

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie

Département de microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Microbiologie Appliquée aux substances antimicrobiennes

Thème

*Caractérisation d'antifongiques non
polyéniques produits par des souches
d'actinomycètes et essai d'optimisation
de leurs milieux de production*

Soutenu le : 14/ 12/ 2011

Par : M^{lle} Salima TIGHIDET

Devant le jury :

M^r BENALLAOUA S. Professeur à l'Université de Béjaia

Président

M^{me} BEDJOU F. Maitre de conférences à l'Université de Béjaia

Examinatrice

M^r TOUATI A. Maitre de conférences à l'Université de Béjaia

Examinateur

M^r KECHA M. Maitre de conférences à l'Université de Béjaia

Promoteur

Année 2010/ 2011

Remerciements

« Louange à Allah pour m'avoir donnée le courage pour réaliser ce travail »

Je remercie mon promoteur Dr. Kecha, Maitre de conférences de l'université de Béjaïa, de m'avoir encadrée, formée, dirigée et surtout de m'avoir fait confiance. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

J'adresse mes remerciements aussi à :

Monsieur Benallaoua. S, Professeur à l'Université de Béjaïa, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Madame Bedjou, Maitre de conférences de l'université de Béjaïa et Monsieur Touati, Maitre de conférences de l'université de Béjaïa, d'avoir accepté d'examiner ce travail ;

Le chef du département, Mr Touati, pour son aide et sa disponibilité ;

Membres du corps technique de la faculté de biologie techniciens et ingénieurs de laboratoire dont je citerai, Mr Amrouche, Bania, Naima et Mounia pour leur aide, encouragements et leur soutien au long de la réalisation de ce travail ;

Doctorants du département, vous avez su nous écouter, nous conseiller, et nous donner de votre précieux temps ainsi que de vos expériences personnelles: Ibtissem, Samiha, Fahima, Betty, Karima, Sofiane et Mohamed ; trouvez ici la marque de ma reconnaissance éternelle.

Mes amies ; Rima, Karima, Sabrina avec lesquels j'ai partagé beaucoup de moments forts tout au long de ce mémoire entre rires et pleurs, déprimés et bonheurs.

Les filles de la Post-Graduation (2009) avec qui j'ai partagé d'agréables moments durant deux ans.

Toutes les personnes, que j'ai oublié de citer.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents pour leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles. Qu'ils trouvent dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

Mes frères et sœurs surtout Kenza ;

Mon neveu Mamou ;

Mon amie Mina ;

et

La promotion de Post-Graduation en Microbiologie (2009).

A.E : Acétate d'éthyle

A.M : Acétate d'éthyle – Méthanol

AN.E : Acétonitrile –eau

ATCC: American type culture collection

B.A.E : *n*-butanol-acide acétique-eau

Ben : Benzène

But : *n*-butanol

CCM : Chromatographie sur couche mince

DAP : diaminopimélique acid

DM : Dichlorométhane

E.A.E : Ethanol-ammoniaque-eau

G: Grossissement

GYEA : Glucose-Yeast-Extract-Agar (milieu de culture)

Hex : *n*-hexane

HPLC : Hight Performance Liquid Chromatography

IR : Infrarouge

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

J : jour

MA : Mycélium aérien

MS : Mycélium du substrat

MSA : milieu synthétique a base d'amidon

MSEA : milieu synthétique a base d'amidon et d'extrait de levure

MSG : milieu synthétique a base de glucose

M₂ : Milieu Williams (milieu de culture)

ND: Non déterminé

P : prélèvement

PS : pigment soluble

R_f : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

UV-VIS : Ultraviolet-Visible.

