



République Algérienne Démocratique 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
Département de Biologie Appliquée



Présentation en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Thème :

**Extraction des molécules a activité Antimicrobienne
produites par les Streptomyces**

Présenté par :

- M^{elle} Boutagouga Aida
- M^{elle} Djeradi khadija
- M^{elle} Malim Amina

Devant le jury :

Mr Mechai A	M.C.A	Université de TEBESSA	Président
Mr Menasria T	M.C.A	Université de TEBESSA	Examineur
Mme Benhadj M	M.C.A	Université de TEBESSA	Promotrice

Date de soutenance : 15 /06 /2022

Année universitaire : 2021/2022

Table de matière

ملخص

Abstract

Résumé

Dédicace

Remerciement

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des planches

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les Actinomycètes est les *Streptomyces*

I. Les actinomycètes	1
1. Définition et caractéristiques générales	1
2. Classification et Taxonomie	2
3. Ecologie	2
4. Critères d'identification	4
4.1 Caractère morphologique	4

4.2. Critères physiologique	4
4.2.1. Taux d'humidité	4
4.2.2. Température	4
4.2.3. pH	5
4.2.4. L'oxygène	5
4.2.5. Matière organique	5
4.3. Critères chimio-Taxonomie	5
4.3.1 Les Sucres	5
4.3.2 Acides aminés	6
4.3.3 Lipides	6
4.4. Critères moléculaire	7
4.4.1 Séquençage de l'ADN ribosomique	7
4.4.2 Hybridation ADN-ADN	7
5. Caractéristique du mycélium aérien et mycélium de substrat	8
6. La Formation des spores	8
6.1 Les Endospores	8
6.2 Les Exospores	8
7. Importance des Actinomycètes	9

II. Le genre *streptomyces*

1.Définition	9
2.Cycle de vie	9
3.Génétique	10
4. Caractéristique du genre <i>streptomyces</i>	10
5. Détermination des espèces du genre <i>Streptomyces</i>	11
6. Importance des <i>Streptomyces</i>	11
6.1. Importance dans les domaines pharmaceutique, médical	11
6.2 Les <i>Streptomyces</i> Agent de biocontrôle	12

Chapitre II Les agents antimicrobiens

I. Les agents antimicrobiens	13
1. Les antibiotiques	13
1.1 Classification et mécanismes d'action	13
1.1.1 Les inhibiteurs de la synthèse de la paroi et la membrane cellulaire	13
1.1.1.1 Les glycopeptides	14
1.1.1.2 Les polypeptides	15
1.1.1.3 Les lipopeptides	15
1.1.2. Les inhibiteurs de la synthèse des protéines	15
1.1.3. Les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (ADN/ARN)	17

1.1.3.1 La rifampicine	17
1.1.3.2 Les quinolones	18
1.1.3.3 Nitroimidazoles	18
1.2. Production d'antibiotiques par <i>Streptomyces</i>	18
1.3.Résistance aux antibiotiques	19
2. Les antifongiques	20
2.1. Classification et mécanismes d'action	20
2.1.1. Les antifongiques agissants sur la membrane fongique	21
2.1.1.1. Les polyènes	21
2.1.1.2. Les azolés	22
2.1.2. Les antifongiques agissants sur la synthèse de la paroi	24
2.1.2.1.Les échinocandines	24
2.1.3. Les antifongiques agissants sur les acides nucléiques	24
2.2. Les antifongiques produits par les streptomycetes	25
2.3. Résistance aux antifongiques	25

Partie Expérimentale

I. Matériels et méthodes

1. Objectif de travail	27
2. Cadre d'étude	27
3. Matériels utilisés	27
3.1 Matériels non-biologique	27
3.1.1 Grands matériels	27
3.1.2 Petits matériels	28
3.2. Matériels biologiques	28
3.2.1 Les champignons filamenteux	29
3.2.2 Les levures	30
3.3 Les milieux de cultures	30
3.4 Les solutions	30
3.5 Les solvants	30
4. Méthode de Travail	31
4.1. Origine des souches	31
4.2. Repiquage et purification des isolats d'actinomycètes	31
4.3. Etude des caractères morphologiques	31
4.3.1. Etude des caractères macromorphologiques	31

4.3.2. Etude des caractères micromorphologiques	31
4.3.2.1. Préparation d`état frais	32
4.3.2.2 Coloration de Gram	32
4.4. Etude des caractères physiologiques	33
4.4.2. Croissance à différents pH	33
4.4.3 Tolérance au Chlorure de sodium	33
4.5. Extraction des molécules bioactives	33
4.5.1 Préparation des inocula des fungi tests	34
4.5.1.1 Préparation de l`inoculum des levures	34
4.5.1.2 préparation des suspensions des champignons filamenteux	34
4.6 Recherche de l`activité des extraits	34
4.6.1 Méthode des disques	34
4.7. L`activité antifongique contre les champignons filamenteux et les levures	34
4.7.1. Technique de la double couche	34
4.8 Test d`Antibiographie	35
4.8.1 Chromatographie sur gel de silice (sur couche mince)	35
4.8.2 Révélation chimiques des substances actives	35
4.8.3 Bioautographie des molécules Bioactives	36

II. Résultats et discussion

1. Repiquage et vérification de la pureté des isolats	37
2.Étude des caractères morphologiques	40
2.1. Étude microscopique	40
2.1.1Coloration de Gram	40
2.1.2 État frais	43
2.2 Etude macromorphologique	48
3.Tests physiologiques	52
3.1 Tolérance à différentes températures	52
3.2 Tolérance à différentes concentrations de NaCl	54
3.3 Tolérance à différents degrés de pH	56
4.Tests d'activité antifongiques	58
4.1 Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des disques de diffusion	58
4.2 Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode de double couche	65
5. Caractérisation partielle des molécules actifs	67
5.1 Chromatographie sur couche mince	67
5.2 Révélation biochimique	71
5.3 Bioautographies	72

Conclusion et perspectives

Références Bibliographique

Annexe

ملخص

الأكتينومييسيتات هي بكتيريا مسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات النشطة بيولوجيًا. في هذا العمل ، كنا مهتمين بالبحث عن الجزيئات النشطة بيولوجيًا ذات النشاط المضاد للفطريات من عزلات *Streptomyces* بالإضافة إلى التوصيف الأولي لهذه الجزيئات الحيوية.

تم إجراء التوصيف المظهرى للعزلات العشر من الفطريات الشعاعية من خلال دراسة الخصائص الزراعية والفسولوجية. تم استخلاص الجزيئات النشطة بيولوجيا باستخدام عدة مذيبات ذات استقطابات مختلفة. أجريت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات بطريقة الانتشار في وسط أجار ضد العديد من الخمائر والفطريات. تم إجراء توصيف أولي للجزيئات الحيوية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والتصوير الحيوي.

أتاحت نتائج اختبارات النمط الظاهري ربط العزلات بالجنس *Streptomyces*. أتاحت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات ضد الفطريات والخمائر إمكانية اختيار عدد قليل من العزلات ذات الفعالية الكبيرة.

تتمتع مستخلصات الأسيتون واليوتانول من سلالات ACT158 و ACT170 بأفضل نشاط ضد جنس المبيضات (مناطق التثبيط بين 30 و 37 مم) ، بينما تظهر العديد من السلالات نشاطاً معادياً ضد الفطريات الخيطية ، ولا سيما مستخلصات اليوتانول ، والهيكسان ، والإيثانول والأسيتون للسلالات ACT170 و ACT97 و ACT316 و ACT299 ضد جنس *Fusarium* بقطر 24 حتى 46 ملم. والمستخلصات الميثانولية والبيوتانولية والإيثانولية من سلالاتي ACT97 و ACT359 التي تظهر نشاطاً قوياً ضد جنس الرشاشيات.

لوحظت أكبر مناطق التثبيط مع مستخلصات السلالات ACT170 و ACT97 و ACT299 و ACT359 و ACT316 والتي تتراوح من 30 ملم إلى 46 ملم.

أفضل مذيبات الاستخلاص هي اليوتانول والهكسان والميثانول والإيثانول والأسيتون. فهي تمكننا من الحصول على مناطق منع تتراوح من 30 مم إلى 46 مم في القطر.

يجعل التصوير الحيوي لمستخلص الهيكسان من سلالة ACT359 مكننا من اكتشاف جزء نشط له تأثير قوي ضد جنس الرشاشيات.

يمكننا أن نستنتج أن سلالات الشعيات المدروسة هي منتجة ممتازة للجزيئات المضادة للفطريات.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الشعاعية ، النشاط المضاد للميكروبات ، ستربتومييسات ، مضادات الفطريات.

Abstract

Actinomycetes are bacteria responsible for the production of most bioactive molecules. In this work, we were interested in the research of bioactive molecules with antifungal activity from *Streptomyces* isolates and a preliminary characterization of these biomolecules.

The phenotypic characterization of the 10 isolates of actinomycetes was carried out by studying the cultural and physiological characteristics. The extraction of bioactive molecules was performed using several solvents of different polarities. Study of the antimicrobial activity of the extracts was carried out by the method of diffusion in agar media against several yeasts and fungi. A preliminary characterization of the biomolecules was performed by thin layer chromatography and bioautography.

The results of the phenotypic tests allowed to assign the isolates to the genus *Streptomyces*. The study of the antimicrobial activity of the extracts against fungi and yeasts allowed the selection of some isolates having a significant activity.

The largest zones of inhibition were observed with the extracts of the strains ACT170, ACT97, ACT 299, ACT359 and ACT316 which ranged from 30mm to 46mm.

The acetone and butanolic extracts of strains ACT158 and ACT170 have the best activity against the *Candida* genus (zones of inhibition between 30 and 37mm), while several strains show antagonistic activity against filamentous fungi, in particular butanolic, hexanoic extracts, ethanolic and acetonic strains ACT170, ACT97, ACT316 and ACT299 against the genus *Fusarium* (24 up to 46mm in diameter). And The methanolic, butanolic and ethanolic extracts of the ACT97 and ACT359 strains which exhibit strong activity against the *Aspergillus* genus.

The best extraction solvents are butanol, hexane, methanol, ethanol, and acetone. They allow for zones of inhibition ranging from 30mm to 46mm in diameter.

The bioautography of the hexanoic extract of the ACT359 strain allows the detection of an active fraction which has a powerful action against the genus *Aspergillus*.

We can conclude that the studied actinomycetes strains are excellent producers of antifungal molecules.

Key words: Actinomycetes, antimicrobial activity, *Streptomyces*, antifungals.

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche des molécules bioactive à activité antifongiques à partir des isolats de *Streptomyces* ainsi une caractérisation préliminaire de ces biomolécules.

La caractérisation phénotypique des 10 isolats d actinomycètes a été réalisée par l'étude des caractéristiques culturelles et physiologiques. L'extraction des molécules bioactives a été réalisée en utilisant plusieurs solvants de polarités différentes. Étude de l'activité antimicrobienne des extraits a été réalisé par la méthode de diffusion en milieux gélosé vis-à-vis de plusieurs levures et champignons. Une caractérisation préliminaire des biomolécules a été effectuée par des chromatographie sur couche mince et bioautographie.

Les résultats des tests phénotypiques ont permis de rattacher les isolats au genre *Streptomyces*. L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des champignons et des levures ont permis de sélectionner quelques isolats ayants une activité non négligeable.

Les extraits acétoniques et butanoliques des souches ACT158 et ACT170 ont la meilleure activité contre le genre *Candida* (zones d'inhibition comprises entre 30 et 37mm), alors que plusieurs souches montrent une activité antagoniste contre les champignons filamenteux, en particulier les extraits butanoliques, hexanoiques, éthanoliques et acétoniques des souches ACT170, ACT97, ACT316 et ACT299 contre le genre *Fusarium* (24 jusqu'à 46mm de diamètre). Et Les extraits méthanoliques, butanoliques et éthanoliques des souches ACT97 et ACT359 qui présentent une activité forte contre le genre *Aspergillus*.

Les plus grandes zones d'inhibition sont observées avec les extraits des souches ACT170, ACT97, ACT 299, ACT359 et ACT316 qui vont de 30mm à 46 mm.

Les meilleurs solvants d'extraction sont le butanol, hexane, méthanol, éthanol, et l'acétone. Ils permettent d'avoir des zones d'inhibition allant de 30mm jusqu'à 46mm de diamètre. La bioautographie de l'extrait hexanoique de la souche ACT359 permet de déceler une fraction active qui possède une action puissante contre le genre *Aspergillus*.

Nous pouvons conclure que les souches d'actinomycètes étudiées sont des excellents producteurs de molécules antifongiques.

Mots clés : Actinomycètes, activité antimicrobienne, *Streptomyces*, antifongiques.

Dédicace

Dieu soit loué, qui nous a permis d'apprécier cette étape de notre parcours académique avec ce mémoire, fruit d'efforts et de réussite, par sa grâce.

- ❖ *Je dédie ce travail à celui qui m'a appris que le monde est un combat et que son arme est la science et la connaissance, à celui qui ne m'a rien épargné, à celui qui a recherché mon confort et ma réussite auprès de l'homme le plus grand et le plus cher dans l'univers : mon cher père.*
- ❖ *À la source de la tendresse qui grossissent et des chagrins de ma mère précieuse.*
- ❖ *À tous mes frères et sœurs.*
- ❖ *À chaque petite et grande famille.*
- ❖ *À tous les enseignants qui nous ont encouragés au cours des cinq années.*
- ❖ *À tous les techniciens du laboratoire de microbiologie.*
- ❖ *Aux compagnons de route et camarades de classe qui ont partagé mes moments de fatigue que dieu les protège.*
- ❖ *Pour chaque étudiant de la croissance, sa préoccupation était le papier et le stylo, et son arme était la connaissance.*
- ❖ *À tous le monde a un impact sur ma vie*

Aïda Boutagoug



Dédicace

Je dédie Cet travail :

- ❖ *À mes cher parents que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, leur encouragements, leur incessants et leur soutien moral au moments difficiles qui furent pour moi. Mon fiere père pour sa patience ses conseils depuis ma naissance jusqu'à au ce jour.*
- ❖ *À ma mere adree pour tout ces efforts et sa tendresse et sa bienfaits.*
- ❖ *À mon marie : imad, mon bonheur et ma raison de vivre.*
- ❖ *À ma chere secur ou plutôt ma deuxième maman fatiha qui me donne le courage toute, le courage pour avancer et etre ruessir.*
- ❖ *Ma autre secur ; El-atra et son mariée Ala, je les souhaite un avenir plein de joie et de bonheur avec leur enfant : abd-elmonim*
- ❖ *À mes cher frères ma vie : surtout mon grand frère : Ridha mon bon exemple de ma vie . Je souhaite à dieu le soutenir avec son epouse et ces enfants ; Arwa, Tasnime, Chaïma*
- ❖ *À mes chere frère : Ahmed sallah que je l'aime beaucoup et son épouse et ces enfants : amoula, Miriam, oumayna.*
- ❖ *Aussi mon adree frere : ismail et son épouse et ces enfants : Sanad, Saja, Sajid*
- ❖ *mes autre frère : walid et mon doctore Hamza ,les meilleurs geges de reussites, que Dieu les protege et leur donne la bonne sante . et qui'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.*
- ❖ *À tout ma famille, et touts mes adorable amie : Yamina ,Basma, imen, Aïda,*
- ❖ *Amina, samia, seïla*
- ❖ *À tout ce que j'aime.*

Djeradi khadija

Dédicace

À ma famille qui m'a soutenu tout au long de mon parcours académique, Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessés de consentir pour mon instruction et mon bien-être. J'espère être à la hauteur de vos espérances et ne jamais vous décevoir. Je vous rends hommage par ce modeste travail.

Masim Amina

Remerciements

Tout d'abord, on remercie Dieu, le Généreux qui nous a donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.

On a le grand honneur de formuler notre gratitude et profonde reconnaissance à l'égard de Mme

Benhadj Mabrouka ; notre promoteur, qui a dirigé notre travail et nous a guidé tout au long de sa réalisation. Son sens des valeurs humaines et son esprit scientifique nous ont conduit à la réussite de ce travail. On vous en est très reconnaissantes.

On tient à exprimer nos vifs remerciements aux membres du jury :

Mr Mechei Abd el basset pour avoir bien voulu examiner ce mémoire et nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de notre haute gratitude.

Mr Menasria Taha qui est bien voulu examiner ce travail et participer au jury. Qu'il trouve ici l'assurance de toute notre reconnaissance.

On tient à remercier également tous les gens qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail. Il nous est agréable de leur exprimer notre reconnaissance et notre profond respect.

Liste d'abréviation

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AM : acétate d'éthyle-méthanol

AmpB : Amphotéricine B

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

BAE : n-butanol - acide acétique -eau

CCM : chromatographie sur couche mince

DAP : acide diaminopimélique

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EAE: éthanol - ammoniac - eau

GYEA: Glucose Yeast Extract Agar

ISP : le projet international des Streptomyces

ME : méthanol – eau

PBP: Penicillin-binding proteins

PC: phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

PG : phospholipides contenant de la glucosamine

PGI : phosphatidylglycérol

pH : potentiel hydrogène

PI : phosphatidylo sitol

RF : rapport frontal

UP : undécaprénylphosphate

UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Cycle de développement des streptomycètes	10
2	Les cibles à des antibiotiques	13
3	La structure des parois cellulaires chez les bactéries Gram+ (<i>Staphylococcus aureus</i>) et les Gram- (<i>Escherichia coli</i>)	14
4	Le processus de synthèse des protéines et les étapes inhibées par divers agents antibactériens	17
5	Les cibles des antifongiques	21
6	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act 158 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	44
7	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act 406 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	44
8	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act316 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	45
9	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act368 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	45
10	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act257 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	46
11	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act97 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	46
12	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act292 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	47
13	micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act359 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100)	47
14	Chromatogramme des extraits sous lampe UV du système B.A.E	71
15	la révélation microbiologique de plaque CCM (souche ACT 359).	73

Liste des Tableaux

Tableau	Titres	Page
1	Répartition des Actinomycètes dans la nature	3
2	chimio types rencontrés chez les <i>actinobacteria</i>	6
3	Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes	7
4	Mécanismes d'action des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines	16
5	Spectre d'activité des antifongiques azolés	23
6	les codes des souches d'actinomycètes	29
7	Résultats de repiquage et vérification de la pureté des isolats	38
8	Résultats de coloration de Gram des 10 isolats	41
9	Aspect macroscopique des souches sur différents milieux de culture	48, 49, 50
10	Croissance des souches de <i>Streptomyces</i> à différentes températures	52
11	Croissance des souches de <i>Streptomyces</i> à différentes concentrations de NaCl	54
12	Croissance des souches de <i>Streptomyces</i> à différents degrés de pH	56
13	Test d'activité antifongique des extraits de 10 isolats de <i>Streptomyces</i>	59, 60
14	Diamètre d'inhibition de la croissance des souches fongique par l'isolat 158	65
15	Les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système BAE	67

16	Les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système AM	68
17	Les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système EAE	69
18	les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système ME	70

Liste des planches

N° de planche	Titre	page
1	Photos représentant les caractères cultureux des isolats sur le milieu ISP ₂	39
2	Observation microscopique de la Coloration de Gram de toutes les souches d'actinomycètes Gx100	42
3	Photos des caractères cultureux des souches sur les différents milieux	51
4	Photos des résultats du test de tolérance à différentes températures de quelques isolats	53
5	Photos des résultats du test de tolérance à différentes concentrations de NaCl de quelques isolats	55
6	Photos des résultats du test de tolérance à différents pH de quelques isolats	57
7	L'activité inhibitrice de quelques extraits vis-à-vis des champignons tests	61
8	L'activité antifongique de souche 158 des champignons filamenteux et quelques levures	66

Introduction

Introduction

Bien que la médecine moderne nous a permis de survivre a des maladies qui auraient été autrement mortelles, cela s'est accompagné d'une expansion des populations des patients immunodéprimés vulnérables aux microbes pathogènes. Parmi ces menaces microbiennes, les champignons qui sont devenus l'une des principales causes de maladies humaines liée à des taux de morbidité et mortalité très élevés, font de leur traitement et de leur prophylaxie un véritable défi thérapeutique (**Brown et al., 2012 ; Brown, Denning et Levitz, 2012 ; Fisher et al.,2020**). Ces envahisseurs opportunistes comprennent essentiellement les espèces de *Candida* et d'*Aspergillus* (**Carle, 2003, Holding et al., 2003**).

Les facteurs de risque sont principalement le nombre accru des patients fragilisés par leurs maladies ou par un traitement immunosuppresseur, les transplantations des organes, Le diabète et l'insuffisance rénale (**Odds, 1995 ; Ampel, 1996 ; Pfaller, 2002 ; Ascioğlu et al., 2002**).

Les antifongiques qui sont actuellement à notre disposition pour le traitement des mycoses dispose à vrai dire un petit nombre de produits, en particulier contre les mycoses profondes. Trois classes d'agents antifongiques sont disponibles : les polyènes (amphotéricine B), les dérivés triazolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole) et les analogues nucléosidiques (5-fluorocytosine) (**Lacroix et al., 2003**).

Pendant ces antifongiques ne sont pas pour autant dénués d'effets indésirables pouvant être graves. Leur utilisation est limitée par leur toxicité, leur bio-disponibilité, des interactions médicamenteuses ou de l'étroitesse de leur spectre d'action. Ainsi que l'apparition d'espèces résistantes (**Ghannoum et Rice, 1999**).

C'est pourquoi la découverte de nouveaux antifongiques avec un spectre large, une activité plus puissante et peu d'effets toxiques est devenu fondamental pour la future prise en charge des infections fongiques systémiques (**Peignen, 1995**).

Aujourd'hui, les Actinomycètes en général et surtout les *Streptomyces* sont les groupes de bactéries les plus courants, produisant des métabolites, notamment antibactériens et antifongiques (**Berdy, 2005**). Ces bactéries sont largement utilisées en pharmacologie, et de nombreux centres de recherche dans le monde ont examiné ces organismes en raison de leur importance dans la production des antibiotiques (**Abdel-Kader et Muharram , 2017**).

Les objectifs de notre étude consistent à :

-La réalisation d'une étude phénotypique particulièrement morphologique et physiologique des isolats.

-L'extraction des molécules à activité antifongique à partir des bactéries du genre *Streptomyces* et la mise en évidence de leur activité ainsi que la caractérisation chimique des biomolécules.

Ce travail est présenté en trois parties :

- La première partie est relative à une synthèse bibliographique en rapport avec le thème abordé.

- La deuxième partie est consacré à la présentation du matériel utilisé et à la description des méthodes effectuées.

- La troisième partie comporte les résultats et discussions.

Partie
Bibliographique

CHAPITRE I

Les Actinomycètes et les *Streptomyces*

Chapitre I : Généralité sur les Actinomycètes et les *Streptomyces***I. Les actinomycètes****1. Définition et caractéristiques générales**

En grec le mot Actinomycète est divisé en deux « *Aktis* » qui signifie rayon et « *Mykes* » qui veut dire champignon, la nomenclature globale veut dire « champignons rayonnants » (**Lamari, 2006**).

Les Actinomycètes ou bien Actinobactéries sont des bactéries à Gram positif caractérisées par un pourcentage de Guanine-cytosine élevée (supérieur à 55%). En outre, elles forment une branche très diversifiée morphologiquement, allant de simple Cocci jusqu'aux formes mycélienne complète (**Goodfellow, 2012**). La majorité d'entre eux sont immobiles, et leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils poussent en quelques jours à quelques semaines. On les trouve en abondance dans la nature (**Boudemagh, 2007**).

Les Actinomycètes sont indispensables à la fertilisation des sols et à la fabrication des produits chimiques complexes tels que les antibiotiques, les vitamines, et les stérols, etc (**Boudemagh, 2007**).

A l'époque les Actinomycètes ont été confondu avec les champignons en raison de leur morphologie fongöides résultant de leur croissance centrifuge autour du germe, et la présence des organes de sporulation (sporangies) (**Reponen et al., 1998**)

Leur propriétés chimiques et physiologiques et immunologiques, en revanche les identifient clairement comme des procaryotes (**Becker et al., 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981**).

