

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr Tahar Moulay – Saida
Faculté des Sciences
Département de Biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : "Microbiologie appliquée"

Thème

**Recherche et caractérisation des substances antifongiques
et antioxydants chez les actinomycètes du sols arides .**

Présenté par :

- **Mme** : BELGACEM Habiba
- **Mme** : BENZERGA Amel

Soutenu le : 28 .Juin 2018

Devant la commission de jury composée de :

Mr SITAYEB .Tayeb	Maitre de conférences A	Université de Saida	Président :.
Mr ADLI DJallal Eddine	Maitre de conférences A	Université de Saida.	Examineur
Mr BENREGUIEG Mokhtar	Maitre de conférences B	Université de Saida	Encadreur.

Année universitaire : 2017 – 2018

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr Tahar Moulay – Saida
Faculté des Sciences
Département de Biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : "Microbiologie appliquée"

Thème

**Recherche et caractérisation des substances antifongiques
et antioxydants chez les actinomycètes du sols arides .**

Présenté par :

- **Mme** : BELGACEM Habiba
- **Mme** : BENZERGA Amel

Soutenu le : 28 .Juin 2018

Devant la commission de jury composée de :

Mr SITAYEB .Tayeb	Maitre de conférences A	Université de Saida	Président :.
Mr ADLI DJalal Edine	Maitre de conférences A	Université de Saida.	Examineur
Mr BENREGUIEG Mokhtar	Maitre de conférences B	Université de Saida	Encadreur.

Année universitaire : 2017 – 2018



Remerciements

Avant tous nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et ce ne sont pas ces quelques mots qui expriment nos sentiments les plus sincères.

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mr BENREGUIEG MOKHTAR pour avoir dirigé ce travail, pour son aide ,ses précieux conseils ,sa compréhension et son soutien moral lors de la Réalisation de ce travail.

Nous exprimons à Mr SITAYEB TAYEB ,toutes nos reconnaissances, d'avoir accepté de

Présider ce jury.Nous le remercions infiniment et sincèrement.

à Mr ADLI DJALLAL EDDINE, pour son aide, son examination et ses corrections sérieuses pour ce travail.

Ainsi nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants du département de Microbiologie,et les techniciens de laboratoire de l'université de Ain el hadjer sans oublier Mr AHMED et les techniciens de laboratoire pédagogiques du département de biologie de Université de moulay tahar de saida Melle SLAMET et LAAREDJ .

Enfin nous remercions nos familles : nos parents pour leurs soutiens sans

Faillie parfois inquiets mais toujours compréhensifs, tout au long de ces années.

Pour tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire

d'une manière directe ou indirecte

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif considéré comme les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. Notre travail a pour but la mise en évidence de l'activité antifongique et antioxydant ainsi que la purification et la caractérisation de la substance impliquée dans ce phénomène chez des actinomycètes isolés à partir du sol aride algérien.

Dix huit isolats ont fait l'objet de cette étude. Les tests d'antagonismes sont réalisés par la technique des cylindres d'agar envers deux bactéries à gram positif *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* et 5 champignons qui sont connues par leur importance dans les pathologies infectieuses humaines. 14 isolats ont montré un pouvoir inhibiteur contre les deux bactéries et 15 isolats ont montré une activité antifongique contre les 5 espèces fongiques : *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus parasiticus* en utilisant la technique de cylindre d'agar. Les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner deux souches d'actinomycètes codées A10 et A7 qui ont un pouvoir inhibiteur très important, ces deux isolats actifs sont utilisés pour une fermentation sur milieu solide (AF) (pour une production de la substance bioactive). Après 14 jours d'incubation à 28°C, le méthanol est utilisé pour l'extraction des métabolites produit dans le milieu. Les différents types des extraits bruts sont testés par la technique de contact direct contre 5 espèces fongiques. L'extrait méthanolique était actif contre les 5 souches cibles même à des faibles concentrations de l'ordre de 2mg/ml.

Le test de dégradation de l'ergostérol a montré que la souche A7 produit une substance antifongique capable d'altérer les stérols membranaires, par contre, la souche A10 n'a donné aucun effet néfaste.

Une caractérisation de l'agent inhibiteur en utilisant des techniques chromatographiques a été réalisée. La séparation par CCM nous a permis de choisir parmi les 6 systèmes solvant utilisé le mélange Toluène - acide acétique (8:2), et le Dichlorométhane - méthanol (8,2) comme étant les meilleurs dans la séparation.

L'activité antioxydant des deux extraits bruts a été évalué à travers le piégeage des radicaux DPPH. Pour le premier test les pourcentages d'inhibition a été estimé à 47% et 58% pour A7 et A10 respectivement. Le test IC₅₀ a été estimé à 14,88 pour l'extrait brut A7 et 8,10 pour l'extrait brut A10 Respectivement.

Mots clé : Actinomycète, molécules bioactives, activité antifongique , activité antioxydant, CCM.

Abstract

Actinomycetes are gram-positive filamentous bacteria considered to be the best candidates for the production of biologically active secondary metabolites. Our work aims to highlight the antifungal and antioxidant activity as well as the purification and characterization of the substance involved in this phenomenon in actinomycetes isolated from the arid Algerian soil. Of the eighteen isolates screened for antifungal potency, only two (A7 and A10) were retained for the remainder of the work. The antagonism tests are performed against 2 bacteria known for their importance in human infectious pathologies, Gram-positive strains: *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by the agar technique, and 5 fungi which are known by their importance in human infectious diseases. 14 isolates showed inhibitory potency against both two bacteria and 15 isolates showed antifungal activity against the 5 fungal species: *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus parasiticus* using the agar cylinder technique. The results obtained allowed us to select two actinomycetes strains coded A10 and A7 which have a very important inhibitory power, these two active isolates are used for solid-state fermentation (AF) (for a production of the bioactive substance). After 14 days of incubation at 28 ° C, methanol is used for the extraction of the metabolites produced in the medium. The different types of crude extracts are tested by the direct contact technique against 5 fungal species. The methanolic extract was active against the 5 target strains even at low concentrations of the order of 2 mg / ml.

The ergosterol degradation test showed that the strain A7 produces an antifungal substance capable of altering the membrane sterols, whereas the strain A10 did not give any harmful effect.

A characterization of the inhibiting agent using chromatographic techniques was carried out. The separation by TLC allowed us to choose from the 6 solvent systems used the toluene-acetic acid mixture (8: 2), and the dichloromethane-methanol (8, 2) as the best in the separation.

The antioxidant activity of the two crude extracts was evaluated through the trapping of the DPPH radicals. For the first test the inhibition percentages were estimated at 47% and 58% for A7 and A10 respectively. The IC₅₀ test was estimated at 14.88 for the A7 crude extract and 8.10 for the A10 crude extract Respectively.

Key words: Actinomycete, bioactive molecules, antifungal activity, antioxidant activity, TLC.

ملخص

تكون شعابيات او الأكتينوميستات هي البكتيريا الخيطية إيجابية الجرام التي تعتبر أفضل المرشحين لإنتاج المركبات الثانوية النشطة بيولوجيا.و يهدف عملنا إلى تسليط الضوء على النشاط المضاد للأكسدة ومضادات الفطريات فضلا عن تنقية وإيجاد توصيف للمادة المنتجة من طرف الأكتينوميستات المعزولة من التربة الجزائرية الجافة والقاحلة.

تمت استهداف 18 عزلة في هذه الدراسة. يتم إجراء اختبارات العداء من خلال تقنية اسطوانة آغار ضد اثنين من البكتيريا موجبة الجرام المكورات العنقودية الذهبية والليستيريا المستوحدة و ضد 5 فطريات معروفة بأهميتها في الأمراض المعدية البشرية حيث أظهرت 14 عزلة من الأكتينوميستات فعالية مثبطة ضد كل من البكتيرييتين و 15 عزلة أظهرت نشاط مضاد ضد الانواع الفطرية الخمسة فيوزاريوم , *graminearum* , فطر الرشاشية , *Aspergillus flavus* , *Aspergillus* , *ochraceus* , *Aspergillus parasiticu* , *Pinicillium, expansum* باستخدام تقنية اسطوانة آغار.

سمحت لنا النتائج التي حصلنا عليها لتحديد سلالتين من الأكتينوميستات المشفرة A10 و A7 والتي اثبتت قدرة تثبيط كبيرة ، وتستخدم كل من العزلات النشطة للتخمير في وسط صلب (AF) بعد 14 يوما من الحضانة عند 28 درجة مئوية، ويستخدم الميثانول لاستخراج الأيضات التي تنتج في الوسط الغذائي يتم اختبار الأنواع المختلفة من المستخلصات الخام بواسطة تقنية التلامس المباشر ضد 5 أنواع فطرية. كان المستخلص الميثانولي نشط و فعال ضد السلالات الخمسة المستهدفة حتى عند التركيزات المنخفضة لترتيب 2 ملغ / مل.

أظهر اختبار اتلاف إرغوستيرون أن سلالة A7 تنتج مادة مضادة للفطريات قادرة على تغيير ستيروول الغشاء، على عكس السلالة A10 التي لم تسفر عن أي أثر سلبي. بينت دراسة الموصافات لعامل مثبط باستخدام تقنية الكروماتوغرافي عملية الفصل بواسطة تقنية CCM سمحت لنا أن نختار من بين ستة أنظمة لمذيبات استخدام خليط التولوين - حمض الخليك (8:2) و داي كلورو ميثان - ميثانول (8،2) كأفضل نظام في عملية الفصل.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من المستخلصين الخام من خلال محاصرة جذور DPPH بالنسبة للاختبار الأول ، تم تقدير النسب المئوية للتثبيط بنسبة 47% و 58% لكل من A7 و A10 على التوالي. وقدرا اختبار IC50 ب 14.88 للمستخلص الخام A7 و 8.10 للمستخلص الخام A10 على التوالي.

كلمات البحث : الاكتينوميستات , الجزيئات النشطة بيولوجيا، مضاد للفطريات، النشاط المضاد للأكسدة, CCM .

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Abréviation	
Résumé	
Introduction générale.....	1

Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes

I. Généralités sur les actinomycètes	4
I.1. Définition et caractéristiques	4
I.2. Historique:	5
I.3. Ecologie	6
I.4. Taxonomie et critères de classification:	8
I.4.1. Taxonomie des actinomycètes	8
I.4.2 Classification.....	8
I.5 Physiologie de développement.....	10
I.5.2 L'oxygène:	10
I.5.3 Le pH:	10
I.5.4 La température.....	10
I.5.5 L'activité de l'eau (Aw):	10
I.5.6 Tolérance en Na Cl.....	10
I.6 Cycle de développement	11
I.6.1. Mycélium primaire:	11
I.6.2. Mycélium secondaire:	12
I.6.3. Types de spores:	12
I.6.3.1 Les exospores	13
I.6.3.2 Les endospores	13
I.7. Morphologie:	14
I.8. Importance:	15

1.8.1 Domaine médical et pharmaceutique	15
1.8.2 Domaine agronomique	15
I.9. La production d'antibiotiques:	16
1.10 La production d'antifongiques	17

Chapitre II : Antifongique et antioxydant

II. Antifongique et antioxydant :	19
II.1. Les Mycoses :	19
II.1.1. Principaux agents des mycoses :	19
II.1.2 Pathologies mycosiques les plus fréquentes	21
II.1.3 Antifongiques disponibles utilisés contre les mycoses	24
II.2. Les antifongiques :	26
II.2.1. Définition	26
II.2.2. Historique :	26
II.2.3. Principaux antifongiques naturels utilisés en médecine humaine :	27
II.2.3.1. Griséofulvine	27
II.2.3.2 Nystatine	28
II.2.3.3. Autres agents polyènes antifongiques :	29
II.2.4 Les antifongiques allylamines	30
II.2.4.1 Le chlormidazole	30
II.2.4.2 Le tolnaftate	30
II.2.4.3 La fluorocytosine	31
II.2.4.4. Les imidazoles	31
II.2.4.5. Les antifongiques allylamines :	33
II.2.4.6 Les antifongique non classés	35
II.2.5 Nouveaux antifongiques d'origine naturelle	35
II.2.5.1 Echinochandines	35
II.2.5.3 Nikkomycines	35
II.2.5.4 Pradimicines :	36
II.2.6 Modes d'action des principaux antifongiques utilisés en thérapeutiques	36
II.2.7 Mécanismes de résistance aux principaux antifongiques	39
II.2.8 Techniques d'étude et de caractérisation d'un antifongique :	44
II.2.8.1. Extraction des antifongiques	44

II.2.8.2 Purification des antifongiques	45
II.2.8.3. Identification des molécules par des méthodes spectrales :	45
II.3. Activite antioxydant :	46
II.3.1. Le potentiel antioxydant	46
II.3.2 Les radicaux libres.....	46
II.3.3. Origine des radicaux libres	47
II.3.4. Cibles des radicaux libres:	49
II.3.5 Le stress oxydatif.....	50
II.3.6 Les antioxydants	50
II.3.6.1 Les antioxydants endogènes	50
II.3.6.2 Les antioxydants exogènes	50
II.3.7 Les Antioxydants chez les actiobacéries	52

Partie Experimentale

Chapitre III : Matériels et méthodes

III. Matériels et méthode	55
III.1 Objectif.....	55
III.2. Criblage des souches actinomycétales :	56
III.2.1 Origine des souches	56
III.2.2. Revivification des souches	56
III.2.3. Confirmation de l'identité des souches d'actinomycètes	56
III.3. Etude morphologique :	56
III.3.1. Les caractères culturels et morphologiques	56
III.3.2. Etude micro morphologique :	57
III.3.2.1. Observation au faible Grossissement :	57
III.4.1. Etude de l'activité antibactérienne :	59
III.4.1.1. Préparation des inocula de bactéries-tests :	59
III.4.1.2. Technique des disques d'agar (Tortorano <i>et al</i> , 1979) :	59
III.4.1.3. Lecture :	59
III.5.2. Etude de l'activité antifongique :	60
III.5.2.1. Préparation des suspensions fongiques :	60
III.5.2.2. Mise en évidence des activités antifongiques	60
III.5.2.3. Lecture	61

III.6. Production du métabolite secondaire:	61
III.6.1.Fermentation sur milieu solide:	61
III.7.Extraction des metabolites:	61
III.7.1. Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide	61
III.8. Tests de l'activité antifongique des extraits	63
III.9. Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique :	64
III.10. caractérisation préliminaire de l'agent antifongique par CCM :	64
III.10.1. Principe :	64
III.10.2. Préparation de la plaque	65
III.12. La semi-purification des fractions séparées par CCM :	67
III.13. Contrôle de l'activité de chaque composant séparé	68
III.14. Etude de l'activité antioxydant :	68

Chapitre IV: Résultat et discussion

IV .Résultat et discussion	73
IV .1 .Résultat de Rèvivification des souches d'actinomycètes	73
IV.2. caractéristiques macroscopiques des isolats	73
VI. 3. Resultats de l'activite antibacterienne	75
IV.4.Caractérisation morphologique	79
IV.4.1. Macromorphologie et caractères cultureux	79
VI.4.2. Coloration de gram	80
V. Tests de l'activité antifongique des extraits	86
V.1 Technique de contact directe ou de dilution.....	86
V.2 Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique	90
v.2.1 Résultat de la bioautographie :	95
v.2.2 Purification des molécules bioactives	96
V..4 Piégeage du radical libre DPPH	97
V.3.Les IC 50 sur le radicale DPPH.....	100
Conclusion	103
Référence bibliographique	106
Annexe	112

Liste Des Figures

Figure 1: Une colonie du genre <i>Streptomyces</i> sur milieu solide (Dvorak, 1999)	5
Figure 2: Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi, 2009).	9
Figure 3: Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> (Hopwood <i>et al.</i> 1985)	11
Figure 4 : morphologie des différentes chaînes de spores chez les streptomycètes	13
Figure 5: Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes	14
Figure 6 : Griséfuline® Laboratoire Sanofi Winthrop	27
Figure 7 : Mycostatine ® Laboratoire Bristol Myers Squibb	28
Figure 8 : Fungizone ® Laboratoire Bristol-Myers-Squibb.....	29
Figure 9 : Sporiline® Laboratoire Schering-Plough	30
Figure 10: Ancotil ® Laboratoire Roche	31
Figure 11 : (a) Daktarin®, (b) Triflucan® Laboratoire Pfizer, (c) Sporanox® Laboratoire Janssen Cilag	32
Figure 12: Econazole (Pevaryl®) laboratoire Janssen-Cilag	32
Figure 13 : Clotrimazole (Trimysten®), laboratoire Roger Bellon.....	33
Figure 14 : Voriconazole (Vfend ®),	33
Figure 15 : Naftifine.	33
Figure 16 : Lamisil® Laboratoire Novartis Pharma	34
Figure 17 : Locéryl® Laboratoire Roche	34
Figure 18 : cible d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote	38
Figure 19 : Mécanismes de résistance aux polyènes chez <i>C. albicans</i>).	40
Figure 20 : Mécanismes de résistance aux 5-fluorocytosine (Ben-Ami <i>et al.</i> , 2008).	41
Figure 21 : Mécanismes de résistance aux azolés chez <i>C. albicans</i>	43
Figure 22 : Mécanismes de résistance aux échinocandines chez <i>C. albicans</i>	44
Figure 23 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).	48
Figure 24 : Structure de l'enchaînement benzo- γ -pyrone (Di carlo <i>et al.</i> , 1999).	51
Figure 25 : ensemencement par écouvillonnage de la suspension sporale sur milieux sabouraud	60

Figure 26 : technique de contact par des cylindre d'agar de 6mm de diamètre déposés sur milieux sabouraud	61
Figure 27 : filtration des extraits en utilisant le papier.....	62
Figure 28 : récupération des extraits mathanolique après filtration	62
Figure 29 : concentration des extraits par évaporation au rota vapeur à 40°C.....	63
Figure 30: migration du solvant par capillarité vers le haut sur plaque CCM	66
Figure 31 : semi purification des extraits sur couche mince de silice.....	67
Figure 32 : récupération des taches de migration des deux extraits A7 et A10 après la semi purification	68
Figure 33: Réaction de test DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Congo, 2012).	69
Figure 34: Schéma du mode opératoire du piégeage du radical DPPH	70
Figure 35 : aspect macroscopiques des isolats	74
Figure 36 : inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Listeria monocytogenes</i> par les isolats des actinomycètes	76
Figure 37 : inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> par les isolats des actinomycètes	76
Figure 38 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes contre <i>S. aureus</i>	77
Figure 39: activité inhibitrice de nos actinomycètes contre <i>Listeria monocytogenes</i>	78
Figure 40 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes vis-à-vis <i>L. monocytogenes</i>	78
Figure 41: Aspect morphologique et caractères culturels des souches A7 et A10	80
Figure 42: observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram	80
Figure 43 : Aspect macroscopique de certaines souches fongique cibles.....	81
Figure 44 : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre 5 souches fongique	82
Figure 45 : résultat de la technique de cylindre d'agar	84
Figure 46 : étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide.	86
Figure 47 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche A10	87
Figure 48 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche A7	87
Figure 49 : Illustration du résultat de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique.....	91
Figure 50 : Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm.avec système Toluène - acide acétique(8 :2)	92
Figure 51 : Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm.avec système Déchlorométhane –méthanol (8,2).	93

Figure 52 : Chromatogramme représentant les résultats de la semi purification des extraits sur couche mince de silice sous UV à 254 et 365 nm	94
Figure 53 : Illustration du résultat de la bioautographie contre la souche fongique (<i>Aspergillus flavus</i>)	95
Figure 54 : illustration des différentes fractions obtenues par CCM après purification. incubations de 48h.	96
Figure 55 : illustrations des zones d'inhibitions des fractions actives purifiées	97
Figure 56: piégeage du radical DPPH (de couleur violette au dipényl picyl-hydrazine de couleur jaune)	98
Figure 57: Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.....	99
Figure 58 : Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait A 10	99
Figure 59: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'Acide ascorbique.....	100

Liste Des Tableaux

Tableau 1 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents	6
Tableau 2 : Répartition des actinomycètes dans la nature	7
Tableau3 : Principaux antibiotiques élaborés par les espèces de Streptomyces	17
Tableau 4 : Classification des antifongiques selon la cible	39
Tableau 5: Quelques exemples de molécules antioxydants produites par différentes souches d'actinobactéries.	52
Tableau 6 : Caractéristiques des souches bactériennes tests.	58
Tableau7 : références des espèces fongiques	58
Tableau N 8 : Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre les micro-organismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar	75
Tableau 9: Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives.....	79
Tableau 10: pouvoir antifongique des actinomycètes obtenus par la technique de cylindre d'agar.....	82
Les tableaux (11 à 15) : développement mycélienne des cinq souches fongique testées vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait.....	88
Tableau 16: résultats de l'effet antifongique en présence de l'ergostérol.....	90
Tableau 17: résultat de la chromatographie sur couche mince système Toluène - acide acétique(8 :2	93
Tableau18 : Résultat du test d'activité des extraits semi purifiés et les Rf des fractions actives	96
Tableau 19: valeurs de IC50 en (mg /ml) pour le test DPPH.....	101

Liste des abréviations :

%: Pourcentage

µl : micro-litres

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : *Aspergillus flavus*

AO : *Aspergillus ochrasus*:

AP : *Aspergillus parasiticus*

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American type culture collection

Aw : activité d'eau.

C° : degré Celsius.

CaCO₃ : carbonate de calcium.

CCM : chromatographie couche mince.

Cdr1 : *Candida* drug resistance 1

Cdr2 : *Candida* drug resistance 2

DPPH: 1, 1- diphenil-2- picrylhydrazyl

DRO: dérivés réactifs de l'oxygène

EOA: espèces oxygénées réactives

ERG3, 6 et 11 : gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol

Fe²⁺ : Ion ferreux

FG : *Fusarium graminearum*

FKS1 : gène codant pour la 1,3-beta-D-glucan synthase

FKS2 : gène codant pour la 1,3-beta-D-glucan synthase

FUR1 : gène qui code une phosphoribosyl-transférase

G/C: Guanine et cytosine.

g: gramme

GYM: Glucose-Extrait de levure-Extrait de Malt.

H⁺: Proton

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HO[•] : Radical hydroxy

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

Hsp90 : heat shock protein

I (%): pourcentage de fongitoxicité.

IC 50% : concentration inhibitrice 50%

IR : Infrarouge

ISP: International *Streptomyces* Project (milieu de culture)

MA: Mycélium aérien,

MDR1 : multidrug resistance gene 1

mg : milligramme

ml : millilitre

mm : millimètre

MS : Mycélium de substrat

NaCl : Chlorure de sodium.

NADPH : Nicotinamide-Adenine-dinucleotide-Phosphate

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

nm : Nanomètre.

NO[•] : Oxyde nitrique

O₂ : Oxygène

ONOOH : Nitroperoxyde.

P/V: Poids sur volume

PDA : Potato dextrose d'agar

PE : *Penicillium expansum*

pH : Potentiel d'Hydrogène.

Rf : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique

SH : Groupement sulfhydryle

SOD : Superoxyde dismutase

UFC : unité formant colonie.

URPT : l'uridine phosphoribosyl-transférase

UV: Ultra-violet

A decorative blue line frame resembling a scroll. It has a horizontal top bar with a rounded right end and a small loop on the left. A vertical line descends from the left, with a small loop at the bottom, and then continues horizontally to the right, ending in a rounded corner.

Introduction

Introduction:

Le taux de mortalité associé aux infections invasives causé par les champignons pathogènes est très élevé (**Bowet al., 1997, Singh Naveryetal., 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 (**Wingardet al., 1999, Harbathet al., 2002**). Les formulations phospholipidiques présentent un meilleur profil de tolérabilité mais leur coût est énorme (**Wingardet al., 2000, Fleminget 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 (**Walshet 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 (**Albengreset al., 1998, Arathoonet 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, Walshet al., 2002, Arnest, 2001**).

Les meilleurs agents antifongiques mis sur le marché médical sont tous des produits de fermentation (**Perezet al., 2002**). Les actinomycètes représentent les principales sources de métabolites secondaires à activité anticellulaire (**Financeet 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 (**Larpentet al. 1989**).

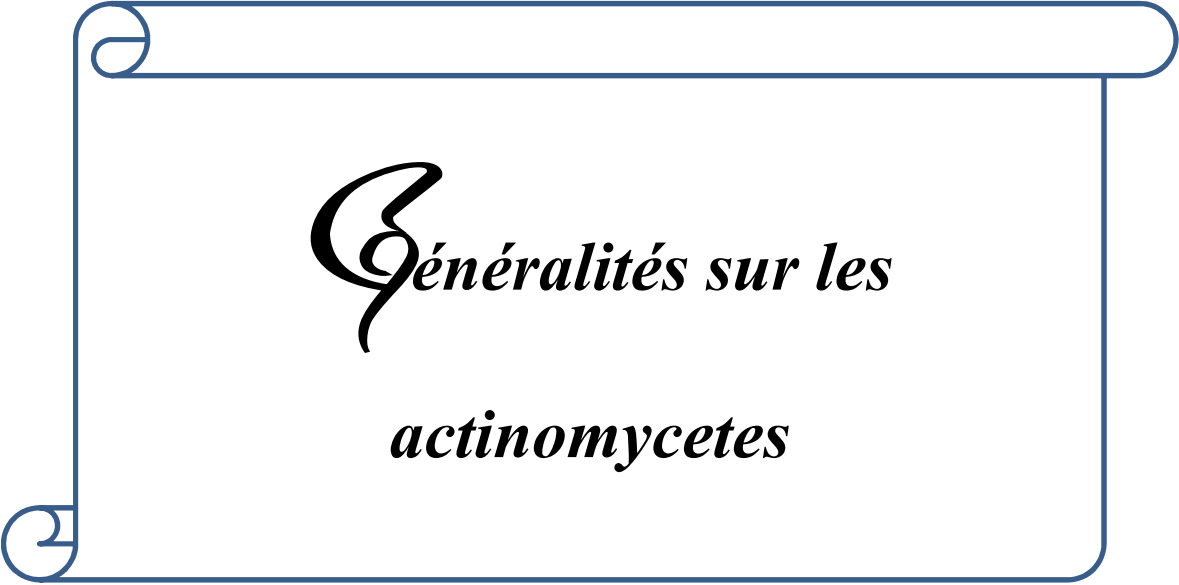
En outre, les bactéries actinomycétales dites rares constituent une source potentiellement importante et encore peu explorée de nouveaux métabolites secondaires à activité antibactérienne et antifongique (**Financeet al., 1985, Hacèneet al., 1994, Ouhdouchet al., 2001, Khattabiet al., 2002, Lemrisset al., 2003, Zitouniet al., 2005, Jun Wang, 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* (**Sheareret al., 1997, Lamariet al., 2002**).

Dernièrement les nouvelles études ont montré que les radicaux libres d'oxygène possèdent un rôle critique dans diverses maladies telles que le cancer, l'Alzheimer, plusieurs infections et les maladies auto-immunes et cardiovasculaire (**Lee et al., 2014**). Du fait de l'impact négatif de l'utilisation d'antioxydants synthétiques sur la santé humaine, il est devenu un sujet très étudié (**Barlow, 1990**). Pour l'utilisation des antioxydants et leurs substitution plusieurs limites et restrictions seront suivies (**Frankel, 1993 et Moure, 2001**). Afin de résoudre ce problème les chercheurs s'intéressent à identifier des antioxydants naturels dérivant des plantes ou des microorganismes tels que les actinomycètes qui sont riches en métabolites secondaires (**Lee et al., 2014**).

Nous nous sommes intéressés par l'extraction de molécules actives des souches d'actinobactéries isolées de la région de El Bayedh en mettant en évidence leur profil antifongique et antioxydant.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique sur les actinomycètes ainsi qu'un aperçu général sur leur métabolisme secondaire, antifongique et antioxydant.

La seconde partie du document traite les principes généraux des matériels et méthodes utilisés. Et enfin, la troisième partie du manuscrit présentera les résultats et discussion des principales parties de cette étude pour pouvoir tirer une conclusion.

A decorative blue scroll frame with rounded corners and small circular details at the top-left and bottom-left corners.

Généralités sur les actinomycètes

II. Généralités sur les actinomycètes

II.1. Définition et caractéristiques

Les actinomycètes sont des bactéries Gram positives chimio-organotrophes dont l'ADN contient un pourcentage en GC supérieur à 50%, formant des filaments ramifiés qui se développent dans la gélose formant un mycélium végétatif et à la surface formant un mycélium aérien, ce dernier, forme des conidies ou conidiospores, la différenciation des spores, leur regroupement, ainsi que la composition en sucre de la paroi du mycélium constitue un critère de classifications des différents genres de ce groupe (**Larpen et Larpen Gourgaud, 1997**).

La plupart des actinomycètes sont non mobiles, la mobilité est présente chez les spores libérés par les sporanges et qui sont flagellées, caractéristiques présentes chez les *Actinoplanes* (**Locci, 2005**).

Ils sont caractérisés par une croissance plus lente que celles des bactéries, variable allant de quelques jours à quelques semaines, une croissance relative aux espèces et aux conditions de culture (**De Jager et al., 2009 ; Saurav et Kannabiran, 2010**).

Sur milieu solide, les actinomycètes sont caractérisées par une couleur spécifique aussi bien au mycélium aérien que celui du substrat est qui n'est pas forcément la même, avec comme couleurs habituelles, le blanc, le gris et le beige, une pigmentation diffusible dans la gélose appelés pigmentation mélanoides peut également être observée.

En milieu liquide, le développement s'effectue uniquement sous sa forme primaire, la production de pigment reste la même pour un milieu donné, et la différenciation physiologique y est mieux exprimée (production d'antibiotiques notamment) (**Keulen et al., 2002**).

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons (eucaryote) (**Otto, 1998**), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leurs morphologies fongiques (**Lefebvre, 2008**). Mais actuellement ils sont classés définitivement parmi les bactéries (procaryote), du fait que leurs matériels génétiques et dépourvus de noyau, contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est inclus dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire. Les principales différences entre les champignons et les actinomycètes peuvent être résumées dans les points suivants:

❖ Leurs parois qui ne renferment ni cellulose ni chitine, se retrouvent respectivement chez les plantes et les champignons (**Shukla, 2010**),

❖ diamètre de leurs mycéliums est approximativement le un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (généralement 0.7 à 0.8 μm),

- ❖ Leurs sensibilités aux attaques des bactériophages et lysozymes (**Hawker & Linton, 1971**).
- ❖ Leurs sensibilités aux antibiotiques antibactériens (**Rangas wami & al, 2004. Winn & Koneman, 2006.**).