Figure	Titre	Page
1	Cycle biologique d'un Streptomycète	07
2	Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques	12
3	Structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs	14
4	Illustration du test des cylindres d'agar de souches d'actinomycètes vis-à-vis des germes cibles sur gélose à l'extrait de malt	35
5	Spectres UV-visible des extraits butanoliques bruts des filtrats de culture de quelques souches d'actinomycètes.	38
6	Diamètre des zones d'inhibition de l'antifongique de P ₁ D ₇ extraits avec les différents solvants après 24h d'incubation	39
7	Diamètre des zones d'inhibition des antifongiques extraits avec les différents solvants après 24h d'incubation.	40
8	Observations micro morphologiques des isolats d'actinomycètes cultivés sur le Milieu M ₂ pendant 14 jours à 28°C au grossissement (10 x 40).	53
9	Caractérisation des sucres pariétaux pour les souches P ₁ D ₇ et P ₂ D ₁₆	55
10	Evolution du pH des différents milieux de culture de la souche P ₁ D ₇	62
11	Evolution du pH des différents milieux de culture de la souche P ₂ D ₁₆	62
12	Effet du milieu de culture sur la croissance de la souche P ₁ D ₇	63
13	Effet du milieu de culture sur la croissance de la souche P ₂ D ₁₆	64
14	Effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de P ₁ D ₇	64
15	Effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de P ₂ D ₁₆	65
16	Effet de la concentration en caséine sur l'évolution du pH des cultures de P ₁ D ₇	68
17	Effet de la concentration en caséine sur l'évolution du pH des cultures de P ₂ D ₁₆	69
18	Effet de la concentration en caséine sur la croissance de la souche P ₁ D ₇	69
19	Effet de la concentration en caséine sur la croissance de la souche P ₂ D ₁₆	70
20	Effet de la concentration en caséine sur la production de l'antifongique non polyénique de la souche P ₁ D ₇	70
21	Effet de la concentration en caséine sur la production de l'antifongique non polyénique de la souche P ₂ D ₁₆	71
22	Effet de la concentration d'amidon sur l'évolution du pH des milieux de	73

	culture de P ₁ D ₇	
23	Effet de la concentration d'amidon sur l'évolution du pH des milieux de culture de P ₂ D ₁₆	74
24	Effet de la concentration d'amidon sur la croissance de la souche P ₁ D ₇	74
25	Effet de la concentration d'amidon sur la croissance de la souche P ₂ D ₁₆	75
26	Effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P ₁ D ₇	75
27	Effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P ₂ D ₁₆	76

Tableau	Titre	Page
I	Chimiotypes des parois	5
II	Classification des antifongiques selon la cible	15
III	Différents systèmes solvants utilisés pour la migration des antifongiques.	24
IV	Révélateurs chimiques et composés révélés	26
V	Antibiotiques testés à l'égard des souches d'actinomycètes	32
VI	Composition des différents milieux de culture en caséine et en amidon	34
VII	Activités des souches d'actinomycètes à l'égard des germes cibles après 24h d'incubation.	36
VIII	Rapports frontaux des différents systèmes éluants des CCM	41
IX	Rapports frontaux des taches actives des deux souches	42
X	Résultat du Test d'activité des extraits semi purifiés	42
XI	Révélation chimique des activités antimicrobiennes produites	43
XII	Effet du pH sur l'activité des extraits méthanoliques	45
XIII	Effet de la température sur l'activité des extraits méthanoliques	46
XIV	Effet des détergents sur l'activité des extraits méthanoliques	47
XV	Effet de la durée de conservation sur l'activité des extraits méthanoliques	48
XVI	Croissance de la souche P ₁ D ₇ sur différents milieux de culture après 7jours	51
XVII	Croissance de la souche P ₁ D ₇ sur différents milieux de culture après 14jours	51
XVIII	Croissance de la souche P ₂ D ₁₆ sur différents milieux de culture après 7jours	52
XIX	Croissance de la souche P ₂ D ₁₆ sur différents milieux de culture après 14jours	52
XX	Analyse des constituants cellulaires pariétaux de la souche P ₁ D ₇ , par CCM.	54
XXI	Analyse des constituants cellulaires pariétaux de la souche P ₂ D ₁₆ , par CCM	54
XXII	Détermination de la température optimale des souches P ₁ D ₇ et P ₂ D ₁₆	56
XXIII	Dégradation des sucres par les souches P ₁ D ₇ et P ₂ D ₁₆	56
XXIV	Dégradation des acides aminés par les souches P ₁ D ₇ et P ₂ D ₁₆	57
XXV	Production de quelques enzymes par les souches P ₁ D ₇ et P ₂ D ₁₆ .	57
XXVI	Détermination des pH optimaux des deux souches.	58
XXVII	Détermination de la concentration optimale en NaCl des deux souches	58
XXVIII	Croissance des souches P ₁ D ₇ et P ₂ D ₁₆ en présence de certains composés chimiques	59

