

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

**Étude de l'activité antifongique des souches
d'Actinomycètes isolés à partir des sols sahariens**

Présenté par : **Mme Benatti Melouka**

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury: Mr BENINE.M.A	(M.C.A/ UDL/SBA)
Examineur : Mme CHAMA.Z	(M.C.B/ UDL/SBA)
Examineur : Mme ZEMRI.K	(M.C.A/ UDL/SBA)
Promoteur : Melle KANOUN.K	(M.C.A/ UDL/SBA)
Co-Promoteur : Mme BOUCHOUICHA.S	(Doctorant/ UDL/SBA)

Année universitaire 2019 - 2020

Session : « Septembre »

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

Au terme de ce modeste travail, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier avant tous mon encadreur Dr **KANOUN.K**, qui a accepté de superviser ce travail pour ses conseils, sa disponibilité et son sérieux dans le travail. Qu'elle reçoive l'expression de ma vive gratitude.

Nos remerciements vont aussi à mon Co- encadreur madame **BOUCHOUICHA.S** pour son appui scientifique, sa rigueur, ses conseils, sa disponibilité.

Mes sincères considérations et remerciements vont également aux membres du jury : M^r **BENINE** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, M^{me} **ZEMRI** et M^{me} **CHAMA** qui ont accepté de faire partie de ce jury, d'examiner ce travail et consacrer de leur temps précieux pour l'évaluation de ce modeste travail.

À toutes la promotion de « Biotechnologie Microbienne » et les ingénieurs du laboratoire de microbiologie appliqué.

Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et qui m'ont appris une infinité de choses et m'ont aidé, conseillé et soutenu de manière continue afin de mener ce travail dans les meilleures conditions.

Dédicace

À mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que dieu les protège et leur donne la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.



À mes frères Redouane, Sidahmed et mes sœurs : Wahiba et Sara

À mon fils : Anes Abderrahmane

À mes Amies qui ont toujours été là pour moi
Ikram et Kamel pour leur amitié, leur
soutien inconditionnel et leur
encouragement.

À toute la famille Benatti.



Melouka

RESUME

Cette étude concerne l'isolement, la taxonomie et les antibiotiques antifongiques des Actinomycètes d'origine saharienne. Pour cela, 85 isolats devraient être collectés à partir de 14 échantillons de sols sahariens, et devraient faire l'objet d'une étude préliminaire de classification sur la base de leur morphologie, et également d'une évaluation de leurs propriétés antifongiques.

Les meilleurs isolats devraient être retenus pour des études plus approfondies. L'étude taxonomique basée sur les caractéristiques culturelles, micro morphologiques et chimiques (analyse des constituants cellulaires en acides aminés, en sucres et en phospholipides) devrait permettre de rattacher les isolats au genre *Streptomyces*. Sur la base des analyses physiologiques, et surtout moléculaires (PCR et séquençage de l'ADN ribosomique 16S, phylogénie), la meilleure souche antagoniste devrait être rapprochée de l'espèce *Streptomyces mutabilis*.

Un de ces isolats devrait être sélectionné sur la base de leur propriété antagoniste intéressante, particulièrement vis-à-vis de champignons filamenteux pathogènes. Des cinétiques de production des antibiotiques en milieux ISP2 et Bennett liquides devraient être montrés la présence de plusieurs maxima suggérant la sécrétion de plusieurs composés bioactifs.

La purification par HPLC devrait montrer que la souche se compose d'un seul antibiotique. Les études spectroscopiques (UV-visible et spectrométrie de masse) devraient montrer que l'antifongique est de nature non polyénique et devrait être relativement stable vis-à-vis du pH, de la température et de la lumière.

Mots clés: sols sahariens, actinomycètes, *Streptomyces*, taxonomie, propriétés antagonistes, antibiotiques.

Abstract

The goals of this study are the isolation, the taxonomy of Saharan Actinomycetes, and the study of the antifungal compounds produced by these Actinomycetes. For that, 85 isolates should be collected from 14 different samples of Saharan soils, and should be the subject of a preliminary classification study based on morphology, and an evaluation of their antifungal properties.

The best isolates should be retained for further study. The taxonomic study based on cultural, micro-morphological and chemical characteristics (analysis of cellular constituents of amino acids, sugars and phospholipids) showed that the best antagonistic strain should be related to *Streptomyces*. The best antagonist strain should be related to the species *Streptomyces mutabilis*, because of the physiological and especially molecular analyses (PCR and sequencing of ribosomal DNA 16S, phylogeny). One of these isolates should be selected, based on their interesting antagonistic properties, particularly vis-à-vis the filamentous pathogenic fungi. The kinetics of antibiotic should be realized in liquid media ISP2 and Bennett should be shown the presence of several maxima of antifungal activity, indicating the production of several antibiotic complexes.

The purification by HPLC should show that the strain composed of only one antibiotic. Spectroscopic studies (UV-visible and mass spectrometry) should show that the antifungal is non-polyenic in nature and should be relatively stable with respect to pH, temperature and light.

Keywords: Saharan soils, Actinomycetes, Streptomyces, taxonomy, antagonistic properties, antibiotics.

المخلص

تعتمد هذه الدراسة على عزل وتصنيف البكتيريا الهيفية ذات الأصل الصحراوي ومضاداتها الحيوية، لهذا الغرض يجب جمع 85 عزلة انطلاقاً من 14 عينة لأتربة صحراوية، حيث يجب أن تكون موضوع دراسة تصنيفية أولية على أساس مورفولوجيتها، وكذلك تقييم خصائصها المضادة للفطريات.

تسمح الدراسة التصنيفية المعتمدة على كل من الخصائص الاستنباتية والميكرومورفولوجية والخصائص البنوية الكيميائية على تحليل المكونات الخلوية من حيث الأحماض الأمينية والسكريات والفوسفوليبيدات حيث يجب الحاقها بالجنس *Streptomyces*.

استناداً إلى التحليلات الفسيولوجية، وخاصة الجزئية (تسلسل PCR و S16 تسلسل الحمض النووي الريبوزومي، والدراسة الوراثية)، يجب أن تتطابق أفضل سلالة مناهضة مع نوع *Streptomyces mutabilis*. يجب اختيار واحدة من هذه العزلات على أساس خصائصها العدائية القيمة، خاصة ضد الفطريات الخيطية الممرضة. يجب إظهار حركية إنتاج المضادات الحيوية في وسائط ISP2 السائلة ووسط Bennett لوجود العديد من الحدود القصوى التي تشير إلى إفراز العديد من المركبات النشطة بيولوجياً.

يجب أن تظهر التنقية بواسطة HPLC أن السلالة تتكون من مضاد حيوي واحد. يجب أن تُظهر الدراسات الطيفية (المرئية بالأشعة فوق البنفسجية وقياس الطيف الكتلي) أن المضاد للفطريات ليس بوليبيد بطبيعته ويجب أن يكون مستقرًا نسبيًا فيما يتعلق بدرجة الحموضة ودرجة الحرارة والضوء.

الكلمات المفتاحية: التربة الصحراوية، بكتيريا هيفية، التصنيف، الخصائص المضادة، المضادات الحيوية.

TABLES DES MATIERES

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Tables des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	02
Chapitre I : Les Actinomycètes	
I.1 Généralités.....	04
I.2 Ecologie et distribution dans la nature.....	05
I.3 L'importance des Actinomycètes.....	06
I.3.1 L'importance dans les domaines pharmaceutique, médical et vétérinaire.....	06
I.3.2 L'importance dans le domaine agronomique.....	07
I.4 Les caractères de détermination des Actinomycètes.....	08
I.4.1 Les caractères morphologiques.....	08
I.4.2 Les caractères cultureux.....	08
I.4.3 Les caractères chimiques.....	09
a- La paroi cellulaire.....	09
b- La structure de l'ADN.....	09
I.4.4 Les caractères physiologiques et métaboliques.....	09
I.5. Taxonomie des Actinomycètes.....	10
I.5.1. Critères actuels d'identification.....	10
I.5.2. Critères morphologiques.....	10
I.5.2.1. Caractéristiques culturelles.....	10
I.5.2.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	11
• Mycélium aérien (MA).....	11

I.5.3. Chimiotaxonomie.....	13
I.5.3.1. Les acides aminés.....	13
I.5.3.2. Les sucres.....	13
I.5.3.3. Les lipides.....	15
I.5.3.4. Les phospholipides.....	15
I.5.3.5. Les acides mycoliques.....	16
I.5.3.6. Les ménaquinones.....	16
I.5.3.7. Les acides gras.....	16
I.6. Métabolisme des Actinomycètes.....	17

Chapitre II : Les antifongiques

II.1 Historique.....	18
II.2 Principaux antifongiques naturels utilisés en médecine humaine.....	19
II.2.1. Griséofulvine.....	19
II.2.2. Nystatine.....	19
II.2.3. Amphotéricine.....	20
II.2.4. Autres agents polyènes antifongiques.....	21
II.3. Antifongiques de synthèse.....	21
II.3.1. Le chlormidazole.....	21
II.3.2. Le tolnaftate.....	22
II.3.3. La flucytosine.....	22
II.3.4. Les imidazoles.....	23
II.3.5. Les antifongiques allylamines.....	25
II.3.6. Les antifongiques non classés.....	26
II.4. Nouveaux antifongiques d'origine naturelle.....	26
II.4.1. Echinocandines.....	27
II.4.2. Nikkomycines.....	27
II.4.3. Pradimicines.....	27

Chapitre III: Matériel et Méthodes

III.1. Objectifs.....	28
III.2. Échantillons de sols.....	28
III.3. Isolement des souches d'Actinomycètes.....	28

III.3. 1. Milieu d'isolement.....	28
III.3. 2. Agents sélectifs.....	28
III.3. 3. Ensemencement et incubation des Actinomycètes.....	29
III.3.4. Reconnaissance des Actinomycètes.....	29
III.3.5. Purification et conservation.....	29
III.4. Étude morphologique.....	29
III.4.1. Étude micro-morphologique.....	29
Coloration de Gram.....	29
Culture sur lamelle.....	30
III.4.2. Étude macro-morphologique.....	30
• Observation à l'œil nu.....	30
• Observation à la loupe binoculaire.....	30
III.5. Étude des antifongiques des souches d'Actinomycètes.....	31
III.5.1. Protocole général d'étude des antifongiques.....	31
III.5.2. Les isolats d'Actinomycètes.....	32
III.5.3. Technique des stries croisées.....	32
III.5.4. Cinétique de production et détection des antibiotiques en milieux liquides.....	32
III.5.4.1. Milieux de culture.....	32
III.5.4.2. Pré-cultures.....	32
III.5.4.3. Cinétique de production des antibiotiques.....	32
III.6. Extraction des antibiotiques.....	33
III.6.1. Extraction à partir du filtrat de culture.....	33
III.6.2. Extraction à partir du mycélium.....	34
III.7. Tests d'Antibiographie.....	34
III.8. Semi-purification des antibiotiques.....	34
III.8.1. Par chromatographie sur colonne de gel de séphadex LH-20.....	35
III 8.2. Sur plaques épaisses de gel de silice.....	35
III. 9. Étude de la stabilité de l'activité antibiotique.....	35
III.9.1. Stabilité en fonction du pH.....	36
III.9.2. Stabilité en fonction de la température.....	36

III 9.3. Stabilité à la lumière.....	36
III.10. Purification par HPLC.....	36
III.11. Études spectroscopiques des antibiotiques.....	37
III.11.1. Spectroscopie UV-visible.....	37
III.11.2. Spectrométrie de masse.....	37

IV. Résultats et Discussion

Résultats.....	38
Conclusion.....	40
Références bibliographiques.....	41
Annexes	

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

Aw : Activité de l'eau

BLAST: Basic Local Aligement Search Tool

Bn: Bennett

c.sp : chaines de spores

CCM : Chromatographie sur couche mince

DAP : L'acide diaminopimélique

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

H₂: Hydrogène

ISP2: International *Streptomyces* Project n° 2

J.C : Jésus Christ

MA : Mycélium aérien

MA : Mycélium aérien.

mm : Millimètre

MS : Mycélium du substrat

MS : Mycélium du substrat.

pH : Le potentiel hydrogène

RA : Retinaculum Apertum

RA : Retinaculum Apertum (chaines en crochets ou en boucles)

RF : Rectus Flexibilis

RF : Rectus Flexibilis (chaines de spores droites à flexueuses)

S : Spira (chaines spiralées)

s : Sporophore

sg : Sporangies

spi : Spores isolées

spm : Spores mobiles

VIH : Le virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures

	Numéro de page
Figure.01 : Coupe transversale d'une colonie d'Actinomycètes.....	03
Figure.02 : Pourcentage d'antibiotiques produits par les principaux genres d'Actinomycètes.....	05
Figure.03 : Micromorphologie des principaux genres d'Actinomycètes.....	12
Figure.04 : Griséfuline® Laboratoire Sanofi Winthrop.....	18
Figure.05 : Mycostatine ® Laboratoire Bristol Myers Squibb.....	19
Figure.06 : Fungizone ® Laboratoire Bristol-Myers-Squibb.....	20
Figure.07 : Sporiline® Laboratoire Schering-Plough.....	21
Figure.08 : Ancotil ® Laboratoire Roche.....	22
Figure.09 : (a) Daktarin®, (b) Triflucan® Laboratoire Pfizer, (c) Sporanox® Laboratoire Janssen Cilag.....	23
Figure.10 : Econazole (Pevaryl®) laboratoire Janssen-Cilag.....	24
Figure.11 : Clotrimazole (Trimysten®), laboratoire Roger Bellon.....	24
Figure.12 : Voriconazole (Vfend ®).....	24
Figure.13 : Naftifine.....	25
Figure.14 : Lamisil® Laboratoire Novartis Pharma.....	25
Figure.15 : Locéryl® Laboratoire Roche.....	25
Figure.16 : Protocole général montrant l'isolement, les tests d'antagonisme et les études des antibiotiques.....	31

Liste des tableaux

	Numéro de page
Tableau.01 : Les taxa de l'ordre des Actinomycétales.....	10
Tableau.02 : Principaux chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.....	13
Tableau.03 : Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes.....	14
Tableau.04 : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycètes.....	18
Tableau.05 : Programme du gradient d'éluion par HPLC.....	36

Introduction

Introduction

La fréquence des infections fongiques a augmenté de façon dramatique au cours des deux dernières décennies, en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés, comme les personnes atteintes d'un cancer, infectées par le VIH ou ayant subi une greffe d'organe solide (**Odds, 1995, Ampel, 1996, Pfaller, 2002, Ascioğlu et al., 2002**). En outre, les procédures de plus en plus invasives, telles les chimiothérapies et les greffes de cellules souches hématopoïétiques, l'usage accru de sondes vasculaires et l'utilisation prolongée d'antibiotiques à large spectre constituent d'autres facteurs prédisposant au développement d'une mycose profonde (**Yashuda, 2001**).

