillon avec la tare avant séchage

P2 : poids de l'échantillon avec la tare après séchage

Pt : poids de tare

H% : Humidité

### III.3.3. Détermination du taux de la matière organique

Après mesure de l'humidité, le sol de chaque échantillon est incinéré pendant 16 heures dans un four à moufle à 450 C°. Le taux de matière organique est différence entre le poids sec et le poids des cendres (Lee et Hwag, 2002).

## III.4. Isolement des actinomycètes à partir le sol

### III.4.1. Prétraitement des échantillons

Les échantillons du sol subis un prétraitement pour améliorer le monde des actinomycètes, pour cela deux prétraitement ont été appliqués :

- **Le séchage** : Les échantillons du sol sont séchés à la température ambiante pendant sept jour, ce prétraitement à comme effet la réduction de la flore bactérienne dans les échantillons du sol.

### Les milieux de cultures

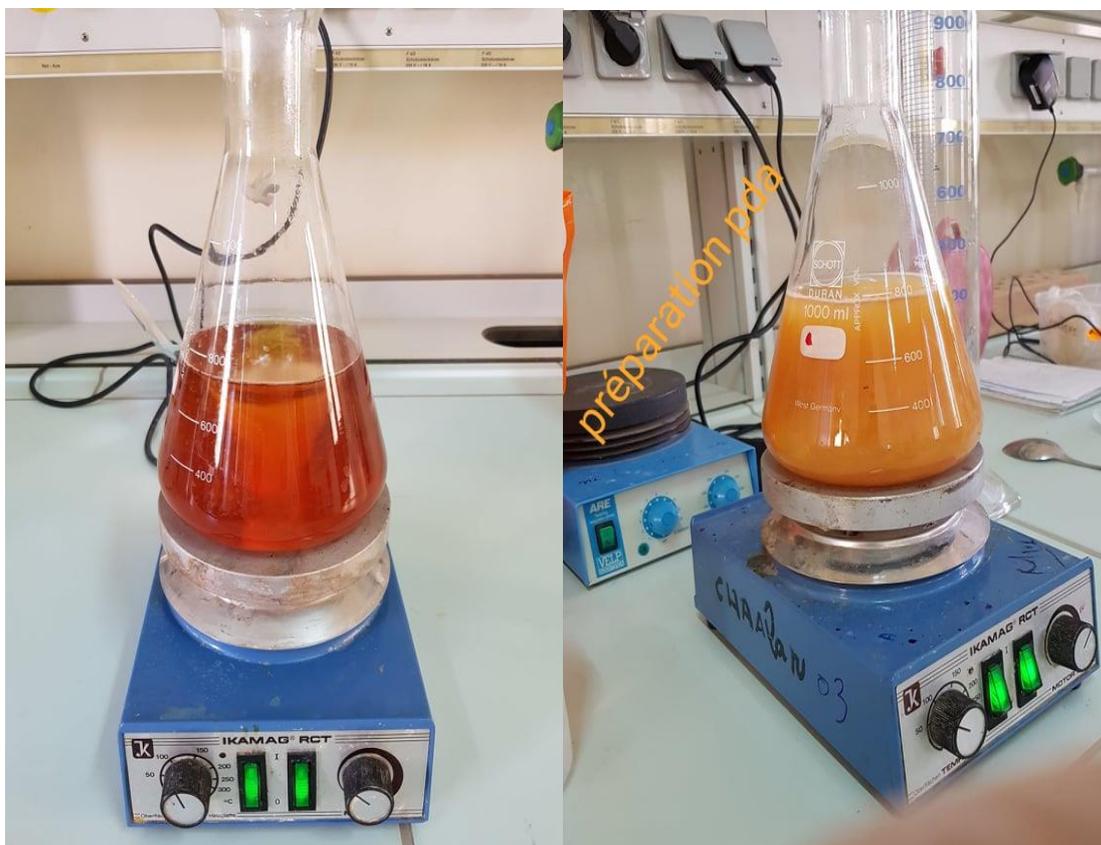
- Milieu Bennett
- Milieu Gym
- Isp2

Voir l'annexe

Les milieux utilisés pour les testes c'est ; PDA et sabouraud.

## Matériel et Méthode

Les compositions de chaque milieu de culture est donnée dans l'annexe. Le pH de chaque milieu de culture est ajusté à raison de  $7.4 \pm 0.2$  avant la stérilisation. Pour favoriser l'isolement des actinomycètes.



**Figure26** : préparation le milieu Isp2

**Figure27** : préparation le milieu PDA

### III.4.2. Préparation de la suspension de la dilution et ensemencement

La préparation des dilutions le 23-01-2020 est consisté tout d'abord à ajouter 1 gramme de sol broyés à 9 ml d'eau physiologique stérile. La suspension subit une agitation par un vortex, ce qui constitue la dilution 10-1. À partir de la cette suspension mère on prépare les dilutions 10 -2 et 10-3.

Un volume de 1 ml de chaque dilution est ensemencé par inondation à la surface de milieu de culture coulé sur des boites pétries, avec trois répétitions pour chaque dilution.

Les boites sont mises dans un incubateur réglé à la température de 28 °C, et ils sont vérifiés régulièrement pendant 21 jours.



## Matériel et Méthode

---

### III.5. Identification des actinomycètes

#### III.5.1. Observation macroscopique

L'aspect phénotypique des colonies et les caractères cultureux sont déterminée sur le milieu. L'inoculum sont ensemences par la méthode de stries. Après 14 a 21 jours d'incubation a 30 °C, les caractères suivantes sont notes : la taille, et la forme, le relief, le contour, l'aspect de la surface, l'élévation, consistance, la couleur. La production des pigments diffusibles.

#### III.5.2. Observation microscopique

Toutes les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques aux actinomycètes, colonie dures et incrustées dans la gélose, sont observées au microscope optique, en utilisant la coloration simple par bleu de méthylène, ainsi que la coloration de Gram.

##### Mode opératoire

- Préparer et fixer sur lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1 minute. Rincer à l'eau distillée
- Ajouter du Lugol pendant 1 minute, puis rinçage à l'eau distillé
- Traiter à alcool pendant 30secondes, rincer à l'eau
- Recolorer à la fuschine pendant 1 minute, rinçage à l'eau puis séchage

L'observation au microscope optique est effectuée avec des grossissements gradués ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ ).

#### III.5.3. Morphologie des mycéliums aériens et de substrat

L'observation des mycéliums (substrat et aérien) ont été effectuées selon la technique décrite par **Cross (1989)** cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé.

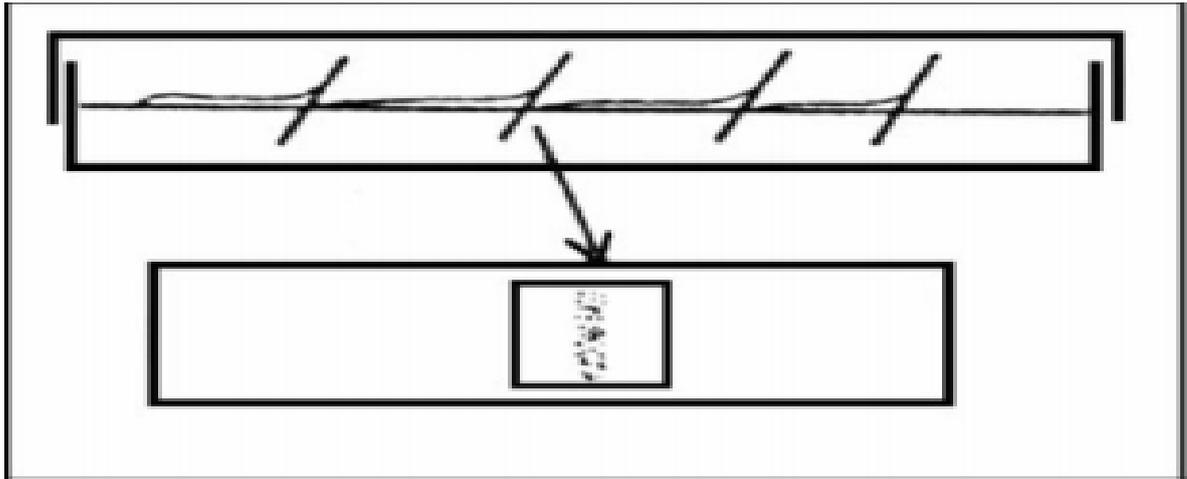
Après 14 jours d'incubation à 30°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des mycéliums de substrat et aérien

Une goutte de l'inoculum est disposée contre la lamelle en contact avec le milieu.

Les pigmentations diffusibles sur les milieux de culture.

## Matériel et Méthode

---



**Figure 30** : Technique de culture sur lamelle

### III.6. Purification des souches

Les colonies présentant les critères des actinomycètes sont repiquées et purifiées sur le milieu de l'isolement, le 17-02-2020, cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention des cultures pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode des stries dans des boîtes de pétri contenant le même milieu d'isolement, puis incubées pendant 2 à 3 semaines à 28°C. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquage possibles, pour conserver la stabilité génétique des souches (**Boussaber & al, 2012**).

La pureté des isolats est contrôlée par des examens microscopiques directs, après chaque repiquage.

### III.7. conservation des souches

Seules les colonies à coloration de Gram positive présentant l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes, sont conservées sur gélose inclinées. Les tubes sont incubés à 28°C jusqu'à croissance. Ils sont placés, par la suite, dans un réfrigérateur à 4°C (**Arifuzzaman & al, 2012**).



**Figure 31** : technique de conservation

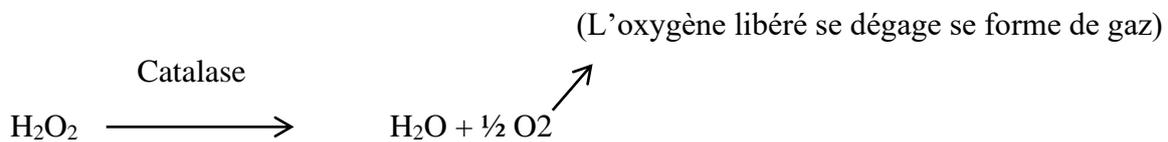
## Matériel et Méthode

---

### III.8. Etude phénotypique

#### III.8.1. Recherche de catalase :

Cette enzyme permet la dégradation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui résulte de l'oxydation par l'oxygène.



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame en verre propre sur laquelle on ajoute une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz abondant sous forme de mousse : le test catalase est positif, s'il n'y a pas de bulles : le test catalase est négatif (**Zinedine, 2004**).