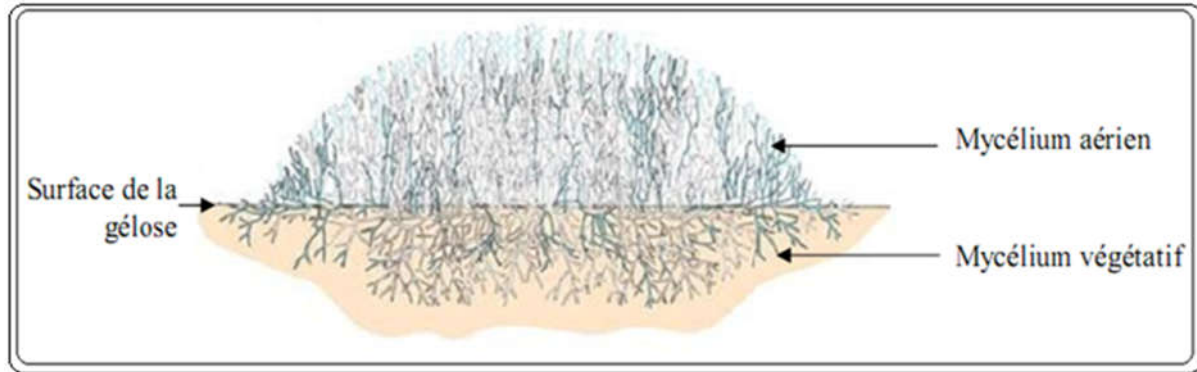


Figure 1: Une colonie du genre *Streptomyces* sur milieu solide (**Dvorak, 1999**)

II.2. Historique:

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

- **La première période (1874-1900):**

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

- **Seconde période (1900-1919):**

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

- **Troisième période (1919-1940):**

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

- **Quatrième période :**

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

II.3.Écologie:

Les actinomycètes représentent un groupe largement distribué dans les écosystèmes naturels (**Srinivasan et al., 1991**). (Tableau 1).

- **Le sol:**

Les actinomycètes sont abondants dans le sol terrestre, et sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2 m de profondeur c'est-à-dire dans la rhizosphère (**Nonomura, 1969; Yamamoto et al., 1999**).

Tableau 1 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**)

Genres	Fréquence (%)
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,94
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06

- **L'eau:**

Ces bactéries sont aussi abondantes en milieu hydrique : dans les eaux des lacs, des rivières, des ruisseaux et également des mers et des océans (**Cheraiati et al., 2012**). Les actinomycètes ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques : eau de mer et de sédiments marins (**Jensen et al., 1991; Ghanem et al., 2000**), eau douce (**Kitouni et al., 2005**), eau issue de marécages salés (**Al-Zarban et al., 2002 ; Boughachiche et al., 2005**).

- **L'air:**

L'air constitue pour les actinomycètes un moyen de transport et non pas un habitat (**Gazenko et al., 1998**).

- **Les composts:**

Certains genres d'actinomycètes semblent préférer certains habitats par rapport à d'autres, comme *Thermoactinomyces* qui se trouve fréquemment dans les composts (**Song et al., 2001**).

Tableau 2 : Répartition des actinomycètes dans la nature (Goodfellow, 1983).

Habitat	Genres
Sol	Actinomodura Actinoplanes Microbispora Micromonospora Nocardia Rhodococcus Streptomyces Streptosporangium
EAU	Actinoplanes Micromonospora Nocardia Rhodococcus Streptomyces
Litière	Actinoplanes Rhodococcus Streptomyces
Matière en décomposition	Sacharomonospora Thermomonospora
Nodule de racine	Frankia
Fumier	Rhodococcus

II.4. Taxonomie et critères de classification:

II.4.1. Taxonomie des actinomycètes:

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des Actinomycétales créé par Buchanan en 1916.

Actuellement, le phylum Actinobacteria tel qu'il figure dans le Bergey's manual (2012) renferme cinq classes : Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria et Thermoleophilia qui sont subdivisées en 19 ordres, 50 familles et 221 genres (**Goodfellow M, 2012**).

II.4.2. Classification:

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec des champignons du fait de leur morphologie fongoïde (présence de filament ramifiés, sporulation) (**Reponen et al., 1998**), ainsi que de l'allure mycosique des maladies que certains provoquent (**Gazenko et al., 1998**), mais leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries (**Mariat et Sebald, 1990**). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitage par des bactériophages, leurs sensibilités aux antibiotiques, antibactériens) ne permet pas de les classer parmi les mycètes (**Hasley et Leclerc., 1993**).

La Classification phylogénétique des Actinomycètes basée sur le séquençage de l'ARN 16S est montrée dans la **figure2**.

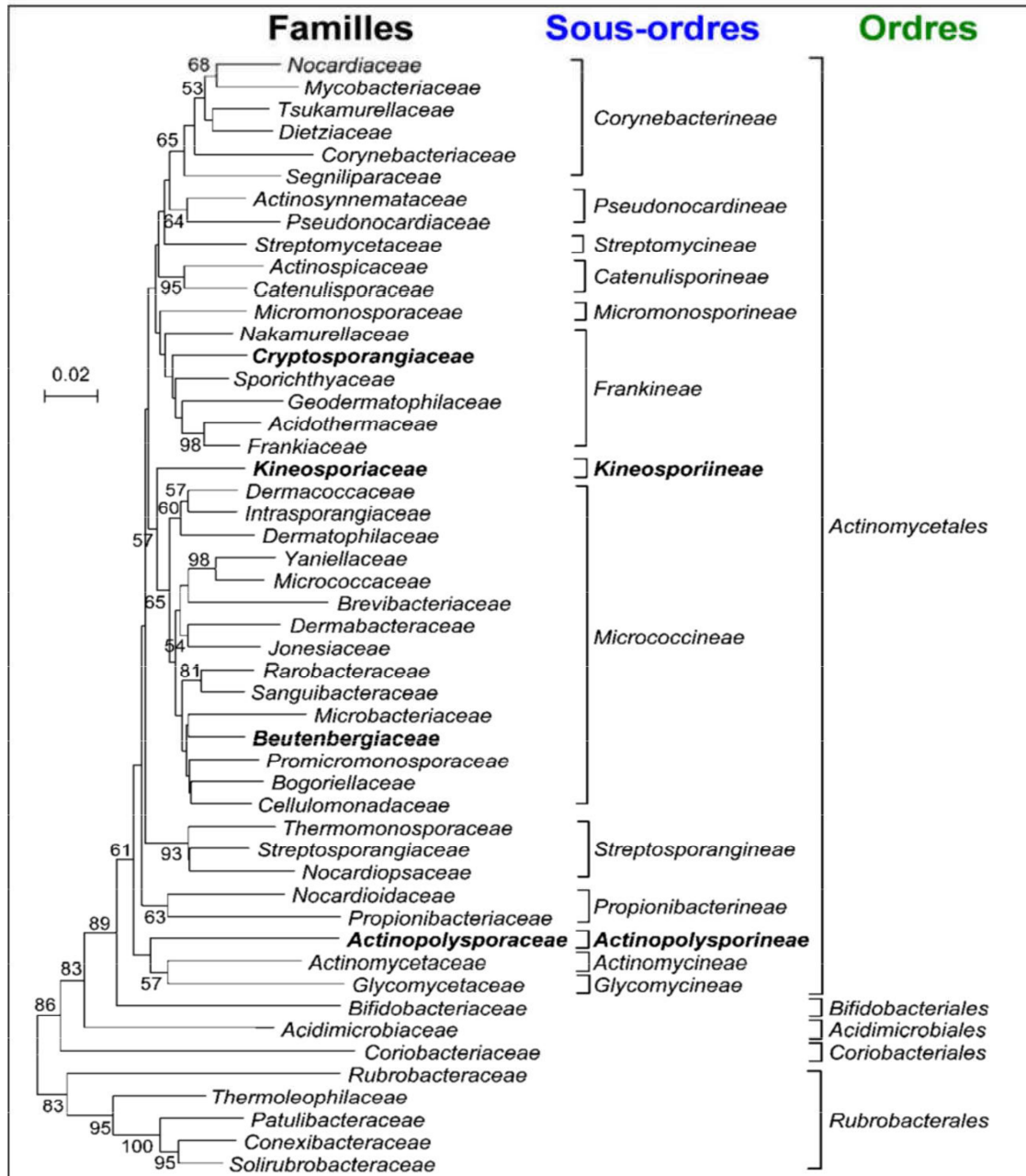


Figure 2: Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi, 2009).

I.5. Physiologie de développement:

La croissance des actinomycètes est influencée par plusieurs paramètres physiologiques en particulier: l'oxygène, le pH, la température...etc.

I.5.1. L'oxygène:

On peut diviser les actinomycètes selon leurs types respiratoires en deux groupes:

❖ Les formes fermentatives anaérobies, représentées par le genre type *Actinomyces*, qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs, Ils font partie de la flore de Veillons (**Avril et al., 1992**).

❖ Les formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces*, sont abondantes dans la nature en particulier sur le sol (**Avril et al., 1992**).

I.5.2. Le pH:

Pour le pH, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, et font une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8. Mais on peut observer une croissance à des valeurs de pH inférieurs à 4 (**McKinney, 2004**), telle est le cas pour les souches acidophiles comme le genre *Streptacidiphilus* (**Wang et al., 2006**).

I.5.3. La température:

La température optimale de croissance est entre 25 à 30°C, mais les espèces thermophiles peuvent croître à des températures entre 55 et 65°C (**Rangaswami et al., 2004**).

I.5.4. L'activité de l'eau (Aw):

La germination des spores de la plupart des actinomycètes peut être observée à des valeurs d'activité d'eaux supérieures ou égales à 0,67, l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égal à 0,98 (**Zvyagintsev et al., 2005**).

I.5.5. Tolérance en Na Cl:

Selon leurs exigences en NaCl, les microorganismes sont divisés en deux groupes :

❖ **Les halophiles:** ont besoin de sel (NaCl) pour leurs croissances, cette concentration peut varier de 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusqu'à 15-30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.

❖ **Les halotolérants:** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leurs croissances. On distingue, les légèrement tolérants (tolèrent de 6 à 8 %

de NaCl (P/V) ; les modérément tolérants (tolèrent de 18 à 20 % de NaCl (P/V) et les extrêmement tolérants (se développent de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (Nanjani, 2011).

I.6. Cycle de développement:

Les actinomycètes ont un cycle de développement complexe (**Figure 3**). Il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifie. Le développement du mycélium de substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (Kim *et al.*, 2004).

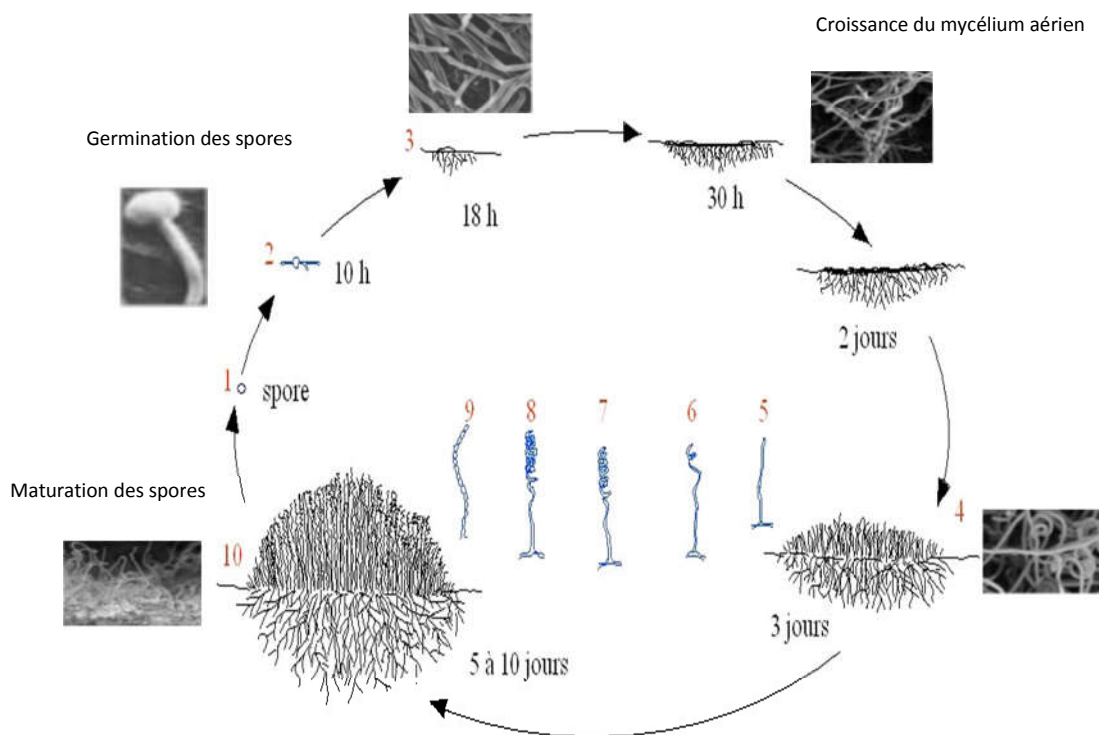


Figure 3: Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood *et al.* 1985)

I.6.4. Mycélium primaire:

Le mycélium primaire est appelé aussi mycélium végétatif, mycélium de substrat ou mycélium intramatriciel, c'est un ensemble de filaments multinucléaires formés à partir du tube germinal (hyphe) issue d'une spore. Cet hyphe s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises. Son développement, sur la surface et à l'intérieur du milieu solide,

donne naissance à des jeunes colonies, formées par des filaments attachés en matrice complexe (**Mighélez et al., 2000**).

I.6.5. Mycélium secondaire:

Le mycélium secondaire est appelé aussi mycélium aérien, il se forme lorsque la colonie sera plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches spécialisées qui se développent loin de la surface de la colonie en donnant un mycélium reproductif dans l'air. Contrairement à celui du substrat, le mycélium aérien est plus épais et peu ramifié, il est protégé par sa paroi hydrophobe et peut se développer sur milieu pauvre en sources nutritionnelles, dans la plupart des cas, par la dégradation du mycélium de substrat dont les produits assurent un apport de nutriments pour sa croissance loin de la colonie. (**Miguélez et al., 2000**).

I.6.6. Types de spores:

Les actinomycètes sont particuliers par la formation de différents types de spores, leurs différenciations rentrent dans leurs critères de classifications, pour les streptomycètes filamenteuses, les spores sont disposées sur le mycélium aérien, les chaînes de spores peuvent être droites, flexueuses ou en spirales, elles sont résumées dans la figure n° 4. Leurs dispositions peuvent être en spores libres, ou attachées les unes aux autres pour atteindre jusqu'à 50 spores sur un seul hyphe ou dans des sacs appelés sporanges, cette formation peut résulter d'une segmentation ou désarticulation de ces hyphes (**Hopwood, 2007**).

La surface des spores peut être lisse, verruqueuse (se réfère aux verrues), épineuse, rugueuse, ou bien poilue (**Dietz et Mathews, 1971**), la plupart de ces spores sont ovoïdes sphériques et non mobiles, mais il existe également d'autres types de spores comme les formes flagellées mobiles présente chez les *Actinoplanes*.

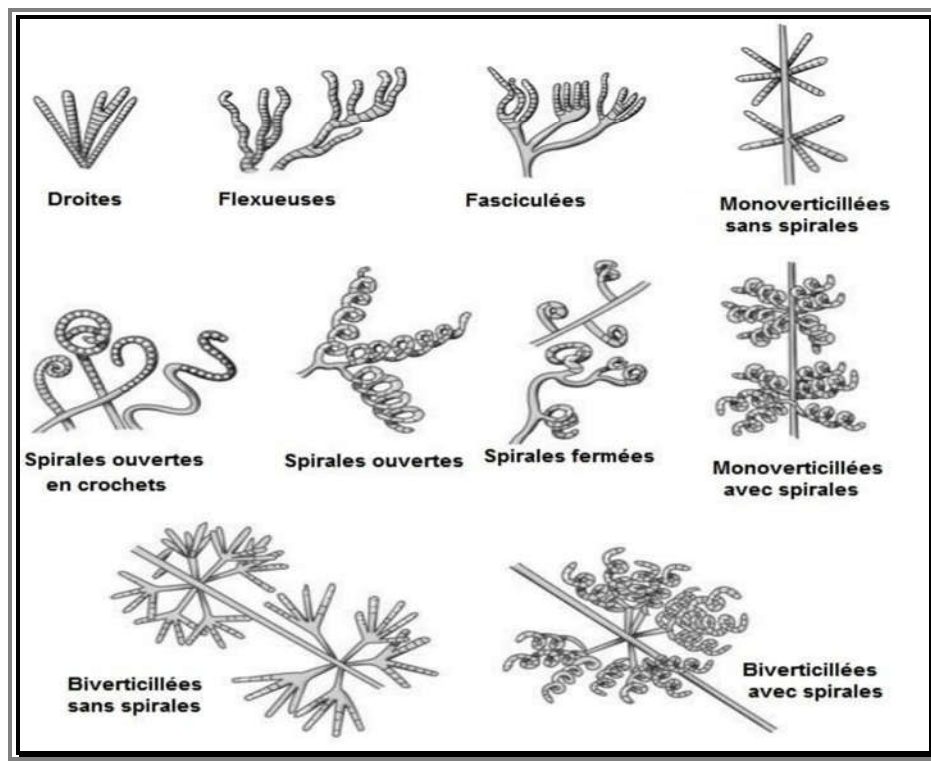


Figure 4 : morphologie des différentes chaînes de spores chez les streptomycètes (Madigan et al., 2011).

Les spores d'actinomycètes ont une fonction de dispersion et de survie dans des conditions défavorables de croissance végétative. Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation: exospores et endospores.

I.6.3.1. Les exospores: sont le type le plus fréquent, elles sont formées par septation d'hyphes existants et séparation des éléments obtenus.

I.6.3.2. Les endospores: sont produites par des actinomycètes thermophiles, elles sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphes existant. La viabilité des spores est fonction de leur type: des endospores de *Thermoactinomyces* ont survécu plusieurs centaines d'années dans des sédiments lacustres à 5 °C. Comparativement, des exospores sèches de *Streptomyces* survivent 20 à 30 ans comme les conidies de champignons.

La thermorésistance des endospores est nettement supérieure à celle des exospores en milieu sec ou humide (Leveau et Buix, 1993).

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement : la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.

Les facteurs propres aux microorganismes sont d'ordres génétiques et biochimiques. De nombreux travaux ont mis en évidence des biorégulateurs codés par des gènes chromosomiques et plasmidiques influant de manière complexe sur la sporulation ainsi que sur la biosynthèse de métabolites secondaires (Beppu, 1986, 1992 ; Grafe et al., 1984 ; Khokhlov, 1986 ; Vitalis et al., 1986).

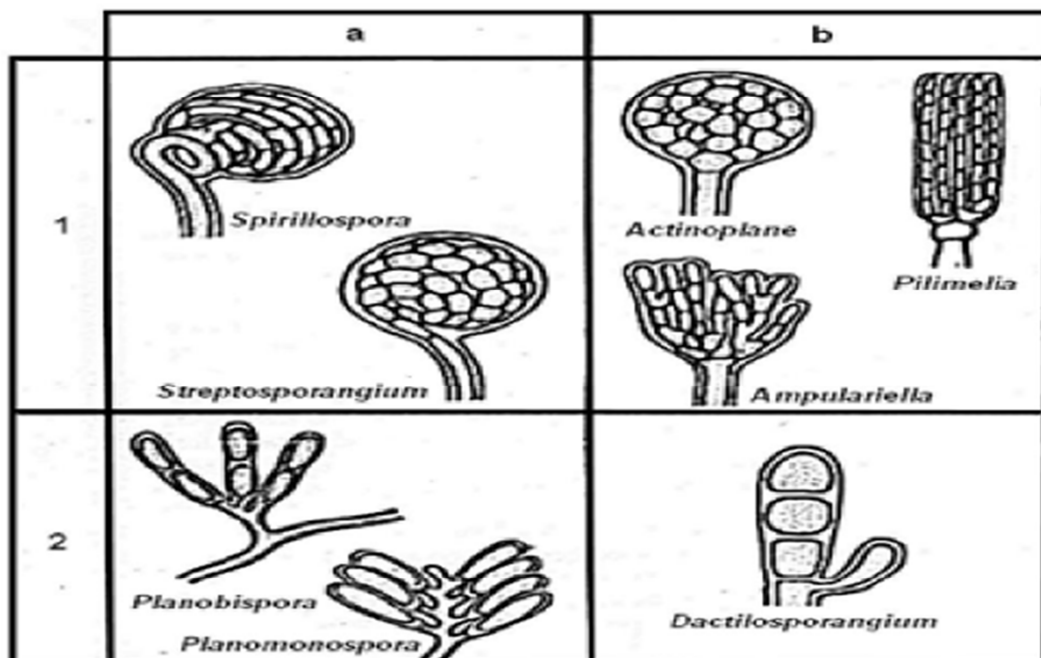


Figure 5: Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes (Larpent et Sanglier, 1989).

a: sur le mycélium secondaire- **b:** sur le mycélium primaire-**1:** spores nombreuses- **2:** spores en nombres limités

I.9. Morphologie:

La morphologie des différents groupes d'actinomycètes varie de simple bacille diphtéroïde à des formes mycéliennes complexes (Gottlieb, 1973) certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux : mycélium végétatifs, ou de substrat (Michel et al., 1988) 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 (**Locci, 1976**)

I.10. Importance:

Les actinomycètes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale, et sont recherchés de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives (**Vijayakumar et al., 2007**).

I.8.1. Domaine médical et pharmaceutique:

Les métabolites secondaires produits par les actinomycètes présentent un grand nombre d'effets biologiques diverses, notamment des activités antimicrobiennes. Ils sont doués aussi d'une activité et aussi antifongique, antivirale, anticancéreuse (**Demain, 2009**).

En plus de la production d'antibiotiques, les actinomycètes produisent un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activités biologique, tel que des enzymes utilisées (les transglutaminases, les xylanases et les cellulases), des inhibiteurs d'enzymes, des immunosuppresseurs, des toxines et des pesticides (**Rawashdeh et al., 2005 ; Li et al., 2005 ; Dairi, 2005 ; Pizzul, 2006**).

I.8.2. Domaine agronomique:

Les actinomycètes ont :

- ❖ Une capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires, qui leur confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique dans le sol(**Goodfellow et Williams, 1983**).

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

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

- ❖ Un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine ... etc (**Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**).

- ❖ Une capacité de recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (**Holzapfel et al., 2002**).

I.10. La production d'antibiotiques:

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques (**Berdy, 2005**). On estime que les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les actinomycètes. Historiquement **A.Waksman** fut le premier à démontrer la richesse des actinomycètes dans ce domaine, il isola quatre des premiers antibiotiques utiles : l'actinomycine (1940); la streptomycine (1944) ; la néomycine (1949) et la candidine (1953). Parmi les espèces actinomycétales, les *Streptomyces* sont les plus importants producteurs d'antibiotiques et autres métabolites secondaires, 75% des antibiotiques sont produits par les espèces de streptomycètes (**Revel et al., 2000**). Les antibiotiques des actinomycètes peuvent être classés en groupes chimiques quelques exemples:

- -Les aminoglycosides (streptomycine, néomycine, kanamycine, gentamicine);
- -Les macrolides (érythromycine)
- -Les ansamycines (rifamycine)
- -Les bêta-lactames (thiénamycine)
- -Les peptides (viomycine, thiostrepton, actinomycine, pristinomycine)
- -Les tétracyclines (chlortétracycline, oxytétracycline)
- -Les nucléosides (puromycine)
- -Les polyènes (nystatine, candidine, amphotéricine B); -Les polyéthers (monensine) (**Berdy, 2005**).

Les antibiotiques des actinomycètes sont utilisés aussi dans le traitement de certaines maladies des plantes. La blasticidine, par exemple, est active sur *Piriculariaoryzae*, un pathogène du riz (**Tomita et al., 1990**). Les antibiotiques ont trouvé également une application en agriculture à des fins de lutte contre les maladies des animaux et des plantes et aussi pour stimuler la croissance des animaux domestiques et accroître les rendements zootechniques (**Tomita et al, 1990**).

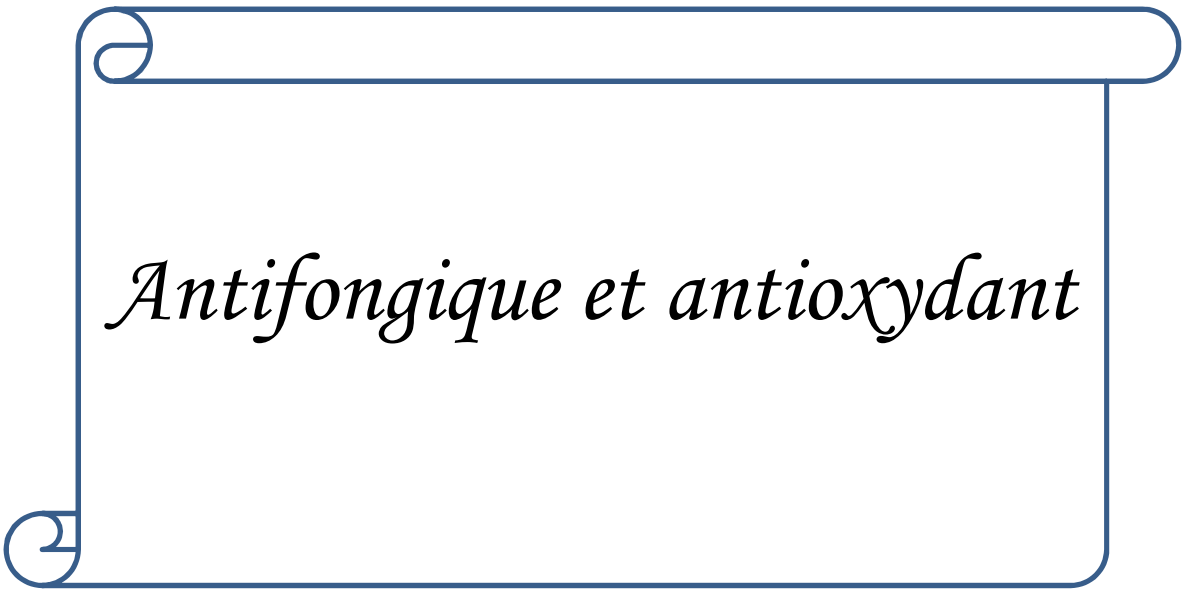
En plus des antibiotiques antimicrobiens, les actinomycètes sont une source de substances anti tumorales (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine), insecticides (mikkomycine), miticide (tétranactine), antihelminthiques (avermectines), pesticides (antimycine A), herbicides (phosphinothricines) et de substances ayant des activités biologiques les plus diverses (immunosuppressives, immunostimulantes) (**Dietera et al, 2003**).

Tableau3 : Principaux antibiotiques élaborés par les espèces de Streptomyces (Madigan et al, 2007)

Classe antibiotique	Dénomination commune	Espèces productrice	Spectre d'action
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>S. griseus</i> ^b	Bacteria Gram Négatif
	Sectinomycine	<i>Streptomyces sp</i>	M. tuberculosis et N. gonorrhoeae
	Néomycine	<i>S. fradiae</i>	Productrice de néomycine Spectre large à utilisation spécifique Du fait de la toxicité de la molécule
Tétracyclines	Tétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Spectre large, Bacteria Gram positif Et Gram négatif, rickettsies Chlamydiae et mycoplasmes
Macrolides	Chlortétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Bacteria Gram positif
	Erythromycine	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Legionella sp, fréquemment Utilisée en remplacement de la Pénicilline
	Climycine	<i>S. lincolnensis</i>	Bacteria anaérobies strictes notamment Bacteroides fragilis
Polyènes	Nystatine	<i>S. noursei</i>	Champignons, notamment les
	Amphotéricine B	<i>S. nodosus</i>	Infection à Candida sp Champignons
Phénicolés	Chloramphénicol	<i>S. venezuelae</i>	Spectre large ; utilisation contre la Fièvre typhoïde

I.10. La production d'antifongiques:

Les antagonistes microbiens sont largement utilisés en lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. L'activité antagoniste de *Streptomyces* vis-à-vis des pathogènes fongiques est généralement liée à la production de composés antifongiques extracellulaires et des enzymes hydrolytiques (Prapagdee et al., 2008). En plus des *Streptomyces*, d'autres genres appartenant aux actinomycètes sont également des producteurs de molécules possédant des activités antifongiques (Sanglier et Trujillo, 1997). Les ramicidines sont par exemple des antifongiques produits par une souche d'*Actinomadura bibisca* (Tomita et al, 1990).



Antifongique et antioxydant

II. Antifongique et antioxydant :

II.3. Les Mycoses :

Il existe plus de 200 000 espèces de champignons, dont une petite centaine est impliquée dans des maladies humaines. Malheureusement ce chiffre est en constante augmentation car de plus en plus d'espèces considérées comme saprophytes deviennent capables de provoquer une infection à l'occasion de modifications générales ou locales du terrain de l'hôte (**Ampel, 1996, Boiron, 1999, Croll, 2002, Pfaller, 2002**). Les infections fongiques, également appelées mycoses, sont des maladies causées par des champignons microscopiques. Plus fréquemment, le nom de l'infection fongique est formé à partir du nom du champignon responsable, en lui ajoutant les suffixes "ose" : candidose, cryptococcose, aspergillose, etc (**Cox et al., 1993, Boiron, 1999**). La formation d'une mycose présuppose, d'une part, un contact avec l'agent pathogène et, d'autre part, la possibilité pour le champignon de pénétrer l'organisme. Par ailleurs, certaines conditions doivent être remplies pour que le champignon puisse ensuite se propager dans les tissus. L'étendue d'une infection fongique, peut être localisée ou généralisée. Autrement dit, soit c'est un tissu spécifique qui est infecté (la peau ou un organe), il s'agit alors d'une infection bien délimitée, soit le champignon atteint la circulation sanguine et s'attaque à plusieurs organes. Dans ce dernier cas, on dit que le germe se généralise ou se dissémine.

Les champignons pathogènes, qui sont à l'origine de mycoses, sont classés en fonction de leur morphologie. Cette classification permet de distinguer grossièrement les champignons filamenteux (avec l'hyphe comme élément de base, une ramification d'hyphes constituant le mycélium) et les levures. Les levures ne possèdent pas de véritables ramifications mycéliennes comme les champignons filamenteux. Il existe une troisième sorte de champignons, qui, selon les conditions environnementales, se présente soit sous un aspect mycélien, soit sous un aspect levuriforme: il s'agit des champignons dimorphiques (**Boiron, 1999**).

II.1.2. Principaux agents des mycoses :

Les agents des mycoses peuvent avoir une origine endogène ou exogène. Les champignons d'origine endogènes sont déjà présents à la surface et à l'intérieur du corps

(principalement le tube digestif). Ils sont représentés essentiellement par *Candida albicans*. Cette levure vit exclusivement dans le tube digestif de l'homme et de certains animaux

La présence de *C. albicans* sur la peau, n'est possible que dans des cas pathologiques. Par contre, une dizaine d'autres espèces de *Candida* (*Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida glabrata*, etc.), et quelques espèces de *Geotrichum*, sont habituellement saprophytes des muqueuses et des téguments, mais se trouvent également dans la nature (Vincent *et al.*, 1998, Boiron, 1999). Les champignons exogènes ont pour origine principale l'environnement. Ils sont représentés en grande majorité des champignons pathogènes ou potentiellement pathogènes. D'une manière générale, ils sont retrouvés dans le sol (*Histoplasma capsulatum*, *Candida neoformans*, *Aspergillus fumigatus*...etc) et quelquefois dans les niches écologiques constituées par des substrats organiques variés (Ainsworth, 1973, Muller et Loeffler, 1976).

En médecine, les agents responsables des mycoses sont classés dans quatre grands groupes: les dermatophytes (champignons filamenteux qui provoquent des mycoses superficielles), les levures, les moisissures et les autres champignons (champignons dimorphiques).