Sachant que leur paroi cellulaire est constituée de peptidoglycane plutôt que de chitine ou de cellulose, et leur cytologie est similaire à celle des bactéries. Ces traits ainsi que d'autres tels que la sensibilité aux actinophages et aux antibiotiques antibactériens, soutiennent la classification des Actinomycètes en tant que des bactéries (**Larpent, 1989 ; Mariat et Sebald, 1990**).

2. Classification et Taxonomie

Les actinomycètes sont classés dans le domaine Bactéria et phylum des Actinobacteria selon le Bergey's manual, (2012), ce dernier (phylum) est subdivisé en 06 classes dont celle de Actinobacteria. Celle-ci se divise en 15 ordres. Les plus importants sont ceux des Actinomycetales et Streptomycetales (**Goodfellow et al., 2012**).

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* et *Actinobacteridae*. Chacune de ces sous-classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des Actinomycetales est subdivisé en 10 sous-ordres :

Actinomycineae, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Sudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae* et *Glycomycineae* (**Stackebrandt et al., 1997**; **Labeda et Kroppenstedt, 2000** ; **Stackebrandt et Schumann, 2000**).

3. Ecologie

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires présentes sur tous les substrats naturels courants, et en particulier le sol (**Lacey, 1973** ; **Porter, 1971** ; **Waksman, 1959** ; **Williams et al., 1984**), on les trouve aussi dans tous les différentes niches écologiques telles que :

sols, air, fumier, débris, végétaux, lacs, sédiments marins, rivières, océans, déserts, sol polluée...etc (**Williams et al., 1983**).

Dans le sol, de nombreuses actinomycètes sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus. Les actinomycètes du sol sont présents en surface, entre 0 et 2m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthylisobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols (**Omura, 1992** ; **Zaitlin et al., 2003** ; **Zaitlin et Watson, 2006**). Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des 5000 souches d'actinomycètes isolées à partir de 16 types de sols (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**). Le rapport microorganisme totaux / actinomycètes, diminue au fur et mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total des microorganismes,

tandis que la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 40% (Ouhdouch, 1989).

Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries.

Les actinomycètes ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques : (i) eau de mer et de sédiments marins (Jensen *et al.*, 1991 ; Ghanem *et al.*, 2000), eau douce (Kitouni *et al.*, 2005), eau issue de marécages salés (Al-Zarban *et al.*, 2002 ; Boughachiche *et al.*, 2005).

Enfin, certains actinomycètes sont des symbiotes de plantes dans la rhizosphère, les actinomycètes appartenant au genre *Frankia* sont extrêmement importants pour de nombreux types de plantes. Cette bactérie fixatrice d'azote (capable d'utiliser l'azote atmosphérique comme seule source d'azote) forme des nodules aux niveau des racines des angiospermes, et confère donc un avantage à la plante pour croître en sol pauvre en azote. Cette association est appelée association actinorhizienne (Prescott *et al.*, 2007). Tableau représente la répartition des actinomycètes dans la nature.

Tableau 1 : Répartition des Actinomycètes dans la nature (Good Fellow, 1983)

Genres	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccarmonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

4. Critères d'identification

La taxonomie actuelle des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. La plupart des genres peuvent être définis par des critères morphologiques et chimiques, tandis que la détermination des espèces repose sur les critères physiologiques et moléculaires.

4.1 Caractère morphologique

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes (**Prescott *et al.*, 1997**). Certaines caractéristiques peuvent être observées à l'œil nu dans les groupes actinomycètes parmi les caractères cultureux importants (**Saker, 2015**).

Les principaux critères morphologiques correspondent à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou de mycélium aérien. Ainsi que la présence des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, la présence de sclérotés, de sporanges ou de synnémata (appelés également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressées, parfois fusionnées et portant des conidies apicales ou latérales (**Theilleux, 1993**). Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*).

4.2. Critères physiologique

La présence des actinomycètes est significativement influencée par les conditions environnementales l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, les faibles taux d'humidité, la nature et l'abondance de la matière organique et la végétation du sol (**Sykes et Skinner, 1973 ; Basilio, 2003**).

4.2.1. Taux d'humidité

En général, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (**Oskay *et al.*, 2004 ; Prescott *et al.*, 2007**).

4.2.2. Température

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

cellulolytique est absente pour le genre *Thermoactinomyces* et commune pour *Thermomonospora* (Holt *et al.*, 1994). Le genre *Streptomyces* comporte aussi des espèces thermophiles comme *Streptomyces thermocrophilus* (Kim *et al.*, 2000) et même psychrophiles (Holt *et al.*, 1994).

4.2.3. pH

Les Actinomycètes préfèrent un pH neutre (et croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9) ou légèrement alcalin cependant (Bellagopi, 2014). Des travaux ont montré l'existence d'une large diversité d'actinomycètes acidophiles qui diffèrent morphologiquement et physiologiquement des espèces neutrophiles (Basilio, 2003).

4.2.4. L'oxygène

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

4.2.5. Matière organique

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

4.3. Critères chimio-Taxonomie

Ces caractéristiques chimiques dépendent de l'identification des contenus cellulaires tels que les acides aminés, glucides totaux, acide gras membranaires...

4.3.1 Les Sucres

Les cellules des Actinomycètes contiennent différents types de polysaccharide comme :

- Arabinose-galactose (type A)
- Arabinose-xylose (type B)
- Rhamnose-galactose (type E)
- Madurose ou 3-0 méthyl-galactose (type B)

Il peut y avoir des types inhabituels ribose, mannose, galactose (type C) (Becker *et al.*, 1964, 1965).

4.3.2 Acides aminés

Le peptidoglycane est le composant principal de la paroi des actinobactérie un parmi les acides aminés est taxonomiquement très importants pour les actinobactéries, l'acide diaminopimélique (DAP) qui peut être sous deux formes, LL ou DL (**Tableau 2**) (**Becker et al,1964,1965**).

Tableau 2 : chimio types rencontrés chez les *actinobacteria* (Harir,2008)

Chimiotypes	Acide aminés	Sucres caractéristiques	Genre
Type I C	L-L DAP Glycine	Pas de sucres caractéristiques	<i>Streptomyces, Nocardioide</i>
Type II D	DL-DAP	Glycine, Arabinose, xylose	<i>Actinoplanes, Micromonospora</i>
Type III B	DL-DAP	Madurose	<i>Streptosporangium, Actinomadura</i>
Type III C	DL-DAP	Pas de sucres caractéristiques	<i>Termomonospora</i> , <i>Nocardiosis</i>
Type III E	DL-DAP	Galactose , Rhamnose	<i>Saccharothrix,</i> <i>Actinosynnema</i>
Type IVA	DL-DAP	Arabinose, Galactose	<i>Nocardia</i> <i>Amycolatopsis</i> <i>Pseudonocardia</i>
Type V	Lysine ornithine	Pas de sucres caractéristiques	<i>Actinomyces</i>
Type VI	Lysine	Pas de sucres caractéristiques	<i>ocrsKovia</i> <i>promicromonospora</i>

4.3.3 Lipides

La composition des actinomycètes en lipides membranaires (phospholipides, ménaquinones, acides gras) ou pariétaux (acides mycoliques) est également un critère de détermination de chimiotypes comme le montre le tableau suivant :

Tableau 3 : type de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobacteria
(lechevalier *et al* ,1977)

Type de phospholipides	pE	pC	pG	pGI	Exemple
PI	-	-	-	V	<i>Actinomadura</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces,pseudonocardia</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiosis,Amycolatopsis</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Nocardia,Nonomuraen</i>
Pv	-	-	+	+	<i>Oerskovia</i>

PE : phosphatidyléthanoline ; **PC** :phosphatidylcholine ; **PG** : phospholipidescontenant de la glucosamine ; **PGI** :phosphatidylglycérol ; + :**présent** ; - :**absent** ; **V** :variable selon le genres et les espèces.

Le phosphatidylo sitol **PI** est présent chez toutes les actinobacteries

4.4. Critères moléculaire

Les techniques partielles sont adoptées pour analyser la séquence de molécules ADN et y compris ARNr (ADNr16s) cette étude est également approfondie de l'hybridation pour CG et déterminer le pourcentage de Guanine et Cytosine. (Bouaziz,2018).

4.4.1 Séquençage de l'ADN ribosomique

Le premier à avoir utiliser cette technique pour la taxonomie des actinobactéries a été (Stackebrandt et ses collaborateurs en 1981 et 1983). Le gène codant pour l'ARN ribosomique16S est un gène chromosomique d'une taille de 1500 paires de bases, présent chez toutes les bactéries dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes.

4.4.2 Hybridation ADN-ADN

L'analyse de l'hybridation ADN-ADN est indispensable pour l'identification définitive d'une espèce lorsque les séquences de l'ADNr 16S présentent des similarités supérieures au pourcentage du seuil de la détermination d'espèce nouvelle. L'hybridation ADN-ADN consiste à estimer le taux de réassociation (hybridation) de l'ADN génomique d'un taxon avec celui des espèces les plus proches. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance de l'ADN génomique inférieur à 70% (Wayne *et al.*, 1987 ; Devereux *et al.*, 1990).

5. Caractéristique du mycélium aérien et mycélium de substrat

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

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, ces hyphes aériennes sont plus épaisses et beaucoup moins ramifiées que les hyphes du substrat. Elles sont en général pigmentées et enfermées dans une enveloppe externe hydrophobe. Le mycélium du substrat est aérobic facultatif, par contre le mycélium aérien est aérobic strict (**Silvey et Roach, 1975**). Les actinomycètes aquatiques sont habituellement dépourvus de ce type de croissance (mycélium aérien). Divers mutants de streptomycètes sans mycélium aérien ou incapables de sporuler ont été décrits (**Chater et Merrick, 1979**).

6. La Formation des spores

Les groupes d'actinomycètes peuvent sporuler soit en cassant certains filaments pour former des conidies soit en produisant des spores extrêmement résistantes à la chaleur.

6.1 Les Endospores

Les Endospores sont produites par des *Actinomycètes* thermophiles et sont semblables, morphologiquement et chimiquement elles sont caractéristiques du genre *thermoactinomyces* il résultent d'une réorganisation du cytoplasme avec la formation d'une nouvelle paroi dans les hyphes, il a une paroi externe épaisse et de nombreuses couches qui en capsulent le cortex et la membrane cytoplasmique, il contient également un acide dipicolinique. (**Kitouni, M ,2007**).

6.2 Les Exospores

Les exospores sont formées par septation d'hyphes existants et séparation des éléments obtenus, le mycélium primaires contient de nombreux éléments disponible retrouvent presque toujours dans ces spores système membranaire intra-cytoplasmique cytoplasme, paroi plus épaisse (**Bride, 1986**).

7. Importance des Actinomycètes

Les actinobactéries suscitent beaucoup d'intérêts, car c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs ce qui fait d'eux des producteurs intéressants en industrie pharmaceutique (Valan Arazu *et al.*, 2009). Ainsi, d'autres métabolites sont également synthétisés. On estime que les deux tiers des quelques six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les actinobactéries.

II. Le genre *streptomyces*

1. Définition

Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre Actinomycetales de la classe *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Ils possèdent un métabolisme oxydatif et un taux G+C% compris entre 69 et 78% (Korn-Wendisch et Kutzner, 1992 ; Hodgson, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2006).

Notamment formant des filaments ramifiés de 0,5 à 2µm de diamètre qui fragmentent rarement c'est le mycélium végétatif. Le mycélium aérien forme par contre à sa maturité des chaînes de spores non mobiles. Les *Streptomyces* produisent un grand nombre de pigments responsables des différentes couleurs du mycélium en plus des pigments diffusibles. Leur température optimale est située entre 25°C et 35°C (à l'exception des espèces thermophiles ou psychrophiles) et leur pH optimum entre 6,5 et 8 (Stackebrandt et Schumann, 2006).

2. Cycle de vie

Le cycle biologique de *Streptomyces* est comparable à celui de nombreux micromycètes. Sur milieu solide, débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium végétatif formé d'hyphes multi-nucléoïde, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium végétatif, en utilisant ce dernier comme substrat. En effet, le mycélium végétatif s'autolyse. La croissance des hyphes est apicale (se fait par le sommet) (Flårdh, 2003), et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien (Miguélez *et al.*, 1999), et s'accompagne de la formation de septa, conduisant à des unités uni-génomiques. Les cellules se différencient ensuite pour former des spores. Cela se traduit par l'épaississement des parois cellulaires (qui rend les spores plus résistantes à la dessiccation), une spiralisation des chaînes, accompagnée d'un dépôt de pigment gris. En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium végétatif, même si

certaines Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement (Hodgson, 1992) Comme le montre dans la figures (1)

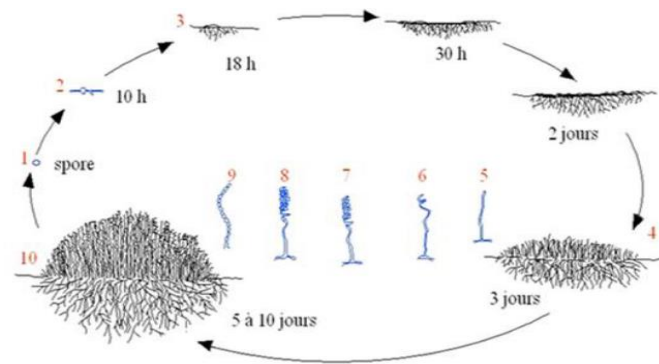


Figure 1 : Cycle de développement des streptomycètes

3. Génétique

Les génomes de plusieurs espèces de *Streptomyces* ont été séquencés et assemblés. C'est le cas des génomes de *S. coelicor*, *S. avermitilis*, *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008). Les génomes de *Streptomyces* sont composés d'une molécule linéaire d'ADN de grande taille, allant de 8 à 10 MB y'a un haut taux de G + C « 70 % ». Ils possèdent également de plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que des plasmides circulaires.

La densité génique est élevée avec environ 1 gène tous les 1200 paire de bases, c'est notamment le premier exemple de bactéries contenant plus de gène dans sans génome que l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae* (Bentley *et al.*, 2002).

4. Caractéristique du genre *streptomyces*

Le genre *Streptomyces* a été décrit pour la première fois par (Waksman et Henrici en 1943) .et classé dans la famille des *Streptomycetaceae* en se basant sur la morphologie et la composition de la paroi cellulaire. Le développement de la classification numérique a permis la reclassification de six autres genres de cette famille (*Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* et *Microellobosporia*) dans le genre *Streptomyces*. Ces anciens systèmes numériques utilisant les caractères phénotypiques sont fondamentalement changés par l'introduction des caractéristiques de la biologie moléculaire dans les systèmes de classification (Stackebrandt *et al.*, 1997). Les genres *Streptomyces* et *Streptoverticillium* étaient deux genres distincts possédant des caractères morphologiques différents, en 1990, Witt et Stackebrandt, ont conclu à partir des comparaisons des séquences d'ARNr 16S et 23S que le genre *Streptoverticillium* doit être considéré comme un synonyme de *Streptomyces*. La famille

Streptomycetaceae contient Actuellement trois genres (*Streptomyces*, *kitasatospora* et *streptacidiphilus*) (Stackebrandt et Schumann, 2006).

5. Détermination des espèces du genre *Streptomyces*

En 1964, le projet international des *Streptomyces* (ISP) a essayé de standardiser les critères de détermination de l'espèce. (Shirling et Gottlieb 1968, 1969, 1972). Ont décrit des critères standards clés pour la détermination des espèces :

- la forme des chaînes de spores (réctiflexible pour les chaînes droites ou flexueuses, spirale pour les chaînes hélicoïdales).
- la couleur du mycélium aérien sporulé avec sept classes de couleur (blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet).
- la production de pigments mélanoides bruns à noirs.
- l'ornementation de la paroi sporale (lisse, verruqueuses, échinelée ou chevelue).
- la présence ou non de pigments solubles ;
- la capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer (D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-raffinose, D-mannitol, D-fructose, L-arabinose, L-rhamnose, i-inositol et saccharose).

6. Importance des *Streptomyces*

6.1. Importance dans les domaines pharmaceutique, médical

La *streptomyces* et l'actinomycètes sont généralement considérés comme les bactéries les plus productrices d'antibiotiques, et plus de 6000 antibiotiques ont été isolés à ce jour par ces types de bactérie, streptomycine, néomycine, candidicine, etc. (Lazzarini et al. 2000 ; Berdy, 2005).

Streptomyces a révélé un potentiel biotechnologique intéressant pour la production d'enzymes (par exemple la xylose isomérase issue d'un Streptomycète thermophile (Hodgson 2000 et Brzezinski, 1997). ou de polluants organiques (par exemple l'acide phénylacétique (Niraula et al., *Streptomyces* est la source la plus importante de métabolites secondaires présentant une activité biologique d'intérêt pour la santé humaine et animale : antibactérienne (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), antifongique (nystatine), antivirale (tunicamycine), antiparasitaire (ivermectine), immunosuppressive (rapamycine), antitumoral (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur d'enzyme (acide clavulanique) (Demain, 2000). En particulier, ce genre est remarquable pour le nombre et la diversité chimique des antibiotiques qu'il produit (Watve et al., 2001).

6.2 Les *Streptomyces* Agent de biocontrôle

De nombreuses études scientifique ont pu aboutir à des résultats montrant que le genre *streptomyces* peut être utilisé comme agent de lutte biologique pour certaines maladies phytopatogènes parmi les types de streptomyces qui on été utilisés contre les agents pathogènes des plantes nous avons *streptomyces palmae pc12* qui est considéré comme un agents de lutte biologique (**cheharn et al.,2020**).

En 2020 abbasi et ses collègues ont testé l'activité agent antifongique pour 106 souche de *streptomyces* contre *phytophthora capsici*, l'agent causal de la brûlure de poivrier, parmi les souches ont été étudiée et quatre souches ont montré une inhibition de croissance supérieure à 50% contre *phytophthora capsici* au milieu de la PDA une combinaison de deux souche *S.vinaceusdrappus SS14* avec *S.rochei IT20* a significativement inhibé la germination champignon pathogène ils ont noté que ce mélange réduisait la douleur causée par *phytophthora capsici* (**Abbasiya et al., 2020**).

CHAPITRE II

Les agents antimicrobiens

I. Les agents antimicrobiens

1. Les antibiotiques

Le terme antibiotique vient des mots grecs « anti » (contre) et « bios » (vie), et il fait référence à toute substance capable de tuer sélectivement ou de ralentir la croissance des bactéries. Si l'effet est destiné à un organisme eucaryote, cette terminologie ne s'applique pas. Ils permettent de lutter contre de nombreuses maladies autrefois mortelles (par exemple la tuberculose) et ont largement bénéficié de l'allongement de l'espérance de vie. (Haas, 2015).

Les antibiotiques doivent souvent agir à l'intérieur de l'hôte. Par conséquent, leur action sur les cellules et les tissus de l'hôte est décisive. L'agent antimicrobien idéal tue le microorganisme nuisible, mais il n'a pas d'effet sur l'hôte humain ; c'est le principe de la toxicité sélective (Tortora, Funke et Case, 2019).

1.2 Classification et mécanismes d'action

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur modes d'action ; la plupart d'entre eux agissent sur une des trois cibles suivantes : la synthèse du peptidoglycane, la réplication de l'ADN ou la synthèse des protéines (Figure 2).

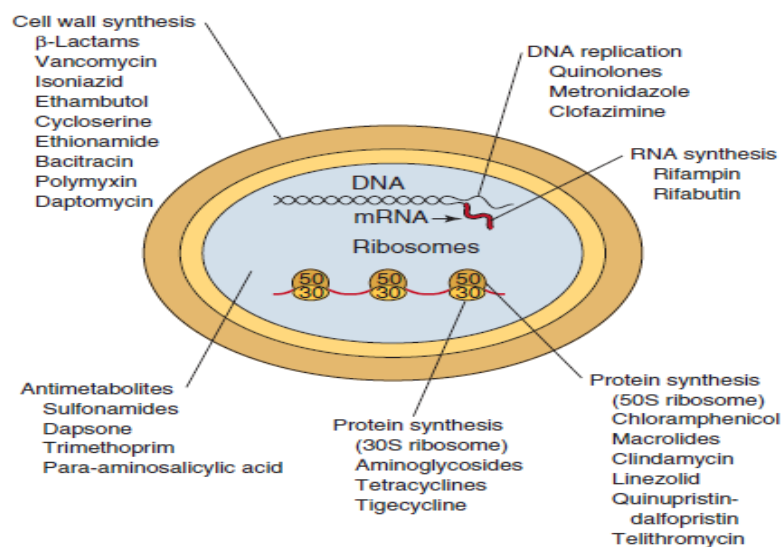


Figure 2. Les cibles des antibiotiques (Rosenthal, et Pfaller, 2016).

1.2.1 Les inhibiteurs de la synthèse de la paroi et la membrane cellulaire

Beaucoup d'antibiotiques empêchent la synthèse de peptidoglycane ; un composant essentiel de la plupart des parois des bactéries, il peut être une cible durant différents stades de son composition ; sa structure de base est une chaîne disaccharidique constitué de molécules alternées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. Ces chaînes sont ensuite

rassemblées avec des ponts peptidiques qui créent un revêtement en mailles rigide pour la bactérie (Costerton, Ingram et Cheng, 1974).

C'est au niveau de ces chaînes peptidiques qu'on peut trouver des variations entre les bactéries ; par exemple pour la plupart des cocci gram+ le troisième acide aminé est la L-lysine tandis que chez les bacilles gram- c'est l'acide méso-diaminopimelique (Chopra, 2010). (Figure 3)

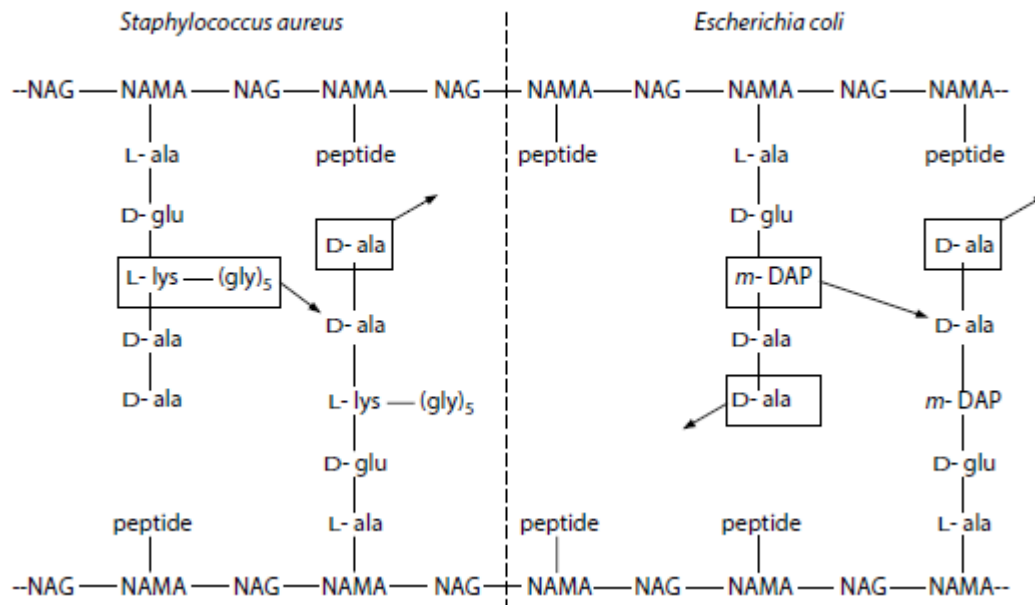


Figure 3. La structure des parois cellulaires chez les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*) et les Gram- (*Escherichia coli*) (Chopra, 2010).

L'attachement des disaccharides-pentapeptides se fait par des enzymes spécifiques (exemple, transpeptidase, transglycosylases). Ce sont des membres d'une grande famille de protéases qui sont également appelées PBP ou penicillin-binding proteins, car elles sont les cibles des antibiotiques β -lactamines. Lorsque des bactéries en croissance sont exposées à ces antibiotiques, ils se lient à des PBP spécifiques dans la bactérie et inhibent l'assemblage des chaînes de peptidoglycane. Ceci active des autolysines qui dégradent la paroi cellulaire entraînant la mort des cellules bactériennes (Sykes et Papich, 2014). Donc les antibiotiques β -lactamines agissent généralement comme des agents bactéricides.