La situation est similaire en thérapie animale, en agriculture, en agroalimentaire, dans les différentes industries où les champignons font des ravages particulièrement dans les pays en développement, et contre lesquelles on ne dispose pas d'antifongiques efficaces ou de fongicides non toxiques, non polluants et si possible biodégradables (**Larpent et al., 1989, Sanglier et al., 1993, Sanglier et Trujill, 1997**).

En médecine humaine, les genres *Candida* et *Aspergillus* sont les principaux champignons pathogènes (**Carle, 2003, Holding et al., 2003, Kam et Lin, 2002**). Le taux de mortalité associé aux infections invasives est très élevé (**Bow et al., 1997, Singh Navery et al., 2003**). L'amphotéricine B représente toujours la norme de référence thérapeutique mais son profil d'innocuité est médiocre, surtout au niveau des réactions en cours de perfusion et de la néphrotoxicité (**Wingard et al., 1999, Harbath et al., 2002**). Les formulations phospholipidiques présentent un meilleur profil de tolérabilité mais leur coût est énorme (**Wingard et al., 2000, Fleming et al., 2001**). Parmi les dérivés azolés, le fluconazole est relativement bien toléré, mais n'offre aucune efficacité clinique contre le genre *Aspergillus* et certaines souches du genre *Candida* (**Bradbury et Jick, 2002**). L'itraconazole couvre l'*Aspergillus* mais n'est disponible que par voie orale et les capsules, présentent une faible biodisponibilité (**De beule et Gestel, 2001**). Le voriconazole semble prometteur dans le traitement de l'Aspergillose invasive (**Walsh et al., 2002, Johnson et Kauffman, 2003**). Par ailleurs, un premier antifongique de la classe des échinocandines a fait son apparition, soit la caspofongine.

Ce dernier agent nous offre une solution intéressante en cas d'infection réfractaire ou d'intolérance (**Denning, 2002**). L'association de deux antifongiques pour traiter les infections sévères semble attrayante mais, d'autres études sont nécessaires (**Albengres et al., 1998, Arathoon et al., 2002**). Finalement, plusieurs nouveaux médicaments et de nouvelles classes pharmacologiques comme les nikkomycines et le voriconazole par exemple, peuvent s'ajouter à notre arsenal thérapeutique (**Potoski et Brown., 2002, Walsh et al., 2002, Arnest, 2001**).

Les meilleurs agents antifongiques mis sur le marché médical sont tous des produits de fermentation (**Perez et al., 2002**). Les Actinomycètes représentent les principales sources de métabolites secondaires à activité anticellulaire (**Finance et al., 1985**). Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent 50 % de la population totale des Actinomycètes du sol et 75 % des molécules à activité antibiotiques sont produites par ce genre. Il faut continuer à chercher parmi ces genres des souches nouvelles capables d'offrir des substances intéressantes (**Larpent et al., 1989**). En outre, les bactéries Actinomycétales dites rares constituent une source potentiellement importante et encore peu explorée de nouveaux métabolites secondaires à activité antibactérienne et antifongique (**Finance et al., 1985, Hacène et al., 1994, Ouhdouch et al., 2001, Khattabi et al., 2002, Lemriss et al., 2003, Zitouni et al., 2005, JunWang, 2006**). Leur isolement sélectif à partir de divers écosystèmes inexplorés, a conduit à la découverte de nouvelles substances intéressantes parmi les genres *Micromonospora*, *Actinomadura* et *Streptosporangium* (**Shearer et al., 1997, Lamari et al., 2002**).

Dans ce travail, nous nous sommes fixés comme objectifs essentiels:

- D'étudier les milieux et les conditions d'isolement sélectif des Actinomycètes à partir des sols arides et semi-arides du sud algérien.
- D'isoler et de sélectionner, à partir de ce type d'écosystème extrême, des souches d'Actinomycètes rares.
- D'étudier l'activité antifongique vis à vis de champignons pathogènes.

Revue bibliographiques

I. Les Actinomycètes

I.1. Généralité

Les Actinomycètes ont été définis comme étant des bactéries Gram positives ayant un G+C (>55%) élevé. À l'origine, ils ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et champignons, mais ce sont des organismes procaryotes (**Naikpatil et Rathod, 2011 ; Khan et Patel, 2011**). Leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques, les rangent parmi les procaryotes (**Williams et al., 1973**). Leur paroi cellulaire, ne renferme ni chitine ni cellulose, mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimilique (forme oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (**Lechevalier et Lechevalier, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990**).

Ils présentent des hyphes embranchés et des spores (**Betelli et al., 2013**). L'embranchement du mycélium peut se présenter sous deux formes : mycélium de substrat et mycélium aérien (**Sulaiman Ali Alharbi et al., 2012**).

Dans la rhizosphère, les Actinomycètes appartenant au genre *Frankia* sont extrêmement importants pour de nombreux types de plantes. Cette importance réside dans le fait qu'elles sont capables de noduler les racines de ces plantes et de fixer l'azote atmosphérique. Cette association est appelée : association actinorhizienne (**Prescott et al., 2007**).

Les Actinomycètes ont été également isolés dans de nombreux environnements aquatiques. Ils ont été isolés à partir des eaux de mer et sédiments marins (**Jensen et al., 1991 ; Ghanem et al., 2000**) ; d'eau douce (**Kitouni et al., 2005**) et dans les marécages salés (**Al-Zarban et al., 2002 ; Boughachiche et al., 2005**).

Les Actinomycètes se rencontrent également sur les débris des végétaux qu'on trouve au bord des rivières et des lacs, les champs de riz (**Wang et al., 2006**) et les cavernes naturelles (**Lee, 2006**), Beaucoup sont capables de sporuler, ce qui leur permet de survivre en conditions défavorables tel que la salinité (**Zaitlin et Watson, 2006**). Cette propriété joue un rôle principal dans leur distribution. (**Voir figure.01**)

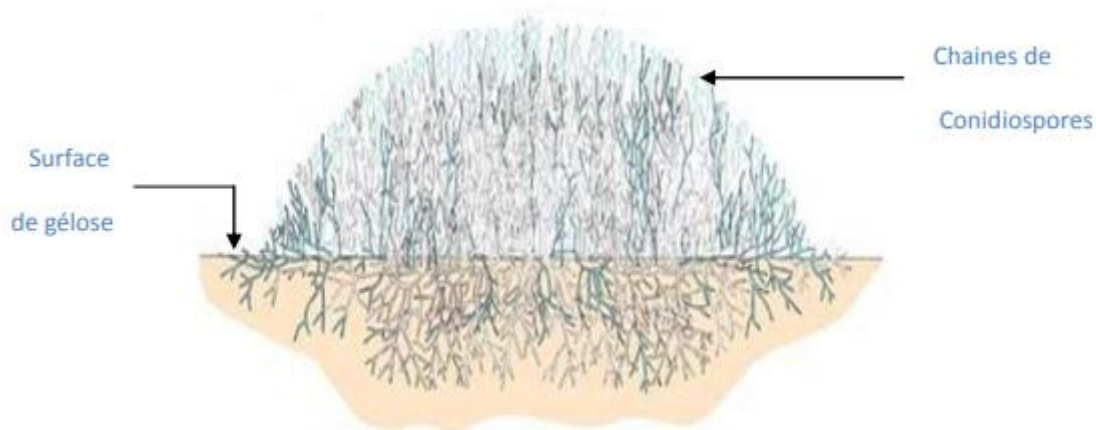


Figure .01 : Coupe transversale d'une colonie d'Actinomycètes. (Prescott *et al.*,2003).

Les Actinomycètes sont surtout réputés pour leur production de nombreux métabolites antimicrobiens. Environ 70% des molécules d'origine microbienne connues sont sécrétées par les Actinomycètes (Badji *et al.*, 2009).

Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et ayant comme habitat le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (Leminor, 1989).

I.2. Ecologie et distribution dans la nature

Les Actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures. Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint généralement les 10^6 germes par gramme de sol séché (Goodfellow et Williams, 1983).

D'après (Waksman, 1967), le rapport Microorganisme totaux / Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries Actinomycétales, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 centimètre ne contient que (40%) ou beaucoup moins jusqu'à seulement 16%. Elles sont généralement plus nombreuses que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Goodfellow et Williams 1983). La

majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau (a_w) est très basse (**Davies et Williams, 1970, Goodfellow et Williams, 1983**).

Les sols sahariens sont caractérisés par une teneur minimale en eau avec un degré de pluviométrie souvent inférieur à 100 mm par an, des températures extrêmement élevées et de faibles quantités d'humus. Des travaux anciens ont prouvé définitivement que les sols désertiques ne sont pas stériles, ils sont peuplés d'une flore microbienne très variée. Parmi les bactéries isolées, les actinomycètes font partie essentielle de cette microflore, leurs présences est considérable dans ce type d'écosystème extrême (**Killian et Feher, 1939**).

I.3. L'importance des Actinomycètes

I.3.1. L'importance dans les domaines pharmaceutique, médical et vétérinaire

Les Actinomycètes sont les producteurs d'antibiotiques les plus efficaces du monde vivant. Plus des deux tiers des quelques six milles antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par cet ordre de bactéries-actinomycine, streptomycine, néomycine et candidine...etc. (**Lazzarini et al, 2000 ; Berdy, 2005**).

Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les Actinomycètes. Elles sont déjà utilisées en industrie agro-alimentaire (ex : glucose isomérase), en thérapeutique (cholestérol oxydase), en vétérinaire, comme additif nutritionnel pour l'élevage (**Oestergraard et al., 2001**), ou encore en industrie chimique, avec addition des protéases aux détergents (**Moreira, 2002**). Des antiviraux (**Kim et al., 1998**), des substances utilisées en neurothérapie (trouble du système nerveux centrale et dégénérescence des neurones) (**Murakata et al., 1998 ; Eder et al., 2002**), des antihistaminiques (**Kase et al., 1986 ; Ohmori et al., 1988**), sont également produits. Non seulement les Actinomycètes sont une riche source d'enzymes mais, inversement, ils produisent aussi de nombreux inhibiteurs d'enzymes (**Imada, 2006**).

Près de 20% des antibiotiques sécrétés par les *Streptomycètes* ont un pouvoir antifongique, les 80% restants ayants des propriétés assez diverses : antibactériennes et antifongiques à la fois, antivirales, anti tumorale, insecticides et anti helminthes...etc. (**Buckingham, 1997**). (**Figure.02**).

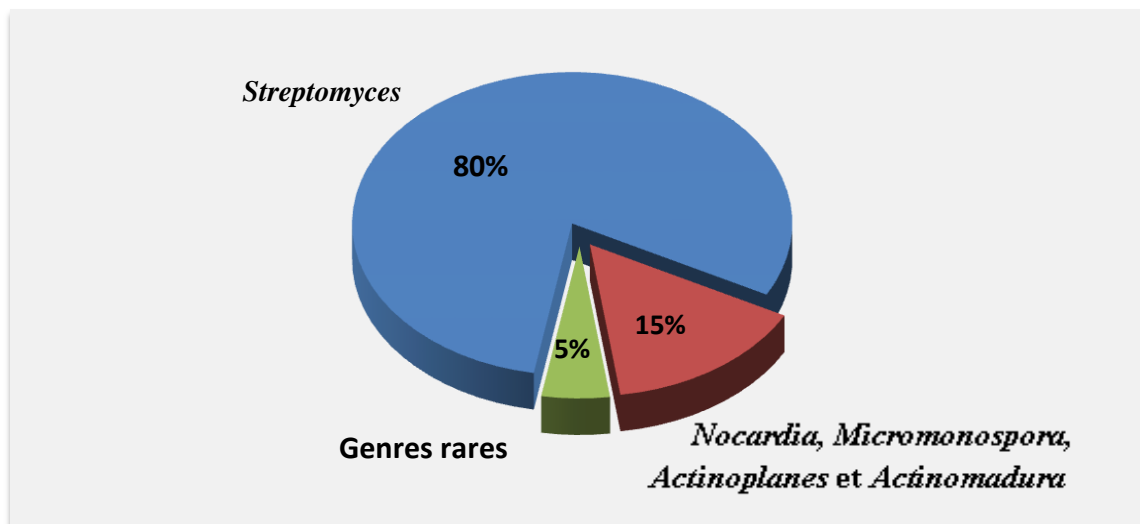


Figure .02 : Pourcentage d'antibiotiques produits par les principaux genres d'Actinomycètes (Okami et Hota, 1988).

I.3.2 L'importance dans le domaine agronomique

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

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

Leur grand pouvoir antagoniste leur confère également un rôle dans la distribution écologique des microorganismes (Dommergues et Mangenot, 1970) et dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes telluriques (Goodfellow et Williams, 1983 ; Moustiri, 1992, Merrouche, 2001).

Les antibiotiques qu'ils produisent sont parfois utilisés dans la lutte chimique contre les maladies des plantes d'origine microbienne, comme le cas de la kasugamycine, la blasticidine et les polyxines. Ces dernières sont utilisées à grande échelle depuis longtemps au Japon contre certaines maladies du riz (Misato, 1982). Le genre *Frankia* est très connu en foresterie pour son rôle dans la fixation d'azote atmosphérique, en symbiose dans les nodules racinaires de certaines arbres dicotylédones (autres que les légumineuses), comme le casuarina, l'orme et l'aulne...etc.

(Becking 1974, Lechevalier, 1981). Ces plantes arbustives sont utilisées pour le reboisement des sols pauvres en matière organique.

I.4. Les caractères de détermination des Actinomycètes

Les Actinomycètes constituent un groupe bactérien très varié dont l'appartenance ou non à un genre donné est très délicate à établir. L'étude des caractères morphologiques, des caractères cultureux et la composition chimique de la paroi cellulaire la permet de séparer ces microorganismes avec une grande précision en groupes et genres différents et d'identifier ces bactéries jusqu'au niveau de l'espèce (Goodfellow et Williams, 1983 ; Moustiri, 1992, Merrouche, 2001).

I.4.1. Les caractères morphologiques

La morphologie des différents groupes d'Actinomycètes varie de simple bacille diphtéroïde à des formes mycéliennes complexes, certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux : mycélium végétatifs, ou de substrat constitué par des hyphes, qui pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface. Cette formation montre la capacité des Actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (Becking 1974, Lechevalier, 1981).

Morphologiquement, les Actinomycètes peuvent être classés en deux groupes : le premier se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forment seulement une masse de filaments ramifiés (mycélium), le second comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (Becking 1974, Lechevalier, 1981).

I.4.2. Les caractères cultureux

Les colonies des Actinomycètes sont de taille moyenne et présentent une apparence macroscopique évocatrice d'une moisissure, leur morphologie générale ressemble fortement à celle des mycètes (Hsu et Lockwood, 1975).

Ces colonies (1 à 4 mm de diamètre) formés sur milieu solide sont caractéristiques. Elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas chez les autres bactéries, elles ont un aspect compacte sec, lisse ou rugueux, poudreux ou en choux fleurs, à contours lisse ou échancrés plus ou moins profondément. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, orange, vert, violet, rose, gris et noir.