Les dermatophytes sont des champignons kératinophiles et comme leur nom l'indique, ils sont responsables d'infections fongiques affectant la peau, aussi bien au niveau de la tête, que du tronc ou des pieds. Toute infection à dermatophytes est désignée par le terme latin de "tinea", ou teigne en français: on parle donc de "tinea capitis" pour une mycose au niveau de la tête, de "tinea corporis" pour une mycose au niveau du tronc et de "tinea pedis" pour une mycose des pieds (Sabouraud, 1910, Ainsworth, 1973, Muller et Loeffler, 1976).

Les levures sont des champignons unicellulaires se reproduisant le plus souvent par bourgeonnement. Parmi les quelques 500 espèces connues, une trentaine peut être retrouvée en pathologie humaine (Pfaller, 2002, Boiron, 1999). Les levures induisent des infections de la peau et surtout des muqueuses. Dans la région génitale (mycose vaginale), dans la bouche (on parle du muguet ou de mycose oropharyngée), au niveau de l'œsophage (c'est une mycose œsophagienne). Les mycoses cutanées à *Candida* se manifestent en règle générale par des

placards érythémateux (rouge sombre) à bords festonnés par une collerette de squames blanchâtres (Ainsworth, 1986, Anaissie *et al.*, 1996, Rex *et al.*, 2000).

Les moisissures déclenchent très rarement des mycoses cutanées. Elles peuvent cependant contribuer à aggraver une maladie déjà existante en colonisant secondairement des sites cutanés déjà infectés. Néanmoins, dans la plupart des cas, les moisissures, comme par exemple les aspergillus, sont à l'origine de mycoses systémiques (Yashuda, 2001, Stevens *et al.*, 2000). Les patients immunodéprimés, c'est-à-dire avec un système de défense affaibli, sont les plus menacés (Singh Navery *et al.*, 1996, Holding *et al.*, 2000). La transmission s'opère généralement par inhalation de spores fongiques à travers les voies respiratoires: raison pour laquelle se sont en premier lieu les poumons qui sont touchés. On parle alors de mycoses profondes (mycoses des organes internes) (Stevens *et al.*, 2000). Parmi les moisissures les plus incriminées dans ces mycoses, les aspergillus prennent la tête de liste, mais d'autres sont aussi rencontrés (Walsh *et al.*, 2001).

De nombreux autres champignons dits dimorphiques à cause du changement de leur formes (filamenteuses et levuriennes), *in vivo* et *in vitro*, causent des mycoses variées telles que la sporotrichose (*Sporothrix schencki*), l'histoplasmosse (*Histoplasma capsulatum*), la blastomycose (*Blastomyces dermatitidis*) et la Paracoccidioïdomycose (*Paracoccidioides brasiliensis*).

II.1.2. Pathologies mycosiques les plus fréquentes :

Les mycoses sont classées généralement dans trois catégories distinctes, les mycoses superficielles, sous-cutanées et profondes.

✓ Mycoses superficielles :

Ces mycoses attaquent les couches superficielles de la peau et des muqueuses et aussi les phanères (protecteur de l'épiderme comme les poils, les ongles...etc). Les *Candida sp* sont des levures saprophytes présentes dans le tube digestif, Certains sont également présents dans le tractus urogénital ou sur la peau. L'infection est opportuniste nous sommes notre propre source de *Candida*. Ces levures sont responsables de candidoses humaines touchant principalement la peau, les muqueuses, les phanères et peuvent même atteindre les organes internes. L'espèce la

plus fréquente, *C. albicans*, est un saprophyte du tube digestif. Les pityrospores ou malassezioses sont des mycoses superficielles dues à des levures lipophiles du genre *Pityrosporum* (= *Malassezia*), faisant partie de la flore cutanée normale de l'homme. La principale espèce impliquée en pathologie humaine est *Pityrosporum* (= *Malassezia*) *furfur*, se localisant dans la peau et dans les oreilles et le nez (Boiron, 1999, Pfaller, 2002).

✓ **Mycoses sous-cutanées :**

Les agents responsables des chromomycoses sont des champignons pigmentés (noirs) du groupe des dématiés. Cinq espèces de champignons, regroupées en quatre genres, en sont responsables : *Cladosporium carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa* et *Rhinocladiella aquaspersa* (Maslin, 2001). Bien que les espèces soient ubiquitaires, la maladie ne se contracte qu'en région tropicale et sub-tropicale. La Sporotrichose cutanéolymphatique est caractérisée par des lésions gommeuses laissant sourdre un pus épais. Une atteinte multiviscérale provoquée par dissémination hémotogène, peut se voir en cas d'immunodépression, et notamment en cas de sida. Elle touche les articulations, les os, les poumons, le système nerveux, une atteinte oculaire ou viscérale est aussi observée. Elle est due à un champignon dimorphique, *Sporothrix schenckii*, parasite des végétaux (cactées) et des bois qui ne se retrouve que dans quelques foyers en Amérique Centrale, en Afrique du Sud et en Asie. Les mycétomes sont des tuméfactions sous-cutanées d'évolution chronique, fistulisées. Les fistules émettent du « pus » contenant des grains parfois visibles à l'œil nu (Dendievel, 2006). Le champignon, *Madurella mycetomatis* est le plus fréquemment rencontré, il est présent au sol et sur quelques végétaux.

✓ **Mycoses profondes :**

Ce terme est utilisé par opposition au terme superficiel et concerne l'invasion des organes ou viscères profonds (synonymes : mycoses viscérales profondes, mycoses systémiques). Les mycoses profondes occupent une place de plus en plus importante dans la pathologie infectieuse. Les champignons du genre *Candida* peuvent provoquer des infections viscérales, elles peuvent se limiter à un organe ou disséminer à travers l'organisme (Rex *et al.*, 2000).

Les levures *Candida* sont souvent responsables d'infections nosocomiales systémiques (Richards *et al.*, 1999). Au plan épidémiologique, l'espèce *Candida albicans* est responsable de la moitié des infections (McNeil *et al.*, 2001, Vincent *et al.*, 1998). La **Cryptococcose** est une infection grave, provoquée par le champignon *Cryptococcus neoformans*, une levure capsulée, survient chez les patients immunodéprimés, en particulier ceux atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La forme clinique la plus fréquente de cette infection est une méningo-encéphalite, fatale en l'absence de traitement. La principale espèce pathogène : *Cryptococcus neoformans*, comporte trois variétés : *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *gattii* et *C. neoformans* var. *grubii*. (Boiron, 1994, Maslin, 2002). **Aspergillus** est un champignon filamenteux dont les spores sont véhiculées par l'air et sont inhalées par tous les individus. Totalement inoffensif pour la majorité de la population, il peut cependant provoquer différentes formes de mycoses chez certains individus. Les aspergilloses sont des mycoses profondes qui occupent le second rang en fréquence des infections mycotiques chez le patient immunodéprimé. *Aspergillus sp.* est isolé dans 30 % des séries autopsiques de patients immunodéprimés atteints d'infection fongique (Bodey, 1992). L'**aspergillose broncho-pulmonaire allergique** est une maladie allergique assez commune chez les asthmatiques : on estime que 20% d'entre eux peuvent contracter cette pathologie à un moment donné de leur vie. Elle touche également les personnes atteintes de mucoviscidose à la sortie de leur adolescence (Maslin, 2004). Le champignon de l'**aspergillome** peut se développer dans une cavité préexistante dans le poumon et résultant d'une maladie antérieure, telle que la tuberculose ou la sarcoïdose. Les spores germent dans cette cavité pour former une boule "mycélienne". La maladie peut passer inaperçue, surtout dans les phases précoces. Les **zygomycoses** sont des affections cutanées, pulmonaires ou cérébrales dues à des champignons coenocytiques de la classe des Zygomycètes (Maslin, 2003). Les zygomycoses comprennent : l'entomophthoromycose à *Conidiobolus coronatus*, la basidiolobomycose à *Basidiobolus ranarum*, la rhinosporidiose qui est due au champignon *Rhinosporidium seeberi* et, enfin, la mucormycose (Maslin, 2004).

Deux histoplasmoses strictement identiques en culture mais différentes par leurs aires de répartition géographique et leur tableau clinique, donnent une mycose profonde dues à deux champignons dimorphiques encapsulés *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* et *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (histoplasmosse africaine). La **coccidioïdomycose** appelé aussi maladie

de Pasadas et Wernicke, est due à un champignon dimorphique *Coccidioides immitis*, présent dans le sol des régions chaudes, sèches, désertiques et semi-désertiques du continent américain (atmosphère poussiéreuse et vents de sable). La **blastomycose** dite aussi blastomycose nord américaine ou maladie de Gilchrist, est également due à un champignon dimorphique *Blastomyces dermatitidis*, isolé du sol et du bois. La **paracoccidioïdomycose** est une mycose profonde provoquée par un champignon dimorphique *Paracoccidioides brasiliensis*. C'est une maladie du continent américain (Amérique centrale et du sud, à l'exception du Chili), touchant en particulier les zones forestières et humides du Brésil et les zones productrices de café. La **pénicilliose** est due à un champignon dimorphique *Penicillium marneffe*, d'Asie du sud-est, qui a émergé avec le sida. Décrite au Vietnam en 1956, la pénicilliose a émergé depuis 1988 en Asie du sud-est. Le champignon a été isolé du sol, de terriers de rongeurs.

II.1.3. Antifongiques disponibles utilisés contre les mycoses :

Parmi tout l'arsenal de molécules naturelles ou de synthèses disponibles, l'antifongique universel, fongicide et bien toléré n'existe pas (Montravers *et al.*, 2003). La thérapeutique antifongique dispose à vrai dire, d'un petit nombre de produits, en particulier contre les mycoses profondes (Odds, 1995, Vincent *et al.*, 1998, Terrel *et al.*, 1999, McNeil *et al.*, 2001, Carle, 2003). L'amphotéricine B sous ces formes lipidiques surtout, est utilisé par voie intraveineuse, est considérée comme étant la molécule d'excellence et la plus efficace parmi les antifongiques systémiques (Ainsworth, 1986, Gallis *et al.*, 1990, Herbrecht *et al.* 2001).

D'autres composés comme la flucytosine, la griséofulvine, puis les dérivés azolés : miconazole, kétoconazole, fluconazole, itraconazole, ont constitué de grandes étapes dans la découverte des molécules antifongiques, les résistances contre ces molécules deviennent malheureusement répandues (Patel *et al.* 1998, Terrell, 1999, Boiron, 2000, Carle, 2003). Les dérivés allylamines et morpholines ont eux aussi participé à cet arsenal d'agents antifongiques (Rex *et al.*, 2000) ; La nystatine est un polyène très actif contre de nombreuses espèces fongiques, levuriformes ou filamenteuses (Medoff et Kobayashi, 1980). La 5 fluorocytosine (ou flucytosine) est principalement active sur les levures et les agents de chromoblastomycoses (Francis et Walsh, 1992). Son efficacité est limitée par sa toxicité hématologique et digestive et l'apparition de résistances fréquentes, interdisant son administration en monothérapie (Patel *et al.*, 1998). Les

azolés, représentés par les imidazoles et les triazoles font partie de la liste. Parmi les imidazoles, on retrouve le miconazole et le kétoconazole, utilisables par voie générale pour le traitement des mycoses profondes. Le fluconazole et l'itraconazole font partie des triazolés. Le fluconazole est actif surtout sur les *Candida* et certains agents de mycoses exotiques. Il est utilisable par voie intra-veineuse, et présente une faible toxicité hépatique (**Terrell, 1999, Dismukes, 2000**). L'itraconazole possède l'avantage sur les autres azolés d'être actif sur *Aspergillus*. Outre ce champignon, cet antifongique est actif sur les levures, les dermatophytes, les dématiés et les champignons dimorphiques (**Espinel-Ingroff, 1998, DeBeule et Van Gestel, 2001**). Le voriconazole est un nouvel antifongique de structure proche du fluconazole, mais plus efficace avec un spectre d'activité plus large, notamment sur *C. glabrata*, *C. krusei* et *Aspergillus spp.* Le voriconazole est administrable par voie orale et par voie intraveineuse (**Potoski et Brown, 2002, Johnson et Kauffman 2003**).

Les allylamines, essentiellement la terbinafine administrable per os, est un antifongique peu toxique possède un large spectre d'activité, comprenant les levures, les dermatophytes, les *Aspergillus* et certains champignons dimorphiques (**Mieth, 1993**). L'amorolfine est la seule des morpholines utilisée en clinique, elle est active sur les dermatophytes, les levures et certaines moisissures (à l'exception d'*Aspergillus*) (**Hartman et polak, 1993, Boiron, 1998, Dismukes, 2000, Ernest, 2001**).

L'activité des échinocandines (nouvelle famille) est fongicide. La caspofongine, sous sa forme intraveineuse, est un agent antifongique très intéressant, il présente un spectre d'activité très large sur l'ensemble des levures et sur les *Aspergillus* (**Lomaestro, 2001, Hoang, 2001, Mora-Duarte et al., 2002**).

II.4. Les antifongiques :

II.2.3. Définition:

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

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

II.2.4. Historique :

Pendant des centaines d'années, les infections fongiques de la peau et des muqueuses ont été traitées par toutes sortes de médicaments populaires. Les infections du cuir chevelu ont été traitées en l'ans 23-79 après J.C. par des préparations telles que de la graisse d'ours mélangée à des extraits de plantes, des cendres de corne de cerf dans du vin, de la bile de chèvre dans de la craie et du vinaigre, de la bile de truie mélangée à de l'urine de taureau et du jus d'ail dans la graisse d'oie (**Ainsworth, 1986**). Parmi tous ces composés, seul l'ail est encore mentionné aujourd'hui en phytothérapie comme remède antifongique éventuel (**Odds, 1995**) Au début du 20^e siècle, les produits chimiques de synthèse et les colorants ont remplacé tous ces mélanges rudimentaires anciens. Ainsi, pour le traitement des infections à dermatophytes du cuir chevelu, le dermatologue **Raymond Sabouraud** en 1910 a décrit une pâte à base d'amidon, de résine et de farine contenant du carbonate de cuivre en tant qu'ingrédient actif Pour l'infection de la peau glabre, il recommandait la teinture d'iode. Depuis, plusieurs préparations contenant du soufre, du permanganate de potassium ou des sels de métaux lourds comme l'argent et le mercure, ont été utilisées pour le traitement topique des infections à dermatophytes (**Ainsworth, 1986**). Nombreuses préparations anciennes ont été abandonnées, seules trois préparations antifongiques topiques du début du siècle sont encore prescrites aujourd'hui. La première est à base d'acide benzoïque et d'acide salicylique sous forme de pommade (**Whitfield, 1912**), la seconde est la teinture de triphénylméthane, le violet de gentiane (**Faber et Dickey, 1925**) et la troisième,

rarement utilisée aujourd'hui, est «la teinture de Castellani » formulée à base de carbolfuchsine (**Castellani, 1928**). Tous les mélanges cités précédemment sont toxiques, ils montrent en plus d'une activité antifongique, une action antibactérienne aussi efficace, ce ne sont donc pas de véritables antifongiques spécifiques. Parmi les premiers composés antifongiques, certains ont été initialement considérés comme des agents antibactériens mais, plus tard, ils ont révélé une activité contre certains champignons. Ces composés étaient entre autres le cycloheximide (qui inhibe *Cryptococcus neoformans*) et les sulfonamides (la sulfadiazine inhibe *Paracoccidioides brasiliensis*). Les premiers antifongiques possédant exclusivement une activité inhibitrice contre les champignons pathogènes humains n'ont été découverts qu'après la seconde guerre mondiale et leur utilisation courante en clinique date seulement de la fin des années 50. Les premières molécules antifongiques à usage médical sont les composés appartenant à la série des polyènes et la griséofulvine. Elles ont toutes été découvertes grâce aux techniques de screening d'actinomycètes et de champignons. Les deux antifongiques pionniers introduits pour un usage clinique, sont la nystatine et la griséofulvine. La nystatine a été commercialisée pour des applications cliniques à la fin des années 50, la griséofulvine au début des années 60, bien qu'elle a été découverte (**Oxford et al., 1939**) avant la nystatine (**Hanzen et Brown, 1950**). La nystatine a été le point de départ du développement de nombreux autres antifongiques cliniques de nature polyénique.

II.2.4. Principaux antifongiques naturels utilisés en médecine humaine :

II.2.3.2. Griséofulvine :

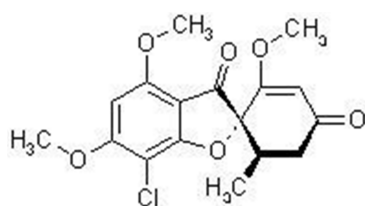


Figure 6 : Griséfuline® Laboratoire Sanofi Winthrop

L'emploi et la commercialisation de la griséofulvine (**Fig. 6**) ont été d'abord comme agent fongicide en agriculture. L'efficacité clinique du traitement orale de la griséofulvine a été démontrée en premier, sur des infections à dermatophytes chez des animaux de laboratoire (**Genties, 1958**). Cette molécule antifongique est un métabolite produit par *Penicillium griseofulvum* d'où elle tire son nom. Parmi les champignons pathogènes pour l'homme, les

genres inhibés sont : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Elle est utilisée, également, contre la plupart des dermatophytoses cutanées en particulier les teignes du cuir chevelu et les infections cutanées qui affectent la partie supérieure du corps. Son action s'oriente sur l'inhibition de la mitose des champignons sensibles. La griséofulvine est considéré comme étant un antifongique bon marché pour les pays pauvres.

II.2.3.3. Nystatine :

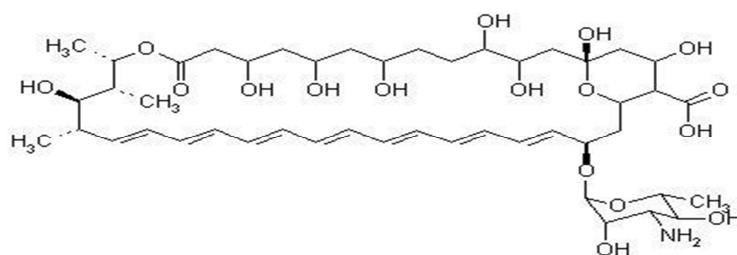


Figure 7 : Mycostatine ® Laboratoire Bristol Myers Squibb

Découvert par Hazen et Brown en 1950, l'appellation initiale était "fungicidin" ce nom a été changé par ses inventeurs en nystatine en l'honneur des laboratoires "New York STATE" pour 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 cycloheximide. La nystatine a été breveté et sa licence confiée à "E.R. Squibb et Sons" (connu maintenant sous le nom de Bristol Meyers-Squibb). La nystatine possède quatre doubles liaisons conjuguées dans sa structure (**Fig. 7**). Le spectre antifongique de la nystatine in vitro est très étendu, il englobe plusieurs levures pathogènes comme les *Candida sp.*, les pathogènes dimorphes qui sont infectieux sous une forme levure et *Cryptococcus neoformans* (Hildick-Smith *et al.*, 1964). La nystatine est également active contre la plupart des dermatophytes et à l'égard de nombreux agents responsables des mycoses profondes y compris *Aspergillus 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.2.3.5. Amphotéricine B :

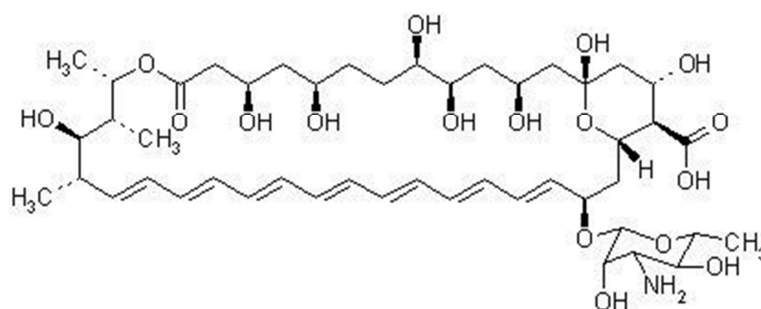


Figure 8 : Fungizone ® Laboratoire Bristol-Myers-Squibb

Molécule antifongique découverte par (Gold *et al.*, 1956). Le germe producteur est un actinomycète isolé du bassin d'Orinoco dénommé *Streptomyces nodosus*. C'est un polyène heptène (**Fig. 8**) 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 la seule polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes. Toutefois, des effets secondaires indésirables sont remarqués lors de ces traitements, mais ceux-ci peuvent être minimisés à l'aide de stratégies d'administration judicieuses.

II.2.3.6. 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 candididine, la candidine, l'étruscomycine (ou lucensomycine), la filipine, la natamycine (pimaricine ou tennecéline) et la trichomycine (hachimycine) (Medoff et Kobayashi, 1980). La mépartricine a été commercialisée au début des années 70 (Simonetti et Strippoli, 1971). Tous ces agents ont été utilisés pour le traitement des mycoses humaines et certains ont été (et sont encore) commercialisés dans certains pays, toujours dans des formulations destinées à un usage topique. Dans l'espoir de trouver de nouvelles formulations lipidiques pour administration

intraveineuse, comme pour l'amphotéricine B, l'intérêt pour ces molécules polyéniques commence à augmenter ces dernières années (Odds, 1995).

II.2.4. Antifongiques de 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 (Odds, 1995). Bien que, ces dernières années de nombreux nouveaux produits naturels à activité antifongique ont été décrits, on estime que depuis 1960 environ, les antifongiques de synthèse ont dominé et ont révolutionné la recherche dans ce domaine. Parmi les agents antifongiques de synthèse les plus utilisés, on cite les suivants :

II.2.4.1. Le chlormidazole :

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

II.2.4.2. Le tolnaftate :

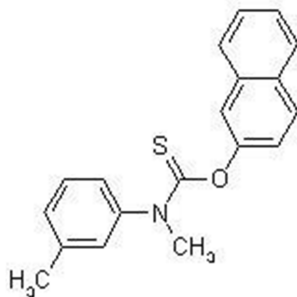


Figure 9 : Sporiline® Laboratoire Schering-Plough

Ce composé thiocarbamate (**Fig. 9**) 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 (Ryder *et al.*, 1986). Le tolciolate, un thiocarbamate plus récent, possède des propriétés très similaires.

II.2.4.3. La fluorocytosine :

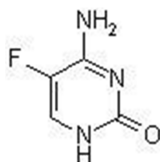


Figure 10: Ancotil ® Laboratoire Roche

Le 5-fluorocytosine (**Fig. 10**) 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 dématiacées et certains isolats d'*Aspergillus* sp. A cause des multiples cas de résistance à cette molécule, la flucytosine est employée avec succès en association avec d'autres antifongiques polyéniques comme l'amphotéricine B ou azolés ou encore avec une échinocandine, dans le traitement combiné de nombreuses mycoses systémiques.

II.2.4.4. Les imidazoles :

Le benzimidazole, le chlormidazole, les arylimidazoles et d'autres font partie des composés imidazoles présentant une activité antifongique importante *in vitro*. Les premiers antifongiques imidazoles appartenant à la série des azolés ont été décrits par Janssen Pharmaceutica en Belgique, il s'agit du miconazole (**Fig. 11 a**) et l'éconazole (**Fig.12**) (**Godefroi et al., 1969**). Le clotrimazole (**Fig. 13**) a été décrit par Bayer AG en Allemagne (**Marget et Adam, 1969**). Ces premières molécules ont été évalués dans de nombreux essais cliniques et ont prouvés leur efficacité dans le traitement topique des infections superficielles à *Candida* et des dermatophytoses. Leur spectre antifongique s'étale contre plusieurs pathogènes fongiques systémiques et contre de nombreux autres agents des mycoses superficielles. Le mode d'action

de ces molécules a été élucidé par en 1978 par **Van den bossche *et al.*** Il a démontré que le miconazole inhibait la déméthylation du lanostérol en ergostérol conduisant ainsi à l'arrêt de la synthèse des stérols fongiques. Le succès des antifongiques azolés a été à l'origine d'une panoplie de découvertes de nouveaux composés du même type.

Le fluconazole (**Fig. 11 b**) et l'itraconazole (**Fig.11 c**) représentent les plus importants antifongiques triazolés. D'autres azolés comme, le voriconazole (**Fig. 14**), produit par Pfizer et le SCH 56592 de Schering-Plough seraient tous deux actifs vis-à-vis des *Candida* résistantes au fluconazole ; ces deux produits possèdent une activité nettement améliorée vis-à-vis d'autres affections fongiques telles que l'aspergillose et l'histoplasmosse.

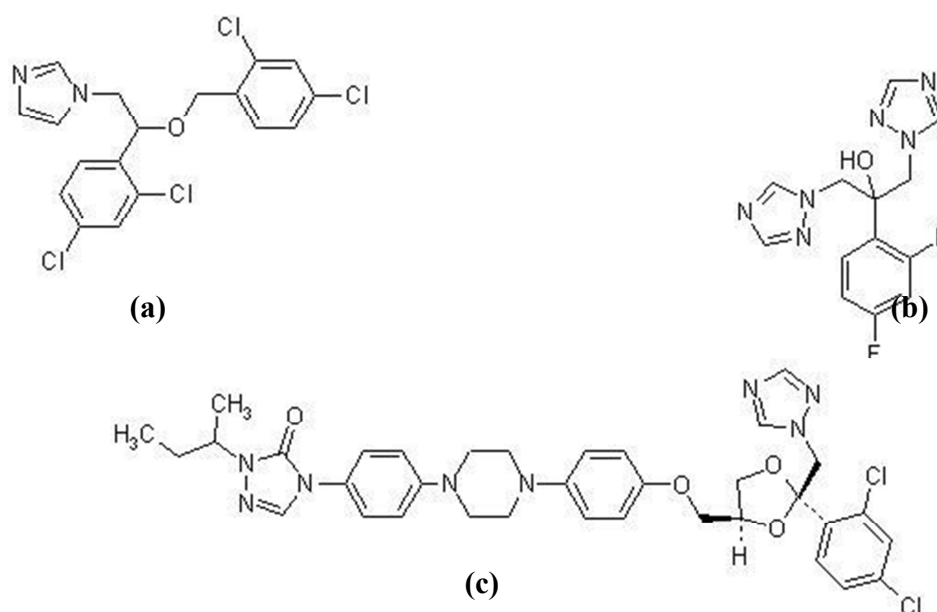


Figure 11 : (a) **Daktarin®**, (b) **Triflucan®** Laboratoire Pfizer,

(c) **Sporanox®** Laboratoire Janssen Cilag

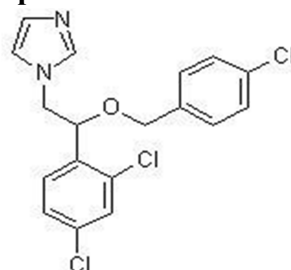


Figure 12: Econazole (**Pevaryl®**) laboratoire Janssen-Cilag

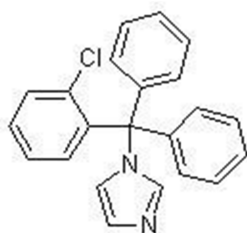


Figure13 : Clotrimazole (**Trimysten®**), laboratoire Roger Bellon

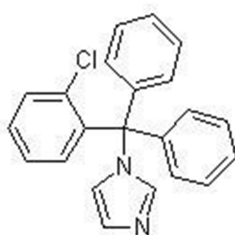


Figure 14 : Voriconazole (**Vfend ®**),

II.2.4.6. Les antifongiques allylamine :

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. Parmi ces antifongiques on retrouve les suivants :

➤ **Naftifine** : Découvert en 1974, il est le premier composé allylamine (**Fig. 15**) développé en clinique. La naftifine est utilisée contre les infections à dermatophytes.

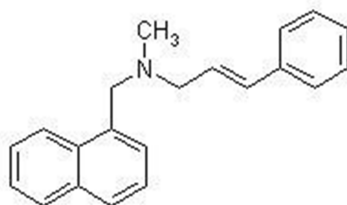


Figure 15 : Naftifine.

➤ **Terbinafine** : La terbinafine (**Fig. 16**), succède à la naftifine, elle est active par voie orale et topique très utilisée dans le traitement des infections à dermatophytes, l'onychomycose comprise. Le spectre antifongique de la terbinafine *in vitro* est très large : il comprend non seulement les dermatophytes, mais aussi *Candida sp* et de nombreuses moisissures (**Mieth, 1993**). Cependant *in vivo*, le composé est presque complètement inactif par voie orale et est aussi nettement moins performant contre les infections superficielles à *Candida*. Ce grand écart entre les activités *in vitro* et *in vivo* est un point, encore, non élucidé.

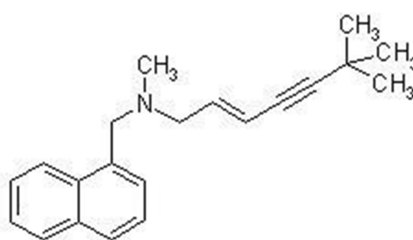


Figure 16 : Lamisil® Laboratoire Novartis Pharma

➤ **Amorolfine** : C'est le seul composé de la classe des phénylmorpholines utilisé en médecine humaine, le reste des représentants de cette série sont employés en agriculture. L'amorolfine (**Fig. 17**)

Inhibe deux enzymes dans la voie de biosynthèse des stérols fongiques (**Hartman et polak, 1993**). Elle agit sur la plupart des champignons responsables des mycoses superficielles, y compris *Candida sp* et la dermatophytes et elle entre dans la composition de diverses préparations pour le traitement de l'onychomycose, des mycoses cutanées et des infections vaginales à *Candida*.

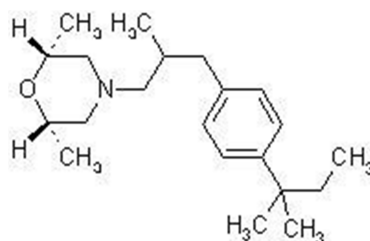


Figure 17 : Loceryl® Laboratoire Roche

II.2.4.6. 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'haloproline, la ciclopiroxolamine et le nifuratel.

II.2.5. Nouveaux antifongiques d'origine naturelle :

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

II.2.5.1. Echinocandines :

Ces molécules sont des lipopeptides cycliques produits par divers isolats d'*Aspergillus* (Benz *et al.*, 1974). Les pneumocandines sont des molécules similaires produites par un autre champignon le *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 en produisant le L-724,872 et les laboratoires Lilly en Inde qui ont mis au point le LY303366. L'amélioration de la solubilité dans l'eau et leur biodisponibilité orale ont été également améliorées.

II.2.5.2. Nikkomycines :

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

II.2.5.3. Pradimicines :

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

II.2.6. Modes d'action des principaux antifongiques utilisés en thérapeutiques :

✓ Les polyènes :

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

✓ Le 5 fluoro-cytosine :

Le 5 fluoro-cytosine représente un autre dérivé fluoré de la pyrimidine (base azoté de des molécules ADN et ARN), il pénètre au niveau de la cellule en compétition avec la cytosine grâce à la cytosine perméase, ensuite, il est métabolisé en 5 fluoro-uracile par la cytosine désaminase, puis converti en 5 fluoro-uracile monophosphate par l'uridine phosphoribosyl- transférase ou UPRT et enfin en 5 fluoro-uracile triphosphate, son mécanisme se situe au niveau de la synthèse protéique de la levure par substitution du 5 fluoro-uracile triphosphate à l'uracile triphosphate dans la molécule d'ARN inhibant ainsi la thymidylate synthétase et en altération de la biosynthèse de l'ADN fongique (Ripert, 2013).