#### III.8.2. Recherche de la cellulase :

Cette activité a été testée sur gélose ISP9 ajouté de 1% de méthyl cellulose. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri puisensemencé par la méthode de stries les souches à tester et incubé à 30°C. Après 14 jours, ajoutant une solution aqueuse de rouge Congo à 1% (Annexe 2) pendant 15 à 20 min permet de mettre en évidence la dégradation de la cellulose (**Pinky, 2012**).

#### III.8.3. Hydrolyse d'amidon :

Les souches sont cultivées sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la gélose est recouverte par une solution de Lugol. L'absence de coloration autour des colonies indique l'hydrolyse de l'amidon tandis que les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Geraldine, 1981**).

#### III.8.4. Hydrolyse de la caséine :

Les souches d'actinomycètes sontensemencées sur milieu gélosé stérile contenant 1 % de lait écrémé, l'apparition des zones claires autour des colonies après 7 à 20 jours d'incubation à 30°C témoigne l'hydrolyse de la caséine (**Gordon, 1974**).

#### III.8.5. Hydrolyse de la gélatine

Les souches sont cultivées sur milieu gélose nutritif contenant 8 % (P/V) de gélatine pendant 14 jours à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercure est ajoutée. Les zones claires correspondent aux zones de l'hydrolyse (**Geraldine, 1981**).

## Matériel et Méthode

---

### III.9. Microorganismes cibles

Dans le but d'effectuer un criblage préliminaire, les isolats conservés ont été repris et testés pour leurs activités antifongiques vis-à-vis des microorganismes cibles de référence obtenus gracieusement de l'université de Saïda de Mr Adli le 24-02-2020.

*Aspergillus flavus*,

*Phytophthora infestans*,

*Endosporium*

*Aspergillus Niger*

*Candida albicans*.

#### III.9.1. Identification des champignons

L'étude des souches purifiées comporte deux caractères :

#### III.9.2. Caractères macroscopique :

Ils nous montrent : L'aspect morphologique des colonies et

La texture du thalle (velouté, laineux). La couleur du thalle (pigmentation du mycélium, conidies...) couleur du revers la culture. Ces caractères sont étudiés à l'œil nu.

#### III.9.3. Caractères microscopique :

Qui détecte la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, la nature de la production et les caractéristiques des fructifications et des spores.

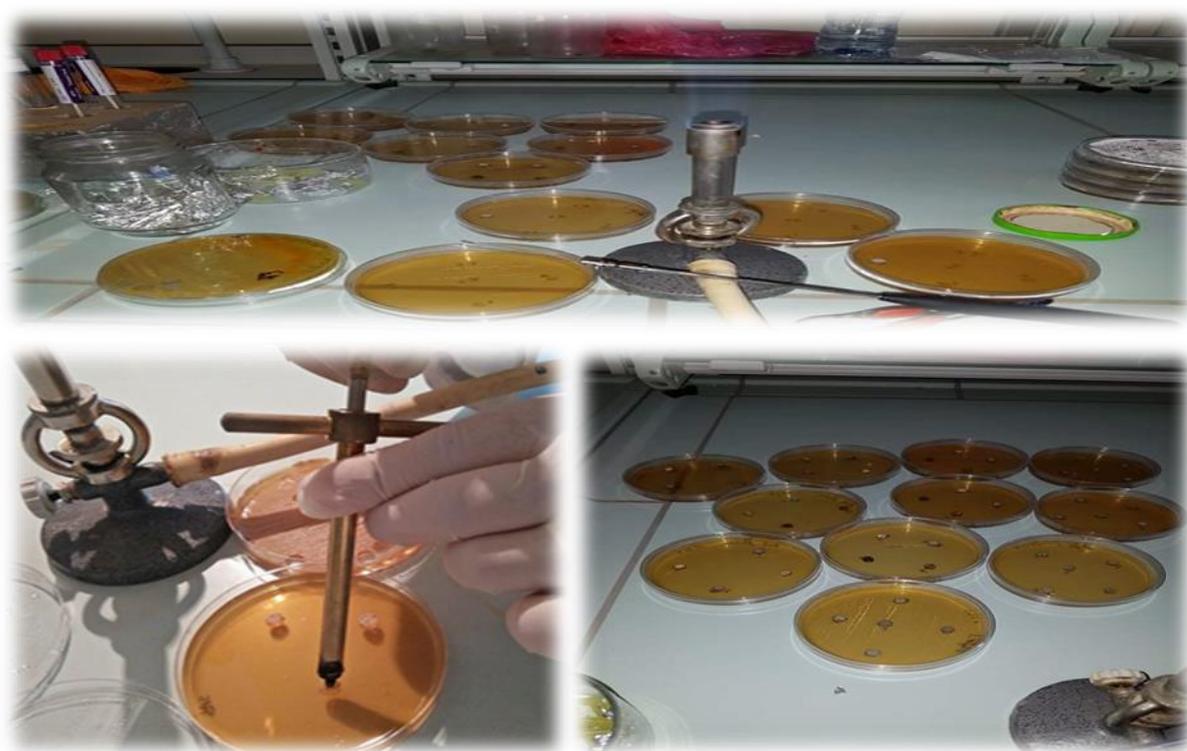
L'identification a été réalisée, soit par la méthode de scotche, soit par la méthode de «microculture». Elle consiste à cultiver les moisissures isolées sur des petits carreaux de 2cm de PDA solidifier d'où les spores sontensemencées sur les limites périphériques du milieu pour qu'elles puissent germer en présence d'oxygène. Chaque carreau est déposé sur une lame puis recouvert d'une lamelle. Ensuite L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide, et les incubés à 25°C pendant 3 à 5 jours. Après incubation, on effectue les observations des lames au grossissement  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ . Les observations retenues sont comparées à celles décrites dans le guide de Barnett (**Barnett et Hunter, 1972**).

### III.10. Méthode de cylindre d'agar

Un volume de 2 ml de chaque suspension d'isolats des champignons le 10-03-2020 et *Candida* le 13-03-2020 est mis en culture. Des cylindres de culture gélosés sont prélevés pour chaque isolat d'actinomycète puis déposés dans les milieux de culture ensemencés au préalable par la suspension de chaque isolat testé. Les cultures sont ensuite mises au réfrigérateur (4°C) pendant 4 heures, afin d'optimiser la diffusion d'un éventuel antifongique,

## Matériel et Méthode

et ralentir la croissance des microorganismes ensemencés. Ensuite les cultures sont incubées à 28°C pendant 48 à 72 heures. Lemriss et al.,2003).



**Figure 32:** technique de cylindre d'agar

### III.11. Recherche de l'activité en milieu solide

#### III.11.1. Technique de stries croisées (Duraipandiyar et al., 2010 ; Valan arasu et al., 2009).

La recherche de l'activité antifongique par la technique des stries croisées est réalisée sur l'ensemble des souches citées.

Cette étape permet de cribler les souches productrices de molécules antifongiques actives en mettant en évidence des zones d'inhibition de la croissance.

##### ➤ **Technique**

La technique des stries croisées consiste à ensemencer la souche d'actinomycètes par une strie centrale dans une boîte de pétri contenant le milieu ISP2, d'incuber 7 jours à 28°C, ensuite les souches tests seront ensemencées par une strie croisant perpendiculairement celle de l'actinomycète, incubé à 37°C pendant 24 à 48h, une autre boîte du milieu ISP2 est également ensemencée avec les souches tests seules et incubée dans les mêmes conditions, cette boîte servira de témoin négatif (absence d'inhibition) (Vlan Arasu et al., 2009).

## Matériel et Méthode

---

La production de molécules antimicrobiennes se traduira par une inhibition partielle ou totale de la souche teste .

Cette technique présente l'avantage de pouvoir utiliser plusieurs microorganismes tests pour la même souche d'actinomycète et sur la même boîte.

### III.11.2. Technique de la double couche (Bastide et al., 1986).

L'activité antifongique des souches d'actinomycètes est aussi évaluée par la technique de la double couche.

#### ➤ Technique

Cette technique consiste à ensemencer l'actinomycète ponctuellement sur la boîte de pétri contenant le milieu ISP2, après incubation 7 jours à 28 jours à 28C°, on coule à la surface 2.5ml de milieu semi solide de sabouraud (agar 8g/l) préalablement ensemencé avec les champignons (1ml d'inoculum avec 9 ml de milieu), incubation à 37C° de 24 à 48h, on obtient ainsi une concentration finale, à la surface de chaque boîte de 10<sup>4</sup> levures/ml.

Le résultat positif se traduit par absence de croissance de la souche test autour de la colonie d'actinomycète.

### III.11.3. Production des molécules bioactives en milieu liquide

La production des métabolites bioactives en milieu liquide est détectée par la formation d'une zone d'inhibition de croissance de la souche test autour du disque, l'activité est proportionnelle au diamètre de cette zone, le suivi de cette activité par rapport à la croissance des actinomycètes est appelée cinétique de **croissance** (des actinomycètes en milieu liquide) et de **production** (des métabolites secondaires), la cinétique de PH des milieux est également suivie (Badji et al., 2006).

#### ➤ Technique

A partir d'une culture sur boîte de l'actinomycète (2 à 4 semaines), préparer une suspension dense qui servira d'inoculum, la densité optique de l'inoculum est mesurée par spectroscopie. Préparer des erlenmeyer de 150 ml de trois milieux de cultures différents ISP2, Gym, Bennet, afin de déterminer le milieu qui donne la meilleure production.

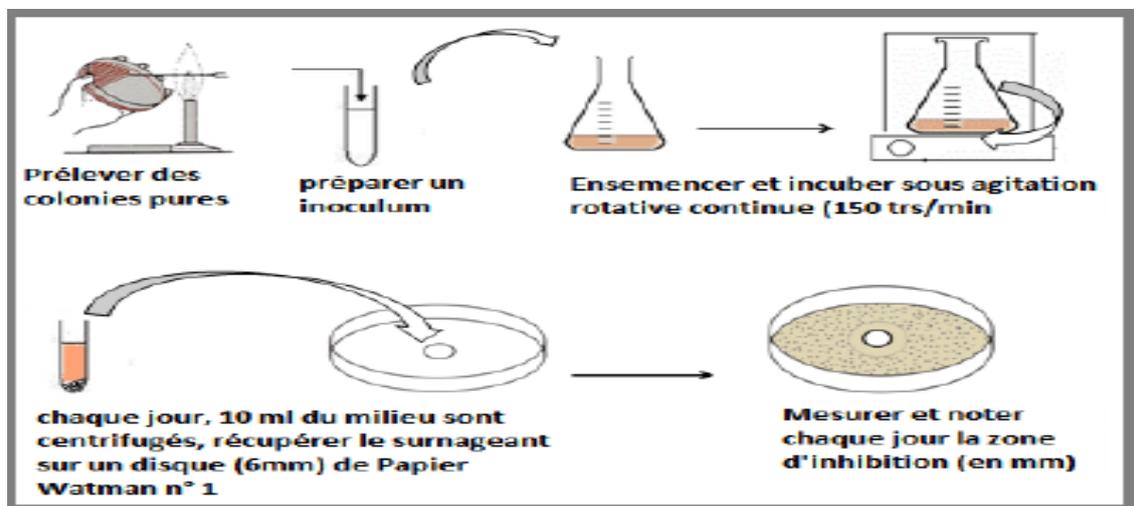
Inoculer (à raison de 1 ml/100 ml de milieu) les trois erlenmeyer qui seront placés dans un incubateur agitateur à 28 °C sous rotation continue de 150 tours/min pendant 15 jours.