XXIX	Tests de sensibilité des souches aux différentes familles d'antibiotiques	60
XXX	Analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P ₁ D ₇	66
XXXI	Analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P ₂ D ₁₆	67
XXXII	Analyse statistique de l'effet de la concentration de la caséine sur la production de l'antifongique de P ₁ D ₇	71
XXXIII	Analyse statistique de l'effet de la concentration de la caséine sur la production de l'antifongique de P ₂ D ₁₆	72
XXXIV	Analyse statistique de l'effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P ₁ D ₇ .	76
XXXV	Analyse statistique de l'effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P ₂ D ₁₆	77

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie théorique

Chapitre I /Généralités sur les actinomycètes

1. Définition.....3
2. Ecologie.....3
3. Taxonomie et critères de classification3
4. Cycle du développement des actinomycètes6
5. Importance des actinomycètes 7
6. Métabolismes des actinomycètes8

Chapitre II : Principales caractéristiques des antifongiques

1. Définition 11
2. Historique 11
3. Classification des antifongiques selon l'origine et la structure..... 12
4. Mode d'action 15
5. Effets post-antifongiques..... 16
6. Techniques d'étude et de caractérisation d'un antifongique 16

Partie pratique

Matériel et méthodes

I) Criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques

A) Origine des souches 19

B) Méthode de purification et de conservation..... 19

✓ Les souches 19
✓ Méthode de purification 19
✓ Méthode de conservation 19

C) Sélection des souches produisant des antifongiques non polyéniques . 19

1. Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieu solide..... 19
2. Production et détection des antibiotiques en milieu liquide 20

II)	Etude des antifongiques produits	
	✚ Extraction des antifongiques par les différents solvants d'extraction .	22
	✚ Détermination du meilleur solvant d'extraction	23
	✚ Détermination du meilleur système de migration.....	23
	✚ Bioautographie.....	24
	✚ Semi-purification des antifongiques et tests d'activité.....	25
	✚ Révélation chimique des antifongiques	25
 III)	 Etude de la stabilité des molécules brutes actives	
	▪ Effet du pH	27
	▪ Effet des détergents	27
	▪ Effet de la température	27
	▪ Effet de la durée de conservation	27
 IV)	 Etude taxonomique des souches sélectionnées	
	1. Etude Morphologique	28
	2. Etude Chimiotaxonomique.....	28
	✓ Obtention de la biomasse	29
	✓ Analyses des acides aminés.....	29
	✓ Analyse des sucres pariétaux.....	30
	3. Etude physiologique	31
	• Production de pigments mélanoides	31
	• Production de nitrate réductase.....	31
	• Utilisation des composés glucidiques	31
	• Utilisation des acides aminés.....	31
	• Sensibilité à divers agents physiques et chimiques	32
 V)	 Cinétique de production des antifongiques non polyéniques et Optimisation de la composition du meilleur milieu de production	
	▪ Choix du meilleur milieu de production	33
	▪ Cinétique de la croissance sur les différents milieux	33
	▪ Cinétique de production de l'antifongique.....	33
	▪ Evolution du pH	33
	▪ Détermination des concentrations optimales de la source d'azote et de carbone	34
	▪	