✓ Les azolés :

Les imidazolés et les triazolés possèdent un spectre d'activité plus restreint que les polyènes, ils agissent sur la structure membranaire en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol, interférant plus précisément avec l'enzyme 14 α -lanostérol déméthylase, qui entraîne la diminution, voire la

suppression de la voie de synthèse de l'ergostérol.

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

✓ **Les échinocandines :**

Les échinocandines sont des lipopeptides cycliques inhibiteurs létaux de la synthèse de la paroi fongique, elles interrompent la formation du glucane par inhibition non compétitive de l'enzyme bêta-1,3-D-glucane synthase qui est présente chez la plupart des champignons et qui est également indispensable à la formation de la paroi fongique, cette enzyme est inexistante chez les cellules humaines éliminant ainsi une potentielle toxicité par ce mécanisme, mécanisme qui explique également l'absence de la résistance croisée entre les échinocandines et les autres antifongiques (**Datry et al., 2005 ; Spampinato et Leonardi, 2013**).

Le mode d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote est représenté par la figure 18.

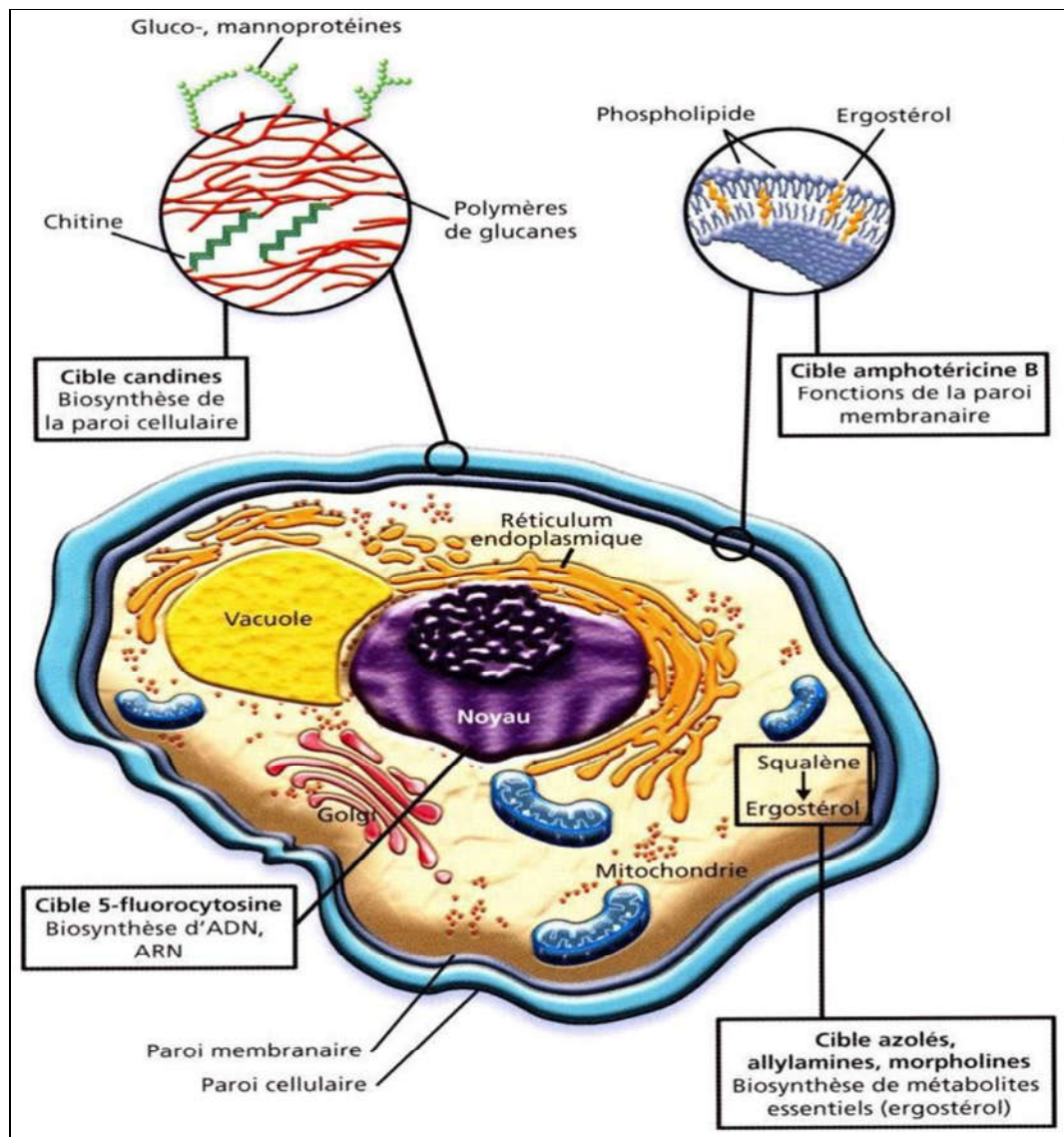


Figure 18 : cible d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote (Hulin et al, 2005).

Les différents modes d'action sont résumés dans le tableau ci-après :

Tableau 4 : Classification des antifongiques selon la cible (Geursen *et al*, 2008)

Mode d'action	Structure	Exemple
Rupture de la membrane	Polyènes	
Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Azols	Imidazoles, ketonazole, Triazoles, fluconazoles, Itraconazole
Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Allylamines	Terbinafine, butenafine
Rupture de la membrane et de la paroi	Pyradone	Ciclipirox olamine
Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Morpholine	Amorolfine
Inhibition de la synthèse de thymidylate	Pyrimidine fluorée	Flucytosine
Inhibition de la synthèse du glucane	Echinocandine	Caspofungine, Anidulafungine
Anti-mitotique, rupture du fuseau cellulaire	Autres	Griséofulvine

II.2.7. Mécanismes de résistance aux principaux antifongiques :

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

Comme dans toutes les conditions environnementales défavorables, l'exposition aux antifongiques active des voies de réponses de stress qui confèrent une protection cellulaire immédiate et favorisent ainsi la survie de la levure. L'un des principaux régulateurs des réactions au stress est le Hsp90 (figure n° 4 et 5), localisée à la surface de la cellule ainsi que dans le cytoplasme, cette protéine induite par le stress intervient

comme régulateur de la signalisation cellulaire, elle régit la morphogénèse et influence la résistance aux antifongiques (Lucy Xie et al., 2014 ; Shapiro et al., 2012)..

❖ Les polyènes :

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

Un phénomène qui est qualifié de rare mais existant, il s'agit d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques, voire une absence totale, par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (figure n° 19), les mécanismes de résistance aux polyènes sont décrits chez *Candida* et *Saccharomyces cerevisiae*, la délétion du gène ERG3 et ERG6 est responsable de ce type de résistance chez *C. albicans* (Spampinato et Leonardi, 2013).

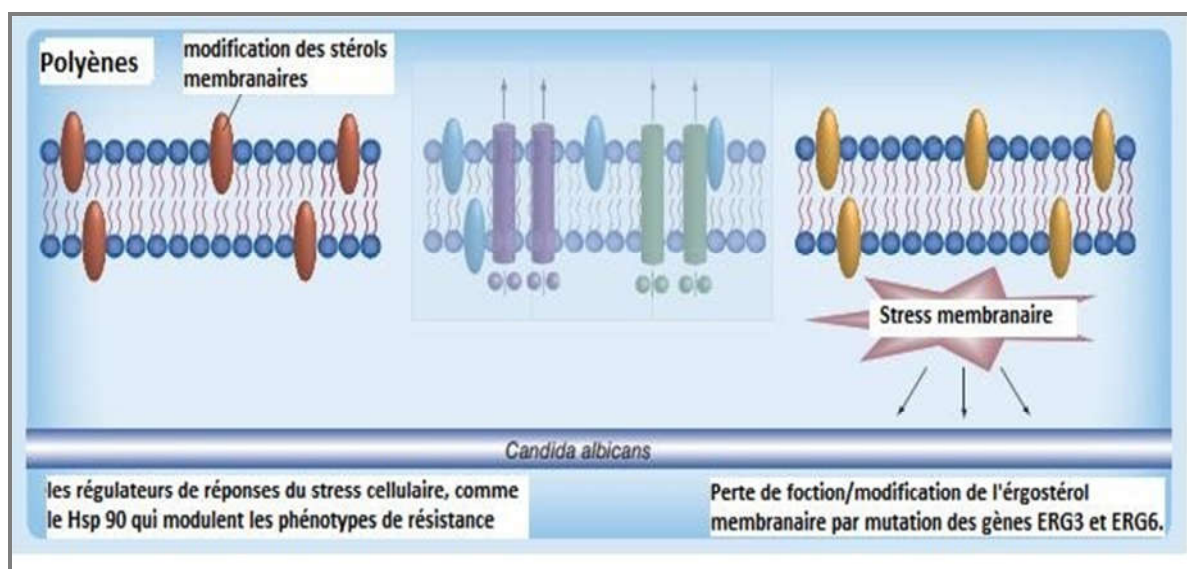


Figure 19 : Mécanismes de résistance aux polyènes chez *C. albicans* (Lucy Xie et al, 2014).

❖ Les fluoropyrimidines :

La résistance peut être intrinsèque caractéristiques d'espèces comme chez *Candida tropicalis* ou acquise après exposition à l'antifongique, en raison de la complexité de son mode d'action, la résistance à la 5-fluorocytosine peut être regroupée en deux catégories :

La résistance peut survenir par mutation d'un gène codant pour l'enzyme impliquée dans le métabolisme de l'antifongique, ainsi le mécanisme le plus fréquent est une mutation sur le gène *FUR1* qui code pour l'uridine phosphoribosyl transférase (UPRT) (Spampinato et Leonardi, 2013).

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

Le mécanisme de résistance au 5-fluorocytosine est résumé dans la figure 20 :

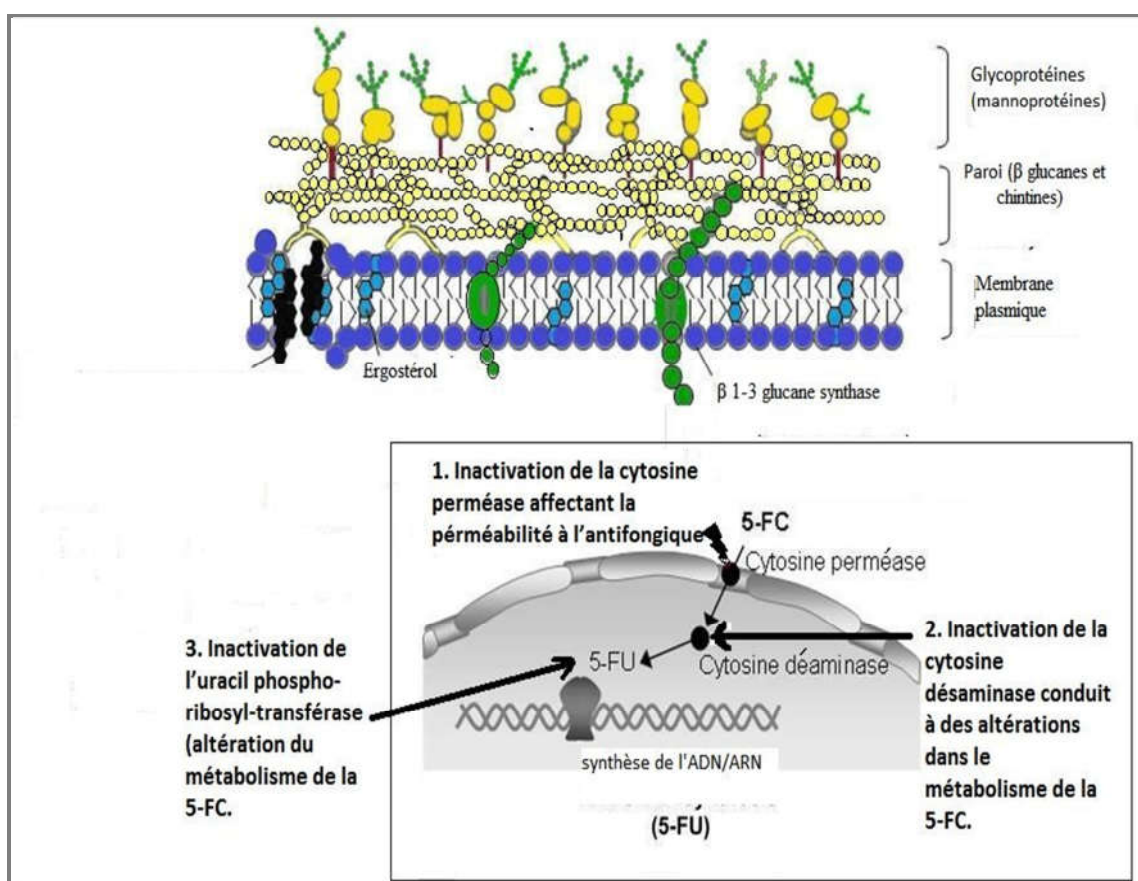


Figure 20 : Mécanismes de résistance aux 5-fluorocytosine (Ben-Ami et al., 2008).

❖ **Les azolés :**

Au début des années 1990 une augmentation considérable de la résistance aux azolés fut observée, en raison de leur large prescription en thérapeutique, de nombreux travaux ont été réalisés dans le but d'étudier les mécanismes de défense des champignons face à ces molécules (figure n° 4) **(Pham et al., 2014 ; Sanguinetti et al., 2005 ; Tobudic et al., 2012).**

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

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

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

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

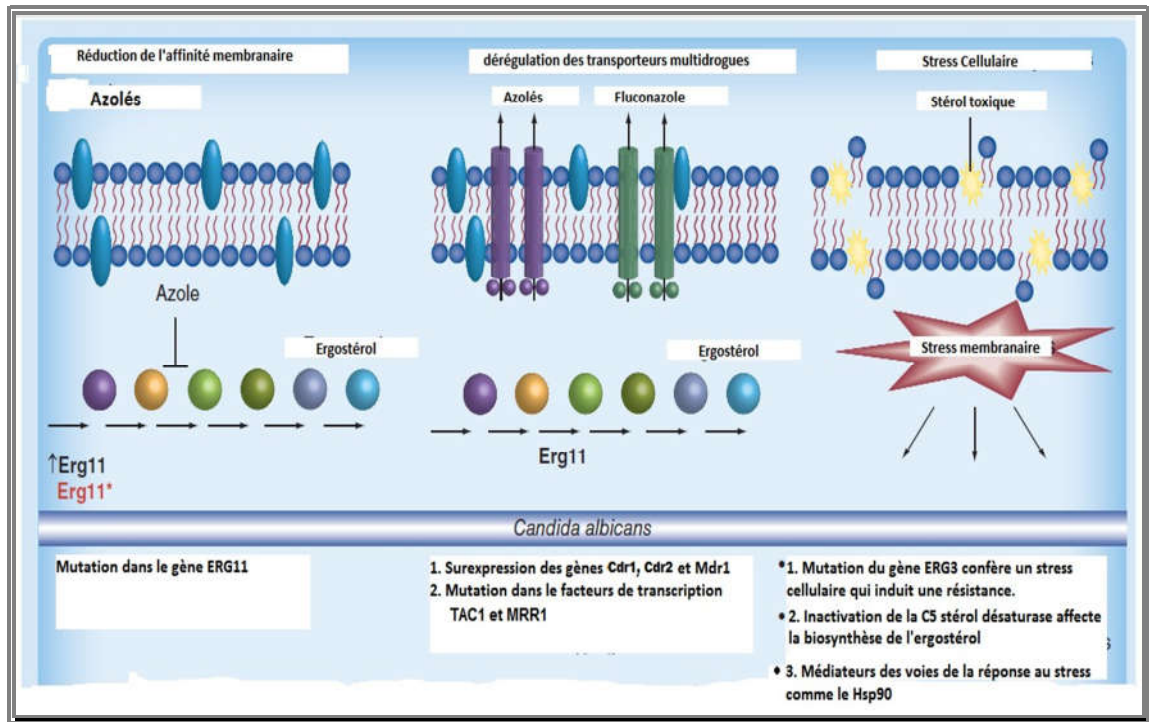


Figure 21 : Mécanismes de résistance aux azolés chez *C. albicans* (Lucy Xie et al, 2014)

❖ Les échinocandines :

La résistance aux échinocandines reste un phénomène assez rare (Espinell-Ingroff, 2008), certains travaux ont pu mettre en évidence le mécanisme moléculaire de la résistance (figure n°22), il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes FKS1 ou FKS2 gène codant pour la β 1,3-glucane synthase chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* (Balashov et al., 2006 ; Park et al., 2005), le mécanisme de résistance fut également observé chez *C. glabrata* (Park et al., 2005), et *C. krusei* (Kahn et al., 2007).

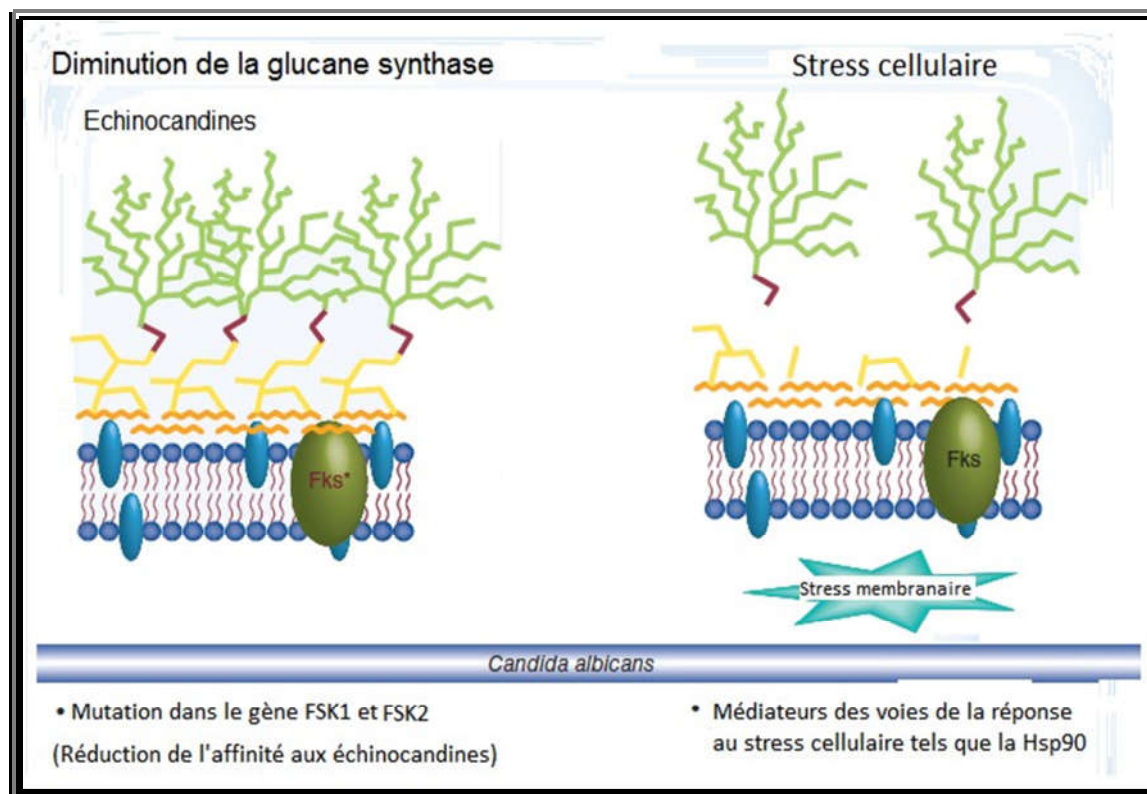


Figure 22 : Mécanismes de résistance aux échinocandines chez *C. albicans* (Lucy Xie et al., 2014).

II.2.8. Techniques d'étude et de caractérisation d'un antifongique :

II.2.8.2. Extraction des antifongiques :

A l'issue de la fermentation, l'antibiotique est présent à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique complexe comprenant les cellules, des éléments du milieu et de nombreux métabolites. Le choix du solvant est primordial, celui-ci doit avoir non seulement une forte capacité d'extraction et une sécurité d'emploi, mais aussi assurer la stabilité des métabolites lors de l'extraction et de leur concentration par distillation (**Badji, 2006**). La localisation des antibiotiques peut être différente selon leur nature et le microorganisme producteur. C'est pour cette raison que les activités antibiotiques sont à rechercher aussi bien dans le filtrat que dans les cellules et même sur les parois de ces dernières (**Augustine et al, 2004**).

II.2.8.2. Purification des antifongiques :

❖ Purification par chromatographie sur couches minces et sur colonne :

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

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

➤ Les méthodes chromatographiques préparatives sont utilisées pour séparer des molécules qui ont des propriétés physicochimiques voisines. Elles sont réalisées sur colonnes ou sur plaques épaisses de gel de silice (Cappuccino et Sherman, 1999).

❖ Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

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

II.2.8.4. Identification des molécules par des méthodes spectrales :

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

❖ Spectroscopie (UV-visible) :

La spectrométrie en UV-visible peut permettre d'identifier la classe de l'antibiotique inconnu par comparaison avec les spectres d'absorption connus et répertoriés. Cette étude permet de détecter les composés aromatiques (absorption entre 240 et 260nm) et les systèmes insaturés dont certains (substances colorées) absorbent même dans le visible. Les polyènes qui absorbent entre 291 et 405 nm (Dyňa et Sztaricskai, 1986) sont aisément détectés par spectroscopie UV-visible.

❖ Spectroscopie dans l'infrarouge (IR) :

Les absorptions dans l'infrarouge permettent de déterminer la présence de groupements et fonctions au sein d'une substance inconnue (CH_3 , CH_2 , CH , OH , NH_2 , CHO , COOH , etc.), d'aromatiques, etc. Et ce, à l'aide de tables de corrélations (Williams et Fleming, 1989).

❖ Spectrométrie de masse :

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

❖ Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) :

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

Le spectre RMN est constitué d'un diagramme représentant des signaux de résonance émis par certains noyaux atomiques de l'échantillon. Pour obtenir ces signaux, l'échantillon est soumis à l'action conjointe de deux champs magnétiques dont l'un est intense et fixe, tandis que l'autre est environ 10.000 fois plus faible et variable. RMN 2D : Les spectres RMN 2D possèdent des données de déplacement chimiques sur deux axes de fréquences. Ils permettent une corrélation des fréquences de résonance de différents noyaux (**Smaoui, 2010**).

II.4. Activité antioxydant :

II.3.2. Le potentiel antioxydant:

Au milieu des années 1950, Gerschman a démontré que l'oxygène molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme (**Gerschman *et al*, 2001**). En effet elle est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactives (EOA) (**Haleng *et al*, 2007**). Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger par différents systèmes antioxydants (**Favier, 2003**).

II.3.3. Les radicaux libres:

Un radical libre est une molécule chimique hyper active et instable qui possède un ou plusieurs électrons non appariés dans une orbitale externe. Afin de se stabiliser, il réagit avec d'autres atomes ou molécules et se comporte, selon les cas, comme un oxydant ou un réducteur,

afin d'apparier son électron libre. Il aura donc tendance soit à donner son électron, soit à créer une liaison pour combler son orbitale. **(Cheeseman, 1993).**

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote $NO^{\bullet}$ **(Yoshikawa, 2000).**

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène **(Favier, 2003).**

Les radicaux libres entraînent un stress oxydatif contribuant à plus d'une centaine de troubles chez l'homme, tels que l'arthrose, l'arthrite, la gastrite, le cancer, le diabète (Wadkar, 2010). Des antioxydants naturels tels que la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C et les polyphénols/flavonoïdes sont connus pour être utilisés pour traiter et prévenir ces maladies **(Cláudia and Alvaro, 2004).**

II.3.5. Origine des radicaux libres

Durant le processus de respiration, l'oxygène est réduit, de façon progressive et contrôlé, en eau par apport de 4 électrons. En revanche, sa réduction incomplète conduit à la formation d'espèces qui ont encore un caractère oxydant et qui sont très réactives: H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée), $OH^{\bullet}$ (radical hydroxyle) et dans une moindre mesure, $O_2^{\bullet-}$ (radical anion superoxyde). Ces espèces, appelées dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), pourront oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines **(Vaughan, 1997).**

Leurs apparitions sont reliées entre elles par des réactions enzymatiques ou chimiques (Figure 23). L'activité superoxyde dismutase (SOD) produit du H_2O_2 à partir du $O_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 conduit à la formation de $OH^{\bullet}$ en présence de Fe^{2+} (réaction de Fenton). Par ailleurs, certaines réactions chimiques ou Figurechimiques (en particulier avec les UVA) conduisent à l'excitation de la molécule de dioxygène. Cet état, noté $[^1O_2]$, est appelé oxygène singulet (spin nul) **(Favier, 2003).**

Le métabolisme normal de la cellule produit sans cesse des dérivés réactifs de l'oxygène (Cerruti, 1985). En effet, les systèmes utilisant un transfert d'électrons sont parfois le lieu de fuites électroniques. Par conséquent, la chaîne respiratoire, les oxydases (xanthine, NADPH...) et les réductases sont responsables d'une production permanente d'espèces oxydantes (Kather, 1995).

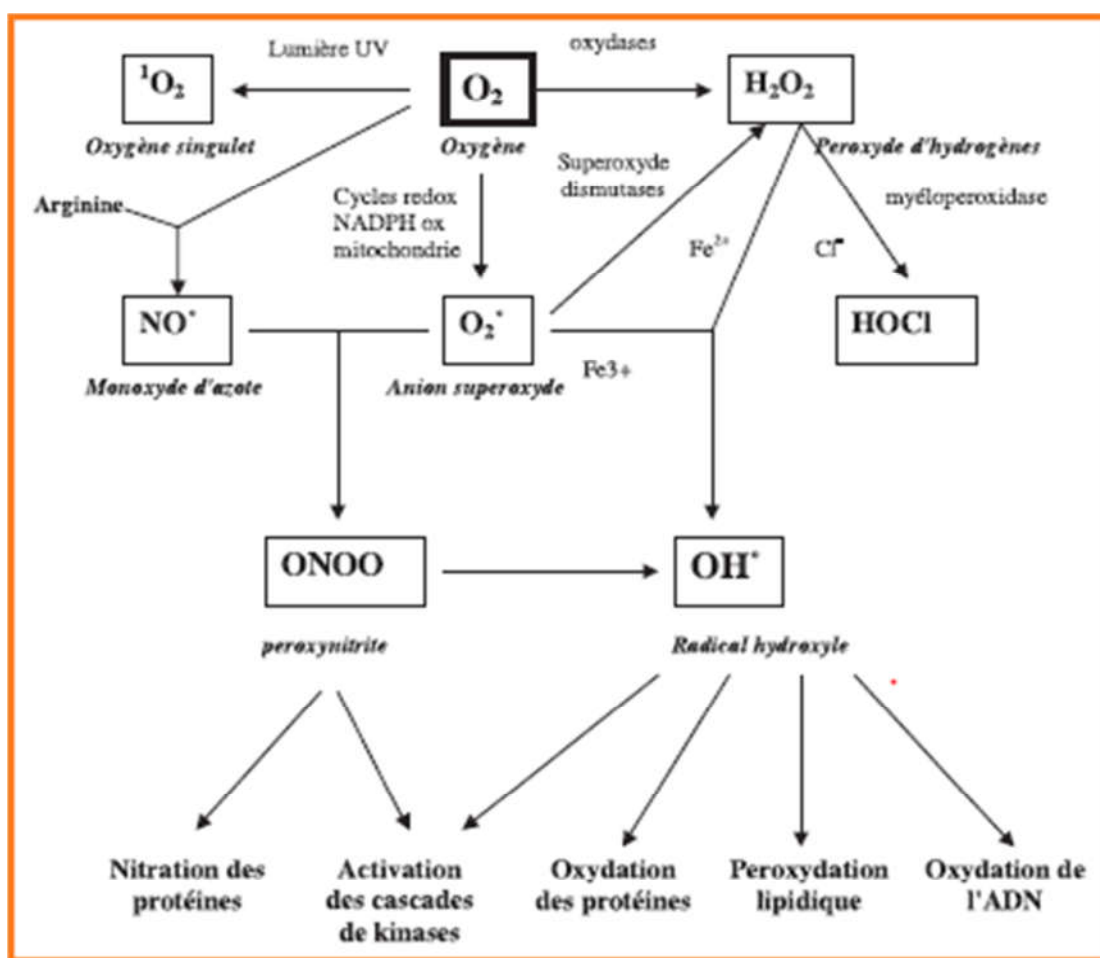


Figure 23 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

II.3.6. Cibles des radicaux libres:

Lors d'un stress oxydant, les espèces oxygénées réactives (EOR) non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, directement à leur contact, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Koechlin, 2006).

❖ La membrane:

L'attaque des radicaux libres des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (Davies, 2000).

❖ L'AND:

Les EOR, et plus spécifiquement le radical hydroxyle, peuvent provoquer des dommages des acides nucléiques. En provoquant des cassures, des mutations ou endommager le processus de réparation de l'ADN. De plus, les EOR peuvent induire des modifications au niveau de la transcription ou de la traduction de l'ADN et ainsi aboutir à la formation de protéines altérées. Ces modifications peuvent être à l'origine de phénomènes mutagènes ou d'un vieillissement accéléré (Valko *et al.*, 2006).

❖ Les protéines:

Les effets des EOR sur les protéines sont complexes, allant du clivage des chaînes latérales des différents acides aminés jusqu'au squelette protéique. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydriles (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui sont ainsi oxydées et inactivées. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation de pont bi-tyrosine, soit subir des coupures et soit des modifications de certains acides aminés.

En outre, les protéines oxydées peuvent aussi devenir très hydrophobes soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales, ce qui conduit à la formation d'amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas associés aux lipides forment les dépôts de lipofuschines, caractéristiques des tissus des personnes âgées (Favier, 2003).

II.3.7. Le stress oxydatif:

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées actives (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (**Haleng et al., 2007**).

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le vieillissement ou le développement de pathologies associées telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète... etc. (**Pincemail et al., 2009**).

II.3.8. Les antioxydants:

Les antioxydants sont définis comme une substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs d'une molécule cible (**Halliwell, 2007**) soit en stabilisant ou en désactivant les radicaux libres avant d'interagir avec les cellules. (**Percival, 1998 ; Kulikowska et al., 2004**). Deux catégories de système de défense ont été mises en évidence (**Powers et al., 2000**), le système endogène et le système exogène.

II.3.6.1. Les antioxydants endogènes:

Le système endogène est constitué d'enzymes ou d'agents réducteurs (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) dont l'action est de neutraliser les EOR par leur transformation en molécules stables et non réactives.

II.3.6.2. Les antioxydants exogènes:

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation (non enzymatique) ce sont des antioxydants exogènes tel que la vitamine E (α tocophérol), la vitamine C (ascorbate) et les caroténoïdes (vitamine A et β -carotène, les flavonoïdes...). En effet leur rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (**Christelle Koechlin, 2006**).

❖ Les polyphénols:

Ce sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives (**Orgogozo et al., 1997**)

Le mécanisme de piégeage des radicaux libres par les polyphénols se fait par le transfert de l'atome d'hydrogène (H-atomtransfer ou HAT). Le radical libre est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R•).



❖ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé (**Ghedira, 2005**). Ils dérivent de l'enchaînement benzo-γ-pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo-γ-pyrone (Figure 24). Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2 (**Di Carlo et al., 1999**).