Autres antibiotiques qui interfèrent avec la construction de la paroi comprennent :

1.1.1.1 Les glycopeptides

Exemple de cette classe la vancomycine qui est un antibiotique très efficace contre les bactéries Gram+. Il perturbe la synthèse de la paroi en se liant spécifiquement à la séquence D-alanine-D-alanine des chaînes latérales pentapeptidiques ce qui inhibe la formation des ponts entre les chaînes de peptidoglycane (Cui *et al.*, 2021). L'utilisation de la vancomycine a été

réservée pour le traitement des staphylocoques résistants à l'oxacilline mais à cause de l'émergence de résistance des entérocoques contre cette antibiotique son utilisation a été ligoté (Murray, Rosenthal et Pfaller, 2016).

1.1.1.2 Les polypeptides

Exemple la bacitracine, c'est un antibiotique a spectre étroit, active seulement sur les bactéries gram+. Elle inhibe une étape tardive de la voie de biosynthèse de peptidoglycane en interférant avec la déphosphorylation et la régénération de lundécaprénylphosphate (UP), un transporteur lipidique membranaire responsable de déplacement des précurseurs de peptidoglycane vers la paroi cellulaire (Bernard, 2007).

1.1.1.3 Les lipopeptides

La daptomycine est le seul représentant de cette classe, c'est un antibiotique naturel, active sur les bactéries Gram+. Son mécanisme d'action implique la liaison aux membranes bactériennes suivie d'une formation des canaux ioniques, ce qui déclencherait un efflux d'ions intracellulaire en particulier de potassium. Ces efflux conduiraient à la dépolarisation de la membrane, à l'arrêt de la synthèse de macromolécules (protéines, ADN, ARN) puis la mort cellulaire (Silverman, Perlmutter et Shapiro, 2003).

1.1.2. Les inhibiteurs de la synthèse des protéines

Dans les systèmes biologiques, le processus de traduction des informations codées par l'ADN en protéines est un phénomène universel. L'établi est le même dans les cellules procaryotes et eucaryotes. Il semblait que la synthèse des protéines ne puisse pas être cible d'un agent à toxicité sélective. Cependant, les ribosomes procaryotes ne sont pas constitués des mêmes protéines que les ribosomes eucaryotes, et on peut les distinguer par leurs coefficients de sédimentation, 70S pour les ribosomes procaryotes et 80S pour les ribosomes eucaryotes (Swayze, Griffey et Bennett, 2007).

Néanmoins, les mitochondries (qui sont des organites eucaryotes) contiennent également des ribosomes 70S similaires à celles des bactéries, les antibiotiques ciblant les ribosomes 70S peuvent donc avoir des effets néfastes sur les cellules de l'hôte (Böttger, 2007).

Les mécanismes d'action de ces antibiotiques varient, certains se lient à la petite sous unité ribosomique 30S, d'autre s'attachent à la sous unité 50S (grande). Plusieurs étapes dans la synthèse des protéines peuvent être également affectés : la liaison aminocyl-ARNt, la formation

des liaisons peptidiques, la lecture d'ARNm et la translocation (**Willey, Sherwood et Woolverton, 2007**)

Le tableau et la figure suivantes résumant les différents antibiotiques agissant sur la synthèse protéique et leurs mécanismes d'action :

Tableau 04. Mécanismes d'action des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines (**Tortora, Funke et Case ; 2019**).

Classe d'antibiotique	Membres de classe	Mécanisme d'action	Effet sur la bactérie
Aminoglycosides	Neomycine Kanamycine Gentamicine streptomycine	Se lie à la petite sous-unité (30S) et provoque une lecture incorrecte de l'ARNm sur le ribosome en interférant avec la formation de complexe d'initiation fonctionnels	bactéricide
Tetracyclines	Oxytetracycline chlortetracycline	Boque l'occupation de l'ARNt dans le site A ce qui empeche l'addition de nouveaux acides aminés à la chaine polypeptidique	bactériostatique
Macrolides	Erythromycine clindamycine	Se lie à l'ARNr 23S de la grande sous-unité (50S) et bloque le tunnel entre les deux sous-unités et empeche le déplacement du ribosome sur l'ARNm pendant la synthèse des protéines.	bactériostatique
Chloramphenicol	chloramphenicol	Inhibe l'activité de peptidyle transférase qui est necessaire pour lier les acides aminés dans la chaine polypeptidique en formation, par conséquent, il provoque l'arret de croissance bactérienne	bactériostatique

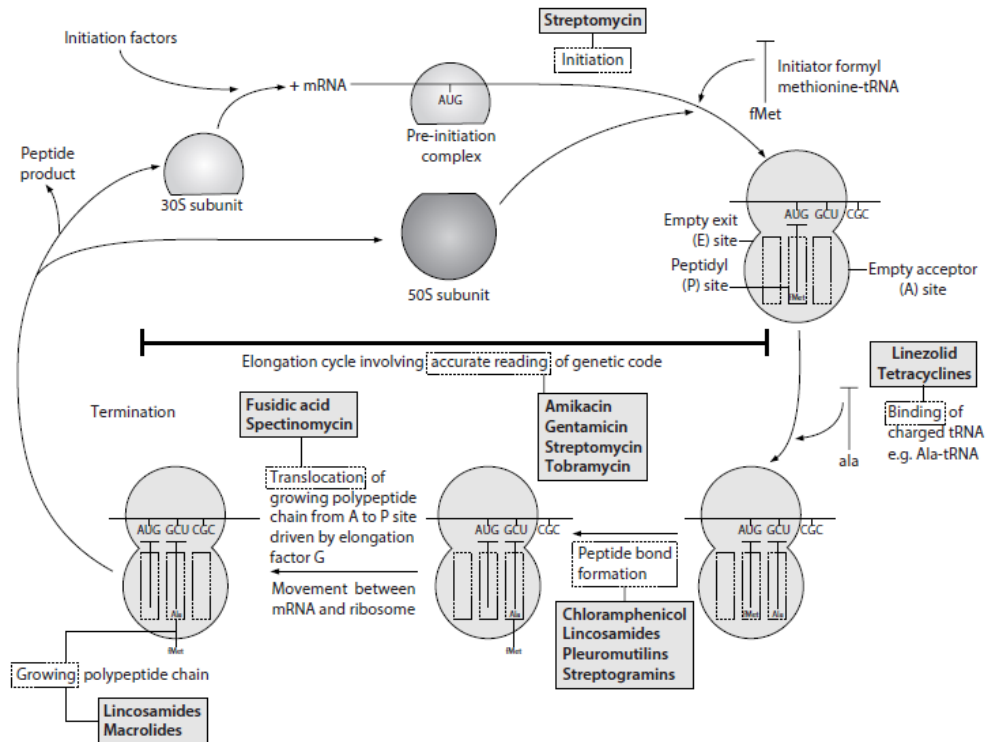


Figure 04 : Le processus de synthèse des protéines et les étapes inhibées par divers agents antibactériens (Chopra, 2010).

1.1.3. Les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (ADN/ARN)

Les composés qui se lient directement à la double hélice sont généralement très toxique pour les cellules eucaryotes car la synthèse des acides nucléiques est très similaire chez les procaryotes comme les eucaryotes et seulement quelques-unes - celles qui interfèrent avec les processus enzymatiques associés à l'ADN - présentent une certaine sélectivité pour l'utilisation systémique en tant qu'agents antibactériens. Ces composés comprennent les quinolones, la novobiocine, la rifampicine (Chopra, 2010).

Les diaminopyrimidines, les sulfamides, Les 5-nitroimidazoles et les nitrofuranes affectent également la synthèse d'ADN d'une façon indirecte, et peuvent être classés sous cette catégorie (Chopra, 2010).

1.1.3.1 La rifampicine

La rifampicine est un antibiotique d'origine semi-synthétique qui appartient à la famille des rifamycines (Marriner, Nayyar, Uh *et al*, 2011) ; (Ma, Ginsberg et Spigelman, 2007), La rifampicine inhibe la croissance bactérienne en se liant à l'ARN polymérase des bactéries causant un blocage de transcription des ARN messagers (Campbell *et al.*, 2001). Son spectre

d'action est large et comprend les bactéries à Gram +, à Gram - et intracellulaires (*Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*) (Dorosz, 2014).

1.1.3.2 Les quinolones

Les quinolones sont parmi les agents chimiothérapeutiques les plus utilisées. Ce sont des produits synthétiques qui inhibent l'ADN topoisomérase bactérienne de type II (gyrase) ou topoisomérase de type IV (Villemagne et al., 2012). Les ADN gyrases et la topoisomérase jouent un rôle clé dans la réplication et la réparation de l'ADN. La nature très condensée du chromosome bactérien le rend totalement dépendant des topoisomérases pour la gestion de son topologie complexe. Chez *E. coli* par exemple, le chromosome circulaire mesure 1100 μm de long, et doit être replié à l'intérieur d'une cellule de 1 à 2 μm (Cairns, 1963). Les deux simples brins d'ADN sont enroulés l'un autour de l'autre environ 400 000 fois pour tenir dans cette petite zone (Brighty et Gootz, 2000). Les topoisomérases sont les enzymes clés qui ajustent le changement de superenroulement ou cours de séparation des brins pendant la transcription et la réplication.

En plus des composés mentionnés précédemment, il existe d'autres antibiotiques qui effectuent la synthèse de l'ADN d'une façon indirecte :

1.1.3.3 Nitroimidazoles

Le composé le plus étudié de ce groupe est le métronidazole, mais on pense que d'autres 5-nitroimidazoles agir de la même manière. Le métronidazole élimine les électrons de la ferrédoxine (ou d'autres protéines de transfert d'électrons à faible potentiel d'oxydo-réduction) entraînant le groupe fonctionnel nitro du médicament à être réduit. C'est cet intermédiaire réduit et hautement réactif qui est responsable de l'effet antimicrobien en se liant à l'ADN, qui subit une rupture de brin (Edwards, 1993). L'exigence d'interaction avec des systèmes à faible redox limite l'activité sur les bactéries anaérobies et certains protozoaires qui présentent un métabolisme anaérobie. La base de l'activité contre les espèces microaérophiles comme *Helicobacter pylori* et *Gardnerella vaginalis* reste spéculatif (Goodwin et al., 1998).

1.2. Production d'antibiotiques par *Streptomyces*

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de micro-organismes fongiques et de bactéries, et inhibent ou tuent d'autres micro-organismes à de faibles concentrations (Marinelli F. 2009) Un grand nombre d'antibiotiques ont été identifiés dans des milieux naturels, mais moins de 1 % sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques ont été structurellement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité, formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (Madigan, et al. 2007).

L'histoire des antibiotiques a commencé avec la découverte de la pénicilline par Fleming dans les années 1940.

les activités antimicrobiennes des antibiotiques produits par les micro-organismes ont été largement étendues étudié, et les recherches entreprises ont permis l'achèvement de l'arsenal antibactérien

accessible aux médecins et au grand public.

Les micro-organismes produisant du chloramphénicol, de la néomycine, de la tétracycline et de la terramycine étaient isolés en 1953. La découverte d'agents chimiothérapeutiques et le développement de nouveaux,

des médicaments plus puissants ont révolutionné la médecine et ont considérablement réduit la souffrance humaine (Prescott. ; *et al*, 2007). Il est bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs.

Près de 50% des espèces *Streptomyces* Biologie fondamentale et applications des actinobactéries 102

1.4. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antimicrobiens est un phénomène évolutif naturel, renforcé par la mauvaise application des médicaments antimicrobiens. La propagation mondiale de la résistance, affecte principalement les patients en mauvaise santé et affaiblis, la résistance aux antimicrobiens entraîne des coûts élevés dans les secteurs de la santé publique de tous les pays, et de nombreux chercheurs sont impliqués dans la recherche d'une meilleure compréhension de la résistance et les moyens pour l'alléger (De Sousa *et al.*, 2016).

Il n'y a que quelques mécanismes majeurs par lesquels les bactéries deviennent résistantes aux agents chimiothérapeutiques :

- Le micro-organisme produit des enzymes qui détruisent l'antibiotique : C'est le mécanisme de résistance le plus fréquent chez les bactéries, il est basé sur plusieurs stratégies de modification de structure des composés antibactériens : l'hydrolyse, est un type de réaction qui se produit principalement avec les agents β -lactamines ; le transfert de groupes fonctionnels (acyl, phosphoryl, thiol, nucléotidil, ADP-ribosyl, glycosyl), qui se produit avec beaucoup d'antibactériens, comme les aminoglycosides, le chloramphénicol, la rifamycine et les lincosamides, ainsi que d'autres modifications chimiques (redox, lyase), qui se produisent avec la tétracycline, la rifamycine et la streptogramine (Bhullar *et al.*, 2012) ; (Wright, 2005).

- Le micro-organisme modifie sa perméabilité à l'antibiotique : Les porines sont des protéines membranaires qui facilitent le passage des molécules hydrophiles à travers la bicouche

lipidique.(Vila, Marti et Sanchez-Cespedes, 2007), Chaque espèce bactérienne produit des porines spécifiques, et la perte ou l'altération d'un ou plusieurs entre eux est un facteur contributeur dans l'établissement de la résistance (ex., la perte d'OprD chez *P. aeruginosa* confère une résistance à l'imipénème et la méropénème) (Gootz, 2010) ; (Kaczmarek *et al*, 2006).

- Le micro-organisme altère le site cible pour l'antibiotique. Exemple : les modifications qui se produisent au niveau des PBP qui sont les protéines cibles des β -lactamines responsables à l'acquisition de résistance pour la pénicilline et la céphalosporine (Livermore, 1987) ; (Becker, Ballhausen, Kock *et al.*, 2014).

- Le micro-organisme développe des pompes d'efflux qui éliminent les substances toxiques, notamment les agents antimicrobiens. De nombreux genres et en particulier les gram-négatifs ont développé ce mécanisme contre les tétracyclines, les macrolides et les fluoroquinolones (Fernandes, Ferreira et Cabral, 2003) ; (De Kievit, Parkins, Gillis *et al*, 2001) ;(Lee, Mao, Warren *et al.*, 2000).

2. Les antifongiques

Les antifongiques sont des substances qui tuent ou inhibent la croissance ou d'autres fonctions des champignons et qui sont utilisées dans le traitement des infections fongiques.

Un nombre limité mais croissant d'antifongiques peut être utilisé pour traiter les mycoses. La plupart ont une ou plusieurs limitations, comme des effets secondaires profonds, un spectre antifongique étroit, mauvaise pénétration dans certains tissus et la sélection des champignons résistants (Wills, Redinbo, Perfect *et al.*, 2000) ; (Abu-Elteen et Hamad, 2007). Il est difficile de trouver des cibles fongiques appropriées car les champignons, comme les humains, sont des eucaryotes. Beaucoup de fonctions cellulaires et moléculaires sont similaires, et il y a souvent de vastes homologie entre les gènes et les protéines fongiques et humains.

2.1. Classification et mécanismes d'action

Il existe 4 classes principales d'agents antifongiques qui agissent soit au niveau de la paroi fongique (les échinocandines), soit sur la membrane fongique (les polyènes et les azolés) ou soit au niveau de l'acide nucléique (les flucytosines). comme le montre dans la figure5

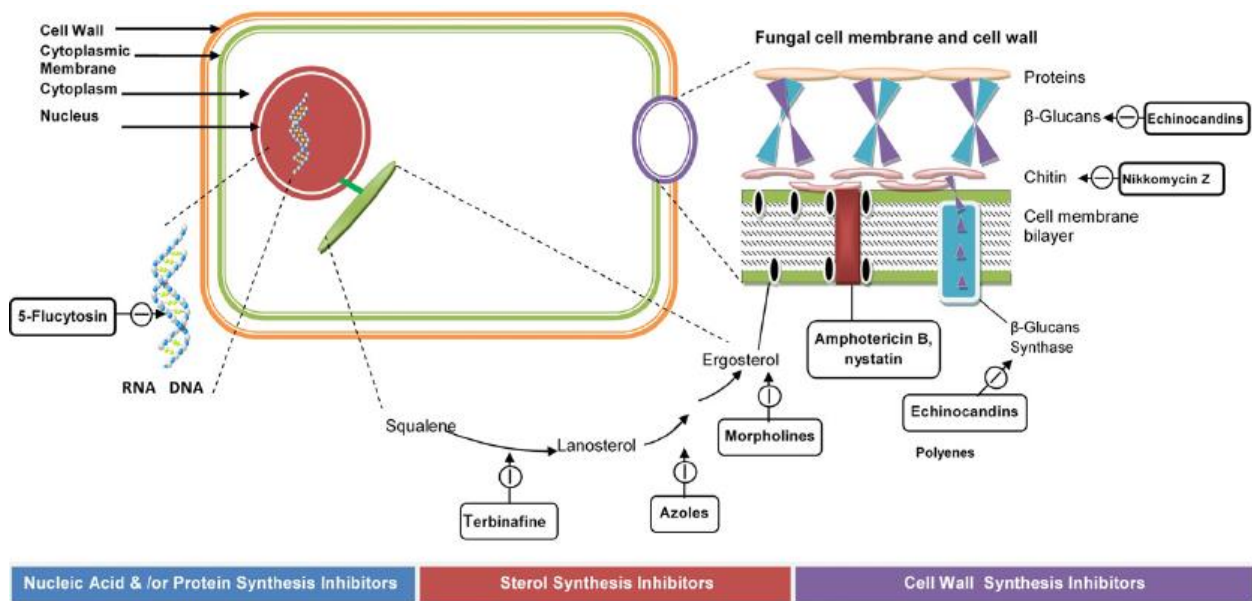


Figure 05. Les cibles des antifongiques (Kathiravan *et al.*, 2012).

2.1.1. Les antifongiques agissant sur la membrane fongique :

La recherche des molécules qui ciblent la membrane plasmique a remporté un grand succès, les imidazoles et les triazoles ont été les plus efficaces jusqu'à présent (Ostrosky-Zeichner, Casadevall, Galgiani *et al.*, 2010).

La membrane cellulaire des champignons est enrichie de divers lipides appartenant à la classe des glycérophospholipides, des sphingolipides et des stérols (van der Rest *et al.*, 1995). Les stérols, sont les principales cibles d'antifongiques polyènes et azolés. Dans les membranes fongiques, le stérol principal est l'ergostérol ; dans les membranes animales c'est le cholestérol (Dupont *et al.* 2012).

Lorsque la biosynthèse de l'ergostérol dans une membrane fongique est interrompue, la membrane devient trop perméable, tuant la cellule. L'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol est la base de la toxicité sélective de nombreux antifongiques, qui comprennent des membres du polyènes, des groupes azolés et des allylamines (Granier, 2000) ; (Granier, 2003).

2.1.1.1. Les polyènes

Les polyènes sont une classe de composés antifongiques à large spectre avec une structure qualifiée macrolide amphiphile cyclique, environ 200 molécules appartiennent à cette classe. Mais les deux principaux polyènes utilisés sont l'amphotéricine B et la nystatine.

L'amphotéricine B : est une molécule d'origine naturelle à large spectre isolées de *Streptomyces nodosum*. L'AmpB est active non seulement sur la plupart des levures et des champignons filamenteux (*Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*), mais elle est également un antiparasitaire de premier ordre, utilisé pour traiter les leishmanioses et certaines amibiases (**Vandeputte, 2008**).

Le mécanisme d'action de l'AmpB implique la formation de complexes avec l'ergostérol dans les membranes cellulaires fongiques, cette liaison résulte à la formation des canaux transmembranaires et permettent aux ions K⁺ de quitter le milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, entraînant la mort cellulaire par déplétion potassique et fuite du matériel intracellulaire. On parle donc d'antifongique fongicide (**Kathiravan et al., 2012**).

AmpB se lie également au cholestérol mais à un degré bien moindre qu'à l'ergostérol. Cela explique sa toxicité et ses effets secondaires néfastes (**Joly, Bolard et Yeni, 1992**).

Plusieurs efforts ont été faites pour le but de réduire la toxicité de l'amphotéricine B en modifiant sa formulation. Trois formulations de lipides ont été développées et sont maintenant disponibles dans la plupart des pays : la dispersion colloïdale amB (ABCD), le complexe lipidique amB (ABLCL) et l'amB liposomal (AmBisome) (**Tiphine, Letscher-Bru et Herbrecht, 1999**).

La nystatine est un antibiotique polyénique produit par *Streptomyces noursei*. Structurellement il est similaire à l'amphotéricine B et ayant un mode d'action pareil. Son spectre d'activité est légèrement plus étroit que celui de l'amphotéricine B mais est néanmoins active contre un certain nombre d'espèces de *Candida*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Blastomyces* et les dermatophytes : *Epidermophyton*, *Trichophyton* et *Microsporum*. La nystatine est soit fongistatique soit fongicide en fonction de sa concentration, de pH de milieu environnant et de la nature de l'organisme infecté (**Park, Shin et Kang, 2017**).

2.1.1.2. Les azolés

Contrairement aux polyènes, dont l'action dépend de la présence d'ergostérol dans la membrane fongique, les antifongiques azolés empêchent la synthèse de stérols membranaires. Ces composés bloquent la synthèse de l'ergostérol en interférant avec la déméthylation de son précurseur, le lanostérol (**Grillot et Lebeau, 2005**) ; (**Borgers, 1985**). La lanostérol déméthylase est une enzyme de type cytochrome P450 et, bien que les antifongiques azolés

aient beaucoup moins d'influence sur les systèmes de mammifères, certains des effets secondaires de ces médicaments sont inévitable. Les dérivés azolés antifongiques sont principalement fongistatiques mais certains composés à des concentrations plus élevées, notamment le miconazole et le clotrimazole, tuent les champignons en endommageant la membrane cellulaire. D'autres effets, moins bien caractérisés des azolés sur la respiration fongique ont également été décrits (Fromtling, 1988).

Les dérivés azolés peuvent être classés chimiquement, selon le nombre d'atomes d'azote dans leur cycle azole, dans les imidazoles (deux azotes) et les triazoles (trois azotes). Le chlormidazole (Fig.) a été le premier azole développé pour être utilisé en pratique clinique par voie topique pour le traitement de mycoses superficielles (Liaras et Soković, 2021).

Le spectre d'activité des azolés les plus utilisés est indiqué dans le tableau :

Tableau 05. Spectre d'activité des antifongiques azolés (Drouhet et Dupont, 1984) ;(Liaras et Soković, 2021).

Imidazoles	
Ketoconazole	<i>Candida spp</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Torulopsis glabrata</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus spp</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>
terconazole	<i>Microsporum canis</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Dychophyton rubrum</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Mucor spp.</i> , et <i>Saprolegnia spp.</i>
Triazoles	
Fluconazole	<i>Candida spp</i> sauf <i>C. krusei</i> , <i>Aspergillus spp</i> comme <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , et <i>A. terreus</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , les Dermatophytes et les champignons dimorphiques
Itraconazole	Dermatophytes, levures (<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Malassezia spp</i>), champignons dimorphiques, <i>Aspergillus Fusarium</i> , <i>Acremonium</i> , Mucorales, Dematiées
Voriconazole	<i>Candida spp</i> , <i>Aspergillus spp</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i> , <i>Fusarium spp</i>
Posaconazole	dermatomycetes, <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichosporon spp.</i> ,
Isavuconazole	Active contre la plupart des <i>Candida spp.</i> , inclus <i>C. glabrata</i> and <i>C. krusei</i> , ainsi que <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , et <i>Cryptococcus neoformans</i>

2.2.2 Les antifongiques agissants sur la synthèse de la paroi

La paroi cellulaire fongique est une structure essentielle avec une grande plasticité qui est vitale pour maintenir l'intégrité et la viabilité cellulaires. La paroi cellulaire joue un rôle important dans différentes fonctions biologiques telles que le contrôle de la perméabilité cellulaire et la protection de la cellule contre le stress osmotique et mécanique (**Garcia-Rubio et al., 2020**). Le glucane est un composant majeur de la paroi cellulaire fongique et représente 50 à 60 % du poids sec de cette structure. Sa synthèse est une cible pour les composés d'échinocandines (**Gow, Latgeet Munro, 2017**).