Résultats et discussion

D) Criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques 35

C) Sélection des souches produisant des antifongiques non polyéniques ..37

1. Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieu solide.....	18
2. Production et détection des antibiotiques en milieu liquide	19
II) Etude des antifongiques produits	
✚ Détermination du meilleur solvant d'extraction	39
✚ Détermination du meilleur système de migration.....	41
✚ Semi-purification des antifongiques et tests d'activité.....	42
✚ Révélation chimique des antifongiques	43
III) Etude de la stabilité des molécules brutes actives	
▪ Effet du pH	45
▪ Effet des détergents	46
▪ Effet de la température	47
▪ Effet de la durée de conservation	48
IV) Etude taxonomique des souches sélectionnées	
Etude Morphologique.....	50
Etude Chimiotaxonomique.....	53
Etude physiologique	55
V) Cinétique de production des antifongiques non polyéniques et Optimisation de la composition du meilleur milieu de production	
▪ Choix du meilleur milieu de production	61
▪ Détermination des concentrations optimales de la source d'azote et de carbone	67
Conclusion et perspectives	78
Références bibliographiques	80
Annexes	

«Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte»

Louis Pasteur (1822-1895)

INTRODUCTION

ANNEXES

RESULTATS
ET
DISCUSSION

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

MATERIEL
ET
METHODES

Dans les années soixante dix, la lutte contre les maladies infectieuses était pratiquement à son apogée. Estimant que leur arsenal thérapeutique était suffisant et que les besoins du marché étaient comblés, de nombreuses firmes pharmaceutiques ont orienté leurs travaux vers la recherche de médicaments autres que les antimicrobiens, tel que les analgésiques, les vasodilatateurs, les anti-inflammatoires, etc. Dix années après, avec la résurgence des maladies infectieuses déjà connues (paludisme, tuberculose, fièvre jaune, choléra, méningite, etc.), l'apparition de nouvelles autres encore plus mortelles (sida, grippe aviaire, etc.) et le phénomène de multirésistance microbienne, l'industrie pharmaceutique s'est tournée de nouveau vers la recherche d'antibiotiques innovants. Cette nouveauté se traduit du point de vue structure chimique, mécanisme d'action ou activité biologique intrinsèque intéressante (Barrett, 2002).

L'origine de ces molécules, peut être naturelle, semi-synthétique ou synthétique. Ainsi, depuis le début des années quatre vingt dix, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de découvrir et de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques, aussi bien pour la médecine humaine et vétérinaire que pour l'agriculture (Donadio *et al.*, 2002). Sachant que le milieu naturel est à l'origine d'environ 70% des médicaments et des anti-infectieux actuels (Newman *et al.*, 2003), les antibiotiques naturels sont produits en majorité par les microorganismes qui ont été la source de nombreuses molécules utilisées en thérapeutique humaine (pénicilline, érythromycine, vancomycine, streptomycine, amphotéricine, etc.) (Mc Manus *et al.*, 2002). Parmi ces microorganismes, les actinomycètes, sont les plus grands producteurs de substances antimicrobiennes.

Les *Streptomyces* sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005), (Smaoui 2010). Mais le nombre d'antifongiques existant est très inférieur par rapport à celui des antibiotiques. En plus, ceux qui existent déjà sur le marché ne réunissent pas les critères définissant l'antifongique idéal.

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

seules les substances à action spécifiquement pariétale devraient présenter moins de toxicité pour l'homme (Benallaoua *et al.*, 1990).

Plusieurs travaux ont été menés pour augmenter la production de métabolites d'intérêts à partir du genre *Streptomyces*. Il a été démontré l'importance majeure et l'implication de l'influence des conditions de culture de la bactérie productrice sur la production du ou des métabolites recherchés (Smaoui 2010).

Afin de mettre en évidence, éventuellement, de nouvelles molécules actives vis-à-vis d'un certains nombre de microorganismes choisis pour leur caractères pathogène pour, l'étude a, également, porté sur des souches faisant partie de la collection de souches du laboratoire de biochimie microbienne de l'université de Béjaia. La première partie du travail (bibliographique) concerne : L'écologie, l'importance et la systématique des actinomycètes. Ainsi qu'un aperçu sur les antibiotiques et d'autres métabolites secondaires synthétisés par les actinomycètes.

La deuxième partie (expérimentale) concerne :

- Criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non polyéniques ;
- Essai de caractérisation chimique des extraits bruts actifs ;
- Etude de la stabilité de ces molécules ;
- Etude taxonomique des souches productrices ;
- Essai d'optimisation des milieux de culture permettant la production de ces substances.

