



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi-Tebessa



Faculté des Science Exactes et des Sciences de la Nature de la vie

Département: Biologie appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la vie

Filière : Sciences biologique

Option : microbiologie appliquée

Thème

**Contribution à la recherche de l'activité
antifongique chez différents isolats des
Actinomycètes**

Présenté par :

- BENMESSAI Rima

- FENNI Nesrine

Devant le jury :

SNOUSSI Asma	M.A.A	Université de TEBESSA	Examineur
BENHADJ Mabrouka	M.A.A	Université de TEBESSA	Rapporteur
FENGHOUR Hind	M.A.A	Université de TEBESSA	Président

Date de soutenance: 27/05/2018

Note :

Mentions :



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : *Fenni Nessrine*

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : *Science de la nature et de la vie*

N° de carte d'étudiant : *4014513*

Année universitaire : *2017/2018*

Domaine : *Science de la nature et de la vie*

Filière : *Science biologique*

Spécialité : *microbiologie appliquée*

Intitulé du mémoire : *Contribution à la recherche de l'activité anti-fongique chez différents isolats des actinomycètes*

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : *27/05/2018*

Signature de l'étudiant(e) :

[Signature]

[Stamp: Université Larbi Tébessi - Tébessa, Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie, 05 جوان 2018]

[Stamp: Direction des études et de la recherche scientifique, Université Larbi Tébessi - Tébessa]



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Benmessai RIMA

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : Science de la nature et de la vie

N° de carte d'étudiant : 4015266

Année universitaire : 2017/2018

Domaine: Science de la nature et de la vie

Filière: Science biologique

Spécialité: microbiologie appliquée

Intitulé du mémoire : Contribution à la recherche de l'activité
antifongique chez différents isolats des actinomycètes

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 27.10.2018

Signature de l'étudiant(e) :



الملخص

الهدف من هذا العمل هو البحث وفحص الأكتينومييسات القادرة على صنع المواد المضادة للفطريات

12 سلالة من الأكتينومييسات المختارة من مجموعة من مختبرات الأحياء الدقيقة بجامعة عنابة لدراسة النشاط المضاد 12 للفطريات ضد السلالات المستهدفة بما في ذلك خميرة نوع كونديدا و 18 عزلة من الفطريات الخيطية.

تم عرض فحص النشاط المضاد للفطريات بواسطة تقنية أسطوانة الأجار ضد تقنية اختبار الخمائر فيما يتعلق بالتحقق من النشاط المضاد للفطريات ضد الفطريات الخيطية ، وهذا الأخير يصنع بواسطة الطريقة من طبقة مزدوجة ، تظهر النتائج أن بعض السلالة من الأكتينومييسات نشطة ضد الأنواع والفطريات الخيطية من بين هذه السلالات النشطة اثنين من النشطين مثل السلالة S450 و S406.

استخلاص الجزيئات الحيوية انطلاقا من وسط الزرع ISP2 للسلالتين S406 و S450, تم استخدام مذيبيات مختلفة الاقطاب مثل : ميثانول , ايثانول. ديكلوروميثان, بيتانول, اسيتات ايثيل. تم التحقق من نتائج المستخلصات عن طريق تقنية الاسطوانة ضد الخميرة و الفطريات الخيطية. النتائج بينت ان ميثانول, اسيتات ايثيل, و ديكلوروميثان هما أفضل مذيبيات لاستخراج جزيئات مضاد للفطريات.

تم إجراء توصيف جزيئي حيوي أولي بواسطة تقنيات الفصل مثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والتصوير الحيوي.

الكلمات المفتاحية: اكتينومييسات, مضاد الفطريات, الجزيئات الحيوية, استخلاص , الفحص, التوصيف.

ABSTRACT

The goal of this work was reported Within in the frame work of the research and screening of Actinomycetes that are capable of synthesizes antifungal substances.

12 isolates of selected Actinomycetes from the microbiology laboratory at Baji Mukhtar University in Annaba has been chosen in the aim of the study of antifungal activities against the target strains of Yeast type *Candida* and 18 strains of filamentous fungus.

The screening of the antifungal activity of the selected strains was demonstrated by the technique of agar cylinders against yeast-test, with regard to the investigation of the antifungal activity against filamentous fungus the later has been carried out by agar well diffusion assay the results show that some strains of Actinomycetes are active against yeast and filamentous fungi and among these active strains 2 of them are potentially active like isolates S450 and S406

The extraction of biomolecules was made from solid media ISP2 of the selected strains S450 and S406, different organic solvent with different polarity were used like ethanol, methanol, ethyl acetate, dichloromethane The extracts were tested by the disk method against certain strains of yeast and filamentous fungi .The results show that methanol, ethyl acetate and dichloromethane are the best solvents for the extraction of antifungal molecules

Preliminary biomolecule characterization was performed by separation techniques such as thin layer chromatography and bioautography

Key words: Actinomycetes, antifungals, biomolecules, extraction, screening, characterization

Résumé

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et le criblage des actinomycètes capables de synthétiser des substances antifongique.

12 souches d'Actinomycètes choisit parmi une collection de laboratoire de microbiologie de l'université d'Annaba pour le l'étude de l'activité antifongique contre des souches cibles dont la levure du genre *Candida* et 18 isolats des champignons filamenteux

Le screening de l'activité antifongique des souches sélectionnés a été mis en évidence par la technique des cylindres d'agar contre les levure-tests en ce qui concerne la recherche de l'activité antifongique contre les champignons filamenteux cette dernière a été réalisée par la méthode de double couche ,les résultats montrent que certains souche d'actinomycètes sont actives contre les levures et les champignons filamenteux parmi ces souches actifs deux sont potentiellement actives comme la souche S450 et S406.

L'extraction des biomolécules a été faite à partir des cultures solides sur ISP2 de deux souches sélectionné S450 et S406, différents solvant organique de polarité différente ont été utilisées comme l'éthanol, méthanol, acétate d'éthyle, butanol, dichlorométhane. Les extraits ont été testés par la méthode de disques contre certaines souches de levure et des champignons filamenteux. Les résultats montrent que le méthanol et acétate d'éthyle, et dichlorométhane sont les meilleurs solvants pour l'extraction des molécules antifongiques

Une caractérisation préliminaire des biomolécules a été réalisée par des techniques de séparation comme de chromatographie sur couche mince et la bioautographie

Mots clés : Actinomycètes, antifongiques, biomolécules, extraction, criblage, caractérisation

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère :

Tu es l'exemple de sacrifice qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi : puisse ALLAH, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père :

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Ainsi que je n'oublie pas à dédier

Ce travail à la mémoire de mon défunt frère Atef Qui ne cessera de m'encourager de son vivant que je n'oublierai jamais Qu'ALLAH l'accueille en son vaste paradis.

A mes adorables neveux : Iyad abd al wadoud, et Atef

A ma belle-sœur : Amira et son mari Rachid

A mes chers frères : Mohamed et sa femme Nadjwa

Et Nassredine qui j'aime beaucoup que dieu vous garde

A mes cousines et mes cousins

À ma chère amie et ma binôme : Nesrine

A mes amis proches, particulièrement: Khawla, Hiba, Manel, Afef, Madiha, Amel, Asma, Chaima, Ahlam, Sarah et Souad

A mes camarades du département.

Rima



Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie ce travail de fin d'études

à :

Ma tendre Mère FATIHA: Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études c'est grâce à elle que je suis là.

À Mon père Mohamed, pour ses encouragements

À ma belle sœur : Chaima

À mes frères : Salah et Chiheb

À toute mes amies intimes : Madiha, Asma, Amel, Chaima, Ahlam, Souad

À ma chère amie et ma binôme dans le mémoire : Rima

À tous les membres de ma promotion.



Nesrine

Remerciement

Nous tenons d'abord à remercier le tout puissant, notre DIEU, le clément et le miséricordieux, de nous avoir donné la clair voyance et la persévérance, pour mener à terme ce travail, prière et salut sur notre prophète MOHAMED.

A nos parents et tous nos frères et soeurs de leur soutien et leur grande affection et les grands efforts pour nous aider à réaliser ce travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur Mme :BENHADJ. Pour nous ouverts les portes qui a bien voulu diriger ce travail et n'a cessé de nous orienter ; nous nous permettons aussi de lui exprimer nos sincères remerciements pour sa disponibilité, les précieux conseils qu'il nous a prodigué et pour son aide durant toute la période pour l'élaboration de ce recueil.

Profondément Merci

Un grand remerciement aux honorables membres du jury :
Mme.FENGOUR d'avoir accepté la présidence du jury de notre Travail.
M.SNOUSI d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Mes meilleurs remerciements vont également à Mme. ZEGHIB et Mrs. DJABRI et aux personnes qui nous ont encouragés et nous aidés à la rédaction de ce travail.

ceux qui nous aidés de près ou de loin, nos profondes reconnaissances.

Nesrine Et Rima

Table de Matière

ملخص	
Abstract	
Résumé	
Dédicace	
Remerciement	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des planches	
Liste des figures	
Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I: Généralité sur les Actinomycètes	
I. Définition	3
II. Historique	3
III-Similitude entre actinomycètes et champignons	4
III. Taxonomie, classification et identification	5
IV. Propriétés générales des actinomycètes	6
V. Caractères cultureux des actinomycètes	7
VI-1- Critères morphologiques	7
VI-1-1 Caractères macromorphologiques	7
VI-1-2- Caractères micromorphologiques	7
VII- Ecologie des actinomycètes	8
VIII- Cycle de développement et de vie:	9
VIII-1- Les structures particulières	10
VIII-1-2 Formation des spores	11
IX- Importance des actinomycètes	12
X- Métabolite des actinomycètes	14
X-1- Métabolite primaire	14
X-2- Métabolite secondaire	15
X-2-1- Les enzymes	16
X-2-2- Les antibiotiques	16
X-2-3- La production d'antifongiques	16
Chapitre 2: Les infections fongiques	
I. Les infections fongiques :	17
I-1-Les candidoses	20
I-2-Les aspergilloses	20
I-3- Les autres infections fongiques	21
I-3-1- Les fusarioses	21
II- Les antifongiques :	21
II-1- Définition	21
II-2- Historique	22
II-3- Classification des antifongiques	22

II-4- Les antifongiques produits par les actinomycètes	23
II-4-1- Cycloheximide	23
II-4-2- Les polyènes	23
a. La nystatine	23
b. L'Amphotéricine B	23
II-4-3- La nikkomycine	24
Partie expérimentale	
Matériels et Méthodes	
I. Objectif de travail	25
II. Cadre de l'étude	25
III. Matériels utilisés	25
III.1. Grand matériels	25
III.2. petits matériels	26
III.3. Matériels biologiques	27
III.4. Milieux de culture	28
III.5. les solutions et les colorants utilisés	28
IV. Méthode de travail	28
IV.1. Origines des souches	28
IV.2. Repiquage et vérification de la pureté des isolats	29
IV.3. mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes	29
IV.3.1. choix du milieu de production des molécules antifongiques	29
IV-3-2 L'activité antifongique contre les levures	29
IV-3-3 L'activité antifongique contre les champignons filamenteux	30
IV-3-4 Extraction des molécules antifongiques	31
IV-3-5 Recherche de l'activité des extraits	31
IV-3-5 Révélations chimiques (Chromatographie)	31
IV-3-6 Révélations microbiologiques ou bioautographie	32
Résultats et discussion	
I-Résultats et Discussion	34
I-1 Repiquage et vérification de la pureté des isolats :	34
I-2 La recherche de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes	34
I-2-1 L'activité antifongique contre les levures :	34
I-2-2 Résultats du test d'activité antifongique contre les champignons filamenteux	43
I-3 Extraction des molécules antifongiques	46
I-4 Révélations chimiques (Chromatographie)	52
I-5 Révélations microbiologique (bioautographie)	55
Conclusion	57
Référence bibliographique	59
Annexe	70

Liste des abréviations

°C	Degré celcus
F	<i>Fusarium</i>
GYEA	Glucose Yeast Extract Agar
H	Heur
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
MA	mycélium aérien
MI	Millilitre
Mm	Millimètre
MS	mycélium du substrat
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

Liste des tableaux

N°	Titre de Tableau	Page
1	Estimation des infections fongiques invasives (incidence annuelle) chroniques et allergiques en Algérie	18
2	Action antagoniste des 12 souches de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis de levures (Zones d'inhibition mesurée en mm)	36
2	Action antagoniste des 12 souches de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis de levures (Zones d'inhibition mesurée en mm)	37
3	activité antifongique de S406 et S450 dans les 4 milieux vis-à-vis de champignons filamenteux	44
4	Action antagoniste des souches de <i>Streptomyces</i> qui présente des activités vis-à-vis de champignons filamenteux	44
5	Diamètres des zones d'inhibition en mm d test d'activités des disques pour la souche S450 J3	47
6	Diamètres des zones d'inhibition en mm de test d'activités des disques pour la souche S406 J3	47
7	Diamètres des zones d'inhibition en mm de test d'activités des disques pour la souche S406 J3	48
8	les Rf des seperation des molecules de l'extrait de S450par chromatographie	54
9	les Rf des seperation des molecules de l'extrait de S450par chromatographie	54
10	les Rf des seperation des molecules de l'extrait de S450 par chromatographie	54

Liste des planches

N°	Titre de planches	Page
1	la coupure des cylindre d'agr	35
2	activité antifongique de J 3 de quelques isolast de <i>Streptomyces</i>	42
3	activité antifongique de J7 de quelques isolast de <i>Streptomyces</i>	42
4	activité antifongique de J10 de quelques isolast de <i>Streptomyces</i>	42
5	activité antifongique de J21 de quelques isolast de <i>Streptomyces</i>	42
6	activité antifongique des souches de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis des champignons filamenteux	45
7	résultat de test des disq des extraits organique J3 de la souche S 450 vis-à-vis des levures-test	49
8	résultat de test des disques des extraits organique J3 de lasouche S 406 vis-vis des levures-test	
9	résultat de test des disques des extraits organique J7 de la souche S 450 vis-vis des champignons filamenteux	50
10	: résultat de chromatographie des extraits organiques sur couche mince de S450	53
11	la révélation microbiologique des plaque CCM des meilleures extraits j3 testé contre ICF 35	55
12	la révélation microbiologique des plaque CCM desmeilleures extraits j7 testé de la souche S450 vis- à- vis <i>F.oxysporum</i>	56

Liste des figures

N°	Titre de Figure	Page
1	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivants (bleu-vert) et mort (blanc). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés	6
2	Principaux groupes d'actinomycètes	8
3	Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i>	10
4	Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes	15
5	Filaments dichotomique 45° à partir des crachats d'un Algérien neutropénique la culture donne le complexe <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
6	Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques	22
7	Activité antifongique de J3 des 12 isolats de <i>Streptomyces</i>	38
8	Activité antifongique de J7 des 12 isolats de <i>Streptomyces</i>	39
9	Activité antifongique de J10 des 12 isolats de <i>Streptomyces</i>	40
10	Activité antifongique de J21 des 12 isolats de <i>Streptomyces</i>	41

Introduction

Depuis des milliers d'années, les hommes utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (**Smaoui, 2010**).

Les actinomycètes constituent un groupe de micro organisme procaryotes tout a fait unique se sont des microorganismes très ubiquitaire que l'ont rencontre sur tout les substrats naturels courants c'est un groupe de microorganisme qui manifeste une diversité considérable depuis des formes bacillaires jusqu'à des formes filamenteuses ramifiées a mode de sporulation complexe .Ils possèdent des propriétés significatives c'est leur capacité de se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude a synthétiser de très nombreuse métabolites bioactifs (**Leveau et Bouix, 1993**).

Les Streptomyces sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (**Sujatha et al., 2005**).

Ces dernières années, Les infections fongiques invasives, aspergillose et candidose, présentent une émergence importante, et sont généralement associées au contexte opportuniste de patients immunodéprimés, que ce soit de manière acquise (VIH), thérapeutique (immunosuppresseurs en transplantation d'organe solide et greffe de moelle) ou iatrogène (anticancéreux) (**Billaud, 2007**). *Candida albicans* et certaines espèces d'*Aspergillus* telles que *A. fumigatus*, *A. flavus* responsables de la majorité des mycoses invasives (**Badji et al, 2006**).

En dépit de la longue liste des antibiotiques actuellement disponibles sur le marché et malgré l'élargissement de l'arsenal thérapeutique antifongique plus de 35 % pour les aspergilloses et les candidoses (**Gellen-Dautremer et al., 2010**), les antibiotiques antifongiques représentent un faible pourcentage (**Vicente et al, 2003**).

L'antifongique le plus connu étant l'amphotéricine B, celle-ci, fait partie des antifongiques polyéniques. Les réactions secondaires et une certaine toxicité liées à la structure polyénique de ces antifongiques ont conduit à la recherche de nouveaux antibiotiques avec en priorité la production de dérivés de structure non polyénique. Concernant le mécanisme d'action de ces derniers, les efforts sont axés sur la recherche de molécules dont l'action serait plus spécifique vis-à-vis du microorganisme et, dans ce cas, seules les substances à action spécifiquement pariétale devraient présenter moins de toxicité pour l'homme.

Cette étude mène à un objectif principal, dans un premier temps de rechercher des molécules bioactives contre les Fungi à partir d'une gamme des souches d'Actinomycètes, dans un second temps, d'extraire ces biomolécules et de les caractérisés

La première partie de ce travail traite (bibliographie) traite de la taxonomie des actinomycètes, de leur écologie ainsi que de leur importance. Un aperçu sur les antifongiques produits par les actinomycetes.