2.2.2.1. Les échinocandines

Sont des lipopeptides cycliques isolée pour la première fois d'une culture d'*Aspergillus sp* en 1974(**Denning, 1997**). Ils inhibent la synthèse de la paroi fongique. Qui est présente chez la plupart des champignons pathogènes mais est inexistante chez les cellules des mammifères. Plus précisément, les échinocandines inhibent de façon non compétitive la (1,3)- β -D-glucane synthétase, un complexe enzymatique nécessaire à la formation des polymères de glucane au sein de la paroi fongique. Elles empêchent ainsi l'incorporation des glucanes et des protéines associées aux glucanes dans la paroi fongique (**Lacroix, Dubach et Feuilhade, 2003**). La cible des échinocandines n'existent pas dans les cellules des humains, leur toxicité est donc minime (**Kathiravan et al., 2012**).

La caspofungine est dérivée d'un sous-produit fermenté par *Glearea lozoyensis*. C'est le premier des échinocandines approuvé pour l'utilisation clinique(**Park, Shin et Kang, 2017**). Il est actif contre une grande variété de pathogènes fongiques, y compris *Candida*, *Pneumocystis*, *Aspergillus* et *Histoplasma spp*. La caspofungine a montré une efficacité thérapeutique supérieure contre les infections à *Candida* par rapport à l'amphotéricine B chez les patients immunodéprimés. La caspofungine est particulièrement importante, chez les patients qui ont des infections fongiques systémiques potentiellement mortelles qui ne peuvent pas tolérer l'amphotéricine B ou le traitement azolé ; il est généralement bien toléré lorsqu'il est administré par voie intraveineuse (**Leroy et Ajana, 2004**).

2.2.3. Les antifongiques agissants sur les acides nucléiques

Plusieurs composés bien caractérisés sont connus pour inhiber ou altérer certaines fonctions enzymatiques dans la transcription d'ADN conduisant à des erreurs dans la séquence d'ARN

qui peuvent à leur tour provoquer une production des protéines mal fonctionnelles. Parmi les composées les plus étudiées ceux qui appartiennent à la classe des flucytosines :

La flucytosine ; est un antimétabolite qui pénètre dans les cellules fongiques via la cytosine perméase, où il est converti intracellulairement en fluorouracile (5-FU), qui agit comme un faux nucléoside, inhibant la synthèse de l'ADN et de l'ARN (**Harvey et al., 2009 ; Wu et al., 2004**).

La flucytosine a un spectre d'activité étroit, il est plus efficace contre *Candida* et *Cryptococcus*. (**Shalini et al., 2011**).

La flucytosine est utilisée en association, surtout avec l'AmpB pour éviter le développement de résistance pendant le traitement (**Pappas et al., 2009**).

2.3. Les antifongiques produits par les streptomyces

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

Ces substances antifongiques proviennent de deux sources : ce sont des métabolites secondaires de divers micro-organismes ou produites chimiques synthétiques. Les antifongiques d'origine microbienne utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polygénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (Bastide et al., 1986). Près de la moitié des substances antifongiques naturelles sont synthétisées par les actinomycètes, en particulier le streptomyces qui est le genre le plus largement répandu dans l'environnement (Badji et al., 2005).

2.3. Résistance aux antifongiques

Malgré les recherches approfondies, l'arsenal thérapeutique disponible contre les maladies fongiques est limité, et comme les bactéries, certains champignons développent également une résistance contre les agents antifongiques. Ainsi, l'émergence de la résistance aux antifongiques a devenu un problème majeur dans la prise en charge des mycoses systémiques ou invasives. Bien que la résistance aux antibiotiques soit largement connue pour les personnels de santé publique, les informations sur la résistance aux antifongiques sont plutôt limitées (**Ben-Ami et Kontoyiannis**).

Il y a quelques mécanismes par lesquels les champignons deviennent résistants :

- La surexpression des protéines appelés « pompes » ou « protéines d'efflux », conduit à la diminution de la concentration intracellulaire d'antifongique et donc moindre efficacité

Par exemple le changement structural des pompes de type ABC (ATP-Binding Cassette) chez certaines souches résistantes de *Candida albicans* est responsable de leur résistance aux antifongiques azolés (**White, 2002**).

-modification de la cible. Exemple : Les altérations des stérols de la membrane cellulaire fongique qui pourraient être liées à des mutations sur le gène ERG2 ou ERG3 (démonstré chez *Candida*) ; Cause une diminution de l'accessibilité de la membrane, par modification de la structure de la paroi fongique (**Nagoba et al., 2013**).

- modification des voies métaboliques : Dans certains cas, les levures peuvent modifier à leur avantage la biosynthèse de métabolites autrement toxiques dérivés de leur exposition à des agents antifongiques.

Le développement de la résistance aux azolés par des mutations dans ERG3 codant pour la stérol 5,6 désaturase est un exemple de ce principe. S'il est actif, ERG3 convertit les stérols 14 α -méthylés en dérivés toxiques du 3,6-diol. Les cellules fongiques incapables de produire ce métabolite toxique acquièrent une résistance à l'azole (**Kelly et al., 1995**).

- résistance par la présence de structures multicellulaires complexes (biofilms) : la capacité à former des biofilms limitent le passage de l'antifongique à l'intérieur de la cellule. Les biofilms sont formés par plusieurs espèces fongiques, notamment *Candida* et *Aspergillus*. Une caractéristique remarquable des biofilms est leur résistance à de nombreux agents antifongiques non apparentés, à l'exception de la caspofongine (**Ramage et al., 2002**).

Partie

Expérimentale

I. Matériels et méthodes

1. Objectif de travail

Ce projet de mémoire consiste à étudier les caractères phénotypiques des isolats d'actinomycètes en particulier les caractères macromorphologiques et micro- morphologiques.

Nous avons étudié aussi certains caractères physiologiques qui consistent à cultiver nos isolats dans différentes températures, différents degrés de PH, et différents concentration en chlorure de sodium

L'objectif principal de notre travail, est à la production et l'extraction des molécules bioactives à partir des souches des actinobactéries « *Streptomyces* », ensuite tester leurs activités par la technique des disques de diffusion vis-à-vis des champignons filamenteux et des levures.

2. Cadre d'étude

Notre partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de microbiologie du département de biologie appliquée, Université Larbi Tebessi de Tébessa, durant une période allant du 17 novembre 2021 jusqu'au 1juin 2022.

3. Matériels utilisées

3.1 Matériels non-biologique

3.1.1 Grands matériels

- Bain marie
- Autoclave
- Balance
- Etuves
- Hotte bactériologique
- Loupe binoculaire
- Microscope optique
- Plaque chauffante
- Réfrigérateur
- Table à niveau
- Vortex
- Rhotavapeur (évaporateur rotatif)

3.1.2 Petits matériels

- Anse de platine
- Barreaux magnétique
- Bec bunsen
- Boites de Pétri
- Bistouri
- Portoirs
- Entonnoir
- Film photographique
- Plaque CCM
- Lames et lamelles
- Micropipettes
- Papier watman n°1
- Picette
- Pipettes Pasteur
- Spatule
- Verreries : béchers gradués, éprouvettes graduées, tubes à essai stériles, les flacons, et leserlenmeyers

3.2. Matériels biologiques

Les 10 isolats d'Actinomycètes qui appartiennent au genre *Streptomyces* proviennent d'une collection de souches d'actinomycètes isolées à partir d'un système lacustre (**Benhadj et al., 2018**)

Chacune avait un code selon le tableau suivant :

Tableau 06 : les codes des souches d'actinomycètes

Souche	Code
S1	ACT 170
S2	ACT97
S3	ACT368
S4	ACT130
S5	ACT158
S6	ACT299
S7	ACT406
S8	ACT316
S9	ACT292
S10	ACT257

3.2.1 Les champignons filamenteux sous les codes :

- *Fusarium* (F.Fso)
- *Lichteimia* (FST87)
- *Lomentospora* (FST67)
- *Aspergillus*(F.AScal)
- *Fusarium* (F.Foxy)
- *Aspergillus* (F.ASfu)
- *Rhizopus* (F.RHroy)
- *Paecilomyces*(F.PAlil)
- *Aspergillus* (F.ASfl)
- *Scopulariopsis* (ICF57)
- *Penicillium*(ICF 59)

- ICF 53 PB
- *Paecilomyces* (F.PAvar)

3.2.2 Les levures sont représentées par les codes suivants :

- *Candida*(L20)
- *Sacharomyces* (L43)
- *Candida*(L44)
- *Candida* (L23)
- *Rhodotorula*(LRm)
- *Candida* (LCk)

3.3 Les milieux de cultures

- GYEA
- ISP1,ISP2,ISP3,ISP4,ISP5,ISP6.
- ISP2 molle
- Sabouraud solide
- Sabouraud liquide
- ISP2 liquide

3.4 Les solutions

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

3.5 Les solvants

- Éthanol
- Méthanol
- n-butanol

- Hexane
- Dichlorométhane
- Chloroforme
- Acétate d'éthyle
- Acétone
- DMSO

4. Méthode de Travail

4.1. Origine des souches

Les dix isolats d'Actinomycètes proviennent d'une collection de souches d'Actinomycètes du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Badji Mokhtar Annaba.

4.2. Repiquage et purification des isolats d'actinomycètes

La première étape dans notre travail est la purification des souches d'actinomycètes étudiées. Cette étape est très essentielle, elle permet de donner des colonies isolés et pure. Le repiquage des souches se fait par la méthode d'ensemencement par stries d'épuisement dans des boîtes Pétri contenant le milieu ISP2, ces boîtes sont incubées à une température de 30°C pendant 7 jours, car les actinomycètes ont une croissance lente (**Eriskon, 1949**).

4.3. Etude des caractères morphologiques

L'étude des caractères morphologiques des souches d'actinomycètes est basée sur les caractères culturels des colonies (croissance, couleur du mycélium aérien et de substrat) et de la forme et de la taille des spores.

4.3.1. Etude des caractères macromorphologiques

Cette étude repose sur l'observation de la croissance et de la couleur des mycéliums aérien et du substrat ainsi que les pigments diffusibles. Les caractéristiques culturelles des colonies sont notées après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30°C sur les milieux ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 recommandés par (**Shirling et Gottlieb ,1966**). ainsi que sur le milieu GYEA. La composition des milieux est donnée en annexe.

4.3.2. Etude des caractères micromorphologiques

Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram, qui a été mise au point en 1884 par un bactériologiste Danois Hans Christian Gram

Cette étude consiste à noter et étudier l'aspect microscopique de nos isolats, après 10 à 20 jours d'incubation à 30°C par l'observation microscopique de l'état frais et la coloration du Gram

4.3.2.1. Préparation d'état frais

Il permet l'étude microscopique des Bactéries vivantes, en absence de toute fixation ou coloration.

Tous les isolats ont été ensemencé sur le milieu GYEA et incubés à 30°C pendant 14 à 21 jours jusqu'à la sporulation des souches après elles ont examinés directement sous un microscope optique sans réalisation d'un frottis

Cette étude nous a permet d'observer :

- La morphologie des bactéries
- Morphologie des spores
- Le mode de groupement des spores

4.3.2.2 Coloration de Gram

Sur des lames en vers propre et désinfectées avec de l'éthanol, on a préparé des frottis à partir des souches isolées, les frottis sont fixés par la chaleur en passant, par mouvements rapides, trois à quatre fois sur la flamme de bec Bunsen.

La coloration de Gram a été effectuée selon la méthode classique ; dont les étapes sont les suivantes :

- Préparer le frottis.
- Fixer les frottis a la chaleur.
- Recouvrir la lame de violet de Gentiane pendant 1 minute, laver a l'eau distillée.
- Recouvrir de lugol pendant 1 minute.
- Décolorera l'alcool puis laver a l'eau.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée pendant 30 secondes puis lave a l'eau.
- Sécher entre deux feuillets de papier buvard.
- Observer sous objectif a immersion (X100) d'un microscope optique (**Prescott et al., (2010).**

À partir de cet examen, nous pouvons déterminer quelques caractères morphologiques des actinomycètes, concernant le type de Gram et les indications sur leurs formes (forme des filament) et la présence ou l'absence de spores isolées (**Williams et al., 1983).**

4.4. Etude des caractères physiologiques

4.4.1. Croissance à différentes températures

Afin de déterminer la température optimale et d'évaluer la croissance des *Streptomyces* sur différentes températures, les souches sont ensemencées sur milieu ISP2, les boîtes sont incubées pendant 21 jours à différentes températures (4, 25, 30, 37 et 42, °C). qui permet une bonne croissance est notée (Smaoui., 2010).

4.4.2. Croissance à différents pH

Ce test est réalisé sur milieu ISP2 ajusté à différentes pH (3, 5, 7, 9 et 10) par des solutions de NaOH et HCl avant autoclavage, la croissance est estimée pendant 21 jours d'incubation à 30°C. (Mckinney,2004).

4.4.3 Tolérance au Chlorure de sodium

Ce test est réalisé sur milieu ISP2 additionné de NaCl pour obtenir des concentrations, de (0, 2.5, 5, 7, et 10%). Après ensemencement les boîtes sont incubées à 30°C pendant 21 jours. (Boucheffa.,2010).

4.5. Extraction des molécules bioactives

Pour réaliser l'étape de l'extraction, nous avons choisis des solvants caractérisés par différentes polarités, cela nous permet d'obtenir le plus grand nombre possible des molécules bioactives produites par les actinomycètes. Les solvants utilisés sont : éthanol, méthanol, n-butanol, hexane, chloroforme, dichlorométhane, acétate d'éthyle et acétone.

Avant l'étape de l'extraction nous avons sélectionner les souches les plus actives avec le meilleur jour et aussi déterminer le meilleur milieu de production des molécules antifongiques basant sur les résultats des études précédentes faites sur les mêmes souches (Khelalfa et al., 2020).

Les différentes souches étudiées sont ensemencées en stries très serrées a la surface de milieu(GYEA). Coulé dans des boîtes de pétri de 9cm de diamètre, après l'incubation de 10 jours à 30°C le milieu contenu dans une seule boîte est découpé en petits cubes lesquels sont placées dans des erlenmeyers, contenant 40ml d'un des solvants organique (éthanol, méthanol, butanol ,hexane, chloroforme,dichlorométhane, acétate d'éthyle ,acétone).l'extraction est

effectuée sous agitation pendant deux heures. L'extrait organique obtenu est filtré puis évaporé sous vide à 39°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. (Barry *et al.*, 1970).

Le résidu sec (les extraits brutes) sont ensuite récupérés à l'aide d'une micropipette et dilués resuspendue dans 5 ml de méthanol absolu et le deuxième résidu de ces extraits sont resuspendue dans 1ml DMSO a 10% (Suthinan *et al.*,2009). Pour chaque solvant et sont stockés dans des Eppendorfs stérile à 4°C pour les utiliser dans le test d'activité antifongique.

4.5.1 Préparation des inocula des fungi tests

4.5.1.1 Préparation de l'inoculum des levures

On a réalisé une suspension en milieux sabouraud liquide à partir de culture de 72 h à 25°C sur milieux sabouraud , les souches indicatrice (les levures) sont inoculées dans des tube contenant 30 ml du milieu sabouraud liquide et agitées avec un vortex, les tubes sont incubées à 25°C pendant 48h.

4.5.1.2 préparation des suspensions des champignons filamenteux

Les champignons filamenteux sont repiqués sur milieu Sabouraud puis incubés à 25°C pendant 3 jours. Une suspension de spores et de fragments mycéliens est Préparée pour le test d'activité.

4.6 Recherche de l'activité des extraits

4.6.1 Méthode des disques

La recherche de l'activité des extraits issus de chaque solvant a été réalisée par la méthode des disques. Des disques de papier Whatman N°1 (6mm de diamètre) stériles sont déposés sur la gélose ISP2 molle préalablementensemencé par les levure-tests et sur le milieu ISP2 molle préalablementensemencé dans la masse par les champignons filamenteux-tests. Les disques sont ensuite imbibés par 30µl des différents extraits organiques. Les boîtes 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).

4.7. L'activité antifongique contre les champignons filamenteux et les levures

4.7.1. Technique de la double couche

Le test d'activité a été réalisé selon la technique de la double couche (**Vidaver et al.,1972**). La souche d'actinomycète à tester estensemencée au centre de gélose ISP2 coulée en boîte de pétrie. L'incubation se fait à 30°C pendant 10 jours. 1 ml de la suspension des souches cibles estensemencé en masse dans 10 ml de milieu semi solide de ISP2 molle Après agitation, le milieu est coulé en double couche sur la gélose ISP2 renfermant la souche d'actinomycète. L'incubation se fait à 30 °C pendant 24 à 48h pour les levures et les moisissures. Le résultat positif se traduit par absence de croissance de la souche test autour de la colonie des actinomycètes.

4.8 Test d'Antibiographie

4.8.1 Chromatographie sur gel de silice (sur couche mince)

Sur des plaques de gel de silice des dépôts de 5µl de chaque extrait (les extraits ayant la meilleure activité antifongique) sont déposés sous forme de spots à 1cm du bord inférieur de la plaque à l'aide d'une microsiringue ou d'une micropipette, après séchage à l'air libre, différents systèmes de solvants ont été utilisés (**Bétina, 1965**) :

- Le système **BAE** : n-butanol - acide acétique -eau (3,1,1,v\v)
- Le système **AM** : acétate d'éthyle-méthanole (10/15 v\v)
- Le système **EAE** : éthanol - ammoniac - eau (8, 1,1v\v)
- Le système **ME** : méthanole - eau (7:4 v\v)

Les plaques sont installées dans les solvants et les molécules commencent la migration, les plaques sont retirées des cuves avant que les extraits migrent vers la ligne du bord supérieur, les plaques sont ensuite séchées sous hotte pour éliminer tous les traces des solvants. Et visualisés sous une lampe à UV. Après cette étape le rapport frontale (RF) pourrait être calculé en divisant la distance de migration (en cm) des composés bioactifs sur la distance parcourue par le solvant (en cm).

4.8.2 Révélations chimiques des substances actives

Des réactions chromogéniques sont effectuées sur des plaques de gel de silice, pour avoir une idée sur la nature chimique des molécules présentes.

Les révélateurs chimiques utilisés sont les suivants (**Merk ,1975**) :

- Ninhydrine : Révélateur des fonction amines
- Formaldéhyde-acide sulfurique : révélateur des aromatiques polycycliques.

Après le séchage les plaques sont observés à l'œil nu puis sous UV.

4.8.3 Bioautographie des molécules Bioactives

Après le test des extraits par la chromatographie sur gel de silice, les systèmes qui ont montré la plus longue distance de migration entre les taches sont utilisés pour la révélation microbiologique, les plaques sont recouvertes par la gélose ISP2 molleensemencé avec la souche cible. elles sont incubées par la suite à 30°C pendant 48h, les zones d'inhibition appariaient après cette période.(**Betina , V.,1973**).

II. Résultats et discussion

1. Repiquage et vérification de la pureté des isolats

Les conditions culturales des actinobactéries (températures favorables, milieu non sélectif pour les bactéries), sont des facteurs qui augmentent la chance d'apparition des contaminants dans la culture des bactéries. Pour cette raison la purification est une étape essentielle avant toute initiation d'un travail d'étude.

Le repiquage successif des différents isolats d'actinomycètes sur le milieu ISP2 nous a permis d'obtenir des cultures pures caractérisés par des colonies homogènes qui partagent le même aspect morphologique : des colonies compactes, dures et fortement adhérentes au gélose, d'une taille moyenne de 1 à 7 mm, d'une forme ronde ou irrégulière et une texture poudreuse causé par la sporulation de mycélium aérien), les résultats sont présentés dans le **Tableau 07**

Les résultats montrent aussi que le milieu ISP2 donne une bonne croissance et permet la sporulation de tous les isolats (**Planche 01**), cela peut être expliqué par la richesse de ce milieu en substrats carbonés et azotés (extrait de levure, extrait de malt, glucose) qui sont des facteurs essentiels pour le développement des bactéries.

Tableau 07 : Résultats de repiquage et vérification de la pureté des isolats

souche	Diamètre des colonies	Couleur de mycélium aérien	Aspect des colonies
ACT 158	1mm - 5mm	gris à beige	Colonies légèrement surélevés, contour irrégulier, une surface rugueuse et consistance sèche.
ACT 406	1mm – 7mm	grisâtre	Colonies aplatés de forme irrégulière avec un centre légèrement surélevé et des bords ondulés.
ACT 316	1mm – 5mm	gris clair	Colonies bombés ont une forme irrégulière déchiquetés avec un aspect poudreux.
ACT 368	1mm - 4mm	grisâtre	Colonies aplatés irrégulières avec un centre bosselé et des bords dentelés.
ACT 257	1mm – 5mm	grisâtre	Colonies bombés irrégulières ont une surface rugueuse, un aspect poudreux et un centre bosselé.
ACT 97	2mm – 6mm	gris clair	Colonies surélevés avec un contour irrégulier, un centre parfois ombiliqué et un aspect poudreux.
ACT 170	1mm – 4mm	grisâtre	Colonies d’une forme irrégulière demi-bombés à centre ombiliqué, aspect rugueux et des bords dentelés.
ACT 292	1mm - 6mm	gris clair	Colonies aplatés à centre parfois ombiliqués, avec des bords réguliers et un aspect poudreux
ACT 359	1mm – 3mm	blanchâtre	Colonies rondes surélevés de forme régulière et aspect rugueux.
ACT 299	2mm – 5 mm	gris foncé	Colonies légèrement surélevés, avec un centre ombiliqué et des bords dentelés et un aspect rugueux.

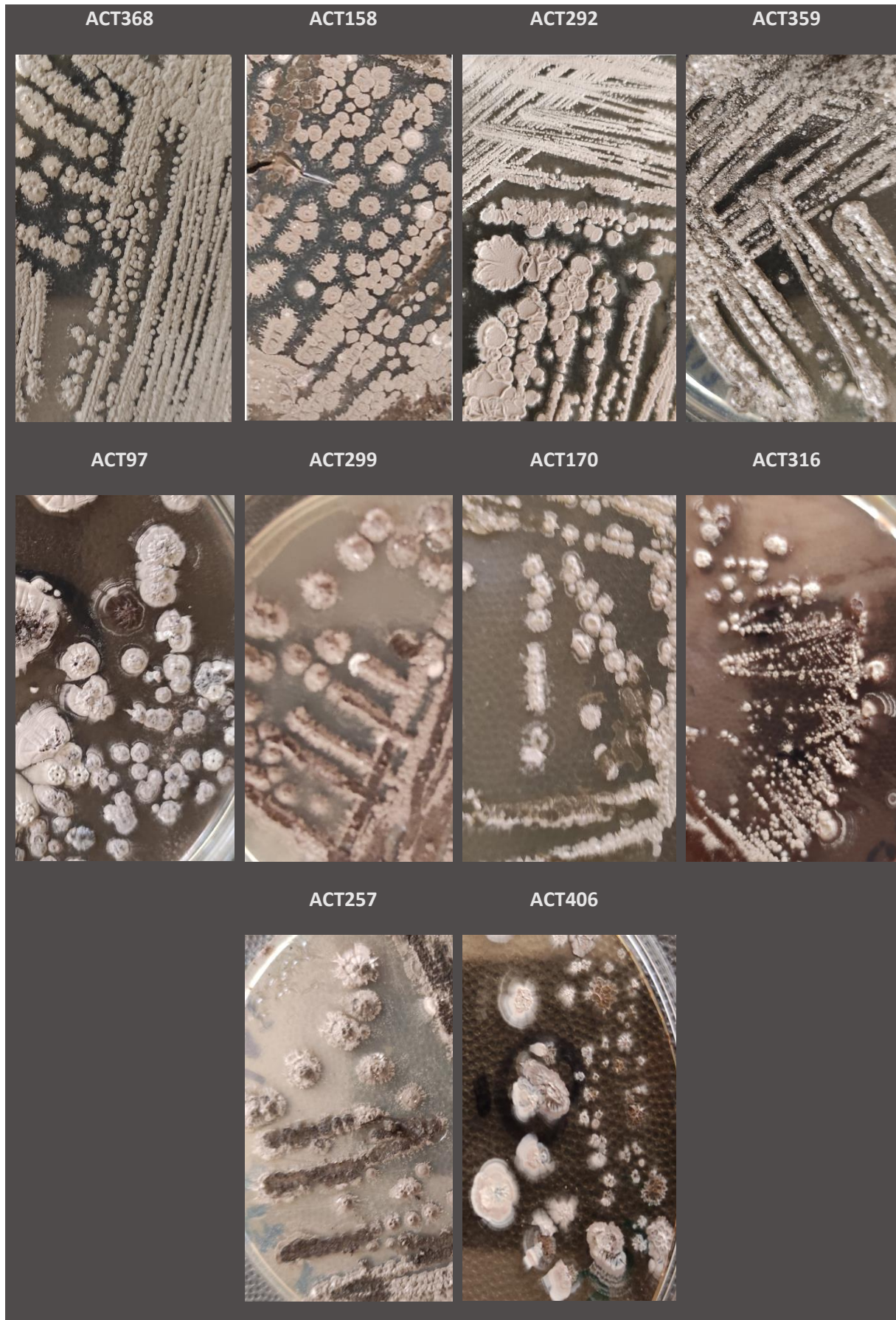


Planche 01 : Photos représentant les caractères cultureux des isolats sur le milieu ISP₂

2. Étude des caractères morphologiques

L'étude des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques) des isolats d'actinobactéries est largement utilisée pour caractériser les genres d'actinobactéries. Selon **Shirling et Gottlieb, 1966**, l'identification des actinobactéries repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Grace aux caractéristiques morphologiques, certains genres d'actinobactéries (*Streptomyces*, *Micromonospora*, *Micobispora...*etc) peuvent être identifiés avec un important degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinoinmadura...*etc).