1. Définition

Les actinomycètes sont des bactéries Gram + avec une proportion de G+C élevée (>55 mol %) formant des colonies à la morphologie complexe, (Colombié, 2005). Ils comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat (nourricier), surmonté par un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) qui leur confère un aspect fongique d'où l'expression "ray fungi" ou "champignons rayonnants", utilisée parfois entre 1930 et 1960 (Iamari, 2006).

2. Ecologie

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (Larpen et Sanglier, 1989). La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre, etc.) et dans des zones géographiques variées : l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts (Lacey, 1997). Ils sont généralement saprophytes (genre *Frankia*). Certains sont pathogènes pour l'homme (*Mycobacterium tuberculosis*), d'autres pour les animaux (*Actinomyces bovis*) ou pour les végétaux (*Streptomyces scabies*, agent de la galle de la pomme de terre) (Loria, 1986).

3. Taxonomie et critères de classification

3.1. Systématique des actinomycètes

Les actinomycètes sont rattachés au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae* et à l'ordre des *Actinomycetales* créé par Buchanan en 1917 (Bergey's manual, 2007).

Le phylum *Actinobacteria* tel qu'il figure dans le **Bergey's manual** (2007) renferme une seule classe : *Actinobacteria*, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces. Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, allant de 51% chez certaines *Corynebactéries*, à plus de 70% chez les genres *Streptomyces* et *Frankia*, (Ventura *et al.*, 2007) et présentent une grande différenciation quand au développement de leur cycle de vie.

3.2. Critères actuels d'identification

- **Caractères morphologiques**

Badji (2006) rapporte que les caractères morphologiques importants ont trait à la présence, le type (fragmenté ou pas) et la couleur du mycélium aérien (MA) et /ou du substat (MS), la présence ou non de sporophores sur le mycélium, la présence ou non de sporanges, de sclérotés ou de synnemata, la présence de spores, leur forme, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes et leur nombre et enfin, la production et la couleur des pigments solubles sécrétés (PS). Parfois, il est possible de classer une souche dans un genre donné en se basant sur des critères micromorphologiques tout à fait évidents et particuliers comme par exemple pour les genres : *Micromonospora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc.

- **Critères chimiques**

Si pour certains genres, les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, la grande majorité par contre (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Nocordioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Soccharothrix*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, etc.) nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires (Boudjella, 2007).

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

Becker et al., (1965), **Yamaguchi** (1965) et **Lechevalier et Lechevalier** (1970) divisèrent les actinomycètes en chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires .

- **Composition pariétale en acides aminés**

La présence de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) est l'une des propriétés les plus importantes de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif et des actinomycètes. Si le DAP est présent, les bactéries contiennent généralement l'un des isomères : la forme LL ou la forme *meso* (DL) selon les genres.

Chez quelques actinomycètes, le DAP peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (Becker et al., 1965).

- **Composition cellulaire en sucres**

Sur la base de la composition des cellules en acides aminés et en sucres, plusieurs chimiotypes ont ainsi été définis:

Tableau I : Différents Chimiotypes de la paroi (Larpent, 2000).

Type	Genres
Type I : LL- DAP, Glycine	<i>Streptomyces, Streptoverticillium, Nocardioides, Intrasporangium, Kineosporia, Sporichthya, Arachnia, Pimelobacter</i>
Type II : meso DAP, Glycine, arabinos	<i>Micromonospora, Glycomyces, Actinoplanètes (Actinoplane Ampullariella, Catellatospora, Dactylosporangium, Pilimelia)</i>
Type III : meso DAP, Galactose	<i>Thermomonospora, Spirillospora, Thermoactinomyces, Nocardiosis, Streptosporangium, Geodermatophilus, Microtetraspora, Brevibacterium, Dermatophilus, Frankia, Maduromycètes (Actinomadura, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Streptosporangium, Saccharothrix, Streptoalloteichus, Nocardia, Corynebacterium, Mycobacterium, Actinobispora, Caseobacter, Rhodococcus</i>
Type IV : meso DAP, Arabinose, Galactose	<i>Kibdelosporangium, Actinopolyspora, Amycolata, Amycolatopsis, Saccharopolyspora, Kibdelosporangium, Pseudonocardia, Saccharomonospora.</i>
Type V : Lysine, Ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
Type VI : Lysine, Acide aspartique	<i>Actinomyces bovis, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Arcanobacterium</i>
Type VII : DAB Glycine, Lysine (+/-)	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
Type VIII : Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

Toutes les parois contiennent les molécules suivantes : glucosamine, acide muramique, alanine, acide glutamique.