Chaque jour, 10ml sont prélevés stérilement, centrifugés, 50µl du surnageant sont pipetés (micropipette) et placés sur un disque de papier Wattman n°1, séchés à l'étuve (37°C pendant 30 min), le PH du surnageant est calculé à l'aide d'un PH mètre.

Le culot est récupéré, lavé trois fois avec de l'eau distillée (centrifuger entre les lavages), puis séché à l'étuve, le poids sec est mesuré en mg/ ml de surnageant (Badji et al., 2006). À

## Matériel et Méthode

partir d'une culture jeune (18h) pour *C. albicans* et les champignons, préparer une suspension de 2 McFarland., Après inoculation du milieu avec les microorganismes testés, les disques sont placés à la manière d'un antibiogramme, placés à l'étuve à 28°C pendant 24h (**figure 33**) (**Joffin et Leyrl., 2006**).



**Figure 33** : Recherche d'activité en milieu liquide (**Badji et al., 2006**)

### III.12. Détection des antifongiques non polyéniques par Spectroscopie UV visible

L'étude spectroscopique permettant la distinction entre les polyènes et les non polyènes a été employée par plusieurs auteurs. Les polyènes présentent des spectres caractérisés par une série de pics entre 260 - 405 nm (**Bastide et al., 1986**). L'étude spectroscopique dans l'UV-visible permet d'avoir un aperçu sur la nature chimique des produits extraits. Pour cela, 40 ml de filtrat de culture de chacune des souches, sont extraits avec du n-butanol, vu qu'il extrait bien les polyènes (**Iamari, 2006**). Les extraits botaniques sont évaporés à sec puis repris dans 5 ml de méthanol. Les extraits sont solubilisés dans du méthanol pur puis analysés par le Spectrophotomètre (Shimadzu UV 1800) précédemment étalonnés avec du méthanol.

### III.13. Etude des antifongiques produits

Après avoir choisi les souches produisant des antifongiques non polyéniques, des cultures liquides sont réalisées afin de mieux étudier ces molécules.

#### III.13.1. Extraction des antifongiques par les différents solvants d'extraction

##### • A partir du filtrat de culture

Après avoir réalisé des cultures liquides sur Erlenmeyers pour chaque souche et obtenu le filtrat de culture, une extraction par des solvants organiques de différentes polarités est effectuée. Cette première expérience nous permet de connaître le meilleur solvant

## Matériel et Méthode

---

d'extraction. Cinq solvants de polarité croissante sont utilisés ; le n-hexane, le benzène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Pour cela 100 ml de filtrat de culture sont extraits par le même volume de solvant à l'aide d'une ampoule à décanter, à température ambiante. La phase organique est récupérée séparément, filtrée sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau, puis évaporée sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est récupéré dans 1 ml de méthanol (**Augustine et al. 2005**).

Il est à signaler qu'ils ne seront testés que les phases organiques de chaque extraction et que les antifongiques produits peuvent être extraits à partir du mycélium et/ou du filtrat de culture.

- **A partir du mycélium**

Le mycélium est récupéré après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation à 3000 g pour se débarrasser des impuretés et autres résidus du milieu. Le culot mycélien est égoutté, récupéré dans une fiole et immergé dans du méthanol (50 mg de mycélium dans 1 ml de méthanol). Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2h de manière à assurer une homogénéisation convenable (à température ambiante). L'extrait méthanolique est ensuite récupéré par filtration sous vide puis concentré à sec à 40°C à l'aide d'un Rotavapor. Le résidu sec est, enfin, repris dans 5ml de méthanol, stérilisé par filtration (filtre millipore 0,45µm) et ce, afin de tester son activité par antibiographie.

### III.14. Antifongigramme des souches

Un Antifongigramme a été réalisé sur les souches candida .A, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Endosporium*.

C'est un system de diagnostic *in vitro* de la sensibilité des levures non exigeantes à croissance rapide aux antifongiques utilisés, c'est une méthode de micro-dilution colorimétrique, chaque plaque comporte six lignes, chaque ligne représente une série de dilution d'un antifongique donne, l'Amphotéricine B (de 0.008 à 16 mg/ml), le fluconazole (de 0.125 à 256 mg/ml), itraconazole( de 0.03 à 64mg/ml) et le voriconazole (de 0.008 à 16mg/ml), la 5-fluorocytosine ( de 0.03 à 64 mg/ml) et le voriconazole (de 0.008 à 16 mg/ml) dans les puits individuels, plus un témoin négatifs de croissance (puits bleu).(**Khelif et al. 2010**)

- **Technique**

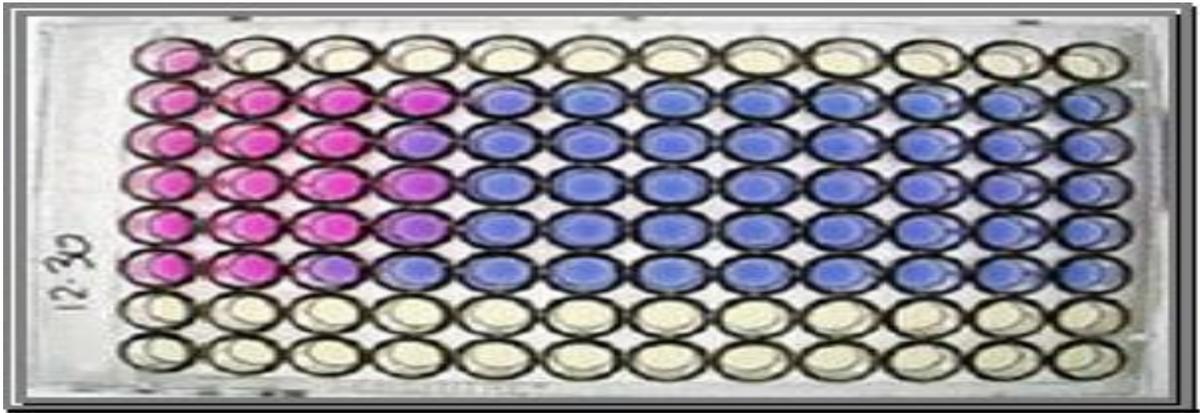
Préparer une suspension d'une densité de 0.5 McFarland à partir d'une colonie pure de 24 h d'incubation de chaque champignon et levure utilisé Transférer 20 µl de cette suspension dans 11ml du bouillon « yeastone » pour obtenir un inoculum de  $1.5 \text{ à } 8 \times 10^3$

## Matériel et Méthode

---

CFU/ml, inoculer chaque puits avec 100  $\mu$ l à l'aide d'une micropipette, couvrir les puits et incuber à 35°C pendant 24 heures.

La lecture manuelle se fait en observant la croissance dans les puits qui se manifeste par un changement de couleur (vers le rose, pourpre ou le rouge selon l'antifongique utilisé). La concentration minimale inhibitrice CMI représente la plus faible concentration pour laquelle l'agent antifongique inhibe la croissance, autrement dit le premier puits bleu.



**Figure 34 :** plaque « sensitive « Yeastone » montrant les CMI de chaque antifongique



**Résultats et  
Discussion**

### **IV Isolement des souches des actinomycètes**

Un protocole d'isolement a été mis en place dans le but d'obtenir un bon criblage, avec l'utilisation de différents milieux. Au bout de 7 jours d'incubation à 28°C, les colonies apparaissent et se développent lentement. Les colonies sont repérées d'après leur aspect caractéristique et sont purifiées.

Un total de 20 isolats d'actinomycètes est obtenu à partir des six échantillons sur les trois milieux de culture (Bennett, Isp2, Gym).

#### **IV.1 Caractérisation des souches d'actinomycètes isolées**

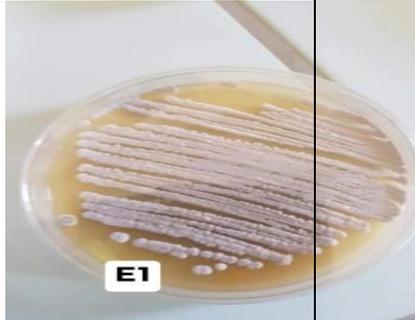
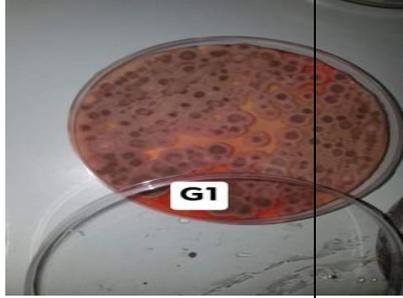
##### **IV.1.1. Etude morphologique**

Après 14 à 21 jours, les colonies apparaissent, ils sont repiqués dans le même *milieu* d'isolement. Les colonies obtenues ont des tailles différentes (petite, moyenne, grande) de forme variable (lisse, bombé, aplatie...etc.) sont tous incrustées dans la gélose, possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (jaune, blanche, marron...etc.), parfois le mycélium aérien est absent.

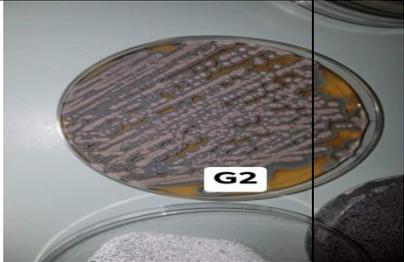
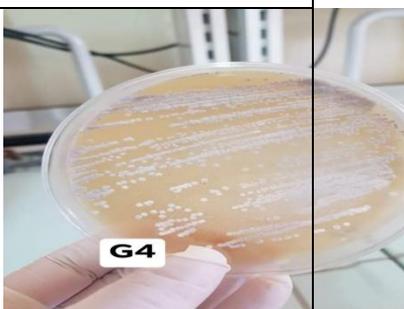
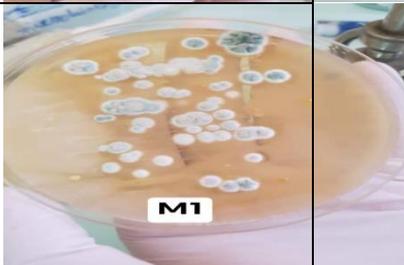
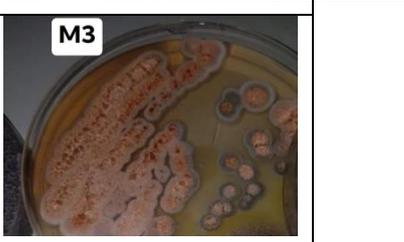
L'aspect macroscopique des isolats est différent. Certains forment des colonies de grande taille, d'autres de taille moyenne et certains d'autres forment des colonies de petite taille. La forme des colonies était différente aussi : colonies bombées, aplatie, poudreuse...etc.