La deuxième partie c'est la partie expérimentale comprendra : le matériel et méthodes utiliser pour la mise en évidence des activités antifongiques des isolats d'actinomycètes, l'extraction de ces biomolécules avec des solvants organiques, leurs caractérisation, et en fin les résultats obtenus ainsi qu'à leurs discussions.

Introduction

Partie bibliographie

Chapitre I
Généralité sur les
Actinomycètes

I. Définition

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

II. Historique

L'histoire des actinomycètes peut être divisée en cinq grandes périodes :

- **Première période (1874-1900)** : a été nommée « période médicale » est celle de la découverte de leurs rôles dans la pathologie : Cohn en 1875 découvre le premier actinomycète qu'il appela *Streptothrix foeresteri* ; Harz en 1877 isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis*.

- **Seconde période (1900-1940)** : se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol : avec les travaux d'Orla Yensen (1909) qui créa la famille des *Actinomycetacees* qui comprend un seul genre *Actinomyces*, par la suite, de nombreuses espèces telluriques furent isolées et décrit, Buchanan (1917) créa l'ordre des Actinomycétales. Les espèces qui composent le genre *Actinomyces*, étaient très différentes, certains auteurs ont commencé par scinder ce genre en plusieurs autres.

Au cours des années (1919-1940) : une meilleure connaissance des germes a été acquise, grâce aux recherches d'Orskov (1923) qui créa le genre *Micromonospora*. Ce genre regroupe les actinomycètes qui ne produisent pas de mycélium aérien. Jensen (1932) regroupe dans le genre *Paraactinomyces* (actuellement *Nocardia*) les actinomycètes dont le mycélium de substrat se fragmente. Cette période couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes.

- **Troisième période** commence en 1940 est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes. En 1943 : Waksman et Henrici créent le genre *Streptomyces* (en combinant les noms des genres *Streptothrix* et *Actinomyces*) qui

regroupe les actinomycètes dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores.

En 1944 : Waksman découvre la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Le minor, 1989 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Cette période a résulté en un accroissement brusque du nombre d'espèces décrites (Baldacci, 1962).

- **Quatrième période (1940-1970)** : peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques.

- **Cinquième période** : depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par Hopwood (Chater, 1999 ; Hopwood, 1973) puis de génomique (Hopwood, 2003) a révolutionné la classification des espèces (Ventura, 2007) puis les méthodes de découverte de métabolites secondaires (Donadio, 2002) et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes.

III- Similitude entre actinomycètes et champignons (Alexander, 1961)

Les mycologistes considèrent les actinomycètes comme des champignons, (Gottlieb, 1973). Il existe trois points qui rapprochent les actinomycètes des champignons :

- Structure mycélienne présentant des ramifications chez les actinomycètes typiques, avec toutefois cette différence que les filaments ont un diamètre deux fois plus faible (0,5 à 1,2 μ) que ceux des champignons, d'où le terme de pseudo-mycélium parfois employé pour désigner cette structure.
- Formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidies.
- En culture liquide, absence de la turbidité caractéristique des bactéries unicellulaires et apparition des amas de cellules.

Les analogies entre les actinomycètes et les champignons sont en fait superficielles ; il s'agit d'une convergence de forme plutôt que d'une parenté génétique, car une différence fondamentale les sépare : les actinomycètes sont procaryotes alors que les champignons sont eucaryotes (Alexander, 1961).

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons (eucaryote) (Otto, 1998), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (Lefebvre, 2008). Leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques,....etc. les rangent parmi les procaryotes.

Les principales différences entre les champignons et les actinomycètes peuvent être résumées dans les points suivants :

- Leurs parois qui ne renferment ni cellulose ni chitine, se retrouvent respectivement chez les plantes et les champignons (Shukla, 2010), mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives).
- Le diamètre de leurs mycéliums est approximativement l'un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (généralement 0.7 à 0.8 μm),
- Leurs sensibilités aux attaques des bactériophages et lysozymes (Hawker et Linton, 1971).
- Leurs sensibilités aux antibiotiques antibactériens (**Rangaswami et al., 2004 ; Winn et Koneman, 2006**).

IV- Taxonomie, classification et identification

La taxonomie et l'identification des actinomycètes sont basées sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires.

L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques (mycélium fragmenté ou non, présence ou non de mycélium aérien, couleur des mycélia, production des spores,.... etc) tandis que les critères physiologiques (tolérance au chlorure de sodium, croissance en différentes valeurs de température et de pH, recherche des enzymes et différents métabolites intermédiaires et terminaux) et moléculaires (détermination du (G+C)%, séquençage des gènes de l'ARNr 16S, hybridation ADN-ADN (ex. hybridation ADN-ADN) séparent les espèces (**Smaoui, 2010**).

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes et sont rattachés à l'ordre des Actinomycétales créée par Buchanan en (**Goodfellow, 2012**).

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.

V- Propriétés générales des actinomycètes

Les actinomycètes partagent de nombreuses propriétés :

- ✓ Ils développent un réseau ramifié d'hyphes. Ceux-ci poussent à la surface et à l'intérieure du substrat pour former un tapis dense d'hyphes, qu'on appelle mycélium végétatif. Les hyphes qui poussent vers le haut forment un mycélium aérien

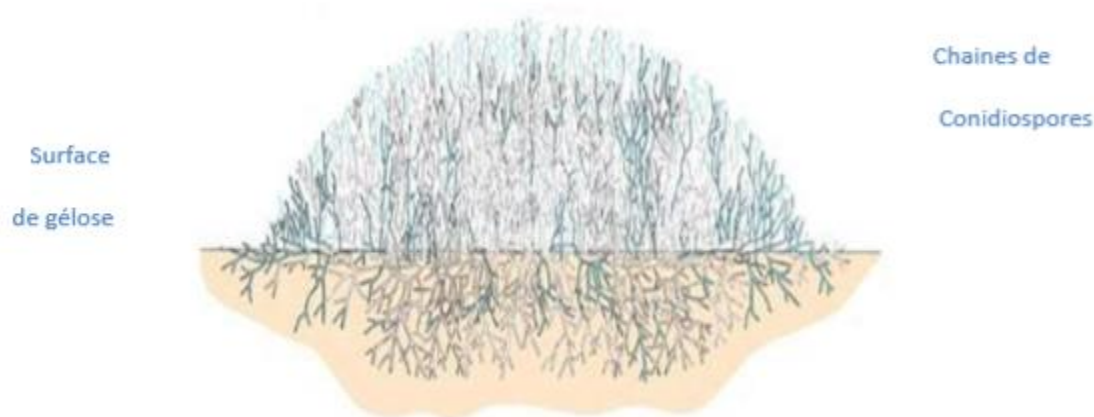


Figure 01 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivants (bleu-vert) et mort (blanc). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (Prescott et al., 2003).

- ✓ La plupart ne sont pas mobiles, lorsqu'il ya mobilité elle est limité aux spores flagellées
- ✓ .La composition de la paroi des actinomycètes ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine ou de l'acide diamino pimélique et leur cytologie est comme celle des bactéries (Lechevalier et Lechevalier, 1985).
- ✓ Les spores d'actinomycètes se développent par septation des extrémités du filament habituellement en réponse à la chaleur mais supportent bien la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative

- ✓ Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou alcalin, ils sont généralement mésophiles d'autres sont thermophiles tolèrent des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

VI- Caractères cultureux des actinomycètes

Avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, les actinomycètes ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries (Kitouni, 2007). Au laboratoire, les colonies visibles apparaissent au bout de 3 à 4 jours, le mycélium aérien mature, portant les spores, peut prendre 7 à 14 jours pour se développer, d'autres actinomycètes plus lentes exigent plus d'un mois d'incubation (Kulkarni S.W., 2003).

Lorsqu'ils croissent sur un substrat solide comme le sol ou la gélose, les actinomycètes développent un réseau ramifié d'hyphes poussant à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat pour former un tapis dense d'hyphes qu'on l'appelle mycélium végétatif. Chez beaucoup d'actinomycètes, les hyphes végétatifs se différencient en hyphes poussent vers le haut et forment un mycélium aérien qui s'élève au-dessus du substrat. C'est à ce moment-là, où les composés médicalement utilisés sont synthétisés (Prescott et al, ; 2010).

VI-1- Critères morphologiques

VI-1-1 Caractères macromorphologiques

D'après Nouredine, (2006) et Boudjella et al; (2007), les caractères cultureux contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux. Parmi les caractères cultureux importants :

-La production d'un mycélium aérien (MA) (cas de nombreux genres) ou non (ex *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus*..

-La présence ou non de mycélium du substrat (MS).

La couleur du MA et du MS. La couleur exacte peut être définie à l'aide d'une charte de couleur.

La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

VI-1-2- Caractères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants selon Nouredine, (2006) et Boudjella, et al., (2007) sont : La fragmentation ou non du MS ; La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur la MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes) ; la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores. La présence de spores mobiles (ex: *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, et *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres). La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou la présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotés ou synnemata (*Actinosynnema*) (**Demain et Solomon, 1986**).

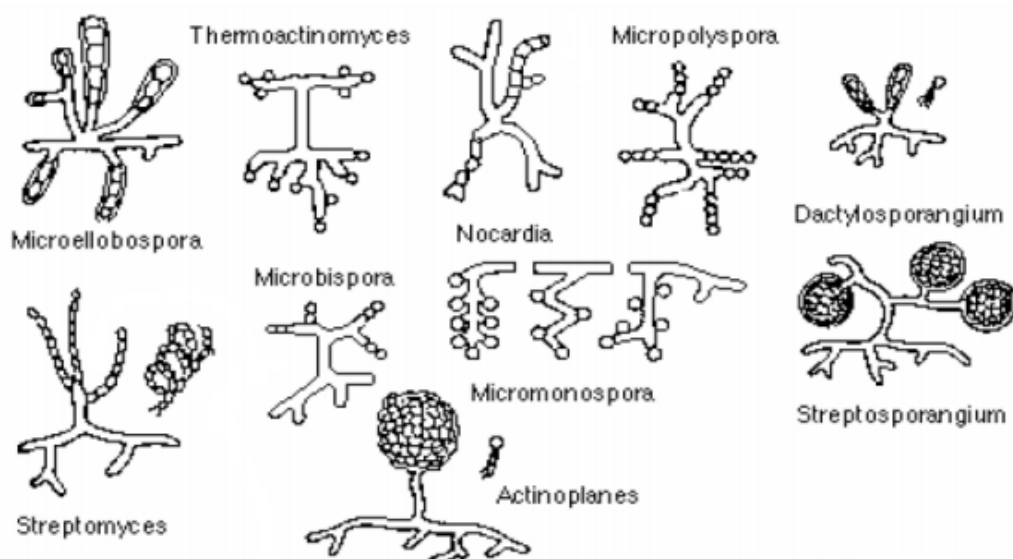


Figure02 : Principaux groupes d'actinomycètes (**Stanier, 1966**)

VII- Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont retrouvés presque partout dans la nature. Ils constituent une part importante de la microflore tellurique: 10 à 20% ou parfois plus (**Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976**). Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95% du total des actinomycètes (Lacey, 1973 ; Elwan et al., 1985). Après *Streptomyces*, les genres

les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (Dommergues et Mangenot, 1970). Les autres genres ne constituent qu'une fraction minime et sont parfois peu fréquents ou même assez rares. La plupart des Actinomycètes sont saprophytes mais quelques-uns peuvent être pathogènes ou symbiotes des plantes et des animaux (**Suzuki et al., 1994**). En générale, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe (**Ensign et al., 1993**). Physiologiquement, il est possible de distinguer les formes aérobies qui sont de très loin les plus nombreuses, et des types anaérobies trouvés primitivement chez les animaux et l'homme. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant les 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**).

VIII- Cycle de développement et de vie:

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes possèdent un cycle de vie complexe (figure03), qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort.

Il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifie. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (**Kim et al ; 2004 ; Smaoui, 2010**).

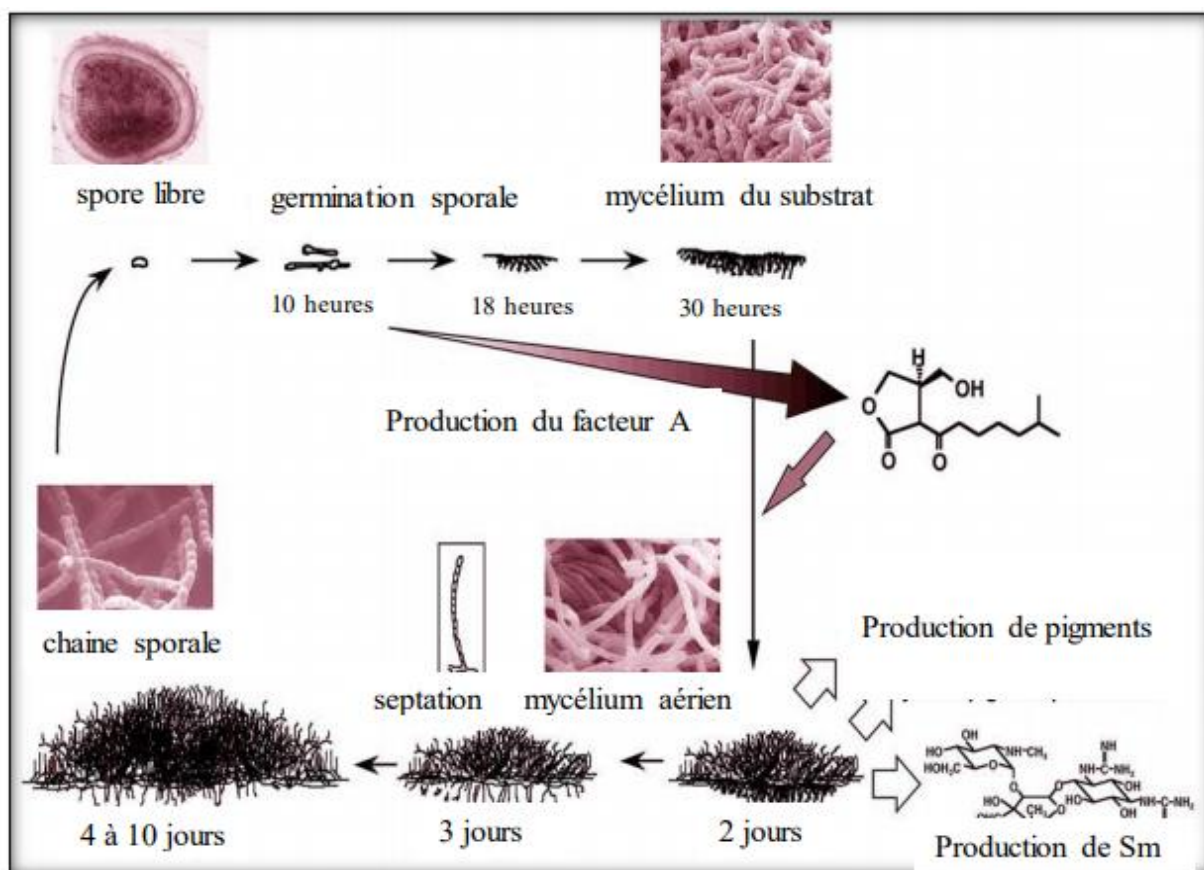


Figure 03 : Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002)

Les hyphes aériens des actinomycètes subissent une série de changements développement qui donneront naissance aux spores (Miguélez *et al* ; 2000). Ces spores sont soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporange. Elles sont de diverses formes, d'aspect lisse et ridée.

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium végétatif, même si certains Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement (Hodgson, 1992).

VIII-1- Les structures particulières :

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

- **Les sclérotés**, trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnées dont les vacuoles sont chargées de glycérides et d'acides gras ramifiés.
- **Les sporanges** sont des sacs contenant des spores. Ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développé ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien peu développé.
- **Les synnemata**, appelés également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressées, parfois fusionnées et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema* (**Theilleux et al ; 1993**).

VIII-1-2 Formation des spores :

Les différents groupes d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certains hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores hautement résistantes à la chaleur et autres adversités

- **Les endospore :**

Les endospores naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. Dans ce groupe, une subdivision supplémentaire est réalisée en fonction du mode de formation de la nouvelle paroi (**Locci et Sharples, 1984**). On parle ainsi de « sporulation entérothallique », caractéristique des genres *Planomonospora* et *Dactylosporangium*, lorsque la nouvelle paroi se forme entre la membrane cytoplasmique et la paroi de l'hyphe parentérale et de « sporulation holothallique », caractéristique du genre *Thermoactinomyces*, lorsque la nouvelle paroi qui délimite la spore provient, au moins en partie, de toutes les couches pariétales de l'hyphe parentérale, recouverte ou non d'une enveloppe (**Kitouni, 2007**). Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles et sont semblables, morphologiquement et chimiquement à celles des *Bacillaceae*. Elles contiennent une paroi externe épaisse, multicouche et résistante, qui enveloppe le cortex, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et le nucléoïde. Elles contiennent aussi de l'acide dipicolinique. Cet acide, probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur. De grandes quantités d'ions calcium et magnésium sont également associées à la

présence de cet acide dans la spore. Les endospores des thermo-actinomycètes peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (Sykes et Skinner, 1973).