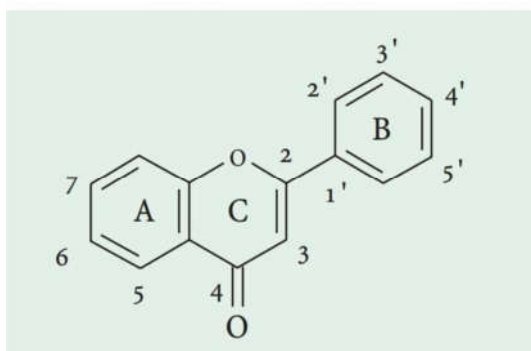


Figure 24 : Structure de l'enchaînement benzo-γ-pyrone (**Di carlo et al., 1999**).

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) (Nijveldt *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1996). En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogenèse. Ils inhibent en plus l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales (Rice-Evans, 2001).

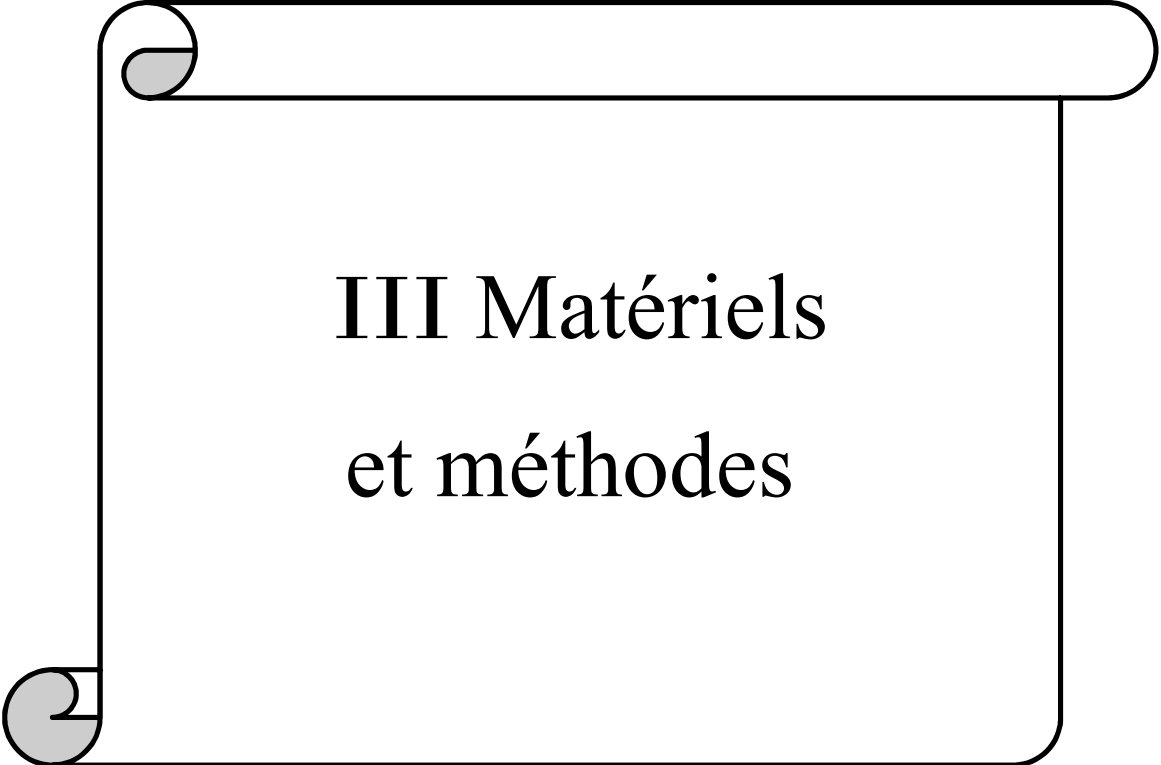
II.3.7. Les molécules antioxydants chez les actinobactéries:

Les actinobactéries sont des producteurs prolifiques de divers composés y compris des molécules dotés d'une propriété antioxydant. Dans le tableau II ci-dessous, sont présentées quelques molécules à activité antioxydante isolées à partir de souche d'actinobactéries.

Tableau 5: Quelques exemples de molécules antioxydants produites par différentes souches d'actinobactéries.

Molécules	Source	Références
La mélanine	<i>Streptomyces sp</i>	Preeti, 2013
L'undécylprodigiosin	<i>Streptomyces sp</i>	Nada, 2012
Diazepinomidine	<i>Micromonospora sp</i>	Abdelmohsen <i>et al.</i> , 2012
Dermacozines A-G	<i>Dermaococcus abyssi sp.</i>	Abdel-Mageed <i>et al.</i> , 2010)
(Z)-1-((1-hydroxypenta-2,4-dien-1-yl)oxy)anthracene-9,10-dione	<i>Nocardiosis alba</i>	Avilala <i>et al.</i> , 2014
PC 766 B	<i>Nocardia brasiliensis</i>	(Kumaqai <i>et al.</i> , 1993)
Dihydroherbimycin	<i>Streptomyces sp</i>	(Chang et Kim, 2007)

**PARTIE
EXPERIMENTALE**



III Matériels et méthodes

Matériels et méthodes :

III.1. Objectif :

L'objectif principal de ce travail est de :

- ✓ Rechercher un effet antifongique chez des actinomycètes isolés à partir des sols arides algériens.

- ✓ Production, extraction et caractérisation partielle de la molécule antimicrobienne produite lors d'un effet antifongique et antioxydant positif.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires pédagogiques du département de biologie de l'université Dr. MOULAY TAHAR – Saida, pendant la période allant de Janvier à Mai 2018.

III.2. Criblage des souches actinomycétales :

III.2.1 Origine des souches :

Les dix huit souches actinomycétales étudiées ont été fournies par le promoteur, celles-ci ont été isolées d'échantillons de sols arides algériens de la région d'Ain Loarak, Sebkha de Bougtob et 'El Bayadh, elles sont codées (A1-A26) . (K17-AK) et conservées par congélation en présence de glycérol dans des tubes de gélose inclinée contenant le milieu ISP2 préconisés lors de « l'International *Streptomyces* Project » ou ISP (**Shirling et Gottlieb, 1966**) en tubes inclinés.

III.2.2. Revivification des souches :

Les isolats actinomycétales qui ont été isolés, purifiés puis conservés par congélation ont subi une revivification. 0.1 ml de chaque suspension bactérienne sont ensemencés sur boîtes de Pétri par stries serrées sur milieu GYM (voir composition en annexe1), puis incubées à 28°C pendant 5 jours.

III.2.3. Confirmation de l'identité des souches d'actinomycètes :

Après la revivification des souches d'actinomycètes, elles sont soumises à une étude des différents caractères morphologique culturels, physiologique, biochimique dans le but de leur identification.

III.3. Etude morphologique :

III.3.1. Les caractères culturels et morphologiques :

Ces caractères sont déterminés sur le milieu Bennet. Le milieu stérilisé et réparti en boîtes de pétri qui sont incubées 24 heures à 28 °C afin de contrôler leur stérilité. Les boîtes sont ensemencées par la méthode de stries avec une goutte de chaque suspension d'inoculum déposée en bordure de la gélose. Après 7, 14 jours d'incubation à 28 °C, l'importance de la croissance et le développement du mycélium aérien sur le milieu sont observés. La pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat (le dos de la colonie) et la présence des pigments diffusibles dans la gélose autre que les pigments mélanoides sont notés (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

III.3.2. Etude micro morphologique :

III.3.2.1. Observation au faible Grossissement :

Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (Grossissement x40) (Suzuki, 2001).

III.3.2.2. Observation au fort grossissement :

Est une observation au microscope optique (Grossissement x100), après coloration de Gram.

La coloration de Gram est une double coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utilisées ces propriétés pour les distinguer et les classifier. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

Procédure de cette coloration :

- Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen ;
- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Rincez à l'eau distillée ;
- Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) pendant 1minute. Puis rinçage à l'eau distillé ;
- Décoloration par l'alcool pendant 30secondes, Rincer à l'eau ;
- Recoloration à la fuschine pendant 1minute, rinçage à l'eau puis séchage ;
- Observation avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 100$).

Le mécanisme de cette coloration est connu. Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet (Camille, 2007).

❖ Souches bactériennes tests :

L'activité antibactérienne a été testée contre les bactéries rapportées dans le tableau

Tableau 6 : Caractéristiques des souches bactériennes tests.

Souches bactériennes	Gram des souches	Provenance des bactéries
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	+	Souche de la collection américaine
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	Souche de la collection Américaine

❖ Souches fongiques tests :

Tableau7 : références des espèces fongiques

Espèce fongique test	code	référence
<i>Fusarium graminearum</i>	FG	(CECT 2150)
<i>Aspergillus flavus</i>	AF	(CECT 20802)
<i>Aspergillus ochrasus</i>	AO	(NRRL3174)
<i>Penicillium expansum</i>	PE	(CECT 2278)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AP	CBS(100926)

III.4.1. Etude de l'activité antibactérienne :

III.4.1.1. Préparation des inocula de bactéries-tests :

Pour chaque souche, un inoculum est réalisé sur gélose nutritive à partir d'une culture bactérienne de 24 heures. La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile, et comparée de visu avec la solution Mc Ferland, ce qui correspond à une concentration finale de 10^6 ufc/ ml.

III.4.1.2. Technique des disques d'agar (Tortorano *et al*, 1979) :

Les 18 souches d'actinomycètes sontensemencées en stries serrées à la surface de 15 ml de milieux GYM (glucose –extrait de levure –extrait de malte). Après 7 jours d'incubation à 28°C, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont prélevés et sont déposés à la surface du milieu Muller-Hinton préalablementensemencé par les bactéries tests à l'aide d'un écouvillon. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 4°C

pendant deux à quatre heures pour permettre une diffusion des substances actives puis elles sont incubées à la température de 37 °C pendant 24 heures.

III.5.1.3. Lecture :

Après incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour des disques d'actinomycètes produisant des antibactériens actifs contre la souche test. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée .L'absence de zones d'inhibition claires autour des disques d'agar, indique un résultat négatif qui montre que les bactéries sont résistantes aux substances produites par les actinomycètes. Plus cette zone est grande, plus l'activité antibactérienne est importante (**Petrosyan *et al.*, 2003**).

III.5.2. Etude de l'activité antifongique :

La production de métabolites antifongiques par les souches d'actinomycètes est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar en utilisant le milieu Sabouraud.

III.5.2.1. Préparation des suspensions fongiques :

Les champignons filamenteux sont repiqués sur milieu PDA et incubés à 28°C pendant 5 jours. Une suspension sporales des souches cibles (*Fusarium graminearum* , *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Pinicillium expansum*,*Aspergillus parasiticus*) ,sont préparées en grattant la surface de la culture à l'aide d'une spatule stérile afin de récupérer les spores et les mélanger par vortex à 10 ml d'eau physiologique stérile.

III.5.2.2. Mise en évidence des activités antifongiques :

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées sur milieu ISP2 et incubées à 28°C pendant 7 jours des cylindres de 6mm de diamètre et placés sur le milieu Sabouraud ,préablement,ensemencé à l'aide des écouvillons par des suspensions sporales fongiques des souches tests.les boites

sont laissées à 4°C pendant 4 heures,pour une bonne diffusion du métabolite antifongique,puis incubées à 28°C.

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



Figure 25 : ensemencement par écouvillonnage de la suspension sporale sur milieux sabouraud



Figure 26 : technique de contact par des cylindre d'agar de 6mm de diamètre déposés sur milieux sabouraud

III.5.2.3. Lecture :

Après incubation, la présence des zones d'inhibition indique un résultat positif. Cette zone est observée autour des disques d'actinomycètes ce qui signifie que ces bactéries produisent des molécules antifongiques capables de stopper la croissance des champignons tests. Le diamètre d'inhibition est mesuré par une règle graduée. L'absence de zones d'inhibition claires autour des disques d'agar, indique un résultat négatif.

III.6. Production du métabolite secondaire:

III.6.1.Fermentation sur milieu solide:

Les souches A7 et A10, retenues parmi les 18 souches d'actinomycètes testées après avoir donné des activités antifongiques importants avec la méthode de cylindre d'agar ,sont ensemencées chacune sur 40 boîtes contenant milieu AF stérile en stries serrées , à l'aide d'une anse de platine puis incubé à 28°C pendant 14 à 21 jours.

III.7.Extraction des métabolites:

III.7.1. Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide :

Les deux isolats retenus dans cette étude (A10 et A7) sont ensemencés en stries serrées sur milieu AF. Après incubation à 28°C pendant 14jours, la gélose est fragmentée puis reparti dans des flacons stériles contenant 25 ml de méthanol a raison de chaque boîte. Les flacons sont ensuite laissés à température ambiante pendant 2 heures avec agitation vigoureuse.

Les extraits sont filtrés en utilisant le papier Wattman afin d'éliminer les

cellules vivantes. Les filtrats sont entrainés dans une centrifugation à 11000 tours pendant 10 minutes **(Boughachiche, 2012)**.

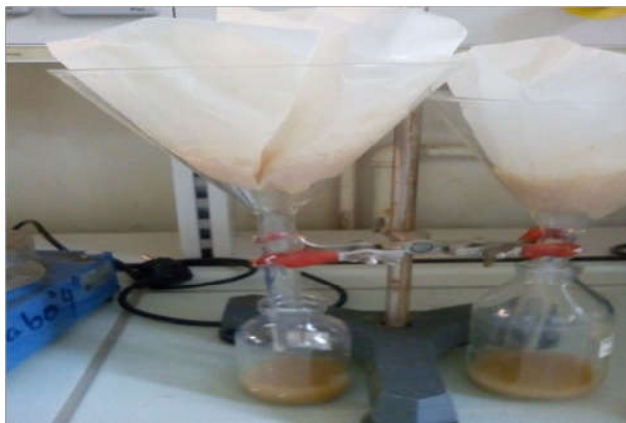


Figure 27 : filtration des extraits en utilisant le papier

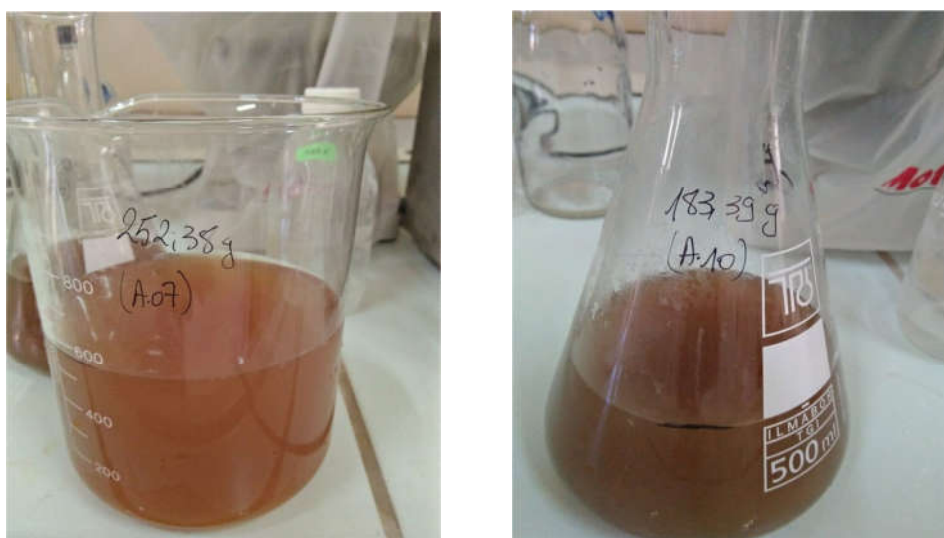


Figure 28 : récupération des extraits mathanolique après filtration

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



Figure 29 : concentration des extraits par évaporation au rota vapeur à 40°C

III.8. Tests de l'activité antifongique des extraits :

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

Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes A10 et A7 dans le milieu de culture sur la croissance des souches fongiques (*Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Pinicillium expansum*, *Aspergillus parasiticus*).

. Une série des dilutions (de 0.5 à 8 mg/ml) est préparée en suspension avec le milieu de culture, à partir de la solution mère par addition des volumes variables de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes. Dans des flacons contenant chacun 250ml de milieu de culture PDA stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 120 °C) et maintenus en surfusion à 45, on ajoute aseptiquement 1ml de l'Acide lactique diluer à 25% pour but d'inhiber les souches bactérienne.

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

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

moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le centre de chaque boîte.

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

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

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

Dt : diamètre de culture des champignons sans l'extrait

Di : diamètre de la culture de mêmes champignons dans un milieu en présence de l'extrait.

III.9. Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique :

Les deux actinomycètes actives A10 et A7 sontensemencés en surface par stries serrées sur milieu AF puis incubées pendant 7 jours à 28°C. A l'aide d'un emporte-pièce, des disques d'agar d'environ 3 mm de diamètre contenant la culture des souches sont recueillis à partir de chaque culture.

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

III.10. caractérisation préliminaire de l'agent antifongique par CCM :

III.10.1. Principe :

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

$$RF = \frac{x}{y}$$

Rf: Rapport frontale.

X: Distance parcourue par le produit

Y: Distance parcourue par le solvant

II.10.2. Préparation de la plaque :

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

➤ Saturation de la cuve:

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

➤ Mode opératoire :

Dix microlitres de chaque extrait méthanolique des souches actinomycétales A10, A7 sont déposés à l'aide d'une micro pipette sur des plaques de CCM en aluminium (6cm × 6 cm) étalées par une couche mince de gel de silice (**indicateur 254 nm,lot #BCBR5950V**).

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

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

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

➤ **Développement du chromatogramme:**

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



Figure 30: migration du solvant par capillarité vers le haut sur plaque CCM

➤ **Révélation:**

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

III.11. La bioautographie :

Chaque tache apparue sur la plaque de silice après la migration, est découpée séparément afin de déterminer si celle-ci possède une activité antifongique, la mise en évidence de cette activité se fait par le dépôt des bandelettes contenant les différentes taches à la surface d'une gélose PDAensemencée par écouvillonnage selon la méthode NCCLS ,à partir d'une suspension fongique provenant d'une culture pure du germe cible (équivalent à 0,5 Mc Farland) (**Betina, 1973 ; Hozzein et al., 2011 ; Irena et Edyta, 2011 ; Gulve et Deshmukh, 2012 ; Kitouni, 2007**).

Après une diffusion de 2h à 4°C, les boîtes sont incubées à une température de 25°C pendant 48h. L'apparition de zones d'inhibition autour des bandelettes indiquera une activité antifongique positive.

III.12. La semi-purification des fractions séparées par CCM :

Les deux extraits bruts sont semi-purifiés sur couche mince de silice, par chromatographie et ce, dans le but d'avoir des quantités suffisantes des fractions séparées afin de pouvoir déterminer lesquelles d'entre elles sont bioactives.

Un volume de 250 à 600 μ l de chaque extrait concentré est déposé en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci sont ensuite développées dans l'éluant sélectionné au préalable, afin de localiser avec précision les taches correspondant aux différents composants séparés (une bioautographie est toujours réalisée en parallèle).

Une fois la migration terminée, la silice montrant des taches est alors récupérée, en découpant la feuille en bandelettes au niveau de chaque tache, celles-ci sont introduites séparément dans des tubes secs contenant chacun 2 ml de méthanol (**Boucheffa, 2011 ; Tighidet, 2011**), une fois la silice complètement dissoute dans le méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice est par la suite éliminée par filtration (**Lamari, 2006**).

Les filtrats méthanoliques limpide sont recueillis et leur activité est contrôlée (**Pazhanimurugan et al., 2010**).



Figure 31 : semi purification des extraits sur couche mince de silice



Figure 32 : récupération des taches de migration des deux extraits A7 et A10 après la semi purification

III.13. Contrôle de l'activité de chaque composant séparé :

Après l'extraction et la semi-purification des fractions séparée, il est indispensable de tester l'activité inhibitrice de celles-ci, par la méthode des puits sur gélose PDA ensemencé par écouvillonnage selon la méthode NCCLS à partir d'une suspension fongique préparée à partir d'une culture pure du germe cible le plus sensible (Lamari, 2006 ; Tighidet, 2011).

Chaque puits recevra le volume de 20 µl de chaque fraction séparée par chromatographie précédemment, l'existence d'un puits témoin contenant le même volume de méthanol est indispensable afin de démontrer si ce dernier a une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche cible testée.

Les boîtes sont ensuite déposées à une température de 4°C pendant 2h pour permettre une bonne diffusion des substances dans la gélose. L'incubation se fait ensuite à 25°C pendant 48h, les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés en mm

III.14. Etude de l'activité antioxydant :

❖ Piégeage du radical libre DPPH :

• Principe

La réduction du radical libre DPPH[•] (2,2'-diphenyle-1-picrylhydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les

antioxydants (**Molyneux,2004**) .En présence des piègeurs de radicaux libres,le DPPH de couleur violette se réduit en DPPH,H de couleur jaune (**Maataoui et al., 2006**).

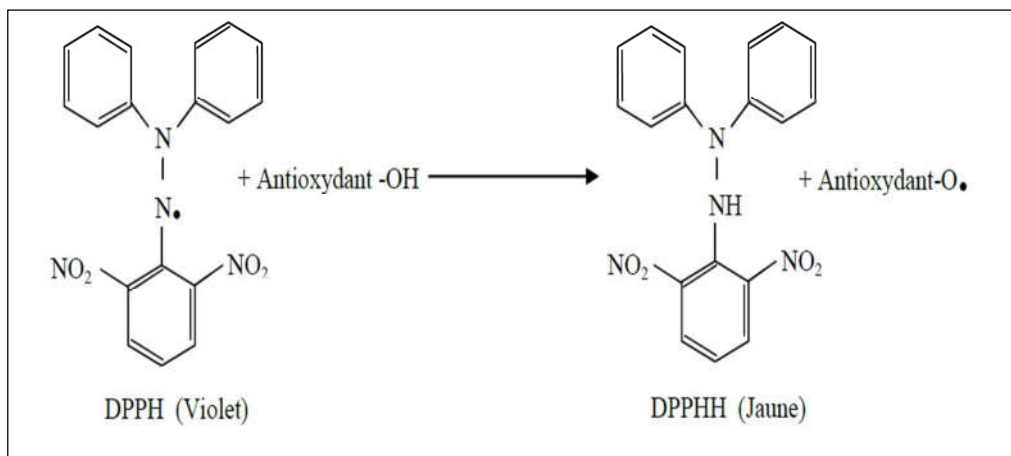


Figure 33:Réaction de test DPPH (2.2Diphenyl1 picrylhydrazyl) (**Congo, 2012**).

➤ **Mode opératoire :**

L'activité du piégeage du radical DPPH est mesurée selon le protocole décrit par (**Athamenaet al., 2010**).Pour des concentrations allant du brute au dilution 1/64.

La lecture de l'absorbance est réalisée contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide Ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration (**Bougandoura,2013**)

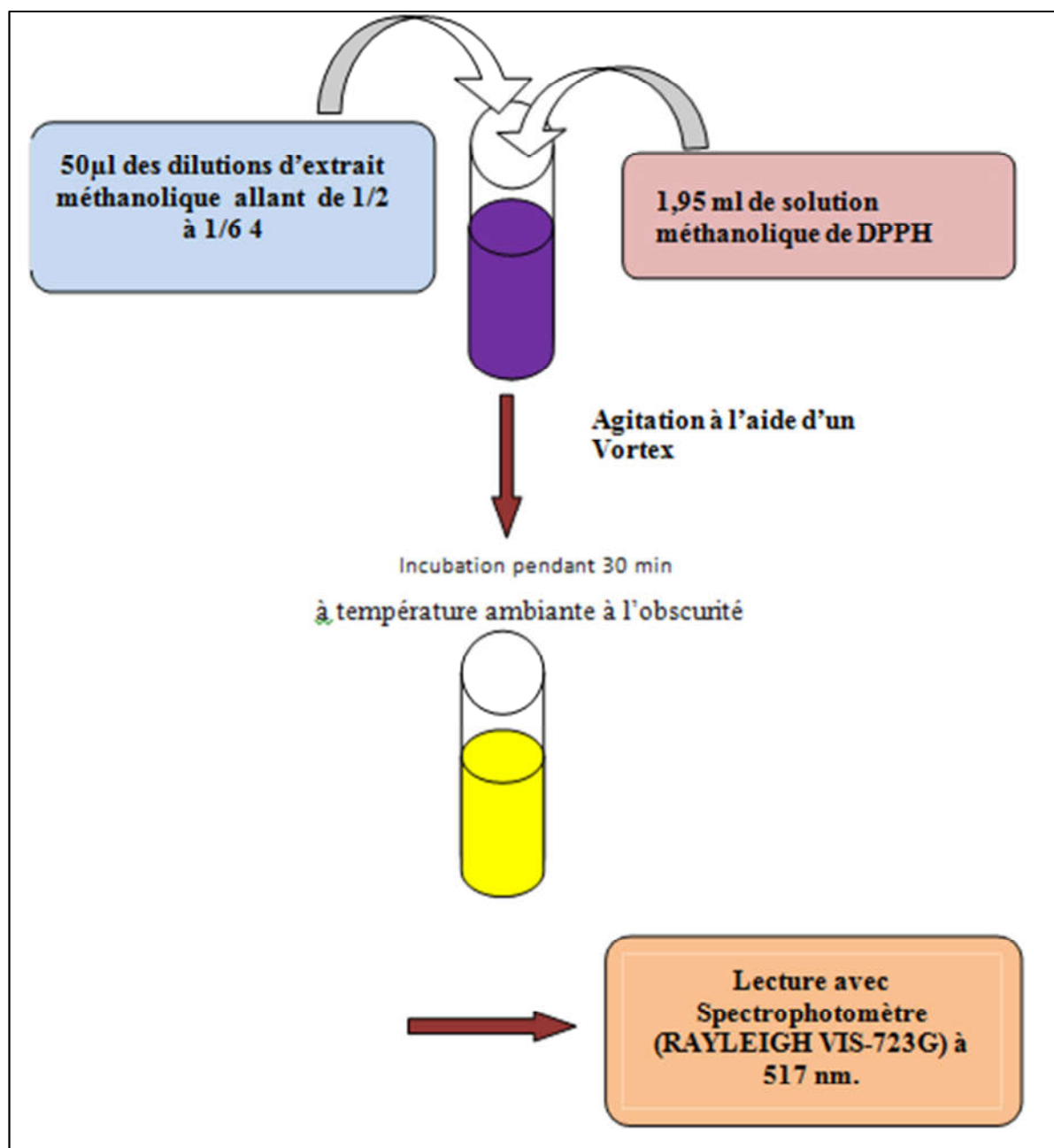


Figure 34: Schéma du mode opératoire du piégeage du radical DPPH (Athamena *et al.* 2010).

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé en utilisant l'équation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = [(A_t - A_e) / A_t] * 100$$

Où : **At**: Absorbance du témoin

Ae: Absorbance de l'échantillon

➤ **Calcul des IC₅₀ :**

L'IC₅₀ est la concentration de l'échantillon est nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés et les standards).

IV: Résultat et discussion

I.1.1. IV .Résultat et discussion

IV .1 .Résultat de Rèvivification des souches d'actinomycètes :

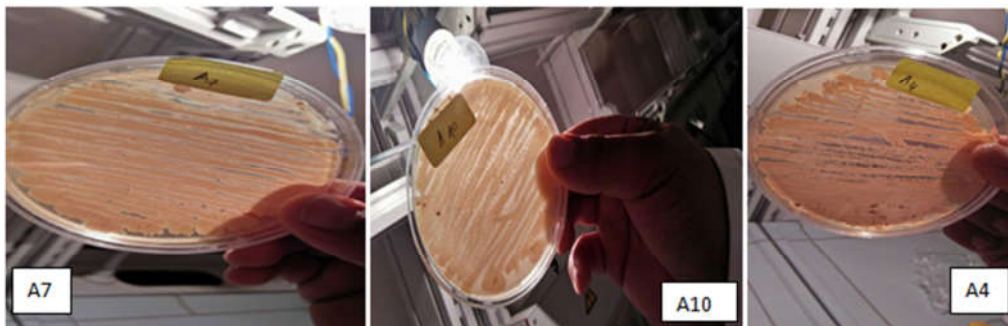
Les 18 souches d'actinomycètes conservées sont revivifiées sur milieu de culture ISP2, par repiquage en strie serrée ensuite incubées à 28°C pendant 14 jours.

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

Les souches qui ont été cultivées sur le milieu ISP2 ont montré une vitesse de croissance très rapide et un taux de croissance de 100 %.

IV.2. caractéristiques macroscopiques des isolats

La Figure 35 représente l'aspect macroscopique de quelques souches des actinomycètes isolées sur milieu de culture ISP2. Ces Figures prisent sur les boîtes montrent la forme caractéristique des colonies d'actinomycètes. Ces dernières ont un aspect différent aux autres bactéries (colonies poudreuses, contour irrégulier, attachées au milieu). Les colonies présentes sur le milieu ont un aspect similaire aux champignons sauf que la différence majeure est la taille de colonies par rapport à la durée d'incubation qui est très longue chez les actinomycètes , taille de colonies



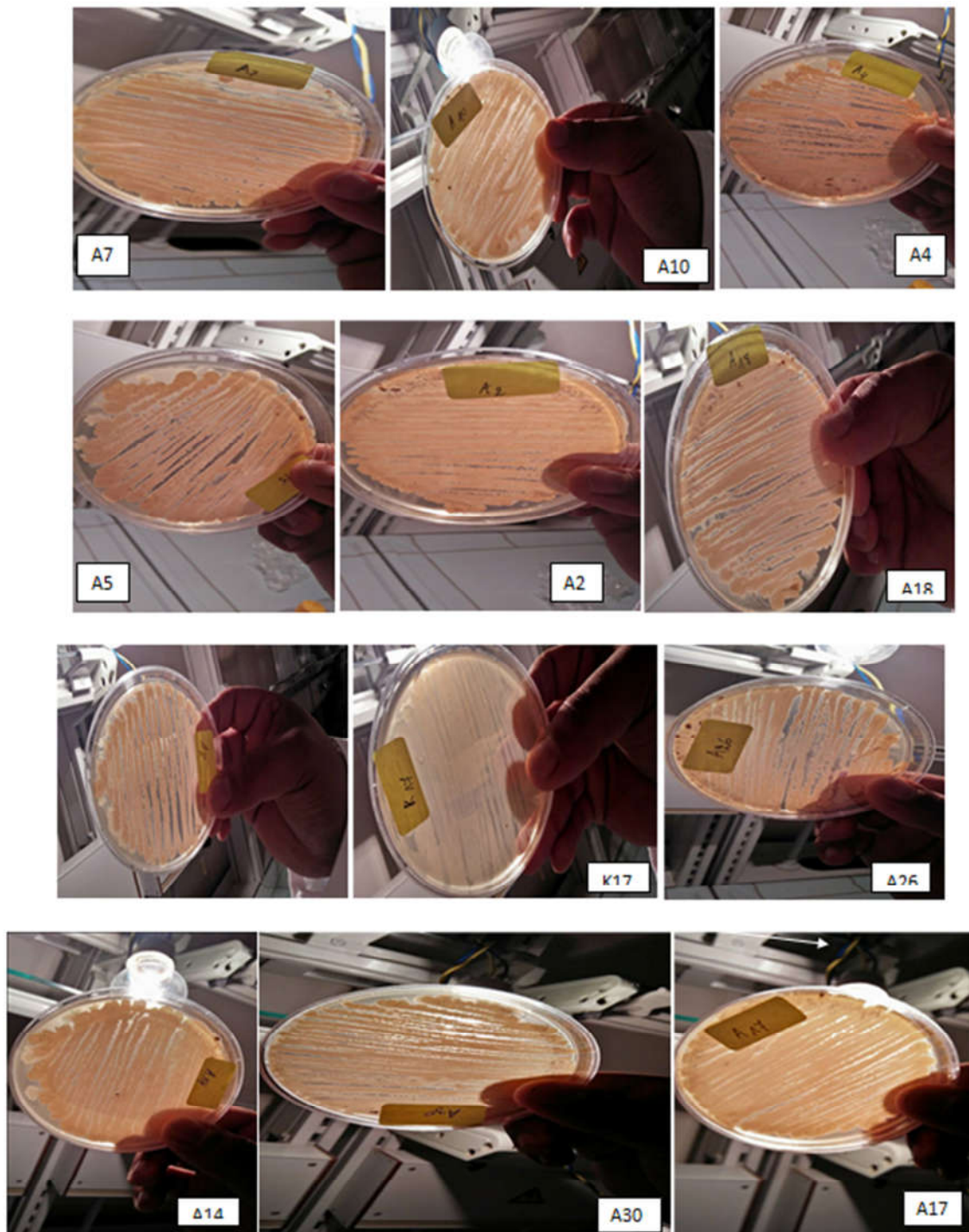


Figure 35 : aspect macroscopiques des isolats

VI. 3. Resultats de l'activité antibacterienne :

L'activité antibactérienne des souches *actinomycétales* isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 8**. Les valeurs mentionnées dans le tableau représentent les diamètres des zones d'inhibition mesurées autours du cylindre d'agar posé sur le milieu Muller-Hinton contenant la souche indicatriceensemencée en surface. L'effet inhibiteur est obtenu par la diffusion de la substance bioactive en milieu gélosé.