- Chez les Actinomycètes anaérobies, l'observation en milieu liquide a montré la formation de grain de taille variable, sédimentant au fond du tube sur les parois.
- Chez les Actinomycètes aérobies dans les milieux liquides, les cultures apparaissent sous forme de voiles de grumeaux (**Larpent et al., 1989**).

I.4.3. Les caractères chimiques

La composition chimique de la paroi cellulaire des Actinomycètes est un outil pratique pour leur taxonomie, elle se montre surtout efficace pour délimiter des groupes et des genres (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**).

a) La paroi cellulaire

La composition de la paroi des Actinomycètes varie fortement d'un groupe à l'autre ; et ne renferme ni chitine ni cellulose, mais une glycoprotéine contenant la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (forme oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (**Williams et al., 1989**).

b) La structure de l'ADN

La taille de chromosome des Actinomycètes est de 3,7 Méga Daltons. Le temps de dédoublement cellulaire chez les Actinomycètes est de 95 mm, alors que la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 60 mm.

La composition de l'ADN permet de définir les familles d'Actinomycètes, pour cela les chercheurs ont étudié, le coefficient de Chargaff (GC%) qui présente le nombre de paires de bases de guanine et de cytosine pour 100 paires de bases dans l'ADN. Les Actinomycètes dont le coefficient de Chargaff (GC%) est généralement compris entre 60 et 75%, appartenant au genre *Streptomyces*, occupent le haut de la gamme (73 à 75%) (**Williams et al., 1989**).

I.4.4. Les caractères physiologiques et métaboliques

Les Actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive, généralement aérobies à métabolisme oxydatif, plus rarement anaérobies à métabolisme fermentatif. Organismes hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique (**Goodfellow, 2004**).

Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tels que, le charbon par pénétration mécanique de la matrice (**Goodfellow, 2004**).

Les *Actinomycètes* sont des bactéries saprophytes, ils participent à la dégradation de la matière organique et donc au recyclage des polymères complexes tels que, la cellulose, la lignocellulose, la lignine, la kératine, la chitine, la pectine et le xylane par la production des enzymes extracellulaires qui sont d'une importance capitale dans l'industrie, plusieurs enzymes sont cités à savoir : les ligninases, les cellulases, les pectinases, les chitinases, les xylanases, les dextrinases, les amylases, les protéases et les lipases. Ils produisent aussi des métabolites secondaires, tels que les vitamines, les antibiotiques et les antifongiques (**Okami et hotta, 1988, Barakat *et al.* 2002**).

Les Actinomycètes préfèrent un pH neutre ou basique (pH=8,5), ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles en tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Okami et hotta, 1988, Barakat *et al.*, 2002**).

I.5. Taxonomie des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont classés dans 36 Familles et 120 genres; quelque sous- ordre ont pu également être définis. (**Voir Tableau.01**).

I.5.1. Critères actuels d'identification

La systématique des Actinomycètes est basée actuellement sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires (**Larpent *et al.*, 1989**).

I.5.2. Critères morphologiques

Les critères morphologiques font appel aux caractéristiques culturales sur différents milieux de culture et aux caractéristiques micromorphologiques (**Larpent *et al.*, 1989**).

I.5.2.1. Caractéristiques culturales

Il s'agit alors de noter :

- La présence ou l'absence de MA.
- La couleur du MA et du MS.
- La production et la couleur des pigments diffusibles.
- La production ou non de pigments mélanoïds. Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.

I.5.2.2. Caractéristiques micromorphologiques

La micromorphologie de quelques genres principaux est schématisée dans la **Figure.03**. Elle est déterminée par observation directe au microscope optique (objectifs X10 et X40), des cultures poussant sur les milieux gélosés. Certains détails nécessitent l'observation entre lame et lamelle en utilisant l'objectif X100 au microscope optique ou parfois l'utilisation du microscope électronique à balayage ou à transmission. Les observations portent généralement sur le MA et le MS. (**Tresner *et al.*, 1961**).

a) Mycélium aérien (MA)

- MA stérile, fragmenté ou sporulant.
- Spores mobiles ou non, isolées ou regroupées par 2, par 4 ou en chaînes plus ou moins longues. Les spores peuvent être sessiles ou portées par des sporophores courts ou longs, ou encore formées anarchiquement sur le MA. Les chaînes de spores peuvent être droites à flexueuses (type RF), en crochets ou en boucles fermées (type RA).

Tableau.01 : Les taxa de l'ordre des Actinomycétales (Euzéby, 2013).

Sous-Ordres	Familles	Genres
<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobaculum</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Arcanobacterium</i> et <i>Mobiluncus</i> .
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i> , <i>Luteococcus</i> , <i>Micrococcus</i> et <i>Propioniferax</i> .
ND	<i>Nocardioideae</i>	<i>Nocardioides</i> , <i>Aeromicrobium</i> .
ND	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> et <i>Oerskovia</i> .
ND	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Promicromonospora</i> .
ND	<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Dermatophilus</i> , <i>Kineosphaera</i> .
ND	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i> .
ND	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Intrasporangium</i> , <i>Janibacter</i> , <i>Knoellia</i> , <i>Terrabacter</i> , <i>Terracoccus</i> et <i>Tetrasphaera</i> .
ND	<i>Jonesiaceae</i>	<i>Jonesia</i> .
ND	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i> , <i>Agreia</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Frigoribacterium</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Mycetocola</i> , <i>Okibacterium</i> , <i>Plantibacter</i> , <i>Rathayibacter</i> et <i>Subtercola</i> .
ND	<i>Bogoriellaceae</i>	<i>Bogoriella</i> .
ND	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Dermacoccus</i> , <i>Demetria</i> et <i>Kytococcus</i> .
ND	<i>Rarobacteraceae</i>	<i>Rarobacter</i> .
ND	<i>Sanguibacteraceae</i>	<i>Sanguibacter</i> .
ND	Famille non définie	<i>Beutenbergia</i> , <i>Ornithinicoccus</i> , <i>Ornithinimicrobium</i> et <i>Salana</i> .

<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i> , <i>Turicella</i> .
ND	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i> .
ND	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> .
ND	<i>Gordoniaceae</i>	<i>Gordonia</i> .
ND	<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>Tsukamurella</i> .
ND	<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia</i> .
ND	<i>Williamsiaceae</i>	<i>Williamsia</i> .
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Kibdelosporangium</i> , <i>Prauserella</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> et <i>Thermocristum</i> .
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Streptosporangium</i> , <i>Acrocarpospora</i> , <i>Herbidospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Planopolyspora</i> et <i>Planotetraspora</i> .
ND	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i> , <i>Streptimonospora</i> .
ND	<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Spirillospora</i> et <i>Actinocorallia</i>
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Asanoa</i> , <i>Catellatospora</i> , <i>Catenuloplanes</i> , <i>Couchioplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Pilimelia</i> et <i>Virgosporangium</i> .
<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae</i>	<i>Frankia</i> .
ND	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus</i> , <i>Blastococcus</i> et <i>Modestobacter</i> .
ND	<i>Microsphaeraceae</i>	<i>Microsphaera</i> .
ND	<i>Sporichthyaceae</i>	<i>Sporichthya</i> .
ND	<i>Acidothermaceae</i>	<i>Acidothermus</i> .
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Glycomyces</i> .

ND : Sous-Ordre non encore défini.

I.5.3. Chimiotaxonomie

Plusieurs études ont montré que la chimiotaxonomie consiste en l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Ces caractères ont été surtout étudiés au niveau des parois cellulaires. En effet, les caractères adoptés par la classification classique dépendent de la nature des composés chimiques des microorganismes (**O'Donnell, 1988**). Les composés majeurs adoptés par cette classification sont les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

I.5.3.1. Les acides aminés

La muréine, ou peptidoglycane, est un composant majeur de la paroi des bactéries à Gram+, dont les Actinomycètes. L'analyse des acides aminés qui la constituent est utilisée pour déterminer des chimiotypes. Deux acides aminés sont taxonomiquement très importants, l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous deux formes, L ou D selon les genres et la glycine qui peut être présente ou absente. Cette dernière forme des liaisons « ponts » entre les sous-unités peptidique de la muréine (**Becker et al., 1964 et 1965, Yamaguchi, 1965, Lebeda et al., 1984**). Chez certains Actinomycètes génétiquement proches des bactéries non mycéliennes, l'acide diaminopimélique (DAP) est remplacé par la lysine ou bien par l'ornithine ou encore l'acide diaminobutyrique.

I.5.3.2. Les sucres

Les sucres sont principalement les couples arabinose galactose, arabinose xylose, rhamnose galactose, ainsi que le madurose ou 3-0-méthyl galactose (**Lechevalier et Gerber, 1970 ; Lechevalier et Lechevalier, 1970 ; Labeda et al., 1989**). Sur la base de la composition des cellules en acides aminés et en sucres, plusieurs chimiotypes ont ainsi été définis (**Tableau.02**).

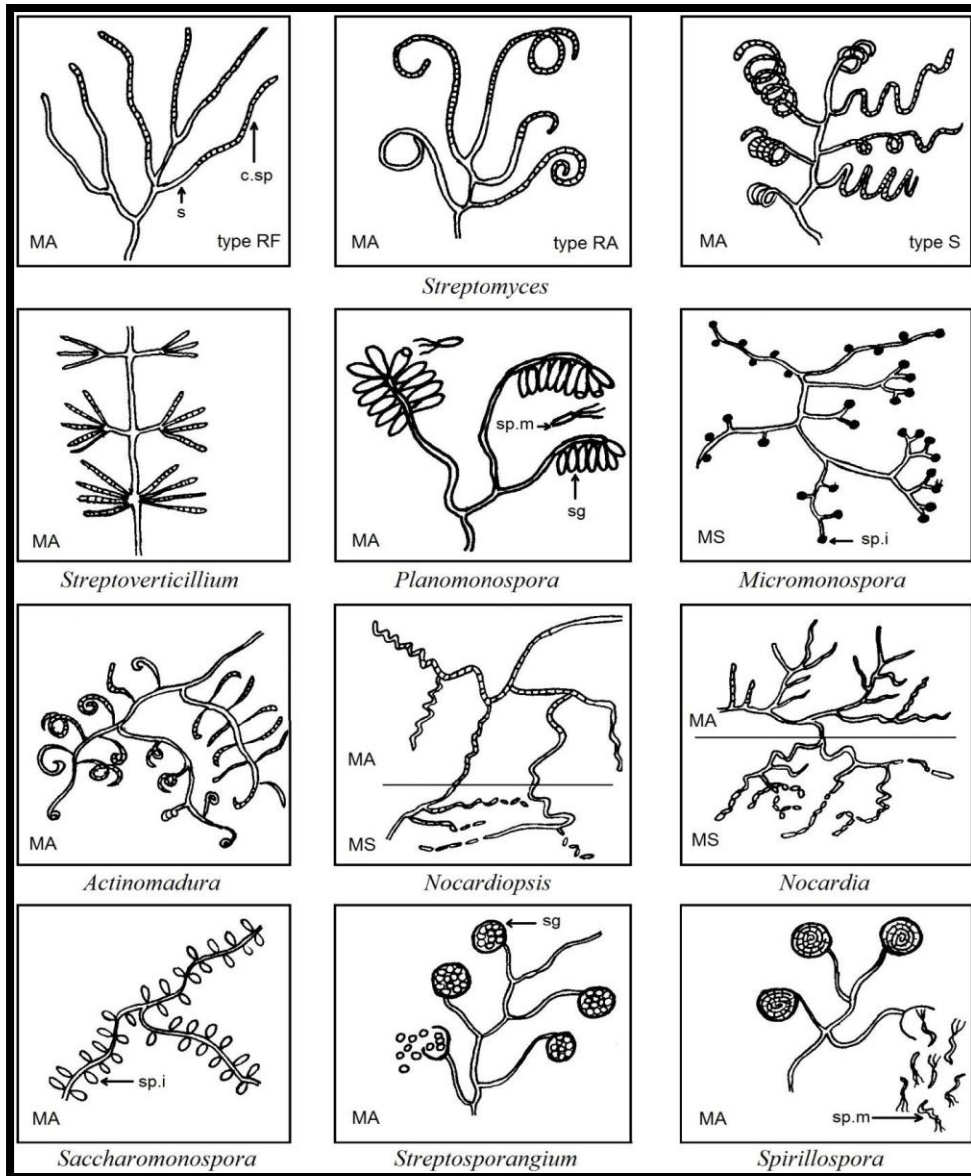


Figure .03 : Micromorphologie des principaux genres d'Actinomycètes (Sabaou, 1988).

MA, mycélium aërien ; **MS**, mycélium du substrat ; **RF**, Rectus Flexibilis (chaines de spores droites à flexueuses) ; **RA**, Retinaculum Apertum (chaines en crochets ou en boucles) ; **S**, Spira (chaines spiralées) ; **s**, sporophore ; **c.sp.**, chaines de spores ; **sp.i.**, spores isolées ; **sp.m**, spores mobiles ; **sg**, sporanges.

Tableau .02 : Principaux chimiotypes rencontrés chez les Actinomycètes (**Becker et al., 1965**).

Chimiotype	Acide diaminopimélique		Glycine	Sucres			
	Forme L	Forme D		Arabinose + galactose	Arabinose + xylose	Rhamnose + Galactose	Madurose
I C	+	-	+	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	+	-	-
III B	-	+	-	-	-	-	+
III C	-	+	-	-	-	-	-
III E	-	+	-	-	-	+	-
IV A	-	+	-	+	-	-	-

Note : I, II, III, IV est définis par (**Becker et al., 1965** ; **Yumaguchi, 1965** ; **Lechevalier et Lechevalier, 1970**), en se basant sur la forme L ou D de l'acide diaminopimélique et la présence ou non de glycine.

A, B, C, D et E : définis par (**Lechevalier et Lechevalier, 1970** ; **Labeda, 1989** ; **Stackebrandt et al., 1994**), en se basant sur la présence ou non des sucres.

I.5.3.3. Les lipides

La composition des Actinomycètes en lipides membranaires (phospholipides, ménaquinones, acides gras) ou pariétaux (acides mycoliques) est également un critère de détermination de chimiotypes (**Küster et Williams, 1964**).

I.5.3.4. Les phospholipides

La diversité des phospholipides a permis aux chercheurs de distinguer cinq chimiotypes notés de PI à PV qui sont caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques. (**Lechevalier et al., 1977**). (**Tableau.03**).

Tableau.03 : Types de phospholipides rencontrés chez les Actinomycètes. (**Lechevalier et al., 1977**).

Types de phospholipides	Phosphatidyl-thanolamine	Phosphatidyl - choline	Phospholipides avec glucosamine	Phosphatidyl-glycérol
PI	-	-	-	V
PII	+	-	-	- V
PIII	-	+	-	-
PIV	+	-	+	+
PV	-	-	+	

Note : Tous les Actinomycètes possèdent le phosphatidylinositol. +: présent; -: absent; v: variable suivant les espèces et les souches.

