



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ « DR. MOULAY TAHAR » DE

SAÏDA

FACULTE DES SCIENCES

LABORATOIRES DE BIOTOXICOLOGIE, PHARMACOGNOSIE ET VALORISATION
BIOLOGIQUE DES PLANTES

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Mr : Cheikh bouye Mohamed

Mr : Ebibecrine Ahmed

--- ○○○○ ---

Sur le thème

**Activité antifongique des métabolites secondaires produits par des
actinomycètes isolés du sol de la zone aride**

--- ○○○○ ---

Soutenus publiquement devant le jury composé de :

Mme .Alioui L.	M.A.A. Université de Saïda	Président
Mr. Benreguiég M.	M.C.B. Université de Saïda	Promoteur
Mme. Ghouti D.	M. A.A. Université de Saïda	Examineur

Année universitaire 2015/ 2016

REMERCIEMENT

Avant toute chose, nous tenons à remercier « Allah » de nous donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre Encadreur **Dr. Mokhtar Benreguieg** (M.C.B à l'université de Dr .Moulay Tahar Saida), qui, par ses encouragements et ses fructueux conseils, nous a apporté une aide précieuse dans la réalisation de ce travail malgré ces nombreuses obligations. Nous somme très honorée d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos compétences tout au long de ces années.*

*Nous avons également l'honneur de témoigner nos gratitudeux membres de jury. A Madame **Alioui Latifa** (M.A.A Université de Dr .Moulay Tahar Saida) qui a accepté de présider ce jury, qu'elle trouve ici l'expression de nos profondes reconnaissances.*

*A Madame **Ghouti Dalila** (M.A.A Université de Dr .Moulay Tahar de saïda). Nous somme très honorée de bénéficier de vos remarques éclairées et nous tenons à vous assurer de nos grande estime et profonde gratitude.*

Nos sincères remerciements vont aussi à Mr.Gacemi, Mr.Adli, Mr Ziani K, Mr.Halla N, Mr.Ammam, Mr.Lasri.B, Mr.Louth, Mme.Amara, Mme.fares et a tous les professeurs de l'université Dr Moulay Tahar a saïda et particulièrement au professeurs de département de biologie qui nous ont enseigné durent ce cursus

Un grand merci à tous les membres du laboratoire de « de nouvelle cite 2000» de l'université de Dr Moulay Tahar a saïda

Nous voudrons exprimer nos reconnaissances envers les amis :(Itt Halima, Med Ali, Abdou, Dah, Bouha, Abdoullah, Ely, Ahmed, T.shirine, C.abdelkader, Abdeljalil) et collègues qui nous a apporté leur support moral et intellectuel tout au long de notre démarche.

Que nos remerciements aillent aussi à nos chers papa, maman, nos frères et sœurs pour ses encouragements et ses prières, et toute personne ayant participé de près ou de loin dans les résultats présentés dans cette thèse.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma très cher Mère qui me doit toutes mes réussites

A mon cher papa qui m'a toujours aidé et guide vers le chemin de la réussite.

A mes chers frères et sœurs pour leur encouragement et confiance en moi.

A toute ma famille.

A tous mes amis, mes collègues et a toute personne qui a participe de loin ou de proche dans la réalisation de ce travail.

Quoique que je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi.

Si je suis arrivé là, C'est grâce à vous. Que dieu vous bénisse, vous donne une long vie, et vous protège pour moi.

Cheikh bouye Mohamed

Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu terminer ce travail que je dédie :

A ma Maman, qui était à chaque instant au près de moi, en donnant l'amour pour réussir.

A mon père, qui m'a toujours aidé à surmonter les obstacles.

A la mémoire de mon cher ami Saddam Ould Abdel Kader, qui a laissé, après son décès, un vide irremplaçable. Repose en paix mon ami.

A toutes les membres de ma famille.

A mon enseignant durant les années de l'éducation primaire, Mr. Babeye Ould Elwali

A mes chers : Ment cheikhna ment Sidi ; Elemine ould Elemine ; Bih ould Hibeyne ; mohameden ould kedad ; Mahaya ould Med val ; Cheikh daddah ould Abbah ; Beye ould Alhachemi ; Brahim ould Edyeija ; Hami ould Alhachemi ; Beye ould lekheyle ; Mouhemedhen ould Adda et Veyah ould Hayballa, qui m'ont aidé pendant toutes ces cinq années.

A ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Ahmed

Résumé

Les actinomycètes sont considérés comme productrices des substances bioactives ayant une activité antimicrobienne importante. Ils sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures.

Nous nous sommes intéressés par la recherche de l'activité antifongique chez 30 souches d'actinomycètes de la zone aride d'Elbayedh. En effet 4 souches sont isolées plus 26 souches qui ont été conservées sont revivifiées.

L'ensemencement des actinomycètes sur 4 milieux de culture (GLM, AF, Bennett et ISP2)(voir annexe) a montré que L'ISP2 est le milieu le plus favorable pour la croissance des actinomycètes.

L'activité antifongique a été testée contre 6 champignons (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus stolonifère*, *Fusarium oxysporum*) et deux souches de *Candida albicans* en utilisant la technique de cylindre d'agar. Les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner deux souches d'actinomycètes codées A6 et A7 qui ont une activité antifongique contre 6 parmi les 8 souches cibles.

Ces souches ont été cultivées par fermentation sur milieu solide AF afin de produire des extraits riches en métabolites secondaires. L'extrait méthanolique était actif contre les 6 souches fongiques testées y compris *Candida albicans*. La détermination de la CMF nous a permis de constater que nos substances ont un effet antifongique efficace à des faibles doses de l'ordre de 2mg/ml.

Le test de dégradation de l'ergostérol a montré que la souche A6 produit une substance antifongique capable d'altérer les stérols membranaires, par contre, la souche A7 n'a donné aucun effet néfaste. Également, ce test nous a permis de dire que les molécules produites par la souche A6 sont probablement de nature polyénique.

Les Mots clés: Actinomycètes; Substances bioactive, activité antifongique, CMF, production des métabolites secondaire.

Abstract

Actinomyces are considered as producers of bioactive substances with antimicrobial activity. They are widely distributed in nature and mainly in soils of different natures.

We are interested by the research of antifungal activity in 30 strains of Actinomyces in the arid area of Elbayedh. This indeed 4 strains are isolated more than 26 strains that have been preserved are reviving.

The seeding of Actinomyces on 4 media (GLM, AF, Bennett and ISP2). showed that the ISP2 is the most favourable environment for the growth of actinomyces.

Antifungal activity was tested against 8 fungi: (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium*, *Alternaria. Alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*) and two strains of *Candida albicans*.

The results obtained allowed us to select two actinomyces strains coded A6 and A7 which have antifungal activity against 6 amongst the 8 target strains.

These strains were grown by fermentation on solid medium AF to produce extracts rich in secondary metabolites. The methanol extract was active against 6 fungal strains tested including *Candida albicans*. The determination of the CMF allowed us to see that our substances have an effective antifungal effect at low doses in the range of 2 mg/ml.

The test of degradation of ergosterol showed that strain A6 produces an antifungal substance capable of altering the membrane sterols; however, strain A7 gave no harmful effect. This test has directed us also.

Key words: Actinomyces; antifungal activity, CMF, bioactive secondary metabolites production.

ملخص

الأكتينوميسات هي بكتيريا مسؤولة عن انتاج معظم الجزيئات البيولوجية النشطة ضد الميكروبات الضارة. هذه متواجدة بشكل مكثف في الطبيعة، وخصوصا في الأنواع المختلفة للتربة. في هذا العمل نحن مهتمون بالبحث عن نشاط مضاد للفطريات في 30 أكتينوميسات مستخرجة من المناطق الجافة لولاية البيض. من أجل البدء في هذا العمل، قمنا بعزل 4 أكتينوميسات و إعادة تنشيط 26 اكتينوميسات كانت محفوظة في المخبر البيداغوجي.

العزل على 4 أوساط انتقائية مختلفة AF،ISP2، Bennet ، GLM ، بين أن الوسط ISP2 هو الأفضل من حيث نمو الأكتينوميسات.

لاختبار النشاط المضاد للفطريات، استخدمنا 6 فطريات مجهرية : (*Aspergillus* ، *Aspergillus flavus* ND7) ، *Rhizopus stolonifère* CDAC2 ، *Alternaria* VDRB2 ، *Cladosporium* VD2B8 ، *niger* CBRb6 ، *Fusarium oxysporum* CDRD9 (*Candida albicans*) و خميرتين (ATCC 26790 et ATCC 10231)

النتائج بينت أن الأكتينوميسات A6 و الأكتينوميسات A7 نشطوا بشكل جيد ضد الفطريات، ولذلك قمنا باستخلاص المركبات الثانوية لهذه الأكتينوميسات بفعل الميثانول بعد أن تم تخميرها 14 يوم في وسط انتقائي صلب AF ووسط انتقائي سائل AF .

المركبات الثانوية أظهرت نشاط مضاد للفطريات وكذلك ضد نوعين من *Candida albicans* ، كما حددنا CMF الذي يسمح لنا بالقول إن كانت المركبات الثانوية نشطة بجرعات منخفضة أم لا.

اختبار تحليل الإرجوستيرون بين أن المركبات الثانوية للأكتينوميسات ، على عكس الأكتينوميسات ، يؤثر على مكونات في غلاف الخلية (Stérols membranaires)

الكلمات المفتاحية : الأكتينوميسات، الجزيئات البيولوجية النشطة، نشاط مضاد للفطريات، المركبات الثانوية، CMF ، الإرجوستيرون.

liste des abréviations

% : Pourcentage.

°C : Degré.

A.niger : *Aspergillus niger*.

A.flavus : *Aspergillus flavus*.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AF: Actinomycète fermentation

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: Adénine three phosphates

BN : Bouillon Nutritif

CaCO₃ : Carbonate de calcium

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CMF : Concentration minimale fongicide.

C.albicans : *Candida albicans*.

I(%) : pourcentage de fongitoxicité.

g : Gramme.

G/C : Guanine et cytosine.

G: Grossissement.

G: Grossissement.

GLM : Glucose-Extrait de levure-Malt.

GN : Gélose Nutritif.

Gram - : Gram négative.

Gram+: Gram positive.

h : heure.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂S : Sulfure d'hydrogène

ISP2 : International Streptomyces Project.

MA: Mycélium aérien,

min : minute.

ml : Millilitre.

MS : Mycélium de substrat

NaCl : Chlorure de sodium.

nm : Nanomètre.

O₂: Oxygène.

P/V: Poids sur volume

PCB : chlorobiphényles.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PDA : Potato dextrose d'agar

R.stolonifère : *Rhizopus stolonifer*

S/C : sous-classe

S/cl : Sous classe.

S/O : Sous ordre.

S/O : sous-ordre

S: Seconde.

TSE : Tryptone, sel, eau.

UFC : unité formant colonie.

V : Volume.

V/V: Volume sur volume

µg : Microgramme.

µl : Microlitre.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.....	7
Tableau 2 : Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes.....	8
Tableau 3: Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983).....	13
Tableau 4 : les souches de moisissures testées.....	43
Tableau 5 : souches de levure testées.....	44
Tableau 6 : représente la Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince.....	50
Tableau 7: Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives.....	53
Tableau 8 : résultats du choix de milieu de culture favorable.....	56
Tableau 9 : pouvoir antifongique des actinomycètes obtenus par la technique de cylindre d'agar.....	59
Tableau 10: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A7.....	63
Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A6.....	64
Les tableaux (12 à 15) : développement mycélien des quatre souches fongique testes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait.....	56
Tableau 16 : résultats de l'effet antifongique en présence d9e l'ergostérol.....	67
Tableau 17: résultat de la chromatographie sur couche mince	69

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'une molécule ménaquinones.....	9
Figure 2 : Structure chimique de l'acide mycolique (Zitouni, 2005).....	9
Figure 3 : Griséofulvine (®Laboratoire Sanofi Winthrop).....	19
Figure 4 : Mycostatine ®Laboratoire Bristol Myers Squibb.....	20
Figure 5 : Fungizone ®Laboratoire Bristol-Myers-Squibb.....	21
Figure 6 : Sporiline ®Laboratoire Schering-Plough.....	22
Figure 7 : Ancotil ®Laboratoire Roche.....	23
Figure 8 a : structure de miconazole ®Laboratoire Pfizer.....	24
Figure 8 b : structure de fluconazole ®Laboratoire Pfizer.....	24
Figure 8 c : structure de Itraconazole.....	25
Figure 9 : Clotrimazole laboratoire Roger Bellon.....	25
Figure 10 : Voriconazole (Vfend®).....	25
Figure 11 : Naftifine.....	26
Figure 12 : Lamisil ®Laboratoire Novartis Pharma.....	26
Figure 13 : Locéryl ®Laboratoire Roche.....	27
Figure 14 : Schéma explicatif de la méthode d'extraction des métabolites.....	46
Figure 15 : Aspect macroscopique des souches actinomycétales isolées.....	52
Figure 16 : souches actinomycétales conservées.....	53
Figure 17 : Aspect morphologique et caractères cultureux des souches A7 et A6.....	54
Figure 18 : observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram...55	
Figure 19 : aspect macroscopique de certaines souches fongiques cibles.....	57
Figure 20 : aspect microscopique des souches fongiques cible.....	58

Figure 21 : résultat de la technique de cylindre d'agar.....	59
Figure 22 :les étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide.....	60
Figure 23 : la fermentation liquide dans des Erlenmeyer.....	61
Figure 24 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche A7.....	62
Figure 25 : diamètres de développement mycélien sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait de la souche A6.....	64
Figure 26 : comparaison entre les zones d'inhibition des deux souches <i>C.albicans</i>	66
Figure 27 : activité de l'extrait A6 sur les souches de candida (techniques des puits).....	67
Figure 28 : les différents produits des extraits sous UV.....	68

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction générale 1

Chapitre I

I. Les Actinomycètes3

I.1 Taxonomie.....3

I.1.1 L'ordre des Actinomycétales.....3

I.1.2. Evolution des critères d'identification.....4

I.2. Critères actuels d'identification.....5

I.2.1. Critères morphologiques.....5

I.2.2. Critères chimio taxonomiques.....6

I.2.2.1. Les amino-acides.....6

I.2.2.2. Les sucre.....7

I.2.2.3. Les lipides.....8

I.2.3 Critères physiologiques et métabolisme des actinomycètes.....9

I.2.4 Critères moléculaires.....10

I.2.4.1 Détermination du (G+C %)......11

I.2.4.2 Séquençage de l'ADN ribosomique 16S.....11

I.2.4.3 Les hybridations ADN-ADN.....	11
I.3 .Ecologie et distribution dans la nature.....	12
I.4. Biologie des actinomycètes.....	13
I.4.1. Thermorésistante des spores.....	14
I.5 Importance des actinomycètes.....	15
I.5.1 Importance en agronomie.....	15
I.5.2 Importance en biotechnologie.....	16

Chapitre II

II. Les Antimicrobiens.....	17
II.1. Les antibiotiques.....	17
II.2 Les antifongiques.....	17
II.2.1. Historique	17
II.2.2 Principaux antifongiques utilisés en médecine humaine.....	17
II.2.2.1. Griséofulvine.....	19
II.2.2.2 Nystatine	20
II.2.2.3. Amphotéricine B.....	21
II.2.3. Autres agents polyènes antifongiques.....	21
II.2.4. Antifongiques de synthétiques.....	22
II.2.4.1. Le chlormidazole.....	22
II.2.4.2. Le tolnaftate.....	22
II.2.4.3. La flucytosine.....	23
II.2.4.4. Les imidazoles	24
II.2.5. Les antifongiques allylamines.....	25
II.2.6. Les antifongiques non classés.....	27
II.2.7. Nouveaux antifongiques d'origine naturelle.....	27
II.2.7.1. Echinocandines.....	28
II.2.7.2. Nikkomycines.....	28

II.2.7.3. Pradimicines.....	28
II.3 Technique de production et d'identification des antifongiques.....	29
II.3.1 Production de métabolites secondaires (antifongiques).....	29
II.3.1.1 Effet de la composition du milieu de culture.....	29
II.4. Extraction.....	29
II.5. Purification des antifongiques.....	30
II.5.1 Chromatographie préparative sur plaque épaisse de gel de silice.....	30
II.5.2 Chromatographies préparative sur colonne.....	31
II.5.3 Purification par HPLC.....	31
II.6. Identification des antibiotiques antifongiques.....	31
II.6.1 Spectroscopie en UV-visible.....	32
II.6.2 Spectroscopie dans l'infrarouge (IR).....	32
II.6.3 Spectrophotométrie de masse	32
II.6.4 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	32
III. Généralités sur les champignons	33
III.1 Les infections fongiques.....	35
III.1.1 Candidose.....	36
III.1.2 Les aspergilloses.....	37
III.1.3 Autres champignons filamenteux opportunistes.....	38

Matériel et Méthodes

Objectifs.....	39
IV.1 Isolement des actinomycètes	40
IV.1.1 Prélèvement des échantillons	40
IV.1.2 Enrichissement du sol	40
IV.1.3 Dilutions	40
IV.1.4 Isolement des actinomycètes	40

IV.1.5	Purification des souches isolées.....	41
IV.2	Revivification des souches.....	41
IV.3	Confirmation de l'identité des actinomycètes.....	41
IV.3.1	Caractérisation morphologique.....	41
IV.3.1.1	Macromorphologie et caractères cultureux.....	41
IV.3.1.2	Micromorphologie.....	42
IV.3.2	Cratérisation biochimique.....	42
IV.3.2.1	Recherches de la catalase	42
IV.4	Choix de milieu de culture.....	42
IV.5	Conservation des souches	43
IV.5.1.	conservation à court terme.....	43
IV.5.2.	conservation à long terme	43
IV.6	Purification et Confirmation de l'identité des souches ciblent.....	43
IV.6.1.	Les souches de moisissure.....	43
IV.6.2.	Les souches de levure.....	44
IV.6.3.	Purification.....	44
IV.6.2	Confirmation de l'identité des souches fongiques.....	44
IV.7	Préparation des suspensions fongiques.....	44
IV.8	Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycète	45
IV.9	Production du métabolite secondaire.....	45
IV.9.1	Fermentation sur milieu solide.....	45
IV.9.2	Fermentation en milieu liquide	45
IV.10	Extraction des métabolites	45
IV.10.1	Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide	45
IV.10.2	Extraction des métabolites de fermentation en milieu liquide.....	46
IV.11	Tests de l'activité antifongique des extraits.....	47
IV.12	Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique.....	48

IV.13. caractérisation préliminaire de l'agent antifongique par CCM.....	48
Résultats et interprétation	
V.1 Isolement et dénombrement des actinomycètes.....	51
V.2 Purification des isolats.....	52
V.3 Revivification et confirmation d'identité des actinomycètes actives.....	53
V.3.1 Caractérisation morphologique.....	53
V.3.1.1 Macromorphologie et caractères cultureux.....	53
V.3.1.2 Micromorphologie.....	54
V.3.1.2.1 Coloration de gram.....	55
V.3.2 Cratérisation biochimique.....	55
V.3.2.1. Recherches de catalase.....	55
V.4. Choix de milieu de culture.....	56
V.5 Purification et Confirmation de l'identité des souches fongiques cibles.....	57
V.6 Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycète.....	59
V.7 production et Extraction des métabolites secondaire.....	60
V.7.1 Fermentation sur milieu solide.....	60
V.7.2 Fermentation en milieu liquide.....	61
V.8 Tests de l'activité antifongique des extraits.....	62
V.8.1 Technique de contact directe ou de dilution.....	62
V.8.2. Teste de l'activité de l'extrait A6 contres candida albicans (technique des puits)..	66
V.9 Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique.....	67
V.10. résultats de la caractérisation partielle des métabolites par CCM.....	68
Discussion	70
Conclusion général	75
Annexe	77
Référence bibliographique	86

I. Les Actinomycètes

I.1 Taxonomie

I.1.1 L'ordre des Actinomycétales

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes et sont rattachés à l'ordre des Actinomycétales créée par **Buchanan en (1917)** Plusieurs réévaluations systématiques récentes de l'ordre reflètent l'intégration de données moléculaires notamment la séquence du gène ARNr 16s.

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, septes, ramifiées, prenant généralement le Gram ; possédant un coefficient de Chargaff (GC%) compris entre 60-70% (**Larpent, 1989**). La plupart d'entre eux sont toujours immobiles, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines. Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols, synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stérols, etc.

Actuellement, le phylum Actinobacteria tel qu'il figure dans le Bergey's manual(2007) renferme une seule classe : Actinobacteria, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des Actinomycétales), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces.

L'ordre des Actinomycétales comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, etc.) (**Oskay et al., 2004 & Srivibool et Sukchotiratana, 2006**).

Les Streptomycètes représentent l'un des taxa appartenant à l'ordre des Actinomycétales qui renferment une diversité de morphotypes, comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés. En effet, la famille *Streptomycetaceae* comprend 10 genres : *Streptoverticillium*, *Streptacidiphilus*, *Microellobospora*, *Kitasatospora*, *Kitasatoa*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Actinosporangium*, *Actinopycnidium* et *Streptomyces* et plus d'une centaine d'espèces.

Cependant, les genres *Actinosporangium*, *Actinopycnidium*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Microellobosporia* et *Kitasatoa*, suite à l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire, notamment, le séquençage de l'ADNr 16s, ont été assimilés au genre *Streptomyces* (**Bergey's manual, 2007**).

Toutefois, le statut taxonomique des genres *Streptoverticillium* et *Kitasatospora* est devenu incertain depuis que les membres de ces genres ont fait l'objet d'analyses phylogénétiques. En effet, Witt et Stackebrandt, (1990) ont proposé l'unification des genres *Streptomyces* et *Streptoverticillium*, alors que Wellington et al., (1992) ont proposé que le genre *Kitasatospora* devait être synonyme du genre *Streptomyces* sur la base des analyses phénétiques et des homologies des séquences de l'ARNr 16s (**Ochi et Hiranuma, 1994 ; Kämpfer, 2006**).

I.1.2. Evolution des critères d'identification

Au cours de cette évolution, quatre périodes distinctes ont marqué la systématique des actinomycètes.

La première période, qui s'est étendue jusqu'au début des années 1960, a vu une systématique essentiellement d'ordre descriptif, basée sur les caractéristiques macros et micro morphologiques (**Pridham et al., 1958**). Ces critères ont trouvé leur limite à partir du moment où l'Ordre des Actinomycétales a commencé à s'agrandir.