- **Les exospores :**

Les actinomycètes forment généralement des exo-spores qui peuvent avoir des formes très variables. Les exo-spores naissent de la formation de parois transversales à partir des hyphes existantes. Une subdivision supplémentaire est également réalisée selon la présence ou l'absence d'une enveloppe qui recouvre la paroi de l'hyphe sporogène (Kitouni, 2007). Ainsi, la formation d'exo-spores par fragmentation d'hyphes avec enveloppe est la plus fréquente et se retrouve notamment chez *Actinoplanes* et *Streptomyces*. La formation d'exo-spores par fragmentation d'hyphes du substrat sans enveloppe se rencontre avec *Micromonospora*. Ces spores sont dépourvues de structures spécialisées. Ces exo-spores contiennent la plupart des éléments du mycélium primaire :

- Un seul nucléoïde correspondant à un seul génome haploïde pour les spores de *Streptomyces*. Le contenu du génome des exo-spores est plus riche en ADN mais moins en ARN que celui du mycélium du substrat.
- Des ribosomes dissociables en sous-unités 30 S et 50 S.
- Un système membranaire intracytoplasmique.
- Des vacuoles.
- Une membrane cytoplasmique
- Une paroi plus épaisse qui peut contenir jusqu'à trois couches auxquelles peuvent s'ajouter des éléments externes (Kitouni, 2007).

Ces exo-spores ne contiennent pas d'acide dipicolinique mais des quantités plus importantes de potassium, calcium et manganèse que dans le mycélium du substrat. Elles englobent aussi souvent des pigments. Leur contenu en tréhalose, relativement abandon, aurait un rôle dans la dormance et la résistance des spores (Kitouni, 2007). La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative (Prescott *et al* ; 2007).

IX- Importance des actinomycètes :

Les actinomycètes possèdent une importance économique majeure et aussi possèdent des rôles importants dans le sol et dans les interactions avec les plantes (Conn, 2005),

mais également pour la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique ayant des applications dans divers domaines industriels, et en particulier pharmaceutiques (**Djinni, 2008**). Ils présentent une variété de cycles vitaux qui sont uniques parmi les procaryotes et jouent un rôle majeur dans le recyclage de la matière organique dans l'écosystème du sol (**Hirsch et Christensen, 1983**).

➤ **Domaine médical et pharmaceutique :**

Les métabolites secondaires produits par les actinomycètes présentent un grand nombre d'effets biologiques diverses, notamment des activités antimicrobiennes. Ils sont doués aussi d'une activité antibactérienne, antifongique, antivirale et anticancéreuse.

Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux. Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux et des plantes, mais aussi dans l'alimentation pour augmenter les rendements zootechniques (**Khachatourians, 1998**).

➤ **Dans le domaine agronomique :**

- En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes possèdent d'autres potentiels intéressants (**Zaitlin et Watson, 2006**) tels que la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires, qui leur confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique dans le sol (**Goodfellow et Williams, 1983**).
- Ils ont l'avantage sur les autres microorganismes de s'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire. Ils sont aussi capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes (**El-Shatoury et al, 2004**).
- 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 (**Holzapfelet al., 2002**).
- 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**).

X- Métabolite des actinomycètes :

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers (**Theilleux, 1993 ; Zhang et Zeng, 2007**). Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (**Loucif, 2011**).

La diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* c'est grâce à leur diversité métabolique, c'est à dire à leur capacité à utiliser une large gamme de source de carbone et d'énergie, et à croître dans des conditions très variées, que les actinomycètes peuvent vivre dans des habitats très différents. D'ailleurs, grâce à cette diversité métabolique, les actinomycètes jouent un rôle extrêmement important dans la minéralisation de la matière organique par production d'enzymes extracellulaires, ce qui améliore les récoltes par la fertilisation du sol (**Djaballah, 2010**).

Le métabolisme des Actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.

X-1- Métabolite primaire :

Les métabolites primaires sont des substances produites par de micro-organisme en période de croissance active. Lorsque des micro-organismes sont mis en culture, ils entrent rapidement en phase de croissance (**Bill, 2007**). Quelle que soit son origine catabolique ou anabolique qui permet la formation de biomasse (**Guiraud, 2003**). Pendant cette phase, des substances nécessaires à leur développement sont produites par des réactions enzymatiques, elles sont appelées métabolites primaires ou généraux tel que : les alcools, les enzymes, les acides organiques...etc. (**Bill, 2007**).

Le métabolisme primaire des actinomycètes est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (**Theilleux, 1993**).

X-2- Métabolite secondaire :

Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (**Theilleux, 1993 ; Challis et Hopwood, 2003 ; Ginolhac, 2006**).

La première définition du métabolisme secondaire date de 1891 et désignait les transformations aboutissant aux composés relativement peu importants de la physiologie végétale (**Ginolhac, 2006**). Ce sont des substances généralement synthétisées plus tardivement dans le cycle de vie, alors que les micro-organismes vieillissent. Ils sont, en général, produits au cours de la phase stationnaire (**Horinouchi, 2002 ; Ginolhac, 2006**).

Le métabolisme secondaire des actinomycètes est affecté par la nature et les taux des sources de carbone et d'azote ainsi que par la disponibilité du phosphore (**Ou et al., 2008 ; Tarkka et Hampp, 2008**) et de molécules diffusibles telles que le γ -butyrolactone (**Nedal, 2007**). L'humanité trouve son intérêt dans l'utilisation de métabolites secondaires tel que : antibiotiques, herbicides anticancéreux...etc., mais le rôle vital de ces derniers pour la cellule bactérienne demeure inconnu (**Strub, 2008**).

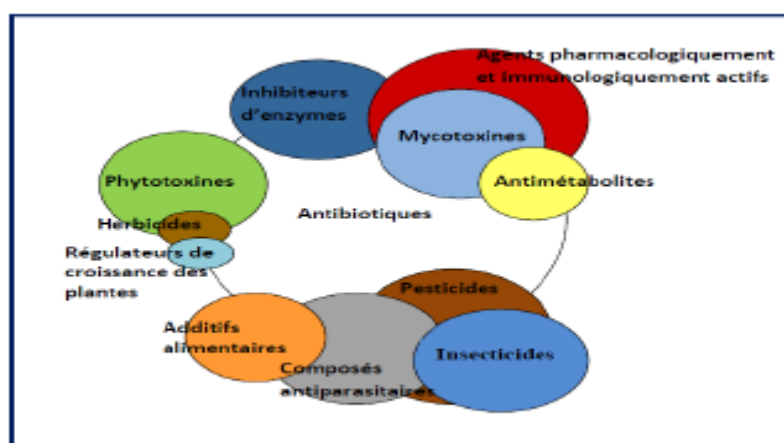


Figure 04: Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (**Conn, 2005**).

Parmi les métabolismes secondaires produits par les Actinomycètes :

X-2-1- Les enzymes :

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (**Theilleux, 1993**). En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (**Vonothini et al ; 2008**), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (**Park et al., 2002**).

Les protéases d'actinomycètes sous forme libre ou immobilisées sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, en tannerie et comme additifs dans les détergents (Ex : pronase de *S.griseus*) (**Theilleux, 1993**).

Par ailleurs, les actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de β -1-3-glucanase et causent des plasmolyses et des lyses des parois cellulaires des germes pathogènes (**Conn, 2005**).

X-2-2- Les antibiotiques :

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire (**Coates et Hu, 2007**). Sur 8100 molécules qui ont été recensées vers la fin de l'année 1999, 45,6% ont été produites par le genre *Streptomyces*, 16,0% par des actinomycètes autres que *Streptomyces*, 16,9% par d'autres bactéries et 21,5% par des champignons. En plus du nombre important de ces molécules, un autre aspect impressionnant des antibiotiques est la diversité de leurs structures chimiques (**Demain et Lancini, 2006**).

Parmi les microorganismes producteurs de métabolites secondaires possédant une activité anticellulaire, 70% appartiennent au groupe des actinomycètes et parmi eux, on trouve 95% de *Streptomyces*. environ 21% de ces métabolites présentent une activité antifongique se répartissant également entre substances de structure polyénique et non-polyénique (**Bushell 1983**), (**Bastide et al., 1986**).

X-2-3- La production des antifongiques :

Les antagonistes microbiens sont largement utilisés en lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. L'activité antagoniste de *Streptomyces* vis-à-vis des pathogènes fongiques est généralement liée à la production de composés antifongiques extracellulaires et des enzymes hydrolytiques (**Prapagdee et al., 2008**). En plus des

Streptomyces, d'autres genres appartenant aux actinomycètes sont également des producteurs de molécules possédant des activités antifongiques (**Sanglier et Trujillo, 1997**). Les ramicidines sont par exemple des antifongiques produits par une souche d'*Actinomadura bibisca* (**Tomita et al, 1990**).

Chapitre II
Les infections
fongiques

I- Les infections fongiques :

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 (**Boucheffa, 2011**).

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

Le *Candida* et l'*Aspergillus* étant les deux principaux types de champignons pathogènes (**Carle, 2003**).

L'incidence des infections fongiques a augmentée de façon dramatique au cours de la dernière décennie et celles-ci se classent maintenant au quatrième rang des infections nosocomiales. Elles peuvent se manifester par des infections superficielles au niveau de la peau, des téguments et des membranes ou par des infections disséminées invasives très sévères responsables d'un taux de mortalité important chez les patients ayant un système immunitaire affaibli (**Carle, 2003**).

Les infections fongiques sont difficiles à diagnostiquer et à traiter. Les tests d'identification et de sensibilité pour les champignons sont beaucoup moins rapides et performants que ceux qui existent pour les bactéries (**Carle, 2003**).

En Algérie, les mycoses superficielles sont fréquemment diagnostiquées. Les infections fongiques profondes sont moins souvent observées (**Chekiri-Talbi M, Denning DW, 2017**).

L'Algérie compte 40,4 millions d'habitants et probablement au moins 568 900 (1,41 %) d'algériens ont une infection fongique grave chaque année. et l'asthme fongique (72 000) sont probablement les problèmes les plus fréquents car il y a plus d'un million d'asthmatiques adultes. L'accent est mis sur l'amélioration du diagnostic et des données épidémiologiques liées à l'infection fongique en Algérie (**ChekiriTalbi, Denning, 2017**).

Tableau 1 : Estimation des infections fongiques invasives (incidence annuelle) chroniques et allergiques en Algérie (**Chekiri-Talbi M, Denning DW, 2017**).

Données démographiques	Nombre	Source
Population		
Population (n)	40 400 000	2
% d'enfants	28	2
Nombre d'enfants	11 312 000	2
AduLtes	29 088 000	2
% femmes âgées pLus de 60 ans	7	2
Infections respiratoires		52
Tuberculose pulmonaire incidence annuelle totale	5418	2
Population âgée plus de 40 ans	11312522	14
Prévalence des BCPO (COPD) tous degrés confondus	9,20%	17
Taux de L'asthme chez [es adultes		17

Nombre d'adultes atteints d'asthme	3,10%	
	1 252 400	
HIV/AIDS patients		
Nombre total HIV/AIDS	9103	11
Proportion des cas diagnostiqués par ARV	1561	11
Nombre de cas diagnostiques ne recevant pas d'ARV	7542	11
Nouveau cas AIDS annuel	1077	11
Nombre de décès par AIDS en 2014	843	
AML des patients par an	300	12
Taux de transplantation rénal annuel	200	13

I-1-Les candidoses :

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 muco-cutanées 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 ., 2000**

En Algérie la candidose vulvo-vaginale récurrente (485 000), la candidose intra-abdominale chez 303 personnes, sont les problèmes les plus courants qui menacent la vie (**Chekiri-Talbi et Denning, 2017**).

I-2-Les aspergilloses :

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.

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**).

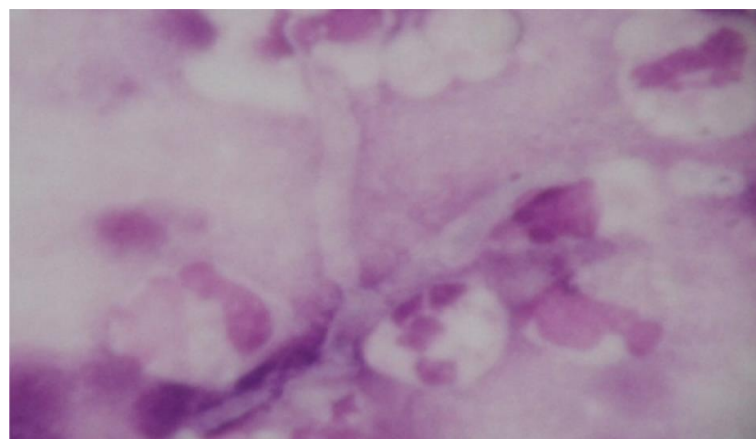


Figure 5 : Filaments dichotomique 45° à partir des crachats d'un Algérien neutropénique la culture donne le complexe *Aspergillus fumigatus* (**Chekiri-Talbiet Denning2017**).

I-3- Les autres infections fongiques :

I-3-1- Les fusarioses

Les fusarioses sont dues à des champignons filamenteux du genre *Fusarium*, ils sont cosmopolites et ubiquitaires. Environ quinze espèces sont impliquées en pathologie humaine, les plus fréquentes sont *F. solani*, *F. oxysporum* et *F. verticillioides* (Nucci -et Anaissie, 2007).

Tous les organes peuvent être touchés mais les atteintes les plus fréquentes sont la peau, les poumons et les sinus³¹. Les infections disséminées surviennent essentiellement chez les patients atteints de leucémie aiguë. Lors des neutropénies profondes et prolongées et dans les allogreffes de CSH (Dignaniet. Anaissie, 2004).

I-3-2- Les zygomycoses :

Les zygomycoses sont dues à des champignons cosmopolites, saprophytes. Les zygomycoses sont placées au deuxième rang des infections à filamenteux (Pagano et al., 2004), elles sont rares mais leur incidence est en augmentation (Bitar et al., 2009). Le taux de mortalité est important (environ 70%)(Pagano et al., 2004).

Des phénomènes de résistance à certains antifongiques largement utilisés (voriconazole, caspofungine), ont été décrits au cours des traitements notamment visée prophylactique (Marty FM, et al ; 2004, Vigouroux S, et al ; 2005).

II- Les antifongiques :

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux.

II-1- Définition :

Les antifongiques sont des substances capables de détruire sélectivement ou non les différents champignons rencontrés en mycologie. Ils s'administrent par voie locale ou générale (O'fel A., 1981).

Ces substances antifongiques ont deux origines: ce sont soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse. Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (Bastide *et al.*, 1986).

II-2- Historique :

La découverte de la nystatine en 1950 par Hazen et Brown, qui est un polymère à activité antifongique synthétisé par *Streptomyces*, a ouvert l'ère de l'antibiothérapie antifongique (Drouhet *et al.*, 1978). Depuis, plus de 200 molécules antibiotiques polyéniques furent découvertes. Mais des problèmes de solubilité, d'absorption et de toxicité n'ont permis l'utilisation que d'un nombre restreint de ces composés en thérapeutique. (Bolard, 1986 ; Belkherroubi, 2009).

La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée dans la figure ci-après (Figure 6).

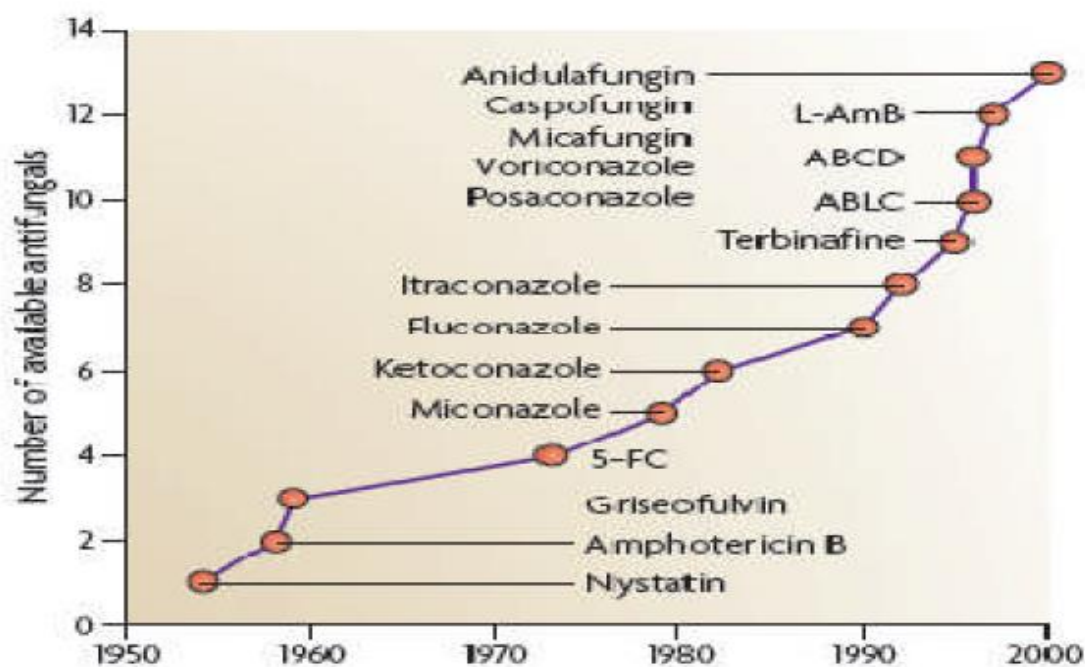


Figure 6: Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques.

(Ostroskyzeichner *et al.*, 2010).