I.5.3.5. Les acides mycoliques

Ce sont des composés pariétaux présents uniquement chez les Actinomycètes ayant le chimiotype A. Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence (**Mordarska et al., 1972**).

I.5.3.6. Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des composés lipidiques membranaires constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique, contenant des unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (**Collins et al., 1980**).

Ex : ménaquinone MK10 (H₂) présent chez *Nocardiosis* : ménaquinone avec dix unités isoprènes dont deux sont hydrogénées. Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus avec les phospholipides. (**Prescott et al., 2003**).

I.5.3.7. Les acides gras

La composition en acides gras des membranes plasmiques a également contribué dans la séparation entre certains genres (**Minnikin et al., 1975**) ; et est utilisée en combinaison avec les

autres critères chimiques. Leurs types et leurs pourcentages sont caractéristiques de plusieurs genres (**Grund et Kroppenstedt, 1990 ; Kroppenstedt *et al.*, Rainey *et al.*, 1996**).

I.6. Métabolisme des Actinomycètes

Deux propriétés les plus significatives des Actinomycètes, sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs parmi lesquels, on compte les deux tiers des antibiotiques produits par des micro-organismes. Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien (**Theilleux, 1993**).

- ❖ Ces bactéries sont aérobies, mésophiles, leur température optimale est de 25-30 °C, leur pH optimal est de 6,5-8 (**Guiraud, 1998**).
- ❖ Les Actinomycètes sont généralement hétérotrophes, certains étant chimio-autotrophes, ils peuvent utiliser une grande variété de substances comme sources de carbone et d'azote tels que la chitine, la kératine, la cellulose, le xylane, le plastique, le nitrate et les polluants pétroliers (**Guiraud, 1998**).

Tableau.04: Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycètes (Larpent, 2000).

Acides aminés	Sucres	Critères morphologiques	Genres et groupes
m-DAP	Xylose + Arabinose	Pas de sporanges ; conidies isolées sur le mycélium végétatif	<i>Micromonospora</i>
		Pas de sporanges, courtes chaînes de conidies	<i>Cattellatospora</i>
		Chaînes de conidies sur mycélium aérien	<i>Glycomyces</i>
		Sporanges oligosporiques, dactyloïdes. Spores mobile	<i>Dactylosporangium</i>
		Sporanges avec spores sphériques, mobiles	<i>Actinoplanes</i>
		Sporanges avec spores mobiles en bâtonnets	<i>Ampullariella</i>
		Sporanges, spores avec flagelles latéraux	<i>Pilimelia</i>
		Sporanges multiloculaires, spores immobile	<i>Frankia</i>
	Madurose	Courtes chaînettes de conidies sur mycélium aérien, incurvées en crosse	<i>Actinomadura</i>
		Chaînes de conidies avec de spores	<i>Microbispora</i>
		Chaînes de conidies avec 2-6 spores	<i>Microtetraspora</i>
		Sporanges avec 2 spores mobiles	<i>Planobispora</i>
		Sporange avec 1 spore mobile	<i>Planomonospora</i>
		Sporanges sphériques sur mycélium contenant de nombreuses spores mobiles en bâtonnets	<i>Spirillospora</i>

II. Les antifongiques

II.1. Historique

Pendant des centaines d'années, les infections fongiques de la peau et des muqueuses ont été traitées par toutes sortes de médicaments populaires. Les infections du cuir chevelu ont été traitées en l'ans 23-79 avant J.C, par des préparations telles que, la graisse d'ours mélangée à des extraits de plantes, des cendres de corne de cerf dans du vin, de la bile de chèvre dans de la craie et du vinaigre, de la bile de truie mélangée à l'urine de taureau et du jus d'ail dans la graisse d'oie (**Ainsworth, 1986**). Parmi tous ces composés, seul l'ail est encore mentionné aujourd'hui en phytothérapie comme remède antifongique éventuel (**Odds, 1995**).

Au début du 20^{ème} siècle, les produits chimiques de synthèse et les colorants ont remplacé tous ces mélanges rudimentaires anciens. Ainsi, pour le traitement des infections à dermatophytes du cuir chevelu, le dermatologue **Raymond Sabouraud en 1910** a décrit une pâte à base d'amidon, de résine et de farine contenant du carbonate de cuivre en tant qu'ingrédient actif pour l'infection de la peau glabre, il recommandait la teinture d'iode. Depuis, plusieurs préparations contenant du soufre, du permanganate de potassium ou des sels de métaux lourds comme l'argent et le mercure, ont été utilisées pour le traitement topique des infections à dermatophytes (**Ainsworth, 1986**).

Nombreuses préparations anciennes ont été abandonnées, seules trois préparations antifongiques topiques du début du siècle sont encore prescrites aujourd'hui. La première est à base d'acide benzoïque et d'acide salicylique sous forme de pommade (**Whitfield, 1912**), la seconde est la teinture de triphénylméthane, le violet de gentiane (**Faber et Dickey, 1925**) et la troisième, rarement utilisée aujourd'hui, est «la teinture de Castellani » formulée à base de carbol-fuchsine (**Castellani, 1928**).

Tous les mélanges cités précédemment sont toxiques, ils montrent en plus d'une activité antifongique, une action antibactérienne aussi efficace, ce ne sont donc pas de véritables antifongiques spécifiques. Parmi les premiers composés antifongiques, certains ont été initialement considérés comme des agents antibactériens mais, plus tard, ils ont révélé une activité contre certains champignons. Ces composés étaient entre autres le cyclo-heximide (qui inhibe *Cryptococcus neoformans*) et les sulfon-amides (la sulfadiazine inhibe *Paracoccidioides brasiliensis*) (**Oxford et al., 1939**).

Les premiers antifongiques possédant exclusivement une activité inhibitrice contre les champignons pathogènes humains, n'ont été découverts qu'après la seconde guerre mondiale, et leurs utilisations courantes en clinique date seulement de la fin des années 50.

Les premières molécules antifongiques à usage médical sont les composés appartenant à la série des polyènes et la griséofulvine. Elles ont toutes été découvertes grâce aux techniques de screening d'actinomycètes et de champignons. Les deux antifongiques pionniers introduits pour un usage clinique, sont la nystatine et la griséofulvine. La nystatine a été commercialisée pour des applications cliniques à la fin des années 50, la griséofulvine au début des années 60, bien qu'elle a été découverte avant la nystatine (**Oxford et al., 1939**). La nystatine a été le point de départ du développement de nombreux autres antifongiques cliniques de nature polyénique. (**Hanzen et Brown, 1950**).

II.2. Principaux antifongiques naturels utilisés en médecine humaine

II.2.1. Griséofulvine

L'emploi et la commercialisation de la griséofulvine (**Figure.04**) ont été d'abord comme agent fongicide en agriculture. L'efficacité clinique du traitement oral de la griséofulvine a été démontrée en premier, sur des infections à dermatophytes chez des animaux de laboratoire (**Genties, 1958**). Cette molécule antifongique est un métabolite produit par *Penicillium griseofulvum* d'où elle tire son nom. Parmi les champignons pathogènes pour l'homme, les genres inhibés sont : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Elle est utilisée, également, contre la plupart des dermatophytoses cutanées en particulier les teignes du cuir chevelu et les infections cutanées qui affectent la partie supérieure du corps. Son action s'oriente sur l'inhibition de la mitose des champignons sensibles. La griséofulvine est considérée comme étant un antifongique bon marché pour les pays pauvres (**Genties, 1998**).

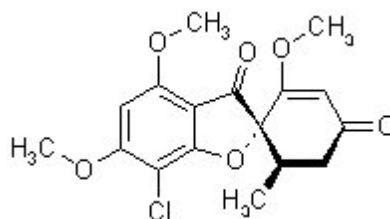


Figure .04: Griséfuline® Laboratoire Sanofi Winthrop (**Genties, 1998**).

II.2.2. Nystatine

Découvert par **Hazen et Brown en 1950**, l'appellation initiale était "fungicidin" ce nom a été changé par ses inventeurs en nystatine en l'honneur des laboratoires "New York State", pour lesquels ils travaillaient. L'activité antifongique a été mise en évidence à partir d'une culture d'un Actinomycète isolé de la terre de la ferme laitière de Nourse en Virginie, aux Etats-Unis, d'où son nom de *Streptomyces noursei*. Cette bactérie filamenteuse, produisait deux antibiotiques : La nystatine et le cyclo-heximide.

La nystatine a été breveté et sa licence confiée à "E.R. Squibb et Sons" (connu maintenant sous le nom de Bristol Meyers-Squibb). La nystatine possède quatre doubles liaisons conjuguées dans sa structure (**Figure.05**). Le spectre antifongique de la nystatine *in-vitro* est très étendu, il englobe plusieurs levures pathogènes comme les *Candida sp.*, les pathogènes dimorphes qui sont infectieux sous une forme levure et *Cryptococcus neoformans* (**Hildick-Smith et al., 1994**).

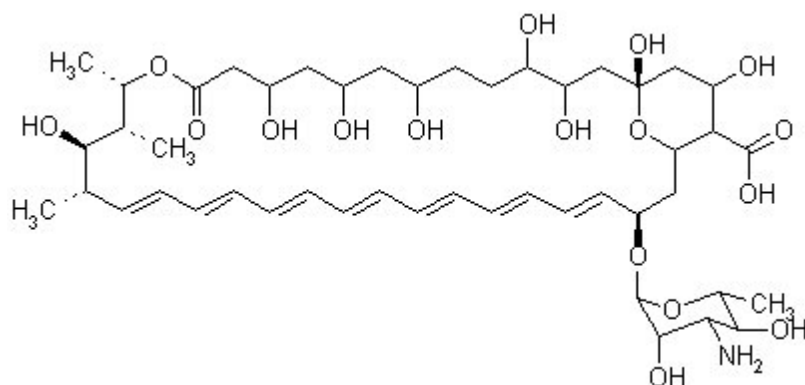


Figure .05: Mycostatine ® Laboratoire Bristol Myers Squibb (**Hildick-Smith et al., 1994**).

La nystatine est également active contre la plupart des dermatophytes et à l'égard de nombreux agents responsables des mycoses profondes, y compris *Aspergillus sp* ainsi que de nombreuses moisissures. La toxicité de la nystatine administrée par voie parentérale rend son utilisation clinique limitée, uniquement pour des usages topiques. La nystatine agit comme tous les autres antifongiques polyènes, en dégradant la membrane cellulaire (**Kerridge et Whelan, 1984**). Cette toxicité sélective de la nystatine contre les membranes de champignons par rapport aux membranes des mammifères est due à une affinité de liaison avec l'ergostérol fongique supérieure à celle du cholestérol des mammifères (**Odds, 1995**).

II.2.3. Amphotéricine B

Molécule antifongique découverte par (**Gold et al., 1956**). Le germe producteur est un Actinomycète isolé du bassin d'Orinoco dénommé *Streptomyces nodosus*. C'est un polyène heptène (**Figure.06**) qui inhibe spécifiquement la croissance de nombreuses levures et moisissures, et est sans action contre les bactéries. L'amphotéricine B, est un puissant antifongique qui inhibe la plupart des espèces pathogènes. En médecine humaine, l'amphotéricine B est le seule polyène antifongique, qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes. Toutefois, des effets secondaires indésirables sont remarqués lors de ces traitements, mais ceux-ci peuvent être minimisés à l'aide de stratégies d'administration judicieuses (**Odds, 1995**).

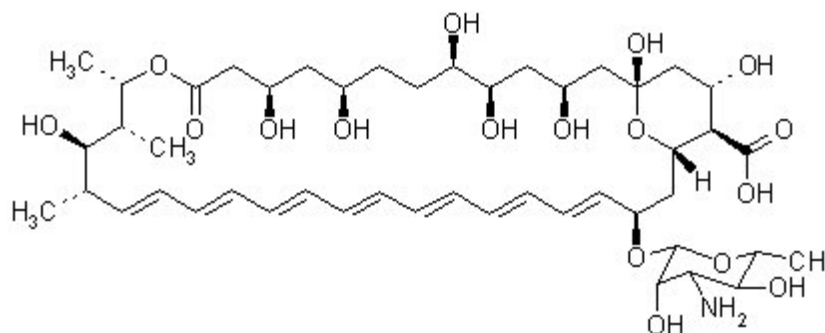


Figure .06: Fungizone ® Laboratoire Bristol-Myers-Squibb (**Odds, 1995**).

II.2.4. Autres agents polyènes antifongiques

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

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

II.3. Antifongiques de synthèse

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

II.3.1. Le chlormidazole

C'est le premier antifongique de synthèse qui a été utilisé en médecine humaine. C'est un dérivé du benzimidazole, et a été utilisé pour le traitement topique des dermatophytoses cutanées. Le composé n'a pas eu un grand succès commercial, mais a ouvert une voie de recherche dans le domaine des molécules antifongiques de synthèse (**Odds, 1995**).

II.3.2. Le tolnaftate

Ce composé thiocarbamate (**Figure.07**) découvert en 1962 est un antifongique topique actif contre les dermatophytes, et il est vendu également sous forme de poudre pour le traitement du tinea pedis. C'est un inhibiteur de l'enzyme squalène époxydase dans la voie de biosynthèse des stérols. Le tolciolate, un thiocarbamate plus récent, possède des propriétés très similaires (**Ryder et al., 1986**)

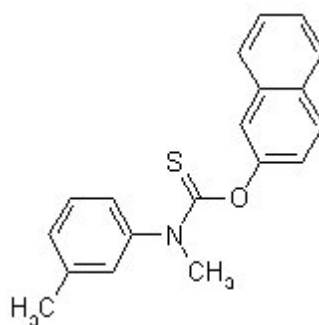


Figure .07: Sporiline® Laboratoire Schering-Plough (**Ryder et al., 1986**).

II.3.3. La flucytosine

Le 5-fluorocytosine (**Figure.08**) est la première molécule qui offrait la possibilité réelle de traiter par voie orale les infections fongiques profondes. C'est un inhibiteur de la synthèse de L'ARN de certains champignons. Après pénétration dans le cytoplasme fongique sous l'action d'une cytosine perméase, le 5-fluorocytosine se transforme en 5-fluorouracile qui se substitue à l'uracile dans la synthèse des ARN. Cette situation conduit au blocage de la synthèse protéique (**Scholer, 1980 ; Polak, 1990**).

La spécificité d'action sur les cellules fongiques, est due à la spécificité de la cytosine perméase qui n'existe pas chez les mammifères. Son spectre d'action *in-vitro*, se limite aux *Candida* sp ; *Cryptococcus neoformans* ; certaines moisissures dematiacées et certains isolats d'*Aspergillus* sp. A cause des multiples cas de résistance à cette molécule, la flucytosine est employée avec succès en association avec d'autres antifongiques polyéniques comme l'amphotéricine B ou azolés ou encore avec une échinocandine, dans le traitement combiné de nombreuses mycoses systémiques (**Smaoui et al., 2010**).