La seconde période, qui a débuté à partir des années 60, a vu le développement de la chimio-taxonomie. Ainsi, la composition des parois cellulaires en acides aminés et des cellules entières en sucres ont permis d'apporter plusieurs clarifications notamment chez les deux principaux genres, *Streptomyces* et *Nocardia*, où une grande confusion régnait auparavant (Becker et al., 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1970). Il en est de même pour l'analyse des lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques (**Mordarska et al., 1972; Minnikin et al., 1977**), les phospholipides (Minnikin et al., 1977), les ménaquinones (Collins et Jones, 1981) et les acides gras (**Grund et Kroppenstedt, 1990**). Ces critères chimiques, combinés aux descriptions morphologiques, se sont révélés être, jusqu'à l'heure actuelle, un outil très efficace pour l'identification des genres d'actinomycètes.

La troisième période, qui a débuté dans les années 70, a vu l'avènement de la taxonomie numérique assisté par ordinateur. Le but était de clarifier l'identification des espèces.

Le principe consiste à traiter avec un logiciel approprié les résultats de plusieurs dizaines de tests physiologiques et biochimiques dont chacun a le même poids taxonomique. Le logiciel permet d'obtenir un dendrogramme montrant les pourcentages de similitude entre les espèces dont la position taxonomique a ainsi été clarifiée pour plusieurs d'entre elles (**Goodfellow, 1971; Athalye et al., 1985; Goodfellow et al., 1990; Grund et Kroppenstedt, 1990**).

La quatrième période débuta à partir des années 80, avec le recours à l'outil moléculaire pour déterminer les parentés phylogénétiques entre les actinomycètes. Pour cela, plusieurs techniques ont été utilisées, telles que l'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine - cytosine), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et 23S, etc. (**Stackebrandt et Woese, 1981**). Ces analyses étaient d'un apport considérable dans la reconnaissance des parentés phylogénétiques entre les actinomycètes à l'échelle des espèces, des genres et même des familles composant l'Ordre des Actinomycétales (**Stackebrandt et al., 1997; Labeda et al., 2001**).

I.2. Critères actuels d'identification

I.2.1. Critères morphologiques

La morphologie des différents groupes d'Actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes. Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif ou mycélium de substrat) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporange ou conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses, ridée, etc, soit isolées soit groupées en chaînes, etc. Certains actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières. D'autres enfin, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires. L'analyse par image des actinomycètes révèle la présence de deux catégories d'hyphes : Les hyphes dispersés et les hyphes en pellets. Dans les hyphes dispersés, la forme "Freelydispersed" et les

"mycelialclumps" sont rencontrées. La première forme c'est des hyphes indépendants dispersés,

La seconde est une masse ou agrégats de mycélium. Les actinomycètes donnant des hyphes en pellets, posent en fermentation des problèmes de limitation de diffusion de l'oxygène et des nutriments à travers l'hyphe. Ceci engendre une diminution de la croissance et peut conduire à une autolyse. Ce point doit être pris en considération, pour éviter ce genre de problème lors des fermentations industrielles. Heureusement, pour plusieurs souches productrices de métabolites secondaire, la forme "Clups" ou masse est la prédominante dans les fermenteurs (90% des cas) (Perry et al., 2004).

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc. (Perry et al., 2004).

I.2.2. Critères chimio taxonomiques

Les études menées par Cummins et Harris (1956), Roman et Nickerson (1956) et Hoare et worke (1957) rapportées par Becker et al., (1965) ont établi que les actinomycètes avaient une paroi cellulaire de composition très proche de celle des bactéries à Gram positif et ont également indiqué que la composition chimique de la paroi cellulaire pourrait fournir des méthodes pratiques afin de différencier les genres d'actinomycètes.

I.2.2.1. Les amino-acides

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée soit d'une :

- glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustrées par le genre *Actinomyces*.
- glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide LL- 2,6 diaminopimélique (DAP) ; ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, tel que les *Streptomyces*.

Les actinomycètes avec des parois cellulaires de type I possèdent principalement de l'acide diaminopimélique de forme LL, cependant que la forme méso de ce même acide est caractéristique des types II, III et IV. La glycine est également présente en quantité importante chez les *Streptomyces* et les *Actinoplanetes* (**Larpent et Sanglier, 1989**).

I.2.2.2. Les sucre

La présence ou l'absence de quatre sucres (arabinose, galactose, xylose et madurose) dans les hydrolysats acides de cellules entières permet de classer les actinomycètes de type pariétal II, III et IV contenant du méso-DAP. Sur cette même base, il est aussi possible de répartir en deux sous-groupes les actinomycètes de type pariétal III selon la présence ou l'absence de madurose.

Becker et al., (1965), Yamaguchi (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) divisèrent les actinomycètes en huit Chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires, et dont les plus importants sont les quatre premiers. Tableau I).

Tableau 1 : Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.

Chimiotype	D.A.P.		Gly.	Lys.	Orn.	D.A.B.	Sucres			
	LL	DL					Ara. + Gal.	Xyl. +	Rha. +	Mad.
I C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
III C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
III E	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IV A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
VI	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
VII	-	-	+	v	-	+	-	-	-	-
VIII	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Note : I, II, III, ..., VIII : définis par Becker *et al*, (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique (DAP), la présence ou non de glycine (Gly.), de lysine (Lys.), de l'ornithine (Orn.) ou de l'acide diaminobutyrique (DAB). A, B, C, D et E : définis par Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur les sucres taxonomiquement importants : l'arabinose (Ara.), le galactose (Gal.), la xylose (Xyl.), le madurose (Mad.) et le rhamnose (Rha.). + : présent. - : absent. v : variable suivant les espèces d'un même genre.

I.2.2.3. Les lipides

Les lipides taxonomiquement importants peuvent être représentés par trois groupes : les lipides polaires, les ménaquinones et les acides mycoliques.

➤ Les phospholipides :

La diversité des phospholipides a permis à Lechevalier et *al.*, (1977) de distinguer cinq chimiotypes notés de PI à PV et caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques (Tableau II).

Tableau 2 : Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes (Lechevalier et *al.*, 1977).

Type de PL	PE	PC	PG	P Glycérol	Exemples de genres
PI	-	-	-	v	<i>Actinomadura</i> <i>Nocardioïdes</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> <i>Amycolatopsis</i> , <i>Kutzernia</i> <i>Saccharothrix</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiosis</i> , <i>Pseudonocardia</i> <i>Saccharopolyspora</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Streptosporangium</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Micrtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i> <i>Cellulomonas</i>

Note : tous les actinomycètes possèdent le phosphatidylinositol.

➤ Les ménaquinones :

Les ménaquinones sont des lipides présents au niveau de la membrane plasmique et jouent un rôle dans le transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative. Ils possèdent dans leur structure un noyau quinone méthyle et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (**Collin et *al.*, 1980**).

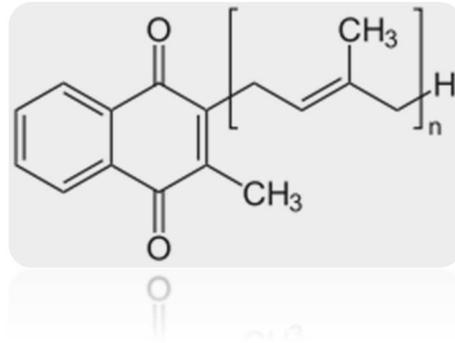


Figure1 : Structure d'une molécule ménaquinones

➤ Les acides mycoliques

Ce sont des composés pariétaux constitués de 20 à 90 carbones, présents uniquement chez certains genres tels que *Mycobacterium* (80 carbones), *Nocardia* (50 C) et *Corynebacterium* (30 C) (chimiotype IVA). Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence (**Mordarska et al, 1972**). Leur structure générale est la suivante:

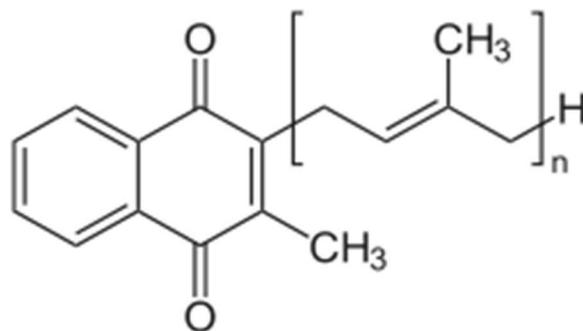


Figure 2 : Structure chimique de l'acide mycolique (Zitouni, 2005).

➤ **Les acides gras** : ce sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre (**Kroppenstedt et al., 1990; Rainey et al., 1996**).

I.2.3 Critères physiologiques et métabolisme des actinomycètes

Les Actinomycètes sont aérobies plus rarement anaérobies, les premiers à métabolisme oxydatif représentent les espèces telluriques, les seconds à métabolisme

fermentatif correspondant aux espèces parasites saprophytes de la cavité buccale éventuellement pathogènes pour l'homme (*Actinomyces* par exemple).

Ce sont généralement des organismes hétérotrophes, qui ont des exigences réduites et tirent leur énergie à partir d'une source très variée de substrats azotés et carbonés. En conséquence, ils sont très largement distribués dans la nature. De nombreuses espèces sont fortement protéolytiques et agarolytiques (**Hsu et Lockwood, 1975**).

Les Actinomycètes sont fréquemment bactériolytiques grâce à des enzymes hydrolytiques capables de fragmenter les peptides de la paroi, leurs propriétés antimicrobiennes sont aussi bien connues et un bon nombre d'antibiotiques sont produits lors de leur croissance. L'équipement enzymatique des actinomycètes est très diversifié, il est à l'origine du rôle écologique majeur de ces organismes. Leur variété et leur importance quantitative, dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la matière organique, les saisons, traitement agricole, etc. Les actinomycètes sont aussi importants en milieu hydrique, dans les eaux douces, les rivières et les fleuves, les membres des genres : *Micromonospora*, *Actinoplana* prédominent. Ceux des eaux usées traitées par aération favorisent la multiplication de certains actinomycètes comme les *Nocardia*. En milieu marin de nombreuses espèces ont été isolées mais il est difficile de connaître l'importance de leur rôle dans la décomposition de la matière organique. Les actinomycètes au cours de leur évolution dans les eaux de surface à usage alimentaire, peuvent produire des substances à forte odeur de terre ou de moisi ces odeurs indésirables qui caractérisent certaines eaux d'alimentation sont dues à des métabolites produits par les actinomycètes notamment la géosmine (le méthyleisobornéol). Certaines espèces d'actinomycètes sont dotées d'un pouvoir pathogène marqué on cite à titre d'exemple les suivants: *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* sont respectivement les agents de la tuberculose humaine ou bovine. Les *Nocardia* sont aussi des agents redoutables des nocardiose humaine ou animale (**Hsu et Lockwood, 1975**).

I.2.4 Critères moléculaires

Dès 1936, **Kluyver** et **Van Niel** proposaient l'utilisation d'une taxonomie phylogénétique, mais les outils nécessaires au développement d'une telle taxonomie n'étaient pas disponibles et il fallut attendre la deuxième moitié du 20ème siècle pour qu'une taxonomie phylogénétique commence à se mettre en place.

I.2.4.1 Détermination du (G+C %)

En 1949, Chargaff et ses collaborateurs, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre. Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN.

I.2.4.2 Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

C'est une technique très fiable pour l'identification des actinomycètes (**Weisburg et al., 1991 ; Cook et Meyers, 2003**).

Stackebrandt et ses collaborateurs (1981, 1983), ont été les premiers à utiliser cette technique pour la taxonomie des actinomycètes. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un gène chromosomique d'une taille de 1500 paires de bases, présent chez toutes les bactéries, dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes.

L'étude de l'ADNr 16S, utilise deux techniques de base : la PCR (Polymérase Chain Réaction) et le séquençage. Cette analyse de l'ADNr 16S a été utilisée ces dernières années pour les groupes à un niveau supra-génique (Famille, Ordre et même Classe) (**Rainey et al., 1996 ; Labeda et Kroppenstedt, 2000**).

I.2.4.3 Les hybridations ADN-ADN

Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : Si les ADN des deux bactéries présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un

appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation),

Puis le duplex se complète de proche en proche. Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses (**Smaoui, 2010**).

I.3 .Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures (**Tableau n°3**). Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint d'après **Goodfellow et Williams (1983)** généralement les 106 germes par gramme de sol séché. D'après **Waksman (1967)**, le rapport Microorganisme totaux / Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries actinomycétales, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 centimètre ne contient que (40%) ou beaucoup moins jusqu'à seulement 16 %. Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Goodfellow et Williams 1983**). La majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau (aw) est très basse (**Davies et Williams, 1970, Goodfellow et Williams, 1983**). Les sols sahariens sont caractérisés par une teneur minime en eau avec un degré de pluviométrie souvent inférieur à 100 mm par an, des températures extrêmement élevées et de faibles quantités d'humus. Des travaux anciens ont prouvé définitivement que les sols désertiques ne sont pas stériles, ils sont peuplés d'une flore microbienne très variée (**Killian et Feher, 1939**). Parmi les bactéries isolées, les actinomycètes font partie essentielle de cette microflore, leurs présence est considérable dans ce type d'écosystème extrême (**Killian et Feher, 1939**).

Tableau 3: Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983).

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplane</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, Eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière, Matière en décomposition
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Streptomyces</i>	Sol, Eau
<i>Streptosporangium</i>	matière en décomposition et en fermentation

I.4. Biologie des actinomycètes

Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes mais un cycle biologique semblable à certains champignons. La germination des spores passe par quatre étapes :

L'activation, l'initiation, l'émergence du tube digestif et enfin la croissance. Le degré hygrométrique joue le rôle prépondérant dans la germination des spores. Dans certains cas, un choc thermique induit l'activation, par exemple un traitement de 5 minutes à 50 °C pour les spores de certaines espèces de *Streptomyces*. Le tube de germination croît et donne des hyphes qui se ramifient intensément. Le mycélium se développe sur et dans le substrat il est dénommé, un mycélium primaire, ou mycélium végétatif ou même quelque fois du mycélium du substrat. La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme de parois transversale isolant les zones les plus âgées. Sur le mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, les hyphes sont peu ramifiés et pourvus d'une enveloppe hydrophobe. Le mycélium secondaire est plus épais que celui du primaire, il est généralement pigmenté.

Les spores se forment sur le mycélium aérien. Dans le cas de la majorité des actinomycètes, notamment les streptomycètes, il s'agit d'exospores. Des parois

transversales se forment pour délimiter les spores, ces parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée.

Des ornements externes peuvent se former, pour donner l'aspect externe important dans la taxonomie. Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorable à la croissance végétative, certaines spores de *Streptomyces* peuvent survivre plus de 20 ans, elles sont plus ou moins résistante à la chaleur.

La formation et la maturation d'une colonie requière de 3 à 7 jours au laboratoire pour la plupart des espèces du genre *Streptomyces*. Dans la nature ce cycle est de durée variable parfois très brève. Les espèces des autres groupes d'actinomycètes présentent des différences plus ou moins marquées par rapport au cycle biologique des streptomycètes. Elles vont de la fragmentation du mycélium (*Nocardioformes*) à la formation de sporange (*Actinoplana* et *Streptosporangium*) à des mobiles (*Actinoplana* et *Actinosynemma*) ou au développement d'endospores semblables à celles des *Bacillaceae* (*Thermoactinomyces*). Ces caractères morphologiques constituent une des bases de la classification des actinomycètes.

I.4.1. Thermorésistante des spores

En générale, la plus part des spores d'actinomycètes comme par exemple les *Streptomyces* ne résistent pas à des températures supérieures à 50°C en chaleur humide et à 70°C en température sèche (Larpent et al., 1989). Il existe cependant plusieurs autres espèces qui résistent à des températures plus élevées (El-Nakeeb et Lechevalier, 1963). C'est le cas de l'espèce *Actinomyces invulnerabilis*, que les spores ne se détruisent qu'à une température de 130°C, le traitement à 120°C inhibe seulement leur germination. Les spores des genres thermophiles tel que *Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, ou thermotolérants tel que *Pseudonocardia*, *Microbispora*, etc., sont également résistantes à des températures élevées.

I.5 Importance des actinomycètes

I.5.1 Importance en agronomie

Les actinomycètes représentent un pourcentage élevé de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires, qui confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique dans le sol.

En plus de leurs fonction de décomposition très actives, les actinomycètes apparaissent avoir de l'importance parmi la microflore de la rhizosphère. En effet les dernières années les différents aspects des interactions actinomycètes-plantes ont fait l'objet d'études étendues (**Valois, 1996**).

Le genre *Frankia* est très connu en foresterie pour son rôle dans la fixation d'azote atmosphérique en symbiose dans les nodules racinaires de certains arbres dicotylédones (autres que les légumineuses) comme le casuarina, l'orme, l'aulne, etc. (**Becking, 1974**).

Leur pouvoir antagoniste prononcé leur confère un rôle dans la distribution écologique des microorganismes et dans la lutte biologique contre certains agents phytopathogènes du sol (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Les actinomycètes ont un rôle important dans les processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (**Goodfellow et al., 1984**).

Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, etc., (**Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983**). Ils sont aussi capables de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (**Holzappel et al., 2002**).

I.5.2 Importance en biotechnologie

L'hétérogénéité biochimique des actinomycètes, leur diversité écologique et leur exceptionnelle capacité à produire des métabolites secondaires font d'eux des producteurs potentiels de nombreux composés intéressants en industrie pharmaceutique et alimentaire (Abbas, 2006).

Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent 50% de la population totale des actinomycètes telluriques, et 75-80% des antibiotiques dérivent de ce genre (Mellouli et al., 2003)

Les actinomycètes gagnent en importance, car c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs (Valanarasu et al., 2009), ce qui fait d'eux des producteurs intéressants en industrie pharmaceutique. Ainsi, de nombreux métabolites sont synthétisés, qui peuvent être des : antibiotiques, enzymes telles que les enzymes alcalines (Li et al., 2005), les transglutaminases, les xylanases et cellulases utilisées dans le traitement des sous-produits (Rawashdeh et al., 2005), des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des immun modulateurs (Badji, 2006), des herbicides, des pesticides ou des antiparasitaires (Oskay et al., 2004). Actinomycètes sont de remarquables producteurs d'antibiotiques, les *Streptomyces* sont particulièrement prolifiques (Oskay et al., 2004). Ainsi, 80% des antibiotiques commercialisés proviennent de ce genre (Thakur et al., 2007), à savoir : la streptomycine, la novobiocine, la nystatine, etc.

D'autres genres producteurs peuvent être cités : *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardiopsis*, et *Saccharothrix*.

Parmi les molécules élaborées par les Actinomycètes, seulement 20% représentent des antifongiques (Sanglier et al., 1993).

II. Les Antimicrobiens

II.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes (**Marinelli, 2009**). Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

Il est très bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs. Près de 50% des espèces de *Streptomyces* isolées sont reconnues comme productrices d'antibiotiques (**Madigan et Martinko, 2007**). Même si on inclut les autres métabolites secondaires, les actinomycètes restent les plus grands fournisseurs avec environ 60% (les *Streptomyces* ont toujours la plus grande partie avec 80%). Plus de 60 substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie (**Madigan et Martinko, 2007**). L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (**Bentley et al., 2002 ; Ikeda et al., 2003**).

Les *Streptomyces* synthétisent des antibiotiques appartenant à différents classes chimiques, ils sont fournisseurs d'oligosides, de β -lactamines, de peptides, de tétracyclines, d'anthracyclines, d'ansamycines, de macrolides, de polyènes, de nucléosides et de la fosfomycine.

II.2 Les antifongiques

II.2.1. Historique

Pendant des centaines d'années, les infections fongiques de la peau et des muqueuses ont été traitées par toutes sortes de médicaments populaires. Les infections du cuir chevelu ont été traitées en l'ans 23-79 après J.C. par des préparations telles que de la

graisse d'ours mélangée à des extraits de plantes, des cendres de corne de cerf dans du vin, de la bile de chèvre dans de la craie et du vinaigre, de la bile de truie mélangée à de l'urine de taureau et du jus d'ail dans la graisse d'oie (**Ainsworth, 1986**). Parmi tous ces composés, seul l'ail est encore mentionné aujourd'hui en phytothérapie comme remède antifongique éventuel (**Odds, 1995**). Au début du 20^e siècle, les produits chimiques de synthèse et les colorants ont remplacé tous ces mélanges rudimentaires anciens. Ainsi, pour le traitement des infections à dermatophytes du cuir chevelu, le dermatologue **Raymond Sabouraud en 1910** a décrit une pâte à base d'amidon, de résine et de farine contenant du carbonate de cuivre en tant qu'ingrédient actif. Pour l'infection de la peau glabre, il recommandait la teinture d'iode. Depuis, plusieurs préparations contenant du soufre, du permanganate de potassium ou des sels de métaux lourds comme l'argent et le mercure, ont été utilisées pour le traitement topique des infections à dermatophytes (**Ainsworth, 1986**). Nombreuses préparations anciennes ont été abandonnées, seules trois préparations antifongiques topiques du début du siècle sont encore prescrites aujourd'hui. La première est à base d'acide benzoïque et d'acide salicylique sous forme de pommade (**Whitfield, 1912**), la seconde est la teinture de triphénylméthane, le violet de gentiane (**Faber et Dickey, 1925**) et la troisième, rarement utilisée aujourd'hui, est « la teinture de Castellani » formulée à base de carbol fuchsine (**Castellani, 1928**). Tous les mélanges cités précédemment sont toxiques, ils montrent en plus d'une activité antifongique, une action antibactérienne aussi efficace, ce ne sont donc pas de véritables antifongiques spécifiques. Parmi les premiers composés antifongiques, certains ont été initialement considérés comme des agents antibactériens mais, plus tard, ils ont révélé une activité contre certains champignons. Ces composés étaient entre autres le cycloheximide (qui inhibe *Cryptococcus neoformans*) et les sulfonamides (la sulfadiazine inhibe *Paracoccidiosis brasiliensis*). Les premiers antifongiques possédant exclusivement une activité inhibitrice contre les champignons pathogènes humains n'ont été découverts qu'après la seconde guerre mondiale et leur utilisation courante en clinique date seulement de la fin des années 50. Les premières molécules antifongiques à usage médical sont les composés appartenant à la série des polyènes et la griséofulvine. Elles ont toutes été découvertes grâce aux techniques de screening d'actinomycètes et de champignons. Les deux antifongiques pionniers introduits pour un usage clinique, sont la nystatine et la griséofulvine. La nystatine a été commercialisée pour des applications cliniques à la fin des

années 50, la griséofulvine au début des années 60, bien qu'elle a été découverte (Oxford et al., 1939).