DAP : acide diaminopimélique

DAB : aide diaminobutyrique

- **Composition en lipides**

L'analyse des lipides est un autre élément qui, tout comme le type de paroi cellulaire, fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne. En effet, une classe de lipides terpéniques, les quinones respiratoires ou isopréniques, ont un potentiel considérable comme marqueurs taxonomiques. Il existe 2 genres majeurs de quinones respiratoires chez les bactéries soit les ménaquinones (mieux connues sous le nom de vitamine K2) et les ubiquinones (aussi appelées coenzyme Q). La classification bactérienne repose donc sur les degrés de saturation et la longueur de leurs chaînes latérales (Harvey, 1999).

- **Les phospholipides :**

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

- **Les ménaquinones :**

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

3.3.Critères physiologiques

La détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc.).

3.4.Critères moléculaires

D'après **Euzeby**, (2002), nous pouvons citer l'hybridation ADN-ADN (Wayne *et al.*, 1987), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S par la méthode de Stackebrandt *et al.* (1981 et 1983) et le pourcentage GC% (Stackebrandt *et al.*, 1981b). Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes

4. Cycle de développement des actinomycètes

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes possèdent un cycle de vie qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (Danilenko *et al.*, 2005).

Sur un milieu solide, les spores d'actinomycètes produisent un ou plusieurs mycéliums de substrats (MS), ramifié et non fragmenté, suite à la germination d'une spore et se développent par croissance apicale (Figure 1).

En réponse à certains signaux, le mycélium aérien émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif tels que l'ADN, les protéines ainsi que des composés stockés résultants de la lyse du MS (Ou *et al.*, 2008).