2.1. Étude microscopique

2.1.1 Coloration de Gram

Les résultats de coloration de Gram reflètent la composition chimique de la paroi des bactéries et permet de les classer en bactérie à Gram positif ou négatif pour les actinomycètes particulièrement elle permet d'apprécier un certain nombre de caractères tels que l'aspect des filaments et l'agencement des spores ce qui contribuent à l'identification des actinomycètes.

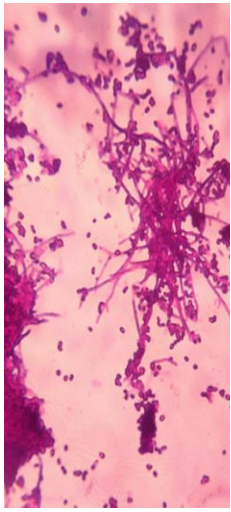
Les frottis bactériens des 10 isolats colorés par la coloration de Gram et observé sous microscope optique à l'objectif (Gr x 100) ont montré que la totalité des isolats sont des bactéries filamenteuses à Gram positif, ayant des formes similaires aux actinobactéries.

Les résultats de coloration de Gram sont représentés dans le **Tableau 08**.

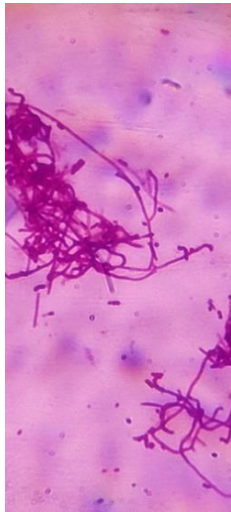
Tableau 08 : Résultats de coloration de Gram des 10 isolats

Souche	Gram	Observation microscopique
ACT 158	+	filaments longs très enchevêtrées avec des spores isolées
ACT 406	+	filaments courtes épaisses avec des spores isolées dispersés
ACT 316	+	filaments longs droites avec des spores regroupées en amas
ACT 368	+	filaments longs fines enchevêtrées avec des spores isolées
ACT 257	+	filaments longs fines, enchevêtrées avec des spores dispersées
ACT 97	+	filaments courtes spirales avec des chaînes de spores dispersés dans le champ
ACT 170	+	filaments longs, fines, avec des spores regroupées en amas
ACT 292	+	filaments courtes, épaisses, recouverts par des spores
ACT 359	+	filaments longs, fines, avec des spores isolés ou regroupés en petites chaînes
ACT 299	+	filaments longs très fines avec des spores isolées

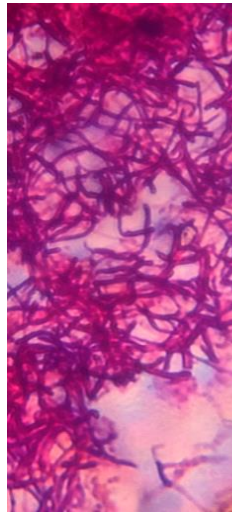
ACT368



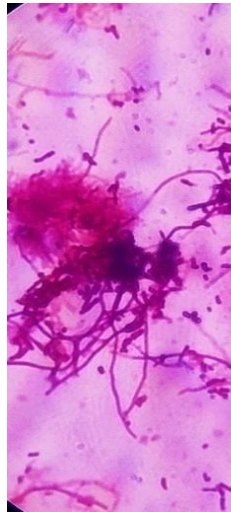
ACT257



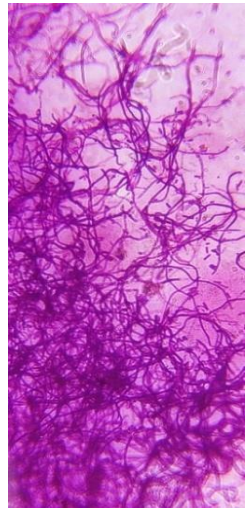
ACT406



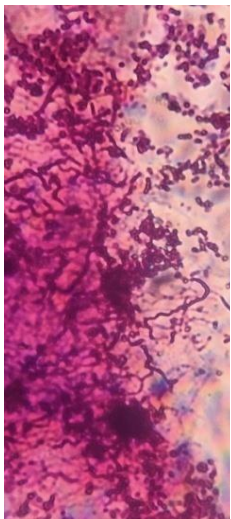
ACT359



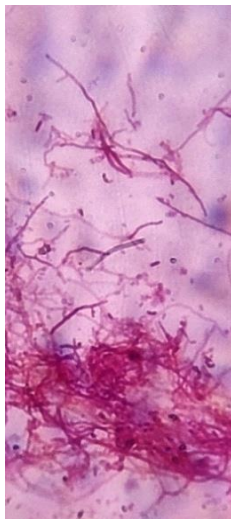
ACT158



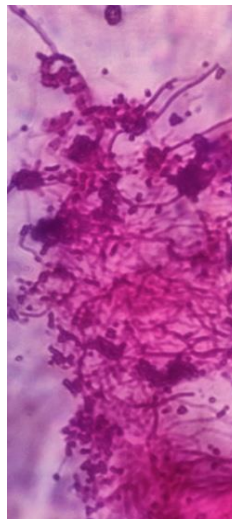
ACT97



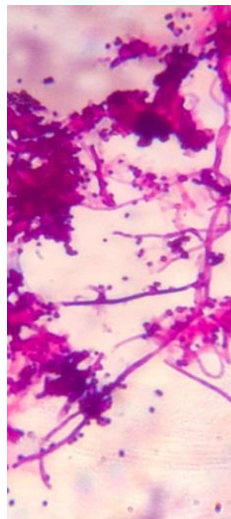
ACT299



ACT170



ACT316



ACT292

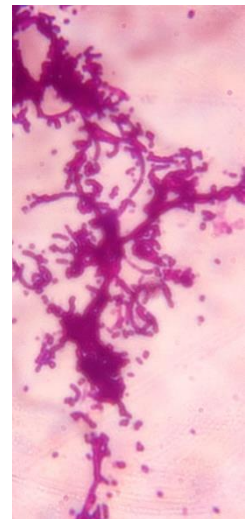


Planche 02 : Observation microscopique de la Coloration de Gram de toutes les souches d'actinomycètes Gx100

2.1.2 État frais

Les isolats ensemencés sur le milieu GYEA présentant une bonne croissance et sporulation sont observés sous un microscope optique ou grossissement (X40 et X100) après 21 jours d'incubation à 30 °C.

Les observations microscopiques sont représentées par **les Figures 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13.**

Les mycéliums aériens et de substrat sont très évolués complexes et persistants, le mycélium de substrat se présente sous forme de longs filaments ramifiées dépourvus de septum (**Erikson, 1949**).

Après 21 jours toutes les souches à l'exception des souches ACT406, ACT 170 et ACT 299 développent un mycélium aérien. Ce mycélium est épais plus foncé et moins ramifié que le mycélium de substrat. Il est peu abondant pour la souche ACT 316 et très abondant pour les souches ACT368, ACT257, ACT97 et ACT292

Les isolats présentent des caractéristiques microscopiques différentes : chez les souches (ACT 158, ACT 316, ACT 368, ACT 257, ACT 97, ACT 292) le mycélium aérien est constitué de filaments ramifiés qui se fragmentent de manière anarchique en donnant des chaînes de spores compactes irrégulières qui présentent 2 à 4 tours (**shirling et Gottlieb ; 1966**) les chaînes de spores prennent souvent une forme RF : *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à fluxeuses) à RA : *Ritinaculum Apertum* (chaînes en crochet ou en boucles), S : *Spira* (chaînes spiralées). Le mycélium aérien de ces souches est illustré par les figures 06, 09, 10, 12.

Par ailleurs, selon les caractéristiques morphologiques des isolats on peut confirmer leur appartenance au genre *Streptomyces*.

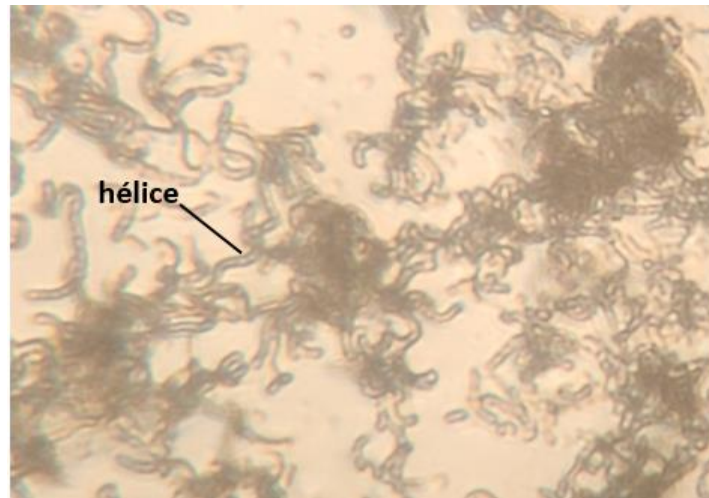


Figure 06 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act 158 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).

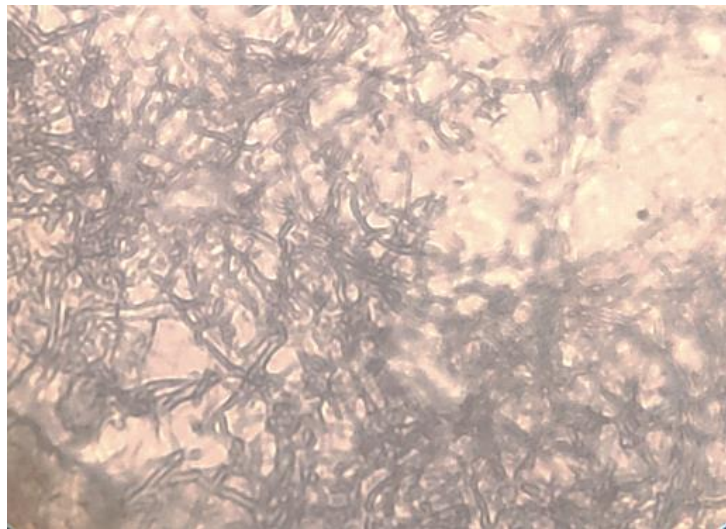


Figure 07 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act 406 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).

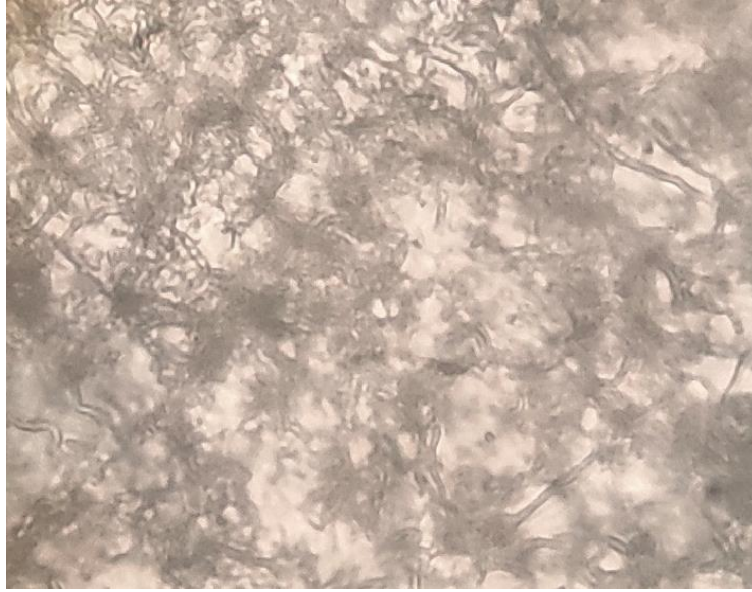


Figure 08 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act316 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).

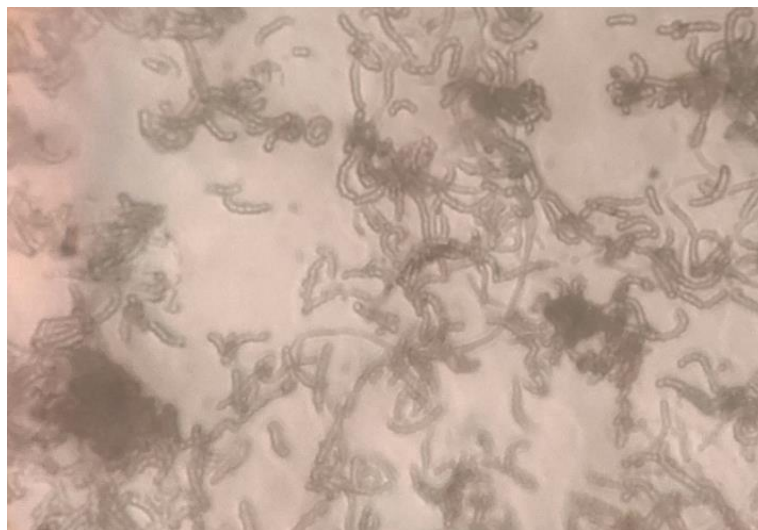


Figure 09 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act368 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).

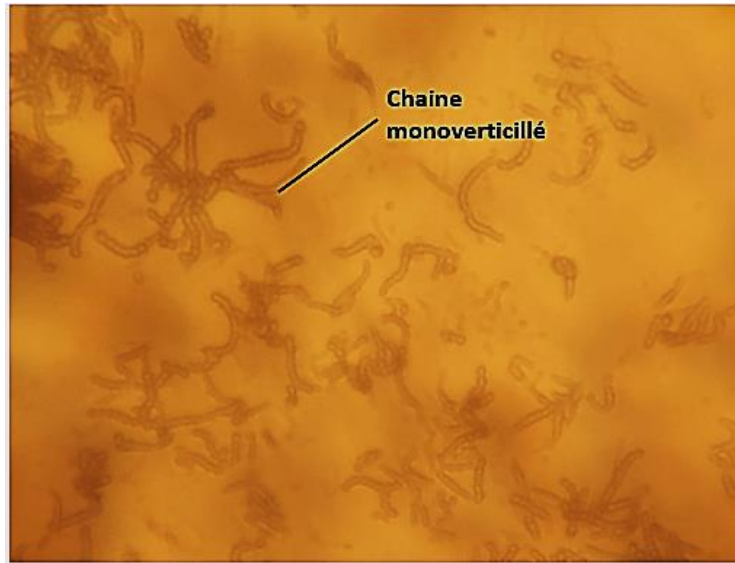


Figure 10 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act257 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).

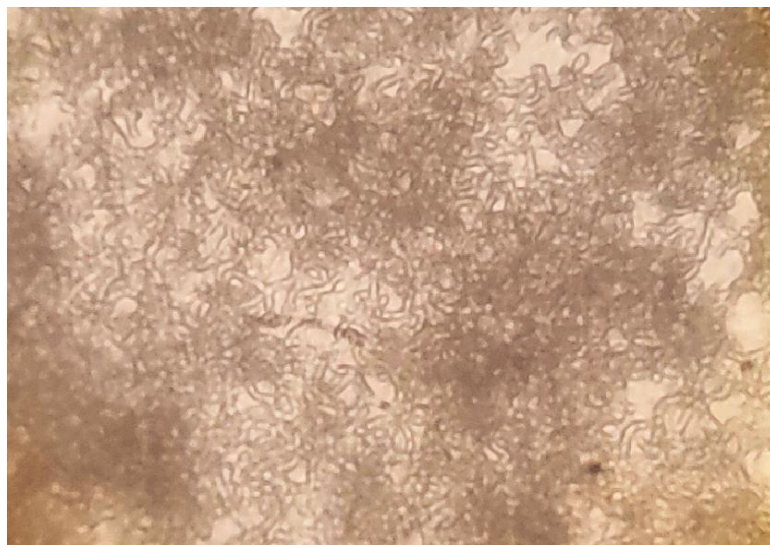


Figure 11 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act97 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).



Figure 12 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act292 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).

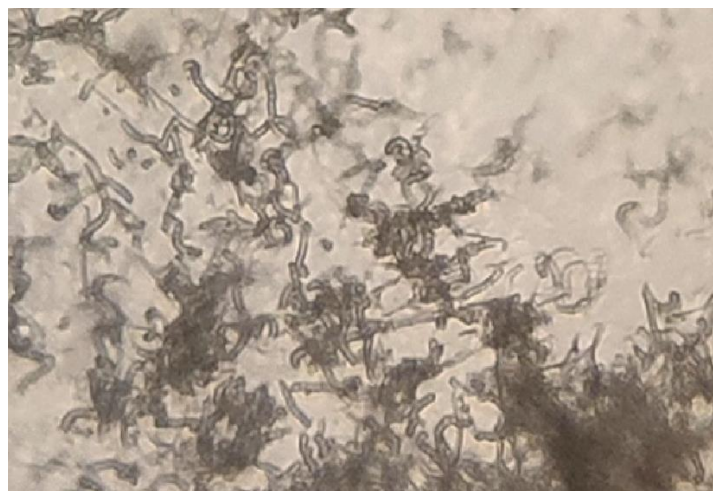


Figure 13 : micromorphologie du mycélium aérien de la souche Act359 sur le milieu GYEA observé au microscope optique (Gr.x100).

2.2 Etude macromorphologique

Les observations rassemblées dans le **Tableau 09** et la **planche 03**, montrent l'aspect macroscopique des souches pures, ceci par rapport au milieu de culture.

Tableau 09 : aspect macroscopique des souches sur différents milieux de culture.

Souche	Milieu	Croissance	MS	MA	P
158	ISP1	++	beige	blanchâtre	-
	ISP2	+++	beige clair	gris à blanc	-
	ISP3	++	jaune clair	grisâtre	-
	ISP4	++	beige	grisâtre	-
	ISP5	++	beige foncé	blanchâtre	-
	ISP6	++	beige foncé	noirâtre	-
	GYEA	++	jaunâtre	grisâtre	-
170	ISP1	++	brun jaunâtre	incolore	-
	ISP2	+++	beige claire	blanchâtre	-
	ISP3	+++	incolore	incolore	-
	ISP4	+++	beige pale	incolore/ blanc	-
	ISP5	++	beige pale	incolore	-
	ISP6	++	beige pale	gris clair	-
	GYEA	+++	jaune clair	gris clair	-
368	ISP1	++	jaune clair	blanchâtre	-
	ISP2	+++	vers olive	grisâtre	-
	ISP3	+++	beige clair	grisâtre	-
	ISP4	+++	beige pale	blanchâtre	-
	ISP5	++	brun foncé	blanchâtre	-
	ISP6	++	brun jaunâtre	incolore	-
	GYEA	+++	beige jaune	incolore	-

257	ISP1	++	beige	blanchâtre	-
	ISP2	+++	noirâtre	grisâtre	-
	ISP3	++	jaune grisâtre	grisâtre	-
	ISP4	++	beige	grisâtre	-
	ISP5	+	brun jaunâtre	blanchâtre	-
	ISP6	++	jaune foncé	blanchâtre	-
	GYEA	+++	jaune brunâtre	blanchâtre	-
406	ISP1	++	beige	blanchâtre	-
	ISP2	+++	brun foncé	gris clair	-
	ISP3	+++	beige clair	gris clair	-
	ISP4	+++	beige	gris clair	-
	ISP5	++	brunâtre	blanchâtre	-
	ISP6	++	orange vif	blanchâtre	-
	GYEA	++	beige	blanc grisâtre	-
359	ISP1	++	jaune orangé	incolore	-
	ISP2	+++	beige foncé	gris claire	-
	ISP3	+++	jaune grisâtre	grisâtre	-
	ISP4	++	beige pale	grisâtre	-
	ISP5	++	beige foncé	jaune claire	-
	ISP6	++	Jaune foncé	blanchâtre	-
	GYEA	+++	beige	incolore	-
299	ISP1	++	beige	blanchâtre	-
	ISP2	+++	brunâtre	blanchâtre	-
	ISP3	+++	Jaune grisâtre	grisâtre	-
	ISP4	++	blanc beige	blanchâtre	-
	ISP5	++	beige pale	blanchâtre	-
	ISP6	++	brun jaunâtre	blanchâtre	-

	GYEA	++	beige pale	blanchâtre	-
97	ISP1	++	beige grisâtre	incolore	-
	ISP2	+++	noirâtre	grisâtre	+ brun
	ISP3	++	brun foncé	grisâtre	-
	ISP4	+++	brunâtre	gris clair	-
	ISP5	++	brun foncé	rouge vif	-
	ISP6	++	brun jaunâtre	incolore	-
	GYEA	+++	jaune orangé	blanchâtre	-
316	ISP1	++	beige	blanchâtre	-
	ISP2	+++	rouge vif	grisâtre	+ brun
	ISP3	++	rose clair	gris clair	-
	ISP4	+++	rougeâtre	blanchâtre	-
	ISP5	++	orangé	grisatre	+ orangé
	ISP6	++	beige pale	incolore	-
	GYEA	++	brun foncé	brunâtre	-
292	ISP1	++	beige	blanchâtre	-
	ISP2	+++	brunâtre	grisâtre	-
	ISP3	++	jaune brunâtre	grisâtre	-
	ISP4	+++	grisâtre	grisâtre	-
	ISP5	++	brun jaunâtre	gris clair	-
	ISP6	++	beige	gris clair	-
	GYEA	++	beige	blanchâtre	-

Croissance/ production : +++ bonne, ++ moyenne, + faible, - nulle

La majorité des souches donnent une croissance abondante à modérée sur les différents milieux utilisés, à l'exception de la souche ACT257 qui a donné une faible croissance sur le milieu ISP5.

Les souches peuvent être réparties en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance. Les colonies des souches ACT299, ACT359, ACT368, ACT292, ACT158, ACT406 et ACT170, apparaissent après 1 à 2 jours d'incubation. Les souches à croissance relativement lente sont : ACT316, ACT97 et ACT292, leurs colonies requièrent 2 à 5 jours d'incubation pour apparaître.

Après 7 jours d'incubation, des colonies jeunes sont apparues, de forme ronde, sèches de couleur beige à jaune correspondant au mycélium de substrat. Celui-ci est formé 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. Sur les milieux ISP1, ISP4 et ISP5, un aspect poudreux de couleur blanche à grise est observé dès la première semaine c'est le mycélium aérien, il continue à se développer durant la deuxième semaine. Du 14^{ème} jour jusqu'à le 21^{ème} jour, le mycélium aérien prend progressivement une couleur grise, ce changement correspond à la formation des spores sur les extrémités des hyphes aériens.

L'observation du revers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat. En effet, pour la majorité des souches, ce mycélium est pigmenté soit en jaune, beige ou brun, mais pour la souche ACT316 il présente une grande variété des couleurs, beige, rouge, rose, orangé, brun.

Deux souches de *Streptomyces* sont caractérisées par la production des pigments, la souche ACT97 qui produit un pigment d'une couleur brunâtre sur le milieu ISP2, et la souche ACT316 qui élabore un pigment brun sur le milieu ISP2 et orangé sur le milieu ISP5.