Avant la nystatine (Hanzen et Brown, 1950). La nystatine a été le point de départ du développement de nombreux autres antifongiques cliniques de nature polyènique.

II.2.2 Principaux antifongiques utilisés en médecine humaine

II.2.2.1. Griséofulvine

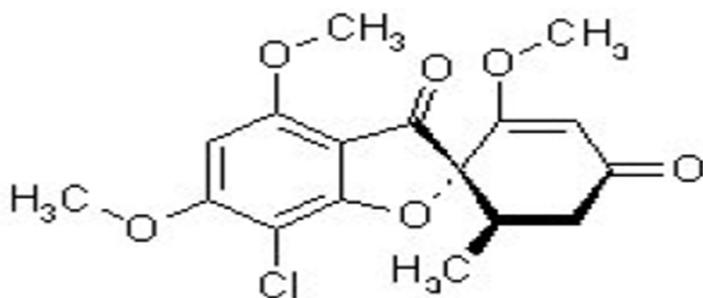


Figure 3 : Griséofulvine (©Laboratoire Sanofi Winthrop)

L'emploi et la commercialisation de la griséofulvine (Fig. 3) ont été d'abord comme agent fongicide en agriculture. L'efficacité clinique du traitement orale de la griséofulvine a été démontrée en premier, sur des infections à dermatophytes chez des animaux de laboratoire (Genties, 1958). Cette molécule antifongique est un métabolite produit par *Penicillium griseofulvum* d'où elle tire son nom. Parmi les champignons pathogènes pour l'homme, les genres inhibés sont : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Elle est utilisée, également, contre la plupart des dermatophytoses cutanées en particulier les teignes du cuir chevelu et les infections cutanées qui affectent la partie supérieure du corps. Son action s'oriente sur l'inhibition de la mitose des champignons sensibles. La griséofulvine est considérée comme étant un antifongique bon marché pour les pays pauvres.

II.2.2.2 Nystatine

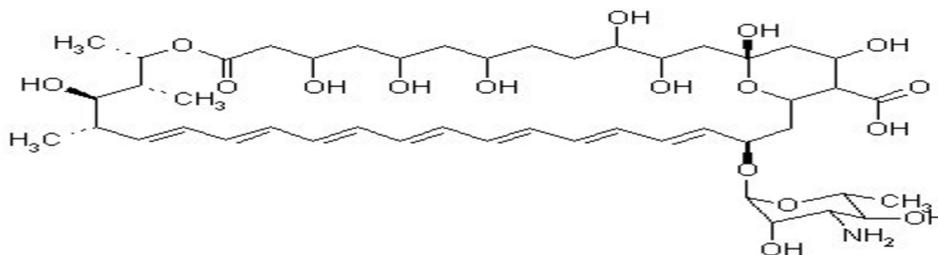


Figure 4 : Mycostatine ©Laboratoire Bristol Myers Squibb

Découvert par **Hazen et Brown en 1950**, l'appellation initiale était "fungicidin" ce nom a été changé par ses inventeurs en nystatine en l'honneur des laboratoires "New York State" pour les quels ils travaillaient. L'activité antifongique a été mise en évidence à partir d'une culture d'un actinomycète isolé de la terre de la ferme laitière de Nourse en Virginie, aux Etats-Unis, d'où son nom de *Streptomyces noursei*. Cette bactérie filamenteuse, produisait deux antibiotiques : La nystatine et le cycloheximide. La nystatine a été breveté et sa licence confiée à "E.R. Squibb et Sons" (connu maintenant sous le nom de Bristol Meyers-Squibb). La nystatine possède quatre doubles liaisons conjuguées dans sa structure (**Fig. 4**). Le spectre antifongique de la nystatine in vitro est très étendu, il englobe plusieurs levures pathogènes comme les *Candida sp.*, les pathogènes dimorphes qui sont infectieux sous une forme levure et *Cryptococcus neoformans* (**Hildick-Smith et al., 1964**). La nystatine est également active contre la plupart des dermatophytes et à l'égard de nombreux agents responsables des mycoses profondes y compris *Aspergillus spainsi* que de nombreuses moisissures. La toxicité de la nystatine administrée par voie parentérale rend son utilisation clinique limitée uniquement pour des usages topiques. La nystatine agit comme tous les autres antifongiques polyènes, en dégradant la membrane cellulaire (**Kerridge et Whelan, 1984**). Cette toxicité sélective de la nystatine contre les membranes de champignons par rapport aux membranes des mammifères est due à une affinité de liaison avec l'ergostérol fongique supérieure à celle du cholestérol des mammifères (**Odds, 1995**).

II.2.2.3. Amphotéricine B

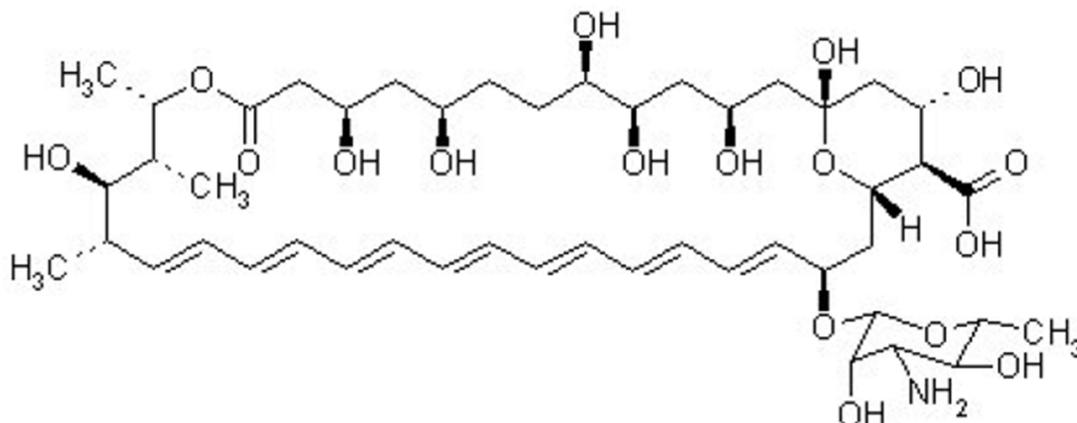


Figure 5 : Fungizone ®Laboratoire Bristol-Myers-Squibb

Molécule antifongique découverte par (Gold *et al*, 1956). Le germe producteur est un actinomycète isolé du bassin d'Orinoco dénommé *Streptomyces nodosus*. C'est un polyèneheptène (Fig. 5) qui inhibe spécifiquement la croissance de nombreuses levures et moisissures et est sans action contre les bactéries. L'amphotéricine B, est un puissant antifongique qui inhibe la plupart des espèces pathogènes. En médecine humaine, l'amphotéricine B est le seule polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes. Toutefois, des effets secondaires indésirables sont remarqués lors de ces traitements, mais ceux-ci peuvent être minimisés à l'aide de stratégies d'administration judicieuses.

II.2.3. Autres agents polyènes antifongiques

Outre l'amphotéricine B et la nystatine qui sont les plus connus parmi la série des polyènes, plusieurs autres molécules naturelles de la même classe ont été découvertes dans les années 50. Il s'agit de la candidine, la candidine, l'étruscomycine (ou lucensomycine), la filipine, la natamycine (pimaricine ou tennecéline) et la trichomycine (hachimycine) (Medoff et Kobayashi, 1980). La mépartricine a été commercialisée au début des années 70 (Simonetti et Strippoli, 1971).

Tous ces agents ont été utilisés pour le traitement des mycoses humaines et certains ont été (et sont encore) commercialisés dans certains pays, toujours dans des formulations destinées à un usage topique. Dans l'espoir de trouver de nouvelles formulations lipidiques pour administration intraveineuse, comme pour l'Amphotéricine B, l'intérêt pour ces molécules polyéniques commence à augmenter ces dernières années (Odds, 1995).

II.2.4. Antifongiques de synthétiques

Jusqu'à la fin des années 50, les seules molécules à usage médicale étaient naturelles. Les premiers antifongiques de synthèse ont été utilisés en agriculture (Odds, 1995). Bien que, ces dernières années de nombreux nouveaux produits naturels à activité antifongique ont été décrits, on estime que depuis 1960 environ, les antifongiques de synthèse ont dominé et ont révolutionné la recherche dans ce domaine. Parmi les agents antifongiques de synthèse les plus utilisés, on cite les suivants :

II.2.4.1. Le chlormidazole

C'est le premier antifongique de synthèse qui a été utilisé en médecine humaine. C'est un dérivé du benzimidazole, et a été utilisé pour le traitement topique des dermatophytoses cutanées. Le composé n'a pas eu un grand succès commercial, mais a ouvert une voie de recherche dans le domaine des molécules antifongiques de synthèse.

II.2.4.2. Le tolnaftate

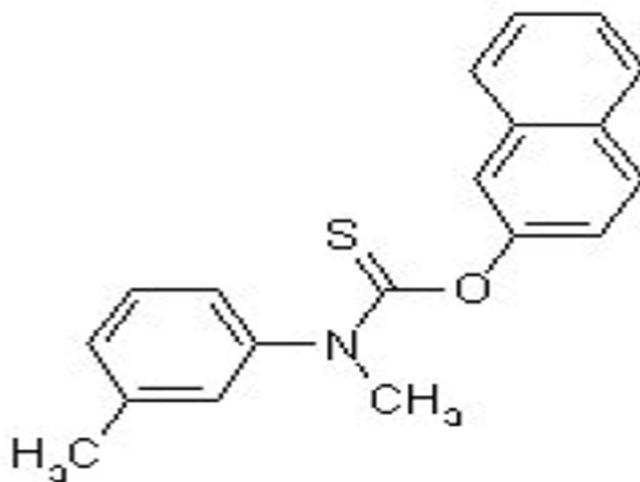


Figure 6 : Sporiline ®Laboratoire Schering-Plough

Ce composé thiocarbamate (**Fig. 6**) découvert en 1962 est un antifongique topique actif contre les dermatophytes et il est vendu également sous forme de poudre pour le traitement du tinea pedis. C'est un inhibiteur de l'enzyme squalèneépoxydase dans la voie de biosynthèse des stérols (**Ryder et al., 1986**). Le tolciolate, un thiocarbamate plus récent, possède des propriétés très similaires.

II.2.4.3. La flucytosine

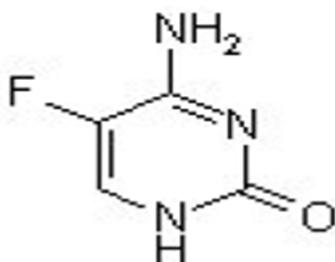


Figure 7 : Ancotil ®Laboratoire Roche

Le 5-fluorocytosine (**Fig. 7**) est la première molécule qui offrait la possibilité réelle de traiter par voie orale les infections fongiques profondes. C'est un inhibiteur de la synthèse de L'ARN de certains champignons. Après pénétration dans le cytoplasme fongique sous l'action d'une cytosine perméase, le 5-fluorocytosine se transforme en 5-fluorouracile qui se substitue à l'uracile dans la synthèse des ARN. Cette situation conduit au blocage de la synthèse protéique (**Scholer, 1980 ; Polak, 1990**). La spécificité d'action sur les cellules fongiques, est due à la spécificité de la cytosine perméase qui n'existe pas chez les mammifères. Son spectre d'action in vitro, se limite aux *Candida* sp ; *Cryptococcus neoformans*; certaines moisissures dématiées et certains isolats d'*Aspergillus* sp. A cause des multiples cas de résistance à cette molécule, la flucytosine est employée avec succès en association avec d'autres antifongiques polyéniques comme l'amphotéricine B ou azolés ou encore avec une échinocandine, dans le traitement combiné de nombreuses mycoses systémiques.

II.2.4.4. Les imidazoles

Le benzimidazole, le chlormidazole, les arylimidazoles et d'autres font partie des composés imidazoles présentant une activité antifongique importante *in vitro*. Les premiers antifongiques imidazoles appartenant à la série des azolés ont été décrits par Janssen Pharmaceutica en Belgique, il s'agit du miconazole (**Fig. 8 a**) et l'éconazole (**Fig. 9**) (Godefroi *et al.*, 1969). Le clotrimazole a été décrit par Bayer AG en Allemagne (Margot *et Adam*, 1969). Ces premières molécules ont été évaluées dans de nombreux essais cliniques et ont prouvés leur efficacité dans le traitement topique des infections superficielles à *Candida* et des dermatophytoses. Leur spectre antifongique s'étale contre plusieurs pathogènes fongiques systémiques et contre de nombreux autres agents des mycoses superficielles. Le mode d'action de ces molécules a été élucidé par Van den bossche *et al.*, en 1978. Il a démontré que le miconazole inhibait la déméthylation du lanostérol en ergostérol conduisant ainsi à l'arrêt de la synthèse des stérols fongiques. Le succès des antifongiques azolés a été à l'origine d'une panoplie de découvertes de nouveaux composés du même type.

Le fluconazole (**Fig. 8 b**) et l'Itraconazole (**Fig.8 c**) représentent les plus importants antifongiques triazolés. D'autres azolés comme, le voriconazole (**Fig. 10**), produit par Pfizer et le SCH 56592 de Schering-Plough seraient tous deux actifs vis-à-vis des *Candida* résistantes au fluconazole ; ces deux produits possèdent une activité nettement améliorée vis-à-vis d'autres affections fongiques telles que l'aspergillose et l'histoplasmosse.

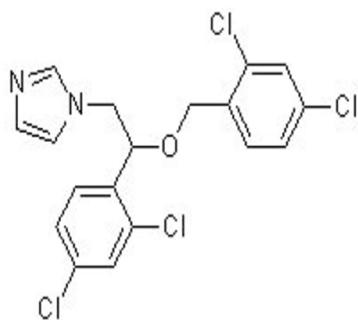


Figure 8 a : structure de miconazole
©Laboratoire Pfizer

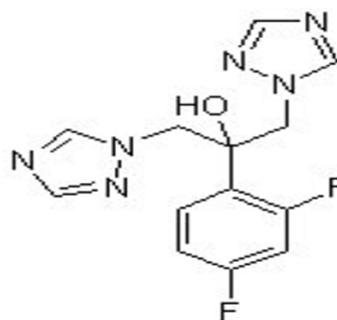


Figure 8 b : structure de fluconazole
©Laboratoire Pfizer

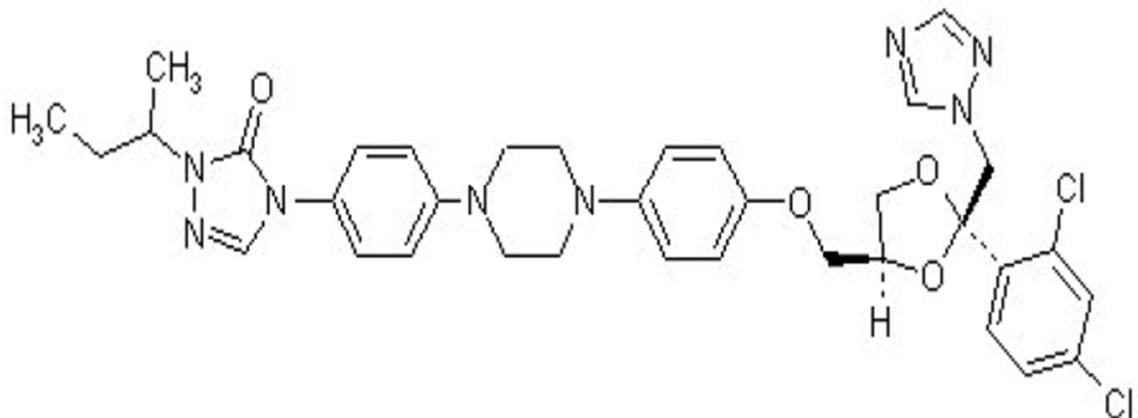


Figure 8 c : structure de Itraconazole

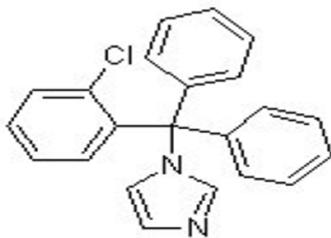
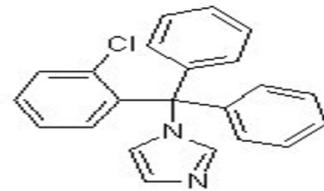
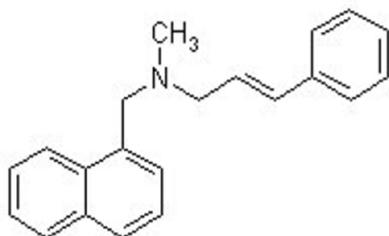
Figure 9 : Clotrimazole laboratoire Roger Bellon
(Vfend®)

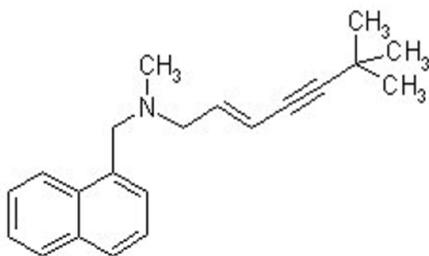
Figure 10 Voriconazole

II.2.5. Les antifongiques allylamines

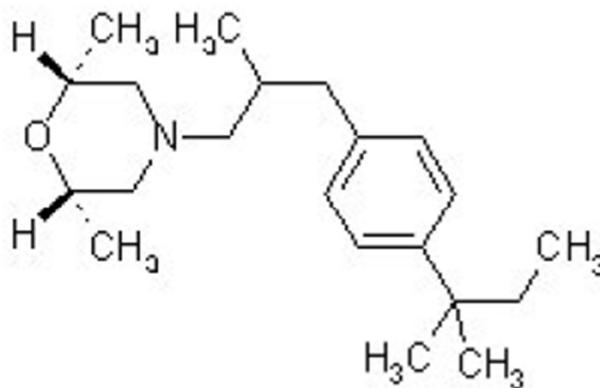
Ce nouveau groupe d'antifongiques, développés en 1977 au Sandoz Research Institute à Vienne, est caractérisé par sa structure chimique comportant une fonction allylamine tertiaire. Les composés de cette classe d'antifongiques inhibent l'enzyme squalèneépoxydase fongique qui intervient dans la voie de la biosynthèse des stérols. Parmi ces antifongiques on retrouve les suivants :

***Naftifine****Figure 11 : Naftifine.**

Découvert en 1974, il est le premier composé allylamine (**Fig. 11**) développé en clinique. La naftifine est utilisée contre les infections à dermatophytes.

***Terbinafine****Figure 12 : Lamisil ®Laboratoire Novartis Pharma**

*Terbinafine : La terbinafine (**Fig. 12**), succède à la naftifine, elle est active par voie orale et topique très utilisée dans le traitement des infections à dermatophytes, l'onychomycose comprise. Le spectre antifongique de la terbinafine *in vitro* est très large : il comprend non seulement les dermatophytes, mais aussi *Candida sp* et de nombreuses moisissures (**Mieth, 1993**). Cependant *in vivo*, le composé est presque complètement inactif par voie orale et est aussi nettement moins performant contre les infections superficielles à *Candida*. Ce grand écart entre les activités *in vitro* et *in vivo* est un point, encore, non élucidé.

***Amorolfine****Figure 13 : Locéryl ®Laboratoire Roche**

*Amorolfine : C'est le seul composé de la classe des phénylmorpholines utilisé en médecine humaine, le reste des représentants de cette série sont employés en agriculture. L'Amorolfine (**Fig. 13**) inhibe deux enzymes dans la voie de biosynthèse des stérols fongiques (**Hartman et polak, 1993**). Elle agit sur la plupart des champignons responsables des mycoses superficielles, y compris *Candida* sp et la dermatophytes et elle entre dans la composition de diverses préparations pour le traitement de l'onychomycose, des mycoses cutanées et des infections vaginales à *Candida*.

II.2.6. Les antifongiques non classés

D'autres antifongiques de synthèse, moins populaires que les molécules précédemment décrites, sont utilisés en clinique ; les plus rencontrés sont la chlordantoïne, l'haloprogrine, la ciclopiroxolamine et le nifuratel.

II.2.7. Nouveaux antifongiques d'origine naturelle

Une quantité infime d'antifongiques naturels ont été découverts et mis sur le marché clinique ces dernières années. Ces molécules sont produites par fermentation essentiellement par des actinomycètes et des champignons. Ils offrent au marché des antifongiques des composés nouveaux capables de faire face aux phénomènes de résistance constamment en progression.

II.2.7.1. Echinochandines

Ces molécules sont des lipopeptides cycliques produits par divers isolats d'*Aspergillus* (Benz et al, 1974). Les pneumocandines sont des molécules similaires produites par un autre champignon le *Zalerionarboricola* (**Schwartz et al.,1989**). Contrairement aux antifongiques azolés, qui bloquent simplement la croissance des cultures fongiques, les échinochandine tuent les champignons en interrompant la synthèse des glycanes, qui est un important constituant de leur paroi cellulaire. Cet élément de la paroi cellulaire ne se trouve pas dans les cellules des mammifères, ce qui fait que le médicament est moins toxique que l'amphotéricine B. Dans le but d'élargir leur spectre d'action contre plusieurs moisissures pathogènes, ces deux molécules ont été optimisées par les laboratoires de recherche Merck au New Jersey en produisant le L 724,872 et les laboratoires Lilly en Inde qui ont mis au point le LY303366. L'amélioration de la solubilité dans l'eau et leur biodisponibilité orale ont été également améliorées.

II.2.7.2. Nikkomycines

Ces composés sont les produits de la fermentation de *Streptomyces tendae* (**Fiedler et al., 1993**). Ces antifongiques sont actifs sur certaines espèces du genre *Candida* et sur les pathogènes dimorphiques (*Coccidioides immitis* et *Blastomyces dermatidis*).

II.2.7.3. Pradimicines

Les laboratoires Bristol-Myers disposent d'antifongiques nouveaux, les Pradimicines. Ce sont des dérivés de l'antibiotique pradimicine A, produits par *Actinomadura hibisca* (**Oki, 1992**). Ces agents antifongiques sont actifs principalement contre les champignons qui contiennent une grande quantité de mannanes dans leur paroi cellulaire, comme chez les levures. Malheureusement, ces produits ne semblent pas être absorbés par voie orale. Certaines augmentations des enzymes hépatiques peuvent-être liées au médicament administré par voie intraveineuse ont été observées chez l'homme.