L'aspect microscopique, indique que tous les isolats ont un aspect filamenteux ramifié segmenté ou non, parfois il est fragmenté, ce qui les rapproche d'une façon certaine aux actinomycètes.

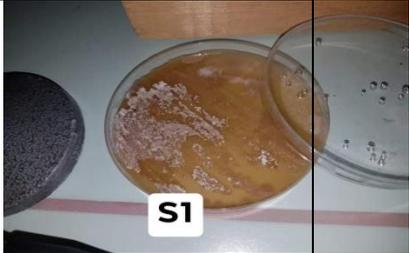
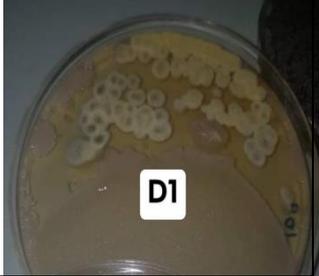
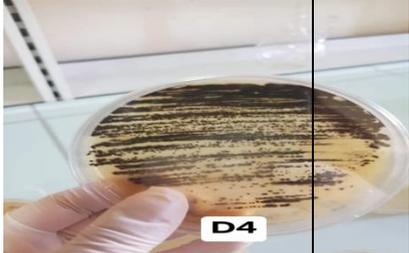
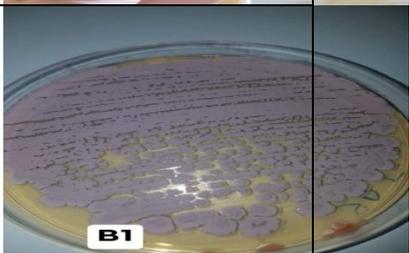
**Tableau 04** : caractéristique culturelle macromorphologiques de différentes souches d'actinomycètes

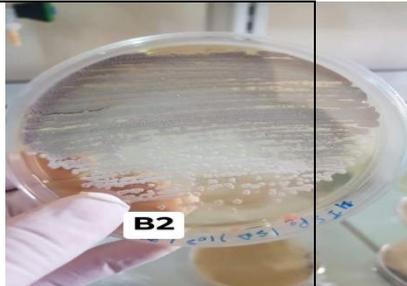
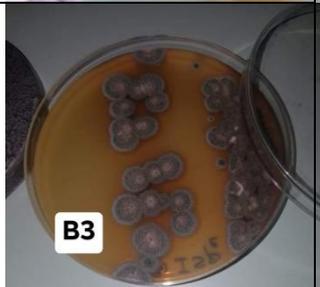
Echantillons	Caractères macroscopiques des colonies			Pigmentation sur le milieu	Photo
	N°	Aspect de surface	Couleur		
E	E1	Lisse	Blanc	Absence de pigmentation	
	E2	Lisse	Blanc	Absence de pigmentation	
	E3	Rugueuse	orange	Absence de pigmentation	
	E4	Rugueuse	grisâtre	Absence de pigmentation	
G	G1	Rugueuse	Gris et rose	Pigmentation orange	

## Résultats et Discussion

	G2	Lisse	Gris claire et foncé	Absence de pigmentation	
	G3	Lisse	rose	Absence de pigmentation	
	G4	Rugueuse	Blanc grisâtre	Absence de pigmentation	
M	M1	Rugueuse	Blanc vert	Absence de pigmentation	
	M2	poudreuse	grisâtre	Absence de pigmentation	
	M3	Rugueuse	Orange vert	Absence de pigmentation	

## Résultats et Discussion

S	S1	Rugueuse	beige	Pigmentation marron	
	S2	Rugueuse	marron blanchâtre	Absence de pigmentation	
D	D1	Lisse	jaunâtre	Absence de pigmentation	
	D2	Rugueuse	Beige blanchâtre	Absence de pigmentation	
	D3	Rugueuse	Beige	Absence de pigmentation	
	D4	poudreuse	noire	Absence de pigmentation	
	B1	Rugueuse	grisâtre	Absence de pigmentation	

B	B2	Rugueuse	Blanc grisâtre	Absence de pigmentation	
	B3	Lisse	Vert grisâtre	Pigmentation marron	

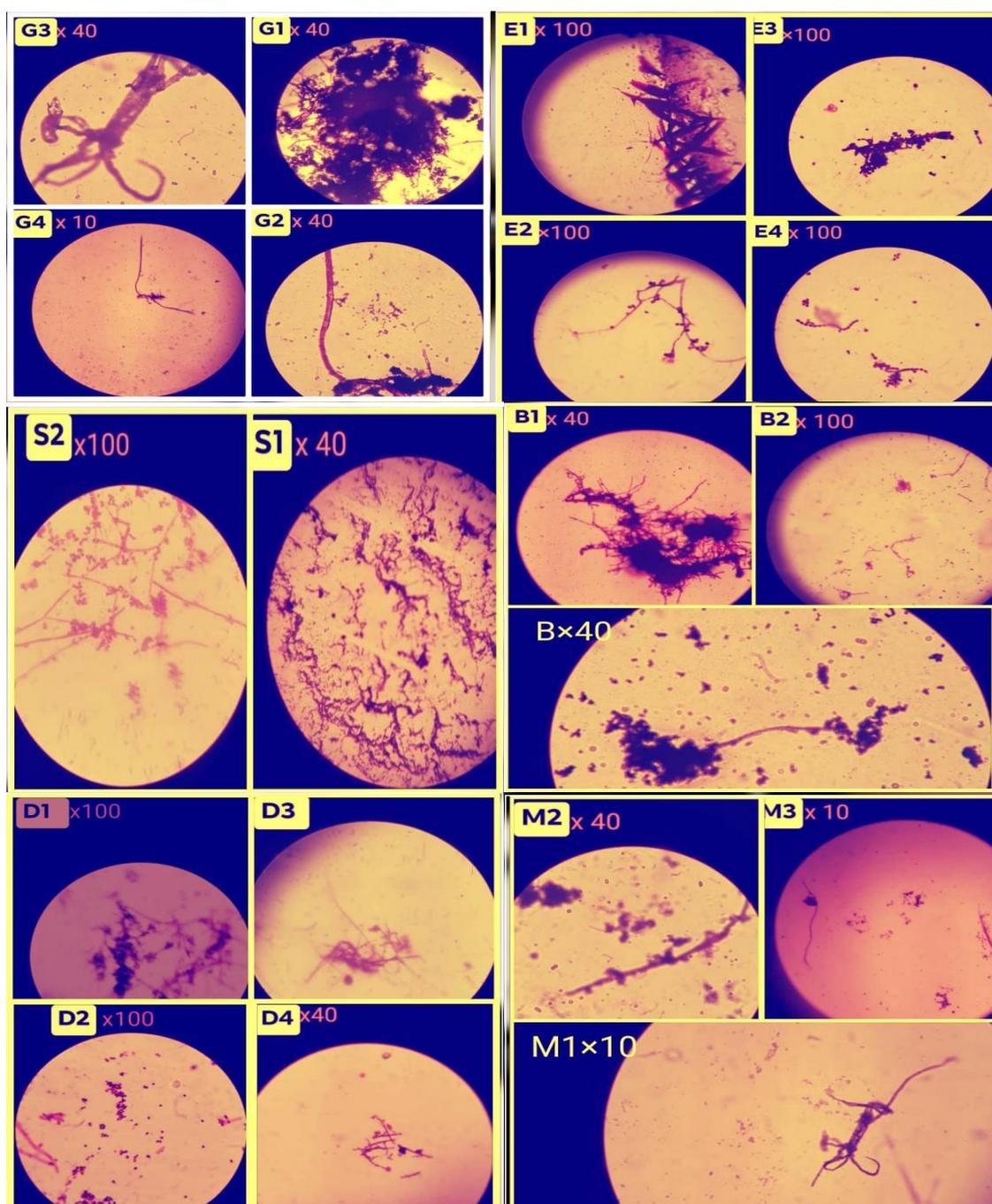
Les 3 milieux utilisés ont montré une croissance importante des actinomycètes suite à leurs richesses en composés organiques. Cependant, le milieu ISP2 a permis une croissance rapide et importante par rapport aux deux autres milieux.

**Andriambololona (2010)** a utilisé le milieu ISP2 pour un isolement sélectif de 82 souches actinomycétales des écosystèmes variés.

**Aouiche et al., (2012)** et **Smaoui et al., (2012)** ont trouvés une bonne croissance et une sporulation abondante sur le milieu ISP2.

### IV.1.2 Etude Micro morphologique :

Les résultats des observations microscopiques des isolats après coloration de Gram confirment l'appartenance de ces isolats aux groupes des bactéries Gram positif, ce test permet d'apprécier un certain nombre de caractères tels que l'aspect des filaments qui contribuent à l'identification des Actinomycètes.



**Figure 35 :** Aspect microscopique de différentes souches d'actinomycètes après coloration de Gram

Les résultats obtenus par **Kitouni et al, (2005)** montrent que l'observation microscopique des bactéries actinomycètes et particulièrement les *Streptomycètes* présentent un aspect filamenteux avec présence des spores isolés ou en amas qui sont parfois à court ou à longues chaînes ou enchevêtrés. Les Actinomycètes appartiennent au phylum d'*Actinobacteria* qui regroupe des bactéries Gram positives ce qui confirme l'appartenance

de nos isolats au groupe des Actinomycètes, ces résultats sont conformes avec ceux obtenus par (Loucif, 2011).

### IV.2. Etude phénotypique

#### IV.2.1 Recherche de catalase

**Tableau 05** : Résultats obtenus de test catalase sur 20 souches.

La souche	La catalase(+) ou (-)
E1	ND
E2	ND
E3	ND
E4	ND
G1	ND
G2	ND
G3	ND
G4	ND
M1	ND
M2	ND
M3	ND
S1	ND
S2	ND
D1	ND
D2	ND
D3	ND
B1	ND
B2	ND
B3	ND

Tous les isolats d'actinomycète de **Rafai (2019)** ont présentées un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse qui indique la dégradation de l'eau oxygénée donc, catalase positive, sauf une souche ne présente aucun réaction donc catalase négative .

Les résultats obtenus par **Qiong Ying et al (2012)** montrent que les souches d'actinomycète sont aérobies à catalase positive.