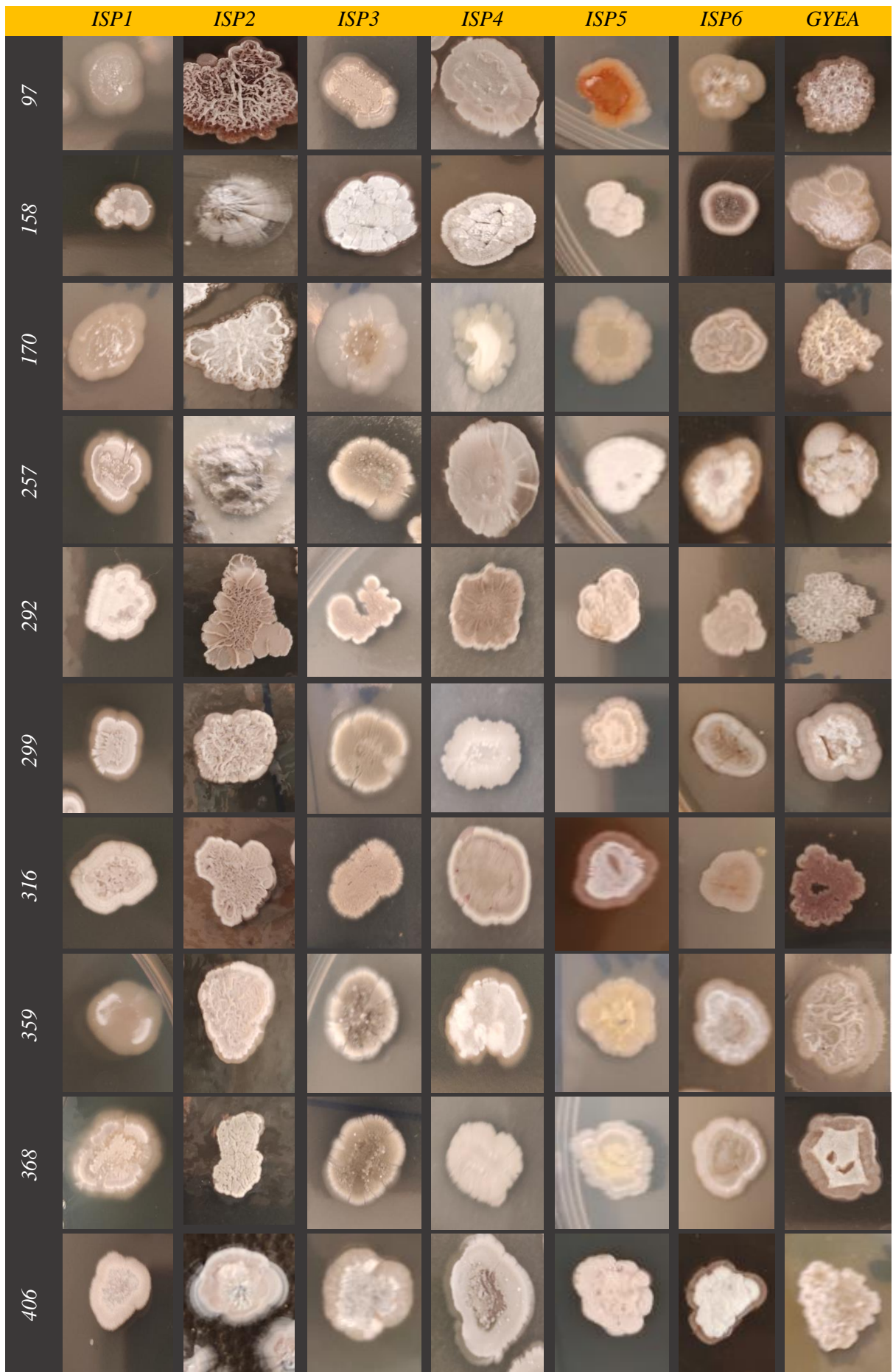


Planche 03 : Photos des caractères cultureux des souches sur les différents milieux.

3. Tests physiologiques

3.1 Tolérance à différentes températures

Les résultats de la croissance à différentes températures des 10 souches de *Streptomyces* étudiés sont résumés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : croissance des souches de *Streptomyces* à différentes températures

souche	4°C	25°C	30°C	37°C	42°C
ACT 158	-	++	+++	++	+
ACT 406	-	++	+++	+++	-
ACT 316	-	++	+++P	+++ P	- P
ACT 368	-	++	+++	+++	+++
ACT 257	-	++	+++	+++	+++
ACT 97	-	++	+++P	+++	+
ACT 170	-	+	+++	++	-
ACT 292	-	++	+++	+	-
ACT 359	-	++	+++	+++	+++
ACT 299	-	++	+++	+++	+++

Pas de croissance (-), croissance faible (+), croissance modéré (++), croissance abondante (+++), Production d'un pigment (P).

D'après les résultats exprimés dans ce tableau, nous avons constaté que toutes les souches croissent dans un intervalle de températures allant de 25°C à 37°C avec une croissance optimale aux températures 30°C et 37°C, ces résultats sont confirmés par le fait que les Actinomycètes sont des mésophiles ayant un optimum de croissance à 30°C (**Goodfellow et Williams, 1983**). Cinq souches ont montré une aptitude à croître à 42°C dont quatre parmi eux avaient une croissance optimale. Il s'agit des souches : ACT 257, ACT 368, ACT 359 et ACT 299. Ainsi on a constaté qu'aucune souche n'a été capable de croître à 4°C.

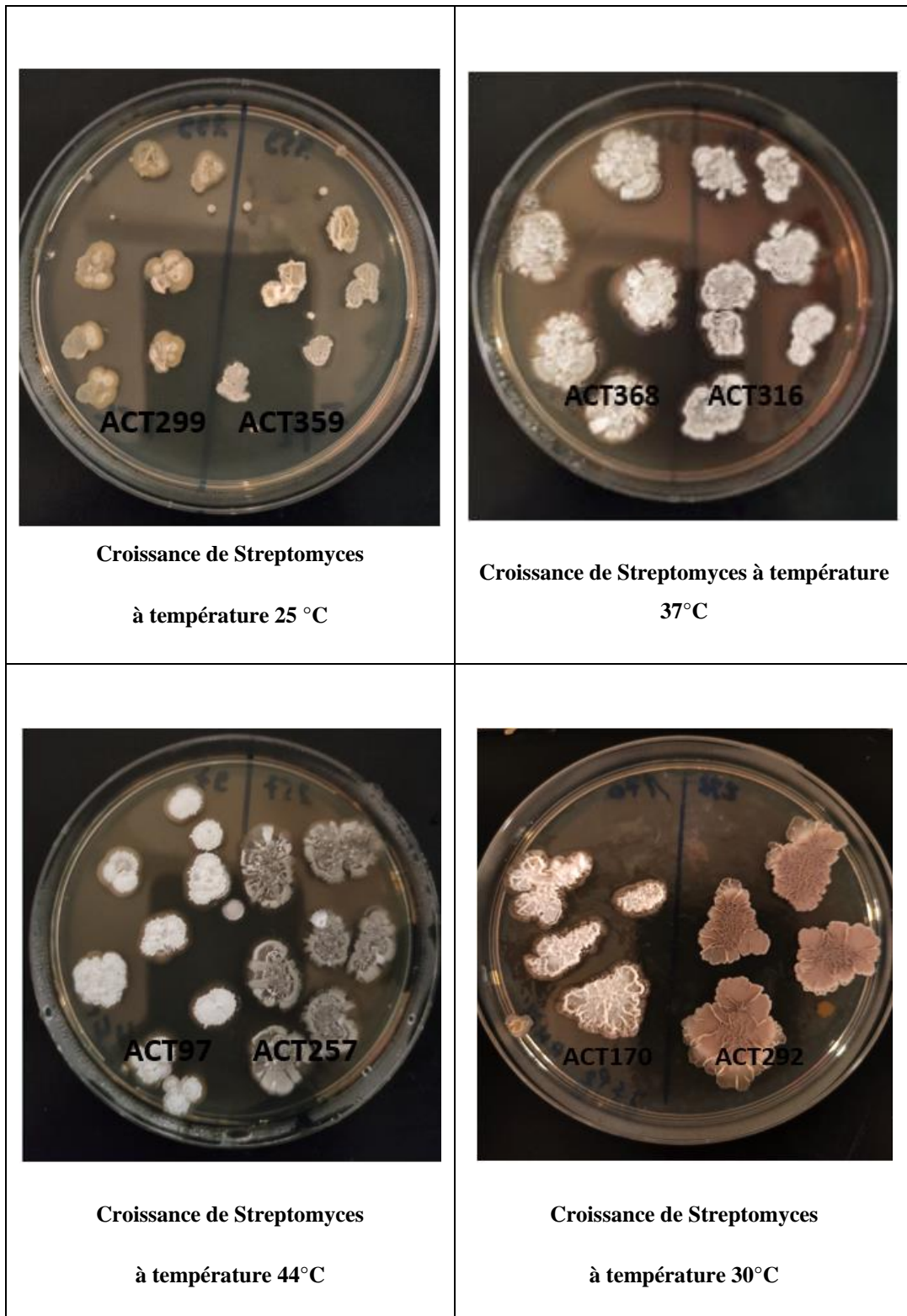


Planche 04 : Photos des résultats du test de tolérance à différentes températures de quelques isolats.

3.2 Tolérance à différentes concentrations de NaCl

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau :

Tableau 11 : croissance des souches de Streptomyces à différentes concentrations de NaCl

souche	0%	2.5%	5%	7%	10%
ACT 158	+++	+	+	-	-
ACT 406	+++	+++	+++	++	-
ACT 316	+++ P	+++	++	++	-
ACT 368	+++	+++	+++	+++	+
ACT 257	+++	+++	+++	++	-
ACT 97	+++ P	+++	++	++	+
ACT 170	+++	+++	++	++	+
ACT 292	+++	+++	++	+	+
ACT 359	+++	+++	+	+	+
ACT 299	+++	+++	++	++	+

Pas de croissance (-), croissance faible (+), croissance modéré (++), croissance abondante (+++), Production d'un pigment (P).

Selon les résultats exprimés dans le **Tableau 11** nous avons remarqués que toutes les souches testées n'exigent pas la présence de NaCl dans le milieu pour croître. Cependant la plupart entre eux ont une croissance optimale ou modéré dans les milieux ayant une concentration en NaCl allant de 2.5% à 7%, elles sont donc des bactéries halotolérantes modérés selon la classification de **Kushner et Kamekura (1988)**.

Il faut noter que nous avons également remarqué l'absence de production de pigments diffusibles par les souches ACT 316 et ACT 97 qui ont été auparavant productrices des pigments rouge et brun sur milieu ISP2 non supplémenté de NaCl.

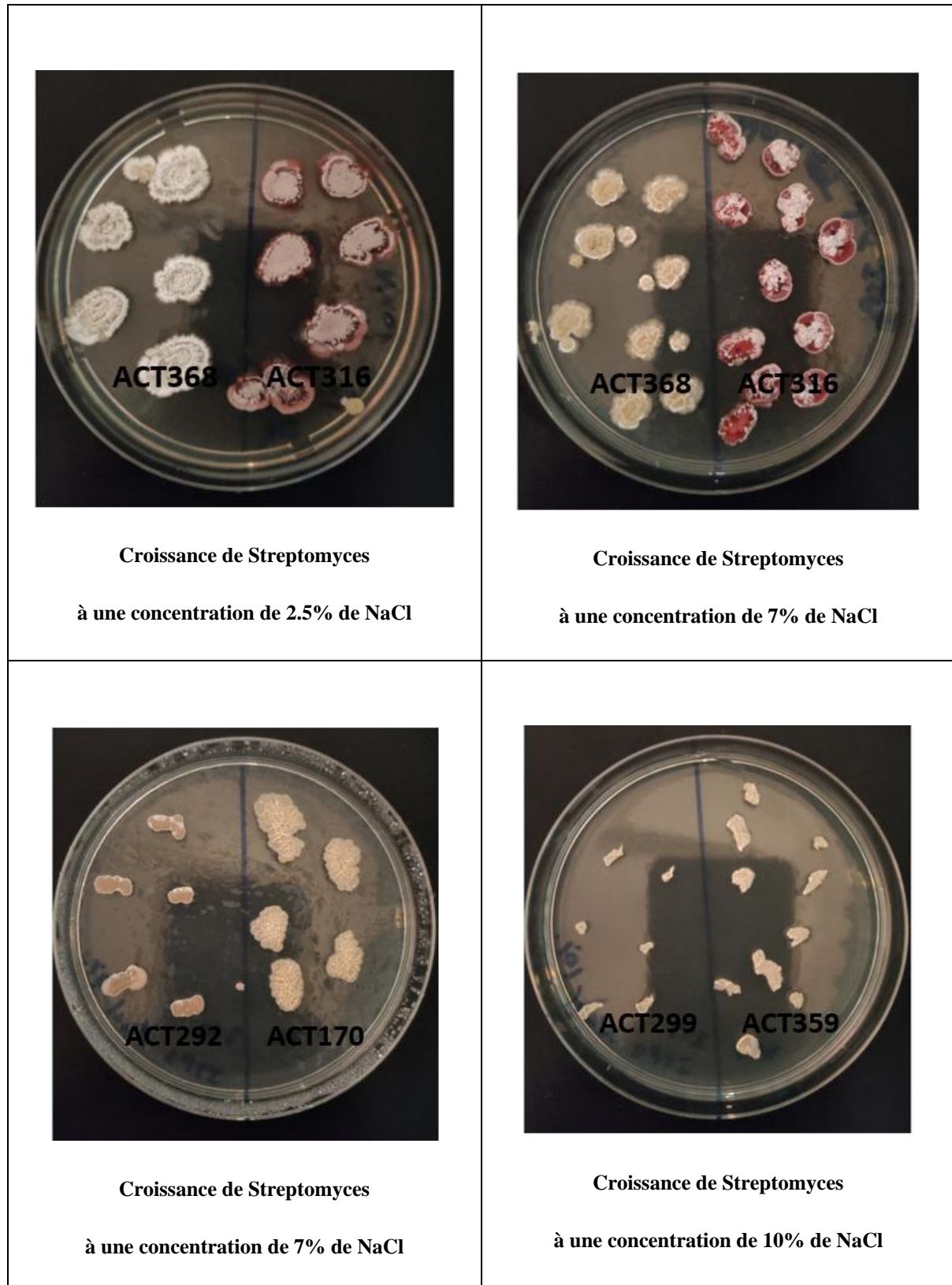


Planche 05 : Photos des résultats du test de tolérance à différentes concentrations de NaCl de quelques isolats.

3.3 Tolérance à différents degrés de pH

Les résultats de ce test sont représentés par le **Tableau 12** :

Tableau 12 : Croissance des souches de *Streptomyces* à différents degrés de pH

souche	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 10
ACT 158	+	++	+++	+++	++
ACT 406	-	++	+++	++	++
ACT 316	-	+	+++P	+++	+++
ACT 368	-	-	+++	+++	+++
ACT 257	-	+	+++	+++	+++
ACT 97	-	+	+++P	+++	+++
ACT 170	-	+	+++	+++	++
ACT 292	-	++	+++	+++	++
ACT 359	-	++	+++	+++	+++
ACT 299	-	++	+++	+++	+++

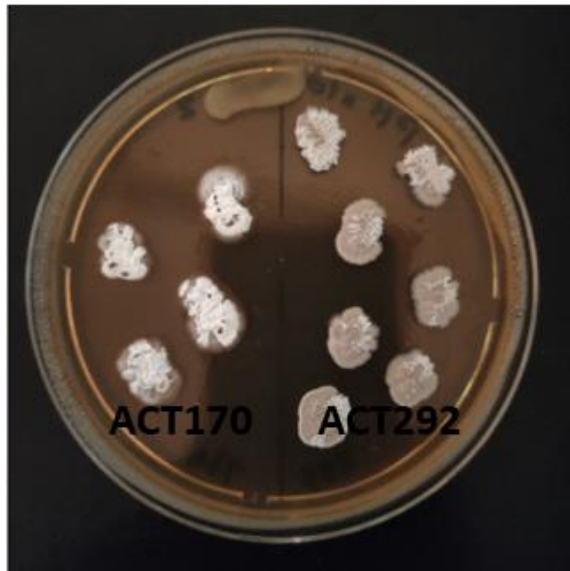
Pas de croissance (-), croissance faible (+), croissance modéré (++), croissance abondante (+++), Production d'un pigment (P).

Selon les résultats de la croissance des souches à différentes valeurs de pH, nous avons remarqué que toutes les souches de *Streptomyces* présentent une croissance optimale à un intervalle de pH entre 7 et 9 certains parmi eux ont un développement important dans un pH alcalin égale à 10 notamment les souches ACT316, ACT368, ACT257, ACT97, ACT359, ACT299.

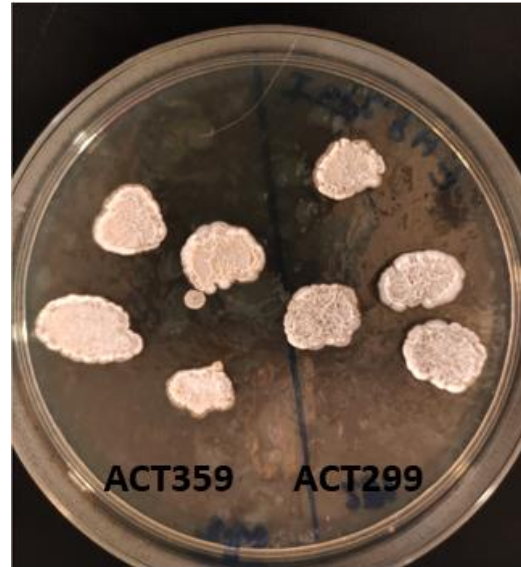
La majorité des souches ont une croissance faible ou modéré sur les milieux peu acides (pH 5), et une croissance nulle sur les milieux à pH 3 à l'exception d la souche ACT 158 qui est capable de croitre sur ce dernier.

Il est bien évident que le pH optimal pour la croissance de nos souches varie de 7 à 9 ce qui est en concordance avec les travaux de (Goodfellow et Williams, 1983) ou il avait décrit que la plupart des Actinomycètes comportent comme des neutrophiles en culture, croissant à un pH entre 5 et 9 avec un optimum proche de la neutralité.

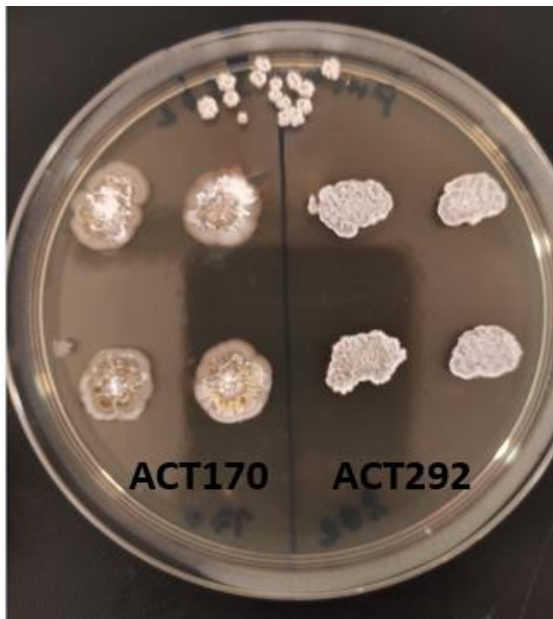
L'acidité de l'environnement est un facteur majeur limitant la distribution et l'activité de genre *Streptomyces*, cependant les *Streptomyces* acidophiles et acidotolérantes sont révélés à être largement répartis dans les sols acides (Hagedorn, 1976).



Croissance de *Streptomyces* à pH 10



Croissance de *Streptomyces* à pH 7



Croissance de *Streptomyces* à pH 9



Croissance de *Streptomyces* à pH 3

Planche 06 : Photos des résultats du test de tolérance à différents pH de quelques isolats.

4. Tests d'activité antifongiques

4.1 Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des disques de diffusion

Le pouvoir antifongique des extraits des souches de *Streptomyces* est évalué contre un nombre des champignons et de levures tests par la méthode des disques de diffusion. Les souches montrent des activités variables selon le germe cible et selon le solvant utilisé pour l'extraction cette variabilité montre que chaque souche produit probablement plusieurs complexes d'antifongiques. Les résultats de l'activité antifongique des extraits des isolats par rapport aux souches cibles sont donnés dans le **Tableau 13** et les **Planche 07**.

Tableau 13 : Test d'activité antifongique des extraits de 10 isolats de *Streptomyces*.

souche	Met		Eth		But		Hex		AE		Ace		Chl		DCM		
	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	
ACT158	L23	-	29	-	-	-	15	-	-	-	-	37	-	21	-	26	
	L44	-	-	-	28	22	-	-	-	-	-	-	25	-	22	-	
	L43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LCK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	F.RHory	-	26	-	22	-	-	-	-	-	-	11	-	11	-	23	
	F.ASfl	-	25	-	21	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ICF57	-	14	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	F.PAvar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	10	-	-	
	ACT170	L20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L23		-	-	-	-	-	30	-	25	-	-	-	-	-	-	-	
F.Fso		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F.Foxy		-	26	-	24	-	46	33	32	30	-	-	21	22	-	28	
F.AScal		22	16	-	13	22	22	-	-	19	-	-	-	13	-	-	
ACT197	F.ASfu	40	26	26	25	40	21	27	22	30	-	23	27	15	20	17	19
	F.Fso	-	25	-	26	-	25	-	30	29	18	27	29	14	35	13	29
	F.PAlil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F.AScal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACT406	L43	-	-	-	-	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	F.Foxy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	F.PAvar	-	28	-	37	-	-	-	-	-	-	36	-	-	-	18	
ACT368	ICF53PB	-	-	-	-	-	33	-	-	36	-	37	33	23	-	14	-
	F.Foxy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 13 : (suite)

souche	Met		Eth		But		Hex		AE		Ace		Chl		DCM		
	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	Met	DMSO	
ACT292	F.PAlil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F.PAvar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FST87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACT316	F.Fso	-	-	38	-	-	-	-	-	14	-	31	28	-	-	19	22
	FST67	37	28	40	27	38	40	44	31	28	22	23	35	20	25	31	40
	F.Foxy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F.PAlil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ICF53PB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACT359	ICF 59	-	42	40	-	16	-	41	-	-	20	-	18	-	-	-	15
	F.AScal	-	-	33	24	14	13	44	-	-	-	-	-	-	-	28	-
ACT299	FST67	-	32	40	30	-	46	13	24	37	23	20	32	31	30	43	42
	F.Foxy	-	-	-	35	-	-	-	-	25	-	24	-	15	-	24	-
ACT257	F.AScal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(Met) : methanol ; (Eth) : ethanol ; (But) : n-butanol; (Hex): hexane; (AE): acetate d'éthyl; (Ace): acetone; (Chl): chloroform; (DCM): dichlorométhane

(DMSO) : Dimethylsulfoxyde

(-): absence de zone d'inhibition

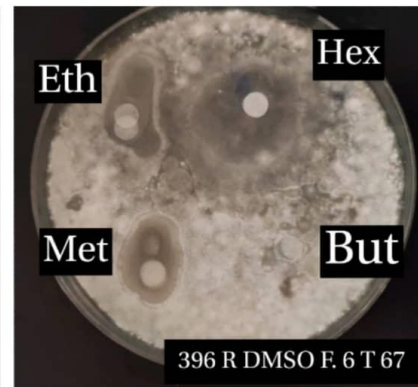
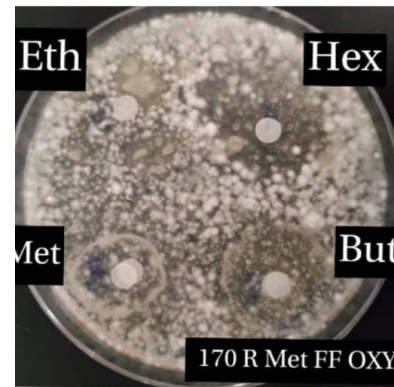
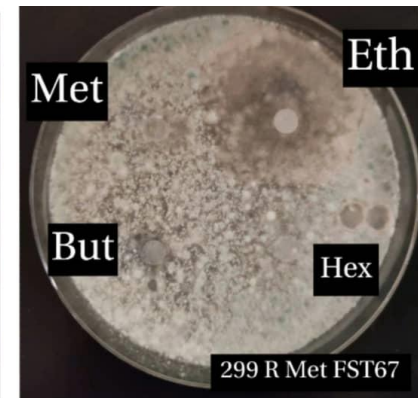
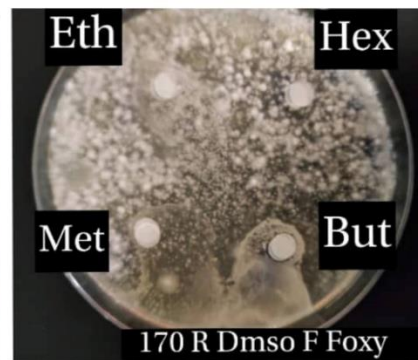
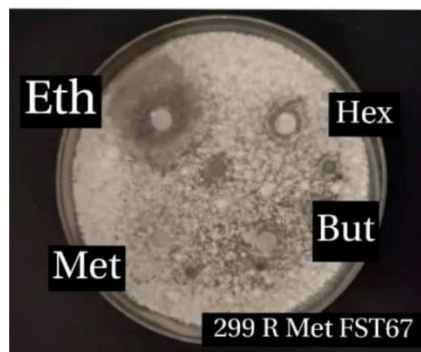
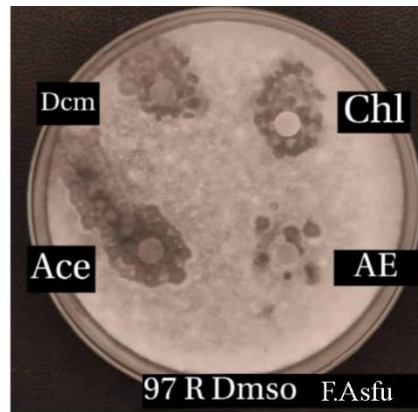
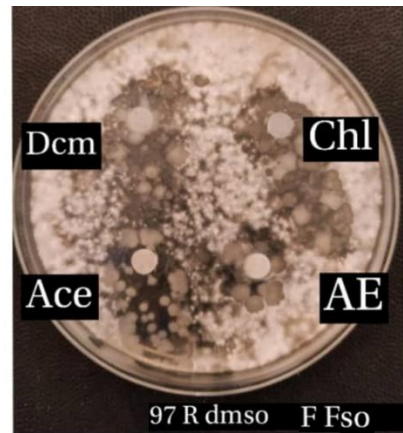


Planche 07 : L'activité inhibitrice de quelques extraits vis-à-vis des champignons tests

Les résultats de **Tableau** montrent que tous les extraits des souches de *Streptomyces* sauf les souches ACT 292 et ACT 257 ont présentés une activité antifongique vis-à-vis d'au moins une souche test utilisée.