II-3- Classification des antifongiques :

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

Les principales molécules antifongiques commercialisées appartiennent à quatre familles les polyènes sont des molécules d'origine naturelle (**Martini, 2008 ; Mouly et Se11ier, 2004**) produits par les actinomycètes ou par des champignons nous pouvons citer l'exemple de l'Amphotéricine B produite par *Streptomyces nodosus*. ; Les analogues nucléosidiques et les azolés qui sont synthétisées par voie chimique au laboratoire ; et les échinocandines dont certaines sont naturelles et d'autres semi-synthétiques comme l'acétate de caspofungine qui est un dérivé aminé semi-synthétique de la pneumocandine B, produit naturel de la fermentation de *Glarealozoyensis* (**Ripert, 2013**).

II-4- Les antifongiques produits par les actinomycètes :

II-4-1- Cycloheximide :

Isolée de *Streptomyces griseus* elle est utilisée uniquement *in vitro* dans les milieux de culture, elle inhibe la croissance de certaines levures et la majorité des champignons filamenteux saprophytes (**Koenig, 1995**).

II-4-2- Les polyènes

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

a. La nystatine : le plus ancien des antifongiques naturels, a été isolée de *Streptomyces noursei* en 1950, elle n'est utilisée que par voie cutanée ou orale en raison de sa toxicité par voie parentérale (injectable), elle est le plus souvent indiquée pour le

traitement courant des candidoses digestives, vaginales et cutanées (**Mouly et Sellier, 2004 ; Ripert, 2013**).

b. L'Amphotéricine B :

Isolée de *Streptomyces nodosus* en 1955, est un macrolide polyénique amphotère (lactone avec 7 doubles liaisons conjuguées), elle est indiquée comme traitement des candidoses vaginales et cutanées, non absorbée par voie digestive, elle doit être administrée par voie veineuse (mycoses profondes) (**Pourriat et Iartin, 2005**).

Les polyènes présentent une toxicité faible à modérée qui dépend de l'état du patient. On remarque comme effet indésirables, une fièvre, des frissons, nausées, vomissements, hypocalcémie, ou encore des troubles hépatiques, l'élévation de la créatininémie (altération de la fonction rénale) est souvent réversible après arrêt du traitement, pour l'amphotéricine B, la forme lipidique est mieux tolérée par les reins et donc réservée aux patients avec une insuffisance rénale, ces molécules polyéniques sont coûteuses et doivent également être adaptées selon le degré de l'insuffisance rénale, cette toxicité relative rend cette classe d'antifongique de moins en moins désirée (**Martin, 2008 ; Monis et Sellier, 2004 ; Ripert, 2013**).

II-4-3- La nikkomycine :

La nikkomycine est un antifongique d'origine naturelle isolé de *Streptomyces sp.*, cet antifongique induit différents mécanismes d'action selon la composition du milieu de culture, il inhibe la chitine synthase (Chs) responsable de la formation de chitine de la paroi fongique, cependant, *C. albicans* se trouve être intrinsèquement résistante à cette molécule (**Feng et al., 2014**) **Kirn et al., (2002)** expliquent ce phénomène par la présence de trois isoformes de la Chs, la CaChs1, CaChs2 et la CaChs3.

Feng et al.. (2014) sont parvenue à synthétiser les analogues nikkomycine Px et Pz semi synthétique de la molécule initiale qui possèdent tin spectre d'action contre la levure *C. albican*, *in vitro*, l'interaction synergétique de la nikkomtycine avec les azolés ou d'autres antifongiques contre la levure a également été rapportée (**Li et Rina1di, 1999 ; Sandovsky et al., 2008**).

*Partie
expérimentale*

Matériels et méthodes

I. Objectif de travail :

Ces dernières années, Les infections fongiques invasives, aspergillose et candidose présentent une émergence importante, et sont généralement associées au contexte opportuniste de patients immunodéprimés, que ce soit de manière acquise (VIH), thérapeutique (immunosuppresseurs en transplantation d'organe solide et greffe de moelle) ou iatrogène (anticancéreux) (Billaud, 2007).

Les actinomycètes représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques: environ 70% des molécules actives d'origine microbienne(Okami et Hotta, 1988), avec des possibilités intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (Islam et al., 2009).

Nous nous sommes intéressés à l'activité des souches d'actinomycètes sur les champignons filamenteux comme *Aspergillus flavus*, les souches fongiques nosocomiales qui sont connues pour leurs incidence dans les infections intra hospitalière et la prévalence de leurs résistances aux traitements thérapeutiques actuels ; le recherche de l'activité est également testée sur plusieurs souche de levure comme *Candida albicans*, une levure commensale, Pathogène opportuniste dotée d'importantes facultés adaptatives, bien connue des milieux hospitaliers et très souvent étudiée pour la pathogénicité et ses mécanismes de résistance aux antifongiques.

II. Cadre de l'étude

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologique, Université de Tébéssa, pendant une durée de 4 mois du 29 janvier 2018 jusqu'à 15 mai 2018

III. Matériels :

III-1 Grands matériels :

✚ Agitateur

✚ Autoclave

✚ Bain marie

- ✚ Balance
- ✚ Etuve
- ✚ Hotte bactériologique et Hotte chimique
- ✚ Loupe binoculaire
- ✚ Microscope optique
- ✚ Plaque chauffante
- ✚ Réfrigérateur
- ✚ Table à niveau
- ✚ Vortex
- ✚ Rhotavapeur

III-2 Petits matériels :

- ✚ Anse de platine
- ✚ Barreaux magnétique
- ✚ Bec bunsen
- ✚ Boites de Pétri
- ✚ Portoirs
- ✚ Entonnoir
- ✚ Film photographique
- ✚ Lames
- ✚ Micropipette
- ✚ Papier watman n°1

- ✚ Picette
- ✚ Pipettes Pasteur
- ✚ Spatule
- ✚ Verres: béchers gradués, éprouvettes graduées, tubes à essai stériles, les flacons, et les erlynes

III-3 Matériels biologiques :

- ✚ Les 12 isolats d'Actinomycètes.
- ✚ Les champignons filamenteux :
 - *Rhodotorula mucilaginosa*
 - *Rhizopus oryzae*
 - *Scedosporium apiospermum*
 - *F.solani*
 - *Lichtheimia corymbifera*St87
 - *F.oxysporum*
 - *Aspergillus calidoustus*
 - *Lamentospora prolificians* ST67
 - *Aspergillus calidousus*A5
 - *Paecilomyces variotii* ICF62B (Arthro)
 - *Penicillium chrysogenum* ICF 59
 - *Candida krusei* ATCC
 - *Candida parasilosis*ATCC
 - ICF58V
 - ICF58B
 - ICF53
 - ICF57
- ✚ Les levures sont représentées par les codes suivants :
 - ICF35,
 - ICF37,
 - ICF38,
 - ICF43,

- ICF44

III.4. Les milieux de cultures :

- Bennet
- GYEA
- ISP 1
- ISP 2
- ISP2 molle
- Sabauroud solide
- Sabauroud molle

NB : La composition de chaque milieu est présentée dans la partie annexe.

III-5 Les solutions et colorants utilisés :

- ✚ L'eau distillée stérile
- ✚ L'eau physiologique stérile
- ✚ Violet de Gentiane
- ✚ Lugol
- ✚ Alcool
- ✚ Fuchsine
- ✚ Huile à immersion

IV- Méthode de Travail :

IV-1 Origine des souches

Ce travail est basé sur l'étude de la biodiversité métabolique de 13 isolats d'Actinomycètes qui proviennent d'une collection de souches d'Actinomycètes du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Badji Mokhtar Annaba.

Ces isolats sont représentés par les codes suivants :

- ✚ S20
- ✚ S97

- ✚ S135
- ✚ S205
- ✚ S275b
- ✚ S275g
- ✚ S395
- ✚ S370
- ✚ S406
- ✚ S444
- ✚ S450
- ✚ S453.

IV-2 Repiquage et purification des isolats

La purification des isolats est une étape essentielle dans notre travail, elle permet d'obtenir des colonies bien isolées et pures ; pour obtenir ces colonies, on doit ensemencer successivement des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP2, par la méthode de strie d'épuisement pour chaque isolat. Ensuite, ces boîtes sont incubées à une température de 30°C pendant 7 jours, car les Actinomycètes sont caractérisées par une croissance relativement lente par rapport aux autres bactéries (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

IV-3 Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes

IV-3.1. Choix du milieu de production des molécules antifongique

Afin de rechercher une meilleure production des molécules antifongiques , les souches d'actinomycètes purifiées sont repiquées sur différents milieux : ISP1,ISP2, GYEA, Bennet. en stries serrés pour faire l'objet de la recherche des propriétés antagonistes vis-à-vis des germes cibles (levures, champignons filamenteux). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant plusieurs jours. (du premier jusqu'au 21ème jours) et la recherche de l'activité antifongique a été réalisé au cours du temps.

IV-3-2 L'activité antifongique contre les levures :

Le test d'antagonisme vis-à-vis des germes cibles utilisés a permis de mettre en évidence l'activité de ces souches contre les levures par la méthode des cylindres d'agar :

- Réaliser une suspension dans l'eau physiologique stérile pour chacune des levures tests, ensemercer par écouvillonnage les levures test sur gélose Sabouraud
- Des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont prélevés à partir des cultures d'actinomycètes dans chaque milieu de production et sont déposés à la surface du milieu Sabouraud préalablement ensemençé par les levures tests. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 4°C pendant deux à quatre heures pour permettre une diffusion des substances actives puis elles sont incubées à la température de 30 °C pendant 24 à 48 heures.

Après incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour des disques d'actinomycètes produisant des antifongiques actifs contre la souche test. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée. L'absence de zones d'inhibition claires autour des disques d'agar, indique un résultat négatif qui montre que les bactéries sont résistantes aux substances produites par les actinomycètes. Plus cette zone est grande, plus l'activité antibactérienne est importante (**Petrosyan et al.,2003**). Ce test a été réaliser dans plusieurs jours (jours3,jours7, jours10et jours21) afin d'optimiser le meilleur jour de production des molécules antifongiques.

IV-3-3 L'activité antifongique contre les champignons filamenteux :

Le test d'activité a été réalisé selon la technique de la double couche (**Vidaver et al.,1972**). La souche d'actinomycète à tester est ensemençée au centre d'une gélose ISP2 coulée en boîte de pétrie. L'incubation se fait à 30°C pendant 7 jours.

1 ml de la suspension des souches cibles est ensemençé en masse dans 10 ml de milieu semi solide de sabouraud (agar 8g/l). Après agitation, le milieu est coulé en double couche sur la gélose ISP₂ renfermant la souche d'actinomycète.

L'incubation se fait à 26 °C pendant 24 à 48 pour les levures et 5 à 10 jours pour les moisissures. Le résultat positif se traduit par absence de croissance de la souche test autour de la colonie des actinomycètes.

IV-3-3 Extraction des molécules antifongiques :

Après la sélection des souches les plus actives et la détermination des meilleurs jours et milieux de production des molécules antifongiques.

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées sur milieu ISP2

Après incubation à 30 °C pendant 3 jours à une semaine selon le meilleur jour de production, la gélose est fragmentée puis répartie dans des erlen contenant 40 ml des différents solvants : méthanol, éthanol, acétate d'éthyle, butanol, dichlorométhane séparément.

Après agitation vigoureuse pendant une heure, les extraits organiques sont récupérés par filtration, et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu est ensuite resuspendu dans 5 ml de méthanol et 1ml de DMSO dilué à 10%.

IV-3-4 Recherche de l'activité des extraits

La recherche de l'activité des extraits issus de chaque solvant et resuspendu dans le DMSO ou le Méthanol a été réalisée par la méthode des disque .Des disques de papier Whatman N°1 (6mm de diamètre) stériles sont déposés sur la gélose Sabouraud préalablement ensemencé par les levure-tests. Et sur le milieu ISP2 molle préalablement ensemencé dans la masse par les champignons filamenteux-tests. Les disques sont ensuite imbibé par 10µl des différents extraits organiques et sont séchés sous la haute. Les boites sont incubées à 30C°.

Des disques témoins, imprègnes de solvants (méthanol, DMSO dilué à 10%) sont également testés. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 à 48 heures d'incubation (**Barry et al.,1970**).

IV-3-5 Révélations chimiques des extraits (Chromatographie) :

Une fois le meilleur solvant d'extraction est mis en évidence pour chaque souche étudiée, il est nécessaire de déterminer le meilleur système de séparation par migration en réalisant une chromatographie sur plaques de gel de silice.

Les dépôts des différents extraits ont été réalisé sous forme de spots placés à 3 cm du bord inférieur de la plaque CCM et à partir de 1 cm des bords latéraux 25µL/spot des

extraits

sont déposés progressivement à l'aide d'une microseringue et sont séchés entre chaque application.

Trois systèmes de solvants ont été utilisés, acétate d'éthyle-méthanol (10-1.5, v/v), éthanol-ammoniac-eau (8/1/1,v/v/v) et n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2,v/v/v) (**Boudjella, 2007**)

L'atmosphère des cuves de chromatographie (qui contiennent 10 ml de système de solvants) est mise à saturer 2 h avant l'introduction des plaques (**Aouiche, 2010**). Après les plaques sont retirés et sécher à température ambiante.

La révélation se fait par vanilline - acide sulfurique

Les zones d'inhibition sont notées après 24 à 48 h et les rapports frontaux (Rf) sont calculés selon la formule suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance entre dépôt et tache active}}{\text{Distance entre dépôt et front de migration du solvant}}$$

IV-3-6 Révélation microbiologiques ou bioautographie :

A l'inverse des méthodes chimiques particulières à chaque classe d'antifongique et qui ne peuvent être mises en œuvre qu'une fois connues leurs réactions colorées, la révélation des antifongiques par voie microbiologique présente un caractère absolument général, puisqu'il consiste à mettre en contact le chromatogramme dans une boîte de Pétri (**Kitouni, 2007**) avec le milieu de ISP2 molle ou sabouraud molle préalablement ensemencé avec les levures-tests et les champignons-tests.

La révélation microbiologique permet de détecter les tâches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur rapport frontal (Rf).

La bioautographie est réalisée en utilisant des plaques de gel de silice. Trois systèmes de solvants ont été utilisés, acétate d'éthyle-méthanol(10-1.5, v/v), éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v)et n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v)(**Boudjella, 2007**).

L'atmosphère des cuves de chromatographie (qui contiennent 10 ml de système de solvants) est mise à saturer 2 h avant l'introduction des plaques (**Aouiche, 2010**).

Les extraits organiques sont déposés sur les plaques à l'aide d'une microseringue à raison de 25 µL/spot. Après séchage avec un séchoir,-

Les plaques sont retirées des cuves, séchées à température ambiante. Par la suite les chromatogrammes sont alors déposés de façon délicatement dans les boîtes de pétries qui contiennent les milieux préalablementensemencés par les souches-tests, et sont incubés à 26°C pour les levures et 30°C pour les champignons.

Les zones d'inhibition sont notées après 24 à 48 h et les rapports frontaux (Rf) sont calculés selon la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre dépôt et tache active}}{\text{Distance entre dépôt et front de migration du solvant}}$$

Résultats et discussions

I. Résultats et Discussion :

Dans le cadre de ce travail, on a étudié 12 isolats d'Actinomycètes qui ont été identifiés qui appartient au genre *Streptomyces*; on s'est intéressé à l'étude de l'activité antifongique de ces isolats contre des levures et des champignons filamenteux.

I-1 Repiquage et vérification de la pureté des isolats :

Des colonies pures de *Streptomyces* sont obtenues après un repiquage successif sur le milieu : ISP2, par la méthode d'épuisement sur gélose Chaque isolat pur est caractérisé par une mode de croissance déférente.

Après 2 à 3 jours d'incubation, des colonies jeunes sont apparues présentant un aspect typique des actinomycètes. Ces colonies de forme ronde, sèches, de couleur beige clair à brun correspondent à la formation du mycélium de substrat. Celui-ci est apparu dans les premiers stades de la croissance et s'est développé sur la gélose puis s'est enfoncé radicalement dans le milieu. Ce mycélium peut être aussi observé sur le dos de la colonie lorsque le milieu est transparent. Entre le 4ème et le 21ème jour d'incubation les colonies prennent un aspect poudreux de couleur blanche à grise dans un premier temps, c'est le mycélium aérien. Ce dernier continue de se développer adoptant progressivement des couleurs variés, ce changement correspond à la formation des spores sur les extrémités des hyphes aériens.

Pour la souche 97 produisent un pigment diffusible dans le milieu ISP2 le pigment est de couleur maron additione de jaune. Pour la souche 444 aussi produisent des pigments sont de couleurs vert et marron Pour la souche 205 produisent un pigment diffusible dans le milieu bennet le pigment est de couleur maron .

I-2 L'activité antifongique des souches d'actinomycètes :

I-2-1 L'activité antifongique contre les levures :

✚ Méthode de cylindre d'agar :

L'activité antifongique des souches de *Streptomyces* isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette technique nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des actinomycètes contre les levures testées.

Les résultats de l'activité antifongiques vis-à-vis des souches levures tests sont reportés dans le tableau 2 et la planche 1 suivantes :

Les résultats montrent que parmi les 12 souches testées 11 souches sont actives contre les levures testées, certaines présentent une activité dès le 3ème jour comme S359, S370, S406, S450. Et d'autres présentent une activité tardive au 7ème jour comme S97, S135, S275b, S275g, S444, S453. Seulement S275g, S359, S406, S450 continueront l'activité au 10ème jour, parmi ces dernières souches seulement S359 et S450 continueront l'activité au 21ème jour par contre la S20 possède une très lente activité qui apparaît au 21ème jour.