Les résultats des activités enzymatiques des 20 souches étudiées sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 06:** Résultats des activités de dégradation des différents substrats des 20 souches étudiées.

Les souches	cellulose	amidon	caséine	Gélatine
E1	ND	ND	ND	ND
E2	ND	ND	ND	ND
E3	ND	ND	ND	ND
E4	ND	ND	ND	ND
G1	ND	ND	ND	ND
G2	ND	ND	ND	ND
G3	ND	ND	ND	ND
G4	ND	ND	ND	ND
M1	ND	ND	ND	ND
M2	ND	ND	ND	ND
M3	ND	ND	ND	ND
S1	ND	ND	ND	ND
S2	ND	ND	ND	ND
D1	ND	ND	ND	ND
D2	ND	ND	ND	ND
D3	ND	ND	ND	ND
B1	ND	ND	ND	ND
B2	ND	ND	ND	ND
B3	ND	ND	ND	ND

Les résultats obtenus de **Rafai (2019)** montrent que la majorité des souches sont Capables de dégrader la plus part des substrats testés ce qui indique leur aptitude à produire des enzymes hydrolytiques.

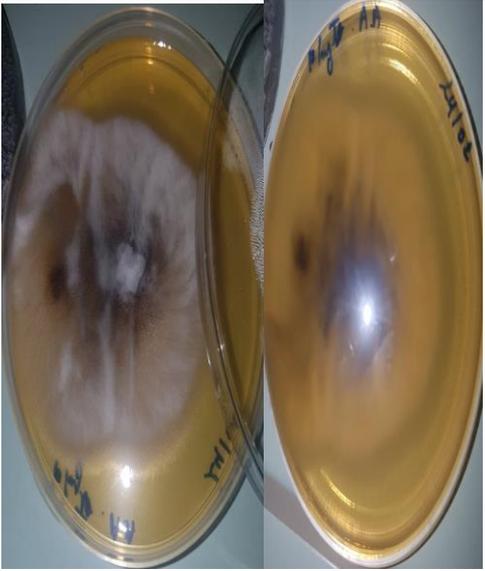
## IV.3 Identification des champignons

### V.3.1 Caractères macroscopique

Les souches cible sont repique successivement sur PDA, les aspects morphologique de ces souches fongique a été étudiier voir (**tableau 07**).

**Tableau 07** : les caractères macroscopique des champignons

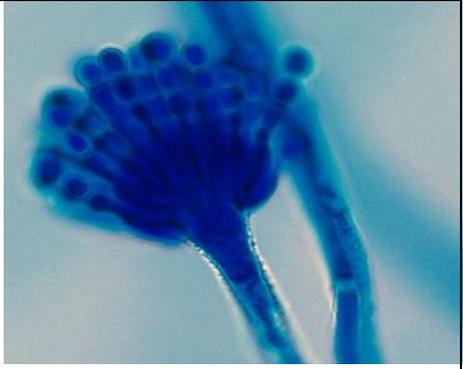
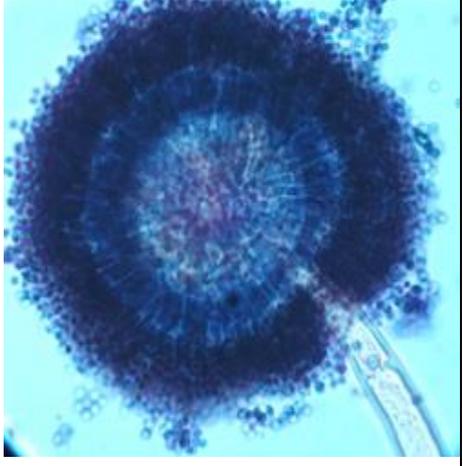
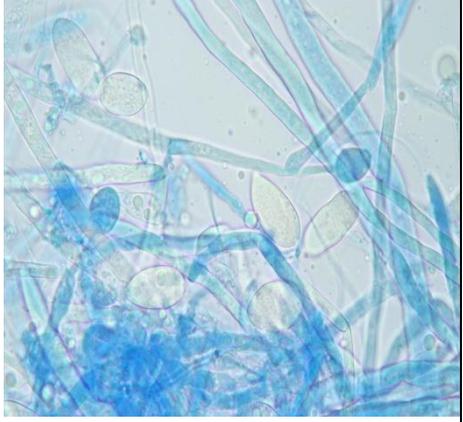
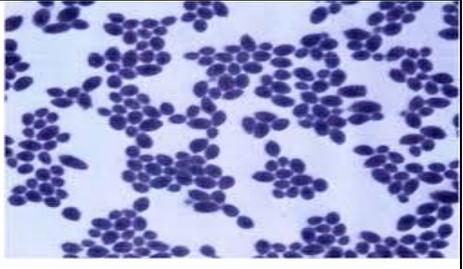
Champignon	aspect	photo
Aspergillus flavus	<p><b>Recto</b> : colonies duveteuses à poudreuses, blanches puis jaunes puis vert</p> <p><b>Verso</b> : incolore, rosé à brun marron clair</p>	
Aspergillus niger	<p><b>Recto</b> : colonies formées par un mycélium compact blanc a jaunâtre recouvert par une couche dense de conidiospores noirs et brun</p> <p><b>Verso</b> : incolore et brun</p>	
endosporium	<p><b>Recto</b> : colonies formées par un mycélium compact jaunâtre, poudreuses, jaunes et marron</p> <p><b>Verso</b> : le centre marron fonce et contour jaune et blanc jaunâtre</p>	

<p>Phytophthora infestant</p>	<p><b>Recto</b> : colonies poussent de façon radiale, compacte sans marge nette, elles sont duveteuses et présentent de courts hyphes aériens la couleur blanc et le centre brun</p> <p><b>Verso</b> : le centre brun et blanc, le contour incolore.</p>	
<p>Candida albicans</p>	<p>Les colonies blanches de type smooth, crémeuse et bombée</p>	

### IV.3.2 Caractère microscopique

Durant les 5 jours d'incubation à 28C° après montre les colonies, en utilisant la methode de scotch, nous avons observé les conidies, les hyphes....

**Tableau 08** : observation microscopique

	caractères	Photo
A. Flavus	Flavus. Les têtes conidiales sont rayonnantes, se divisant pour former des colonnes lâches, bisériées mais ayant des têtes avec des phialides portées directement sur la vésicule	
A. niger	Têtes conidiennes brun foncé à noires, Conidiophore lisse, hyalin ou brunâtre Vésicule globuleuse supportant deux séries de stérigmates sur toute sa surface. Phialides brunes. Conidies brunes globuleuses	
P. infestans	présentait des hyphes hyalins et ramifiées de 5 à 8 µm de diamètre, des sporangiosphères longs avec un pédicelle et des sporanges ellipsoïdaux avec des papilles âgées.	
C.albicans	Observation d'un frottis au bleu de méthylène au MO levures ovales colorées en bleu	

Dans le but de sélectionner des souches d'actinomycètes ayant une activité antifongique, on a réalisé un test de cylindre d'Agar sur 6 souches fongique à savoir : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Endosporiumsp*, *phytophthora infestant*. Et *Candida albicans*.

### IV.4 l'activité antifongique

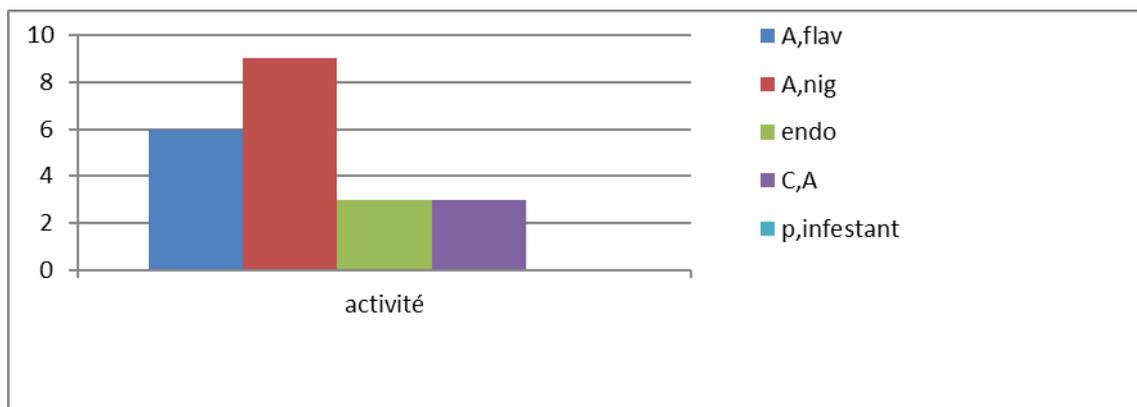
#### IV.4.1 Méthode des cylindres d'agar

Les isolats d'actinomycètes sont testés contre *C. albicans*, *A. flavus*, *A. niger*, *P. infestant*, *Endosporium*, par méthode cylindre d'agar. Les résultats obtenus sont regroupés dans les figures et le tableau suivant.

**Tableau 09** : activité antifongique des actinomycètes.

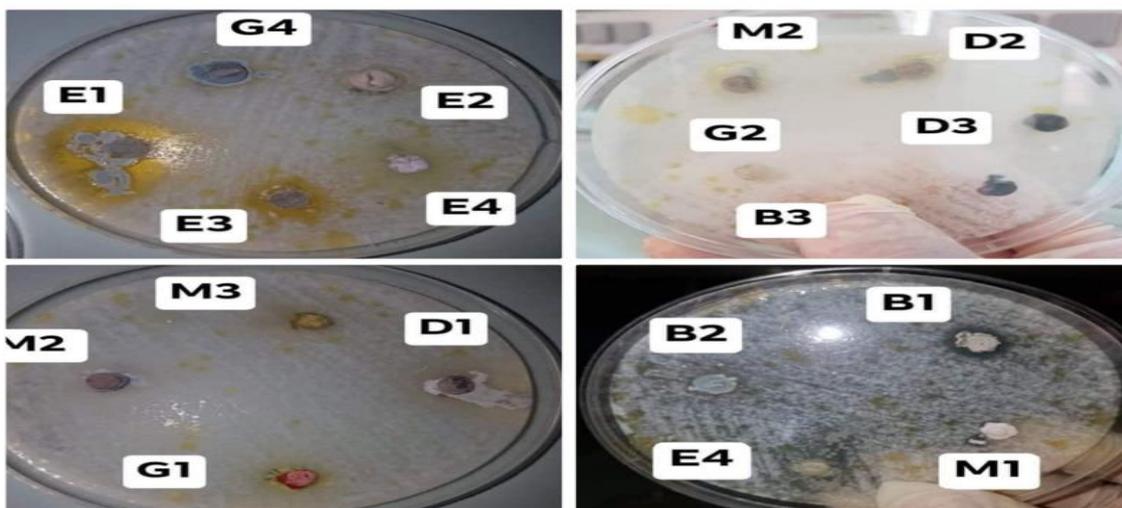
	Champignon				levure
	A. Flavus	A. Niger	Endosporium	p. Infestant	C.A
<b>E1</b>	+	-	-	-	+
<b>E2</b>	-	+	-	-	-
<b>E3</b>	+	+	-	-	-
<b>E4</b>	+	+	+	-	+
<b>B1</b>	+	+	+	-	-
<b>B2</b>	-	+	+	-	-
<b>B3</b>	-	+	-	-	-
<b>M1</b>	-	-	-	-	+
<b>M2</b>	-	-	-	-	-
<b>M3</b>	-	+	-	-	-
<b>D1</b>	+	-	-	-	-
<b>D2</b>	-	+	-	-	-
<b>D3</b>	-	-	-	-	-
<b>G1</b>	+	+	-	-	-