Les extraits de la souche ACT 158 avec la majorité des solvants (ré-suspendue dans le DMSO et le méthanol) montrent une activité importante contre le genre *Candida* avec des zones d'inhibitions comprises entre 15 mm et 37 mm de diamètre,

Les extraits aux éthanol, méthanol, acétone, chloroforme et dichlorométhane (diluée dans le DMSO), de la souche ACT 158 ont une activité inhibitrice faible à modéré (11 mm – 26 mm) contre les champignons *Rhizopus (FRHory)*, *Aspergillus(F.ASfl)* et *Peacilomyces(F.PAvar)*.

On peut noter à partir de ces résultats que les biomolécules produites par la souche ACT 158 solubles dans le DMSO présentent une meilleure activité que celles re-suspendu dans le méthanol. Ces résultats corroborent avec ceux (d'**Augustine et al., 2005**). Qui montrent que les souches tests appartenant au genre *Aspergillus* sont les plus sensibles aux molécules bioactives d'actinomycètes.

Pour la souche ACT 170 les extraits butanoïques et hexanoïques (ré-suspendue dans le DMSO) ont une activité inhibitrice comprise entre 25mm et 30mm, contre le genre *candida(L23)*. On constate que le meilleur extracteur dans ce cas est le :n- butanol, ces résultats obtenues sont comparables avec celles obtenues par (**Slavica et al.,2005**)qui ont mentionnés que des souches actinomycetales appartenant au genre *Streptomyces* montrent des zones d'inhibition comprise entre 11mm et 31mm vis à vis de *condida albicans* .Nos résultats sont meilleurs que ceux de (**Belyagoubi, 2014**) qui a travaillé sur l'activité antifongique de 9 isolats d'actinomycètes tellurique contre plusieurs espèces de levures cette étude montre que l'activité anti-candidosique révèle des zones allant de 7 à 21 mm.

Presque tous les extrais de la souche ACT 170 avec tous les solvants sauf l'acétate d'éthyle et l'acétone (diluées dans le DMSO et le méthanol) présentent une activité intéressante vis-à-vis des champignons filamenteux, *Fusarium (F.Foxy)*, (21 mm – 46 mm) et *Aspergillus (F.AScal)* (13 mm – 22mm), dont le meilleur solvant d'extraction est le butanol.

Les extraits de la souche ACT 97 avec tous les solvants (ré-suspendue DMSO, méthanol) ont une activité inhibitrice allant de 13mm à 41mm contre les genres *Aspergillus (F.ASfu)*,*Fusarium(F.Fso)*, on peut noter que l'éthanol et le butanol sont les meilleurs extracteurs. On constate que la nature de ces biomolécules est non-peptidique, poly phenolique

et polyénique (**Lamari,2006**). Ces résultats sont mieux que les résultats trouvés par (**Aouichi et al., 2012**) qui signale que la souche de *Streptomyces* PAL 111 présente des zones de 17mm vis-à-vis de *Fusarium culmorum* et celle de (**Badji et al., 2005**) qui trouve une zone de 9 mm vis-à-vis *Fusarium sp* et *Fusarium oxysporum*.

L'extrait butanolique de la souche ACT406 diluée dans le méthanol montre une activité inhibitrice importante de l'ordre de 41 mm contre le genre *Saccharomyces(L43)*, ce qui est mieux que les travaux de (**Aghighi et al.,2004**) qui trouve que la souche de *Streptomyces plicatus* montre des activités vis-à-vis *Saccharomyces cerevicae* avec une zone de 5mm à 9 mm de diamètre. Une activité contre *Peacilomyces(F.Pavar)* est également enregistrée (18 mm – 37 mm) cependant aucune activité n'a été enregistré contre le genre *Fusarium(F.Foxy)*.

Les extraits de la souche ACT 368 avec les solvants : butanol, hexane, acétone, chloroforme, dichlorométhane qui ont été testés contre le champignons (ICF53PB), présentent une activité inhibitrice comprise entre 14mm et 37mm et une absence d'activité contre *Fusarium*, Les résultats montrent que l'acétone est le meilleure solvant d'extraction.

Les extraits de la souche ACT 316 avec tous les solvants (ré-suspendue dans le DMSO et le méthanol) ont une activité inhibitrice importante contre les champignons filamenteux *Fusarium* (F.Fso) et *Lomentospora* (FST67) allant jusqu'à 44mm, dont les meilleurs solvants d'extraction sont : hexane et butanol.

Les extraits de la souche ACT 359(dilués dans le DMSO et le méthanol) avec presque tous les solvants présentent une activité importante contre les deux genres *Aspergillus* (F.AScal) et *Penicillium*(ICF59) comprise entre 13mm et 44 mm, avec un meilleur extracteur (l'éthanol). Ces résultats sont supérieurs par rapport aux résultats trouvés par (**Aouichi et al., 2012**) qui a trouvé un résultat de17 mm de diamètre pour la souche de *Streptomyces* PAL111 contre *Penicilium glabrum*.

Les extraits de la souche ACT 299 (dilués dans le DMSO et le méthanol) avec tous les solvants, sauf l'éthanol présentent une activité inhibitrice importante contre *Lomentospora* (FST67), et *Fusarium* (F.Foxy) allant de 13mm à 43 mm . Le meilleur extracteur est le dichlorométhane qui donne la plus grande zone d'inhibition, le dichlorométhane ; un solvant très peu soluble dans l'eau mais miscible avec la plupart des solvants organiques, selon **Sacramento** et ses collaborateurs (**2004**) signale que le dichlorométhane extrait des composés peptidique.

On peut déduire donc que, le n-butanol suivie de l'éthanol puis le dichlorométhane et l'hexane sont les solvants qui ont donnés les meilleurs résultats. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Augustine et al. (2005)** qui ont pu extraire des molécules à activités antifongiques en utilisant de l'hexane comme solvant d'extraction dans les surnageants de culture de *Streptomyces albidoflavus*. D'autres études telles que celle réalisé par **Boudjella et al. (2006)** et **Zitouni et al. (2005)** ont souligné l'efficacité du butanol et de dichlorométhane dans l'extraction des antibiotiques synthétisés par des Actinomycètes.

L'apparition de l'activité antimicrobienne dans un solvant polaire (n-butanol), de polarité moyenne (dichlorométhane) et apolaire (n-hexane) suppose qu'il s'agit soit de plusieurs molécules de polarités différentes soluble chacune dans un solvant différent ou bien d'une ou plusieurs molécules solubles dans différents solvants. Cette dernière hypothèse est plus probable puisque selon **Guernet et Hamon (1981)**, les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entrainant une affinité pour des solvants très divers.

4.2 Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode de double couche

Afin de confirmer l'activité antimicrobiennes de nos isolats, nous avons utilisé une autre technique plus précieuse celle de la double couche qui donne plus de précision sur l'activité antimicrobienne de nos isolats d'actinobactéries.

Les résultats de l'activité antifongique de quelques isolats d'actinomycètes par rapport aux souches fongique testées (levures et champignons filamenteux) sont donnés dans le Tableau et les planches suivants :

Tableau 14 : Diamètre d'inhibition de la croissance des souches fongique par l'isolat 158

Souche de streptomyces	Jour10							
	Levures				Champignons filamenteux			
	L43	L44	L23	LCK	F.RHory	F.ASfu	F.Pavar	ICF57
Souche 158	--	+	--	+	--	--	+	+

(--): faible ;(+): présence de zone de zone d'inhibition

A partir de ce tableau on constate que la souche ACT 158 testée présente une activité intéressante vis-à-vis des souches fongiques testées (levures et champignons filamenteux). On remarque aussi l'apparition des zones d'inhibitions très importantes pour la souche ACT 158

contre ICF57 et F.PAvar. On note que la souche ACT 158 ne présente aucune activité antagoniste vis-à-vis des souches fongique F.RHory et F.ASfu testées par cette méthode.

Pour les levures on note qu'il ya une apparition intéressante des zones d'inhibitions contre L44 et LCK et une faible ou manque de présence d'une zone d'inhibition (aucune activité inhibitrice) contre la levure L43 et L23.

On constate que ces résultats, montrent aussi que l'activité antimicrobiennede souche d'actinomycète158 testée dépend de la méthode utilisée (**Lemriss, 2003**). Les zones d'inhibitions obtenue par la technique de double couche sont plus important par rapport à celle obtenue par la technique des disques de diffusion; par ailleurs la technique de double couche est mieux adapté pour l'étude des activités antifongique (**Gandhimathi et al., 2008**) elle permet la diffusion des microorganismes ensemences en masse dans la gélose molle (**Bastide et al ,1989**).

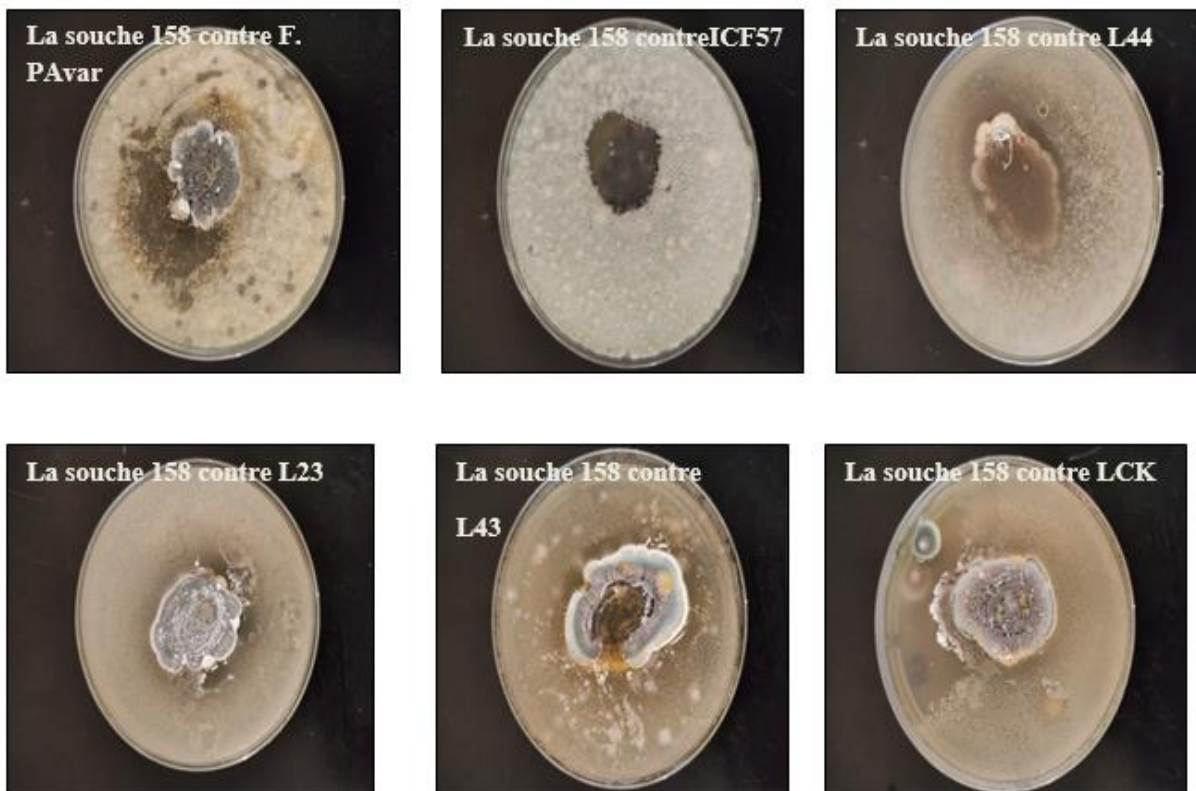


Planche 8. L'activité antifongique de souche158 des champignons filamenteux Et quelques levures

5. Caractérisation partielle des molécules actifs

5.1 Chromatographie sur couche mince

Après avoir effectué une chromatographie sur couche mince en utilisant les extraits bruts issu de l'extraction par différents systèmes BAE, EAE, AM, ME les résultats sont présentés dans les tableaux 15, 16, 17, 18 :

Tableau 15 : les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système **BAE**

le système BAE :n-butanol - acide acétique -eau (3,1,1,v\ v)			
souche	Meilleur extrait	Ré-suspendue dans	Rapport frontal des taches
ACT 97	methanol	methanol	a = 0,71
	chloroform	DMSO	a = 0,83
ACT 170	butanol	DMSO	a = 0,95 b = 0,70
	butanol	méthanol	a = 0,62 b = 0,35
ACT 158	éthanol	DMSO	a = 0,83 b = 0,74 c = 0,69
	méthanol	DMSO	a = 0,85
ACT 299	butanol	DMSO	a = 0,87
	éthanol	DMSO	a = 0,97
ACT 359	hexane	méthanol	a = 0,23
ACT 368	acétone	méthanol	a = 0,63 b = 0,32 c = 0,27
ACT 406	butanol	méthanol	a = 0,5
	éthanol	DMSO	a = 0,86 b = 0,75 c = 0,59
ACT 316	éthanol	méthanol	a = 0,87 b = 0,31 c = 0,25
	hexane	méthanol	a = 1

Tableau 16 : les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système **AM**

le système AM :acétate d'éthyle-méthanol (10/15 v\v)			
souche	Meilleur extrait	Ré-suspendue dans	Rapport frontal des taches
ACT 97	methanol	methanol	a= 0,3
	chloroform	DMSO	a= 1
ACT 170	butanol	DMSO	a = 0,80
	butanol	méthanol	a = 0,75 b= 0,50
ACT 158	éthanol	DMSO	a = 0,25
	méthanol	DMSO	a = 0,71
ACT 299	butanol	DMSO	a = 0,71
	éthanol	DMSO	a = 0,7
ACT 359	hexane	méthanol	a = 0,92
ACT 368	acétone	méthanol	a = 0,9
ACT 406	butanol	méthanol	a = 0,71
	éthanol	DMSO	a = 0, 95 b = 0, 83
ACT 316	éthanol	méthanol	a = 0,87
	hexane	méthanol	a = 0 ,84

Tableau 17 : les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système **EAE**

le système EAE :éthanol - ammoniac - eau (8, 1,1v\ v)			
souche	Meilleur extrait	Ré-suspendue dans	Rapport frontal des taches
ACT 97	methanol	methanol	a = 1
	chloroform	DMSO	a = 0,93
ACT 170	butanol	DMSO	a = 83 b = 79
	butanol	méthanol	a = 1
ACT 158	éthanol	DMSO	a = 0,80 b = 0,57
	méthanol	DMSO	a = 0,71 b = 0,66
ACT 299	butanol	DMSO	a = 0,57
	éthanol	DMSO	a = 0,66
ACT 359	hexane	méthanol	a = 0,75
ACT 368	acétone	méthanol	a = 1
ACT 406	butanol	méthanol	a = 0,6
	éthanol	DMSO	a = 0,75
ACT 316	éthanol	méthanol	a = 0,80 b = 0,36
	hexane	méthanol	a = 1

Tableau 18 : les Rf des séparations des molécules des extraits de certaines souches par chromatographie utilisant le système **ME**

le système ME :méthanol - eau (7:4 v\ v)			
souche	Meilleur extrait	Ré-suspendue dans	Rapport frontal des taches
ACT 170	butanol	DMSO	a = 0,83 b = 0,77
	butanol	méthanol	a =1
ACT 158	éthanol	DMSO	a =1
	méthanol	DMSO	a =0,68
ACT 299	butanol	DMSO	a = 1
	éthanol	DMSO	a = 0,87
ACT 359	hexane	méthanol	a =0,93
ACT 368	acétone	méthanol	a =0,95
ACT 406	butanol	méthanol	a =0,75
	éthanol	DMSO	a =1 b = 0,59
ACT 316	éthanol	méthanol	a = 0,66
	hexane	méthanol	a = 1

La visualisation sous UV à 245 nm des chromatogrammes des extraits bruts développés sur les quatre systèmes de solvants différents révèlent une bonne séparation des bandes avec les système **BAE** : n-butanol - acide acétique -eau (3,1,1, v\|v) et le système **AM** : acétate d'éthyle-méthanol (10/15 v\|v). Ce système a permis de mettre en évidence plusieurs taches pour les souche ACT 158, ACT 170, ACT 406, ACT 316 et ACT 368 (figure 14).

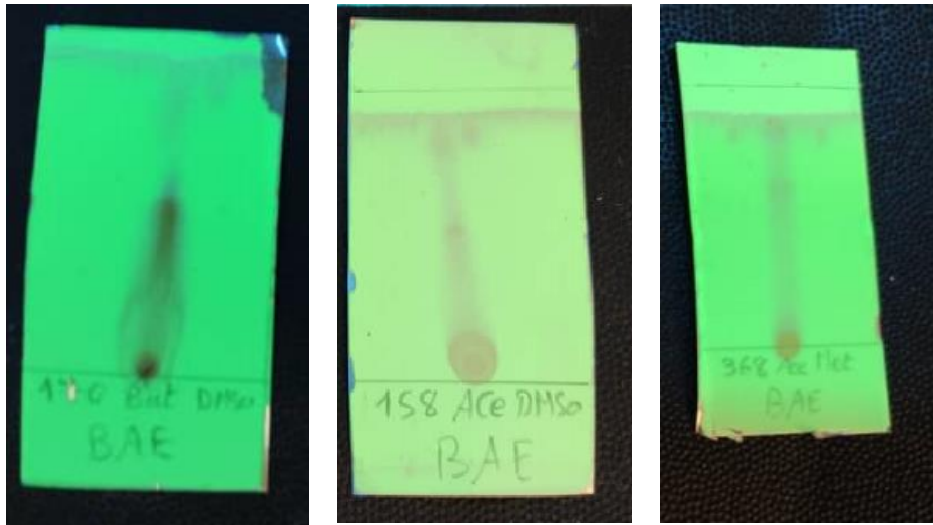


Figure 14 : Chromatogramme des extraits sous lampe UV du système B.A.E

Les molécules bioactives de la souche 316 extraites à l'éthanol (méthanol resuspendé au méthanol) présentent un caractère polaire puisqu'elles migrent dans les systèmes butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1v/v) et le système **AM** ; acétate d'éthyle-méthanol (10 /15 v/v) et le système **EAE** ; Ethanol –ammoniac-eau (8 ;1 ;1v/v).

Les molécules bioactives de La souche 97 extraites à Méthanol (Méthanol) présentent un caractère polaire puisqu'elles migrent dans les systèmes (**BAE**) butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1v/v) et le système(EAE) et (AM) respectivement .et restent à l'emplacement du dépôt dans le système (ME) : méthanol, Éthanol (**7 ;4 v/v**).

Les molécules bioactives de La souche 170 extraites à Butanol (Méthanol) présentent un caractère polaire puisqu'elles migrent dans toute les systèmes de migration respectivement à des rapports de (0,35 ;0,62 ;0,5 ;0,75 ;1 ;1). Pour les plaques dans lesquelles on observe une grande distance de migration plusieurs molécules actives peuvent apparaître.

En basant sur les résultats obtenues de la chromatographie sur couche mince ou on a pu calculer les rapports frontales de chaque taches on peut déduire que les meilleurs systèmes de solvants qui sont donnés la plus grande séparation des molécules bioactives sont le système **BAE** : n-butanol - acide acétique -eau (3,1,1,v\ v) et le système **ME** :méthanol - eau (7:4 v\ v)

5.2 Révélation biochimique

Selon les résultats de la révélation biochimique par la ninhydrine et le formaldéhyde-acide sulfurique pour les isolats choisis on constate que :

La ninhydrine réagit positivement avec les taches codées 'a' de l'extrait de l'acétone resuspendue dans le méthanol de la souche ACT368 avec les deux systèmes AM et ME. Ainsi avec la tache 'a' de l'extrait hexanoïque de la souche ACT 359 sur le système EAE.

Pour la souche ACT 158 la réaction avec la ninhydrine est positive en ce qui concerne les taches 'a' et 'b' de l'extrait éthanoïque avec le système EAE et avec la tache 'b' de l'extrait méthanoïque avec le système EAE. Cependant la réaction est négative avec les taches obtenues dans les chromatogrammes de la souche ACT 97.

La tache 'a' qui correspond à l'extrait butanolique sur le système EAE est aussi positive à la réaction.

Ces résultats laissent supposer que les produits obtenus de ces souches contiennent dans leur structure des résidus aminés.

L'utilisation de révélateur Formaldéhyde-acide sulfurique avec les différents extraits donne des résultats positifs seulement avec les taches codées 'b' de la souche ACT 170 avec le système ME et la tache 'b' de la même souche sur le système BAE, on peut conclure que l'extrait de cette souche contient dans sa structure des résidus aromatiques polycycliques.

5.3 Bioautographies

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

La révélation microbiologique de l'extrait hexanoïque ré-suspendue à DMSO de la souche ACT 359 avec le système AM : acétate d'éthyle-méthanol (10/15 v/v) permet de mettre en évidence une seule tache active contre *Aspergillus* avec un Rf de 0,4 (figure 15). Ces résultats sont comparables avec ceux trouvés par bouaziz, 2017.



Figure 15 : la révélation microbiologique de plaque CCM (souche ACT 359).

Conclusion et perspectives

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques ont été largement étudiés surtout chez le genre *Streptomyces*, largement dominant dans de nombreux écosystèmes dits non rudes ou extrêmes.

L'objectif principal de notre travail est la recherche des biomolécules par des tests d'activité antifongique des extraits d'un groupe de *Streptomyces* contre différents champignons filamenteux et des levures. L'activité antifongique a été évaluée au moyen de la méthode de disques de diffusion. Nous avons également effectué un test de chromatographie sur gel de silice et de bioautographie pour séparer et caractériser les molécules bioactives.

Après purification des souches les caractéristiques morphologiques et physiologiques des souches sont étudiées, les résultats confirment l'appartenance des isolats au genre des *Streptomyces*.