Planche 1 : la coupure des cylindres d'agar d'Actinomycètes

Un graphe de production des molécules antifongique a été tracé pour les quatre milieux de production, les résultats sont représenté dans la figure 7

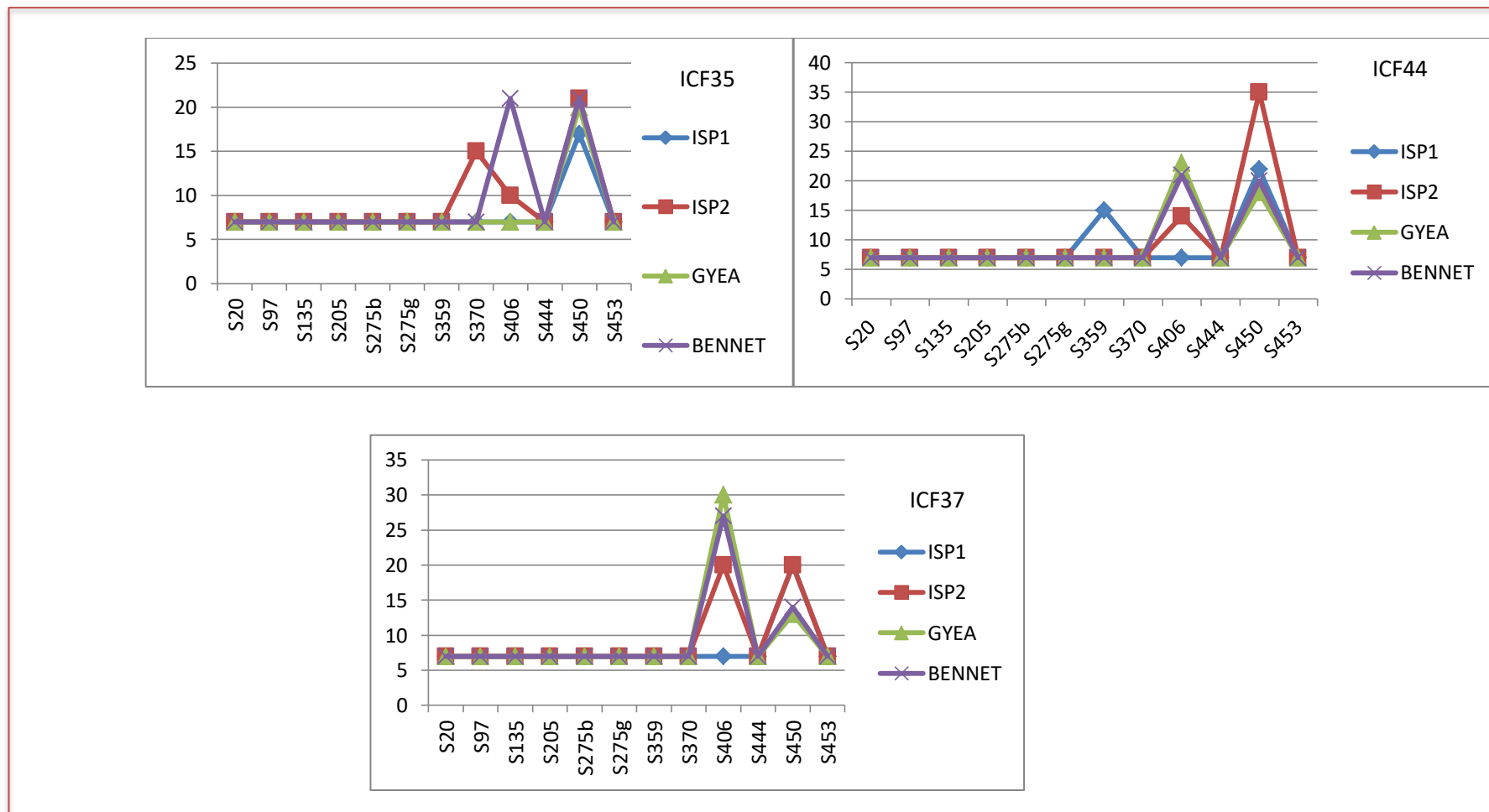


Figure7 : Activité antifongique de J3 des 12 isolats de *Streptomyces*

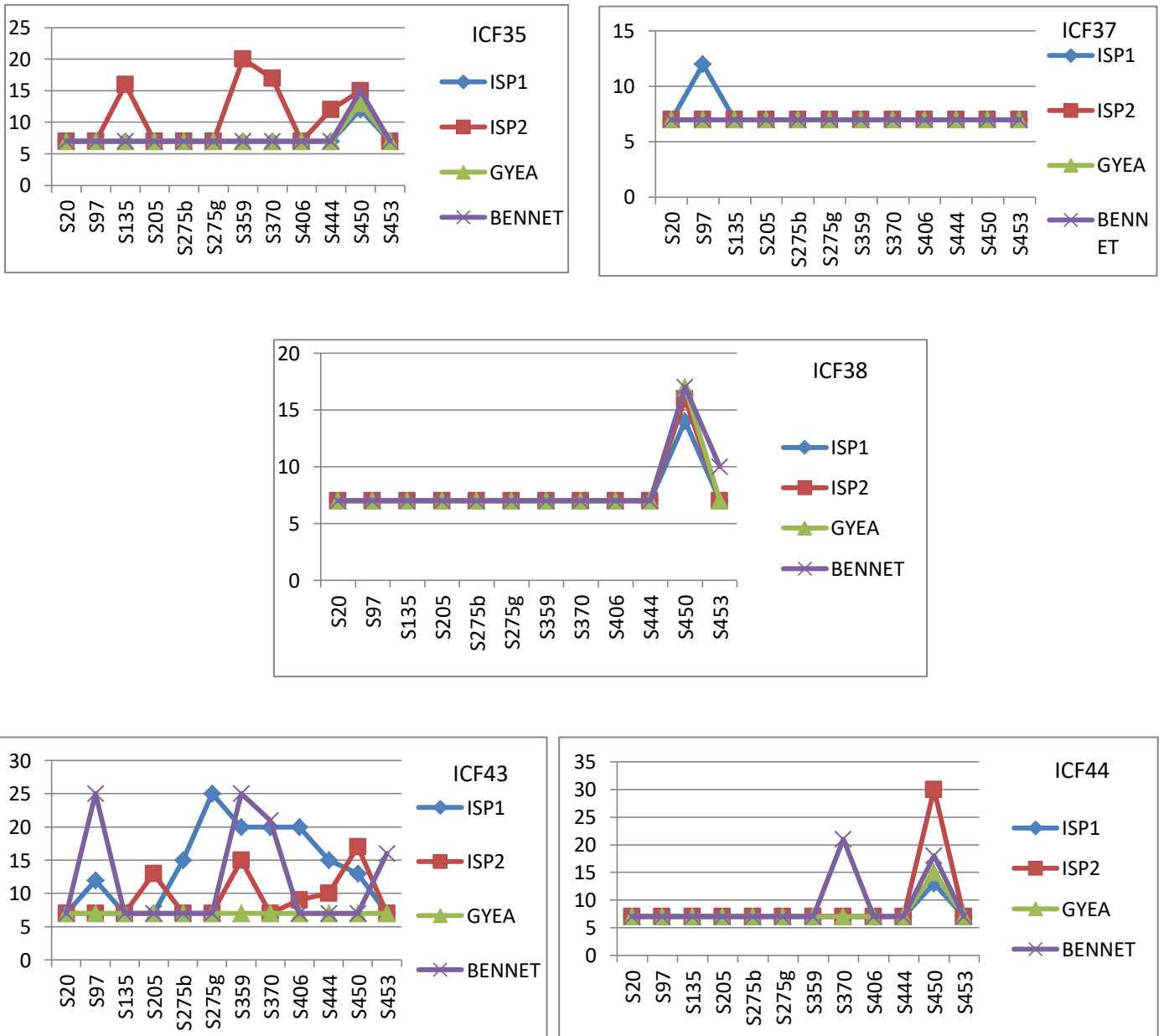


Figure 8 : Activité antifongique de J7 des 12 isolats de *Streptomyces*

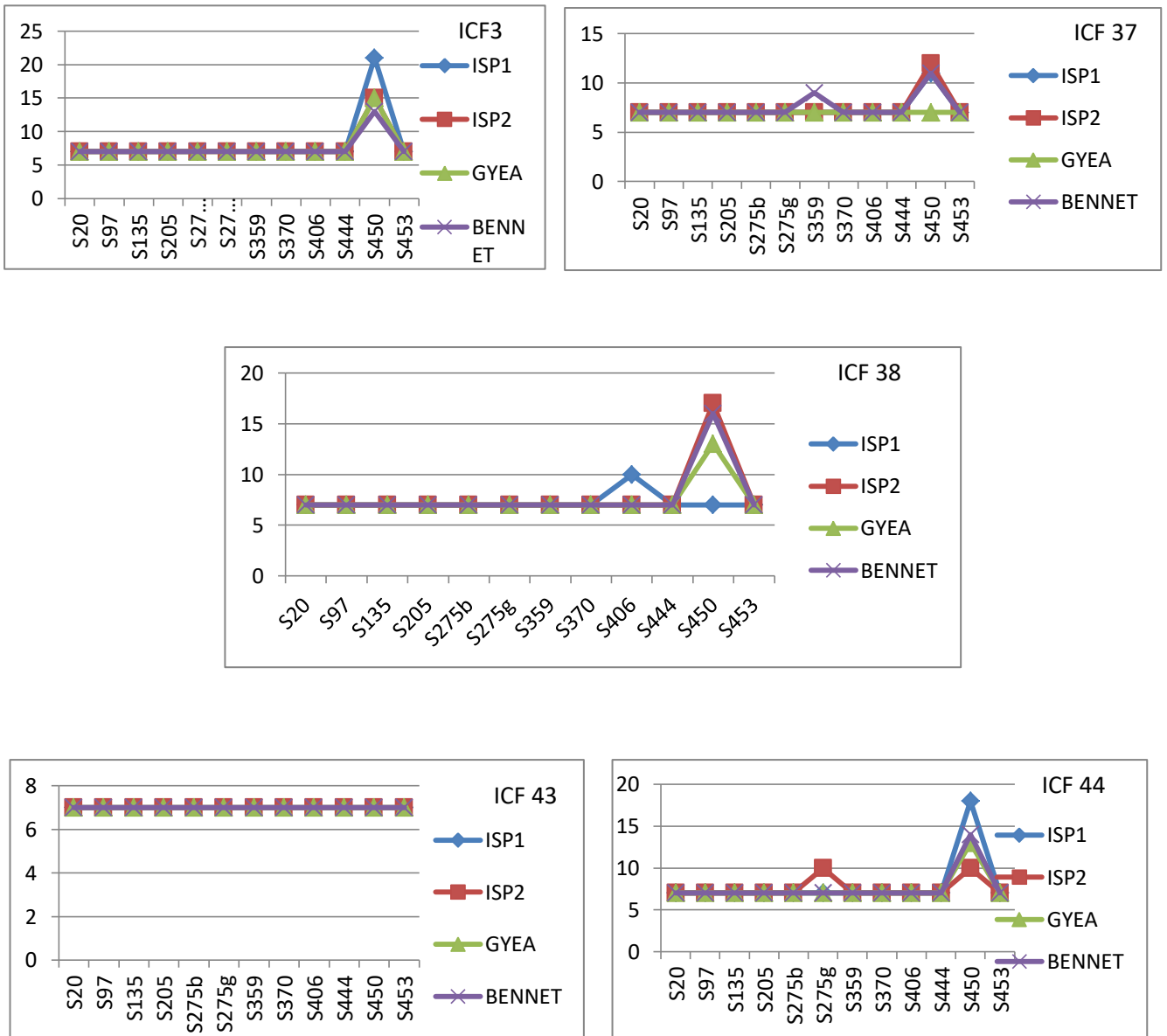


Figure 9 : Activité antifongique de J10 des 12 isolats de *Streptomyces*

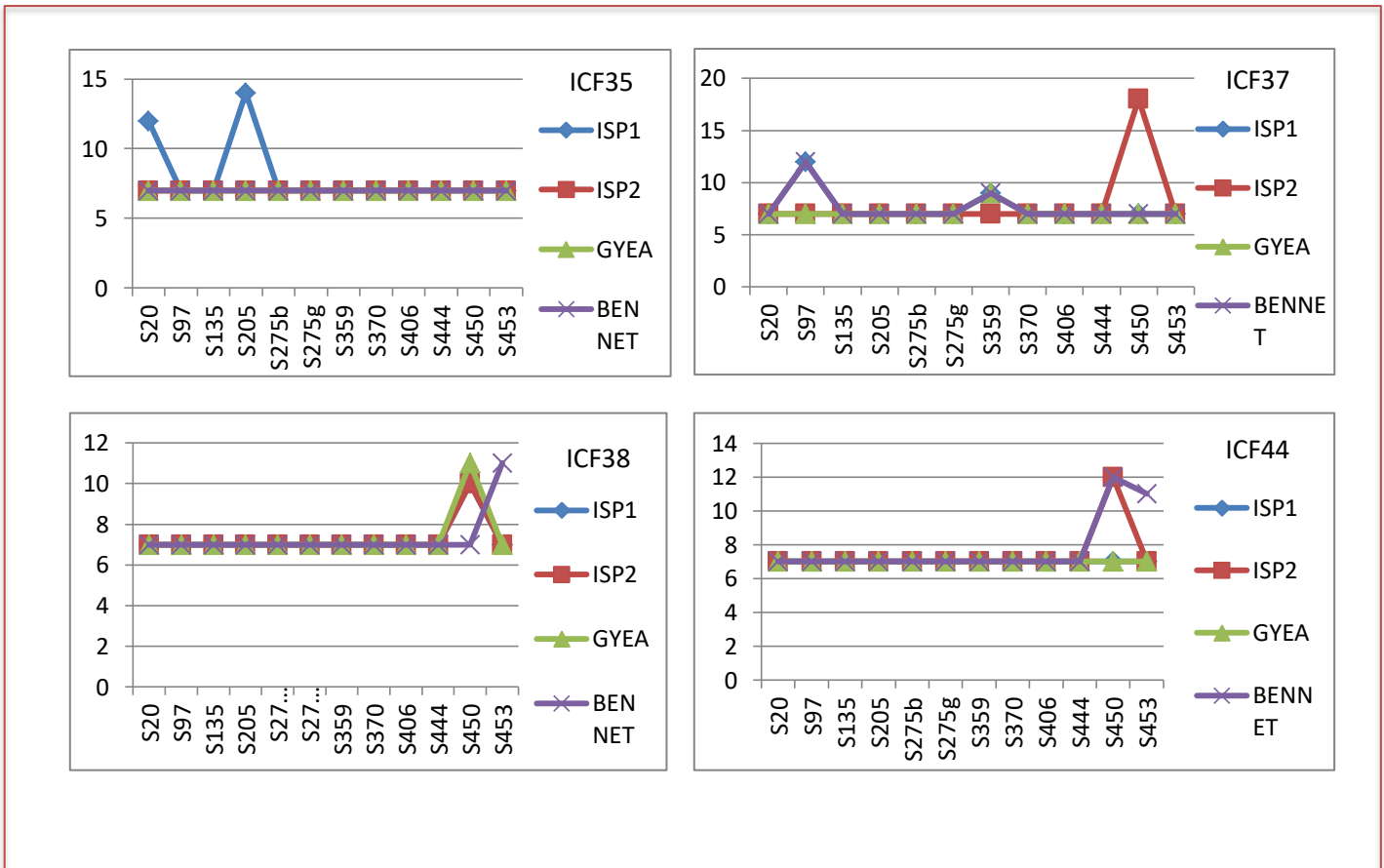


Figure 10 : Activité antifongique de J21 des 12 isolats de *Streptomyces*

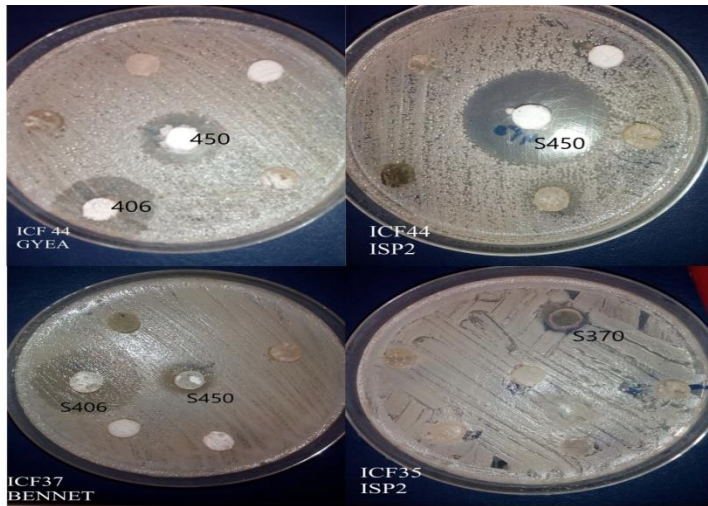


Planche 2: activité antifongique de J 3 de quelques isolats de *Streptomyces*

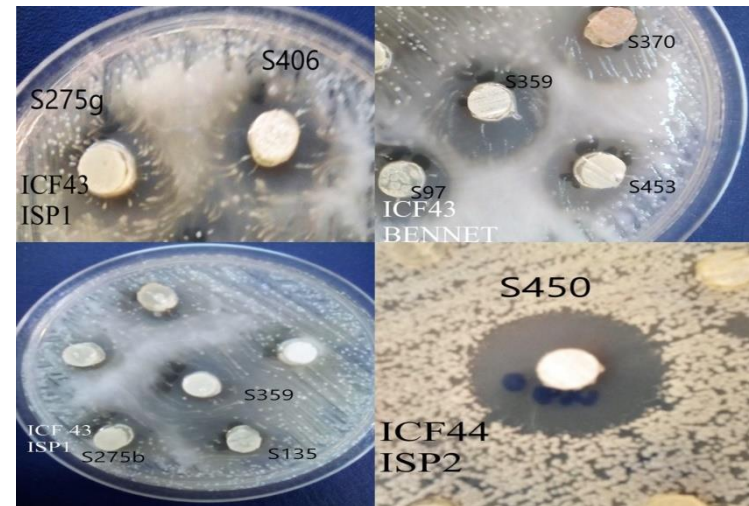


Planche 3 : activité antifongique de J7 de quelques isolats de *Streptomyces*

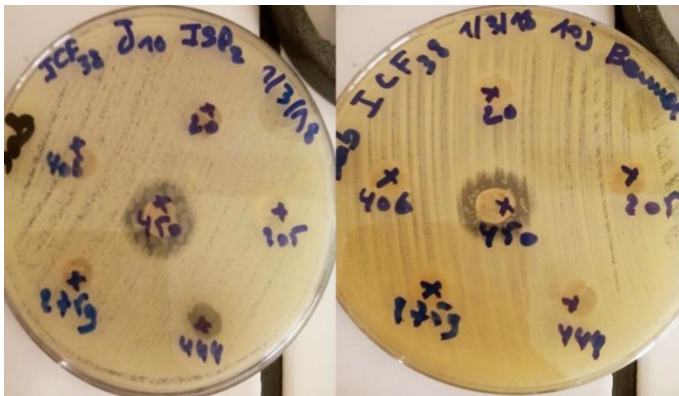


Planche 4: activité antifongique de J10 de quelques isolats de *Streptomyces*

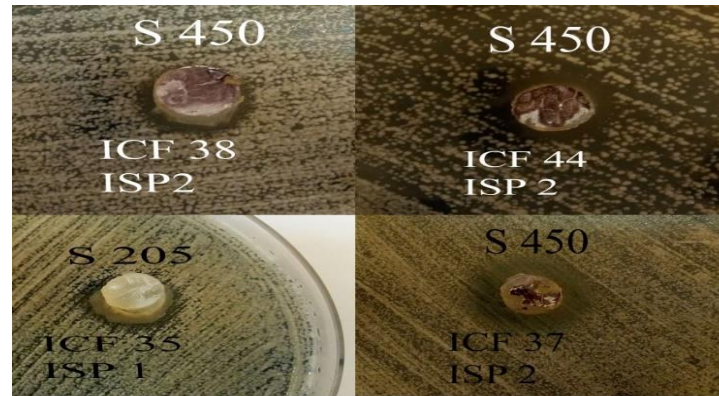


Planche 5: activité antifongique de J21 de quelques isolats de *Streptomyces*

On constate que les deux souches S406, S450 montrent des activités importantes contre les levures-test avec des zones d'inhibition intéressantes, il atteignent 35 mm au jour 3 pour la souche S450 (sue ISP2) contre ICF44 et 30 mm pour la souche S406 contre ICF35 au GYEA, au jour 7 il reste presque les même diamètres pour S450 mais la souche S406 présente une activité dans ISP1 et ISP2 et disparaître dans les autres milieux, pour le jour 10 et 21 la souche S450 garde sa activité dans les 4 milieux de façon acceptable mais la souche S406 perde sa activité sauf contre ICF43 dans ISP1 et ISP2.

Des autres souches comme S97,S135, S205, S275b, S275g, S359, S370 montrent des activités faible puis une absence totale de l'activité.

Par comparaison aux données bibliographiques des chercheurs, on a trouvé que les travaux de **Taechowisan et al.,2005** et **Bouizgarne et al., 2006** , démontrent que les actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces* sont capables de produire des antifongiques.

Notre résultat est mieux que celui de **Belyagoubi (2014)**qui a travaillé sur l'activité antifongique de 9 isolats d'Actinomycètes, l'activité anti-Candidosique révèle des zones d'inhibition allant de 7 à 21 mm pour 10 souches parmi les 38 testés soit 26,3%.

I-2-2 Résultats du test d'activité antifongique contre les champignons filamenteux :

✚ Méthode double couche :

A partir de la méthode précédente de cylindre d'agar on conclue que les meilleurs souches qui présentent de bonnes zones d'inhibition sont les S406 30mm contre ICF37 dans le GYEA et S450 35mm contre ICF44 dans l'ISP2

Les résultats sont représentés dans le tableau et les planche7 suivantes :

Tableau 3: activité antifongique de S406 et S450 dans les 4 milieux vis-à-vis de champignons filamenteux

Les souches de Streptomyces	diamètre de la zone d'inhibition en mm			
	ICF 53			
	ISP 1	ISP 2	GYEA	BENNET
S 450	38	50	35	37
S 406	-	-	-	-

Tableau 4 : Action antagoniste des souches de *Streptomyces* qui présente des activités vis-à-vis de champignons filamenteux

Les souches de Streptomyces	diamètre de la zone d'inhibition en mm											
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ICF 57	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>F.Solani</i>	ICF 58V	ICF 53	ICF 58B	ICF 62 B (arthro)	<i>paecilomyces variotii</i>	<i>Penicillium Chrysogenum</i> ICF 59
Souche 450	18	15	68	30	28	26	35	30	55	45	30	50
Souche 406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

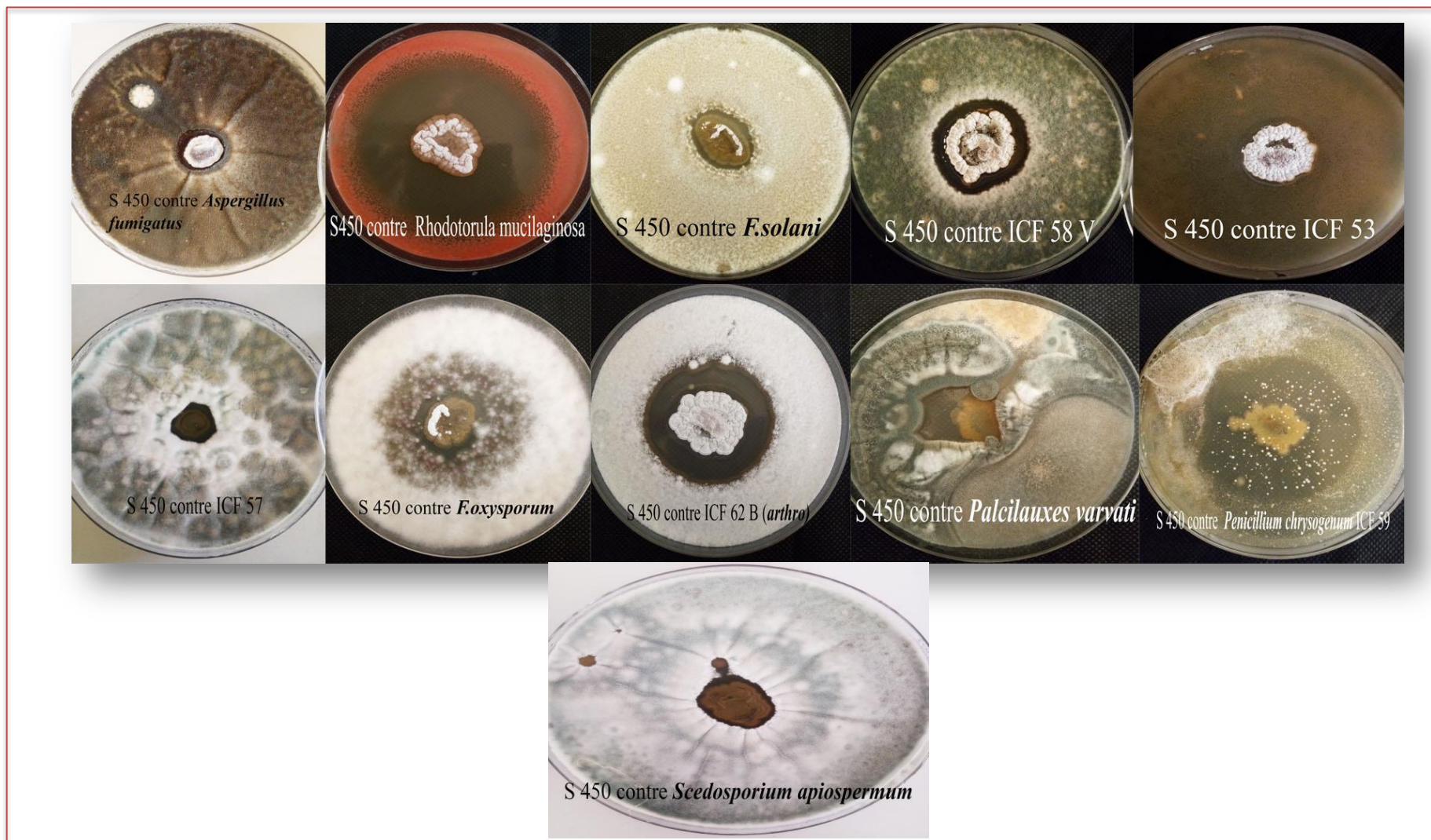