(-) : pas d'inhibition, (+) : présence d'inhibition



**Figure 36 :** l'activité anti fongique

Les 14 souches d'actinomycètes ont présenté une activité antifongique vis-à-vis d'au moins une souche. La souche E4 est active sur les trois champignons et la levure. Cependant, *Candida albicans* présente une résistance aux antifongiques produits par la plupart des actinomycètes. Aucune activité n'est marquée contre *Phytophthora*, alors que la majorité des isolats ont inhibé la croissance d'*A. Niger* figure(36)



**Figure 37 :** activité antifongique des actinomycetes contre *A. flavus*

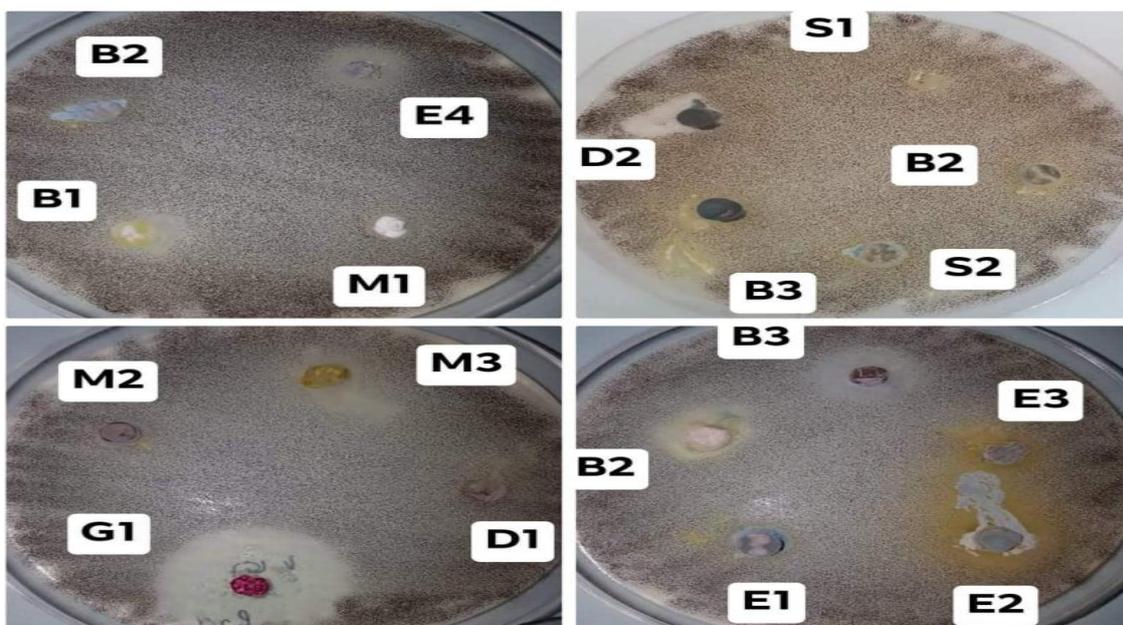


Figure 38 :activité antifongique des actinomycetes contre A.niger



Figure 39 : activité antifongique conte endosporium



Figure 40 : activité antifongique contre candida albicans.

Nos résultats de l'activité antifongiques sont en accord avec les travaux de **Hacène et al. (1994)** qui démontrent que 11,18 % de l'ensemble des actinomycètes isolés du sahara Algérien ont une activité antifongique. Les travaux de **Hilali et al. (2002)** confirment également les mêmes résultats. L'arsenal en molécules antifongiques est donc très pauvre à

cause de la rareté des organismes producteurs de ce type de substance. Par conséquent, les recherches dans ce domaine doivent continuer afin de palier à ce manque flagrant.

**Boucheffa(2011)** a travaillé sur l'espèce *Aspergillus flavus* en retenant toutes les souches qui ont donné une zone d'inhibition supérieure à 11 mm, et qui ont pu inhiber toutes les souches.

### **IV.5 production et Extraction des métabolites secondaire**

Afin de pouvoir comparer le rendement et l'efficacité des métabolites secondaires obtenus, les deux types de fermentation sont utilisés (sur milieu solide et en milieu liquide).

#### **IV.5.1 Recherche de l'activité en milieu solide**

La recherche de l'activité antifongique par la technique des stries croisées est réalisée sur l'ensemble des souches citées.

##### **IV.5.1.1 Technique de la double couche**

L'activité antifongique des souches d'actinomycètes est aussi évaluée par la technique de la double couche.

#### **IV.5.2 Production des molécules bioactives en milieu liquide**

Les 14souches qui nous ont donné une activité antifongique sont utilisées pour préparer une suspension dense qui servira d'inoculum dans trois milieux de cultures différents ISP2, Gym, Bennet, afin de déterminer le milieu qui donne la meilleure production.

Par le placement des disques, et le calcul de diamètre des zone d'inhibition sur les champignons et candida albicans.

**Benouagueni S (2015)** trouve que la technique des stries croisées a donnée des diamètres d'inhibition plus importants par rapport à celle de la double couche. Cette technique est souvent employée comme premier screening de l'activité antimicrobienne (**Baskran et al. 2011 ; Okudoh et Wallis, 2007 ;Parthasarathi et al., 2010 ; Ravikumar et al., 2010 ; Valan Arasu et al., 2012**),c'est une technique simple qui permet de tester l'activité d'une souche d'actinomycète sur plusieurs microorganismes et sur la même boîte de pétri, cependant l'ensemencement des souches tests qui se fait par strie sur milieu ISP2 qui n'est pas sélectif a tous les microorganismes diminue la reproductibilité des résultats (**Walstad et al., 1974**) ; par ailleurs, la technique de la double couche est mieux adaptée pour les levures et moisissures(**Gandhimathi et al., 2008 Ouhdouch et al., 2001 ; Spadari et al., 2013 ; Zheng et al., 200**), elle permet une meilleure diffusion des champignons ensemences en masse dans le gélose molle, des résultats plus fiables, et une meilleure reproductibilité des résultats puisque la densité de l'inoculum est préalablement connue et ainsi une meilleure comparaison entre les résultats est possible (**Bastide et al., 1986 ;**

**Savioli et al., 2006 ; Walstad et al., 1974**), cependant l'étude de l'activité antifongique doit passer par la mesure de la concentration minimal inhibitrice pour pouvoir déterminer le réel potentiel antimicrobien de la molécule pure une fois extraite (**Gan- Jun et al., 2012 ; Kumar et Kannara, 2010 ; Valanarasu et al.**).

En effet la production d'antimicrobiens à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide. Il existe même des microorganismes producteurs d'antimicrobiens sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide (**Shomura et al., 1979**).

#### **IV.6. Détection des antifongiques non polyéniques par Spectroscopie UV- visible**

(**Tighidet S., 2011**) Vu que le butanol est un solvant qui extrait les polyènes, vous avez réalisé Analyse spectrale afin de savoir si ces composés sont présents dans les phases Butanoliques brutes des souches testées. Les extraits butanoliques sont vaporisés puis solubilisés dans du méthanol puis analysés par un spectrophotomètre UV, précédemment étalonnés avec du méthanol.

Le spectre UV-visible est déterminé entre à sec (190 - 500 nm) sur les extraits butanoliques bruts, afin de noter la présence ou l'absence de composés polyéniques les quels présentent 3pics caractéristiques à chaque type de polyènes. A titre d'exemple, les Triènes : le premier pic apparaît à une longueur d'onde de 283 nm, le second à 272 nm et le troisième à 262 nm (**lamari, 2006 et Boudjella, 2007**).

(**Tighidet S., 2011**) présenté quelque quelques spectres UV-visible des phases butanoliques brutes des deux souches testées, obtenus lors de la réalisation de ce test. A partir des spectres UV-visible, il constate que, seuls les extraits butanoliques des souches, ne contiennent pas des pics caractéristiques des antifongiques polyéniques. La première souche présente un pic à 275 nm et la deuxième souche, le présente à 215nm. De ce fait, ces deux souches feront l'objet de vos études concernant la nature des substances produites.

(**Lamari, 2006**) des souches présélectionnées sur les germes testés est réalisée par spectrophotométrie UV-visible à des valeurs se situant entre 210nm et 400nm (**Thakur et al., 2007**). Aucun extrait n'a montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes.

#### **IV.7. Etude des antifongiques non polyéniques produits**

(**Tighidet S., 2011**) réalisé les cultures liquides pour deux souches produisant des antifongiques.

### IV.7.1 Détermination du meilleur solvant d'extraction

(Tighidet S., 2011) vu que Les filtrats des cultures ont été extraits par cinq solvants d'extraction de polarité différente. L'activité de chaque extrait est testée par antibiographie sur les six germes cibles.

Selon **Franco et Countinho (1991)** cité par **Augustine et al.,(2005)**,la plupart des antifongiques connus à ce jour, sont surtout extraits par l'acétate d'éthyle. Du même point de vue, **Remya et Vijayakumar, (2008)** cité par **Oskay, (2011)** rapportent que l'acétate d'éthyle est le meilleur extracteur des molécules antibactériennes et antifongiques de la souche *Streptomyces* RM42. **Ahmed (2007)** cité par **Hozzein et al.,(2011)**,rapporte aussi que l'activité antimicrobienne de *Streptomyces violachromogenes* est mieux extraite avec ce même solvant .Il est à signaler aussi que de nombreux travaux ont confirmé l'efficacité du butanol par rapport aux autres solvants, entre autres, celui réalisé par **Boudjella et al.,(2006)** sur le genre *Streptosporangium* qui indique, clairement, que le solvant le plus approprié pour l'extraction des substances actives était *len*-butanol. **Zitouni et al.,(2005)**, ont aussi obtenu des taux d'extraction importants avec *len*-butanol et le dichlorométhane sur le genre *Saccharothrix*.

Par contre, pour le genre *Nocardiopsis*, le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle étaient les plus efficaces.