Les résultats obtenus du test d'activité ont montré que la plupart des extraits testés présentent une activité contre les champignons filamenteux et les levures ciblées, les plus grandes zones d'inhibition sont observées avec les extraits des souches ACT170, ACT97, ACT 299, ACT359 et ACT316 qui vont de 30mm à 46 mm, ces résultats confirment que ces souches sont des excellents producteurs de molécules antifongiques.

Les résultats montrent également que parmi les différents solvants d'extraction, le butanol, le méthanol, l'hexane, l'acétone et le chloroforme donnent les meilleurs résultats.

La réalisation de la bioautographie de l'extrait hexanoïque re-suspendue dans le DMSO de la souche ACT359 avec le système **AM** : acétate d'éthyle-méthanol (10/15v/v) a permis de mettre en évidence une seule tache active contre *Aspergillus* avec un Rf de 0.4.

Nous pouvons conclure à l'issue de ce travail que les souches d'actinomycètes testées présentent une source prometteuse de biomolécules et probablement de nouvelles molécules antifongiques.

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, la spectroscopie d'absorption en lumière IR, la spectroscopie de masse pour déterminer leurs structures.

Références Bibliographique

A

- Abu-Elteen KH. and Hamad MM. (2007). Novel antifungal therapies. In *New Insights in Medical Mycology* ed. Kavanagh, K. pp. 69–98. Co.Kildare, Ireland: Springer.
- Abdel-Kader, M.S., Muharram, M.M., 2017. New microbial source of the antifungal allylamine “Terbinafine.” *Saudi Pharmaceutical Journal* 25, 440–442.
- Al-Zarban, S.S., Al-Musallam, A.A., Abbas, I., Stackebrandt, E., Kioppenstedt, R.M. (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int J Sys Env Microbiol*, 52: 555-558.
- Ampel N.M., (1996). Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. *Emerging infect. Dis.* 2(2): 109-116.
- Aouar L. (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri-Constantine
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. (2012). Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *J Mycol Med*, 22(1),42-51.
- Arasu, M.V., Duraipandiyan, V., Agastian, P., Ignacimuthu, S., 2009. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale* 19, 22.
- Ascioğlu S., Rex J.H., De Pauw B., (2002). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplantants: an international consensus. *Clin.3 Infec. Dis.* 34: 7-14.

B

- Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabou N. (2005). Activité antifongique d'une souche D'*actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie médicale*,15(4),211-219.

- Barry A.L., Garcia F. et Thrupp L.D. (1970) An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens . *Am J Clin Pathol.* 53: 149-158.
- Bastide A., Demeo M., Andriantsoa M., Laget M., Dumenil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyénique. *Mircen J*, 2,453-466.
- Basilio A., González I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., González A. and O. Genilloud O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl Microbiol.*, 95. 814-823.
- Becker K, Ballhausen B, Kock R, Kriegeskorte A (2014). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*, 304(7):794_804.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl microbiol*, 13: 236-43.
- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen .146p.
- Ben-Ami R, Kontoyiannis, DP. (2021). Resistance to Antifungal Drugs. *Infect Dis Clin North Am* 35, 279–311. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.003>
- Bétina (1965), V papier chromatography of antibiotics, In chromatographie Reviews progress in chromatography, électrophoresis and relateds lederer M, Ed p 21,166
- Betina, V (1973) bioautographie in paper and thin -layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *Journal of chromatography A* 78,41-51
- Bernard R (2007). Résistance à la bacitracine chez *Bacillus subtilis*. Thèse de Doctorat: Microbiologie et Biotechnologies. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 221 P.
- Borgers M (1985). Antifungal azole derivatives. In: Greenwood D, O'Grady F, eds. *The scientific basis of antimicrobial chemotherapy*. Cambridge: Cambridge University Press; 133–153.

- Böttger EC (2007). Antimicrobial agents targeting the ribosome: the issue of selectivity and toxicity - lessons to be learned. *Cell Mol Life Sci* 64, p 791–795
- Brighty KE et Gootz TD. (2000). Chapter 2 - Chemistry and Mechanism of Action of the Quinolone Antibacterials, in: Andriole, V.T. (Ed.), *The Quinolones (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 33–97.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhha de Ain Mlila. *Sciences & Technologie C*, 23 : 5–10.
- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.I., Thomson N.R., James K.d., Harris D.E. et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*A3 (2). *Nature*. 417:141-7.
- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, 7(4):e34953.
- Boughahiche F. 2012, Étude de molécules antibiotiques secrétés par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de sebkhha, thèse Doctorat université Mentouri Constantine p 77,79
- Boudemagh, A. (2007). Isolement à partir des sols sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat d'Etat : Microbiologie Appliquée. Université Frères Mentouri Constantine, Constantine, p.23,132
- Brown, G. D. et al. (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4, 165rv13.
- Brown, G. D., Denning, D. W. & Levitz, S. M. (2012). Tackling human fungal infections. *Science* 336, 647.

C

- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst, SA(2001). Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 104, 901–912.
- Cairns J (1963). The chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*28, 43–46.

- Carle S., (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. **36** : 25-41.
- Costerton JW, Ingram JM, Cheng KT (1974). Structure and function of the cell envelope of Gram negative bacteria. *Microbiological Reviews*; 38 (1) : 87-170.
- Chopra I (2010). Chapter 2 - Modes of action, in: Finch, R.G., Greenwood, D., Norrby, S.R., Whitley, R.J. (Eds.), *Antibiotic and Chemotherapy* . 9thEdition . W.B. Saunders, London, pp. 10–23.
- Cui Q, Bian R, Xu F, Li Q, Wang W, Bian Q, (2021). Chapter 10 - New molecular entities and structure–activity relationships of drugs designed by the natural product derivatization method from 2010 to 2018, in: *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products*. Elsevier, p. 371.

D

- De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. (2001). Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* ,45:1761–70.
- De Sousa Oliveira K, de Lima LA, Cobacho, NB, Dias SC, Franco OL (2016). Chapter 2 - Mechanisms of Antibacterial Resistance: Shedding Some Light on These Obscure Processes? in: Kon, K., Rai, M. (Eds.), *Antibiotic Resistance*. Academic Press, pp. 19–35.
- Denning DW (1997). Echinocandins and pneumocandins--a new antifungal class with a novel mode of action. *J Antimicrob Chemother* 40, 611–614.
- Dorosz P, Durand DV, Le Jeune C, Collectif ; (2014). *Guide pratique des médicaments Dorosz*, 34e édition, Éditions Maloine. 1906 pp., disponible sur: <https://livre.fnac.com/a6378136/Philippe-Dorosz-Guide-pratique-des-medicaments> (4.13.22) ISBN : 978-2-224-03389-7
- Drouhet, Dupont B (1984). Ketoconazole : spectre, pharmacocinétique, tolérance et activité thérapeutique dans les mycoses profondes. *Médecine et Maladies Infectieuses* 14, 518–529.

- Dupont S, Lemetais G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P et Beney L (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* 66, 2961-2968.
- Devereux R., He S.H., Doyle C.L., Orkland S., Stahl D.A., Le Gall J., and Whitman W.B., (1990). Diversity and origin of *Desulfotomaculum* species: phylogenetic definition of a family. *J. Bacteriol.*, 3609-3619
- Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol Adv*, 18(6): 499-514

E

- Edwards DI (1993). Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother.* 31 :9–20.
- Erikson, D. (1949); The morphology, cytology and taxonomy of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*; 3: 23-54

F

- Fernandes P, Ferreira BS, Cabral JM (2003). Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 22 :211–6.
- Fisher, M. C. *et al* (2020). Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. *mBio* 11, e00449-20.
- Fromtling RA (1988). Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Rev* 1, 187–217.
- Flårdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*, 6(6): 564–71

G

- Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology* 10 : 2993
- Ganesh Kumar C., Mongolla P., Joseph J., Nageswar Y.V.D., Kamal A., (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Journal de mycology medical* (20), 283-289. DOI: 10.1016/j.mycmed.2010.08.002.

- Ghannoum, M.A., Rice, L.B., 1999. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 501–517. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.501>
- Goodfellow, M., Williams, S.T., 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37, 189–216.
- Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, *et al.* (1998) Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes theoxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol.* 28:383–393.
- Gootz TD (2010). The global problem of antibiotic resistance. *CritRevImmunol*,30(1):79_93.
- Gow NAR, Latge,J.-P, Munro CA (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum* 5, 5.3.01
- Granier F (2000). Les infections fongiques invasives. *La presse médicale*, 29 : 2051.
- Ghanem, N.B., Sabry, S.A, El-Sherif, Z.M., Abu El-Elal, G.A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol*, 46(3): 105–111.
- Goodfellow and Cross (1984). In Embley T.G., O'Donnell M.A., Rostron J. and Goodfellow M. (1987). Chemotaxonomy of wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *J. Gen.l Microbiol.*, 134. 953-960.
- Goodfellow ,M ,wiliams S.T(1983) Ecology of Actinomycètes.*Ann Rev Microbial* 37 ,189,216
- Granier F (2003). Antifongiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes derésistance. *Antibiotiques*, 5 : 39–48.
- Grillot R, Lebeau B. (2005) Systemic antifungal agents. In: Bryskier A, ed. *Antimicrobial agents*. Washington, DC: American Society for MicrobiologyPress;1260–1287.
- Gandhimathi R., Arunkumar M., Selvin J.,Thangavelu T.,Sivaramakrishnan S.,Kiran GS.,SHanmughapriya S.,Natarajaseenivasan K. (2008). Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes.*J de Mycologie Médicale*,18(1),16-22.

H

- Haas D; (2015). Métabolisme secondaire de *Streptomyces ambofaciens*: exploration génomique et étude du groupe de gènes dirigeant la synthèse du sphydrofurane. Thèse de Doctorat: Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud – Paris, 194 p.
- Hagedorn, C., 1976. Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl Environ Microbiol* 32, 368–375.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wikins.
- Hodgson, D.A. (1992). Differentiation in *Actinomycetes*. In: *Prokaryotic Structure and Function*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Harir ,M (2017/2018) caractéristique des molécules Bioactives produites par des souches d'actinobactériés isolées des sols Arides et semi Arides d'Algérie, Thèse de Doctorat, spécialité intérêt des microorganisme en agriculture et en agroalimentaire ,p 61
- Hopwood, DA. (2007). *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. NewYork, Oxford University Press- Google Books [WWW Document], n.d. URL [https://books.google.dz/books?hl=en&lr=&id=zPURDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=%E2%80%A2%09Hopwood,+DA.+\(2007\).+Streptomyces+in+Nature+and+Medicine:+The+Antibiotic+Makers.+NewYork,+Oxford+University+Press&ots=0S_ZLEil_k&sig=tvRqJ8HIzJ-mtS7etzKd6hqmeC8&redir_esc=y#v=onepage&q=%E2%80%A2%09Hopwood%2C%20DA.%20\(2007\).%20Streptomyces%20in%20Nature%20and%20Medicine%3A%20The%20Antibiotic%20Makers.%20NewYork%2C%20Oxford%20University%20Press&f=false](https://books.google.dz/books?hl=en&lr=&id=zPURDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=%E2%80%A2%09Hopwood,+DA.+(2007).+Streptomyces+in+Nature+and+Medicine:+The+Antibiotic+Makers.+NewYork,+Oxford+University+Press&ots=0S_ZLEil_k&sig=tvRqJ8HIzJ-mtS7etzKd6hqmeC8&redir_esc=y#v=onepage&q=%E2%80%A2%09Hopwood%2C%20DA.%20(2007).%20Streptomyces%20in%20Nature%20and%20Medicine%3A%20The%20Antibiotic%20Makers.%20NewYork%2C%20Oxford%20University%20Press&f=false) (consulté: 26/ 04/ 2022).
- Harvey RA, Champe PC, Finkel R(2009). *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*, fourthedition. Lippincott Williams and Wilkins, New Delhi, pp. 407–415.
- Harir,M (2017,2018) caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols Arides d'Algérie, thèse de doctorat ,intérêt des microorganismes en agriculture et en agroalimentaire, université d'ovan Ahmed Ben Bella p(38,39)

- Hodgson DA. (2000). Primary metabolism and its control in Streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Phys*,42, 47-238.
- Holding K.J., Dworkin M.S., Wan P.C. *et al.*, (2000). Aspergillosis among people infected with human immunodeficiency virus. Incidence and survival adult and adolescent spectrum of HIV disease project. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 1253-7.

J

- Joly V, Bolard J, Yeni P(1992). In vitro models for studying toxicity of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 1799–1804.
- Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102–1108.

K

- Kitouni,M(2007) isolement de bactéries Actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées,Thèse de doctorat, université Mentouri Constantine Faculté science de la vie et de nature , p(14, 15 ,16)
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J Med Mycol*, 15(1) : 45–51.
- Kim B., Al-Tai A.M., Kim S.B., Somasundaram P. and Michael Goodfellow M. (2000). *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 50. 505-509.
- Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD (2006), High level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrob Agents Chemother*,50(10):3396_406.
- Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 5678–5698.

- Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE(1995) Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. *BiochemBiophRes Co* 207: 910–915.
- Khelaaff .H lebour Rahma,Nouri,N (2019/ 2020) criblage des souches d'actinomycètes productrices de molécules Antifongique , Mémoir Master, Microbiologie appliquée université Larbi Tébessi Tébessa p43, 10
- Kushner D. et Kamekura M. (1988). Physiology of halophilic Eubacteria. In:Rodriguez Valera, F. (Ed.), Halophilic Bacteria.

L

- Lacey, J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: Actinomycetales: characteristics and practical importance. Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner.Academic press, London, New York. 231–251.
- Larpent, J.P., Larpent-Gourgand, M. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3ème Edition, Tech & doc., Lavoisier. 1039p.
- Lee J.Y. and Hwang B.K., (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48. 407-417.
- Larpent J.P. et Larpent-Gourgaud M. (1985). Manuel pratique de microbiologie. Herman. Paris.
- Lacroix C, Dubach M, Feuilhade M(2003). Les échinocandines : une nouvelle classe d'antifongiques. *Médecine et Maladies Infectieuses* 33, 183–191.
- Lamari L, 2006, production de nouveaux antibiotiques des groupe de des pyrthines par une nouvelle espèce d'actinomycète,saccharothrix Algériensis ,Thèse de Doctorat université de Tizi Ouzou Mouloud Mammeri.
- Lechevalier MP, de Bièvre C, Lechevalier HA (1977) Chemo-taxonomy of aérobic actinomycètes :phospholipid com-position. *Biochem Sys Ecol* 5 :249-260
- Larpent, J.P., Sanglier, J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481p.

- Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, *et al.*(2000). Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J Bacteriol.* 182:3142–50.
- Leroy O, Ajana F(2004). Caspofungine, place dans les stratégies thérapeutiques antifongiques. *Antibiotiques* 6, 132–143.
- Liaras K et Soković M, (2021). Chapter 5 - Synthetic antifungal compounds, in: Soković, M., Liaras, K. (Eds.), *Antifungal Compounds Discovery*. Elsevier, pp. 167–262.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. (1967). Biologie of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*, 21: 71–100
- Livermore, DM., 1987. Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs* 34 Suppl 2, 64–88.
- Lechevalier, H. A., Lechevalier, M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: *The prokaryotes*, Vol. 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), Springer – Verlag, Berlin. p. 1915–1922.
- Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin JM., Saintpierre-Bonaccio D.(2003). Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49,669–674

M

- Marriner GA, Nayyar A, Uh E, Wong SY, Mukherjee T, Via LE *et al.* (2011). The Medicinal Chemistry of Tuberculosis Chemotherapy. *Topics in medicinal chemistry.*, 7: 47–124.
- Ma Z, Ginsberg AM and Spigelman M (2007). Antimycobacterium agents. *Global Alliance for Tuberculosis Drug Development*. New York., 7: 699-730.
- Madigan MT, Martinko JM. *Biologie des microorganismes*. 11e éd. ed. Pearson Education
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2007. *Microbiologie*. Bruxelles: De Boek & Larcier; 2007. pp. 805-825ance; pp. 331-423, 686-718

- McKinney R. E., (2004). Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York. Pp: 448. Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- Murray PR, Rosenthal KS et Pfaller MA (2016). antibacterial agents. In: Medical Microbiology. 8th edition. Philadelphia. USA: Elsevier, P. 165. ISBN: 978-0-323-29956-5
- McKinney R. E., (2004). Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York. Pp: 448. Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- Miguélez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol*, 145(3): 515–25.
- Mighélez EM , Hardisson C and Manzanal (2000) ,*Streptomyces* A new model to study cell Death *j. cell Biol* 153-158
- Marinelli F. **2009**; Antibiotics and *Streptomyces*: The future and antibiotic discovery. *Micro-biology Today*;2:20-23

N

- Nagoba DBS, Shaikh N, Jahagirdar V, Kothadia S(2013). Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. *European Journal of General Medicine* 10, 254–258.

O

- Odds F. C., (1995). Les antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 10 (4): 285-293.
- Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC. and Rex JH (2010). An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 719-727.
- Ouhdouch, Y. (1989). Bactéries actinomycétales rares productrices d'antifongiques. Thèse de Doctorat . Université de Nancy.
- Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M., Horinouchi S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 1350. *J. Bacterial.* 190 (11):4050-60.

- Omura, S. (1992) The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.
- Oskay M., Tamer A.U. and Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology. Vol. 3 (9), pp. 441-446.

P

- Pappas PG, Kauffman, CA, Andes D, Benjamin Jr DK, Calandra TF, Edwards Jr JE, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD (2009). Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 48 (5), 503–535.
- Peignen, P., 1995. A la recherche de nouveaux antibiotiques. *La recherche* 26, 444–447.
- Pfaller M.A., (2002). Focus on fungal infections. 12, Phoenix Arizona March.
- Porter, J.N. (1971). Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. Adv Appl Microbiol, 14: 73–92.
- Prescott *et al.*, (2010). Microbiologie. 3eme édition. Paris.p: 589-603.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein D.A. (2007). Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles:805–825.
- Prescott L.M., Harley J.P., and Klein D.A. (2007). Microbiologie. 2eme Edition De Boeck et Larcier.p539
- Park NH, Shin KH, Kang MK (2017). 34 - Antifungal and Antiviral Agents, in: Dowd, F.J., Johnson, B.S., Mariotti, A.J. (Eds.), Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition). Mosby, Missouri USA, pp. 488–503.
- Peterson E.A. (1954) A study of cross antagonisms among some actinomycetes active against *Streptomyces scabies* and *Helminthosporium sativum*. Antibiot Chemother. 4: 145,149.

R

- Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL (2002) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 49: 973–980.
- Reponen, T.A., Gazenko, S.V., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Cole, E.C. (1998). Characteristics of Airborne Actinomycete Spores. *Appl Environ Microbiol*, 64 (10): 3807–3812.

S

- Saker R (2015), Recherche de nouveaux tanons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes, Thèse de Doctorat, université Ferhat Abbas, Sétif ,p 14
- Shalini K, Kumar N, Drabu S, Sharma PK (2011). Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 7 : 668–677.
- Shirling E.B. et Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Silverman JA., Perlmutter NG., Shapiro HM (2003). Correlation of Daptomycin Bactericidal Activity and Membrane Depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (8), 2538–2544.
- Slavica BI., Sandra SK., Zoran BT. (2005). Uv/Vis analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Med Biol*, 12(1) , 44–46.
- Smaoui S., 2010. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. P :251.
- Stackebrandt E. and Schumann P. (2006). Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria, dans: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. *Prokaryotes*. Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA: 297-321.
- Stackebrandt E., Rainey F. A. et Ward-Rainey N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol*. 47: 479-491.

- Stackebrandt E. and Woese C.R., (1981). The evolution of prokaryotes. Symposia of the Society for General Microbiology, 32: 1-31.
- Swayze EE, Griffey RH, Bennett CF(2007). 26 - Nucleic Acids (Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid), in: Taylor JB, Triggler DJ. (Eds.), Comprehensive Medicinal Chemistry II. Elsevier, Oxford, pp. 1037–1052.
- Sykes G. and Skinner F.A. (1973). Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Academic press. London. New York.
- Sykes JE, Papich MG(2014). Chapter 8 - Antibacterial Drugs, in: Sykes, J.E. (Ed.), Canine and Feline Infectious Diseases. W.B. Saunders, Saint Louis, P. 65-86.
- Sutthinan Khamna, Akira Yokota, John F Peberdy, Saisamora Lumyong. 2009. antifungal activity of streptomyces spp. isolated from rhizosphere of thai medicinal plants, Vol 6. N°3. P :143-147.

T

- Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R(1999). Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. Transpl Infect Dis 1, 273–283.
- Tortora GJ, Funke BR et Case CL (2019). Antimicrobial Drugs. In: Microbiology: an introduction. 13th ed . Boston. USA: Pearson , P. 558 ISBN 9780134605180
- Theilleux J. In Leveau 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.
- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.

V

- Vandeputte P(2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida Glabrata* - 168p. Th : Biologie des organismes : Angers ; 930.

- van der Rest M.E, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman Bet Konings WN (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev.* **59**, 304-322.
- Vila J, Marti S, Sanchez-Céspedes J (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*,59(6):1210_15.
- Villemagne B, Crauste C, Flipo M, Baulard AR, Déprez B, Willand N (2012). Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 51: 1-16

W

- WhiteTC, HollemanSDyF MirelsLF StevensDA(2002) Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Ch*46: 1704–1713.
- Willey J, Sherwood L, Woolverton CJ (2007). antimicrobial chemotherapy. In: Prescott/Harley/Klein's Microbiology, 7th edition. ed. McGraw-Hill Education, New York. USA, 835-858.
- Wills EA, Redinbo MR., Perfect JR., Poeta MD (2000). New potential targets for antifungal development. *Emerging Therapeutic Targets* 4, 265–296.
- Wright GD (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*,57(10) : 1451-1470.
- Wu JJ, Pang KR, Huang DB, Tying SK (2004). Therapy of systemic fungal infections. *Dermatol. Ther.* 17, 532–538.
- Wayne, L et al (1987), International committee on systematics, Bacteriology report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to Bacterial systematics Int,J syst ,Bacteriol 37,463,464
- Wayne L., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H. Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackbrandt E., Starr M. P., Truper H. G.,(1987). Report from the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic, *Int J. Syst. Bacteriol*, 37: 463-464.
- Waksman, S.A. (1959). The actinomycetes: nature, occurrence and activities. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1: 29–46.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Arch Microbiol*, 176(5): 386–90.

- Williams S. T., Goodfellow M., Wellington E. M. H. Vickers J. C., Alderson G., Sneath P. H. A., Sackin M. J. et al. (1983). A probability matrix for identification of some streptomycetes. *J Gen Microbiol.* 129: 1815-18.
- Williams, S.T., Lanning, S., Wellington, E.M.H. (1984). Ecology of Actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. 481–528.

Z

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

Annexe

Composition des milieux des cultures

Milieu ISP1

Tryptone	5g
Extrait de levure.....	3g
Agar.....	15g
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

pH = 7,2

Milieu ISP 2

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose.....	4g
Agar.....	20g
H2O distiller.....	1000ml

pH : 7.2

Milieu ISP3

Farine d'avoine	20 g
Solution saline standard	1 ml
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH=7,2

Solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O:g;

Eau distillée.....	100 ml
--------------------	--------

Milieu ISP4

Amidon	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Solution saline standard	1 ml

pH=7,2

GYEA

Extrait de levure.....	10g
Glucose.....	10g
Agar.....	18g
Eau distille.....	1000ml

PH: 6,8

ISP2 molle

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

PH : 7,2

ISP2 liquide

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

Bennet

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

pH 7,2

- **La stérilisation s'effectue par l'autoclave pendant 20 minutes à 100 C°**

La composition chimique des révélateurs utilisés est donnée ci-dessous (**Merck,1975**).

Chlorure de fer ferrique (FeCl₃) :

Révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.

-Solution de vaporisation: solution de FeCl₃ de 1 à 5% dans HCL 0,5N.

Les taches correspondant aux phénols sont colorées en bleu-vert et celles des acides hydroxamiques en Rose.

Formaldéhyde-acide sulfurique : révélateur des aromatiques polycycliques.

-solution de vaporisation: dissoudre 0,2 ml d'une solution de formaldéhyde (37%) dans 10 ml de H₂SO₄ concentré.

*les taches apparaissent de diverses couleurs (brunes, blanchâtres, etc.)

Ninhydrine: révélateur des amines, des acides aminés et des osamines.

-Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol .

*Traitement complémentaire : chauffer à 110 °C (5 à 10 min) jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette ou rose).