Planche 6 : activité antifongique des souches de *Streptomyces* vis-à-vis des champignons filamenteux

On a essayé cette méthode contre ICF53 dans les 4 milieux : ISP1, ISP2, GYEA, BENNET, le meilleur résultat est obtenu dans l'ISP2, pour cela on a choisi le milieu ISP2 pour contenir notre travail

La souche S450 est active contre 12 souches de champignons filamenteux des 20 souches-tests utilisées, pour que la souche *Rhodotorula mucilaginosa* atteigne le plus grand diamètre est 68mm, puis la souche *Penicillium chrysogenum* ICF59 de 50 mm de diamètre, jusqu'à la zone d'inhibition de 15 mm de diamètres pour la souche ICF57.

Par rapport aux travaux de **Cherai** ,2007 qui a trouvé un résultat de 30 mm pour la souche ACTsp5 contre le *Rhodotorula Mucilaginosa* qui était inférieur de notre zone d'inhibition.

Au contraire de la première souche de *Streptomyces* la S406 est ne présente aucune activité inhibitrice contre les 20 champignons-tests utilisés.

I-3 Extraction des molécules antifongiques :

Afin de mieux étudier ces biomolécules, les filtrats de culture solide issu du meilleur jour et milieu de production ont été extraits par cinq solvants d'extraction de polarité différente. Après évaporation des solvants les résidus secs ont été resuspendus dans du méthanol et dans du DMSO à 10 %. L'activité de chaque extrait est testée par antibiographie sur des souches de levure pour l'extrait de J3 et souches des champignons filamenteux pour l'extrait de J7.

Les résultats de test des extraits organiques de l'activité antifongique sont représentés dans les planches et les tableaux suivants :

Tableau 5: Diamètres des zones d'inhibition en mm de test d'activités des disques pour la souche S450 J3

Les souches fongiques	Diamètres des zones d'inhibition en mm pour la souche S450											
	R méthanol						R DMSO					
	Méthanol	Butanol	Acétate d'éthyle	Ethanol	dichloro méthane	Méthanol témoin	Méthanol	Butanol	Acétate d'éthyle	Ethanol	dichloro méthane	DMSO 10%
ICF 35	25	19	19	20	22	-	-	-	-	-	-	-
ICF 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ICF 44	22	16	15	18	22	-	-	32	-	13	22	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	23	21	25	17	22	-	15	20	-	15	-	-
<i>Candida parasilosis</i>	21	18	12	11	20	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 6: Diamètres des zones d'inhibition en mm de test d'activités des disques pour la souche S406 J3

Les souches fongiques	Diamètres des zones d'inhibition en mm pour la souche S406											
	R méthanol						R DMSO					
	Méthanol	Butanol	Acétate d'éthyle	Ethanol	dichloro méthane	Méthanol témoin	Méthanol	Butanol	Acétate d'éthyle	Ethanol	dichloro méthane	DMSO 10%
ICF 37	19	15	12	22	12	-	-	-	-	-	-	-

- : Résultat négative

Tableau 7 : Diamètres des zones d'inhibition en mm de test d'activités des disques pour la souche S406 J3

Les souches fongiques	Diamètres des zones d'inhibition en mm pour la souche S450											
	R méthanol						R DMSO					
	Méthanol	Butanol	Acétate d'éthyle	Ethano l	dichloro méthane	Méthanol témoin	Méthanol	Butanol	Acétate d'éthyle	Ethanol	dichloro méthane	DMS O 10%
<i>F.oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	30	-	-	25	-	-
<i>Penicillium chrysogenum ICF 59</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
<i>ICF 58V</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
<i>paecilomyces variotii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-

- : Résultat négative

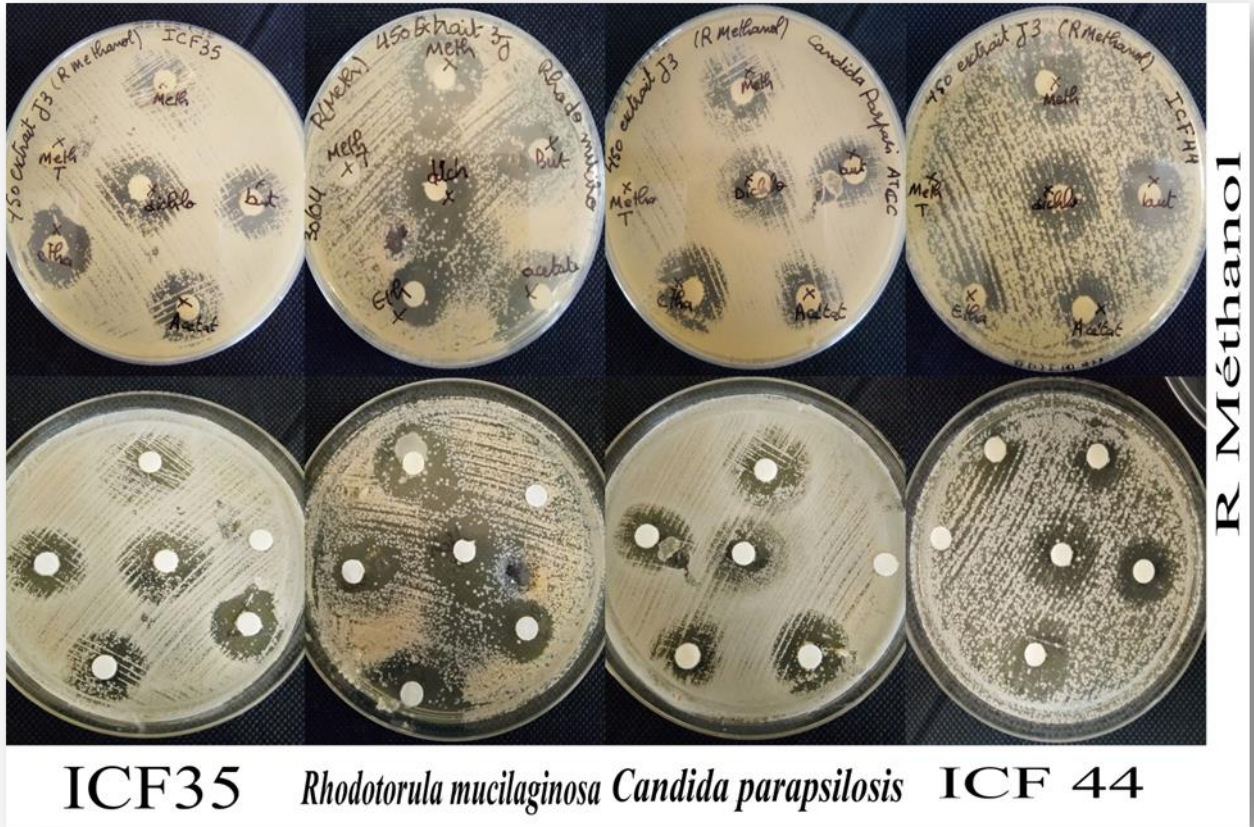


Planche 7 : résultat de test des disques des extraits organique J3 de la souche S 450 vis-à-vis des levures-test

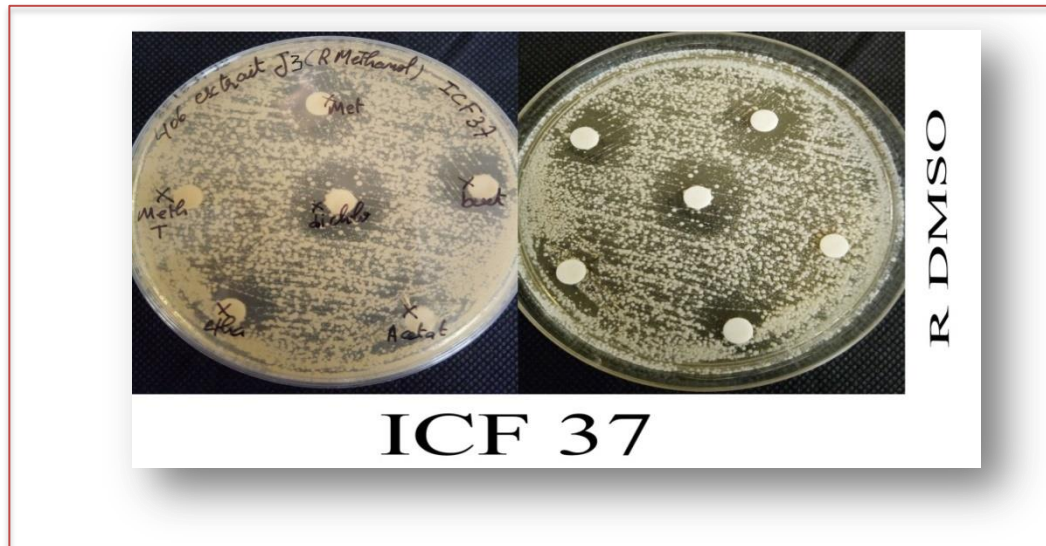


Planche 8 : résultat de test des disques des extraits organique J3 de la souche S 406 vis-vis des levures-test