### IV.8 Antifongigramme des souches

Les résultats de l'Antifongigramme de **Benouagueni 2015** des souches *C. albicans* de l'hôpital a permis de démontrer la forte résistance au 5-fluorocytosine de la souche *C.albicans* (autrement dit tous les puits ont donné une couleur pourpre), l'apparition des espèces émergentes des souches de *candida* résistances au 5-fluorocytosine a depuis longtemps été rapportée(**Barchiesi et al., 2000 ; Estrella et al., 2001**), et les mécanismes moléculaires impliqués dans ce type de résistance sont également connus (**Peman et al., 2009 ; Cowen et al., 2010**), aussi il semble exister une relation entre ce type de résistance et la sensibilité réduite aux azolés pour les isolats cliniques de *C. albicans* (**Noel et al., 2003**).

D'autres études ont été faites sur la résistance à l'Amphotéricine B. Ainsi (**Sud et Feingold, 1983**) ont trouvé que des souches de *Candida albicans* qui, lorsqu'elles sont mises en culture en présence du Ketoconazole, développent une résistance à l'Amphotéricine B. De plus, (**Conly et al., 1992**) ont montré que, bien que le développement de la résistance chez *Candida albicans* à l'Amphotéricine B est considérée

comme rare, *C. albicans* a été constamment récupérés à partir d'un homme de 28 ans, après une thérapie antimicrobienne de large-spectre pour un abcès pancréatique.



# Conclusion Général

## Conclusion Général

---

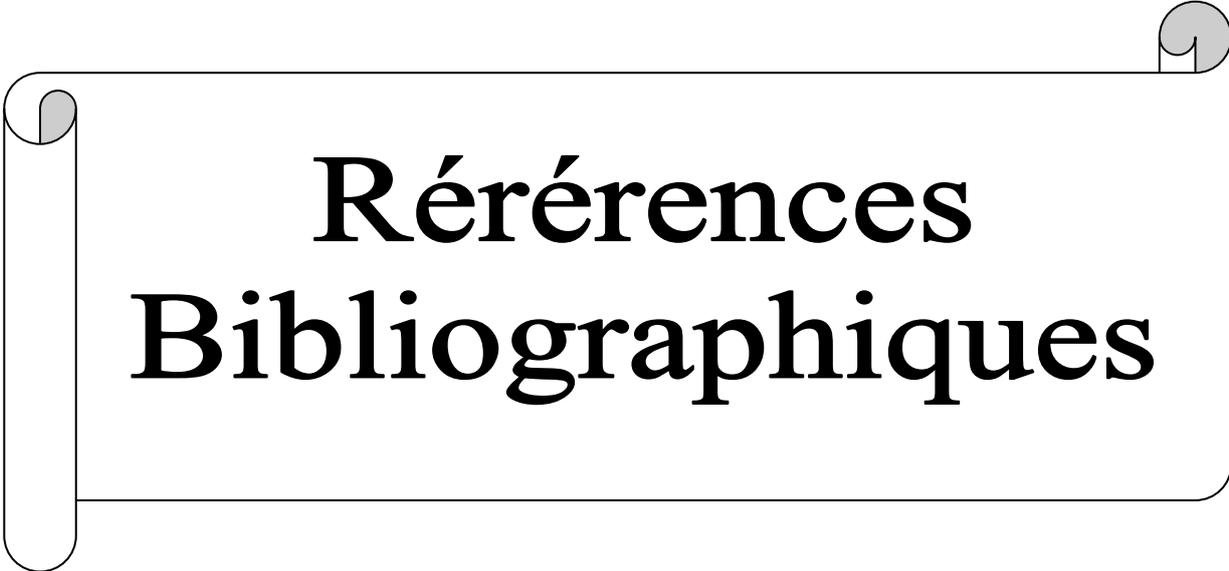
Dans ce présent travail, qui entre dans le cadre de l'axe de recherche de métabolites secondaires biologiquement actifs, l'objectif de ce travail était de faire un criblage des actinomycètes qui ont un pouvoir antagoniste contre des isolats de microorganismes pathogènes (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Endosporium sp.* et *Phytophthora infestant*).

Six écosystèmes naturels divers situés dans des zones géographiques différentes de l'Algérie sont choisis pour réaliser l'isolement. Trois milieux de cultures (GYM, Bennet et ISP2) sont utilisés pour réaliser l'isolement afin d'avoir une grande diversité des souches. Au total 20 isolats actinomycétales sont obtenus à partir de six sites de prélèvement différents. Les bactéries isolées ont subi par la suite une purification et une identification macro et micro morphologique pour confirmer leur appartenance au groupes des actinomycètes.

Les souches isolées sont testées par la méthode du cylindre d'agar sur milieu solide afin de mettre en évidence leurs capacités à produire des métabolites antifongiques. Parmi ces 20 souches isolées 14 souches ont montré une activité vis-à-vis des cinq germes cibles utilisés.

13 isolats sur les 14 testés (soit 93%) ont montré une activité contre au moins une souche fongique indicatrice. Une souche codée E4 a inhibé la croissance de 4 champignons sur les 5 testés y compris *Candida albicans* et une codée B1 a montré une activité chez 3 souches fongiques sur 5. Ces deux isolats peuvent être des bons candidats pour des travaux de production et purification des agents bioactifs.

L'intérêt de ces métabolites dans le domaine médical et la santé publique nécessite leur étude d'une manière plus approfondie en procédant à une extraction purification et caractérisation de la molécule antifongique en utilisant les techniques les plus performantes (HPLC, GC-SM, RMN,IR). La souche productrice d'une ou plusieurs molécules intéressantes doit aussi avoir une identification moléculaire arrivant jusqu'à la comparaison avec les bases de données mondiales (NCBI).



**Références  
Bibliographiques**

## Référence Bibliographique

---

- Alangaden G. (2011).** Nosocomial fungal Infections : Epidemiology, Infection control, and prevention. *Infect dis clin N Am.*2011 ; 25 :201-225.doi :10.1016/j.idc.2010.11.003.
- Amine, R., Dupuis, A., Aaron, S. D.and. Ratjen, F. (2010).** The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* 137, 171-176.
- Augustine S.K., Bhavsar S.P. and Kapadnis B.P., (2005).** A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.* **30(2)**, 201–211.
- Baddley, J. W. (2010).** Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Med Mycol* 49 supp11, s7-s12.
- Badji B., (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou p226.
- Balashov, S, S. park, and D. S. Perlin.(2006).** Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin candida albicans by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob. Agents chemother.* ; 2058-2063.
- Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget and G. Duménil., (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique *mircen J. 2* : 453-466.
- Basilio A, justice M, Harris G, Bills G, Collado J, de la cruz M, Diez M.T, Hernandez P, Liberator P, Nielsen Kahn J, Pelaez F, Platas G, Schmatz D, Shastry M, Tormo JR, Andersen GR, and Vicente F.( 2006)** The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestazzioides*. *Bioorg Med Chem.* ; 14(2) :560-566.
- Belkherroubi.L. (2009).** Biologie cellulaire et Moléculaire : Effet de l'état physique des antifongiques polyéniques sur leur activité cellulaire : exemple de l'amphotéricine B. Thèse de doctotrat. Université aboubekr belkaid tlemcen.pp132.
- Ben-Ami R, Lewis R.E, and Konotoyiannis D.P. (2008).** Immunopharmacology of Modern Antifungals. *Clinical infecttious Diseases*;47 :226-35.doi : 10.1086/589290.
- Brand, A. (2012).** Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *Int J Microbiol* , 517-529.
- Caillot, D., couaillier, J. F., Bernard, And.Other authors (2001).** Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J clin Oncol* 19, 253-259.

## Référence Bibliographique

---

- Camille S-P , (2013).**les antifongiques azoles : utiles et efficaces non denues de danger.adaptation de la thérapie antifongique chez une patiente atteinte d'histoplasmosse, diplôme d'état de docteur en pharmacie .université Toulouse paul sabatier.
- Cappuccino J G and Sherman N. (1999).** Microbiology-A laboratory manuel Harlow :Benjamin 263-264.
- Carle S. (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel. 36 (1), 25-41.*
- Chai, L. Y., Netea, M. G., Sugui, J., Vonk, A. G., van de sande, W. W., Warris, A., Kwon-Chung, K. J. and Kullberg , B. J. (2010).** *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology* 215,915-920.
- Chapman, S.W., and Cleary, J.D. (2011).** Amphotericine B. In *Essentials in clinical Mycology*.pp.41-55.Edited by C.A. Kauffman, P.G. Pappas. J.D. Sobel,W.E Dismukes.
- Chen, S. C., Salvin, M. A. and Sorrell, T. C. (2011).** Echinocandin antifungal drugs in fungal infections : a comparison. *Drugs* 71, 11-41.
- Darty A, and Bart-Delabesse E. (2006).** La caspofungine : du mécanisme d'action aux application revue de médecine interne. ; 25(1) :32-39.
- De Vrankrijker, A. M, van der Ent, C. k., van Berkhout, F. T., Stellato, R. K., Willems, R. J., Bonten, M.J. and Wolfs, T. F. (2011).** *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis : implication for lung function. *Clin microbiol infect* 17, 1381-1386.
- Drouhet E. (1978).** Antifugul agents. *Antibiot. Chemother., 25: 253-288.*
- Ellis D. Amphotericin B : Spectrum and resistance. *Journal pf antimicrobial chemotherapy.* 2002 ; 49(1) : 7-10.
- Espinel-Ingroff A. (2008).** Mecanisms of resistance to antifungal agents : yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam micol. ; 25 : 101-106.*
- Euzéby j. (2008).** Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Tec Lovoisier édition. ISBN-13 :978-2743010447.
- Feng C, Ling H, Du D, Zhang J, Niu G, and Tan H. (2014).** Novel nikkomycin analogues generated by mutasynthesis in *streptomyces anosochromogens*. *Microb Cell Fact.* ;13(59) :1-10.doi :10.1186/1475-2859-13-59.
- Ferwerda, B., Ferwerda, G., Plantinga, T. S. and other autors (2009).** Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl med* 361, 1760-1767.
- Fournier P, Schwebel C, Maubon D, Vesin A, Lebeau B , Foroni L, Hamifar-Roy R, Cornet M, Timsit JF, and pelloux H. (2011).**Antifungal use influences candida species

## Référence Bibliographique

---

distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 66(12) :2886-2886. Doi : 10.1093/jac/dkr394

**Gesheva. V ; Ivanova. V ; and Gecheva. R. (2005).** Effects of nutrients on the production of AK- 111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological Research*, 160, 243-248.