II.3 Technique de production et d'identification des antifongiques

II.3.1 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 bio activité 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.3.1.1 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 polyéniques, la AK-111-81, par *Streptomyces hygroscopicus*.

La biosynthèse des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes dus au 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.4. Extraction

L'extraction liquide-liquide à l'aide des solvants organiques non miscibles avec l'eau est considérée comme une étape de purification partielle. A l'issue de la fermentation,

l'antibiotique est présent à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique (comprenant les cellules, des éléments du milieu et différents métabolites). Généralement, les molécules bioactives passent dans la phase aqueuse. Le choix du solvant d'extraction est primordial. Il doit non seulement avoir une forte capacité d'extraction et une sécurité d'emploi, mais aussi assurer la stabilité des molécules lors de l'extraction ainsi que leur concentration par distillation.

II.5. Purification des antifongiques

Pour purifier les antifongiques, de nombreuses techniques ont été décrites en littérature.

Elles varient selon les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées. Parmi toutes les techniques décrites, celles se rapportant à la chromatographie liquide restent les plus utilisées et permettent une purification totale des antifongiques.

II.5.1 Chromatographie préparative sur plaque épaisse de gel de silice

Les techniques analytiques utilisées précédemment ont été transposées en techniques préparatives pour de plus grandes quantités d'antibiotiques. La préparation des plaques et le protocole d'expérimentation sont les mêmes que pour les plaques de couches minces sauf que l'épaisseur est fixée cette fois-ci à 0,5 mm (donc 50 g de poudre de silice mélangé à 120 ml d'eau distillée). Deux cent à trois cent microlitres d'extrait concentré sont déposés progressivement en ligne continue à l'aide d'une micropipette, à 3 cm du bord inférieur et à 2 cm des bords latéraux des plaques (**Badji, 2006**).

La migration se fait conjointement avec des petites plaques qui servent à une bioautographie de manière à localiser avec précision les zones actives. Les zones présentant une activité intéressante sont récupérées par grattage de la poudre de silice. Les produits sont désorbés dans du méthanol sous agitation pendant 2 h à température ambiante.

Des verres frittés permettent de séparer le gel de silice du solvant avec aspiration par le vide à l'aide d'une pompe à eau. Le filtrat limpide obtenu est ensuite évaporé à sec au rotavapeur. Le résidu est repris dans un minimum de méthanol et son activité est contrôlée par antibiographie (**Badji, 2006**).

II.5.2 Chromatographies préparative sur colonne

L'objectif général de la chromatographie préparative est d'obtenir des quantités adéquates des produits, c'est une technique qui est capable à elle seule de remplacer une chaîne de méthodes chimiques telles que l'extraction liquide-liquide, la distillation, ou encore la cristallisation fractionnée (Rosset, 1999).

Les fractions obtenues sont repérées par leur couleur et recueillies séparément et leur temps de sortie est noté. Lorsque la récolte des fractions est terminée, on vérifie leur pureté par chromatographie sur couches minces ainsi que leur activité par antibiographie (Badji, 2006).

II.5.3 Purification par HPLC

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 (Badji, 2006). La colonne C18 est très souvent utilisée pour séparer les antibiotiques qui sont généralement de polarité moyenne (Zitouni, 2005).

La phase mobile la plus utilisée est un gradient méthanol-eau. Lorsque l'équilibre entre la silice greffée et le mélange est établi, les constituants les moins polaires de la phase éluant (solvant organique) s'adsorbent préférentiellement à la surface des chaînes hydrocarbonées.

La phase inverse est la plus utilisée pour purifier les antibiotiques notamment ceux extraits par des solvants organiques à polarité faible ou moyenne (Lamari, 2006).

II.6. Identification des antibiotiques antifongiques

Les techniques spectrales combinées à des réactions chromogéniques, sont utilisées pour rechercher la présence de certains groupements chimiques caractéristiques dans les molécules d'antibiotiques (liaison conjuguées, certains groupements fonctionnels ; etc.), ou encore pour détecter la présence de certains types d'antibiotiques comme les polyènes présentant des spectres d'absorption caractéristiques en UV-visibles (Charin et Aszalos, 2002).

II.6.1 Spectroscopie en UV-visible

Permet également de connaître le degré de saturation des molécules (présence ou non de doubles liaisons) (**Lindenfelser et al., 1964 & Bastide et al., 1986**).

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 (**Dinya et Sztaricskai, 1986**) sont aisément détectés par spectroscopie UV-visible.

II.6.2 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 (CH₃, CH₂, CH, OH, NH₂, CHO, COOH, etc.), d'aromatiques, etc. et ce, à l'aide de tables de corrélations (**Williams et Fleming, 1989**).

Le domaine des infrarouges s'étend du spectre visible (environ 400 à 900 nm) jusqu'aux ondes hertziennes (environ 1010 à 1011nm), assurant ainsi la continuité du spectre des radiations électromagnétiques (**Pouilly, 2009**).

II.6.3 Spectrophotométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique qui permet de caractériser des molécules purifiées ou présentes en très faible quantité, de l'ordre du femtomole (soit 10⁻¹⁵), au sein d'un mélange. Cette technologie nécessite que les biomolécules soient volatilisées et ionisées pour être analysées (**Auvin-Guette, 2002**). Il existe deux méthodes différentes pour ioniser les biomolécules qui permettent d'avoir les masses molaires et parfois même la structure des substances analysées avec une grande certitude.

II.6.4 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique polyvalente utile aussi bien en analyse quantitative que structurale. Elle est généralement utilisée en complément des autres méthodes de spectroscopie classiques et de la spectrométrie de masse pour localiser les atomes, de préciser la formule développée et la

stéréochimie du composé étudié. 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 (**Diop, 1998**).

III. Généralités sur les champignons

Les Champignons, encore appelés "Fungi" (du latin) ou mycètes, constituent un large groupe diversifié qui possède des caractéristiques communes avec les plantes inférieures et les animaux inférieurs. (**Murray et al., 2008**).

Ce sont des organismes eucaryotes, c'est-à-dire possédant des noyaux individualisés pourvus d'une membrane nucléaire, de chromosomes et d'un nucléole, et un appareil mitochondrial. Ils possèdent une paroi peptido-polyosidique épaisse, de composition variable selon les groupes : mannanes, glucanes, chitine, protéines, phospholipides, et une membrane riche en stérols (ergostérol). (**Stevens et al., 2000**). L'existence simultanée d'une paroi cellulaire périphérique et de vacuoles turgescentes dans le cytoplasme, les rapproche des végétaux auxquels on les rattachait autrefois. Mais l'absence de chloroplastes (et donc de chlorophylle) en fait, comme les animaux, des organismes hétérotrophes. L'intermédiaire de la lysine est l'acide diaminoapinique, alors qu'il s'agit généralement de l'acide diaminopimélique chez les bactéries. Leur substance de réserve est le glycogène comme pour les animaux alors que c'est l'amidon dans le cas des plantes (**Stevens et al., 2000**).

Donc ni animaux ni végétaux les champignons sont aujourd'hui érigés en un règne autonome celui des Fungi, au même titre que les Végétaux ou d'autres organismes. Leur nombre est évalué à ce jour à environ 100.000 espèces, mais il est probablement plus élevé.

Ce sont des organismes hétérotrophes dont la nutrition carbonée est dépendante de la présence de matières organiques préformées, ce qui conditionne, suivant les circonstances, leur vie saprophytique, parasitaire ou symbiotiques.

La quasi-totalité des champignons vivent en saprophytes dans le sol, sur des plantes mortes ou vivantes, mais uniquement à leur surface et sans leur causer de lésions.

Beaucoup d'espèces sont des parasites de plantes, ce qui constitue un problème économique.

Un nombre plus restreint, quelques centaines, sont opportunistes et peuvent devenir pathogènes pour l'homme et les animaux (**Stevens et al., 2006**).

Des nombreuses espèces sont symbiotiques, soit associées à des algues (dans les lichens), soit associées à des racines (constituant les mycorhizes).

La reproduction des champignons est complexe, reflétant ainsi l'hétérogénéité de leur mode de vie. Elle peut être sexuée ou asexuée, bien que certains champignons alternent entre les deux types de reproduction (**Nester et al., 1998**).

La reproduction asexuée se fait sans fusion des gamètes. C'est un mode de reproduction commun presque à tous les champignons. La reproduction asexuée chez les champignons peut se faire par bourgeonnement, fission binaire, fragmentation, ou par formation de spores (**Alexopoulos et al., 1996**).

La fusion de deux noyau haploïdes, qui vont subir une méiose ces événements sont suivi par la formation des spores (**Deacon, 2005**).

Plusieurs champignons alternent entre la reproduction sexuée et asexuée, dépendant des conditions (**Bruns, 2006**).

Les champignons envahissent occasionnellement l'air que nous respirons par l'intermédiaire de leurs spores disséminés par le vent. Ces spores sont responsables de certaines allergies et maladies graves. L'aspergillose pulmonaire par exemple, est une maladie de l'appareil respiratoire, causée par inhalation des spores de moisissures du genre *Aspergillus* (**Kamanfu et al., 1993**).

Aussi les champignons ont un grand intérêt pour l'homme dans plusieurs domaine tel que :

En écologie, les champignons saprophytes participent au maintien de l'équilibre écologique en libérant dans l'environnement, à partir de la matière qu'ils décomposent, du carbone et des sels minéraux (**Joffin, 2005**).

En pharmacie, plusieurs espèces de champignons sont utilisées pour la synthèse de médicaments. Le polysaccharide K, produit chimique dérivé de *Trametes versicolor*, est utilisé comme adjuvant dans le traitement du cancer (**Fisher et Yang, 2002**).

En agriculture, les champignons à l'instar de *Beauveria bassiana* sont utilisés dans la lutte biologique. Ce champignon permet de lutter contre le doryphore dans la culture des pommes de terre ou contre une chenille responsable de la pyrale du maïs (**Becker, 1998**).

III.1 Les infections fongiques

Les infections fongiques, également appelées mycoses, sont des maladies causées par des champignons microscopiques. Plus fréquemment, le nom de l'infection fongique est formé à partir du nom du champignon responsable, en lui ajoutant les suffixes "ose" : candidose, cryptococcose, aspergillose, etc. (**Cox et al., 1993, Boiron, 1999**).

Il existe plus de 200 000 espèces de champignons, dont une petite centaine est impliquée dans des maladies humaines. Malheureusement ce chiffre est en constante augmentation car de plus en plus d'espèces considérées comme saprophytes deviennent capables de provoquer une infection à l'occasion de modifications générales ou locales du terrain de l'hôte (**Ampel, 1996, Boiron, 1999, Croll, 2002, Pfaller, 2002**).

Les infections fongiques systémiques restent des affections graves et leur incidence est en progression significative. A côté de l'apparition de mycoses d'importation dues à la multiplication des voyages, la cause principale de cette croissance réside dans l'augmentation considérable des facteurs de risques et plus particulièrement du nombre croissant de patients à risque immunodéprimés liés au virus du sida, aux avancées en transplantation et en oncologie, à l'utilisation de cathéters vasculaires et au recours fréquent à des antibiothérapies à large spectre.

Ces infections sont associées à une élévation significative de la morbidité et de la mortalité des patients hospitalisés (**Blanchet et al., 2004**).

La formation d'une mycose présuppose, d'une part, un contact avec l'agent pathogène et, d'autre part, la possibilité pour le champignon de pénétrer l'organisme. Par ailleurs, certaines conditions doivent être remplies pour que les champignons puissent ensuite se propager dans les tissus. L'étendue d'une infection fongique, peut être localisée ou généralisée. Autrement dit, soit c'est un tissu spécifique qui est infecté (la peau ou un organe), il s'agit alors d'une infection bien délimitée, soit le champignon atteint la circulation sanguine et s'attaque à plusieurs organes. Dans ce dernier cas, on dit que le germe se généralise ou se dissémine.

Les champignons pathogènes, qui sont à l'origine de mycoses, sont classés en fonction de leur morphologie. Cette classification permet de distinguer grossièrement les champignons filamenteux (avec l'hyphe comme élément de base, une ramification d'hyphes constituant le mycélium) et les levures.

Les levures ne possèdent pas de véritables ramifications mycéliennes comme les champignons filamenteux. Il existe une troisième sorte de champignons, qui, selon les conditions environnementales, se présente soit sous un aspect mycélien, soit sous un aspect levuriforme: il s'agit des champignons dimorphiques (**Boiron, 1999**).

III.1.1 Candidose

La candidose, ou muguet, est une infection causée par un type courant de levure, appelé *Candida*. (**Jean-Luc Guérin et Cyril Boissieu 2008**)

Les *Candida* sont des levures, micro-organismes endogènes ou exogènes, dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisants locaux ou généraux. Les candidoses peuvent donc être des infections opportunistes dont les causes sont très variées. Le spectre clinique s'étend des formes localisées (cutanées et/ou muqueuses), d'une grande fréquence en médecine générale, aux atteintes invasives rencontrées chez les patients hospitalisés cumulant de nombreux facteurs de risque et dont le pronostic est souvent réservé. La seule présence de ces levures n'est pas synonyme de maladie, car l'isolat responsable de l'infection est le plus souvent celui que le malade héberge spontanément. Les atteintes invasives sont un exemple d'infections nosocomiales, résultant des traitements médico-chirurgicaux de plus en plus spécialisés chez des patients de plus en plus fragiles. Le diagnostic de ces mycoses est difficile et repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. (**ANOFEL 2014**)

Les infections causées par les souches de *Candida* représentent la principale cause des infections fongiques nosocomiales (80 %). Les souches de *Candida* peuvent produire une grande variété d'infections, allant des infections légères mucocutanées aux infections invasives (septicémie). Il existe au-delà de 150 espèces de *Candida*. Cependant, le *Candida albicans* (*C. albicans*) est responsable de la majorité des infections (**Rex et al., 2000 cité par Carle, 2003**)

III.1.2 Les aspergilloses

Les aspergilloses sont des affections opportunistes provoquées par la prolifération dans l'organisme de champignons filamenteux appartenant au genre *Aspergillus*. Ce genre comprend environ 300 espèces ; seules quelques-unes sont pathogènes pour l'homme et provoquent des affections opportunistes, fréquentes et souvent mortelles chez le patient immunodéprimé (**Morin, 2005**).

L'*Aspergillus* est le deuxième pathogène fongique après le *Candida*. Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment rencontrées en clinique sont l'*Aspergillus fumigatus* et l'*Aspergillus flavus*. Les autres espèces communes sont l'*A.niger*, l'*A.nidulans* et l'*A.terreus*. *Aspergillus fumigatus* est de loin l'espèce qui semble avoir le plus grand pouvoir pathogène (**Morin, 2005**).

Une aspergillose invasive chez l'humain représente une infection très sérieuse. Elle affecte principalement les poumons, mais parfois les sinus et le Système Nerveux Central de l'hôte (**Carle, 2003**).

Les *Aspergillus* font partie de la classe des Deutéromycètes-Hyphomycètes ou champignons imparfaits, dont le mode de reproduction et de propagation s'effectue par des spores ou conidies (**Sulahian, 2007**).

Le genre *Aspergillus* appartient à la famille des Aspergillaceae et à la classe des Ascomycètes. Le pouvoir pathogène des *Aspergillus* se manifeste par des mécanismes différents :

- production de toxines comme les aflatoxines cancérigènes, sécrétées par *Aspergillus flavus* qui se développe dans les arachides ou les différentes toxines nécrosantes (protéase, ARNase, catalase) à l'origine des hémoptysies dans l'aspergillome ;
- pouvoir allergisant déclenchant des phénomènes d'hypersensibilité immédiate ou semi-retardée ;
- pouvoir infectieux par colonisation de cavités naturelles ou néoformées de l'homme (aspergillome) ou par invasion des tissus sous-jacents (aspergillose) (**Sulahian, 2007**).

Champignon opportuniste, l'*Aspergillus* ne devient pathogène que s'il rencontre des conditions favorables à son implantation.

III.1.3 Autres champignons filamenteux opportunistes

Ces affections sont provoquées par des champignons filamenteux cosmopolites, ubiquitaires, et pathogènes opportunistes puisqu'ils profitent d'une défaillance naturelle ou iatrogène des systèmes de défense de l'hôte pour l'infecter. L'intensité des facteurs favorisants et le niveau d'exposition à une source environnementale seront déterminants dans la présentation clinique de l'infection. Le spectre clinique s'étend des formes localisées (colonisation ou infections d'évolution souvent chronique), aux atteintes invasives multiviscérales gravissimes. Il comprend également des manifestations immuno-allergiques. Le diagnostic de ces mycoses est difficile et repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

Ces moisissures peuvent également être responsables de mycoses opportunistes, à l'origine d'infections localisées ou invasives, d'allergies ou de mycotoxicoses. Parmi elles

- les Hyalohyphomycètes (champignons à filaments cloisonnés hyalins) tels que les champignons des genres *Fusarium*, *Scedosporium*, *Scopulariopsis*, *Acremonium* ...
- les Phaeohyphomycètes (champignons à filaments cloisonnés pigmentés) tels que les champignons des genres *Alternaria*, *Cladosporium* (**Anofel 2014**).

Objectif

Nous avons fixée comme objectifs essentiels dans notre travail :

- l'isolement et purification des souches d'actinomycètes a partir de la zone aride de Elbayidh.
- revivification, purification, et confirmation d'identité des souches d'actinomycètes conservés.
- choisir le milieu de culture le plus favorable pour la croissance des actinomycètes.
- tester l'activité antifongique de ces souches d'actinomycètes et sélection des souches productrice des antifongiques.
- production et extraction des métabolites secondaire à partir des souches actinomycétales qui ont montré une activité antifongique.
- étude de l'activité antifongique des extraits des actinomycètes et calcule de la concentration minimale fongicide (CMF).
- étude de l'action des molécules produite par les souches sur l'ergostérol membranaire.
- caractérisation préliminaire de ces extraits actinomycétales (métabolites secondaire).

IV.1 Isolement des actinomycètes

IV.1.1 Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sols sont prélevés dans la zone aride dans la région d'Al Bayadh selon la technique de **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 un dispositif tubulaire 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.

IV.1.2 Enrichissement du sol

Cette étape consiste à mélanger 1g de chaque sol, séché à l'air, avec 0.1g de CaCo₃ et incubé à 28°C pendant 7 jour dans une atmosphère saturée d'humidité (**Cavala et Eberlin, 1994**).

IV.1.3 Dilutions

5g de chaque sol séché et traité est dilué dans 45 ml de TSE (Tryptone, Sel, Eau). Cette suspension mère constitue la dilution 10⁻¹ subit une agitation pendant 10 minutes. Une série de dilutions décimales allant à 10⁻⁵ est effectuée pour chaque échantillon.

IV.1.4 Isolement des actinomycètes

L'isolement d'actinomycètes dans cette étude a été réalisé sur trois milieux différents : Bennett, GLM (Glucose-Extrait de levure-Malt) et ISP2 (International Streptomyces Project) (voir composition en annexe).

Les trois milieux sont additionnés stérilement de 75µg/ml d'amphotéricine B pour inhiber le développement des champignons filamenteux et 50µg/ml de l'acide nalidixique pour inhiber la croissance de bactéries à Gram négatif.

Cent microlitre des dilutions 10⁻³ et 10⁻⁴ sont ensemencés en surface sur les trois milieux d'isollements (2 boîtes pour chaque dilution).

Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C pendant 21 jours. Une atmosphère saturée en humidité est créée en utilisant un béccher rempli de l'eau dans l'étuve. Des observations régulières sont effectuées chaque semaine.

IV.1.5 Purification des souches isolées

Les souches d'actinomycètes isolées sont purifiées par repiquages successifs sur milieu ISP2 en présence d'antifongique.

Les isolats ainsi purifiés sont conservés à 4°C sur des tubes de gélose inclinée contenant le même milieu, en vue d'études ultérieures.

IV.2 Revivification des souches

Les 26 souches d'actinomycètes conservées dans des tubes de gélose Bennet inclinés ou congelées en présence du glycérol, sont ensemencées par strie sur milieu gélose AF, ISP2 et Bennet puis incubées à 28°C pendant 14 à 21 jours.

IV.3 Confirmation de l'identité des actinomycètes

Des études morphologiques, culturales, et biochimiques sont réalisées sur les souches d'actinomycète revivifiées préalablement pour confirmer leur identité en vue de tester leur activité antifongique vis-à-vis des champignons filamenteux.

IV.3.1 Caractérisation morphologique

IV.3.1.1 Macromorphologie et caractères culturels

Ces caractères sont déterminés sur les milieux ISP2, Bennett et GLM. Les milieux sont stérilisés et répartis en boîtes de Pétri qui sont incubées 24 h à 28°C avant leur utilisation, afin de contrôler leur stérilité, ils sont ensuite ensemencés en stries à partir d'une à deux gouttes de suspension de l'inoculum déposées sur le bord de la gélose. Les boîtes sont incubées à 28°C et après 14 à 21 jours d'incubation, l'importance de la croissance de chaque souche, le développement et la pigmentation du mycélium aérien, la pigmentation du mycélium de substrat (dos de la colonie) sont déterminés. S'il y a production de pigments diffusibles de couleurs différentes, autre que la couleur brun-noir caractéristique des pigments mélanoides, la couleur est notée (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

IV.3.1.2 Micromorphologie

Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (G×40) (Suzuki, 2001).

Une observation au microscope optique (G×100), après coloration de Gram est ensuite réalisée.

IV.3.2 Cratérisation biochimique

IV.3.2.1 Recherches de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction suivante :



Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîche de H₂O₂ à 10 volumes. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène : le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulle: catalase négatif (Camille, 2007).

IV.4 Choix de milieu de culture

Les souches d'actinomycète sont ensemencées en strie sur quatre milieux d'isolement (Bennet, GLM, AF, ISP2).

Les colonies des actinomycètes sont observées et comptées après 3 à 14 jours d'incubation pour connaître le milieu le plus favorable à leur multiplication et qui répond aux besoins nutritives de ces germes.

IV.5 Conservation des souches

IV.5.1. conservation à court terme

Conservation en gélose inclinée à 4 °C après incubation de 21 jours à 28°C, un repiquage est effectué tous les deux mois (**Hilali et al ., 2002**).

Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sont remplis de L'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation (**Boudmagh, 2007**).

IV.5.2. conservation à long terme

La congélation à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.

IV.6 Purification et Confirmation de l'identité des souches cibles

IV.6.1. Les souches de moisissure

Les moisissures étudiées sont illustre dans le (**tableau 4**)

Tableau 4 : les souches de moisissures testées.