Tableau N 8 : Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre les micro-organismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar

	<i>Activité antibactérienne (mm)</i>	
<i>Code</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A4</i>	<i>00</i>	<i>12</i>
<i>A5</i>	<i>00</i>	<i>14</i>
<i>A7</i>	<i>06</i>	<i>15</i>
<i>A8</i>	<i>09</i>	<i>15</i>
<i>A9</i>	<i>00</i>	<i>12</i>
<i>A10</i>	<i>00</i>	<i>14</i>
<i>A13</i>	<i>00</i>	<i>00</i>
<i>A14</i>	<i>11</i>	<i>14</i>
<i>A15</i>	<i>00</i>	<i>13</i>
<i>A17</i>	<i>08</i>	<i>17</i>
<i>A18</i>	<i>09</i>	<i>15</i>
<i>A2</i>	<i>00</i>	<i>00</i>
<i>A19</i>	<i>09</i>	<i>16</i>
<i>A20</i>	<i>10</i>	<i>16</i>
<i>A25</i>	<i>00</i>	<i>00</i>
<i>A26</i>	<i>10</i>	<i>12</i>
<i>AK</i>	<i>00</i>	<i>00</i>
<i>K17</i>	<i>00</i>	<i>00</i>

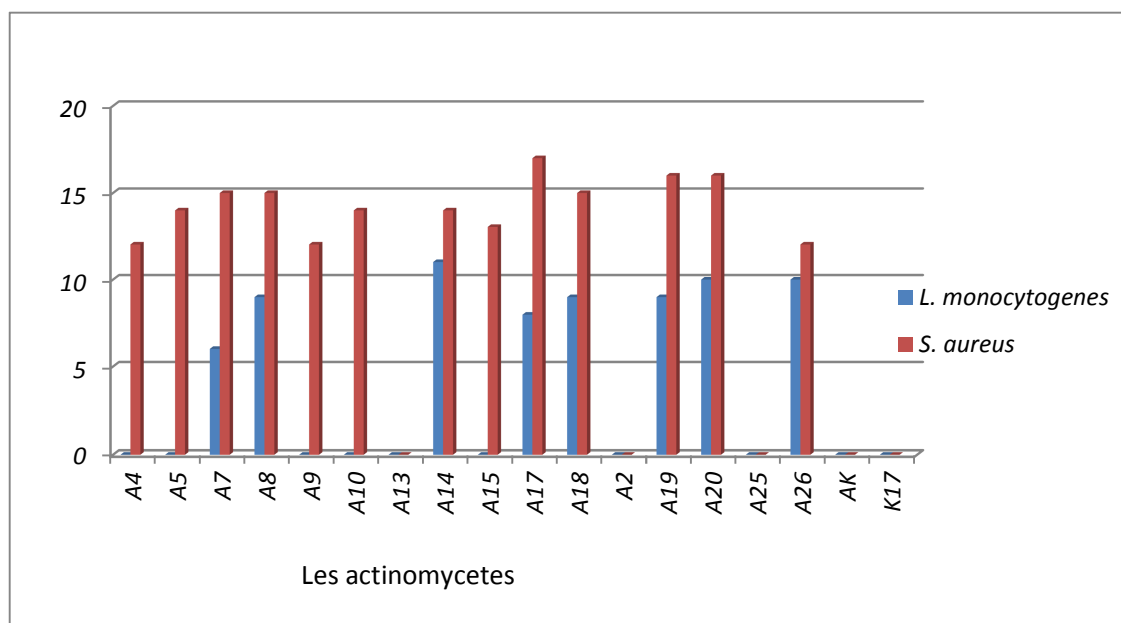


Figure 36 : inhibition de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* par les isolats des actinomycètes

Sur un total de 18 isolats purifiées et testés contre 2 bactéries indicatrices, 08 seulement ont montrés une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* . et 13 isolats ont montrés une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*. La zone d'inhibition la plus grande (17mm) a été donnée par la souche A17 contre *S. aureus*. Et (11 mm) a été donnée par la souche A14 contre *Listeria monocytogenes* .

IV.3.1. inhibition de *Staphylococcus aureus* par les isolats actinomycétals :

Les résultats de l'activité antibactérienne de nos actinomycètes vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC sont représentés dans la **figure 37**

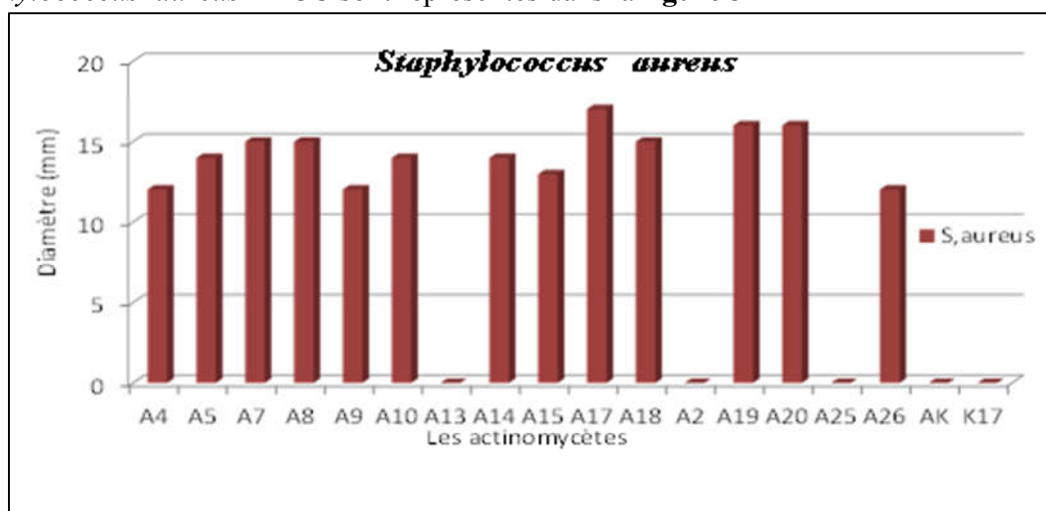


Figure 37 : inhibition de *Staphylococcus aureus* par les isolats des actinomycètes

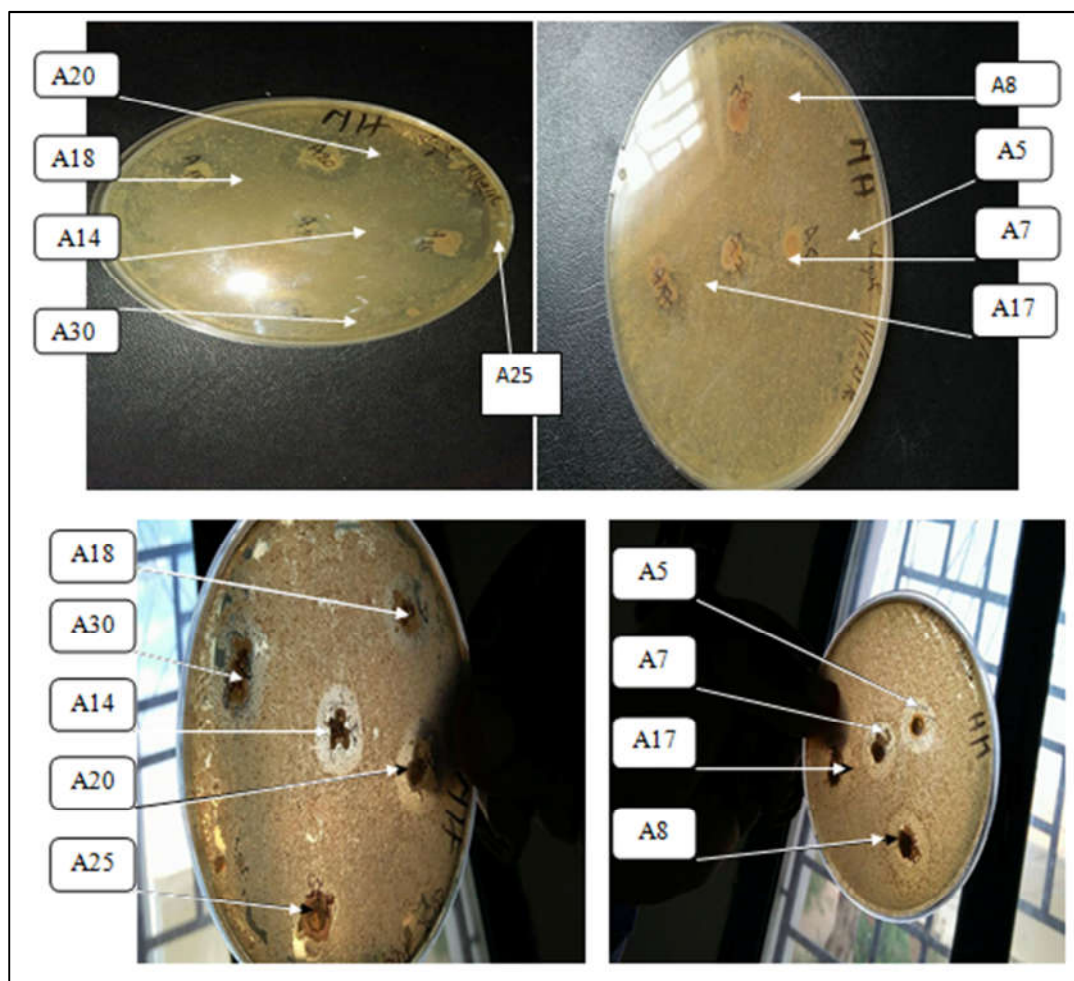


Figure 38 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes contre *S. aureus*

La figure 38 montre que *S aureus* a été inhibée par 13 souches parmi les 18 actives. La souche A17 a donné la zone d'inhibition la plus importante avec un diamètre de 17 mm. Les isolats A19,A20, ont exercées une activité moins importante avec un diamètre de 16mm et A7 ,A8,A18 avec un diamètre de 15 mm .Les diamètres des zones d'inhibition appliquées par les souches A4et A9,A26, est compris entre 12-14 mm

IV.3.2. inhibition de *Listeria monocytogenes* par les isolats actinomycétaux :

Les résultats de l'activité antibactérienne des actinomycètes isolés contre la souche *Listeria monocytogenes* sont représentés dans la figure suivante (figure 39).

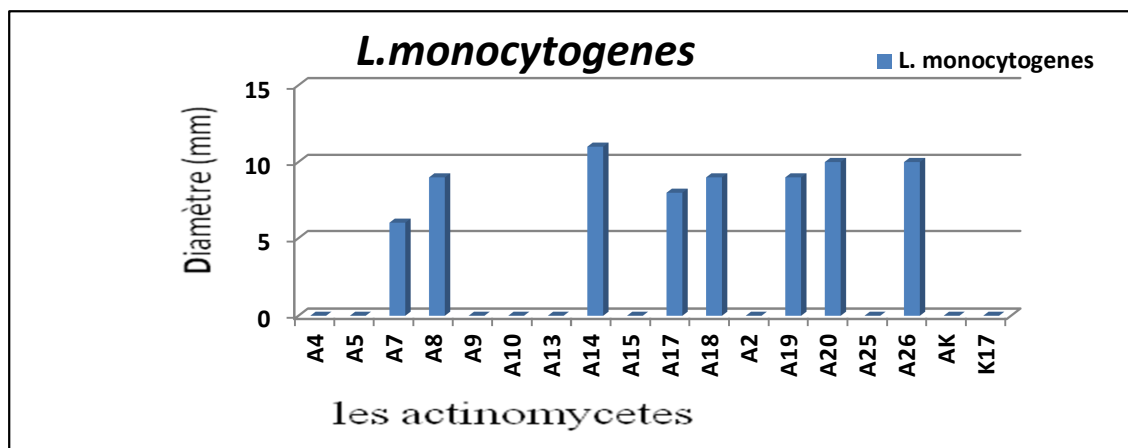


Figure 39: activité inhibitrice de nos actinomycètes contre *Listeria monocytogenes*

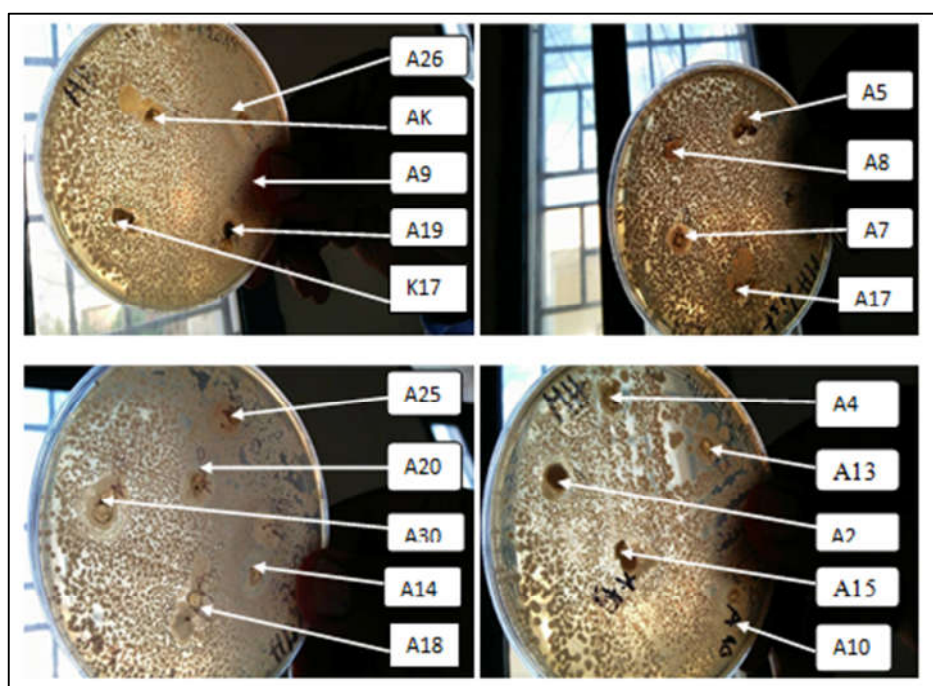


Figure 40 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes vis-à-vis *L. monocytogenes*

D'après l'historgramme on remarque que 8 souches, sur les 18 testées, ont présentées une activité inhibitrice contre *L. monocytogenes*. Le pouvoir inhibiteur le plus important est noté chez la souche A14 avec un diamètre de 11mm. La souche A20 et A26 a donné une zone d'inhibition de 10mm de diamètre. L'activité la plus faible, qui se traduit par un diamètre de 06mm, a été marquée par la souche A7. Les autres actinomycètes ont donnés des zones d'inhibition de diamètre compris entre 06 et 10mm.

Parmi les 18 isolats on a sélectionné deux souches qui ont donné une activité inhibitrice importante contre les deux espèces bactériennes tests et qui sont A07 et A10

IV.4.Caractérisation morphologique

IV.4.1. Macromorphologie et caractères cultureux

Les résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des 2 souches actives sont illustrées sur (le tableau 9)

Tableau 9: Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives

Souches	A10	A7
Milieu de culture	ISP2	ISP2
Couleur de MA	Absent	Blanc Beige
Couleur de MS	Beige	Beige
Pigmentation	Absent	Beige

Après ensemencement sur milieu ISP2, les colonies des souches d'actinomycètes actives apparaissent durant deux jours d'incubation à 28°C. A partir du 14^{eme} jour, la souche A10 a donné des colonies poudreuses et circulaires convexes, bossues, à bords ondulés et irréguliers, de taille moyenne de 4 à 7 mm, et adhèrent fermement au milieu de culture, elles sont difficiles à mettre en suspension avec un mycélium de substrat beige et absence de mycélium aérien.

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

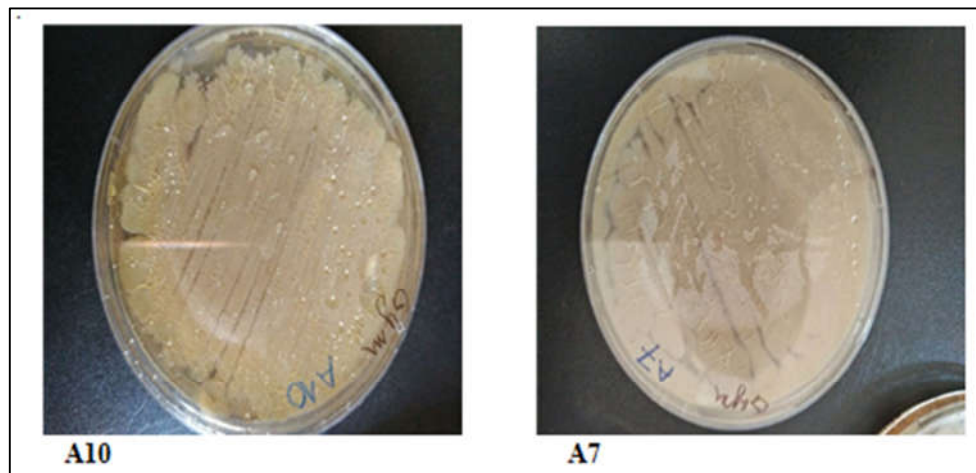


Figure 41: Aspect morphologique et caractères cultureux des souches A7 et A10

VI.4.2. Coloration de gram

Une coloration de gram a été réalisé et qui à montré montré une couleur violette des colonies après observation sous microscope optique (grossissement x100) avec l'huile à immersion, ce qui veut dire que les actinomycètes sont de gram positif (**voire figure 42**).

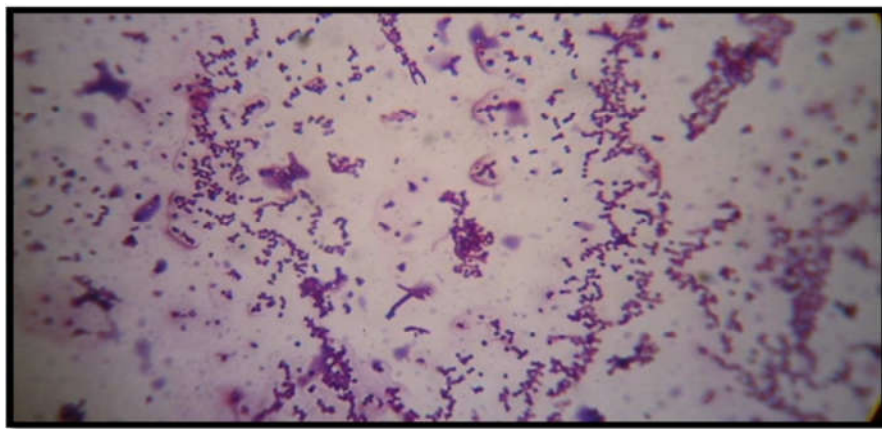


Figure 42: observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram

Purification et Confirmation de l'identité des souches fongiques cibles

Les souches cible sont repiqué successivement sur PDA, les aspects morphologique de ces souches fongique a été étudiier (voir figure 43).

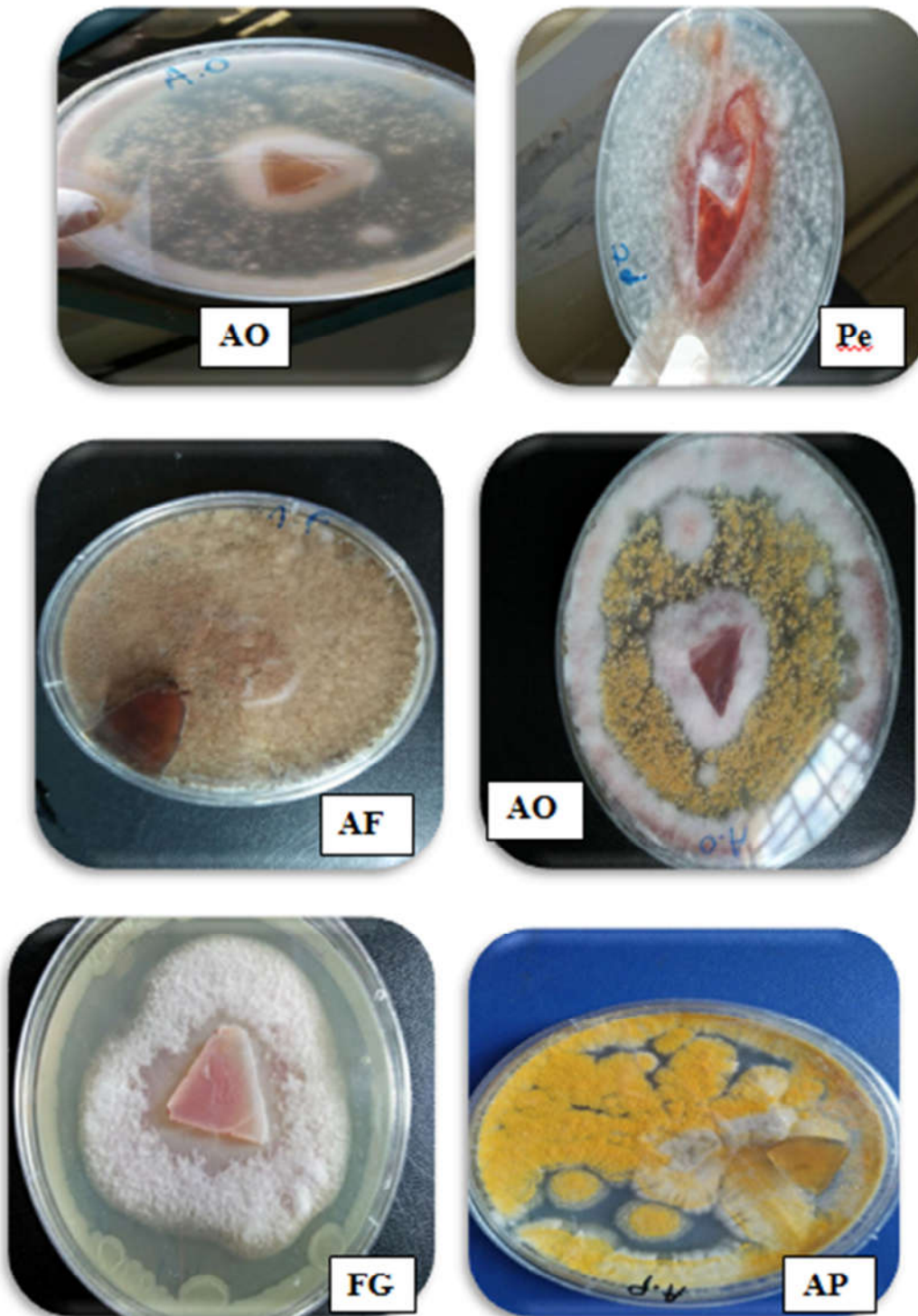


Figure 43 : Aspet macroscopique de certaines souches fongique cibles

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

Dans le but de sélectionner des souches d'actinomycètes ayant le pouvoir de produire des molécules qui sont capables d'inhiber certaines souches fongiques. Le test de cylindre d'agar est utilisé dont les résultats sont représentées dans le (tableau 10)

Tableau 10: pouvoir antifongique des actinomycètes obtenus par la technique de cylindre d'agar

Actinomycètes	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				
	AP1	AF	FG	AO	Pe
A2	12	12	08	00	08
A4	13	13	00	08	00
A5	09	07	00	00	08
A7	12	16	12	10	12
A8	13	15	00	08	00
A10	09	17	10	00	12
A13	11	15	00	08	00
A14	13	15	00	10	00
A15	15	15	00	00	00
A17	00	07	00	00	00
A18	00	16	00	14	00
A19	17	15	00	08	08
A20	00	15	00	00	00
A25	00	00	00	00	00
A26	12	14	00	00	06
A30	15	14	00	00	09
AK	00	00	00	00	00
K17	00	00	00	00	00

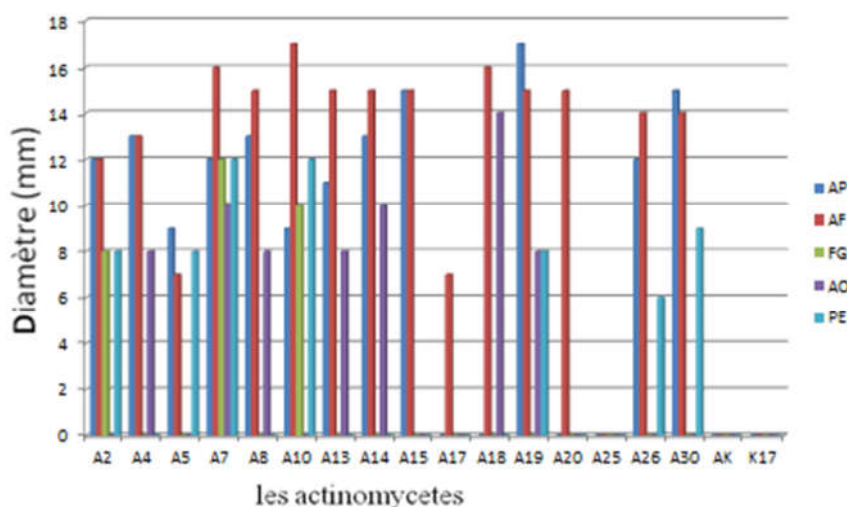
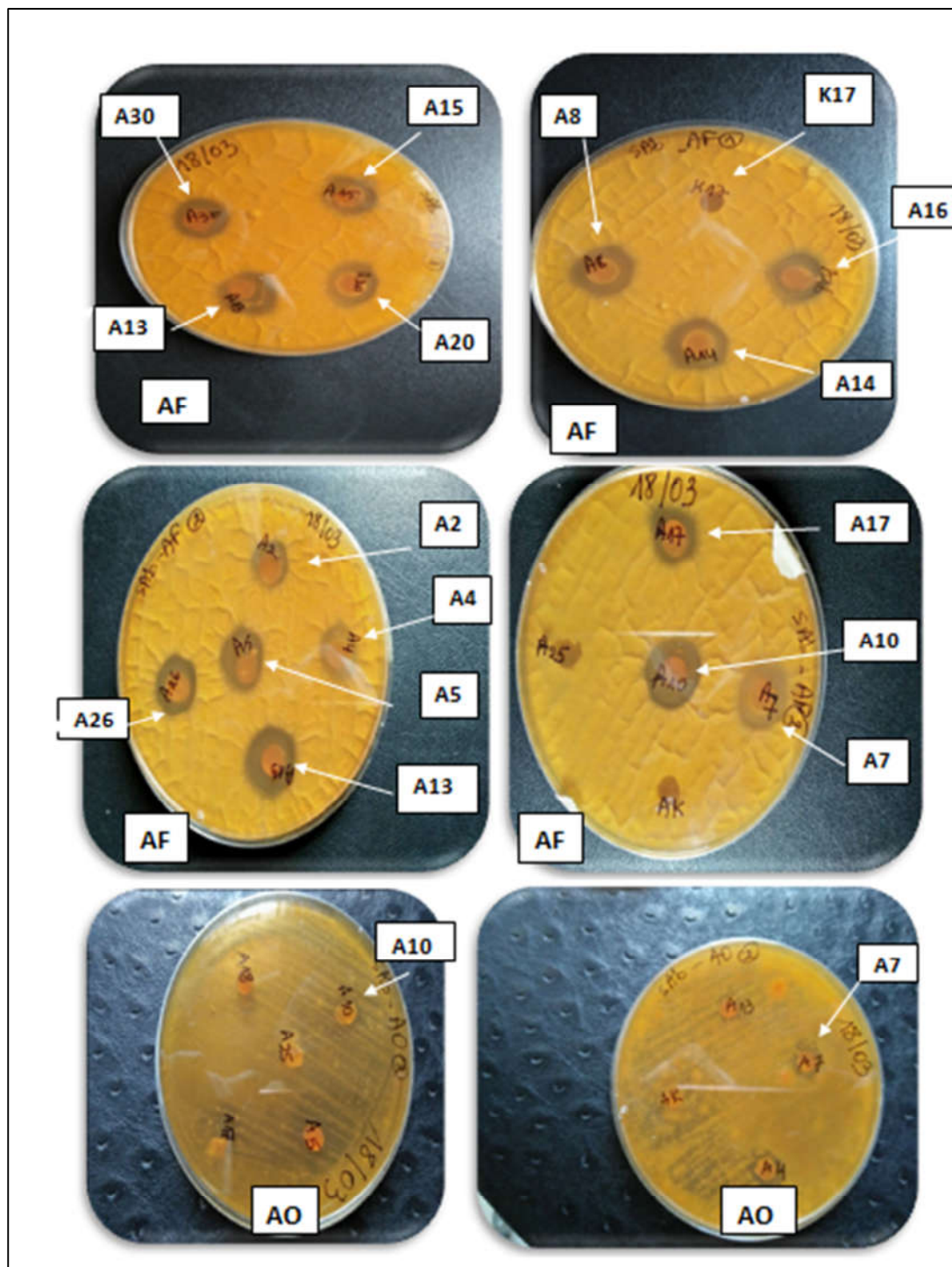


Figure 44 : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre 5 souches fongique



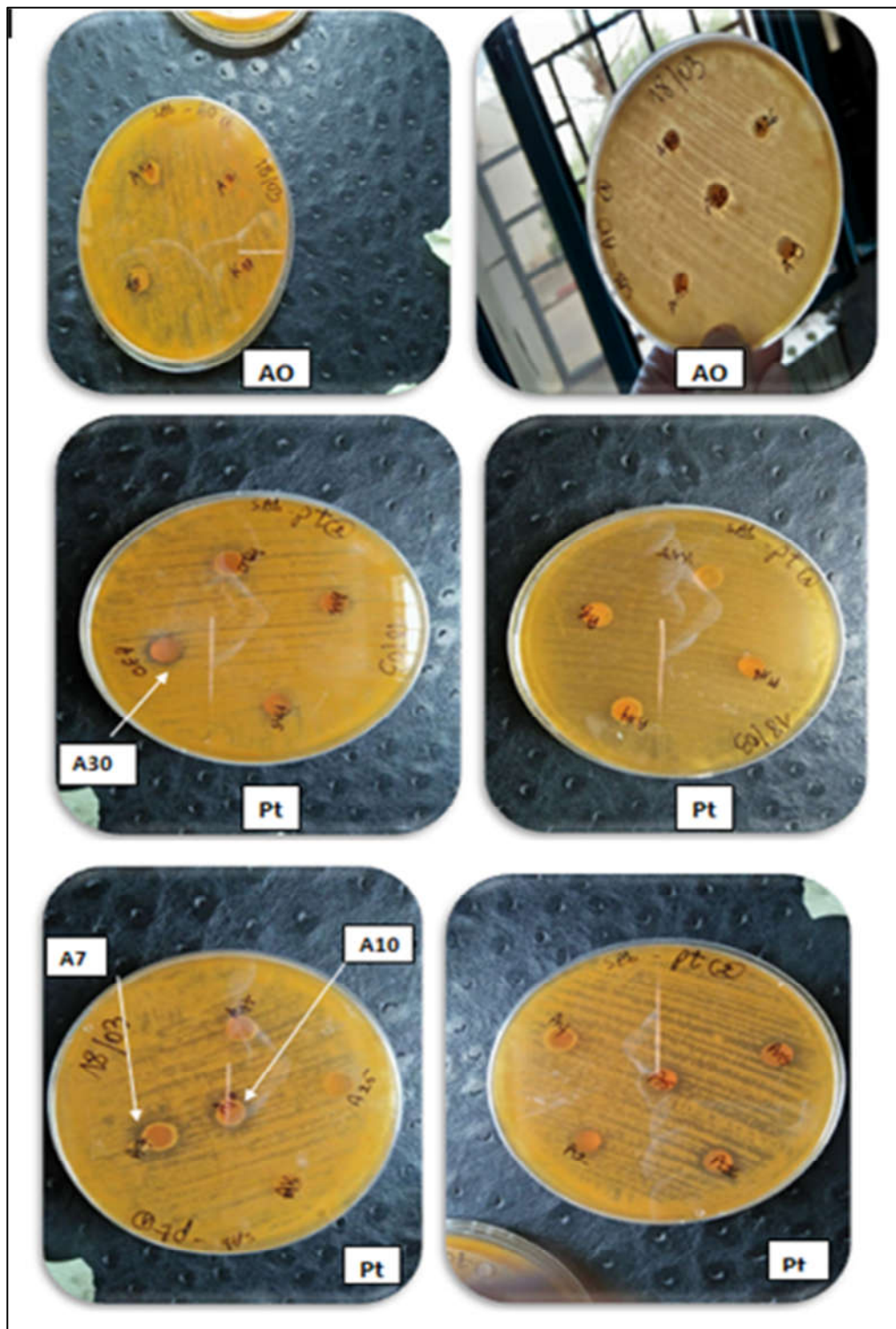


Figure 45 : résultat de la technique de cylindre d'agar

Les résultats du test antifongique obtenus montrent que Les souches A10 et A7 ont montré un pouvoir inhibiteur important avec la majorité des souches fongiques à l'exception de la souche fongique AO qui n'a pas été inhibée par La souche A10.

les 4 souches d'actinomycète A4, A8, A13 et A14 présentent un effet inhibiteur seulement contre les souches fongiques AP,AF,AO.