**Granier F.( 2003):** Antifongiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. *Antibiotique*, ; 5 : 39-48.

**Hanadate T, Tomishima M, Shiraishi N, Tanabe D, Morikawa H, Barrett D, Matsumoto S, Ohtomo K, and Maki K. (2009)** FR290581, a novel sordarin derivative : synthesis and antifungal activity. *Bioorg Med Chem Lett*; 19(5) :1465-1468. doi : 10.2016/j.bmcl.2009.01.051.

**Hincky-Vitrat V. (2011).** Les antifongiques systémiques. Clinique maladies infectieuses - CHU Grenoble,

**Hulin A, Deguillaume A.M, Bretagne S, Bezie Y.( 2005).** bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives. *J pharm clin.*;24(3) 125-38.

**Kahn J.N, Garcia-Effron G, Hsu M.J, park S, Marr K.A, and Perlin D. S. (2007).** Acquired echinocandin resistance in *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother.* ; 1(5) : 1876-1878.

**Kanafani Z.A, and Perfect J.R. (2008).** Resistance to Antifungal Agents : Mechanisms and clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases.* ; 46 : 120-128.

**Kitouni, M. (2005).** Identification d'une Actinomycétales, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides des régions de Biskra. *Sciences & Technologie.*

**Kousha, M., Tadi, R. and Soubani, A. O. (2011).** Pulmonary aspergillosis : a clinical review. *Eur Respir Rev* 20, 156-174.

**Lucy Xie J, Polvi EJ, Shekhar-Guturja T , and Cowen L.E. (2014).** Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiol*; 9(4) : 523-542.

**Martin C. (2008).** Urgen, ces et infection Guide du bon usage des antibiotique. Antifongiques, antiviraux, antiseptiques.. Wolter Kluwer, France, Arnette Ed. ISBN-978-2-7184-1181-1.

**Martin J.F. and Demain A. L. (1980).** - control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 44, 230-261.

**Mellouli L, Ben Ameer- Mehdi R, Sioud S, Salem M, and Bejar S.( 2003).** Isolation, purification and partial characterisation of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces sp.* US24 strain. *Research in Microbiology.* ; 154 : 345-352.

## Référence Bibliographique

---

- Meyer A, Dejana J., and Bernard A. (2004).**Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Doin Ed. France.. ISBN 2-7040-1170-2.
- Mouley S, and Sellier P. (2012).**Monitoring thérapeutique des anti-infectieux : des exigences réglementaires au bon usage du médicament. Springer-Verlag Paris. P98-92. ISBN-2-287-406840.
- Noel T,(2012 ).**The cellular and molecular defense mechanisms of the candida yeast against azol antifungal drug J Mycol Med ; 22(2) :173-178. Doi : 10.1016/j.mycmed..04.004.
- Ostrosky-zeichner Luis,arturo casadevall,john N.Galgiani, Frank C.Odds and John H.Rex. (2010).** An insight into the antifungal pipeline : selected new molecules and beyond.nature Reviews Drug Discovery.Overview of treatment options for invasive fungal infection .Med Mycol 49,561-580.
- Pappas,P.G.(2011).**Terbinafine. in Essential of clinical mycology pp.113-119. Edited by C.A. Kauffman ; p.G. Pappas, J.D. Sobel. W. E. Dismukes : Springer.
- Park S, Kelly R, Kahn J.N, Robles J, Hsu M, Register E, Li W, Vyas V, Fan H, Abruzzo G, Flattery A, Gill C, Chrebet G, Parent S. A , Kurtz M, Teppler H, Douglas C.M,and perlin D.S. (2005).**Specific substitutions in the echinocandin target FKS1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *candida sp* .isolated .; 49 : 3264-3273.
- Peman J, Canton E, and Espinel- ingroff A. (2009).** Antifungal drug resistance mechanisms.Expert Rev Anti Infect Ther. ; 7(4) : 453-460. Doi : 10.1586/eri.09.18.
- Pfaller,M.A., Espinel-Ingroff,A., Canton, E. and others (2012).** Wild-Type MIC Distribution and Epidemiological cutoff values for Amphotericin B, Flucytocine, and Itraconazole and *candida spp.*as Determined by CLSI Broth Microdilution 2012 mar 29. [Epub ahead of print].
- Pham H.T, Nguyen N.P, Phi T.Q, and Dang P.T,( 2014)** Le H.G.The Antibacterial and Anticancer activity of marine Actinomycete Strain HP411 Isolated in the northern coast of Vietnam. Int J Med Health Biomed and Pharm Engineering. ; 8(12) : 793-797.
- Pihet, M., Crrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F. and Bouchara, J. P. (2009).** Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretion of patients with cystic fibrosis—a review. *Med Mycol* 47, 387-397.
- Polak, A. (1992).**Preclinical data and mode of action of amorolfine. *Dermatology* 184 suppl1,3-7.
- Pound,M. W., Townsend, M.L., Dimondi, V., Wilsou, Drew, R. H. (2011).** Overview of treatment options for invasive fungal infection .Med Mycol 49,561-580.

## Référence Bibliographique

---

- Pourriat J.L and Martin C. (2005).**Principe de réanimation chirurgicale.2eme édition Arnette, France..ISBN 2-7184-1074-4.
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J and other authors (2011).** Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin- 17 immunity. *Science* 332, 65-68.
- Rautemaa R.,Richardson M.,Michael A.,faller P., Perheentupa J., saxen and saxen H.(2008).** Activity of Amphotericin B, Anidulafungine, Caspofungin, Micafungin, Posaconazole and Voriconazole against *Candida albicans*. *Diagnostic*.
- Ripert C. (2013).***Mycologie médicale*..Tec et Toc Lavoisier édition. ISBN-13 :978-2743014889.
- Sandovsky-Losica H, Shwartzman R, Lahat Y, and Segal E.(2008).** Antifungal activity against *candida albicans* of nikkomycin Z in combination with caspofungin, voriconazole or amphotericin B. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. ;letters.635-537.doi :10.1093/jac/dkn216.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, and Fadda G.(2005) ,** Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents chemother* .; 49(2) :668-679.
- Shapiro R.S, Zaas A.K, Betancourt-Quiroz M, and Perfect J.R, (2012).**Cowen L.E. The Hsp90 co-chaperonr sgt1 governs candida albicans morphogenesis and drug resistance.Plos one. ;7(9) : e44734.doi : 10.1371/journal.pone.0044734.
- Sheikh N, Jahagirdar V, kothadia S, and Nogoba B,( 2013 ).**Antifungal Drug Resistance in *candida species* . *Eur J Gen Med*. ; 10(4) : 254-258.
- Smaoui.S (2010).** Génie de Procédés et Environnement : Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.pp182.
- Spampinato C, and Leonardi D. (2013).** *candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms : traditional and alternative antifungal agents. *Biomed res Int*. 2013 ; :1-13.doi : 10.1155/2013/204237.
- Staneck. J.L; and. Roberts. G.D. (1974).** Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Environ. Microbiol*, 28 (2), 226-231.
- Tobudic S, Kratzer C, and Presterl E. (2012).** Azole-resistant *candida spp*- emerging pathogens. *Mycoses*.; 55(1) : 24-32.

## Référence Bibliographique

---

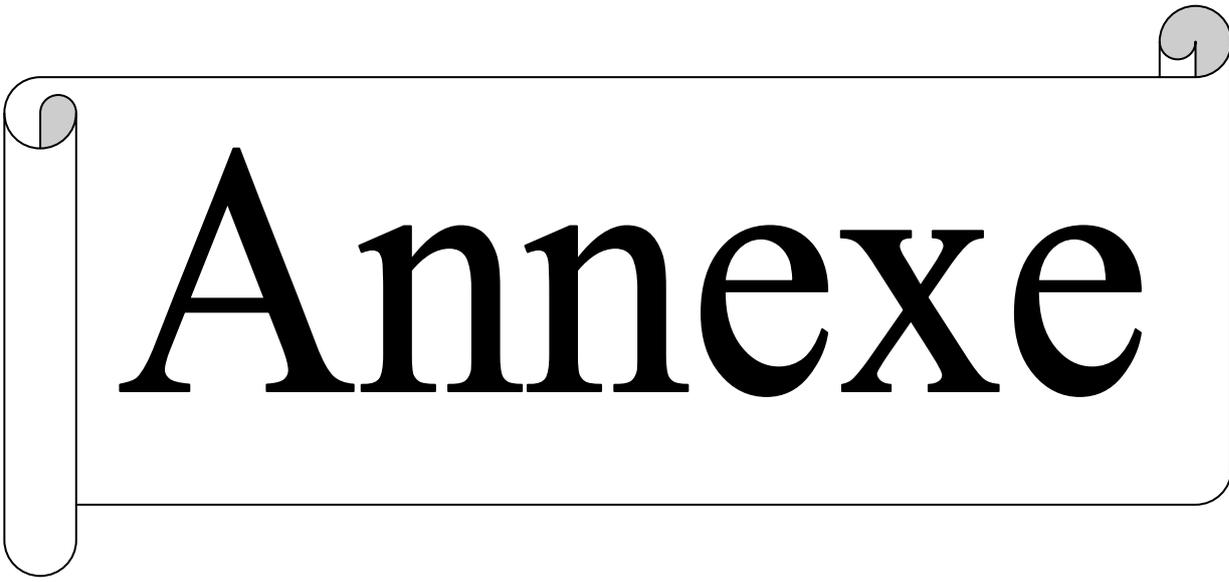
**Van de veerdonk, F. L., Plantinga, T. S., Hoischen, A. and other authors (2011).** STAT1 mutation in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 365, 54-61.

**Vandeputte, P.,Ferrari, S. and Coste , A.T. (2012).** Antifungal resistance and strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol* 2012, 713687. Epub 2011 dec 1.

**Vandeputte. V. (2008).** Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France).pp 168.

**Vazquez, J. A. and Sobel, J. D. (2011).** Candidiasis . in essentials of clinical mycology, pp 167-206. Edited by C .A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel . W. E. Dismukes : Springer.

**Williams S.T. and Fleming I., (1989).** Spectroscopic methods in organic chemistry. 4th Ed. : Mc Graw Hill book company, London, p 264.

A decorative scroll graphic with the word "Annexe" written on it. The scroll is white with a black outline and features three rolled-up ends: one on the left side and two on the top right corner. The word "Annexe" is written in a large, bold, black serif font across the center of the scroll.

**Annexe**

## Annexe

### Milieux de culture

#### Milieu Bennett

Extrait de levure.....	1g
Extrait de viande de bœuf.....	1g
Peptone pancréatique de caséine.....	2g
Glucose.....	10g
Agar .....	15g
Eau distillée.....	1000m

#### Milieu Gym

Glucose.....	4g
Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	4g
CaCo3 .....	2g
Agar.....	12g

#### Milieu ISP2

Extrait de levure .....	4g
Extrait de malt .....	10g
Glucose.....	4g
H2O distillée .....	1000ml