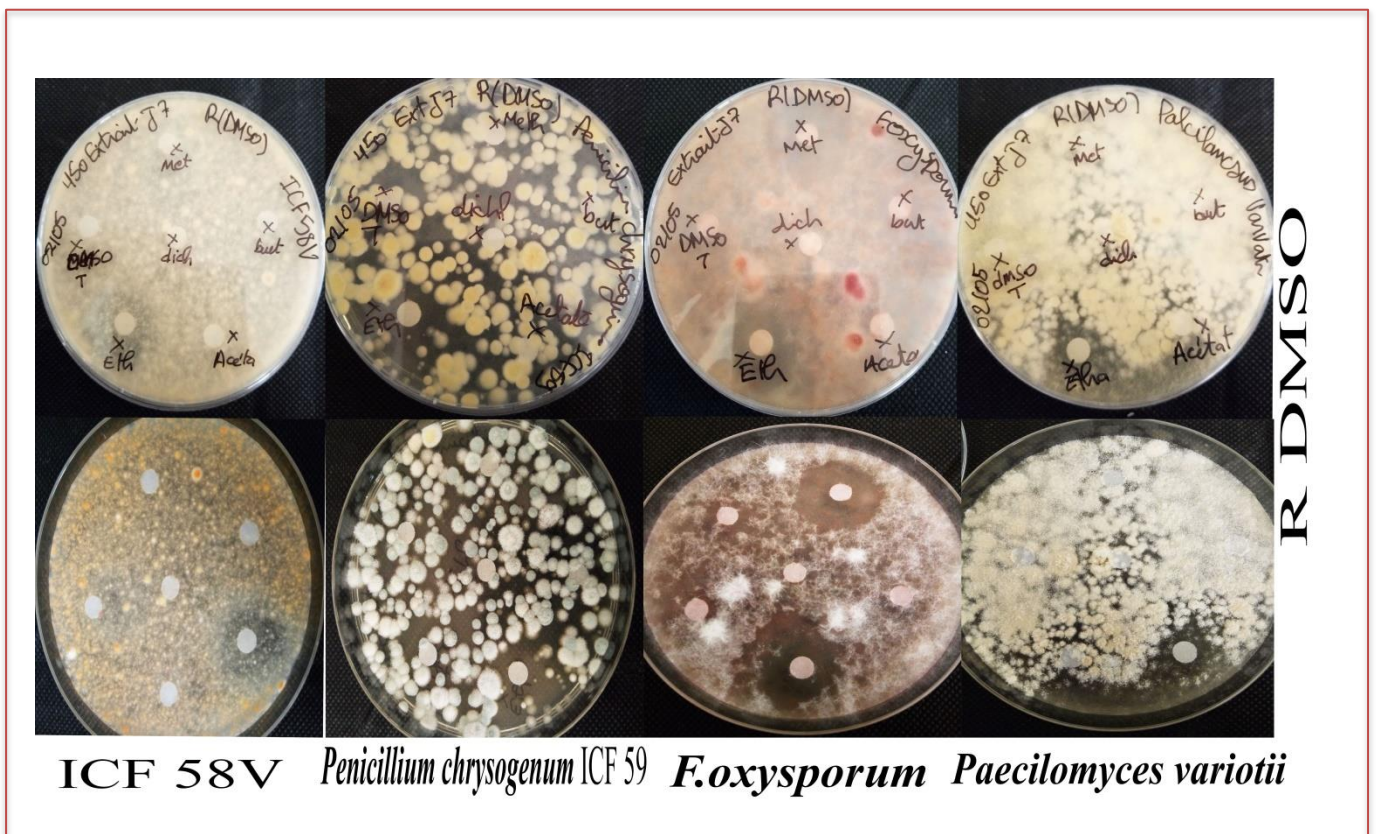


Planche9 : résultat de test des disques des extraits organique J7 de la souche S 450 vis-vis des champignons filamenteux

Les extraits de jour 3 qui ont été testés contre les levures vis à vis la S450 par la méthode des disques montrent que les extraits qui ont été ré-suspendu dans le méthanol ont une activité intéressante contre tous les levures-test sauf ICF37 avec des zones d'inhibitions allant de 19 à 25 mm.

Nous concluons que le meilleur solvant pour l'extraction J3 de S450 est le méthanol contre ICF35, ICF44, *Candida parasilosis*, et l'acétate d'éthyle contre *Rhodotorula mucilaginosa*, sauf ICF37 ne possède aucune activité dans les cinq solvants, par contre a été posséder des activités pour tous les solvants testés vis-à-vis la souche S406 et son meilleur solvant d'extraction de j3 est l'éthanol avec une zone d'inhibition de 22mm.

Selon **Franco et Countinho. (1991)** cité par **Augustine et al, (2005)**, la plupart des antifongiques connus à ce jour, sont surtout extraits par l'acétate d'éthyle. Du même point de vue. **Remya et Vijayakuinar. (2008)** cité par **Oskav, (2011)** rapportent que l'acétate d'éthyle est le meilleur extracteur des molécules antibactériennes et antifongiques de la souche

Streptomyces RM42. **Ahmed (2007)** cité par **Hozzein el al, (2011)**, rapporte aussi que l'activité antimicrobienne de *Streptomyces violachromogenes* est mieux extraite avec ce même solvant.

Sachant que les cinq solvants testés ont tous permis l'extraction des molécules à activité antifongiques de S450, ce qui suppose que les activités mesurées par antibiographie sont dues à un grand nombre de molécules ayant des structures différentes (polaires, de polarité moyenne ou apolaires).

On peut noter à partir de ces résultats que les biomolécules produites par la S450 et S406 dans le J3 sont soluble dans le méthanol beaucoup plus que DMSO 10%.

D'autre part les extraits de jour 7 qui ont été testé contre les champignons filamenteux vis-à-vis S450 donne des zones d'inhibition seulement dans les extraits ré-suspendu dans le DMSO 10%, la souche *F.oxysporum* donne des zones d'inhibitions uniquement dans le méthanol et éthanol de 30 à 25 mm, par contre *Penicillium chrysogenum*, ICF 59, ICF 58V, *Paecilomyces varvati* donnent des activités uniquement dans Ethanol de même diamètre 20mm.

Le dichlorométhane ; un solvant très peu soluble dans l'eau mais miscible avec la plupart des solvants organiques. Selon **Sacramento** et ses collaborateurs (2004) , le dichlorométhane extrait des composés non peptidiques et selon (**Mahmoudi , 2013**) l'éthanol est préférables pour l'extraction des molécules polyphénoliques, ce qui peut donner une indication sur la nature éventuelle de la biomolécule. Donc dans un premier temps on peut dire que les molécules bioactives produites par S406 et S450 sont de nature peptidique non poly phénoliques

. Vu que le butanol extrait les molécules polyneiques et le dichlorométhane extrait les molécules non-peptidiques la molécule produite par la S450 est une biomolécule de nature polygénique et non- peptidique.

A partir de ces résultats on peut dire en principe que la S450 produites de molécules bioactives déférentes la première de nature peptidique a effet de nature non-peptidique a effet antifongiques.

I-4 Révélations chimiques des extraits (Chromatographie) :

Une fois le meilleur solvant d'extraction est mis en évidence pour chaque souche étudiée, il est nécessaire de déterminer le meilleur système de séparation par migration en réalisant une chromatographie sur plaques de gel de silice (**Tighidet., 2011**).

La détection du meilleur système de migration se fait grâce à un révélateurs générale la vanilline les résultats des chromatogrammes élués par les différents systèmes de migration sont représentés dans les planches et le tableau suivants :

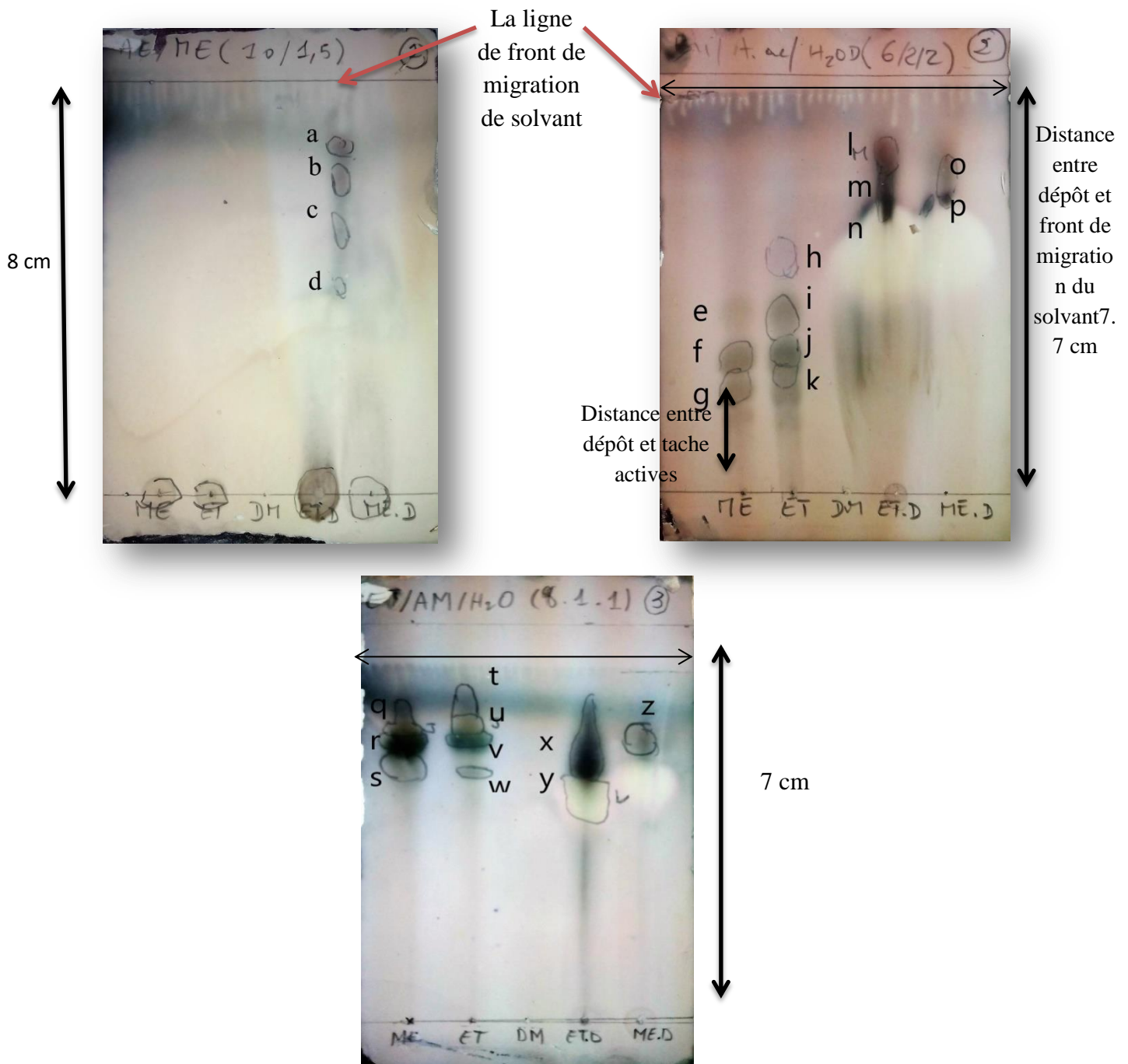


Planche 10 : résultat de chromatographie des extraits organiques sur couche mince de S450

Tableau 8 : les Rf des separation des molecules de l'extrait de S450 par chromatographie

Système de migration d'acétate d'éthyle-méthanol (10-1.5, v/v)	
Les taches	Rapport frontal
	Ethanol DMSO J7
a	0.87
b	0.78
c	0.67
d	0.51

Tableau 9 : les Rf des separation des molecules de l'extrait de S450 par chromatographie

Système de migration éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v)				
Les taches	Rapport frontal			
	Méthanol J3	Ethanol J3	Ethanol DMSO J7	Méthanol DMSO J7
e	0.37	-	-	-
f	0.29	-	-	-
g	-	0.63	-	-
h	-	0.49	-	-
i	-	0.38	-	-
j	-	0.31	-	-
k	-	-	0.88	-
l	-	-	0.79	-
m	-	-	0.74	-
n	-	-	-	0.84
o	-	-	-	0.74
p	-	-	-	0.74

Tableau 10 : les Rf des separation des molecules de l'extrait de S450 par chromatographie

Système de migration n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v)				
Les taches	Rapport frontal			
	Méthanol J3	Ethanol J3	Ethanol DMSO J7	Méthanol DMSO J7
q	0.91	-	-	-
r	0.81	-	-	-
s	0.77	-	-	-
t	-	0.95	-	-
u	-	0.87	-	-
v	-	0.81	-	-
w	-	0.72	-	-
x	-	-	0.92	-
y	-	-	0.70	-
z	-	-	-	0.85

Des révélations chimiques des plaques par la vanilline ont été réalisées pour classer et détecter la nature des extraits obtenus. Suite à la sélection du meilleur système de migration, d'autres plaques de gel de silice sont développées dans les mêmes conditions dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des antifongiques produits.

Des révélations positives ont été obtenues dans les trois systèmes utilisées, sachant que le troisième système n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v).

Les molécules bioactives de la souche S450 extraites à méthanol, éthanol pour les extraits de J3, et méthanol éthanol ré-suspendue dans le DMSO 10% pour les extraits de J7 présentent un caractère polaire puisqu'elles migrent dans les systèmes éthanol-ammoniac-eau (8/1/1,v/v/v) et n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2,v/v/v).

I-5 Révélations microbiologique (bioautographie) :

La bioautographie consiste à faire migrer les fractions par chromatographique sur couche mince et détecter les taches actives contre la souche cible et cela par révélation microbiologique (Melouah., 2015).

Les résultats obtenus sont montrée dans les planches 12 et 13 suivantes :

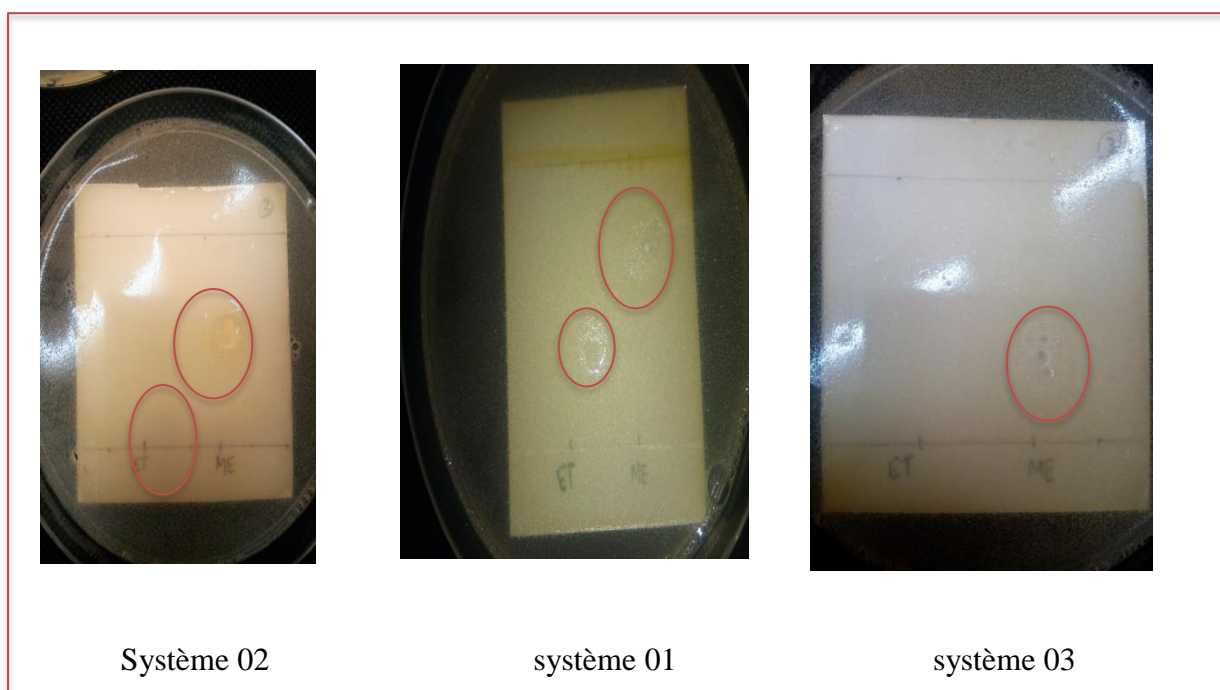


Planche 11 : la révélation microbiologique des plaque CCM des meilleures extraits j3 testé contre ICF 35

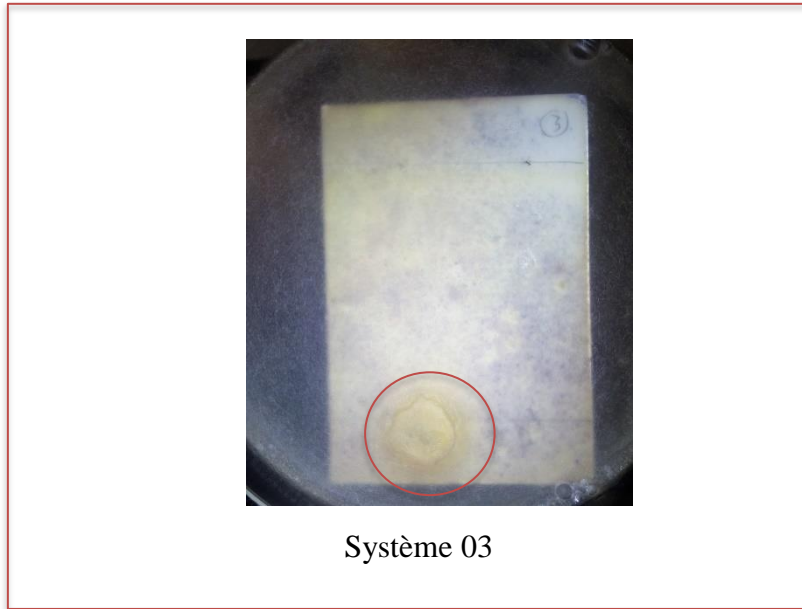


Planche 12: la révélation microbiologique des plaque CCM desmeilleures extraits j7
testé de la souche S450 vis- à- vis *F.oxysporum*

Nous avons trouvé que l'extrait méthanol j3, méthanol-DMSO j7 avait une activité de S450 contrées souches fongiques-test par la présence des taches.