La souche A15 n'inhibe que la souche AP ,et AF avec une zone d'inhibition de 15mm.

La souche A19 a montré un pouvoir inhibition important contre la souche fongiques AP avec une zone d'inhibition de 17mm.et contre AF avec une zone d'inhibition de 15mm et aucune effet sur la souche FG.

La souche A20 inhibe seulement la souche fongique AF avec une zone d'inhibition de 15mm de diamètre..

Les souches d'actinomycète A5,A26,A30 a pu inhiber seulement les souches fongiques AP,AF,Pt.

La souche A25,AK ,K17 n'a inhibé aucune souche fongique, alors que la souche A17 a pu inhiber seulement la souche AF, avec une zone d'inhibition de 7mm de diamètre. Les souches A7 et A18 ont montré un pouvoir inhibiteur contre AF et AO avec des zones d'inhibition de 16 mm et 14 et elle ne présente aucune effet sur AP,FG,Pt. . **(figure 45)**

production et Extraction des métabolites secondaire

Fermentation sur milieu solide

Les souches d'actinomycètes retenues A7 et A10 , après avoir montré un pouvoir inhibiteur important lors du test de cylindre d'Agar, sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu AF (10 boîtes pour chaque souche), puis incubées à 28⁰ C pendant 14 jours.

Après l'incubation, les milieux produisant des métabolites sont fragmentés dans des flacons contenant du méthanol (20 ml pour chaque boîte). Ce dernier est utilisé comme un solvant d'extraction. Les flacons subissent une agitation rigoureuse pendant 2 heures. Le mélange obtenu subit par la suite une filtration du contenant, puis une centrifugation à 11000 g pendant 10 min. **(Figure 46)**

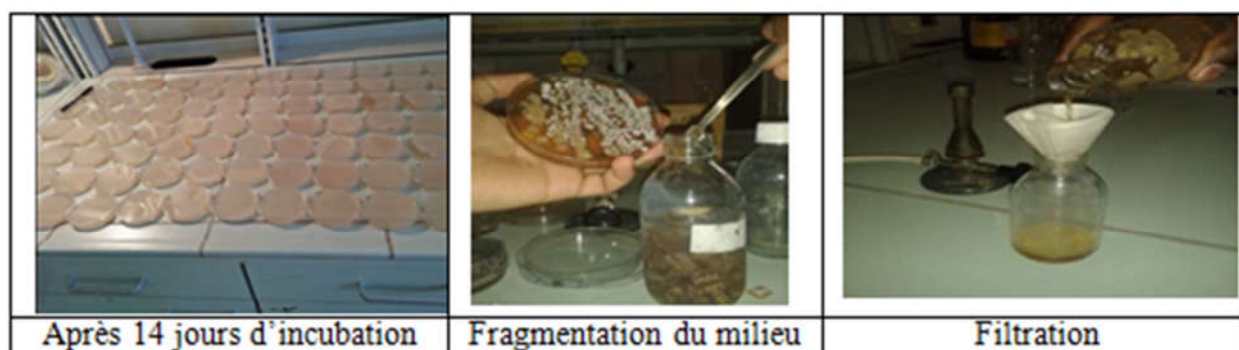


Figure 46 : étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide.

Durant la période d'incubation, des changements de la couleur et de l'aspect du milieu sont observés. Le milieu contenant la souche A10 est devenu jaune foncé alors que celui contenant la souche A7 prendre la couleur marron foncée.

V.8 Tests de l'activité antifongique des extraits

V.8.1 Technique de contact directe ou de dilution

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

Test antifongique de l'extrait de la souche A10 et A7 :

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de la souche A10 sur la croissance mycélienne des cinq champignons, après une période d'incubation de 5 jours sont regroupés dans la figure suivante

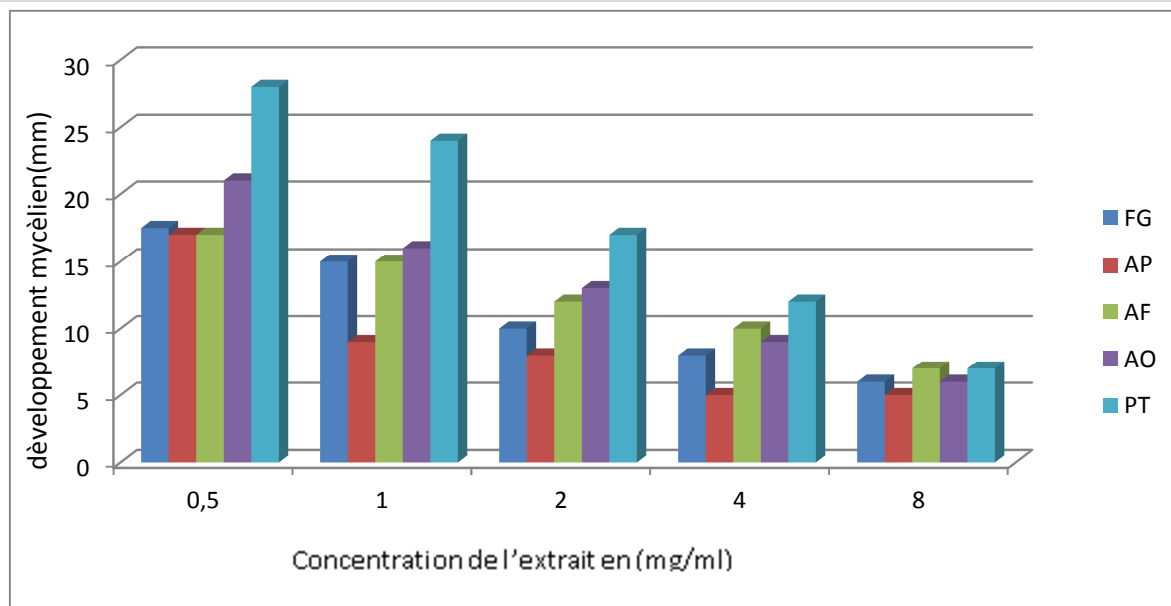


Figure 47 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche A10

Les résultats obtenus montrent qu'à une concentration de 8mg/ml toutes les souches fongiques sont inhibées totalement. Dans les concentrations (0,5 et 1mg/ml) les cinq souches fongiques ont donné une croissance mycélienne qui augmente chaque fois en diminuant les concentrations de l'extrait. nous remarquons en terme de sensibilité que la souche fongique *Ap* présente une très bonne sensibilité

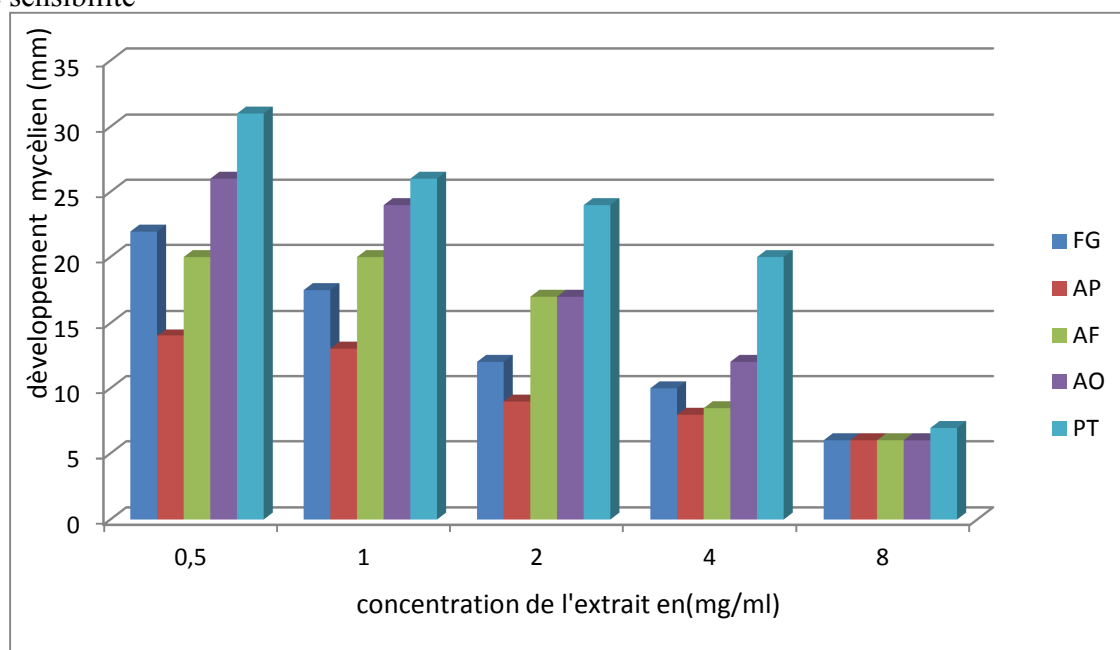


Figure 48 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche A7

Les tableaux (11 à 15) : développement mycélienne des cinq souches fongique testes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait.

Pour *Penicillium expansum*

Dilution (mg/ml) Souche D'Actinomycète	0,5	01	02	04	08
Souche A 7					
Souche A 10					

Pour *Aspergillus flavus*

Dilution (mg/ml) Souche D'Actino-mycète	0,5	01	02	04	08
Souche A 7					
Souche A 10					

Pour *Aspergillus ocrasus* :

Dilution (mg/ml) Souche D'Actino-mycète	0,5	01	02	04	08
Souche A 7					
Souche A 10					

Pour *Aspergillus parasiticus*

Dilution (mg/ml) Souche D'Actino-mycète	0,5	01	02	04	08
Souche A 7					
Souche A 10					

Pour *Fusarium gramineum* :

Dilution (mg/ml) Souche D'Actino- Mycète	0,5	01	02	04	08
Souche A 7					
Souche A 10					

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

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

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

Actinomycète Souches fongiques	Zone d'inhibition donnée par A10 (mm)		Zone d'inhibition donnée par A7 (mm)	
	Sans ergostérol	Avec ergostérol	Avec ergostérol	Sans ergostérol
<i>Aspergillus flavus</i>	10	10	14	10.5

Les résultats montrent que le diamètre de la zone d'inhibition exercée par la souche actinomycétales A7 a subi une diminution en présence de l'ergostérol dans le milieu de culture préalablementensemencé par la souche fongique (*Aspergillus Flavus*). la souche A7 a donné une zone de diamètre de 14 mm dans un milieu dépourvu de l'ergostérol, alors que la zone diminue, en ajoutant de l'ergostérol, à une valeur de 10,5 mm.

La souche A10 a donné des diamètres des zones d'inhibition identiques, en absence et en présence de l'ergostérol contre *Aspergillus flavus*

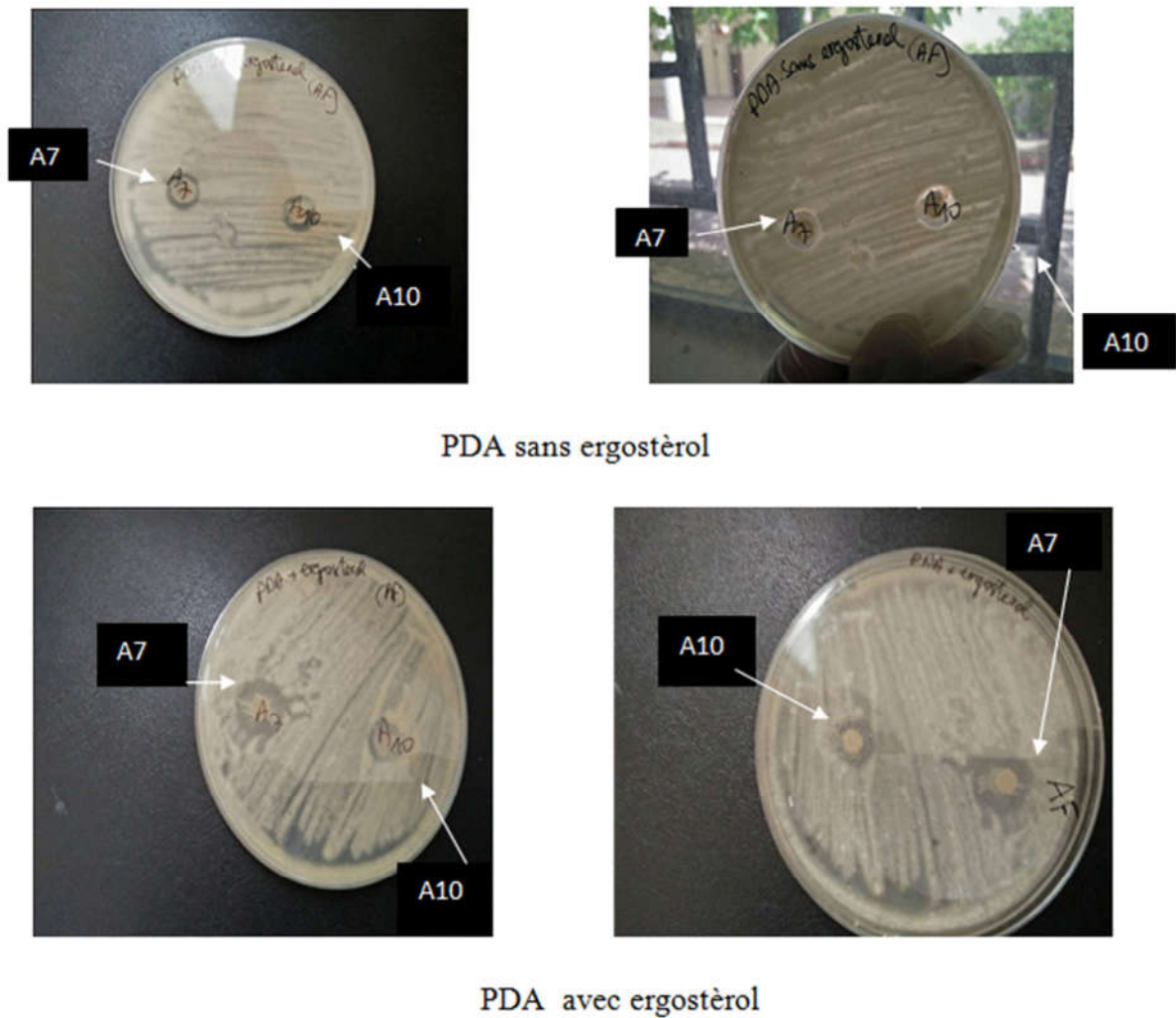


Figure 49 : Illustration du résultat de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique

La caractérisation préliminaire de l'agent antifongique par chromatographie sur couche mince

Résultat de la CCM

Après extraction par méthanol et La visualisation sous UV (à 254 nm) et la détection des molécules fluorescentes (à 365nm) des chromatogrammes des extraits bruts développés sur les différents systèmes de solvants, , Les résultats ont montré que la meilleur séparation des produits de l'extrait a été donnée par les systèmes d'éluent Toluène - acide acétique(8 :2) et Déchlorométhane –méthanol (8,2).

Pour les deux extraits représentés dans la figure 50

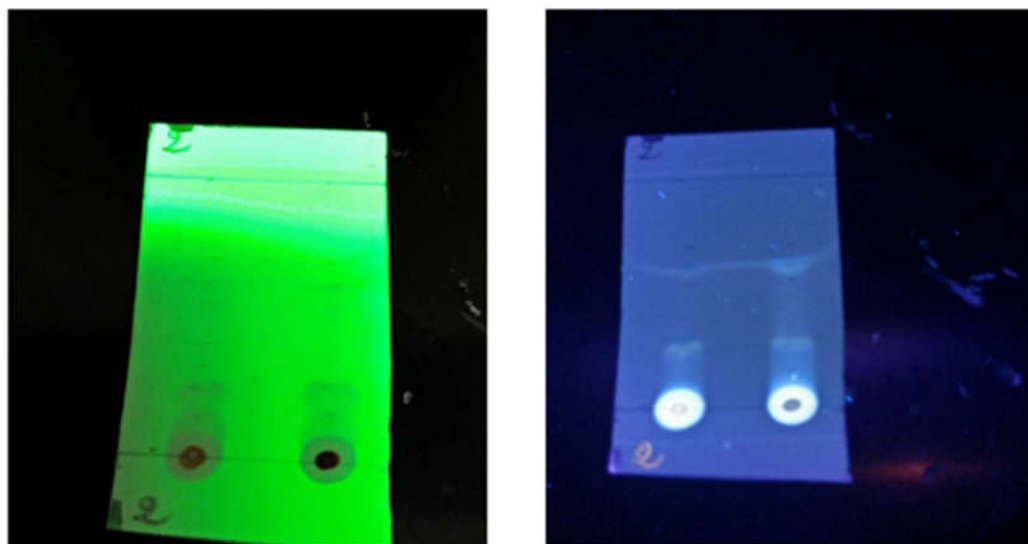


Figure 50 : Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm.avec système Toluène - acide acétique(8 :2)

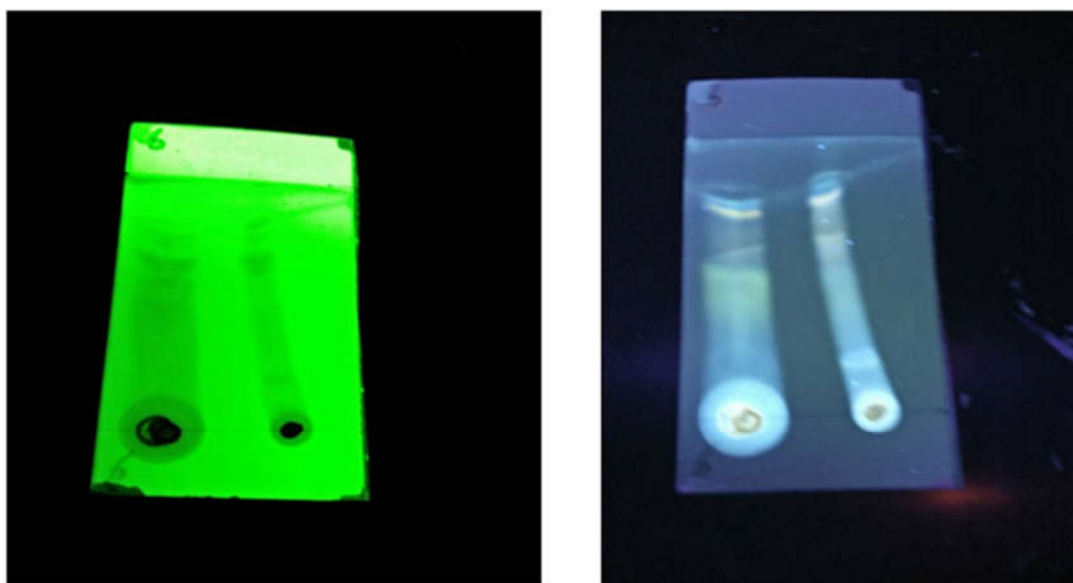


Figure 51 : Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm.avec système Déchlorométhane –méthanol (8,2).

Les résultats de la CCM après la séparation montrent que l'extrait méthanolique de l'isolat **A7** qui est disposée à gauche est constituée de 7 composés qui ont migré chacun avec sa polarité et observée sous UV à 254nm possédant des R_f de (0,11 - 0,21 - 0,28 - 0,35 - 0,52 - 0,59 - 0,67), En ce qui concerne la séparation de l'extrait méthanolique de l'isolat **A10**, elle révèle 6 composés sont observée sous la même bande UV. le rapport frontale de chacun de ses composés : R_f de (0.14 - 0.23- 0.30- 0.52- 0.59- 0.67).

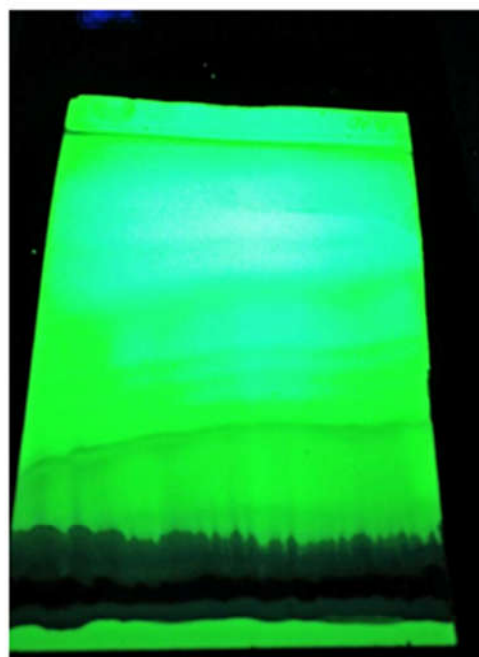
Tableau 17: résultat de la chromatographie sur couche mince système Toluène - acide acétique(8 :2)

Les extraits Les spots	RF (A7)	RF (A10)
1ere spot	0.11	0.14
2eme spot	0.21	0.23
3eme spot	0.28	0.30
4eme spot	0.35	0.52
5eme spot	0.52	0.59
6eme spot	0.59	0.67
7eme spot	0.67	

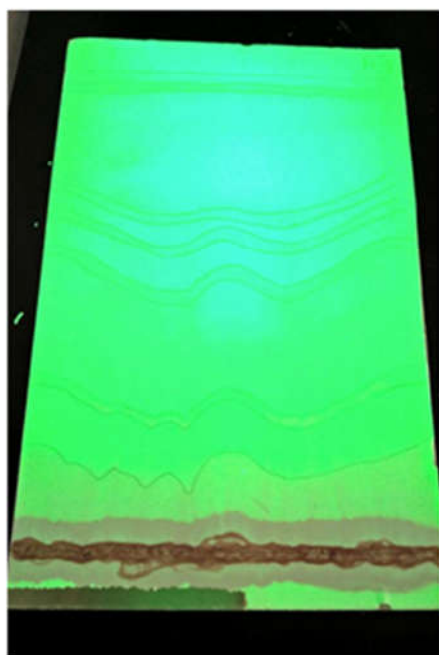
Les résultats ont montré que les 3 derniers spots des deux extraits ont les mêmes rapports frontale respectivement $RF = (0.67, 0.59 \text{ et } 0.52)$ alors que . Tous les spots des deux extraits ont presque la même couleur qui est jaune foncé



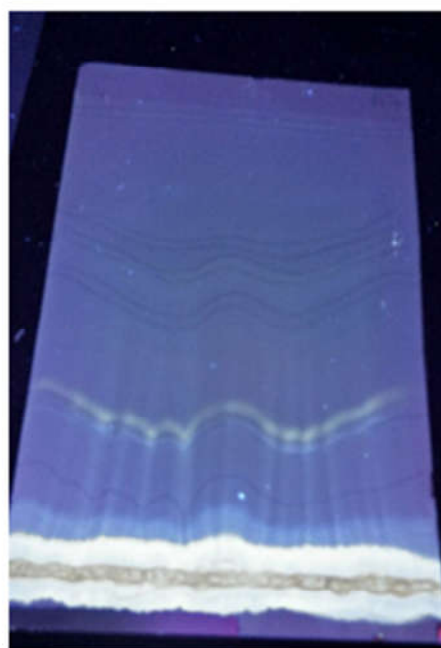
Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'isolat A10 à 365 nm (UV) (Fluorescence)



Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'isolat A10 à 254 nm (UV)



Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'isolat A7 à 254 nm (UV)



Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'isolat A7 à 365 nm (Fluorescence).

Figure 52 : Chromatogramme représentant les résultats de la semi purification des extraits sur couche mince de silice sous UV à 254 et 365 nm

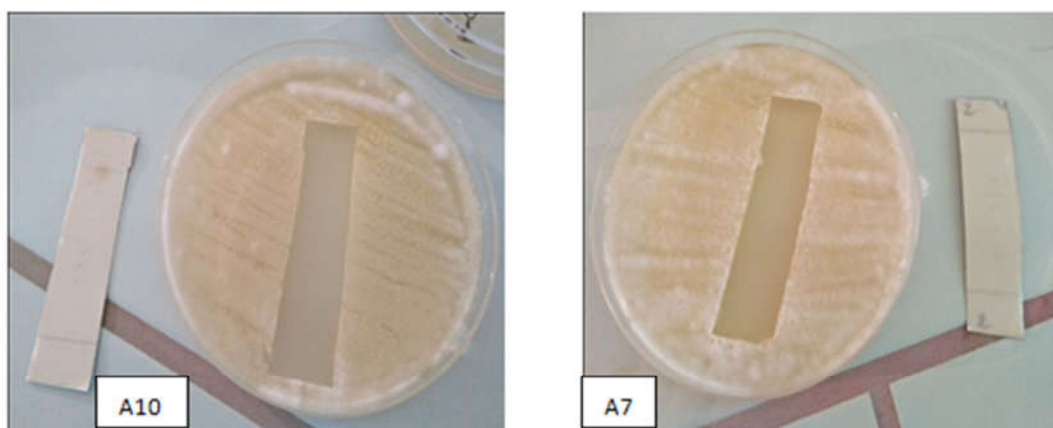
I.1. Résultat de la bioautographie :

Après sélection du solvant d'extraction ayant permis la meilleure récupération des activités antifongique par antibiographie qui c'est révélé être le méthanol, et après choix du meilleur système d'élution permettant une bonne séparation des substances présentes dans les extraits bruts à savoir Toluène - acide acétique(8 :2) et Déchlorométhane –méthanol (8,2). l'autobiographie des fractions séparées par CCM a montrée un résultat négatif.

Bien que la migration des substances soit bonne, il a été néan moins impossible de distinguer l'activité antifongique par bioautographie et cela malgré le nombre de répétition (2) (**Figure 26**).

Cela s'explique, très probablement, par la faible quantité de substances antifongiques présente au sein de la plaque de silice.

Une autre hypothèse suggère la présence d'un effet synergique entre deux ou plusieurs composants bioactive de chaque extrait qui, après séparation leur activité a considérablement diminué.



Bioautographies des extraits bruts de l'isolat A7 et A10.

Figure 53 : Illustration du résultat de la bioautographie contre la souche fongique (*Aspergillus flavus*)

I.2. Purification des molécules bioactives

Un volume de 600 µl de chaque extrait concentré est déposé en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci, sont ensuite développées dans l'éluant sélectionné auparavant.

Après migration et grattage des différentes bandes séparément, le contenu des taches actives révélées par UV à 254 nm et les taches fluorescentes à 365 nm sont dissoutes dans 2ml de méthanol. Une filtration est effectuée pour éliminer la silice et garder le surnageant contenant les activités (**Figure 54**).

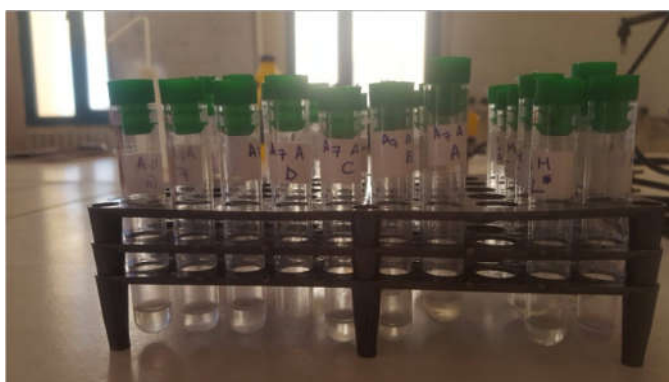


Figure 54 : illustration des différentes fractions obtenues par CCM après purification.

L'activité des filtrats est testée sur les souches fongiques (*Aspergillus flavus*) et PT ensemercer sur milieu PDA. (**Tableau 18**) et la (**Figure 55**) démontrent les rapports frontaux des fractions actives, ainsi que les diamètres des zones d'inhibitions obtenues après incubations de 48h.