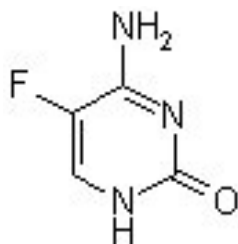


Figure .08: Ancotil ® Laboratoire Roche (**Smaoui et al., 2010**).

II.3.4. Les imidazoles

Le benzimidazole, le chlormidazole, les arylimidazoles et d'autres font partie des composés imidazoles présentant une activité antifongique importante *in-vitro*. Les premiers antifongiques imidazoles appartenant à la série des azolés ont été décrits par Janssen Pharmaceutica en Belgique, il s'agit du miconazole (**Figure.09a**) et l'éconazole (**Figure.10**) (**Godefroi et al., 1999**).

Le clotrimazole (**Figure.11**) a été décrit par Bayer AG en Allemagne (**Marget et Adam, 1969**). Ces premières molécules ont été évaluées dans de nombreux essais cliniques, et ont prouvé leur efficacité dans le traitement topique des infections superficielles à *Candida* et des dermatophytoses. Leur spectre antifongique s'étale contre plusieurs pathogènes fongiques systémiques, et contre de nombreux autres agents des mycoses superficielles. Le mode d'action de ces molécules a démontré que le miconazole inhibait la déméthylation du lanostérol en ergostérol, conduisant ainsi à l'arrêt de la synthèse des stérols fongiques. Le succès des antifongiques azolés a été à l'origine d'une panoplie de découvertes de nouveaux composés du même type (**Van den bossche et al., 1978**).

Le fluconazole (**Figure.09b**) et l'itraconazole (**Figure.09c**) représentent les plus importants antifongiques triazolés. D'autres azolés comme, le voriconazole (**Figure.12**), produit par **Pfizer** et le **SCH 56592** de **Schering-Plough**, seraient tous deux actifs vis-à-vis des *Candida* résistantes au fluconazole ; ces deux produits possèdent une activité nettement améliorée vis-à-vis d'autres affections fongiques telles que l'aspergillose et l'histoplasmosse (**Al-Zarban et al., 2002**).

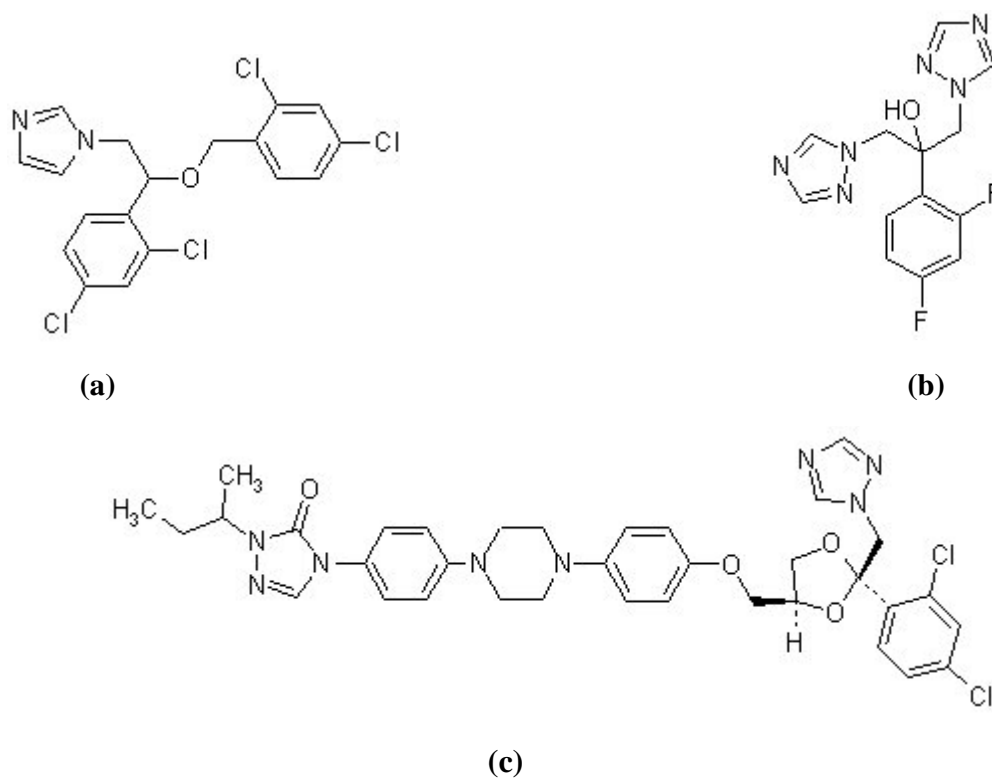


Figure .09: (a) Daktarin®, (b) Triflucan® Laboratoire Pfizer, (c) Sporanox® Laboratoire Janssen Cilag (Al-Zarban *et al.*, 2002).

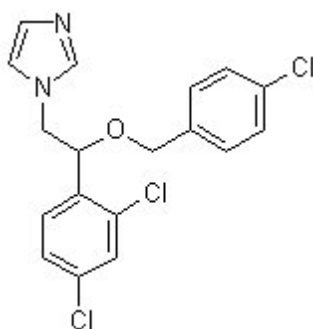


Figure .10: Econazole (Pevaryl®) laboratoire Janssen-Cilag (Boudjella, 2007).

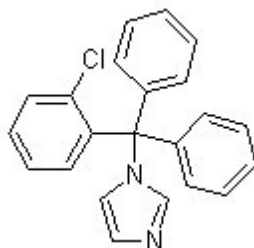


Figure .11: Clotrimazole (Trimysten®), laboratoire Roger Bellon (Bradbury *et al.*, 2002).

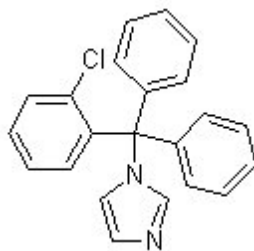


Figure .12: Voriconazole (Vfend®).

II.3.5. Les antifongiques allylamines

Ce nouveau groupe d'antifongiques, développés en 1977 au **Sandoz Research Institute** à **Vienne**, est caractérisé par sa structure chimique comportant une fonction allylamine tertiaire. Les composés de cette classe d'antifongiques inhibent l'enzyme squalène époxydase fongique, qui intervient dans la voie de la biosynthèse des stérols (**Mieth, 1993**). Parmi ces antifongiques on retrouve les suivants :

- **Naftifine** : Découvert en 1974, il est le premier composé allylamine (**Figure.13**) développé en clinique. La naftifine est utilisée contre les infections à dermatophytes (**Oki, 1992**).

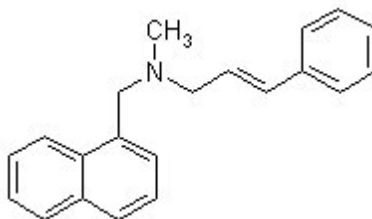


Figure .13: Naftifine (**Oki, 1992**).

- **Terbinafine** : La terbinafine (**Figure.14**), succède à la naftifine, elle est active par voie orale et topique, très utilisée dans le traitement des infections à dermatophytes et l'onychomycose. Le spectre antifongique de la terbinafine *in-vitro* est très large : il comprend non seulement les dermatophytes, mais aussi *Candida.sp* et de nombreuses moisissures. Cependant *in-vivo*, le composé est presque complètement inactif par voie orale et est aussi nettement moins performant contre les infections superficielles à *Candida*. Ce grand écart entre les activités *in vitro* et *in vivo* est un point encore non élucidé (**Mieth, 1993**).

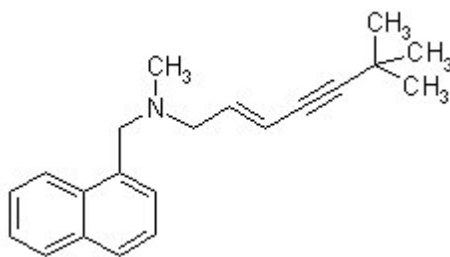
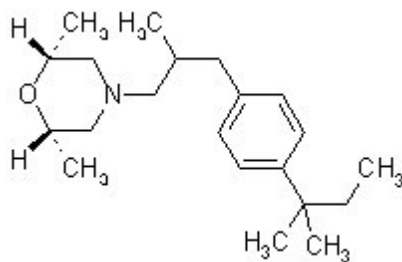


Figure .14: Terbinafine® Laboratoire Novartis Pharma (**Mieth, 1993**).

- **Amorolfine** : C'est le seul composé de la classe des phénylmorpholines utilisé en médecine humaine, le reste des représentants de cette série sont employés en agriculture. L'amorolfine (**Figure. 15**) inhibe deux enzymes dans la voie de la biosynthèse des stérols fongiques. Elle agit sur la plupart des champignons responsables des mycoses superficielles, y compris *Candida.sp* et les dermatophytes et elle entre dans la composition de diverses préparations, pour le traitement de l'onychomycose, des mycoses cutanées et des infections vaginales à *Candida* (**Hartman et polak, 1993**).



- **Figure .15: Amorolfine®** Laboratoire Roche (**Hartman et polak, 1993**).

II.3.6. Les antifongiques non classés

D'autres antifongiques de synthèse, moins populaires que les molécules précédemment décrites, sont utilisés en clinique ; les plus rencontrés sont la chlordantoïne, l'haloprogrine, la ciclopiroxolamine et le nifuratel (**Schwartz et al., 1989**).

II.4. Nouveaux antifongiques d'origine naturelle

Une quantité infime d'antifongiques naturels ont été découverts et mis sur le marché clinique ces dernières années. Ces molécules sont produites par fermentation essentiellement par des Actinomycètes et des champignons. Ils offrent au marché des antifongiques de nouveaux composés capables de faire face aux phénomènes de résistance constamment en progression (**Benz et al., 1994**).

II.4.1. Echinocandines

Ces molécules sont des lipopeptides cycliques produits par divers isolats d'*Aspergillus* (**Benz et al., 1994**). Les pneumocandines sont des molécules similaires produites par un autre champignon le *Zalerion arboricola* (**Schwartz et al., 1989**).

Contrairement aux antifongiques azolés, qui bloquent simplement la croissance des cultures fongiques, les échinocandines tuent les champignons en interrompant la synthèse des glycanes, qui est un important constituant de leur paroi cellulaire. Cet élément de la paroi cellulaire ne se trouve pas dans les cellules de mammifères, ce qui fait que le médicament est moins toxique que l'amphotéricine B. Dans le but d'élargir leur spectre d'action contre plusieurs moisissures pathogènes, ces deux molécules ont été optimisées par les laboratoires de recherche **Merck** au **New Jersey**. L'amélioration de la solubilité dans l'eau et leur biodisponibilité orale ont été également améliorées (**Benz et al., 1974**).

II.4.2. Nikkomycines

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

II.4.3. Pradimicines

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

MATÉRIEL ET MÉTHODES

III. Matériel et méthodes

III.1. Objectifs

- Les objectifs de cette étude, consistent à définir les conditions et les milieux d'isolement des Actinomycètes, à partir des échantillons provenant d'un sol aride et semi-arides du sud algérien, et d'étudier l'activité antifongique vis à vis de champignons pathogènes.

III.2. Échantillons de sols

Trois échantillons de sol devraient être prélevés à quatre Km de Biskra (Ville située à la porte du désert algérien. Longitude 005E44, Latitude 034N51). 100 à 150 g de sols devaient être prélevés, après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, selon la technique dérivée de celle de (**Pochon et Tardieux, 1962**).

Chaque échantillon devrait être partagé en deux lots de 50 g chacun. Un des deux lots subit un chauffage à 110°C pendant 10 minutes. 1 gramme de chaque sol chauffé ou non, et devrait être introduit dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique stérile et des billes en verre stériles de 2 mm de diamètre. Les échantillons devraient être homogénéisés par agitation au vortex, pendant quelques minutes. Les suspensions ainsi obtenues devraient constituer les solutions à analyser (**Agate et Bath, 1993**).

III.3. Isolement des souches d'Actinomycètes

III.3. 1. Milieu d'isolement

Les souches d'Actinomycètes qui devraient être isolées sur le milieu chitine-vitamine B, qui pouvait fournir de bons résultats, du point de vue de leur sélection et de la mise en évidence d'une grande diversité d'espèces (**Hayakawa et Nonomura, 1984; Boudjella, 1994**).

III.3. 2. Agents sélectifs

L'ajout d'agents sélectifs au milieu Ch-VB, permet de sélectionner divers genres, espèces et souches particulières. Le choix des agents et des concentrations utilisés est basé sur les bons résultats obtenus, par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'ENS de Kouba. Pour cela nous devons additionner au milieu Ch-VB cinq antibiotiques antibactériens devraient être prendre un à un, à des concentrations précises: la rifampicine et la streptomycine (10 mg/L pour chacun), le chloramphénicol, la kanamycine et la pénicilline (25 mg/L pour chacun). Le milieu Ch-VB devraient être également additionné d'actidione à raison de 80 mg/L pour empêcher la croissance des champignons indésirables présents éventuellement dans les sols (**Boudjella, 1994**).

III.3. 3. Ensemencement et incubation des Actinomycètes

La méthode d'ensemencement à utiliser est celle des suspensions-dilutions et étalement sur milieu Ch-VB coulé en boîtes de Pétri stériles. **(Rapilly, 1998)**. Les suspensions-mères devraient être préparées par agitation vigoureuse pendant 5min de 1g de sol dans 9 ml d'eau distillée stérile. Elles devraient être ensuite diluées en série jusqu'à 10^{-4} . Un volume de 0,1 ml de chaque dilution devrait être étalée sur le milieu Ch-VB, deux essais devraient être effectués pour chaque dilution. Les boîtesensemencées devraient être incubées à 30°C pendant 14 jours **(Boudjella, 2007)**.

III.3.4. Reconnaissance des Actinomycètes

Toutes les colonies d'Actinomycètes qui devraient apparaître à la surface du milieu d'isolement sont systématiquement observées directement à l'œil nu, et au microscope optique aux grossissements X 10 et X 40. Ces observations devraient permettre de reconnaître (de manière préliminaire) les différents genres, de sélectionner les colonies, appartenant à un grand nombre de genres, et d'éviter de retenir un nombre élevé d'isolats susceptibles d'appartenir à une même espèce **(Reghioua et al., 2008)**.

III.3.5. Purification et conservation

Les colonies sélectionnées devraient être prélevées délicatement à l'aide d'une pointe stérile puis devraient être purifiées par stries sur milieu ISP2 « International *Streptomyces* Project » **(Shirling et Gottlieb, 1996)**, à base de glucose, d'extrait de malt et l'extrait de levure **(voir Annexe. 01)**. Les isolats purifiés devraient être ensemencés sur le même milieu coulé en tubes inclinés. Ces derniers devraient être incubés à 30°C, pendant 14 à 28 jours, puis conservés à 4°C. Le milieu ISP2 est choisi car il permet une croissance et une sporulation relativement bonnes des souches étudiées **(Boudjella, 2007)**.