Nom de la souche	La famille	Source et identification
<i>Aspergillus flavus</i>	Trichocomaceae	Laboratoire de recherche des sources végétales et la sécurité alimentaire des zones semi-arides du sud ouest algérien université de Béchar.
<i>Aspergillus niger</i>	Trichocomaceae	
<i>Cladosporium</i>	Dividiellaceae	
<i>Fusarium oxysporium</i>	Monoliaceae	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Mucoraceae	
<i>Alternaria. Alternata</i>	Pleosporaceae	

IV.6.2. Les souches de levure

Deux souches de *Candida albicans* testées sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : souches de levure testées.

Noms de la souche	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
N° ATTC	ATTC 10231	ATTC 26790
Famille	Sccharomycetaceae	Sccharomycetaceae

IV.6.3. Purification

Les souches fongiques cibles (*A. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium*, *A. Alternata*, *R. stolonifère*, *Fusarium oxysporum*) sont repiquées sur le milieu Potato dextrose Agar (PDA) (voir annexe), stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes puis acidifié aseptiquement par 1ml de l'acide lactique dilué à 25% pour inhiber les souches bactériennes. L'ensemencement est réalisé par un disque de 6mm de la colonie fongique prélevé à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours.

IV.6.4 Confirmation de l'identité des souches fongiques

L'identification des moisissures cibles fait appel aux caractères cultureux (la vitesse de croissance, la texture, la couleur de thalle et la couleur du revers de la culture) et morphologique (c'est l'étude du mycélium et la nature des organes différenciés). Une observation microscopique est ensuite réalisée en utilisant la méthode se scotch. (**Botton et al., 1990**).

IV.7 Préparation des suspensions fongiques

Des suspensions fongiques de chaque une des souches fongique (*A. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium*, *A. Alternata*, *R. stolonifère*, *Fusarium oxysporum*) sont préparées en grattant la superficie de culture à l'aide d'une spatule stérile et la mélanger par vortex avec 10 ml d'eau physiologique stérile.

IV.8 Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycète (Cylindre d'agar)

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées sur milieu ISP2 et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Des cylindres de 3 mm de diamètre sont coupés et placés sur le milieu PDA, préalablement, ensemencé à l'aide des écouvillons par des suspensions fongiques des souches tests. Les boîtes sont laissées à 4 °C pendant 4 heures, pour une bonne diffusion du métabolite antifongique, puis incubées à 28 °C.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 48 heures d'incubation pour les champignons cibles (**Lemriss *et al.*, 2003**).

IV.9 Production du métabolite secondaire

IV.9.1 Fermentation sur milieu solide

Les souches A7 et A6, retenues parmi les 30 souches d'actinomycètes testées après avoir donné des activités antifongiques importants avec la méthode de cylindre d'agar ,sont ensemencées en stries serrées sur milieu AF stérile, à l'aide d'une anse de platine puis incubé à 28°C pendant 14 à 21 jours.

IV.9.2 Fermentation en milieu liquide

Dans des Erlenmeyers de 250 mL de volume, une colonie de chaque souche d'actinomycètes est ensemencée dans 50 mL du milieu Actinomycète fermentation liquide (voir annexe).

Les cultures sont incubées dans un bain-marie, mené d'un système d'agitation de va et vient, à 28°C pendant 48 heures. Ces cultures sont considérées comme pieds de cuve, elles sont entièrement versées dans un autre Erlenmeyer de 500 mL de volume contenant 200 mL du milieu AF liquide. Ces nouvelles cultures sont, également, incubées dans un bain-marie agité à 28°C pendant 7jours.

IV.10 Extraction des métabolites

IV.10.1 Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide

Les deux isolats retenus dans cette étude (A6 et A7) sont ensemencés en stries serrées sur milieu AF. Après incubation à 28°C pendant 14jours, la gélose est fragmentée puis reparti dans des flacons stériles contenant 25 ml de méthanol a raison de chaque boîte. Les

flacons sont ensuite laissés à température ambiante pendant 2 heures avec agitation vigoureuse.

Les extraits sont filtrés en utilisant le papier Wattman afin d'éliminer les cellules vivantes. Les filtrats sont entraînés dans une centrifugation à 11000 g pendant 10 mn (Boughachiche, 2012).

IV.10.2 Extraction des métabolites de fermentation en milieu liquide

Après 9 jours d'incubation dans un bain marie à agitation, les cultures en Erlenmeyer sont centrifugées à 5000g pendant 15 min. Le surnageant récupéré et ensuit mélangé avec le méthanol.

Après séparation des phases dans les ampoules à décanter, les parties organiques obtenues pour chaque souche sont concentrées par évaporation au rota vapeur à 40°C (Boudmaghe 2007).

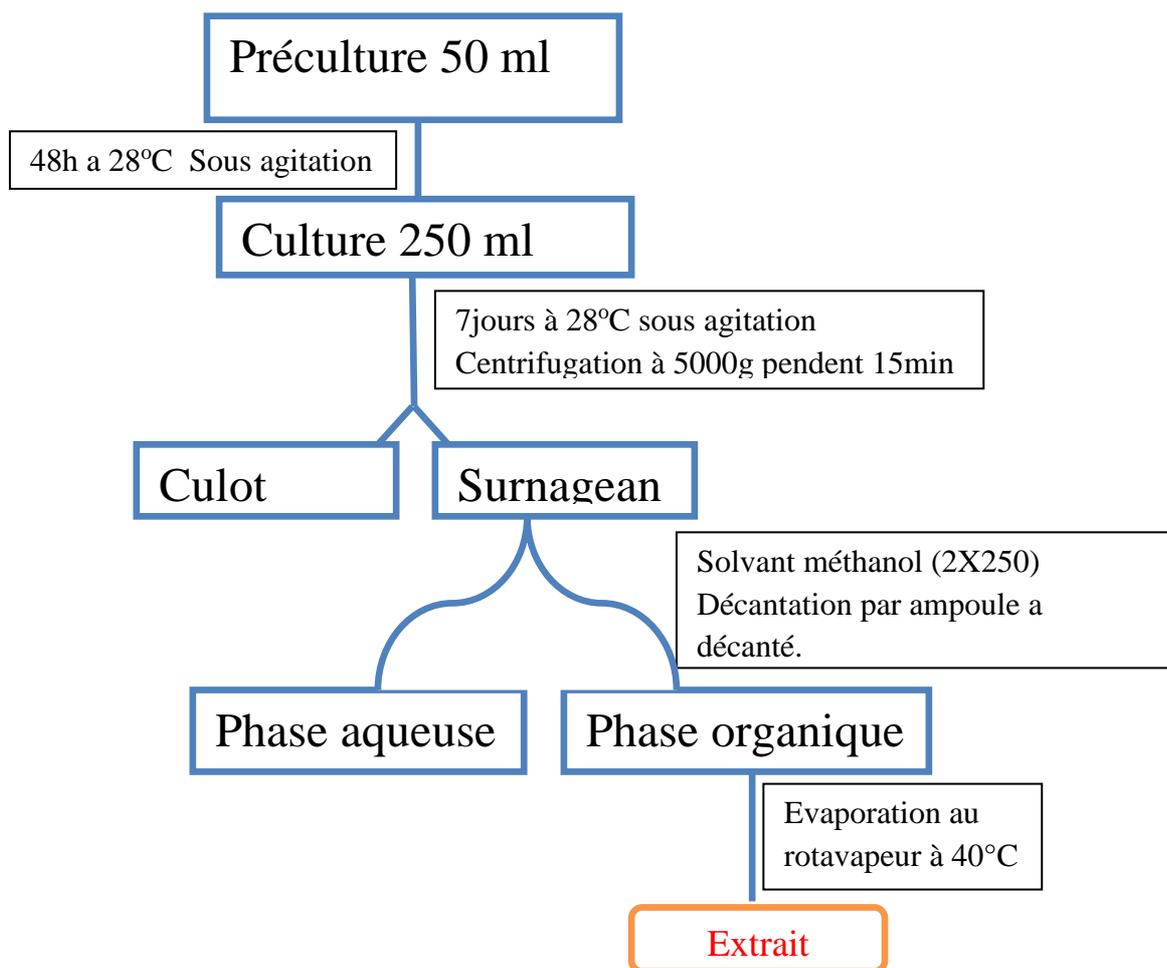


Figure 14: méthode d'extraction des métabolites en milieu liquide

IV.11 Tests de l'activité antifongique des extraits

Les extraits des souches actives sont testés pour leur activité antifongique par la technique de contacte directe selon Laghchimi et al. (2014)

Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes A6 et A7 dans le milieu de culture sur la croissance des souches fongiques (*A.niger*, *A.flavus*, *Cladosporium*, *A. Alternata* et *candida albicans*). Une série des dilutions (de 0.5 à 8 mg/ml) est préparée en suspension avec le milieu de culture, à partir de la solution mère par addition des volumes variables de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes. Dans des flacons contenant chacun 250ml de milieu de culture PDA stérilisé à l'autoclave (20 minutes à 120 °C) et maintenus en surfusion à 45, on ajoute aseptiquement 1ml de l'Acide lactique diluer à 25% pour but d'inhiber les souches bactérienne.

Dans des tubes à essais on verse 20 ml du milieu PDA préparé préalablement, on ajoute l'extrait avec différent volume de tel façon à obtenir les dilutions (0,5, 1, 2, 4 et 8mg/ml). Des témoins, contenant 20 mL de milieu de culture PDA seule, sont également préparés.

Puis on les agite convenablement à l'aide du vortex avant de les répartir dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 20 ml de mélange par boîte. Après solidification, les boites préparées sontensemencées au centre de la surface du milieu gélosé avec un disque de mycélium (6 mm de diamètre) prélevé de manière stérile à l'aide d'une aiguille à partir du périphérique de cultures âgées de 7 jours. Les boites sont ensuite incubées à l'obscurité à une température de 28 °C pendant 5 jours. La croissance mycélienne est suivie en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le centre de chaque boite.

L'activité inhibitrice de l'extraits A6 contre *candida albicans* a été testé en utilisant la technique des puits et avec la gamme de concentration de 0.5, 1, 2, 4, 8mg/ml et un témoin est versé avec le méthanol. Ce teste est réalise sur gélose de Sabouraud.

La fongitoxicité, exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance de mycélium (I%), est calculé selon la formule de **Pandey et al. (2000)**.

Les souches fongiques sont ajustées à 10^{-6} à l'aide d'un spectrophotomètre.

$$I(\%) = \frac{D_t - D_i}{D_t} \times 100$$

D_t : diamètres de culture des champignons sans l'extrait,
D_i : diamètre de la culture de même champignons dans un milieu en présence de l'extrait.

IV.12 Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique

Les deux actinomycètes actives A6 et A7 sont ensemencés en surface par stries serrées sur milieu AF puis incubées pendant 7 jours à 28°C. A l'aide d'un emporte-pièce, des disques d'agar d'environ 3 mm de diamètre contenant la culture des souches sont recueillis à partir de chaque culture.

Quatre lots de boîtes de Pétri sont préparés, le premier lot est composé de deux boîtes de milieu PDA ensemencé dans la masse par *A. niger* et *A. flavus* et contenant 50 µg/ml d'ergostérol. Le second est constitué de deux boîtes de milieu PDA sans ergostérol. Les disques d'agar préparés, précédemment, sont déposés sur les deux types de boîtes, puis laissées à +4°C pendant 4 heures pour faciliter la diffusion des substances. Après incubation à 28°C pendant 48 heures, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle (Hacène, 1994).

IV.13. caractérisation préliminaire de l'agent antifongique par CCM

Principe

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'absorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille en plastique ou en aluminium. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Chaque tache détectée ou révélée est caractérisée par sa référence frontale donnée par la relation suivante (Randerath, 1971 ; Vernin, 1970 ; Andriambololona, 2010).

$$RF = \frac{X}{Y}$$

Rf: Rapport frontale.

X : Distance parcourue par le produit

Y: Distance parcourue par le solvant

Préparation de la plaque

Une ligne de dépôt des extraits est tracée à environ 1cm du bord inférieur de la plaque. Puis les échantillons en solution sont déposés sous forme de trait sur la ligne de dépôt à l'aide d'un capillaire. Ils sont espacés de 1cm. Les dépôts sont séchés immédiatement puis vérifiés sous UV pour s'assurer que la quantité déposée est bien suffisante.

➤ **Saturation de la cuve**

Le système de solvants est versé dans la cuve 15 minutes avant l'élution. Ceci a pour effet de saturer l'atmosphère de la cuve.

Mode opératoire

Dix microlitres de chaque extrait méthanoïque des souches actinomycétales A6, A7 sont déposés à l'aide d'une micro seringue sur des plaques de CCM en plastique (6cm × 6 cm) étalées par une couche mince de gel de silice GF254.

Ces plaques sont ensuite maintenues verticaux dans des cuves de CCM contenant les systèmes de solvants suivants:

- Toluène-acétone (6 :4)
- Toluène- acide acétique (8 :2)
- N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1)
- Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4)
- Toluène- méthanol (5 :5) (**Boughachiche, 2012**).
- Déchlorométhane –méthanol (8,2) (**Andriambololona, 2010**).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance à partir du point de dépôt. Après élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV à deux longueurs d'onde différentes 254 nm et 365 nm (**Boughachiche, 2012**).

➤ **Développement du chromatogramme**

La plaque est placée en position presque verticale dans la cuve contenant le solvant de chromatographie, puis la cuve est fermée et le solvant migre par capillarité vers le haut le long de la plaque. Lorsque le front de solvant se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve et séchée à l'aide d'un séchoir.

➤ Révélation

La plaque est d'abord observée sous lumière UV aux longueurs d'onde 254nm et 365nm. Les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres.

Les chromatogrammes sont révélés par pulvérisation de la plaque à la vanilline sulfurique (H₂SO₄), la ninhydrine et les cristaux d'iode (les molécules bioactives se colorent en brun) (**Tableau N° 6**).

Tableau 6: représente la Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince.

Révélateur chimique	Mode préparatoire	Molécules chimiques révélées	Conditions de révélation	Références
Vanilline	3 % vanilline, 1,5 % acide sulfurique, éthanol à 95 %	Les éthers	110 °C pendant 3-5 min	Geshva et al., 2004
Ninhydrine	Exemple : Préparation d'une solution de 0,3% de ninhydrine. 0,3% ninhydrine, 100 ml n-butanol.	Molécules portant des résidus amines (primaires et secondaire)	80°C pendant 3-5min	Li et al, 2006
Cristaux d'iode	Une cuve en verre hermétique Préalablement saturée par les vapeurs des cristaux d'iodes	Les lipides	Juste à l'apparition des taches jaunes-marron	Parsons et pattons, 1967

V.1 Isolement et dénombrement des actinomycètes

Les échantillons du sol sont prélevés au niveau de la zone aride située dans la wilaya d'ElBayadh.

L'isolement des souches d'actinomycètes a été effectué sur trois milieux (Bennett, GLM et ISP2), additionnés d'agents sélectifs convenables.

Quatre souches d'actinomycètes sont isolées. Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhèrent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat (**Shirling et Gottlieb 1966**). Toutes les colonies sont purifiées par repiquage dans le milieu ISP2 et incubées à 28 °C pendant 7 jours.

Les résultats obtenus ont montré que le milieu ISP2 est le plus favorable pour l'isolement. En effet, nos souches ont commencé à montrer l'aspect caractéristique des actinomycètes dès le 3^{eme} jour d'incubation contrairement aux deux autres milieux GLM et Bennett qui n'ont donnés des colonies visibles qu'après le 7^{eme} jour de l'incubation.

V.2 Purification des isolats

Les Quatre colonies obtenues ont été purifiées par repiquage successive. Cette méthode a été réalisée sur le même milieu d'isolement afin d'éviter ou minimiser la période de la phase d'adaptation. **(Figure 15).**

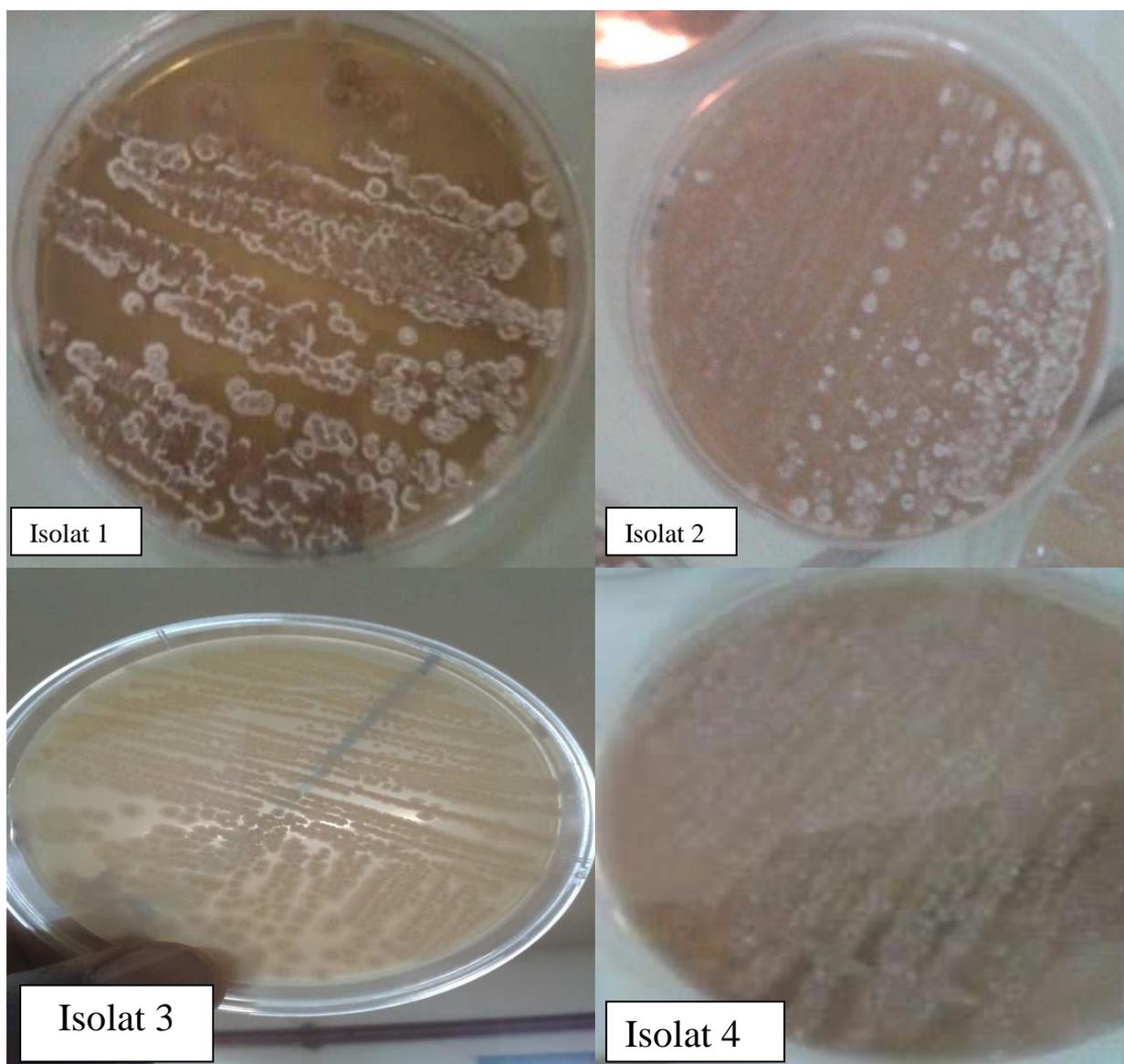


Figure 15: Aspect macroscopique des souches actinomycétales isolées

V.3 Revivification et confirmation d'identité des actinomycètes actives

Les 26 souches d'actinomycètes conservées sont revivifiées sur 3 milieux de culture (ISP2, Bennett et AF) par repiquage en strie serrée ensuite incubées à 28°C pendant 14 jours.

Après 14 jour d'incubation, les résultats montrent des colonies sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat.

Les souches qui ont été cultivées sur le milieu ISP2 ont montré une vitesse de croissance très rapide par rapport à celles cultivées sur les autres milieux.



Figure 16 : souches actinomycétales conservées

V.3.1 Caractérisation morphologique

V.3.1.1 Macromorphologie et caractères cultureux

Les résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des 2 souches actives sont illustrées sur (le tableau 7)

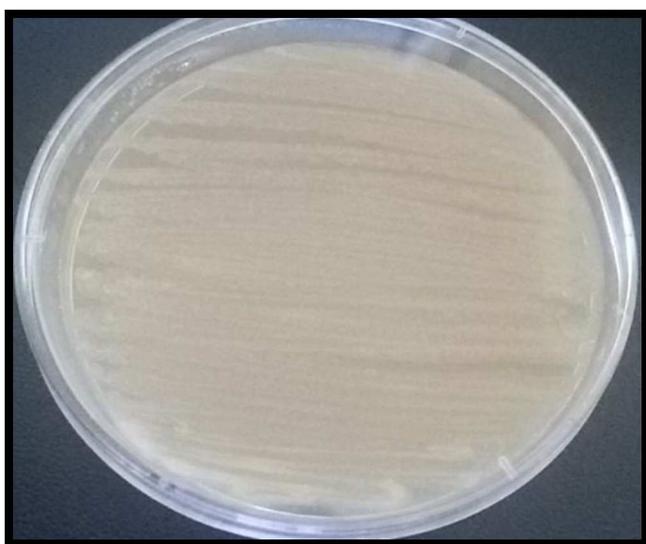
Tableau 7: Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives.

Souches	A6	A7
Milieu de culture	ISP2	ISP2
Couleur de MA	Absent	Blanc Beige
Couleur de MS	Beige	Beige
Pigmentation	Absent	Beige

Résultats et interprétation

Après ensemencement sur milieu ISP2, les colonies des souches d'actinomycètes actives apparaissent durant deux jours d'incubation à 28°C. A partir du 14^{ème} jour, la souche A6 a donné des colonies poudreuses et circulaires convexes, bossues, à bords ondulés et irréguliers, de taille moyenne de 4 à 7mm, et adhérent fermement au milieu de culture, elles sont difficiles à mettre en suspension avec un mycélium de substrat beige et absence de mycélium aérien.

La souche A7 présente des colonies à bords ondulés et irrégulières, opaques, adhérent au milieu de culture, mycélium de substrat beige, mycélium aérien blanc beige et une pigmentation beige.



A6



A7

Figure 17: Aspect morphologique et caractères culturels des souches A7 et A6

V.3.1.2 Micromorphologie

Une colonie a été prélevée à partir de chacune des souches après une incubation de 7 jours à 28°C. Elle est déposée entre lame et lamelle puis observée au microscope optique à un grossissement de 40 x.