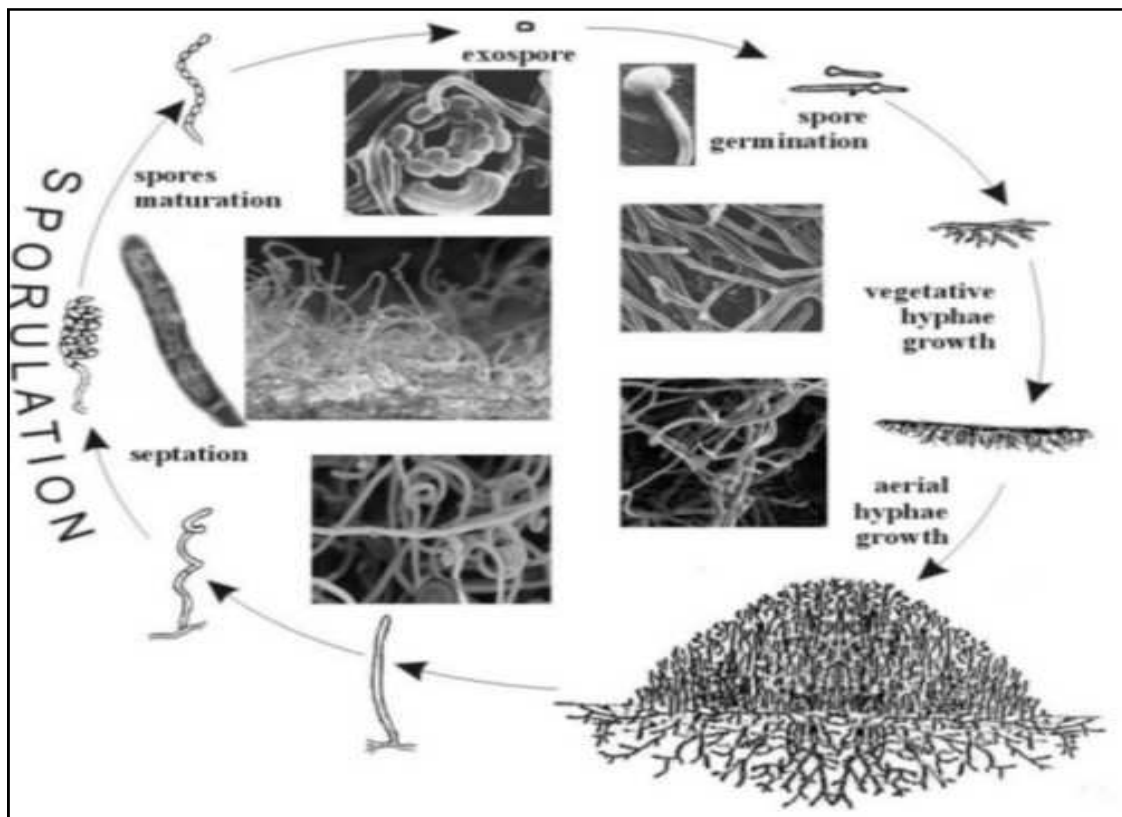


Figure 1: Cycle biologique d'un Streptomyète (Jakimowicz, 2007)

5. Importance des actinomycètes

La principale raison derrière l'engouement pour les actinomycètes vient du fait qu'ils possèdent des rôles importants dans le sol et dans les interactions avec les plantes, (Conn, 2005), mais également pour la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique.

Il a été estimé que sur 16500 antibiotiques connus, 8700 (53%) sont produits par les actinomycètes dont 6550 (40%) par des espèces de *Streptomyces* (Choulet, 2006).

En plus de la production d'antibiotiques, les actinomycètes produisent un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activités, tels que des inhibiteurs d'enzymes, immunosuppresseurs, toxines et pesticides (Dairi, 2005 ; Pizzul, 2006).

✓ **Dans les domaines médical, vétérinaire et industriel**

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).

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

✓ **Dans le domaine agronomique**

En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, ils sont vitaux pour le recyclage des nutriments et comptent parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en bioremédiation, capable de dégrader des composés organiques complexes tels que la chitine (Zaitlin et Watson, 2006) et grâce à un potentiel enzymatique riche ainsi que des spores résistantes à la dessiccation (Pizzul, 2006). Ils ont la possibilité de s'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire. Ils sont aussi capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes (El-Shatoury *et al.*, 2004).

Le genre *Frankia* est également très important pour un bon nombre de plantes, provoquant des nodulations aux racines permettant ainsi la fixation de l'azote par la plante hôte (Zaitlin et Watson, 2006).

6. Le métabolisme des actinomycètes

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une extraordinaire diversité de structures et d'activités biologiques (Choulet, 2006).

Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux

métabolites bioactifs (Theilleux, 1993). En effet, la streptomycine fut le premier antibiotique ayant pour origine une souche de *Streptomyces*.

D'après Tarkka et Hampp (2008), les métabolites secondaires des Streptomycètes peuvent être séparés en quatre classes distinctes en fonction de leur activité biologique :

- ✓ Agents antagonistes, comportant des antibiotiques, des antifongiques, des antiprotozoaires et même des antiviraux.
- ✓ Agents pharmacologiques tels que des antitumoraux et des inhibiteurs d'enzymes;
- ✓ Agents agrobiologiques tels que des pesticides et des herbicides ;
- ✓ Composés à activité régulatrice, tels que des facteurs de croissance.

Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien (Theilleux, 1993).

La diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* est due à leur génome de grande taille qui renferme des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes, leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (Singh *et al.*, 2006).

6.1. Le métabolisme primaire

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

6.2. Le métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (Theilleux, 1993). De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas des fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (Colombié, 2005).

❖ Les enzymes

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

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

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

❖ Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire (Coates et Hu, 2007).

Sur 8100 molécules qui ont été recensées vers la fin de l'année 1999, 45,6% ont été produites par le genre *Streptomyces*, 16,0% par des actinomycètes autres que *Streptomyces*, 16,9% par d'autres bactéries et 21,5% par des champignons. En plus du nombre important de ces molécules, un autre aspect impressionnant des antibiotiques est la diversité de leurs structures chimiques. (Demain et Lancini, 2006).