Lors des tests préliminaires, les souches d'Actinomycètes qui devraient montrées une activité antifongique intéressante, devraient être sélectionnées pour les étudier taxonomiquement.

III.4. Étude morphologique

III.4.1. Étude micro-morphologique

- **Coloration de Gram**

Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram, qui a été mise au point en 1884 par le bactériologiste Danois Hans, Christian Gram. Cet examen devrait être réalisé sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolat obtenu sur le milieu ISP2, ces frottis devraient être colorés, après observation à l'aide d'un microscope optique à grossissements (X100), ce dernier permet de déceler les formes morphologiques des différentes bactéries et de préciser le Gram + et le Gram-. À partir de cet

examen, nous pouvons déterminer quelques caractères morphologiques des Actinomycètes, concernant le type de Gram et les indications sur leurs formes (principalement la forme des filaments) et la présence ou l'absence de spores isolées. (**William et al., 2010**).

- **Culture sur lamelle**

L'observation *in-situ* de la morphologie des chaînes de spores et l'étude du mycélium aérien et du mycélium de substrat, devraient être effectuées selon la technique décrite par **Cross (1989)**. Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé ISP3, de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec celui-ci. Une goutte de chaque inoculum des souches devrait être déposée sur la lamelle en contact avec le milieu gélosé.

Après 21 jours d'incubation à 30 °C, la lamelle devrait être retirée soigneusement de la gélose, entraînant quelques fragments du mycélium, elle devrait être ensuite déposée sur la lame avec une goutte de bleu de méthyle et devrait être examinée au microscope optique à grossissement (X 100) (**Cross 1989**).

III.4.2. Étude macro-morphologique

- **Observation à l'œil nu**

L'étude macromorphologique permet de déterminer les différents aspects du mycélium de substrat (MS) et du mycélium aérien (MA), qui varient selon les milieux. Ce test consiste à ensemercer différents milieux d'identification (ISP2, ISP3, ISP4) (**Shirling et Gottlieb, 1969**), puis devraient être incubés à 30 °C pendant 7, 14 et 21 jours. La production de pigments diffusibles dans le milieu devrait être également notée.

- **Observation à la loupe binoculaire**

Après 21 jours d'incubation à 30 °C, les boîtes contenant les colonies d'Actinomycètes, d'aspect bien précis et clair devraient être observées à la loupe binoculaire (X 40).

III.5. Étude des antifongiques des souches d'Actinomycètes

III.5.1. Protocole général d'étude des antifongiques

Nous devons suivre le protocole suivant, pour étudier les activités antifongiques:

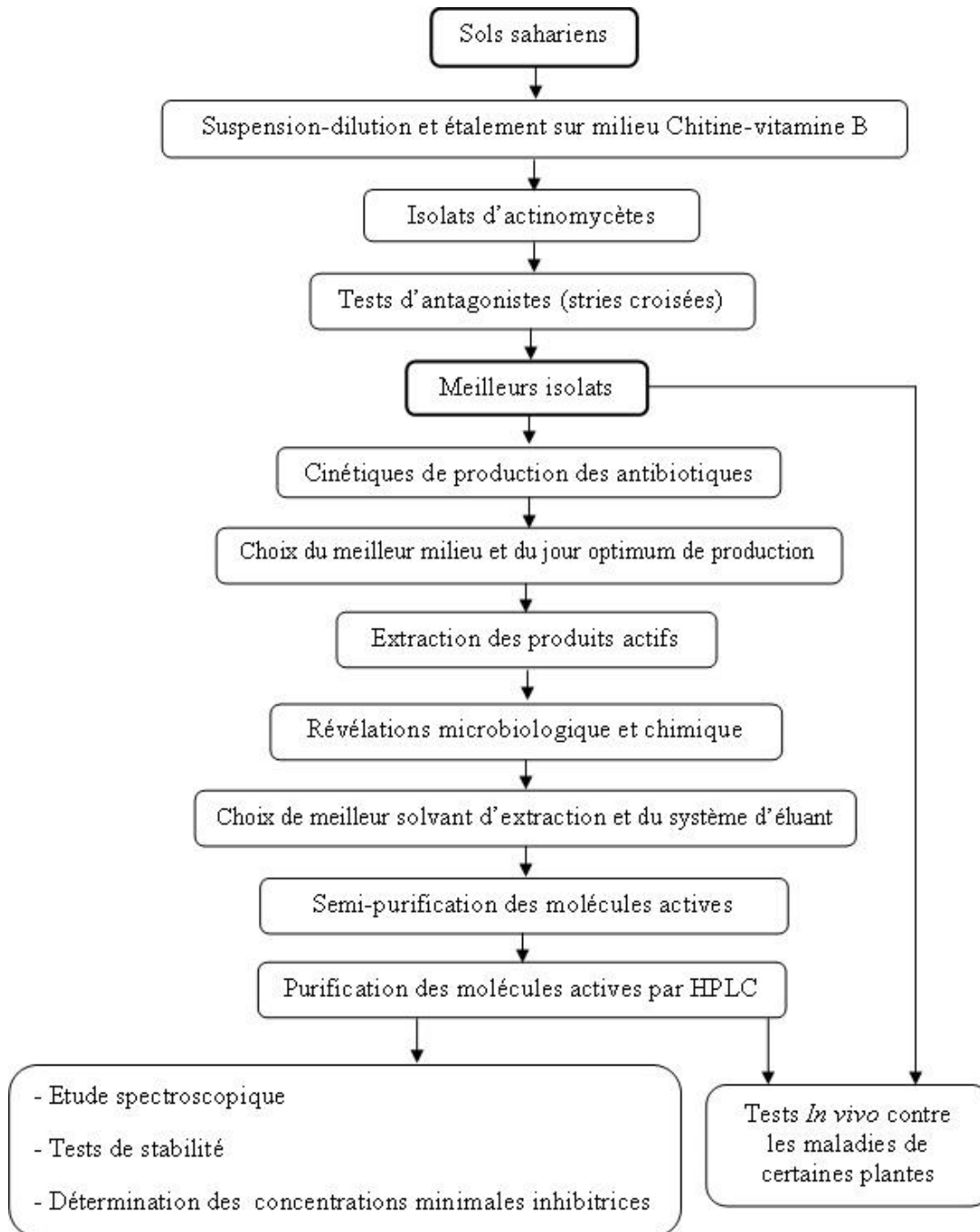


Figure.16: Protocole général montrant l'isolement, les tests d'antagonisme et les études des antibiotiques (Toumatia, 2010).

III.5.2. Les isolats d'Actinomycètes

Les isolats d'Actinomycètes qui devraient présenter une activité antifongique intéressante devraient être sélectionnés et le meilleur est retenu pour une étude approfondie de ses antibiotiques (Toumatia, 2010).

III.5.3. Technique des stries croisées

L'activité antimicrobienne des souches d'Actinomycètes devrait être évaluée par la méthode des stries croisées sur le milieu ISP2. Cette méthode consiste à ensemercer la souche d'Actinomycète en un seul trait à la surface du milieu solide, et en bordure de la boîte de Pétri (diamètre = 9 cm). Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les souches-cibles devraient être ensemençées perpendiculairement à l'Actinomycète. La lecture des résultats devrait se faire en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures de la souche-cible et de la souche d'Actinomycète, après 24 h d'incubation pour les bactéries et les levures, et 36 à 48 h pour les champignons (Toumatia, 2010).

III.5.4. Cinétique de production et détection des antibiotiques en milieux liquides

Cette étude devrait être réalisée sur les cinq meilleures souches d'Actinomycètes, celles ayant montré une activité antibiotique intéressante lors des tests préliminaires.

III.5.4.1. Milieux de culture

Deux milieux de culture complexes devraient être utilisés: l'ISP2 et le milieu Bennett (annexe 1).

III.5.4.2. Pré-cultures

Pour obtenir les pré-cultures, les spores devraient être raclées à partir d'une culture en boîte de Pétri de la souche d'Actinomycète âgée de 7 jours, et inoculés dans des tubes à vis contenant 3 mL de chaque milieu désiré à inoculer par la suite. Après 48 h d'incubation dans un shaker (250 rpm; 30°C), les pré-cultures devraient être utilisées pour inoculer les milieux de production (Al-Musallam A.A ; Abbas I, 2002)

III.5.4.3. Cinétique de production des antibiotiques

La cinétique de production des antibiotiques devrait être réalisée en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées et de comparer cette production entre les milieux de culture sélectionnés. Des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant chacune 100 mL de milieu (pH 7,2) devraient être ensemençé avec 3 mL de la pré-culture. Les cultures devraient être incubées à 30°C et agitées à 250 rpm dans un Shaker. Des prélèvements devraient être effectués toutes les 24 h pendant 10 jours pour être analysés. L'évolution de l'activité

antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement (**Bergey's Manuel, 2007**).

L'activité antibiotique devrait être déterminée par la méthode de diffusion des puits contre *Bacillus subtilis*, *Mucor ramannianus*, *Fusarium culmorum* et *F. oxysporum f. sp.*

Dans cette méthode, du milieu ISP2 contenant 12 g/L d'agar en surfusion devrait être préensemencé avec le germe-cible avant d'être coulé en boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, des puits devraient être conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Une aliquote de 0,2 mL de surnageant de culture à analyser, devrait être prélevée stérilement puis introduite dans le puits. Les boîtes devraient être mises 4 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits après 24 h (pour les bactéries et les levures) et 48 h (pour les champignons) (**Bettelli E, 2011**).

L'évolution de la biomasse durant la fermentation devrait être estimée selon la méthode de Pfeffel *et al.*, (2000). Pour cela, 2 ml de culture devraient être prélevés tous les 24 h puis centrifugés à 5000 g dans des tubes Eppendorf préalablement tarés. Le surnageant devrait être récupéré et vas servir pour suivre l'évolution du pH du milieu grâce à un pH mètre. Le culot (biomasse) devrait être lavé par centrifugation à 3 reprises avec de l'eau distillée. Les tubes devraient être ensuite incubés à 100°C durant 24 h puis pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare (**Boudjella H, 2007**).

III.6. Extraction des antibiotiques

III.6.1. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Quatre solvants de polarité croissante devraient être testés (index de polarité): le *n*-hexane (00), le dichlorométhane (3,1), le *n*-butanol (4) et l'acétate d'éthyle (4,4). Les cultures devraient être réalisées en milieux ISP2 ou Bennett (selon les souches) (au total, 500mL par milieu) dans les mêmes conditions que celles évoquées précédemment, à savoir: erlenmeyer de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu; pH = 7,2; agitation = 250 rpm; température = 30°C. Après 8 jours d'incubations, les filtrats devraient être répartis en 4 fractions de 100 mL extraites chacune avec 100 mL de solvant. Les phases organiques devraient être séparées des phases aqueuses, puis déshydratée par passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant du sulfate de sodium anhydre, afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les extraits devraient être concentrés à sec puis repris dans du méthanol et testées pour leur antagonisme par

la méthode des disques de papier. Les extraits devraient être spotés à raison de 60 μL pour *B. subtilis* et 80 μL pour *M. ramannianus*, *F. culmorum* et *F. oxysporum* f. sp. La phase aqueuse devrait être également testée par antibiographie (même conditions) pour estimer l'activité résiduelle non extraite (Bradbury B.D, Jich S.S, 2002).

III.6.2. Extraction à partir du mycélium

Le mycélium devrait être récupéré après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation (3000 g). Le culot mycélien devrait être récupéré dans une fiole et immergé dans du méthanol. Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium devrait être réalisée avec du méthanol: 200mL de MeOH pour 50 g de mycélium lavé à l'eau distillée et égoutté. L'extrait méthanolique devrait être débarrassé du mycélium par centrifugation, puis concentré à sec à 40°C à l'aide d'un rotavapor. Les activités devraient être recherchées par la méthode des disques de papier (Mechlinski and Schaffner, 1974).

III.7. Tests d'Antibiographie

Les différents extraits organiques obtenus à partir des filtrats ou du mycélium, ainsi que les phases aqueuses, devraient être testés pour vérifier leurs activités antimicrobiennes. La méthode utilisée est celle des puits et celle des disques de papier.

Des disques de papier de 6 mm de diamètre devraient être imprégnés de 50 μL à 80 μL d'extrait à tester. Ils devraient être séchés pour faire évaporer le solvant, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 min. Les disques imprégnés devraient être ensuite déposés à la surface du milieu ISP2 contenant 12 g/L d'agar, pré-ensemencé avec le germe-cible et coulé en boîtes de Pétri. Celles-ci devraient être mises à 4°C pendant 4 h avant d'être incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (Debeule K, Vangestel J, 2001).

III.8. Semi-purification des antibiotiques

Des semi-purifications des antibiotiques à partir de l'extrait organique brut devraient être effectuées selon deux méthodes:

III.8.1. Par chromatographie sur colonne de gel de séphadex LH-20

Le gel de séphadex LH-20 devrait être utilisé pour la purification de l'extrait organique de la souche d'Actinomycète sélectionnée. Ce gel devrait être équilibré avec du méthanol et déposé dans une colonne de 50 cm x 2 cm de façon à avoir une longueur de gel de 40 cm. Des aliquotes de 1 à 2 mL du concentré de l'extrait organique brut devraient être ensuite déposées en surface et

passées à travers le gel en utilisant une phase mobile composée de 75% de méthanol dans l'eau (mode isocratique, à pression atmosphérique, débit 1,2 mL/min). Les fractions devraient être d'abord récoltées dans des tubes à raison de 5 mL par tube, puis récupérées en fonction des couleurs des bandes formées lors de la séparation. Les fractions actives devraient être localisées par antibiographie contre *Bacillus subtilis*, *Mucor ramannianus* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lini* (Djinni I, 2009).

III 8.2. Sur plaques épaisses de gel de silice

Les antibiotiques de l'extrait organique brut devraient être semi-purifiés sur couche épaisse de gel de silice GF254 (0,5 mm d'épaisseur) par chromatographie, dans le but d'avoir des quantités suffisantes d'antibiotiques pour les études ultérieures.

Dans ce cas, des plaques de 20 cm de côté devraient être préparées de la même manière que les plaques fines. 250 à 400 µL de chaque extrait concentré devraient être déposés en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci devraient être ensuite développées dans l'éluant sélectionné au cours de l'étude bio-autographique, afin de localiser avec précision les bandes actives (une bio-autographie est toujours réalisée en parallèle). Une fois la migration terminée, la silice correspondant aux zones actives est alors grattée. Les antibiotiques devraient être désorbés dans 100 à 200 mL de méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice devrait être par la suite éliminée après filtration sur verre fritté n°4. Le filtrat méthanolique limpide devrait être recueilli et son activité devrait être contrôlée par antibiographie contre les microorganismes évoqués précédemment. Il devrait être purification finale par HPLC (Eder C, Kurz M, Wink J, 2002).