Il apparaît que les deux souches développent un mycélium de substrat avec l'absence de mycélium aérien chez la souche A6. Le mycélium des deux souches se présente sous forme de long filament ramifié.

V.3.1.2.1 Coloration de gram

Après une coloration de gram, les colonies ont montré une couleur violette, ce qui veut dire que les actinomycètes sont de gram positif (**voire figure 18**).

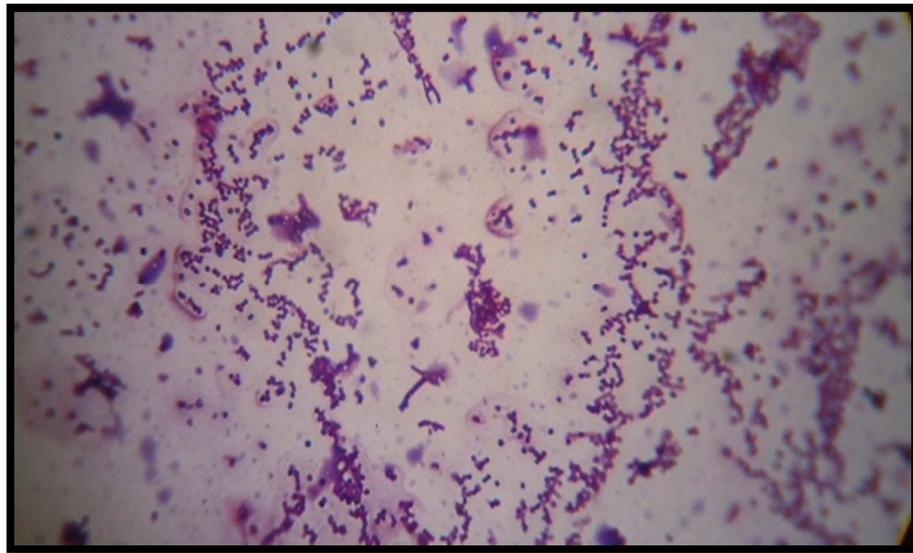


Figure 18: observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram

V.3.2 Cratérisation biochimique

V.3.2.1. Recherches de catalase

Le résultat de la recherche de catalase a montré des bulles d'air ou une mousse qui se présente dans l'eau oxygénée donc catalase positif.

V.4 Choix de milieu de culture

Les isolats sont cultivés sur différents milieux de culture, y compris ISP2, GLM et AF, les résultats sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : résultats du choix de milieu de culture favorable.

Temps	Milieu	A7	A6
1 à 3 jours	ISP2	+	+
	GLM	-	-
	AF	-	-
	Bennett	-	-
4 à 6 jours	ISP2	++	++
	GLM	-	-
	AF	-	-
	Bennett	-	-
7 à 14 jours	ISP2	+++	+++
	GLM	+++	+++
	AF	+++	+++
	Bennett	+++	+++

(+):Faible croissance. (++) : Croissance Moyenne. (+++): Forte croissance.(-):Absence des colonies.

Le milieu ISP2 a permis une croissance faible des colonies dans les 3 premiers jours en revanche les autres milieux n'ont montré aucune croissance.

Une augmentation moyenne des colonies est observée, sur ISP2, entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour avec une absence des colonies, toujours, sur les autres milieux.

Une croissance importante est remarquée à partir de la 7^{ème} sur les milieux ISP2 et GLM, alors qu'elle est restée moins importante sur les milieux AF et Bennett.

V.5 Purification et Confirmation de l'identité des souches fongiques cibles

Les souches cible sont repiqué successivement sur PDA, les aspects morphologique de ces souches fongique a été étudié (voir figure 19).

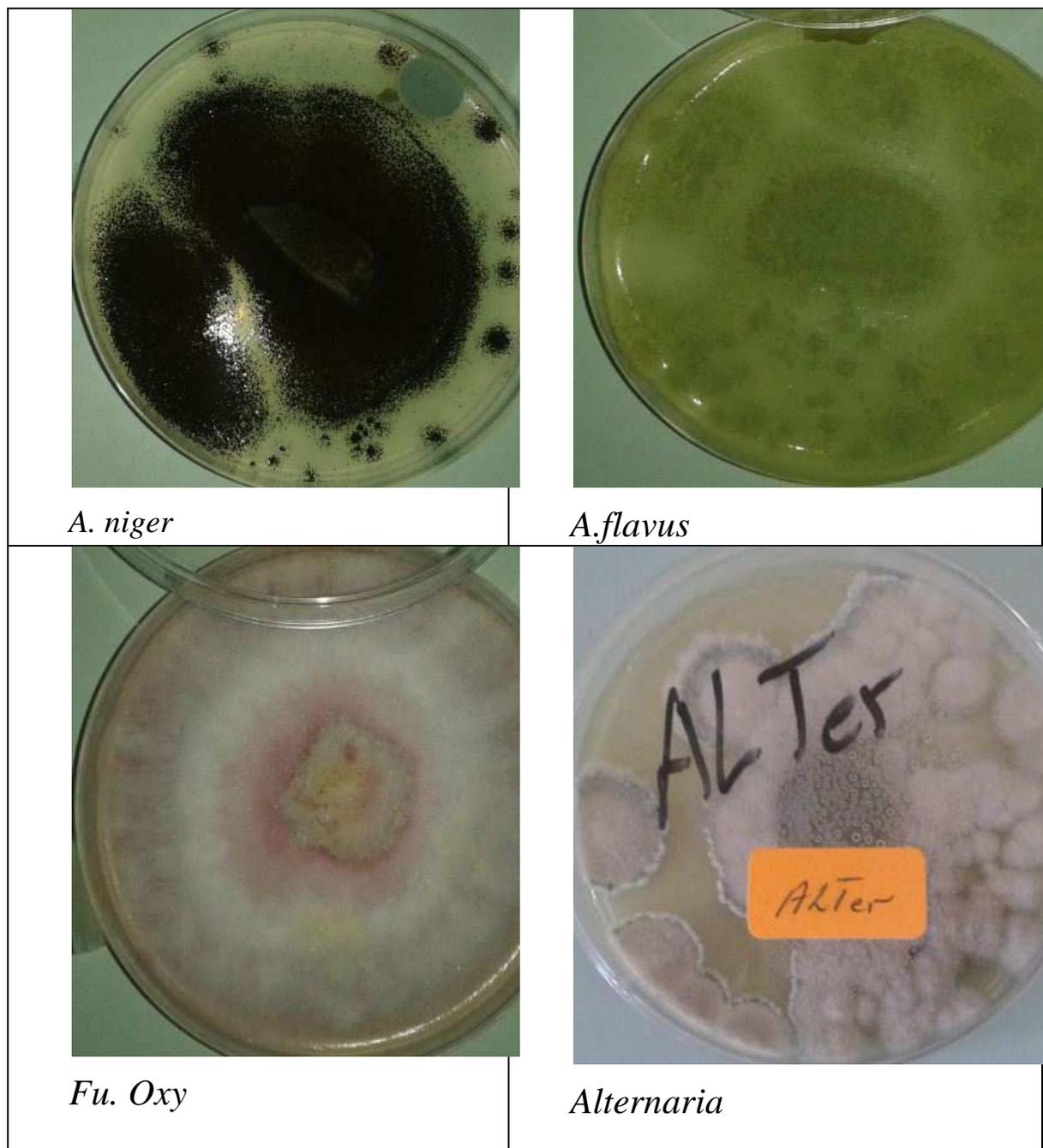


Figure 19 : aspect macroscopique de certaines souches fongique cibles

Résultats et interprétation

Durant les 5 jours d'incubation à 28°C, *Aspergillus niger* montrés des colonies d'abord blanches, puis jaunes et enfin granuleuses noires. Sous microscope, en utilisant la méthode de scotch, nous avons constaté la présence des conidies globuleuses, brunes, échenillées, disposées en chaîne.

Aspergillus flavus montre des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaune sur le milieu PDA. L'aspect microscopique présente des conidies globuleuses à subglobuleuses, vertes pâles et échenillées.

Les colonies de *Cladosporium* apparaissent blanchâtre, mais vire au vert grisâtre, puis au jaune verdâtre foncé pour finir en vert jaunâtre très foncé. Le centre est légèrement plus élevé, de couleur plus claire, d'aspect laineux, alors que le reste de la colonie est d'un fin velouté ras. La marge de la colonie est blanc verdâtre, alors que sous microscope les hyphes sont septes, les conidies et les conidiospores sont bien interprétés.

Alternaria a montré un thalle ras verdâtre, revers de boîte noir. Il a présenté des blastopores pluricellulaires bruns de grande taille, septes transversalement et longitudinalement, bec apical spécifique présentant un pore. (Figure 20).

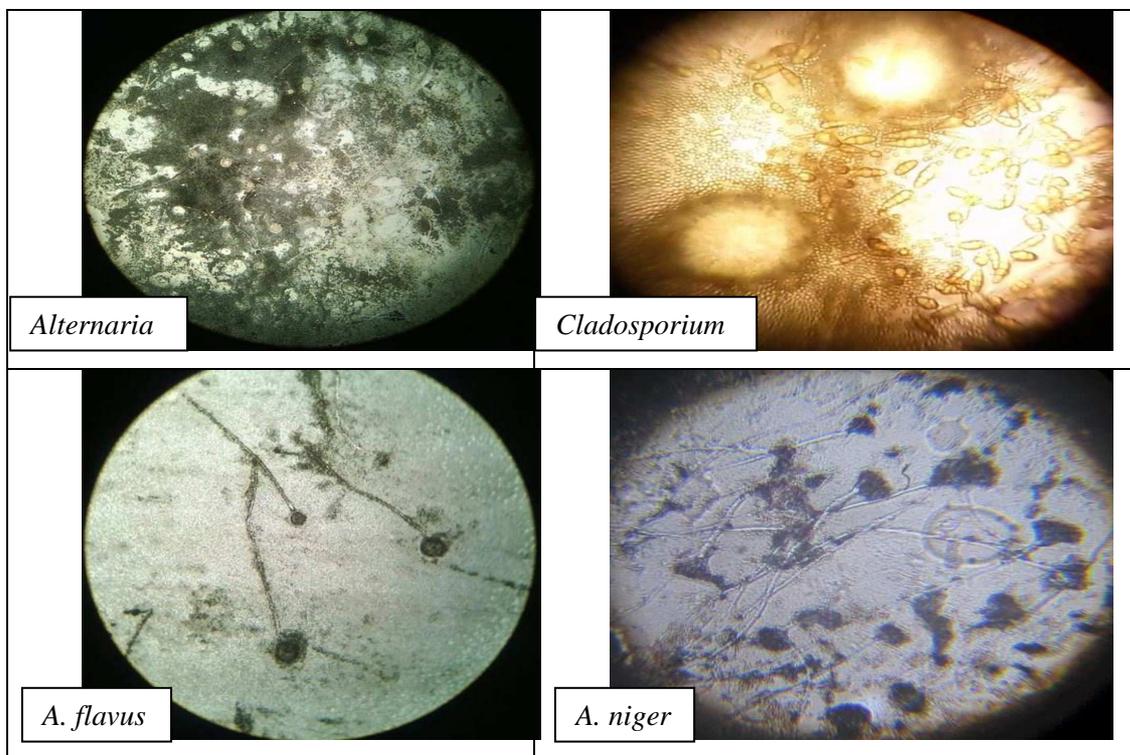


Figure 20 : aspect microscopique des souches fongiques cibles (Gx40).

V.6 Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycète

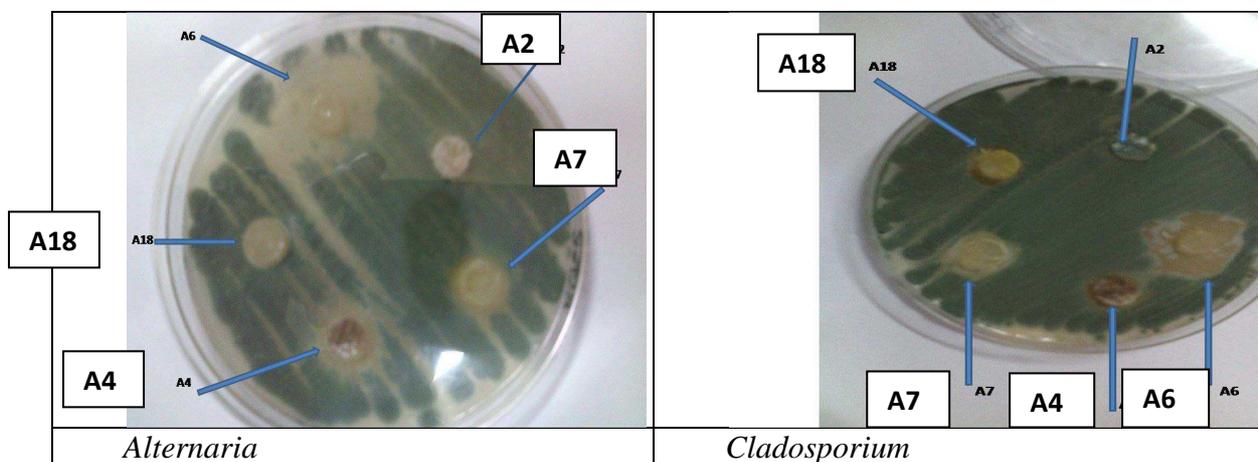
Dans le but de sélectionner des souches d'actinomycètes ayant le pouvoir de produire des molécules qui sont capables d'inhiber certaines souches fongiques. Le test de cylindre d'agar est utilisé dont les résultats sont représentées dans le (tableau 9)

Tableau 9: pouvoir antifongique des actinomycètes obtenus par la technique de cylindre d'agar.

Actinomycètes	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				
	<i>Alternaria</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>A.niger</i>
A2	0	0	0	0	0
A4	13	0	0	0	0
A6	25	25	24	0	18
A7	13	17	14	0	21
A18	11	0	14	0	0

Les résultats du test antifongique obtenus montrent que les 4 souches d'actinomycète A4, A6, A7 et A18 présentent un effet inhibiteur contre au moins une souche fongique parmi les 5 utilisées dans cette étude. Les souches A6 et A7 ont montré un pouvoir inhibiteur important avec toutes les souches fongique à l'exception de *Rhizopus*. Cette dernière n'est inhibée par aucune souche actinomycétales.

La souche A2 n'a inhibé aucune souche fongique, alors que la souche A4 a pu inhiber seulement la souche *Alternaria*, avec une zone d'inhibition de 13mm de diamètre. Les souches A7 et A18 ont montré un pouvoir inhibiteur contre *Alternaria* et *Cladosporium* (figure 21)



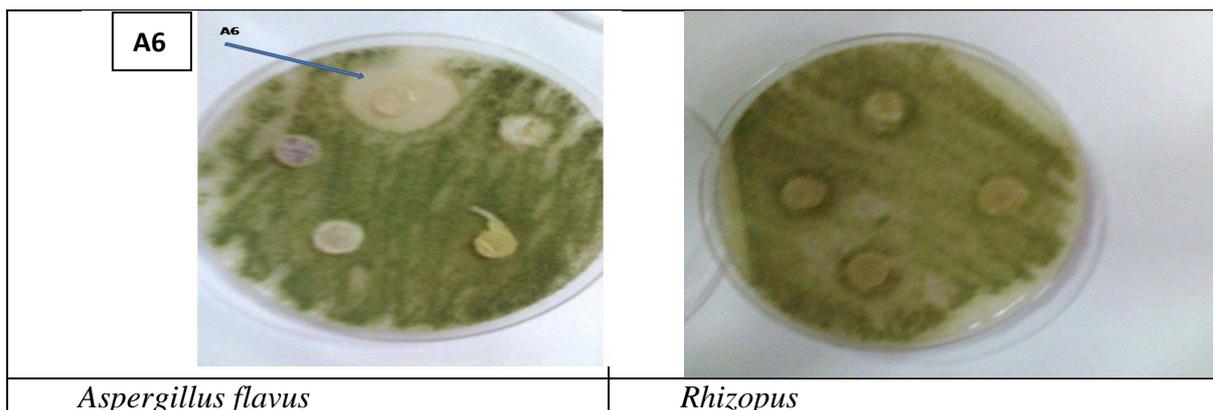


Figure 21 : résultat de la technique de cylindre d'agar

V.7 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). Le milieu AF (Actinomycètes Fermentation) est utilisé dans ces deux états solide et liquide.

V.7.1 Fermentation sur milieu solide

Les souches d'actinomycètes retenues, après avoir montré un pouvoir inhibiteur important lors du test de cylindre d'Agar, sontensemencées dans des boites de Pétri contenant le milieu AF (10 boites pour chaque souche), puis incubées à 28⁰ C pendant 14 jours.

Après l'incubation, les milieux produisant des métabolites sont fragmentés dans des flacons contenant du méthanol (20 lm pour chaque boite). Ce dernier est utilisé comme un solvant d'extraction. Les flacons subissent une agitation rigoureuse pendant 2 heures. Le mélange obtenu subi par la suite une filtration du contenant, puis une centrifugation à 11000 g pendant 10 min. (Figure 22)

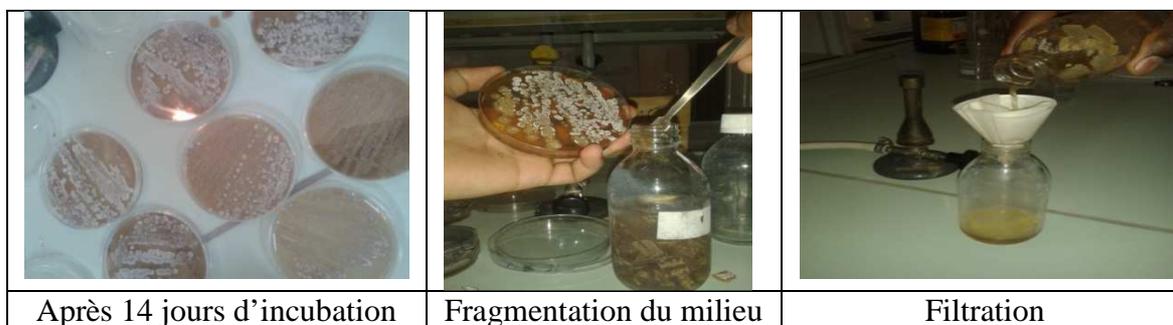


Figure 22 : étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide

V.7.2 Fermentation en milieu liquide

Après une durée d'incubation de 7 jours, sous agitation, les métabolites produits par chaque souche sont récupérés par le méthanol. Les contenus des Erlenmeyers sont mis dans une ampoule à décanter pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. Cette dernière subit une centrifugation.

La **figure 23** représente une étape de la fermentation, qui est l'incubation, sous agitation, dans un bain marie.



Figure 23 : la fermentation liquide dans des Erlenmeyer.

Durant la période d'incubation, des changements de la couleur et de l'aspect du milieu sont observés. Le milieu contenant la souche A6 est devenu jaune foncé alors que celui contenant la souche A7 prend la couleur marron foncée. La présence de la mousse est remarquée dès les premiers 2 jours chez la souche A7 alors qu'on a remarqué l'absence de ce phénomène chez la souche A6.

V.8 Tests de l'activité antifongique des extraits

V.8.1 Technique de contact directe ou de dilution

Il s'agit de l'incorporation de l'extrait à différentes concentrations avec le milieu de culture et le suivi de la croissance par rapport à un témoin.

Test antifongique de l'extrait de la souche A7 :

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de la souche A7 sur la croissance mycélienne des quatre champignons, après une période d'incubation de 5 jours sont regroupés dans la figure suivante.

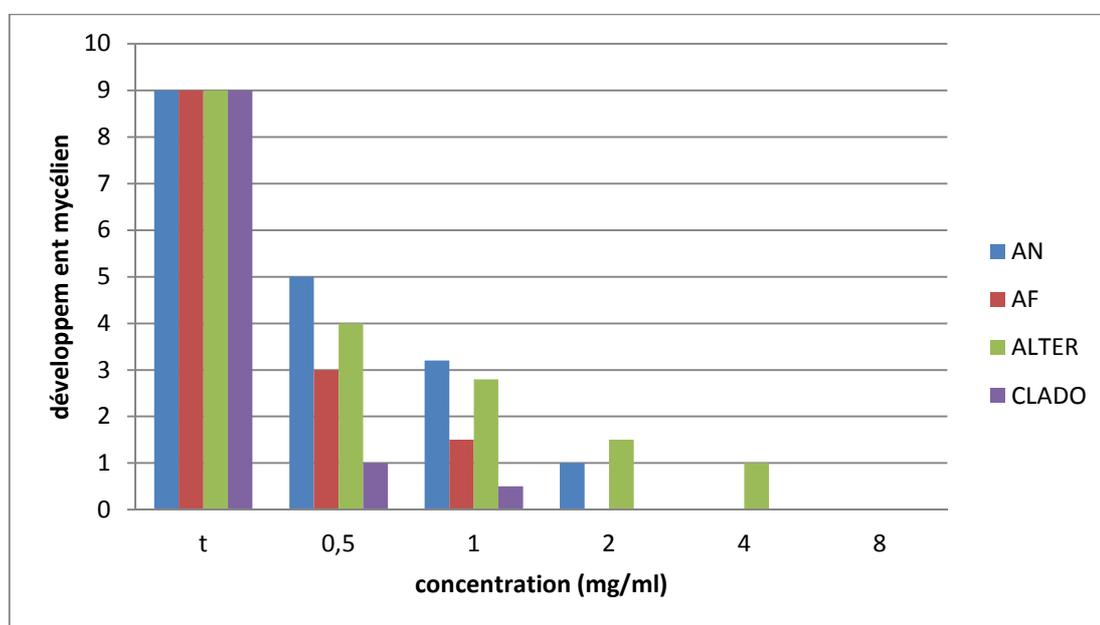


Figure 24 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche A7

Les résultats obtenus montrent qu'à une concentration de 8mg/ml toutes les souches fongiques sont inhibées totalement, ainsi qu'avec une concentration de 4mg/ml toutes les souches ont présenté une croissance à l'exception d'*Alternaria* qui donne une croissance radiale de 1cm. Les souches *Cladosporium* et *A.flavus* n'ont montré aucune croissance à la concentration de 2mg/ml de l'extrait dans le milieu. A cette dernière concentration *A. niger* et *Alternaria* ont donné une croissance de 1 et 1,5 de diamètre respectivement.