Conclusion

Conclusion et perspective

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 (**Demain et Lancini, 2006**).

Dans ce présent travail, on s'est fixé l'objectif essentiel de notre travail était la mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes et l'extraction des molécules antifongiques, pour cela trois parties ont été développées :

Dans la première partie, nous sommes intéressés à la recherche des activités antifongiques potentiellement produites par les souches des *Streptomyces* contre divers souches-test dont les levures et les champignons filamenteux.

Dans la seconde partie, nous avons effectué l'extraction des molécules bioactives en question par différents solvants organiques et l'application de test d'activité des disques.

Enfin, la chromatographie par couche mince CCM et la bioautographie pour la séparation des biomolécules actives.

Les résultats obtenus montrent que la plupart des souches de *Streptomyces* étudiées présentent une activité antifongique contre au moins une souche-test. Les plus grandes zones d'inhibitions ont été observées avec les souches S450 (35mm) contre la souche test ICF44, et S406 (30mm) contre ICF35.

Ces résultats permettent de confirmer que les deux souches de *Streptomyces* (S450 et S406) sont les meilleurs producteurs des molécules bioactives.

Le test d'activité des extraits organiques indique que le méthanol, acétate d'éthyle, et le dichlorométhane sont les meilleurs extracteurs des molécules à activités antifongiques.

Le meilleur système de séparation est le e 3 n-butanol-acide acétique-eau, les molécules bioactives de la souche S450 extraites avec le méthanol, éthanol pour les extraits de J3, et méthanol éthanol ré-suspendue dans le DMSO 10% pour les extraits de

J7 présentent un caractère polaire puisqu'elles migrent dans ce le système éthanol-ammoniac-eau, et pour la bioautographie nous avons trouvé que l'extrait méthanol j3, méthanol-DMSO j7 avait une activité de S450 contre les souches fongiques-test par la présence des taches.

En perspectives, il serait nécessaire de continuer notre étude par la purification complète des molécules produites (en utilisant d'autres techniques chromatographiques comme l'HPLC, l'utilisation de plusieurs techniques spécifiques comme la spectroscopie d'absorption en lumière UV-VIS, la spectroscopie d'absorption en lumière IR, la spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire pour déterminer leurs structures.

*Les references
bibliographies*

A

Alexander, 1961. *Introduction to soil microbiology.* John Wiley, New York
Ottow J.C.G.; Glath H., 1968. Rose bengal-malt extract –agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.*, (16): 170-171.

Aouiche Adel . 2010 Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l’homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives, UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI-BEL-ABBES p 42

Augustine S.K., Bhavsar S.P. and Kapadnis B.P.,(2005). A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.* 30(2), 201–211.

B

Baldacci E., 1962. Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann Soc Belge Méd Trop*, (4) : 633–646.

Bastide,A.,M.de Méo.,M ,Andriantsoa,M,Laget et G.Duménial.(1986).isolement et sélection de souche d’actinomycètes productrice de substance antifongiques de structure non-polyénique. Laboratoire de microbiologie .faculté de pharmacie .MIRCEN journal, 1986, 2, p 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.

Belkherroubi.L. (2009). Biologie cellulaire et Moléculaire : Effet de l’état physique des antifongiques polyeniques sur leur activité cellulaire : exemple de l’amphotericine B. Thèse de doctotrat. Université aboubekr belkaid tlemcen.pp132.

Belyagoubi Larbi. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries(actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Université Aboubakr Belkaïd.Tlemcen .P :114-127.

Bill I., 2007. La biologie de A à Z. Ed. Dunod, Paris, 344P.

Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, Che D. Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI **2001-2010** : incidence, létalité et tendances Bulletin épidémiologique hebdomadaire. 2013. n° 12-13 pp 109-114.1

Bitar D, Van Cauteren D, Lauternier F, et al., (2009). Increasing incidence of zygomycosis mucormycosis). France. 1997-2006. Emerging infect. Dis.:15(9):1395-1401.

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

Boucheffa Karima.2011.Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques :Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits . Université Abderrahmane .Bejaia.P :35-45.

Boucherit-Atmani Z, Seddiki SML, Boucherit K, Sari-Belkharoubi L, Kunke D. Candida albicans biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. J Mycol Med **2011**;21:182—7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.07.006>.

C

Carle S. (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *harmactuel*, 36 (1), 25-41.

Challis. G.L and Hopwood. D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. The National Academy of Sciences of the USA, PNAS, 100 (2), 14555– 14561.

Chater K. F., (2006). Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that proM. **Chekiri Talbi et D.W. Denning (2017).** Estimation des infections fongiques en Algérie; revue général;; p. 1-7vide us with antibiotics. Phil. Trans. R. Soc. B, 361, 761–768.

Cheraiti Nardjess., 2007. isolement des souches d'actinomycetes productrices de nouvelles molecules antifongique (cas des eaux du lac Oubeira), p :116

Coates A.; Hu Y., 2007. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, 152, 1147–1154.

Conn. V.M. (2005). Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297.

D

Demain, A.L ; and Lancini. G.(2006). Bacterial Pharmaceutical Products. In: *Prokaryotes*. 1: 812–833.

Dignani MC. Anaissie E., (2004). Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 Suppl 1:67-

Djaballah C., 2010. Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 73 p.

Djinni I., 2008. Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaïa. P 16.

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

Drouhet E. (1978). Antifungal agents. *Antibiot. Chemother.*, 25: 253-288.

E

El-Shatoury S.; Mitchell J.; Bahgat M.; Dewedar A., 2004. Biodiversity of Actinomycetes in a Constructed Wetland for Industrial Effluent Treatment. *Actinomycetologica*, 18 (1), 1-7.*

Elwan S.H., Dab A. and Al-Gounaim Y. (1985). Ecology of the Streptomycetes flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6, 99-104.

Ensign J.C., Normand p., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* 144, 657-660

Euzeby, J.P.2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 307–334.

F

Feng C, Ling H, Du D, Zhang, Niu G, Tan H. Novel nikkomycin analogues generated by mutasynthesis in *Streptomyces onsochrc,mo* genes. *Microb Cell Fact.* 2014; 13(59): 1-10. doi: 10.1186/1475-2859-13-59.

G

Ginolhac A., 2006. Metagenomique et bioinformatique : Etude des polyketides synthases bactériennes. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard - Lyon I. pp 146.

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

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 : 1-6.

Gottlieb D, 1973., General consideration and implication of the Actinomycetales. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance.* Edited by G. Sykes and F. A. Skinner. Academic Press, London, New York.

Guiraud J. P., 2003. Microbiologie alimentaire. Paris : Dunod. Pp : 696.

H

Hawker L. E.; Linton A. H., 1971. Micro-organismes. Pp: 325-333.

Hirsch C. F.; Christensen L., 1983. Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol,* 46 (4), 925-929.

Hodgson D. A., 1992. Differentiation in actinomycetes. In: *Prokaryotic Structure and Function,* Cambridge University Press, Cambridge.

Holzapfel 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 : 19.

Horinouchi S., 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *streptomyces griseus*. Frontiers in Bioscience 7, 2045-2057.

Hozzein W.N., Rabie R., Ali M.I.A.,(2011). Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(12), 2295-2301.

I

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.

K

Khachatourians. G.G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. Can. Med. Assoc. (CMAJ) 159 (9), 1129-1136.

Kim ME, Park HS, Kim CH, Park H.M, Choi W (2002). Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. Yeast; 19(4): 341-349.

Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M., (2004). Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 : 211-214.

Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri - Constantine. Algérie : 170.

Koenig H., (1995) guide de mycologie médicale, édition ellipses P:44, 71, 98-99, 156,170-172, 251-268.

Kulkarni S.W. 2003. Role of actinomycètes in environnement. In : Kumar A., Bohra C.P., Sing L.K. Environnement, pollution and mangement. Publiching Corporation. 531-541.

L

Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and foddors. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., 2, 231-51.

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

Le Minor L.; Véron M., 1990. Bactériologie médicale. Médecine-Sciences Flammarion. France.

Lefebvre T., 2008. Associations biologiques entre les termites du genre Nasutitermes et leur microflore actinomycétale: spécificité et évolution. Thèse doc : Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé : Paris. Pp: 168.

Li, R. K, RINAIDI M. G (1999). In Vitro Antifungal activity of Nikkomycin Z in combination with Fluconazole or Itraconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. ; 43(6) : 1401—140S.

Locci R.; Sharples G. P., 1984. Morphology. In: “The biology of actinomycetes”. (Goodfellow M., Modarski M. and Williams S. T., Eds.) pp 165-199. *Ac. Press. London.*

Loucif K., 2011-Recherche de substances antibactériennes à partir d’une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Mémoire en vue de l’obtention du diplôme de magister en microbiologie. Université Mentouri-Constantine : 21p.

M

Mahmoudi Fariba , Behzad Baradaran, Alireza Dehnad, Dariush Shanehbandi, Leila Mohamed Khosroshahi &Mahyar Aghapour. 2013.The immunomodulatory activity of secondary metabolites isolated from Streptomyces calvuson human peripheral blood mononuclear cells. Volume 73. N° 2.P: 97-103 .

Marty FM, Cosimi LA., Baden LR., 2004. Breakthrough zygomycosis after voriconazole treatment in recipients of hematopoietic stem-cell transplants. *N Engl. J. Med.*;350(9):950-952.

Matan. N and Matan. N. (2008). Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Inter Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 75–78.

Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. (2000). Streptomycetes: A new model to study cell death. *J. Cell. Biol.* 3: 153–158.

Mouly S., Sellier P. 2004. Monitoring thérapeutique des anti-infectieux : des exigences réglementaires au bon usage du médicament Springer-Verlag .Paris.P 98-92. ISBN-2-287-40684-0.

N

Nedal A., 2007. Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. Thèse de Doctorat. Norwegian University of Science and Technology, (Norvège). pp 81.

Nouredine. L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algerie). pp 186.

Nucci M, Anaissie E. Fusarnim., (2007). Infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.*;20(4):695-704.

O

O'fel A. Parasitologie, Mycologie (1981): Maladies parasitaires et fongiques. Association des Professeurs de parasitologie. 3 e édition. Paris: E. Crouan et Roques.: 349 P

Okami Y, Hotta K., 1988: Search and discovery of new antibiotics, In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (Ed). *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, Inc., San Diego, 33-67.

Omura S. (1992). Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. ind. Microbiol.*, 10, 135-156

Ou X.; Zhang B.; Zhang L.; Dong K.; Liu C.; Zhao G.; Ding X., 2008. SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta. Biochim. Biophys Sin*, 40 (10), 877-882.

Oskay .M.,(2009). Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *Afr. J. Biotechnol* 8 (13) 3007-3017.

Ostrosky-zeichner Luis,arturo casadevall,john N.Galgiani, Frank C.Odds and john H.Rex. (2010). An insight into the antifungal pipeline : selected new molecules and beyond.nature Reviews Drog Discovery.

P

Park J.O.; El-Tarabily K.A.; Ghisalberti E.L.; Sivasithamparam K., 2002. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 361–365.

Pagano L, Offidani M, Fianchi L, et al., (2004). Mucomycosis in hematologic patients. *Haematologica.*;89(2):207-214.

Petrosyan, P., Garcia-Varela, M., Luz-Madriral, A., Huitron, C., Flores, M. E. (2003). *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 1): 269–273.

Pourriat J.L., Martin C (2005). Principe de réanimation chirurgicale. 2ème édition Arnette, France.. ISBN 2- 7184-1074-4

Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S (2008). Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4: 330-337.

Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. 2003. Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme edition Pp 589.

Prescott L. M.; Harley J. P.; Klein D. A., 2007. Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles: 805–825.

R

Rastogi. B. V, Kishore. B. 1997. A Complete Course in ISC Biology. Pitambar Publishing: New Delhi. Pp: 592.

Rangaswami G.; Bagyaraj D. J.; Bagyaraj D. G., 2004. Agricultural Microbiology. PHI: New Delhi. Pp: 440.

Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD et coll (2000). Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Clin Infect Dis;30:662-78.

Ripert C. Mycologie médicale. 2013. Tec et Toc Lavoisier édition. ISBN-13: 978-2743014889.

S

Sandovsky-Losica H, Shwartzman R, Lahat Y, Segal E (2008). Antifungal activity against *Candida albicans* of nikkomycin Z in combination with caspofungin, voriconazole or amphotericin B. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; letters. 635-537. doi:10.1093/jac/dkn216.

Sanglier J.J. ; Trujillo M., 1997. Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. Bull. Soc. Fr. Microbiol. **12**, 13.

Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 16:313-340.

Shukla G. Soil Enzymology., 2010. Springer: Berlin. Pp: 384.

Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Génie de procédés et environnement.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic Classification system, Actinobacteria classis Nov. Int J Syst Evol Microbiol, 47(2): 479–491

Strub C., 2008. Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France. **1 Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. and Suzuki Y. (1994).** Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 8, 122–127-74p.

Sykes G.; Skinner F. A., 1973. Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Academic press. London. New York.

T

Tarkka M.; Hampp R., 2008. Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions *in* Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology, P. Karlovsky (ed.), 14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Theilleux J. In levreau J.Y. and bouix M. (1993) Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier, Paris. Ch : 6 425-481. Technique et documentation. Lavoisier. Paris.

Tomita, K., M. Nishito, K. Sitoh, H. Yamamoto, Y. Hashino, H. Okhuma, M. Konishi, T. Miyaki et T. Oki. 1990. Pramucidins A, B and C: new antifungal antibiotics. I. Taxonomy, production and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* 43: 755-762.

V

Ventura M.; Canchaya C.; Tauch A.; Chandra G.; Fitzgerald G. F.; Chater K. F.; van Sinderen D., 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (3), 495–548.

Vidaver A.K., Mathys M.L., Thomas M.E and Schuster M.L, (1972). Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol 18 : 705-713.

Vigouroux S, Morin O, Moreau P, et al., (2005). Zygomycosis after prolonged use of voriconazole in immunocompromised patients with hematologic disease: attention required. *Clin. Infect. Dis.* ; 40(4):e35-37.

Vonothini G.; Murugan M.; Sivakumar K.; Sudha S., 2008. Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *African Journal of Biotechnology*, 7 (18), 3225-3230.

W

Waksman S. A., 1963. *Ma vie avec les microbes*. Albin. Michel (ed.), 280 p.

Winn W. C.; Koneman E. W., 2006. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins: Washington. Pp: 1565.

Z

Zaitlin. B; and Watson. S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. 40 (9), 1741-1753.

Zhang J.W.; Zeng R.Y., 2007. Purification and characterization of a cold-adapted α -amylase produced by *Nocardia* sp. 7326 isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Marine Biotechnol*, 10, 75–82.

Les annexes

Annexe I : Milieux de culture**- ISP1 (International *Streptomyces* Project 1)**

-Tryptone.....	5g
-Extrait de levure.....	3g
-Agar.....	20g
-H2O distillée.....	1000ml

pH : 7.0 a 7.2**- ISP2 (International *Streptomyces* Project 2)**

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

pH : 7,2**- ISP2 molle**

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

pH : 7,2

- **Milieu GYEA**

Extrait de levure.....	10g
Glucose.....	10g
Agar.....	18g

pH : 6,8

- **Milieu BENNET**

Peptone.....	2g.
Glucose.....	10g.
Extrait de viande.....	1g.
Extrait de levure.....	1g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml.

pH = 7,2.

- **Gélose Sabauroud**

Peptone.....	10g
Glucose massé.....	20g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

vitamines et facteurs de croissance

pH : 6,0

- **Gélose Sabauroud**

Peptone.....	10g
Glucose massé.....	20g
Agar-agar.....	8g
Eau distillée.....	1000ml

vitamines et facteurs de croissance

pH : 6,0

NB :

- la stérilisation s'effectuer par l'autoclave pendant 30 minutes a 120C°.

Annexe II : Solutions et Réactifs

- **Eau physiologique**

NaCl.....	9g
H ₂ O distillée.....	1000
ml	