III. 9. Étude de la stabilité de l'activité antibiotique

Avant d'effectuer la purification des fractions semi-pures actives, nous avons voulu avoir une idée sur la stabilité de ces dernières en fonction du pH, de la température et de la lumière. Cette étude devrait être effectuée sur des produits semi-purs, solubilisés dans un mélange de méthanol (10%) et d'eau distillée (90%) à raison de 1 mg/mL. L'activité antibiotique des échantillons traités devrait être testée par antibiographie sur disques contre *F. o. lini* (Euzéby J.P, 2013).

III.9.1. Stabilité en fonction du pH

Des fractions de 5 mL de solution active devraient être ajustées à différents pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12) avec du NaOH (0,1 N et 1 N) ou du HCl (0,1 N et 1 N). Les piluliers devraient être laissés 24 h à 20°C à l'obscurité. Les pH devraient être ensuite ramenés à la neutralité et les extraits, testés par antibiographie contre les germes cibles.

III.9.2. Stabilité en fonction de la température

Des fractions de 5 mL (placées dans des conditions optimales de pH d'activité) devraient être soumises aux traitements thermiques suivants: 60 min à 50°C, 30 min à 70°C, 15 min à 100°C et autoclavage durant 10 min à 120°C. Les échantillons devraient être refroidis à température ambiante et testés ensuite contre les germes cibles.

III 9.3. Stabilité à la lumière

Des tubes contenant chacun 5 mL de la solution active (pH 7, température = 20°C) devraient être exposés à l'action d'une lampe (100 Watts) placée à une hauteur de 50 cm. Après 24 h d'exposition, l'activité devrait être testée contre les germes cibles et comparée à celle des témoins (l'un conservé à l'obscurité et l'autre à la lumière du jour).

III.10. Purification par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) devrait être utilisée comme dernière étape de purification des antibiotiques. L'appareil qui devrait être utilisé, devrait être équipé des composants suivants:

- Dégazeur.
- Système de pompe 2055.
- Injecteur automatique (Autosampler) doit être relié à une boucle d'injection de 100 µL.
- Détecteur (UV-Vis 545V à barrette de diode à longueur d'onde UV-visible variable).
- Colonne analytique en phase inverse (C18) INTERCHIM, de 15 µm de granulométrie, 300 mm de longueur et 7,8 mm de diamètre intérieur (DI). Cette colonne devrait être précédée d'une pré-colonne de garde de 10 x 4 mm.
- Le contrôle du gradient de solvant d'élution, la collection des données et l'intégration des pics devraient être assurés par un ordinateur qui devrait être équipé d'un logiciel d'exploitation et d'analyse.

Les conditions de purification devraient être déterminées après plusieurs expériences préliminaires. Le débit d'élution devrait être fixé à 1 mL min⁻¹. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) devrait être conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 8 min (le temps mort de la colonne). Lorsque la colonne aura équilibré, 40 µL de l'échantillon de produit semi pur, provenant de l'extrait butanolique devraient être injectés et analysés. Le gradient devrait être utilisé, soit être linéaire de 50 à 100% méthanol/eau pendant 30 min (**Tableau.05**).

Tableau.05 : Programme du gradient d'éluion par HPLC qui devrait être utilisé

Temps (min)	Eau	MeOH
0	50	50
30	0	100
35	0	100
40	50	50

III.11. Études spectroscopiques des antibiotiques

III.11.1. Spectroscopie UV-visible

Le spectre UV-visible devrait être déterminé en premier lieu sur les extraits butanoliques bruts, pour noter la présence ou non de polyènes (extractibles par le *n*-butanol), lesquels présentent trois maxima caractéristiques. Par la suite, le spectre devrait être déterminé pour l'antibiotique purifié. Dans les deux cas, l'extrait devrait être solubilisé dans du méthanol pour HPLC qui devrait être utilisé comme témoin aussi, puis devrait être analysé à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU UV 260, précédemment étalonné avec du méthanol.

III.11.2. Spectrométrie de masse

La technique qui devrait être utilisée est celle de "Nano-Electrospray Ionisation" ou (= Nano-ESI-IT-MS) qui permet de déterminer le poids moléculaire (PM) des antibiotiques, ainsi que ceux des fragments qui en résultent, après ionisation des ions parents. Lors de cette analyse, le détachement des noyaux stables résistants à la fragmentation ; et qui possèdent des masses correspondant généralement à des groupements bien connus, permettent souvent de retracer la séquence de fragmentation de la molécule de l'antibiotique, et d'aboutir à la structure ou une hypothèse de structure très proche.

Cette étude devrait être réalisée sur un spectrophotomètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San Jose, CA) et la technique de Nano-ESI-IT-MS permet d'analyser de très faible quantité de produit. 5 µl d'une solution de méthanol (qualité HPLC) contenant quelques microgrammes de l'antibiotique, devraient être utilisés. L'analyse devrait être réalisée en mode positif et en mode négatif. La fragmentation progressive des ions parents est suivie jusqu'à épuisement du produit.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

IV. Résultats et Discussion

D'après, (Davies et Williams, 1970), Les Actinomycètes existent dans divers habitats en nature y compris le sol qui est considéré comme le réservoir principal de ces bactéries Ils constituent une source intéressante de substances bioactives, notamment les molécules antimicrobiennes. Le criblage des souches d'Actinomycète d'origine terrestre présente une nouvelle voie de recherche d'antimicrobiens naturels. La plupart des criblages concernant la recherche des substances antimicrobiennes à partir des souches d'Actinomycètes ont été effectués sur des échantillons du sol.

De plus, (Boudjella, 1994) a montré que l'effet des antibiotiques additionnés au milieu a permis la réduction du nombre et de la taille des colonies de bactéries et de champignons invasifs, gênants pour la croissance des Actinomycètes. Bien que l'ajout d'antibiotiques sélectifs soit souvent utilisé pour l'obtention de genres et taxa d'Actinomycètes rares autres que les Streptomycètes qui sont dominants dans les sols (Sabaou *et al.*, 1998).

Plusieurs chercheurs (Hwang *et al.*, 2001; Lee et Hwang, 2002 ; Meklat *et al.*, 2011, Suela Silva, 2013), ont supposé que : Depuis, la découverte de la streptomycine par l'équipe de Waksman en 1943 à partir de bactéries du sol du genre *Streptomyces* et l'isolement de la nystatine, premier antibiotique antifongique, par Hazen et Brown en 1951 à partir de *Sreptomycetes noursei* provenant aussi du sol, plusieurs recherches ont été entreprises sur des souches d'Actinomycètes d'origine terrestre. Différents types de sol (forêts, boue, lac), même des milieux extrêmes (désert), ont été explorés dans l'espoir de découvrir de nouvelles souches produisant des produits nouveaux.

D'autre part Hacène *et al.* (1994) ont trouvé que sur 286 souches d'Actinomycètes isolées de différents écosystèmes du Sahara algérien, seulement 32 souches (11,19 %) ont montré une activité contre au moins un germe cible parmi quatre bactéries, deux levures et plusieurs champignons filamenteux.

Dans les travaux de Hilali *et al.*, (2002) les résultats d'un criblage initial de 85 souches d'Actinomycète isolées à partir du milieu naturel (sol, eau et sédiments marins) montrent que 25 souches (29,41 %) ont une activité vis-à-vis au moins un des germes cibles suivants : bactéries et/ou des champignons pathogènes (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* R2, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*).

En outre, (Lemriss, 2003) a trouvé que, les résultats de screening montrent aussi que l'activité antimicrobienne des souches d'Actinomycètes testées dépend de la méthode utilisée.

Les travaux de **Fourati-Ben Fguira et al., (2005)**, ont montré que les *Streptomyces* isolés du sol d'Oasis Tunisien possèdent une activité inhibitrice entre 21 et 32 mm sur ce germe. Par contre, une souche de *Streptosporangium* isolée du sol du Sahara algérien a révélé des zones d'inhibition de 41 mm et les fractions du surnageant purifier par HPLC ont montré des zones d'inhibition entre 26 et 34 mm (**Boudjella et al., 2006 ; Boudjella et al., 2007**).

De même, **Şahin et Uçur (2003)**, ont isolé des souches de *Streptomyces* du sol de la Turquie avec une activité vis-à-vis de *S. aureus* de 11 à 30 mm. Des souches d'Actinomycètes de la même origine révèlent une inhibition entre 08 et 16mm (**Oskay et al., 2004**).

D'autre part, **Boudjella et al. (2006)** ont remarqué une absence d'effet de la souche *Streptosporangium* sur *P. fluorescens*. Les résultats de l'effet de substances bioactives produites par des Actinomycètes isolés à partir d'échantillons d'eau, de sol et d'écorces d'arbres du nord-est de l'Algérie montrent que deux souches parmi les 14 testés sur *P. aeruginosa* par la méthode des disques (3mm) présentent des zones d'inhibition supérieurs à 3mm (**Kitouni et al., 2005**).

D'après, les résultats des expériences réalisées par **Lemriss et al. (2003)** par la méthode des cylindres d'agar et la méthode des puits (3mm), on note que parmi les 110 Actinomycètes d'origine clinique, 42 (soit 38%) sont actives contre *C. albicans* CIP 884.65 avec des diamètres des zones d'inhibition qui varient entre 03 et 52 mm. De même **Slavica et al. (2005)** ont mentionné que des souches appartenant au genre *Streptomyces* montrent des zones d'inhibition (11- 31mm) vis-à-vis de *C.albicans* ATCC10231.

Plusieurs études ont également montré une grande variabilité des résultats des tests d'activité antifongique en fonction de la méthodologie (**Cadet et al., 1996; Kauffman et Carver, 1997; Kang et al., 2010 ; Mendes et al., 2013**).

Par ailleurs, **Kattere et Andren (2001)**, le nombre et l'activité des microorganismes changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs.

Ces dernières années, plusieurs études ont décrit l'isolement de souches d'*Actinobactéries* à partir des sols sahariens qui ont montré des propriétés antagonistes importantes, et plusieurs antibiotiques originaux ont été obtenus (**Sabaou et al., 1998; Zitouni et al. 2004 ; Badji et al., 2007; Boudjella et al., 2010**).

CONCLUSION

Conclusion

La recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes est devenue une nécessité suite à l'apparition de nouvelles maladies infectieuses dû à des pathogènes et l'augmentation de microorganismes résistants à ces molécules.

L'objectif de ce travail était de rechercher, à partir des sols sahariens, des Actinomycètes producteurs d'antifongiques.

Le présent travail rentre dans cette optique et a comme objectif la recherche d'Actinomycètes dans les sols sahariens et la mise en évidence de nouvelles espèces, ainsi qu'un test d'activité antimicrobienne qui devrait être effectué sur plusieurs isolats d'Actinomycètes vis-à-vis de levures pathogènes, de levures non pathogènes et d'une bactérie à Gram négatif par méthode de cylindres d'agar, afin de montrer l'activité inhibitrice de ces isolats vis-à-vis des microorganismes testés.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1- Albengres E, Louet H, Tillement J.P (1998). Drug interactions of systemic antifungal agents. *Drug Safety*. 18: 83-97.
- 2- Al-Zarban S.S, Al-Musallam A.A, Abbas I (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int. J. Sys. Env. Microbiol*, 52: 555-558.
- 3- Bazot S (2005). Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récents dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne, Unité Mixte de Recherche INRA INPL Agronomie Environnement Nancy Colmar. 176: 25-26.
- 4- Bergey's Manuel (2007). In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. Copyright, Michigan State University Board of Trustees.
- 5- Bettelli E, Carrier Y, Gao W (2011) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
- 6- Boudjella H (1994). - Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'Actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177 p.
- 7- Boudjella H (2007). - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique ElHarrach. 188p.
- 8- Bow E.J, Loewen R, Cheang M.S, *et al* (1997). Cytotoxic therapy-induced Dxylose malabsorption and invasive fungal infection during remission-induction therapy for acute myeloid leukemia in adults. *J. Clin. Oncol*. 15: 2254-61.
- 9- Bradbury B.D, Jich S.S (2002). Itraconazole, fluconazole, and certain rare serious adverse events. *Pharmacotherapy*. 22(6):697-700.
- 10- Breton A, Theilleux J, Sanglier J. J (1989). - Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In: *Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent J. P. et Sanglier J. J. (Eds). Paris, Masson. pp. 33-70.
- 11- Bryskier A (1999). - Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses (Eds.). Paris.
- 12- Buckingham J (1997). - *Dictionary of natural products*. Chapman and Hall/CRC, England CRC Press.

- 13- Bycroft B (1988). - Dictionary of antibiotics and related substances. London: Chapman and Hall, 944 p.
- 14- Carle S (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. 36: 25-41.
- 15- Crawford D.L, Lynch J.M, Whipps J.M (1993). Isolation and characterization of Actinomycetes antagonists of a fungal roots pathogen. *Appl. Env. Microbiol.* 59 (11): 3899-3905.
- 16- Davies F.L, Williams S.T (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. / The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* 2: 227-238.
- 17- Debeule K, Vangestel J (2001). Pharmacology of itraconazole. *Drugs*. 61: 27-37.
- 18- Dening D.W (2002). Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 889-91. Dierckx. *Biochem. J.*, **33**: 240-248.
- 19- Djinni I (2009). Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Mémoire De Magister en Microbiologie Appliquée, Université A. Mira de Bejaia : 54.
- 20- Eder C, Kurz M, Wink J (2002). - Use of thiolutin dioxide and its derivatives for the treatment of CNS disorders and a process for the preparation thereof. *Eur. Pat. Appl.*, p.11.
- 21- Ettlinger L, Corbaz R, Httter R (1958). - Zur Systematik der Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, 31, 326-358.
- 22- Euzéby J.P (2013). - List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesa.html> France.
- 23- Finance C, Ouhdouche Y, Jaques A (1985). Nouvelles substances à action antifongique produites par des souches d'actinomycètes isolées à partir des milieux naturels. *Ana. Biol. Clin (Paris)*. 43: 652.
- 24- Goodfellow M, Haynes J.A (1983). Actinomycetes in marine sediments. pp: 453-472. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F., Yakoleff V. (ed.), *Biological, biochemical and biochemical aspect of actinomycetes*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- 25- Gordon R.E, Barnett D.A, Handarhan J.E (1974). - *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 54-63.
- 26- Grund E, Kroppenstedt R.M (1990). - Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 5-11.