Dans les concentrations (0,5 et 1mg/ml) les quatre souches fongiques ont donné une croissance mycélienne qui augmente chaque fois en diminuant les concentrations

Résultats de la détermination de la CMF de la souche A7

Les Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A7 sont présentés dans le (tableau 10)

Tableau 10: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A7

Concentration (mg/ml)	Espèces fongiques testes			
	<i>A .niger</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>
8	100%	100%	100%	100%
4	100%	100%	100%	88%
2	88%	100%	100%	83%
1	64%	83%	88%	68%
0.5	44%	66%	66%	55%

Le calcul du pourcentage d'inhibition mycélienne a montré que *A.flavus* et *Cladosporium* sont totalement inhibées par une concentration de 2 mg/ml. C'est la concentration minimale fongicide. Pour *A. niger* et *Cladosporium*, les concentrations minimales fongicides sont de 4mg/ml et 8mg/ml respectivement.

Test antifongique de l'extrait de la souche A6

Les résultats de ce test ont montré qu'à une concentration de 8mg/ml aucune croissance n'est marquée chez les quatre souches fongiques cibles (tableau 11). Cependant, à une concentration de l'extrait de l'ordre de 4 mg/ml seule la souche *Alternaria* a montré une croissance. La souche fongique *A. flavus* n'a montré une croissance qu'à une concentration de 2 mg/ml, à cette concentration nous avons marqué l'absence de la croissance chez les deux espèces *A. niger* et *Cladosporium*. Ce dernier s'avère le plus sensibles à nos extraits car sa croissance a été totalement inhibée à partir d'une concentration de 1mg/ml de l'extrait méthanolique des métabolites de la souche A6.

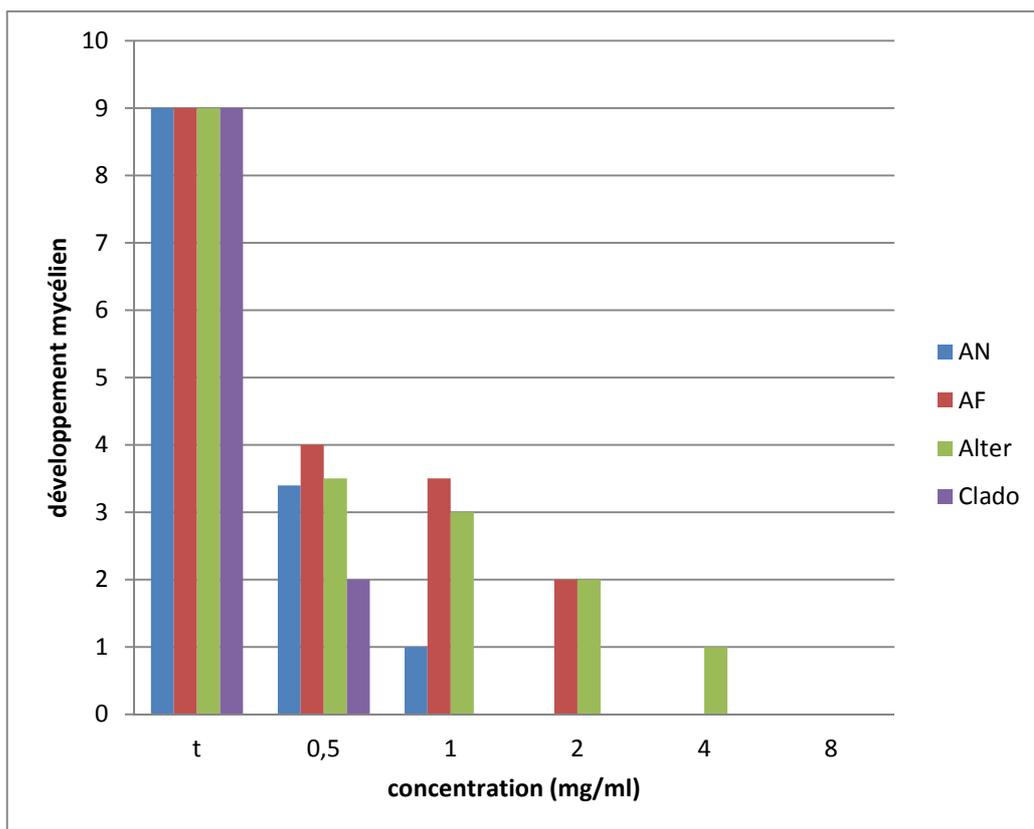


Figure 25 : diamètres de développement mycélien sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait de la souche A6

Résultats de la détermination de la CMF de la souche A6

Les Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A6 sont présentés dans le (tableau 11)

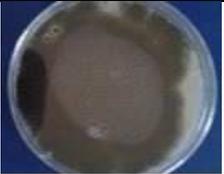
Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A6.

Concentration (mg/ml)	Espèces fongiques testes			
	<i>A .niger</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>
8	100%	100%	100%	100%
4	100%	100%	100%	88%
2	100%	77%	100%	77%
1	88%	61%	100%	66%
0.5	62%	55%	77%	61%

Résultats et interprétation

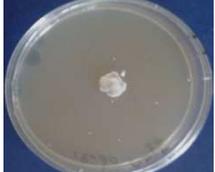
En se basant sur les résultats obtenus, il est clair que l'extrait issu de la souche A6 présente une activité antifongique importante. Cela est visiblement remarqué sur *Cladosporium* en inhibant sa croissance totalement à partir d'une concentration minimale fongicide (CMF) de 1mg/ml. Pour *A. niger* la CMF est de 2mg/ml alors que l'espèce *A. flavus* a montré l'absence totale de croissance à une CMF de 4mg/ml.

Les tableaux (12 à 15) : développement mycélien des quatre souches fongique testées vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait.

Concentration (mg/ml)	00	0.5	2	4
<i>A.niger</i>				

Concentration (mg/ml)	00	0.5	1	2
<i>A.flavus</i>				

Concentration (mg/ml)	00	2	4	8
<i>Alternaria</i>				

Concentration (mg/ml)	00	0.5	1	2
<i>Cladosporium</i>				

V.8.2. Teste de l'activité de l'extrait A6 contre *Candida albicans* (technique des puits)

Un test de sensibilité de *Candida albicans* contre nos extraits a montré qu'elle est sensible à l'extrait A6 et résistante à l'extrait A7.

Les deux souches (*Candida albicans* ATTC 26790 et *Candida albicans* ATTC 10231) sont ensemencées par écouvillons sur gélose Sabouraud, 20µl de l'extrait A6 à des différentes concentrations est versé dans les puits. Après une incubation pendant 24h à 37°C, les résultats sont illustrés dans le courbe suivant.

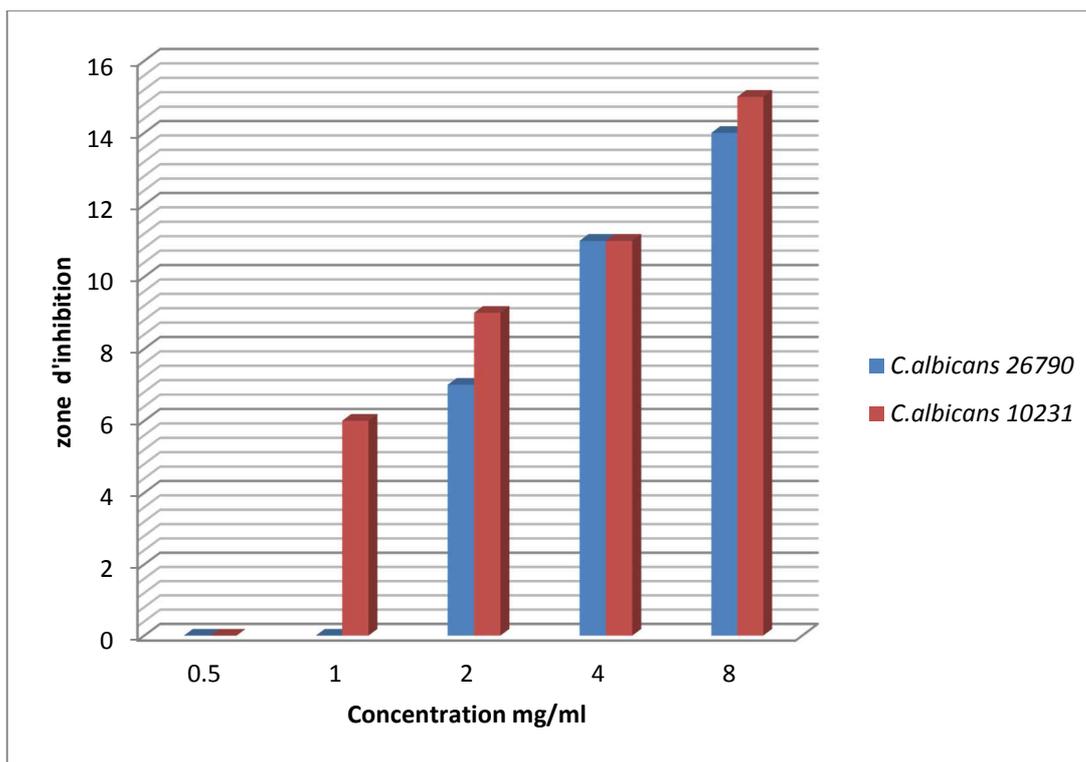


Figure 26 : comparaison entre les zones d'inhibition des deux souches *C. albicans*.

Selon les résultats obtenus, les zones d'inhibition augmentent avec l'augmentation de la concentration de l'extrait chez les deux souches testées. Avec une première concentration de 0.5mg/ml l'extrait n'a pas donné une zone, alors qu'à partir de 1 mg/ml une zone d'inhibition de 6mm apparaît chez *C. albicans* 10231 et augmente avec l'augmentation de la concentration. Chez *C. albicans* 26790 une zone de 7mm apparaît à une concentration de 2mg/ml.

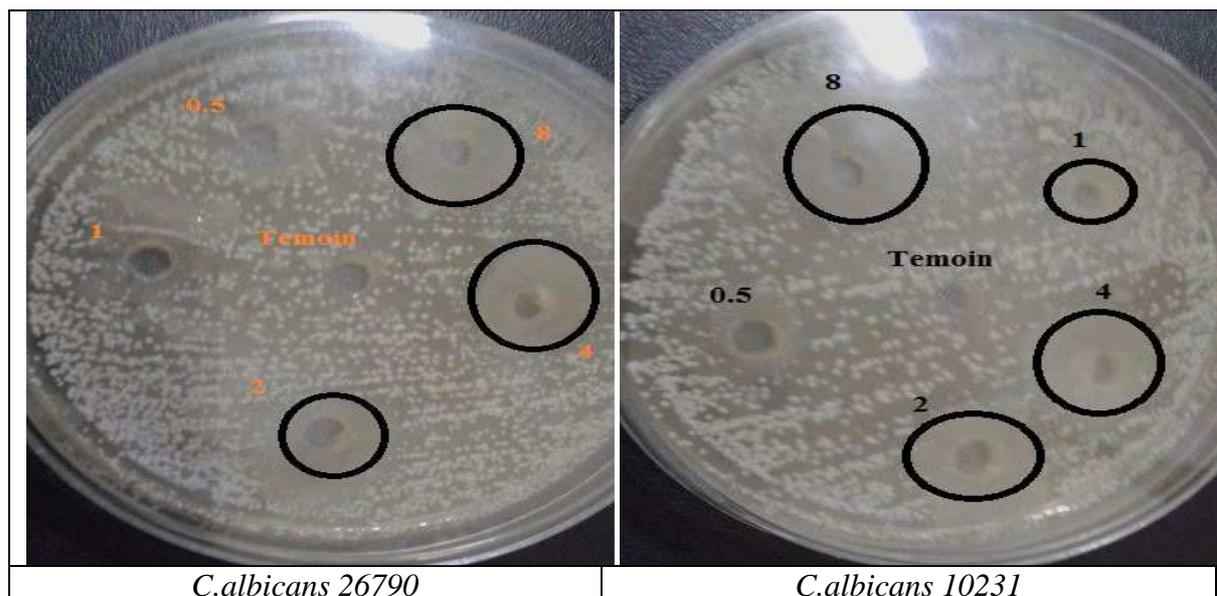


Figure 27 : activité de l'extrait A6 sur les souches de candida (techniques des puits)

V.9 Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique

Le test de l'ergostérol consiste à révéler l'effet des molécules actives sur les stérols membranaires, en se basant sur les diamètres des zones d'inhibition provoquées par les actinomycètes contre des souches fongiques sur un milieu avec et sans ergostérol. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 16: résultats de l'effet antifongique en présence de l'ergostérol.

Actinomycète Souches fongiques	Zone d'inhibition donnée par A6 (mm)		Zone d'inhibition donnée par A7 (mm)	
	Sans ergostérol	Avec ergostérol	Avec ergostérol	Sans ergostérol
<i>Aspergillus niger</i>	24	21	17	17
<i>Aspergillus flavus</i>	25	20	15	15

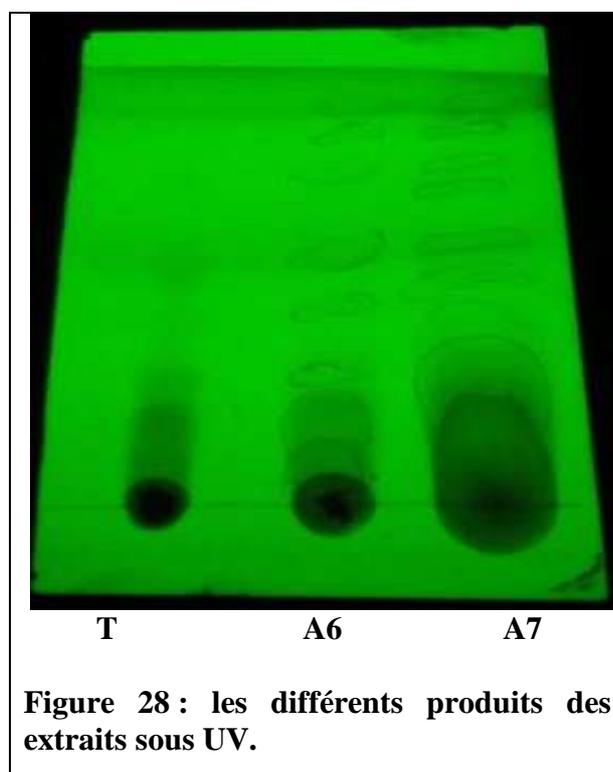
Les résultats montrent que le diamètre de la zone d'inhibition exercée par la souche actinomycétale A6 a subi une diminution en présence de l'ergostérol dans le milieu de culture préalablement ensemencé par les deux souches fongiques (*Aspergillus Niger* et *Aspergillus Flavus*). Pour *Aspergillus Niger*, la souche A6 a donné une zone de diamètre de 24 mm dans un milieu dépourvu de l'ergostérol, alors que la zone diminue, en ajoutant de l'ergostérol, à une valeur de 21 mm. Le même effet est observé pour *Aspergillus flavus*, où la zone diminue de 25 mm à 20 mm en ajoutant de l'ergostérol.

La souche A7 a donné des diamètres des zones d'inhibition identiques, en absence et en présence de l'ergostérol contre *Aspergillus Niger* et contre *Aspergillus flavus*.

V.10. résultats de la caractérisation partielle des métabolites par CCM

Après extraction par méthanol et le choix du meilleur système de solvant parmi les systèmes testés : (Toluène-acétone (6 :4), Toluène- acide acétique (8 :2) N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1), Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4), Toluène- méthanol (5 :5) Déchlorométhane –méthanol (8,2)), est analysé par bioautographie sur couche mince (séparation des produits de l'extrait).

Les résultats ont montré que la meilleur séparation des produits de l'extrait a été donnée par le système d'éluent Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4) les résultats sont représentés dans la figure 28 :



Résultats et interprétation

Les résultats de la CCM montrent que l'extrait de la souche A7 qui est disposée à gauche est constituée de 9 composés qui ont migré chacun avec sa polarité, alors l'extrait de A6 est constituée de 8 composés, le rapport frontale de chacun de ses composés est illustré dans le tableau suivant :

Tableau 17: résultat de la chromatographie sur couche mince

Les extraits	A7	A6
Les spots	RF	RF
1ere spot	0.21	0.1
2eme spot	0.35	0.21
3eme spot	0.40	0.28
4eme spot	0.47	0.42
5eme spot	0.57	0.54
6eme spot	0.70	0.75
7eme spot	0.75	0.85
8eme spot	0.85	0.91
9eme spot	0.91	-

Les résultats ont montré que les 3 derrière spots des deux extraits ont les mêmes rapports frontale respectivement RF= (0.91, 0,85 et 0,75) alors que le 1^{er} spot de l'extrait de A7 et le 2^{eme} spot de l'extrait de A6 ont une même RF=0.21. Tous les spots des deux extraits ont presque la même couleur qui est jaune foncé.

Discussion

Les actinomycètes sont considérés comme productrices des substances bioactives ayant une activité antimicrobienne importante. Ils sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures.

Les Actinomycètes en général, et plus particulièrement les *Streptomyces* ont une importance médicale et industrielle parce qu'ils synthétisent des antibiotiques de structures très diverses et en quantité abondante. En effet, plus de cinquante antibiotiques différents ont été détectés dans le genre de *Streptomyces*, y compris la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines (**Goodfellow et Williams, 1983**).

A ces antibiotiques dans le champ d'application s'étend non seulement aux divers domaines thérapeutique humaine et vétérinaire mais aussi à l'agriculture, s'ajoutent d'autres produits comme des enzymes et lorsque ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose...), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases. Et des inhibiteurs d'enzyme dont certains manifestent des activités pharmacologiques soulignant encore l'intérêt de ces microorganismes (**Theilleux, 1993**).

Dans notre travail, on est intéressé par la recherche des souches d'actinomycètes qui montrent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des souches fongiques. Pour réaliser ce travail, des échantillons du sol ont été prélevés d'une zone aride située à 40 km de la Wilaya d'Al Bayadh, en même temps, des souches actinomycétales, déjà isolées et conservées dans des travaux antérieurs, sont revivifiées sur différents milieux. Les travaux d'isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols arides sont relativement récentes et rares (**Hacène et al., 1994, Ouhdouch et al., 2001, Zitouni et al., 2005**).

L'échantillon isolé à partir de la zone aride a subi un enrichissement avec CaCO₃, qui a pour rôle de favoriser la sporulation et augmenter jusqu'à 100 fois le nombre d'actinomycètes par rapport au témoin non traité par CaCO₃ (**Cavalla et Eberlin, 1994**). Cependant, **Kitouni (2007)** a prouvé que le nombre d'actinomycètes augmente en le

traitant avec du CaCO₃ jusqu'à 16,199 105 UFC/ g par rapport à 7,809 105 UFC/ g des sols non traités.

L'isolement des souches actinomycétales a été fait dans trois milieux : GLM, Bennet, AF et ISP2, additionnés des agents sélectifs. **Boudmagh (2007)** a utilisé un mélange des agents antifongiques et antibactériens pour inhiber la flore indésirables lors d'un isolement des actinomycètes. En effet, l'actidione (cycloheximide) à 50 – 100 µg/mL et la nystatine à une concentration de 50 µg/ml sont les antifongiques les plus utilisés comme additifs dans les milieux d'isolement des actinomycètes (**Dulaney et al., 1955 ; Porter et al., 1960**).

Les antibactériens les plus utilisés dans l'isolement sélectif des actinomycètes, sont la polymyxine à 5µg/ml, la pénicilline à 1µg/ml et l'acide nalidixique à 10µg/ml (**Williams et Davies, 1965 ; Takizawa et al, 1993 ; Cavala, 1994**).

Les 4 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. En revanche, **Boudmagh (2007)** a montré que le GLM est le meilleur vis-à-vis la croissance et l'apparition des colonies bien différenciées et **Boussaber et al. (2012)** ont utilisé GLM et Bennett pour l'isolement de 25 souches d'actinomycètes possédants une activité antifongique importante.

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*, *Cladosporium sp*, *Rhizopus Alternaria sp*. Et *Candida albicans*26790 et *Candida albicans* 10231.

Sur un total de 30 souches d'actinomycètes testés, 4 souches seulement (A4 ; A6 ; A7 ; A18) ont montré un pouvoir inhibiteur, mais deux seulement (A6 et A7) ont montré un pouvoir inhibiteur contre toutes les souches cibles à l'exception de *Rhizopus*. Ces deux sont retenues suite aux diamètres de leurs zones d'inhibition. **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.

Les deux souches A6 et A7 ont donné des colonies après 24 à 48 heures d'incubation sur le milieu ISP2, et leurs mycéliums aériens apparaissent avec les couleurs blanc beige et beige. Selon **Nodwel et Losick (1998)**, les colonies de *Streptomyces coelicolor* apparaissent après 24 heures d'incubation et selon **Shirling et Gottlieb(1966) ; Williams et Wallington(1984)** les couleurs blanc beige et beige sont considérés comme un critère de détermination de genre *Streptomyces*. Donc ces deux souches A6 et A7 peuvent être rapprochées au genre *Streptomyces*. Cependant ces critères sont insuffisants pour identifier les autres souches d'actinomycètes actives. Selon **Provost et al. 1997 et Kim et al. (1999)**, ces méthodes d'identification ont été abandonnées et remplacées par les techniques moléculaires qui sont souvent utilisées pour leur rapidité et efficacité.

Après 14 jours d'incubation sur milieu AF solide, les deux souches A6 et A7 ont donné des colonies poudreuses et granuleuses. Dans cette étape il y avait une production des métabolites secondaires, qui sont dispersées dans le milieu de culture et sont extraites avec le solvant organique. Puis la culture par fermentation a été macérée avec 25 ml de méthanol pendant 2 heures. La filtration et la centrifugation de l'extrait est indispensable pour débarrasser les cellules vivantes présents dans l'extrait.

Une autre fermentation a été lancée sur milieu AF liquide sous agitation. Après 7 jours d'incubation à 28⁰ C, des mycéliums apparaissent en indiquant une production des métabolites secondaires. 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**). Cette différence est due à la physiologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces se* fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas, 2001**) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin,1999**). Cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide. Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus dans le test de mise en évidence et qui ne sont retrouvés qu'après extraction à partir de milieux solides. D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* comme (**Bussari et al. 2008**).