Tableau18 : Résultat du test d'activité des extraits semi purifiés et les Rf des fractions actives

Les extraits Bruts	Les rapports frontaux (Rf) à 254 nm (UV)		Zones d'inhibition (mm)
Extrait méthanolique A10	0.14 0.23	0.30	14 mm 15 mm 13mm
Extrait méthanolique A7	0.11 0.21	0.28	12 mm 15 mm 13mm

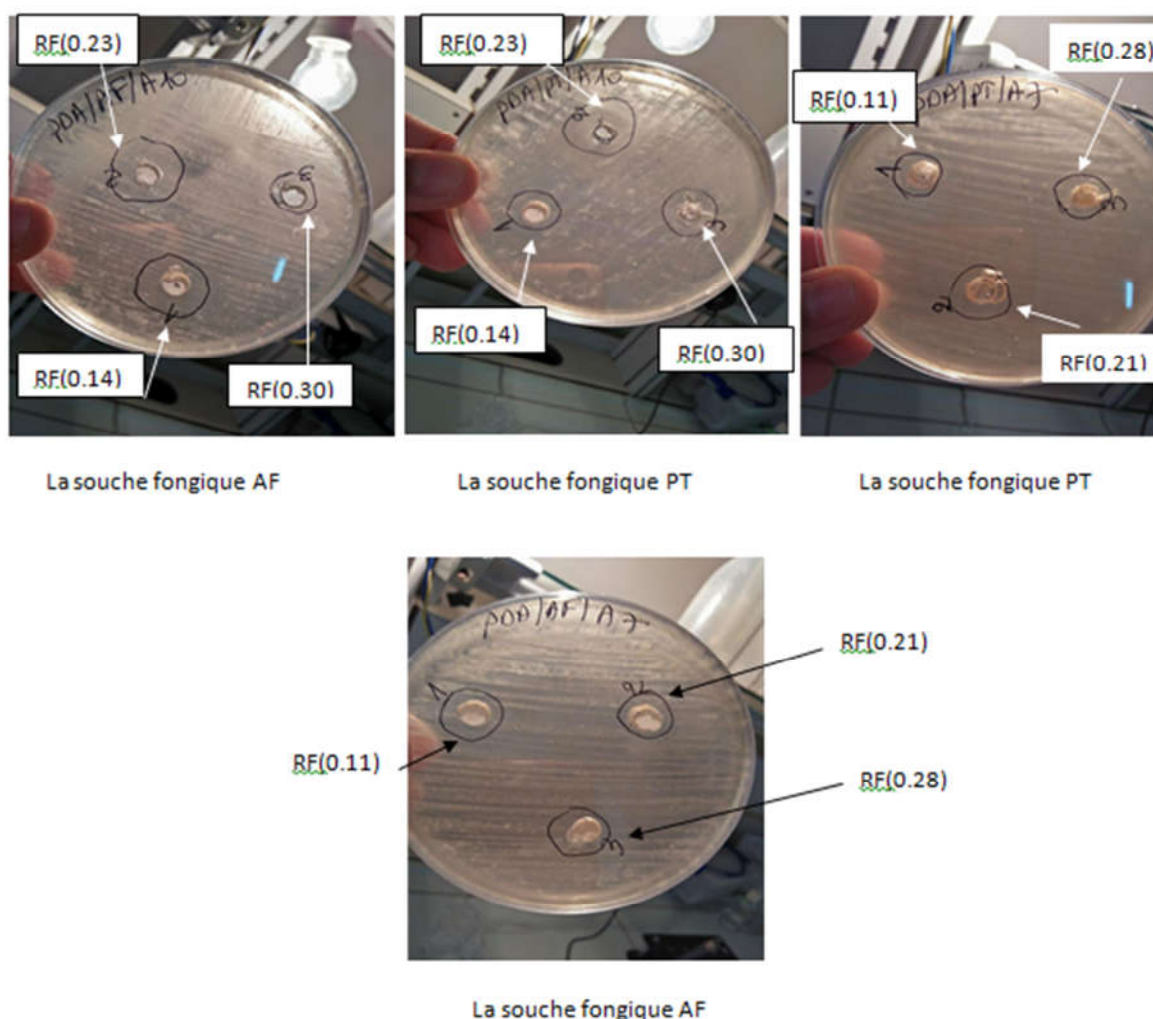


Figure 55 : illustrations des zones d'inhibitions des fractions actives purifiées

Les résultats ont montré que les 3 premiers spots des deux extraits ont une activité inhibitrice donc les molécules bioactives se situent dans ces fractions actives ou le RF : (0,11 – 0,21 – 0,28) pour l'extrait de la souche A7 et RF : (0,14 – 0,23 – 0,30) pour l'extrait de la souche A10.

I.2.1. V.1. Piégeage du radical libre DPPH :

Ce test est l'une des méthodes les plus fréquentes et relativement rapide utilisées pour tester l'activité radicalaire des substances biologiquement actives (**Molyneux et al., 2007**). Ce radical présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517nm et il est de couleur violette mais se décolore rapidement et devient jaune quand il est réduit (**fig .56**). La capacité des antioxydants présents dans le milieu est proportionnelle à l'intensité de la couleur

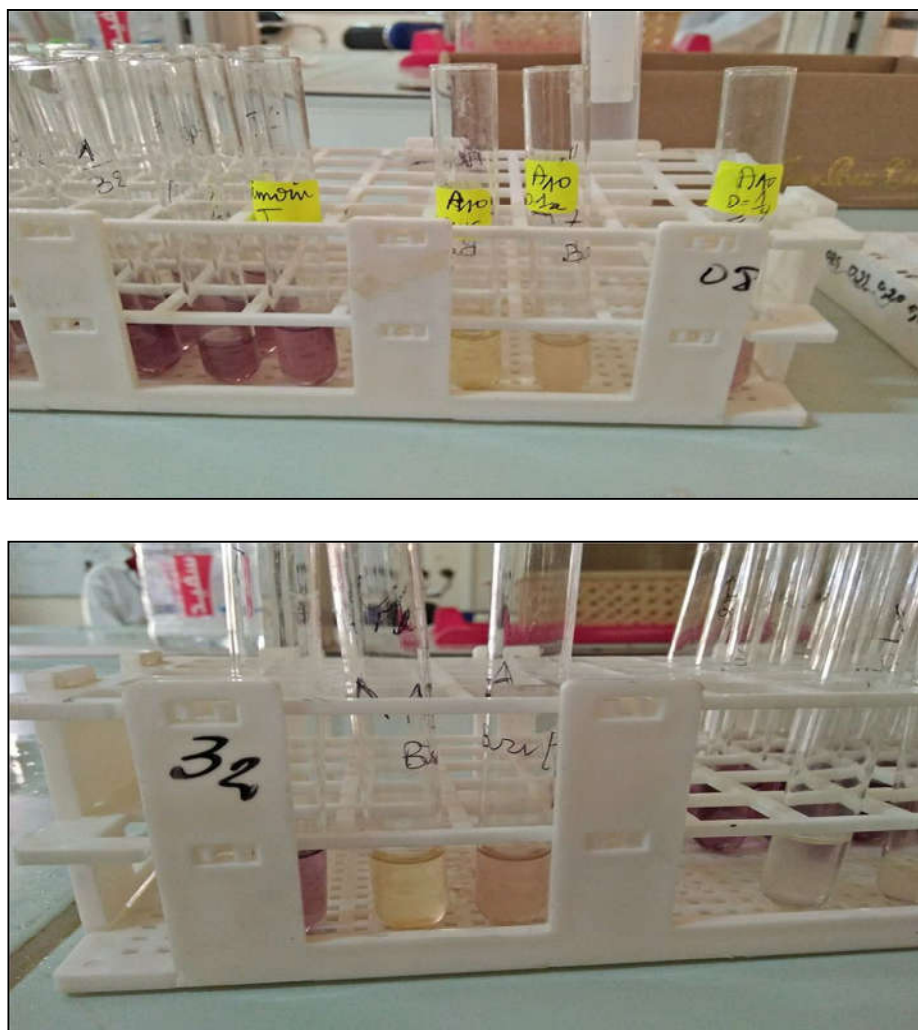


Figure 56: piégeage du radical DPPH (de couleur violette au dipényl picyl-hydrazine de couleur jaune)

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des deux extraits méthanolique (A7, A10) testés est illustré dans les figures 1et 2 suivantes :

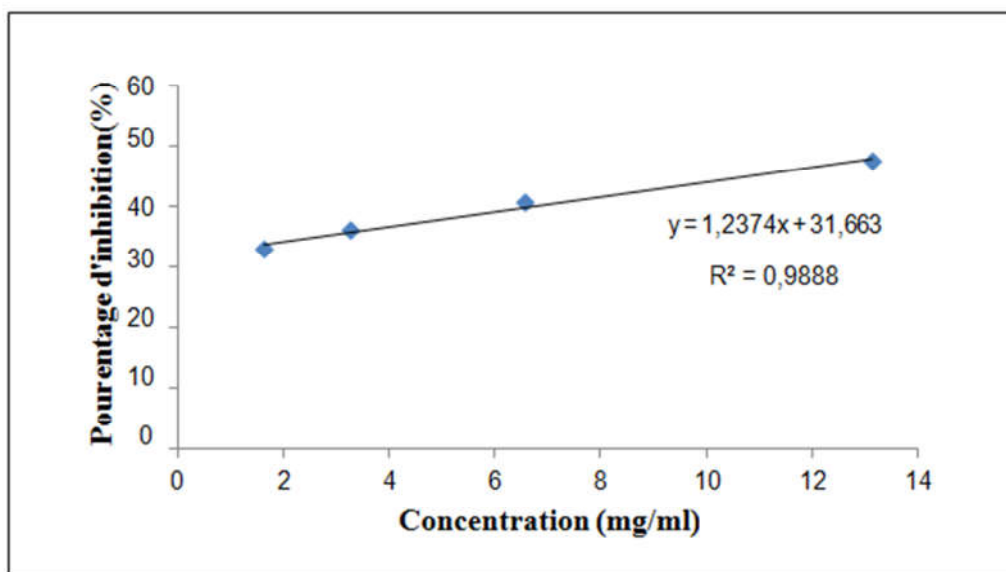


Figure 57: Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de L'extrait A7.

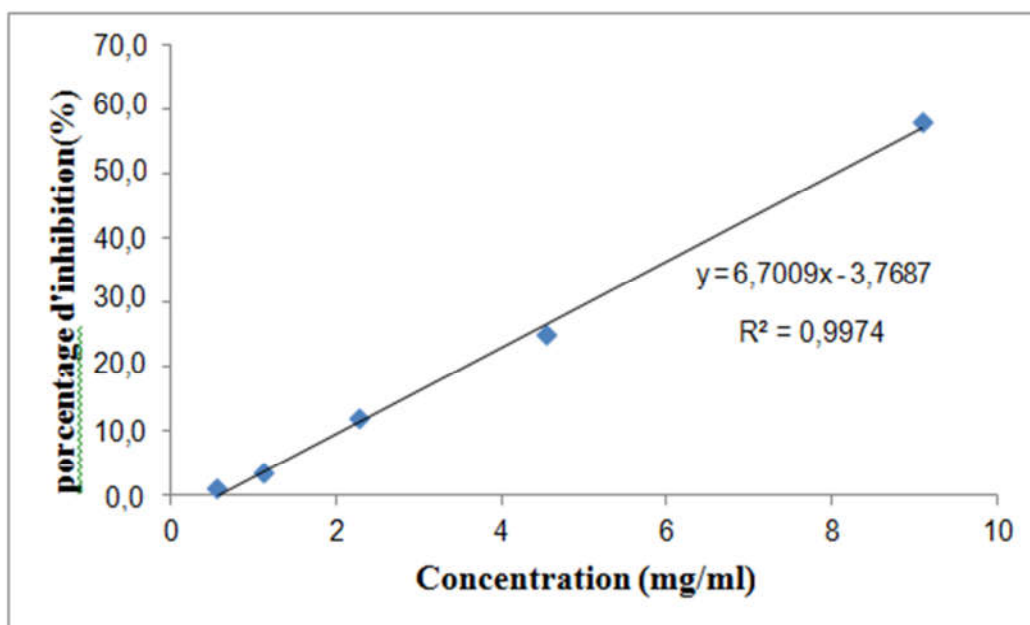


Figure 58 : Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait A 10

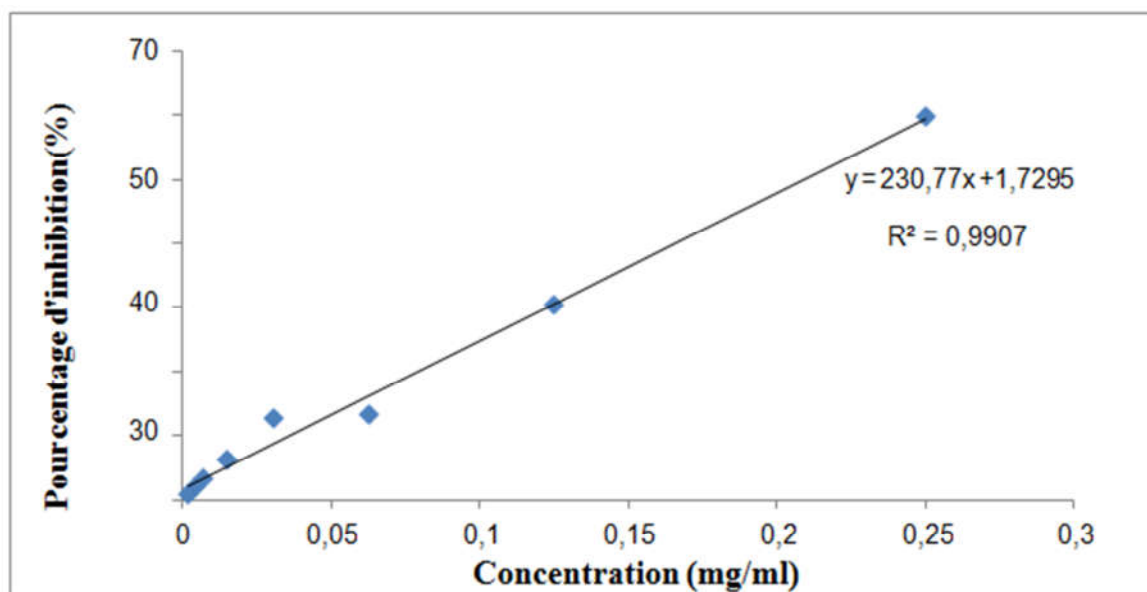


Figure 59: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'Acide ascorbique

D'après les résultats présentés dans les (fig.57) et (fig.58), il est clair que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration aussi bien pour le standard l'acide ascorbique (fig. 59) que pour les deux extraits bruts A7 et A10. Bien que l'activité antioxydante soit faible par rapport aux standards, il est évident que nos deux extraits soient en mesure de céder des hydrogènes. Cette aptitude leur confère la possibilité d'être utilisé comme réducteurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires (Chung *et al.*, 2006).

V.2. Les IC 50 sur le radical DPPH:

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC50. C'EST la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre (DPPH). Plus la valeur d'IC 50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Hebi et Eddouks, 2016).

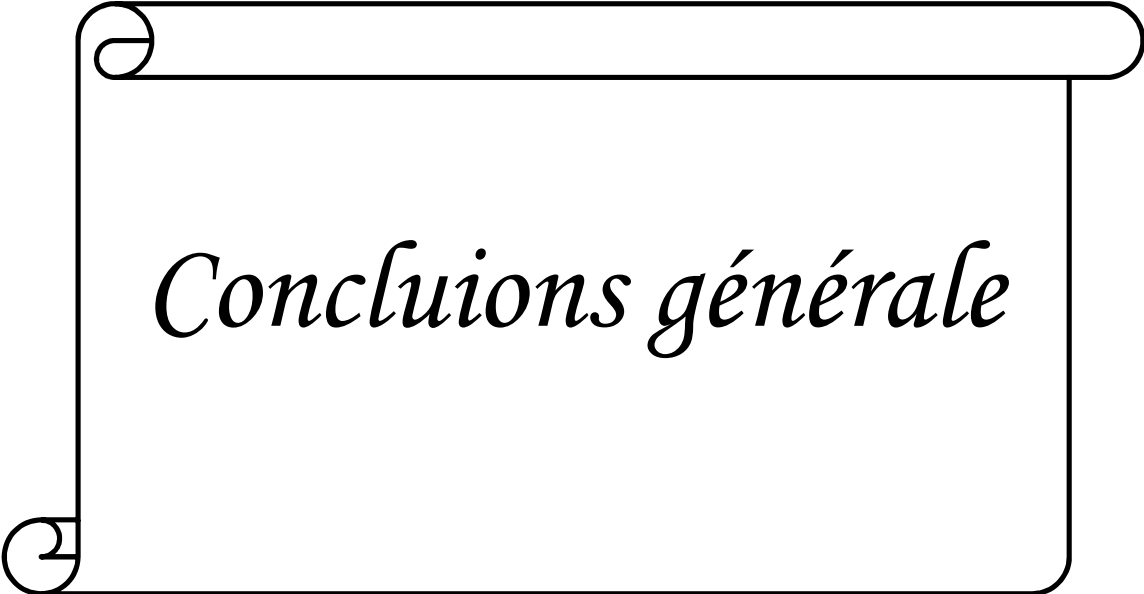
A partir des courbes (fig 57, 58, 59) les IC50 sont déterminés pour le test DPPH, des deux extraits et le standard. Les valeurs des IC50 sont représentées dans le tableau suivant

Tableau 19: valeurs de IC50 en (mg /ml) pour le test DPPH

Extraits et standard	IC 50 (mg/ml) DPPH
A7	14.88
A10	8, 10
Acide ascorbique	0.27

D'après les résultats présentés dans le tableau 1, le IC50 obtenu pour le standard est largement inférieur à ceux des extraits des deux souches A7 et A10 et donc a une activité antioxydante très élevée, le IC50 obtenu pour la souche A10 est inférieur à celui de l'extrait de la souche A7 ce qui confirme que l'activité antioxydante de la souche A10 est élevée.

L'effet inhibiteur des deux extraits testés est moins important que l'effet inhibiteur puissant du standard (acide ascorbique), cela est dû essentiellement à la pureté de ce dernier. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs (Kekuda et al., 2010 ; Manasa et al., 2012 ; Priya et al., 2012 ; Thenmozhi et Kannabiran, 2012 ; Gautham *et al* 2013).



Concluions générale

Conclusion

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, leur capacité à produire une variété de substances intéressantes.

Dans le cadre de recherche de métabolites secondaires bioactifs des actinomycètes, le présent travail vise la production, l'extraction et la purification des molécules bioactives synthétisé par deux souches d'actinomycètes isolée de la région de El Bayadh, ainsi que la mise en évidence de leurs activités antifongique et antioxydante.

L'isolement et la revivification des souches actinomycétales ont été faits sur 3 milieux, y compris AF, GYM et ISP2. Les résultats ont montré que ces 3 milieux permettent une croissance importante des actinomycètes, avec une croissance rapide, dès le premier jour, dans le milieu ISP2.

Parmi les 18 souches d'actinomycètes testées, deux seulement ont montré une activité antifongique importante, lors du test de cylindre d'Agar. On parle des souches **A10** et **A7**. Les deux souches, **A10** et **A7**, ont été ensemencé par stries serrés dans le milieu gélosé AF, puis incubé à 28⁰ C pendant 14 jours. Après cette durée, les métabolites ont été récupérés sous l'action du méthanol.

Ce dernier semble être le solvant le plus approprié pour extraire les molécules bioactives des filtrats de la culture, l'étude est ensuite suivi d'un essai de semi-purification des ces fractions organiques, et cela par l'analyse chromatographique sur couche mince

La chromatographie à montré que le meilleur système de séparation est le Toluène - acide acétique(8 :2).

Les extraits ont montré une activité importante et surtout extrait de la souche **A10** contre les souches fongiques testées, avec des concentrations minimales fongicide comprises entre 2 et 8 mg/ml. Ceci dépend de la souche actinomycétales et les souches fongiques

D'après les résultats de l'action de l'ergostérol sur les substances antifongiques, on peut avoir comme conclusion que la souche **A10** n'a pas un effet sur les stérols membranaires, en revanche la souche **A7** influe négativement sur les stérols membranaire.

L'étude de l'activité antioxydante des deux extraits bruts par la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH,a révélé une meilleur activité antioxydante de l'extrait **A10**

La faible activité antioxydante enregistrée avec l'extrait A7 peut être expliquée par la présence des substances antifongiques autres que les antioxydants.

L'ensemble des résultats obtenus méritent d'être complétés par:

- Des corrélations entre cette dernière et les IC50 des tests du piégeage du DPPH et entre l'activité antifongique et celle antioxydantes sont indispensables afin de pouvoir tirer des conclusions précises;
- l'utilisation d'autres germes cibles ;

En perspectives, il serait nécessaire de continuer l'étude, par la purification complète des molécules produites (en utilisant d'autres techniques

chromatographiques comme l'HPLC) et de déterminer leurs structures par l'utilisation de plusieurs techniques spécifiques comme la spectroscopie d'absorption en lumière UV-VIS, la spectroscopie d'absorption en lumière IR, la spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire

*Références
bibliographiques*

A

1. Adegboye. (2013). Babalola Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary Metabolites M. F. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education A. Méndez-Vilas.
2. Ahmed L, Jensen P.R, Freel K.C, Brown R, Jones A.L, Kim B.Y, Goodfellow M. *Salinispora pacifica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013; 103(5):1069-78. doi: 10.1007/s10482-013-9886-4.
3. AINSWORTH G.C., (1986). Introduction to the history of medical and veterinary mycology. University Press. Cambridge.
4. Alexander B.D, Pfaller M.A. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. Clinical Infectious Diseases 2006; 43: S15–27.
5. Al-Zarban SS, Al-Musallam AA, Abbas I, Stackebrandt E and Kioppenstedt RM (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. Int J Sys Env Microbiol, 52: 555-558.
6. Anzai K, Nakashima T, Kuwahara N, Suzuki R, Ohfuku Y, Takeshita S, Ando K. Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore area of Nagasaki Prefecture, Japan: diversity and biological activity. J Biosci Bioeng. 2008; 106(2): 215-217. doi: 10.1263/jbb.106.215.

B

7. Boudemagh A, Kitouni M, Boughachiche F, Hamdiken H, Oulmi L, Reghioia S, Zerizer H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. Journal de Mycologie Médicale. 2005; 15(1): 39-44. Doi : 10.1016/j.mycmed.2004.12.004
8. Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. J Mycol Med. 2005; 15(4): 211-219.
9. Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. Can J Microbiol. 2006; 52: 373–382.
10. Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J. C., Pinkas

- M., Luycky M. et Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, vol 46, p 1086-1089.
11. Baniyadi F., Shahidi G.H., Karimi Nik A. (2009). In Vitro Petroleum Decomposition by Actinomycetes Isolated from Petroleum Contaminated Soils. *American-Eurasian. Journal of Agricultural and Environmental Science*, vol 6, p 268-270.
12. Bendjama A, Morakchi K, Meradi H, Boukari A, Chouchane T, Belaabed B.E, Djabri L. Caracterisation des matériaux biologiques issus d'un écosystème naturel « PNEK » situé au nord-est de l'Algérie. *J Soc Alger Chim*, 2011 ; 21(1) : 45-58.
13. Boughachiche F, Reghioua S, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A and Boulahrouf A (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de antimicrobiennes à partir de la Sebkhia de Ain Mlila. *Sciences & Technologie 10. substances C*, 23 : 5–10.

C

14. Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnan S and Oliynyk M .(2001). Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem Biol*, vol 8, p 71–723.
15. Carle S. Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. 2003. 36 : 25-41.

F

16. Favier A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108-115.
17. Fenical W., Jensen PR. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete. bacteria. *Nat Chem Biol*, vol 2 p 666–73.

G

18. Goodfellow M. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *Microbiology* 1971; 69: 33-80.
19. Goodfellow M., Kumar Y., Labeda D.P., Sembring L. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for streptomycetes with rugose ornamented spores. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007; 92: 173–199.

20. Goodfellow M., Stach J.E.M., Brown R., Bonda A.N.V., Jones A.L., Mexson J., Fiedler H-P., Zucchi T.D., Bull A.T. *Verrucosisspora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces Abyssomicins. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012 ; 101: 185–193.
21. Gottlieb, D. General considerations and implications of the actinomycetes. In *Actinomycetales : Characteristics and Practical Importance*. 1973. Edited by G. Sykes & F. A. Skinner. New York: Academic Press. pp 1–10.

H

22. Haji M., Jarraya R., Lassoued I., Masmoudi O., Damak M., Nasri M. (2010). GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. *Process Biochem*, vol 45p 1486-93.
23. Haleng, J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. fonc.(2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, vol 62(10) ,p 628-638.

J

24. Jensen PR, Dwight R and Fenical W (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102–1108.
25. Jones T, Federspiel N.A, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee B.B, Newport G, Thorstenson Y.R, Agabian N, Magee PT, Davis RW & Scherer S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101 : 7329-7334.

K

26. Kim KJ, Yang YJ and Kim JG (2003). Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J. Biochem. Mol. Biol*. 36(2), 185–189.
27. Kim M, Kwon T.H, Jung S.M, Cho S.H, Jin S.Y, Park N.H, Kim C.G, Kim J.S. Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from the Internal Organs of Edible Snow Crabs. *PLOS Journal*. 2013; 8(8):e70887. doi: 10.1371/journal.pone.0070887.
28. Kim M.K, Park H.S, Kim C.H, Park H.M, Choi W. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast*. 2002; 19(4): 341-349.
29. Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioua S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale* 2005 ; 15 : 45–51.

L

30. Larpent-Gourgaud M., Larpent J-P. Mémento technique de microbiologie. Paris, Tec & Doc-Lavoisier, 1997. 3ème édition. ISBN- 2-7430-0163-1.
31. Lechevalier M.P. Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Schaal and Pulverer (Eds.) . Zbl. Bakt. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-New-York. , 1981, 11: pp 159-166.
32. Leclerc H., Meyer A., Deiana J. Cours de microbiologie générale : nouveau programme. Doin éditeur, Paris. 1994. ISBN : 2-7040-0745-4.
33. Lee S.D, Jeong H.S. *Actinomadura hallensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Mt. Halla in Korea. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56(1):259-264.
34. Locci R, Actinomycetes as plant pathogens. European Journal of Plant Pathology. 1994; 100: (3-4) 179-200.
35. Locci R. Actinomycete spores. Encyclopedia of Life Sciences. 2005; doi: 10.1038/npg.els.0004237.<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0004237/abstract>

M

36. Madigan M. et Martinko J. (2005). Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, Mater.
37. Madigan M.T., Martinko J.M, Stahl D, Clark D.P. brock biology of microorganisms. 13th Edition Hardcover. 2012. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.
38. Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. Brock biology of microorganisms. 13th Edition Hardcover. 2011. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.
39. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S.K. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. Microbiol Res. 2013; 168(6): 311-32. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.002

P

40. Pridham T.G. Color and Streptomycetes, report of an international workshop on determination of color of Streptomycetes. Applied Microbiology 1965 ; 13(1) : 43-61.
41. Pridham T.G., Gottlieb D. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. J Bacteriol. 1948 ; 56(1): 107–114.

S

42. Seghir A, Boucherit-Otmani Z, Belkherroubi-Sari L, Boucherit K. Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen : épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. Journal de Mycologie Médicale. Article in Press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.08.005>
43. Srinivasan MC, Laxman RS and Deshpande MV (1991). Physiology and nutrition aspects of actinomycetes – An overview. World Journal of Microbial and Biotechnology 7, 171-184.
44. Srinivasan MC, Laxman RS and Deshpande MV (1991). Physiology and nutrition aspects of actinomycetes – An overview. World Journal of Microbial and Biotechnology 7, 171-184.

T

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

V

46. Valan Arasu M, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil. Journal de Mycologie Médicale. 2009 ; 19: 22—28.
47. Van Wezel G.P, Krabben P, Traag B.A, Keijser B.J, Kerste R, Vijgenboom E, Heijnen J.J, Kraal B. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(8): 5283-5288. Erratum in: Appl Environ Microbiol. 2006; 72(10): 6863

W

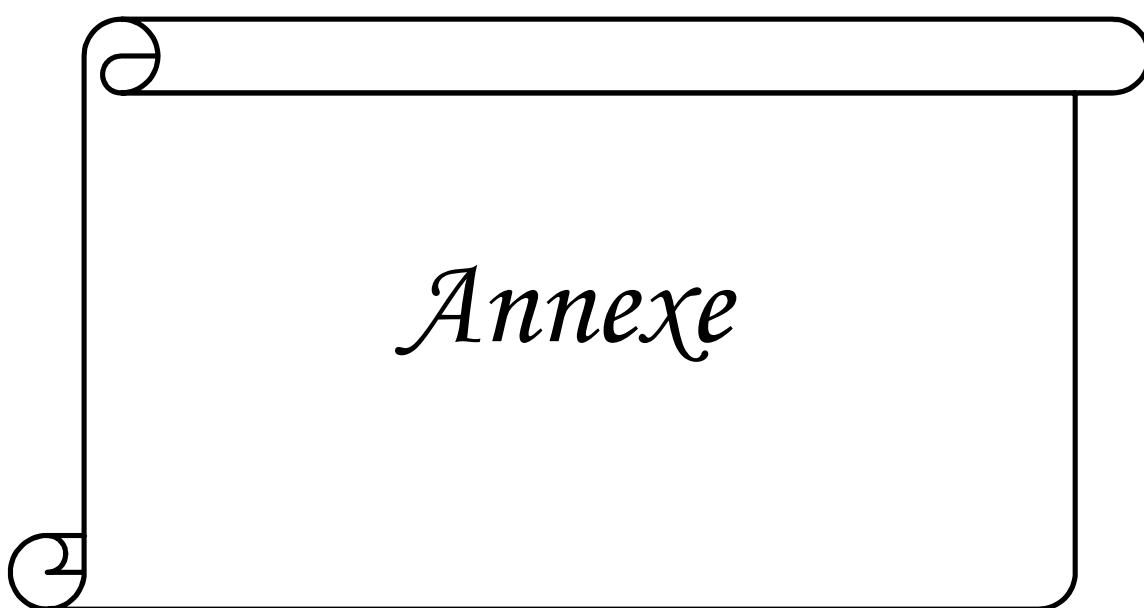
48. Wacksman SA and Woodruff HB (1940). The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease producing bacteria. In “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”. Williams & Wilkins Eds, 4: 2333-2648.
49. Williams, S. T., M. Sharmeemullah, E. T. Watson et C. I. Mayfield. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil VI. The influence of moisture tension on growth and survival. Soil. Biol. Biochem. 4: 215-225.
50. Williams, S.T. et T. Cross. 1971. "Actinomycetes" in «Methods in microbiology» Academic Press, London (Ed.). 4: 295-3334.

Y

51. Yamamoto SP, Bouvet JM and Harayama S (1999). Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridisation. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:87-95.

Z

52. Zermane, F. (2008). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organique de synthèse. Mémoire magister : Microbiologie appliquée, Université Mentouri Constantine.
53. Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59 (Pt 3): 589–608



Milieux de culture:**Milieu AF:**

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	2g
NaCl	2 ,5 g
CACO3	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH : 7

Bennett :

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

pH= 7.3

GYM : Glucose- yeast- extrait de malt

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
CaCo ₃	2g
Glucose	4g
Agar	12g
Eau distillée	1000ml

pH = 7.2

ISP2: (International Streptomyces Project)

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

pH= 7.3

PDA: potato dextrose agar

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

pH: 5,6

Sabouraud:

Peptone	10g
Glucose	40g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH :7

Les colorants:**Lugol :**

Iode	1g
Iode de potassium	2g
Eau distillée	300 ml

Violet de gentian:

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90	10g
Phénol	2g
Eau distillés	1000ml

Fuchsine:

Fuchsine basique	02g
Acide phénique	10g
Alcool absolu	20ml