- 27- Gupte M, Kulkarni P, Ganguli B.N (2002). - Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 58, 46-57.
- 28- Haslay C, Leclerc H 1993. *Microbiologie des eaux d'alimentation*. Lavoisier TEC &DOC.
- 29- Hayakawa M, Nonomura H (1984). - Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*, 65, 501-509.
- 30- Hegde V.R, Silver J, Patel M, *et al.*, (2001). - Novel fungal metabolites as cell wall active antifungals: fermentation, isolation, physico-chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiot.*, 54, 74-83.
- 31- Janssen J.J, Strack van schijndel R.J, Van der poest clement E.H, *et al* (1996). Outcome of ICU treatment in invasive aspergillosis. *Intensive Care Med*; 22: 1315-22.
- 32- Janssen J.J, Strack Van Schijndel R.J, Van Der Poest Clement E.H., *et al.*, (1996). Outcome of ICU treatment in invasive aspergillosis. *Intensive Care Med*; 22: 1315-22.
- 33- Killian CH, Feher D (1939). Microbiology of desert soils. pp: 21-127. *Encyclopedie Biologique*.
- 34- Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L., *et al.*, (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the northeast of Algeria. *Journal of Medical Mycology*. 15: 45-51.
- 35- Larpent J.P, Sanglier J.J (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Ed. Masson, Paris 481 p.
- 36- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, (2000). Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78:399-405.
- 37- Lechevalier M.P (1988). Actinomycetes in agriculture and forestry. In: Actinomycetes in biotechnology (Goodfellow M., Williams S.T. et Mordarski M., coord). Ac. Press., London.
- 38- Lee Jung Yeop, Hwang Byung Kook (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48**: 407-417.
- 39- Leminor L, Veron M (1989). *Bacteriologie médicale*. 2^{ème} édition. pp 335-349.
- 40- Mariat F, Sebald M (1990). Actinomycétales. In Le Minor. L., Véron M. *Bactériologie médicale*. Medecine-Sciences. Flammarion. France. Deuxième partie : 933-999.
- 41- Naikpatil S.V, Rathod J. L (2011). Antimicrobial and cytotoxic activity of actinomycetes from Karwar coast, west coast of India, *World Journal of Science Technology*, 1(1): 07-10.

- 42- Nolla Salas J, Sitges Serra A, Leon Gil C, *et al.*, (1997). Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study Group of Fungal Infection in the ICU. *Intensive Care Med*; **23**: 23-30.
- 43- Nomura H, Ohara Y (1969). The distribution of actinomycetes, in soil. VI. A selective plate-culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. Part 1. *J. Ferment. Technol.* **47**: 463-469.
- 44- Nonomura H, Hayakawa (1988). New methods for selective isolation of soil actinomycetes. In Okami y., Beppu T. and ozawara H., (ed.) *Biology of actinomycetes.* Japan scientific societies Press Tokyo. pp 288-293.
- 45- O'Donnel A. G, Minnikin D. E, Goodfellow M (1988). Integrated lipid and wall analysis of actinomycete. In "chemical methode in bacterial systematic" (Goodfellow M. and Minnikin D.E., coord) PP131-143, ac press., London.
- 46- O'Hagan D (1991). - The polyketide metabolites. Ellis Horwor (Eds.) New York, p. 176.
- 47- Ochi K, Haraguchi K, Miyadoh S (1993). - A taxonomic review of the genus *Microbispora* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 58-62.
- 48- Odds F. C (1995). Les antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. *Bull. Soc.Fr. Microbiol.* 10 (4), 285-293.
- 49- Ohmori K, Ishii H, Manabe H., *et al* (1988). – Anti-inflammatory and antiallergic effects of a novel metabolite of *Nocardiosis* sp. as a potent protein kinase C inhibitor from microbial origin. *Arznei mittel forschung.*, 38, 809-814.
- 50- Okami, Y, Hotta, K (1988). - Search and discovery of new antibiotics. In: M.Goodfellow, S.T.Williams & M.Mordarski (eds.) *Actinomycetes in Biotechnology.* Academic Press, New York, pp. 33-67.
- 51- Oki T (1992). Pradimicin, a novel antifungal agent. In "New approaches for antifungal drugs" (Fernandes PV., ed.), Boston, pp. 64-87.
- 52- Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur.j.Soil.Biol.* **37**:69-74.
- 53- Oxford A.E, Raistrick H, Simonart P (1939). Studies in the biochemistry of microorganisms. 60. Griseofulvin, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*
- 54- Palleroni N.J (1980). A chemotactic method for isolation of *Actinoplanaceae*. *Arch. Microbiol.* 128: 53-55. Patel R., (1998). Antifungal agents. Part 1. Amphotericin B

- preparations and flucytosine. Mayo. Clin. Proc. 73: 1205-25. PARKER M.M. (2000). Biology of microorganisms Brock (ed.) pp 637-743.
- 55- Peignen P (1995). - A la recherche de nouveaux antibiotiques. La recherche, 26, 444-447.
- 56- Perez. S, Patterson T.F (2002). Antifungale resistance in pathogenic fungi. Clin. Infect. Dis. 35: 1073-80.
- 57- Pfefferle. C, Theobald, U, Gurtler, H (2000). - Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. Journal of Biotechnology, 80, 135–142.
- 58- Phoebe.C.H, Combie J, Albert F.G., *et al* (2001). - Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. J. Antibiot., 54, 56-65.
- 59- Potoski B.A, Brown J (2002). The safety of voriconazole. Clin. Infect. Dis. 35: 12735.
- 60- Prescott.L, Harley J. P, Klein D. A (2007). Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles: 805–825.
- 61- Sabaou N (1988). - Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat En Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger.192 p.
- 62- Sabaou N, Boudjella H, Bennadji A., *et al* (1998). - Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse, 9, 147-153.
- 63- Sabaou N, Bennadji A, Bennadji H (1992). - Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. Can. J. Microbiol., 38, 1066-1073.
- 64- Scriban R (1999). - Biotechnologie. 5ème édition. Tec et Doc. (Ed.), Paris, 1042p.
- 65- Shearer MC (1997). Methods for the isolation of non-*streptomycetes* actinomycetes. J Ind Microbiol 28: 91-8.
- 66- Shirling. E.B, Gottlieb.D (1968). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species description from the first study. Int. J. Syst. Bacteriol., 18, 69–189.
- 67- Singh S, Barrett J. F (2006). Empirical antibacterial drug discovery-Fondation in natural products. Biochem. Pharmacol., 71: 1006-1015.
- 68- Smaoui S (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat, Spécialité Génie

- de Procédés et Environnement, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).251p.
- 69- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey N (1997) Proposal for a new hierarchical classification system, Actinobacteria classis nov. Int J Syst Bacteriol 47:479-491.
- 70- Stackebrandt E, Goebel B.M (1994). - Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol., 44, 846-849.
- 71- Toumatia.O, Compant.S, Yekkour.A (2013) Biocontrol properties and colonisation ability of the phytosphere and the endosphere of wheat seedlings by *Streptomyces* sp. strain IA1 isolated from the soil in the Sahara of Algeria. Microbiol Res.
- 72- Toumatia O (2010). - Actinomycètes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger.115p.
- 73- Tresner H.D, Davies M.C, Backus E.J (1961). - Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. J. Bacteriol., 81, 70-80.
- 74- Umezawa H. (1988). - Low molecular-weight enzyme inhibitors and immunomodifiers. In: Actinomycetes in biotechnology. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M (Eds.). London: Academic Press, p. 285-325.
- 75- Vinig L.C (1985) - Antibiotic biosynthesis. Biotechnol. Adv., 3, 171-194.
- 76- Waksman S.A (1967). Distribution, isolation and methods of study. In: The Actinomycetes- a summary of current knowledge. The Ronald Press Company. New York. pp: 9-21
- 77- Walsh T.J, Pappas P, Winston D.J. *et al.*, (2002). Voriconazole versus amphotericin B, for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. N. Engl. J. Med. 346: 225-34.
- 78- Wang J, Soisson S.M. *et al.*, (2006). Platensimycine is a selective Fab F inhibitor with potent antibiotic properties. Nature. 441: 358-361.
- 79- Williams S.T, Goodfellow M, Alderson G (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In Bergeys manual of systematic bacteriology, Vol 4 ed.
- 80- Williams S.T, Sharpe M.E, Holt J.P (2002). Baltimore: Williams and Wilkins. Pp. 2452-2492.
- 81- Wingard J.R, Kubillis P, Lee L, *et al.*, (1999). Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. Clin. Infect.Dis. 29: 1402-7.

- 82- Wingard J.R, White M.H, Anaissie E, *et al.*, (2000). A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. L. Amph/ABLC collaborative study group. *Cli. Infect. Dis.* 31: 1155-63.
- 83- Yashuda J.M (2001). An update on antifungal therapy; a focus on systemic Agents for nasive fungal infection. *California J. Health System. Pharm.* 4-42.
- 84- Zaitlin B, Watson S.b, Ridal J (2003). Actinomycetes in Lake Ontario: Habitats, geosmin, and MIB production. *Res J Can*, 95 (2): 115-113-118-125.

ANNEXES

ANNEXE 1

Milieux de culture

I. Milieux d'isolement des Actinomycètes

- **Milieu "chitine - vitamines B "** (Hayakawa et Nonomura, 1997).

Chitine: 2 g; K₂HPO₄: 0,35 g; KH₂PO₄: 0,15 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g; NaCl: 0,3 g, CaCO₃: 0,02 g; FeSO₄, 7H₂O: 10 mg; ZnSO₄, 7H₂O: 1 mg; MnCl₂, 4H₂O: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

Pour ce milieu, sont ajoutés:

- **Les vitamines:** thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine-HCl, inositol, panthoténate de calcium: à raison de 0,5 mg/L et biotine: 0,25 mg/L. Les vitamines sont stérilisées à l'éther puis dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.
- Une solution stérile d'un antifongique, le cycloheximide (80 mg/L).

II. Milieux d'identification des Actinomycètes

1. Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de « International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1996). L'ISP3 et l'ISP4 sont prêts à l'emploi (DIFCO).

1.1. Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL; agar: 20 g. pH 7,2.

1.2. Milieu ISP3

Farine d'avoine: 20 g; solution saline standard: 1 mL; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

- solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g; ZnSO₄, 7H₂O: 0,1 g; eau distillée q.s.p. 100 mL.

1.3. Milieu ISP4

Amidon: 10 g; K₂HPO₄: 1 g; MgSO₄,7H₂O: 1 g; NaCl: 1 g; (NH₄)₂SO₄: 2 g; CaCO₃: 2 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

1.4. Gélose nutritive:

Peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,5.

2. Etude physiologique

2.1. Dégradation des glucides et dérivés

Les glucides, stérilisés à l'éther, sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1 %.

La croissance des souches en fonction des sources de carbone est estimée sur milieu ISP9 de Pridham et Gottlieb (1948). Ce milieu est subdivisé en trois parties:

Solution A: composée de sources de carbone (10g/L dans l'eau distillée) stérilisées par ultrafiltration.

Solution B: solution saline dont les constituants seront utilisés à l'état de trace dans le milieu final. Elle est composée de: sulfate de cuivre: 0,64 g; sulfate ferreux: 0,11 g; chlorure de manganèse: 0,79g; sulfate de zinc: 0,15g; eau distillée 100 mL.

- Cette solution est conservée au réfrigérateur.

Solution C: milieu minéral de base. Il est composé de: sulfate d'ammonium: 2,64 g; phosphate mono-potassique: 2,38 g; phosphate bi-potassique: 5,65g; sulfate de magnésium: 1 g; solution B: 1 mL; eau distillée q.s.p. 1000 mL; pH 7,5.

L'agar est ajouté au milieu qui est ensuite stérilisé à l'autoclave. Le milieu final est obtenu en mélangeant aseptiquement 100 mL de solution A et 900 mL de solution C. Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant du glucose sert de témoin positif.

2.2. Dégradation de l'adénine, de la guanine, de la tyrosine, et de la xanthine (Goodfellow, 1971; Gordon *et al.*, 1974).

0,4 g de chaque composé (sauf pour la guanine et la testostérone: 0,2 g) est suspendu dans 10 mL d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile et maintenue en surfusion à 50°C.

- Gélose nutritive: peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,5.

La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

2.3. Dégradation de l'esculine et de l'arbutine (Marchal et Bourdon, 1987)

Esculine (ou arbutine): 1 g; citrate de fer ammoniacal: 1 g; peptone: 10 g; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7.

La dégradation de ces 2 hétérosides se manifeste par l'apparition d'un pigment brun à noir autour des colonies.

2.4. Dégradation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1994)

Sel de sodium (acétate, benzoate, butyrate, citrate, oxalate, propionate, pyruvate, succinate et tartrate): 2 g, NaCl: 2 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g; (NH₄)₂HPO₄: 1 g; KH₂PO₄: 0,5g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04%: 20 mL, pH 6,8.

* La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

2.5. Production de pigments mélanoides.

*** Milieu ISP6 (Shirling et Gottlieb, 1996).**

Peptone: 20 g; citrate ferrique ammoniacal: 0.5 g; K₂HPO₄: 1 g; thiosulfate de sodium: 0,08 g; extrait de levure: 1 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

*** Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1996).**

Glycérol: 15 g; L-tyrosine: 0,5 g; L-asparagine: 1 g; K₂HPO₄: 0,5 g; MgSO₄,7H₂O: 0,5 g; NaCl: 0,5 g; FeSO₄, 7H₂O: 0,01 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

III. Milieux de production d'antibiotiques

1. Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH 7 à 7,2.

2. Milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955)

Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

ANNEXE 2

Revelateurs chimiques utilisés pour les antibiotiques (Merck, 1975)

1.- Naphtorésorcinol - acide sulfurique: révélateur des glucides.

*Solution a: dissoudre 0,2 g de naphtorésorcinol dans 100 mL d'éthanol.

*Solution b: acide sulfurique (à 20% dans l'eau).

*Solution de vaporisation: juste avant l'emploi, mélanger des volumes égaux de **a** et de **b**.

* Traitement complémentaire: chauffer 5 à 10 min à 100-105°C. Les taches apparaissent roses, violettes ou bleues.

2.- Chlorure de fer ferrique (FeC13): révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.

* Solution de vaporisation: solution de FeC13 de 1 à 5% dans HCl 0,5N. Les taches correspondant aux phénols sont colorées en bleu-vert et celles des acides hydroxamiques, en rouge.

3.- 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.).

4.- Ninhydrine: révélateur des amines, des acides aminés, des osamines et des phospholipides contenant la phosphatidyl-éthano-lamine.

* 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).

5.- Vanilline-acide sulfurique: révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.

* Solution de vaporisation: dissoudre 1 g de vanilline dans 1000 mL de H₂SO₄ concentré.

* Traitement complémentaire: chauffer à 120°C pendant 5 à 10 min. (couleurs violette, rose ou grise).

6.- Réactif de Dragendorff: selon Munier et Macheboeuf: utilisé pour révéler la phosphatidyl-choline.

Solution a: dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth basique dans 10 mL d'acide acétique cristallisable et 40 mL d'eau.

90

Solution b: dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 20 mL d'eau.

Solution de réserve: mélanger a et b (volumes égaux). Cette solution se conserve bien au réfrigérateur (flacon sombre).

Solution de vaporisation: avant emploi, mélanger 1 mL de solution de réserve, 2 mL d'acide acétique cristallisable et 10 mL d'eau.

Les taches de phosphatidylcholine apparaissent