Les molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes ont été extraites sous l'action d'un solvant organique (méthanol). **Boudmagh(2007)** a fait une comparaison entre les différents solvants d'extraction, il a trouvé que les molécules extraites par le méthanol sont actives contre plusieurs souches pathogènes, y compris *Aspergillus niger* ; *Candida albicans* ; *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'étude de l'activité antifongique des extraits organiques a été faite par la méthode de contact direct, qui est dû à l'incorporation des différentes concentrations dans le milieu avant sa solidification.

La détermination de la concentration minimale fongicide des souches fongiques cibles se fait par une incorporation des différentes concentrations de l'extrait dans le milieu de culture, d'intervalles allant de 0.5 mg/ml à 8 mg/ml. La souche fongique *Cladosporium* est la plus sensible vis-à-vis l'extrait provenant de la souche A6, car elle est inhibé totalement à une concentration de 1 mg/ml. Par contre, *Alternaria* est la plus résistante vis-à-vis cet extrait, car elle n'a pas été inhibé que lorsque la concentration atteint 8 mg/ml. Cependant, *A. flavus* et *A.niger* ont été inhibées, respectivement, par 2 mg/ml et 4 mg/ml (**Voir tableau 11**).

En effet, l'extrait issu de la souche A7 était moins efficace, par rapport à celui d'A6, contre *Cladosporium*, qui est inhibé, cette fois ci, par 2 mg/ml. La CMI de la souche *A.flavus* est de 2 mg/ml, et celle d'*A.niger* est de 4 mg/ml. La souche *Alternaria* est la plus résistante, sa CMF est de 8 mg/ml (**Voir tableau 10**).

D'une manière générale, la diminution de la croissance en présence de l'extrait comparé au témoin pourrait s'expliquer par la présence dans ces extraits des composés terpéniques à activité antifongique (**Tatsadjieu, 2003**).

Une activité antifongique contre deux souches *Candida albicans* (ATCC 26790 et ATCC 10231) a été faite en utilisant la technique des puits. La première souche a été inhibée par une CMI de 2 mg/ml, alors que la CMI de la deuxième souche est de 1 mg/ml.

L'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique diffère selon les deux souches A6 et A7, d'une part la souche A6 diminue de sa zone d'inhibition en ajoutant de l'ergostérol au milieu préalablement ensemencé par *A.niger* et *A.flavus*, d'autre part la souche A7 agit de la même façon en absence ou en présence de l'ergostérol dans le milieu.

Boudemagh(2007). Prouvait que si une souche diminue sa zone présence de l'ergostérol cela veut dire qu'elle agit sur l'ergostérol membranaire. Les molécules produites par la souche A7 peuvent être de nature non polyènique. En effet, **Le mode d'action de ces substances est différent de celui des polyènes**, ces derniers agissent uniquement contre l'ergostérol, composant membranaire majeur des champignons, alors que les molécules produites par la souche A6 sont probablement de nature polyène, selon **Allain (2008)** les antifongique de nature polyène agit sur tous les microorganismes dont la membrane est riche en ergostérol, comme *Candida*, *Streptococcus neoformans*, et *Aspergillus*. D'après sa forte activité contre *Candida et aspergillus* et d'après son action contre l'ergostérol, la molécule produite par la souche A6 confirme la probabilité qu'elle soit de nature polyène.

L'étude de la chromatographie sur couche mince a montré que l'Acétate d'éthyle-méthanol (6 :4) est le meilleur éluant et que l'extrait de la souche A7 est constitué de 9 composés alors que ceci de la souche A6 composé de 8 (**voir tableau 17**)

Conclusion

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques. Ceux-ci ont été largement étudiés surtout chez le genre *Streptomyces*, largement dominant dans de nombreux écosystèmes. Cependant, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les recherches ont été orientées vers des genres peu fréquents à rares et provenant d'environnements peu communs voir extrêmes (**Demain et Lancini, 2006**).

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinomycètes n'existe pas. Il faut toujours varier les stratégies et les milieux d'isolement dans un même screening, afin de réussir à isoler la plupart de la flore actinomycétales qui compose l'échantillon étudié (**Cross, 1982**).

Dans ce travail, qui a été réalisé dans un laboratoire pédagogique à l'université de Dr MOULAY Taher à Saida, on est intéressé par :

- L'isolement, la revivification et la purification des souches d'actinomycètes
- La sélection des souches actinomycétales ayant la capacité de produire des métabolites secondaires bioactives.
- Retenir des actinomycètes ayant montré une activité antifongique importante.
- La production et l'extraction des substances bioactives.
- Mettre en évidence l'activité des extraits des métabolites secondaires des actinomycètes sur des souches fongiques.
- La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- L'étude de l'action de l'ergostérol sur les substances antifongique.

L'isolement et la revivification des souches actinomycétales ont été faits sur 4 milieux, y compris AF, GLM, Bennet et ISP2. Les résultats ont montré que ces 4 milieux permettent une croissance importante des actinomycètes, avec une croissance rapide, dès le premier jour, dans le milieu ISP2.

Parmi les 30 souches d'actinomycètes testées, deux seulement ont montré une activité antifongique importante, lors du test de cylindre d'Agar. On parle des souches **A6** et **A7**,

ces deux souches ont pu inhiber toutes les souches fongiques testées à l'exception de *Rhizopus*.

Les deux souches, **A6** et **A7**, ont été ensemencé par stries serrés dans le milieu gélosé AF, puis incubé à 28⁰ C pendant 14 jours. Une autre fermentation, sous agitation, a été réalisée sur milieu AF liquide.

Après une durée d'incubation allant de 7 à 14 jours, les métabolites ont été récupérés sous l'action du méthanol.

Les extraits ont montré une activité importante contre les souches fongiques testées, avec des concentrations minimales fongicide comprises entre 2 et 8 mg/ml. Ceci dépend de la souche actinomycétales et les souches fongiques.

D'après les résultats de l'action de l'ergostérol sur les substances antifongiques, on peut avoir comme conclusion que la souche **A7** n'a pas un effet sur les stérols membranaires, en revanche la souche **A6** influe négativement sur les stérols membranaires.

Reference bibliographique

Abbas I.H., (2006). A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *J. Appl. Sci. Res.* **2.10**:809-815.

AINSWORTH G.C., (1986). Introduction to the history of medical and veterinary mycology. University Press. Cambridge.

Allain P (2008) "Les médicaments" 3ème édition

Auvin-Guette.C. (2002). Nouvelles techniques de spectrométrie de masse appliquées à l'étude des venins. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **95**, 3, 212-213.

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 p 226.

Badji. B ; Zitouni. A; Mathieu. F; Lebrihi. A; and Sabaou. S. (2006). Antimicrobial compound produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, **52**, 373–382.

Bastide A., De Méo M., Andriantsoa M., Laget M. and Duménil G., (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. J.*, **2**, 453-466.

Becking J.H. (1974). Family III. *Frankiaceae*. In: Bergey Manual of Determinative Bacteriology. 8th Eds. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.

Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965). - Chemical composition of cell wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, **13**, 236-242.

Bergey's Manuel, (2007). Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Copyright, Michigan State University Board of Trustee

Blanchet B., Huet E. ; Astier A., Hulin A. (2004). Suivi thérapeutique des médicaments antifongiques. *Revue Française des laboratoires*, n ° 365.

Boudemagh A., (2007) . Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse pour l'obtention le grade de doctorat d'état en Microbiologie Appliquée. Université de Mentouri Constantine

Boughachiche F, (2012). Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkh. Thèse Présentée pour l'obtention le grade de Doctorat en Sciences Option : Biotechnologies Microbiennes. Université Mentouri Constantine

Boussaber E., Issam M. K., Hilali L., Hilali A. (2012). Isolement des souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques. Volume 4N° 120801

Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S. (2008). Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:49-58.

BOIRON P., (2000). Les antifongiques s'engagent dans de nouvelles voies thérapeutiques. Option/Bio, N°251 : 4-5.

BOIRON P., (1999). Etude des infections fongiques : des avancées multiples. Option/Bio, N°238 : 4-5.

Camille D. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire p, 248, 250, 296, 320, 341, 359, 476.

CASTELLANI A., (1928). The treatment of epidermohytosis of the toes (mango toe) and certain forms of epidermophytosis by fuchsin paint. *Lancet.* 2: 595-596.

CAVALA M., EBERLIN T., (1994). Isolement des streptomycètes du sol. L'opéron. 4: 13-7.

COX G. et PERFECT J. (1993). Fungal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 6 : 422-426.

CARLE S., (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel.* 36 : 25-41.

Charin T. and Aszalos A. (2002). TIC and UV-light spectrometry. *In:* "modern analysis of antibiotic, Aszalos A., (Eds), Vol. 27, Marcel Dekker Inc, New-York. p. 1982.

Collins M.D., Goodfellow M. and Minnikin D.E. (1980). - Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.*, 118, 29-37.

Cook A.E. and Meyers P.R. (2003). - Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S-rRNA gene restriction fragment patterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1907-1915.

Demain A.L. (1995). Emerging concepts of secondary metabolism in Actinomycetes. *Actinomycetologica.* 9:98-117.

Demain A.L. and Solomon N. A., (1985) .Biology of industrial micro-organisms. The Benjamin/ cummings publishing company, INC. California

DAVIES F.L. et WILLIAMS S.T., (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 1/ The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* **2**: 227-238.

Diop. C.A.K. (1998). Synthèse et étude par spectroscopie infrarouge, RAMAN, Mossbauer, RMN et par diffraction aux rayons X de quelques dérivés organostanniques de type A (Sn Ph₃)_n (n= 1,2,3 ; A= oxoanion) et de leur interaction avec les bases de Lewis, complexes organostanniques de Sn Cl₄, de l'ion hydrogéoarséniate et contenant Sb₂Cl₈. Thèse de Doctotat. Université Cheikh Antan Diop de Dakar, (Sénégal).pp231.

Dommergues Y., et Mangenot F., (1970). Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.

DULANEY E.L., LARSEN A.H. et STALEY E.O., (1955). A note on the selective isolation of microorganisms from natural sources. *Mycologia.* **47**: 420- 422.

Dynia. Z.M; and Sztaricskai. F.J. (1986). Ultraviolet and light spectrometry. In: A modern analysis of antibiotics. Aszolas. A. Eds, Marcel. Dekker.inc New York, PP.19-96.

FABER K.K., DICKEY L.B., (1925). The treatment of thrush with gentian violet. *Am. J. Dis. Child.* **34**: 408-417.

FIEDLER H.P., SCHUZ T., DECKER H., (1993). An overview of nikkomycins; history, biochemistry, and applications. In "cutaneous antifungal agents" (Rippon J.W., Fromfling R.A., eds) Marcel Dekker, New York, pp 325-352.

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

GENTIES J.C., (1958). Experimental ringworm in guinea pigs : oral treatment with griseofulvin. *Nature*, **182**: 476-477.

GODEFROI E.F., HEERES J. VAN- CUTSEM J., JANSSEN P.A.J., (1969). The preparation and antimycotic properties of 1-phenethyl imidazole. *J. Med. Pharm. Chem.* **12**: 784-791.

Goodfellow M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **69**, 33-90.

Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.

Goodfellow M., Stalon L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. (1990). Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 19-36.

Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (1984). Introduction to and importance of the actinomycetes. *In: « The biology of the actinomycetes »*, Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, pp. 1-6.

GOLD W., STOUT H.A., PAGANO J.S., DONOVICK R., (1956). Amphotericin A and B: antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Annu.* **56**: 579-586

Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.

Hacène H., Sabaou N., Bounaga N., Lefevre G. (1994). Screening for non-polenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbiol.* **79**: 81.

HARTMAN P.G., POLAK A., (1993). The action of amorolfine: from molecule to cell. In “Cutaneous antifungal agents” (Rippon J.W., Fromlting R.A., eds). Marcel Dekker, New York. 27-36.

HANZEN E.L., BROWN R., (1950). Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc. Soc. Exp. Biol., (NY).* **76** : 93-97.

Hilali L., Khattabi A., Nssrlah N., Malki A., Finance C. (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotech.* **2** :49-53.

HILDIK-SMITH G., Blank H., SARKANY I., (1964). Fungus diseases and their treatment. Little, Brown, Co., Boston U.S.A., 370-377.

HSU S.C., LOCKWOOD J.L., (1975). Powder chitin agar as selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol. Technol.* **66**: 559-565.

Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P. S., Teniola D., Addo P. (2002). Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . *PCT Int. Appl.*, p. 19.

Ishizawa S. and Araragi M. (1976). Composition of actinomycetes population in soil. *In: Actinomycetes, the boundary microorganisms.* Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107.

Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. et Omura S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology.* **21**(5): 526- 531.

KERRIDGE D., WHELAN W.L., (1984). The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine: molecular actions and interactions. In “ Mode of action of antifungal agents” Cambridge University Press. Cambridge. 343-376.

KILLIAN CH. et FEHER D., (1939). Microbiology of desert soils. pp: 21-127. Encyclopedie Biologique

Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 331-336.

Lamari L., (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

LARPENT J.P. et SANGLIER J.J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris 481 p.

LARPENT J.P., (1997). Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire. Lavoisier Tec-Doc. 1073p.

Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970b). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. *In: The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.

Lechevalier M.P. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. *In Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**, 159-166.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970a). Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In: « The Actinomycetales »* Prauser H. (Eds.) Fisher Verlag, Jena, pp. 311-316.

Lindenfelser. L.A., Shotwell. O.L, Bachler. M.J., Shannon G.M., and Pridham T.G. (1964). Antibiotics against plant disease. VIII. Screening for non polyenic antifungal antibiotics produced by Streptomycetes. *Appl. Microbiol*, **12 (6)**, 508-512.

Li S., Chena C., Zhang H., Guo H., Wang H., Wang L., Zhang X., Huac S., Yu J., Xiao P., Li R., Tan X. (2005). Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiv. Res.*, **67**, 18–23

LEMRISS S., LAURENT F., COUBLE A., CASOLI E., LANCELIN J.M., SAINTPIERRE-BONACCIO D., RIFALI S., FASSOUANE A., BOIRON P., (2003). Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol* **49**:669-74

Madigan M. T et Martinko J.M. (2007) Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11e édition : 331-423, 686-718.

MARGET W., ADAM D., (1969). Erste Erfahrungen mit dem breibandantimykotikum bay b5097. *Med. Klim.* **64**: 1235-1239.

Marinelli F. (2009) Antibiotics and *Streptomyces*: the futur and antibiotic discovery *Microbiology today*. 2: 20-23.

Mellouli L, Mehdi RB, Sioud S, Salem M, Bejar S. (2003). Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol*; **154**:345—52.

Miao L., Kwong T. F. N. and Qian P. Y. (2006) Effect of culture conditions on mycelia growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 1063-1073.

MIETH H., (1993). In vitro and in vivo activities of terbinafine in cutaneous antifungal agnts. (rippon J.W., Fromtling R.A., eds), Marcel Dekker, New York. 137-149.

Mordarska H., Mordarski M. and Goodfellow M. (1972). Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **71**, 77-86.

Mellouli L, Mehdi RB, Sioud S, Salem M, Bejar S. (2003). Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol*; **154**:345—52.

ODDS F. C., (1995). Les antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **10** (4), 285-293.

Oskay M., Tamer A. and Azeri C., (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.*, 3(9), 441–446.

Ochi. K; and Hiranuma. H. (1994). A Taxonomic Review of the Genera *Kitasatosporia* and *Streptoverticillium* by Analysis of Ribosomal Protein AT-L30.

OKI T., (1992). Pradimicin, a novel antifungal agent. In “ New approaches for antifungal drugs” (Fernandes PV., ed.), Boston, pp. 64-87.

OXFORD A.E., RAISTRICK H., SIMONART P., (1939). Studies in the biochemistry of micro-organisms. 60. Griseofulvin, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochem. J.*, **33**: 240-248.

Pandey, D.K (2000)., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D., Dixit, S.N. *J. Plant. Dis. Prot.* 89 (1982) 344-349.

Pridham T.G., Hesseltine C.W. and Benedict R.G. (1958). A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups: placement of strains in morphological selection. *Appl. Microbiol.*, 6, 5-79.

POCHON J., TARDIEUX P., (1962). Technique d’analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourtourelle, Saint-Mandé.

POLAK A., (1990). Mode of action studies. In “ Chemotherapy of fungal diseases” (Ryley J.F., ed), Springer-Verlag. Berlin, pp,155-182.

Pouilly. J.C. (2009). Spectroscopie IR et spectrométrie de mobilité ionique appliquées aux structures de systèmes chargés isolés d'intérêt pharmaceutique. Thèse de Doctorat. Université Paris XIII, (France).pp 231.

Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M. and Stackebrandt E. (1996). The genus *Nocardioopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage proposal of *Nocardioopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 1088-1092.

Rawasheh R., Saadoun I., et Mahasneh A., (2005). Effect of culturel conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) an dits potential to utilize tomato pomace. *Afri. J. of Biotechnol.* **4**: 251-255.

REX J.H., BENNETT J.E., SUGAR A.M. et al., (1994). A randomized trial comparing fluconazol with amphotericin B for treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N. Engl. J. Med.* **331**: 1325-30.

RYDER N., FRANK I., DUPON M.C., (1986). Ergosterol biosynthesis inhibition by the thiocarbamate antifungal agents tolalfate and tolcliate. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **29** : 858-860.

Rosset R., Caude M., Jardy A. (1990). Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Masson, 2e édition, Paris.

SABOURAUD R., (1910). Les Teignes. Masson et Cie. Paris.

Sanglier J.J., Haag H., Huck T.A., Fehr T. (1993). Novel bioactive compounds

SCHOLER H. (1980). Flucytosine. In “Antifungal chemotherapy” (Speller D.C.E. Ed.). Chichester, U.K. 35-106. from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, **144** (8), 633-642.

SCHWARTZ R.E., GIACOBBE R.A., BLAND J.A., MONAGHAN R.L., (1989). L-671329, a new antifungal agent. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.* **42** : 163-167.

SIMONETTI N., STRIPPOLI V., (1971). Azione della metilpatricina sulfa *Candida albicans*. *Antibiotica.* **9**: 5-19

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, (France). pp251.

- Stackebrandt E. and Woese C.R (1981).** The evolution of procaryotes. *Synopsia of the society for general microbiology*, **32**, 1-31.
- Stackebrandt E., Rainey F.A and Ward-Rainey N.L. (1997).** A proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* clasis nov. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **47**, 479-491.
- Staneck, J.L. and G.D. Robert, (1974).** Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.*, **28**: 226-231.
- STEVENS DA, KAN VL, JUDSON MA, et al., (2000).** Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*; **30** : 696- 709.
- SHIRLING E.B. et GOTTLIEB D., (1966).** Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **16(3)**: 313-340.
- Shirling E. and Gottlieb D. (1972).** Cooperative description of type strains of strains of *Streptomyces*. *Intern. J. Syst.* **22**, 265-394.
- Sneath P.H.A. (1989).** Numerical taxonomy. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. **4**. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 2303-2305.
- Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. and Suzuki Y. (1994).** Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, **8**, 122–127.
- Suzuki S.I. (2001).** Establishment and use of gellan gun media for selective isolation and survey of specific rare Actinomycetes. *Actinomy.* **15(2)**, 55-60.
- Theilleux J.,(1993) .** *In* Levreau J. Y., Bouix M.O. Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoisier. France. Ch 6 : 425-481.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., et Bora T.S., (2007).** Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Microbiol. Médi.*, **17** : 242-249.
- Valan Arazu. M; Duraipandiyam. V; Agastian. P; Ignacimuthu. S. (2009).** In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India).
- Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., De'Ry C., Brezezinski R., et Beaulieu C. (1996).** Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent raspbrry root rot. *Applied and Environment Microbiol.* **62. 5** : 1630-1635..
- WITFIELD A., (1912).** Eczematoid ringworm of the extremities and groins. *Proc. Roy. Soc. Med.* **5**: 36-43.

WILLIAMS S.T., DAVIES F.L., (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* **38**: 251-261.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 697-703.

Yu. J; Liu. Q; Liu. Q; Liu. X; Sun. Q; Yan. J; Qi. X; Fan. S. (2008). Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology*, **99**, 2087–2091.

ZITOUNI A., LAMARI L., BOUDJELALE H., BADJI B., SABAOU N., GAOOUAR A., et al., (2005). *Saccharothrix algeriensis* sp. Nov., isolated from a sahara soil. *IJSEM*

Milieux de culture

Bennett

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

pH= 7.3

Bennett liquide

Extrait de levure	1g
Extrait de viande de bœuf	1g
Peptone pancréatique de caséine	2g
Glucose	10g
Eau distillée	1000ml

pH= 7.3

Eau physiologie

Na Cl	9g
Eau distillée	1000ml

Sabouraud

Peptone	10g
Glucose	40g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
PH	7,0

Bouillon Sabouraud

Peptone	10g
Glucose	40g
Eau distillée	1000ml

Glucose - Extrait de levure-Malt (GLM)

Extrait de levure	3g
Extrait de malt	3g
Peptone	5g
Glucose	10g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

pH = 7.2

ISP2 (International Streptomyces Project)

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	4g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

pH= 7.3

Tryptone -Sel-Eau (TSE)

Tryptone	1g
Na Cl	8.5g
Eau distillés	1000ml

Eau physiologie

Na Cl	9g
Eau distillée	1000ml

Bouillon nutritif (BN)

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Na Cl	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

Gélose nutritive (GN)

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15-20g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7,2

Gélose TSI (Triple Sugar Iron.)

Peptone de viande	15g
Protéase peptone	5g
Extrait de viande	3g

Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Lactose	10g
Citrate de fer ammoniacal	0,3g
NaCl	5g
Sodium thiosulfate	0,3g
Rouge de phénol	0,05g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml

pH =7,2

Citrate de Simmons

Ammonium dihydrogenophosphate	1g
Phosphate de dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate magnésium	0,2g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH= 6,8

Potato dextrose agar (PDA)

Infusion de pomme de terre	200g
Dextrose	20g
Agar	15g
Eau distillé	1000g

PH : 5.6±0.2

Urée-indole

L-tryptophane	3g
Phosphate de dipotassique	1g
Phosphate monopotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Rouge de phénol	2,5g
Eau distillée	1000ml

pH= 6,8

Milieu AF

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	2g
NaCl	2,5 g
CACO ₃	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH = 7

Milieu AF liquide

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	2g
NaCl	2,5 g
CACO ₃	1g

Eau distillée 1000ml

pH = 7

Les colorants

Lugol

Iode 1g

Iode de potassium 2g

Eau distillée 300ml

Violet de gentiane

Violet de gentiane 1g

Ethanol à 90 10g

Phénol 2g

Eau distillés 1000ml

Fuchsine

Fuchsine basique 02g

Acide phénique 10g

Alcool absolu 20ml