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

1. 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).

2. Historique

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

La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée dans la figure ci-après (Figure 2).

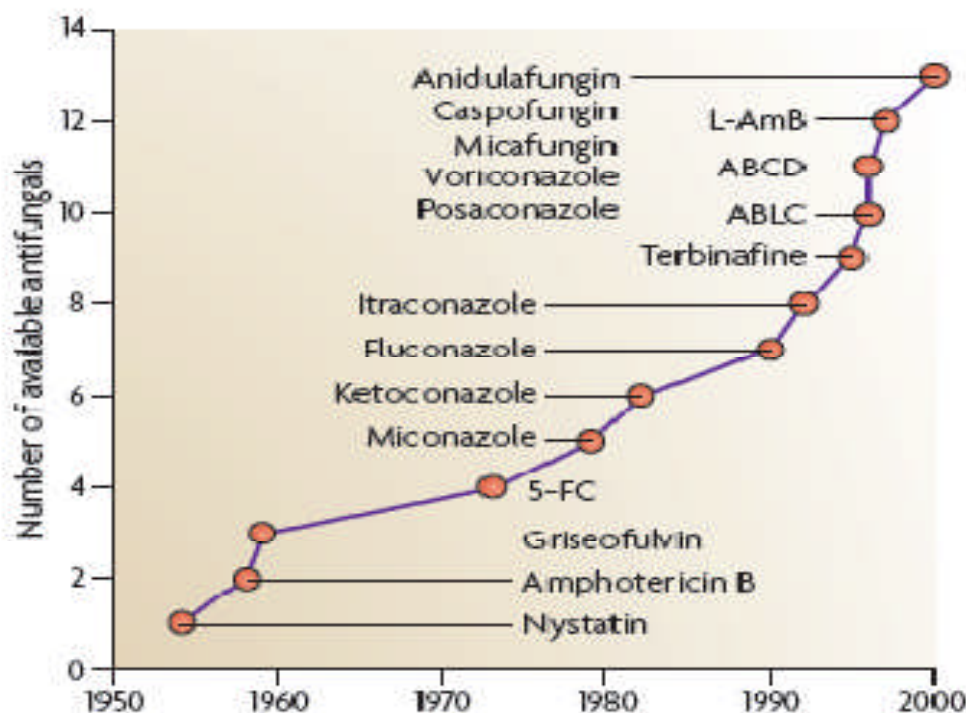


Figure 2: Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques. (Ostrosky-zeichner *et al.*, 2010).

3. Classification des antifongiques selon l'origine et la structure

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008).

3.1. Antifongiques de synthèse chimique

A. Les azolés

Les dérivés azolés sont les antifongiques les plus utilisés en clinique. Pour cette raison, ils sont les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leurs propriétés pharmacologiques et de leur mode d'action, que des stratégies de défense adoptées par les micro-organismes.

Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Vandeputte, 2008).

B. Les fluoropyrimidines

Les fluoropyrimidines, dont les seuls représentants actuellement utilisés chez l'homme sont la 5-fluorocytosine (5-FC) et le 5-fluorouracile (5-FU). Ce sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine (Vandeputte, 2008).

3.2. Antifongiques naturels

A. Les polyènes

Les polyènes sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. La plupart sont constitués d'un cycle macrolactone de 20 à 40 atomes de carbone sur lequel est branché un groupement D-mycosamine. Leur caractère amphotère est lié au regroupement de plusieurs doubles liaisons conjuguées (d'où leur nom de "polyène") sur une face du cycle macrolactone, qui est donc hydrophobe, et de groupements hydroxyles sur l'autre face, qui est hydrophile (Vandeputte, 2008).

Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B, la nystatine et la natamycine (figure 3) (Vandeputte, 2008).

Les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques de structure non polyénique pouvant être souvent antibactériens (Berdy *et al.*, 1987).

Bien que les polyènes puissent être synthétisés chimiquement, ils sont encore produits aujourd'hui, pour des raisons économiques, à partir de cultures de *Streptomyces* spp. (Vandeputte, 2008).

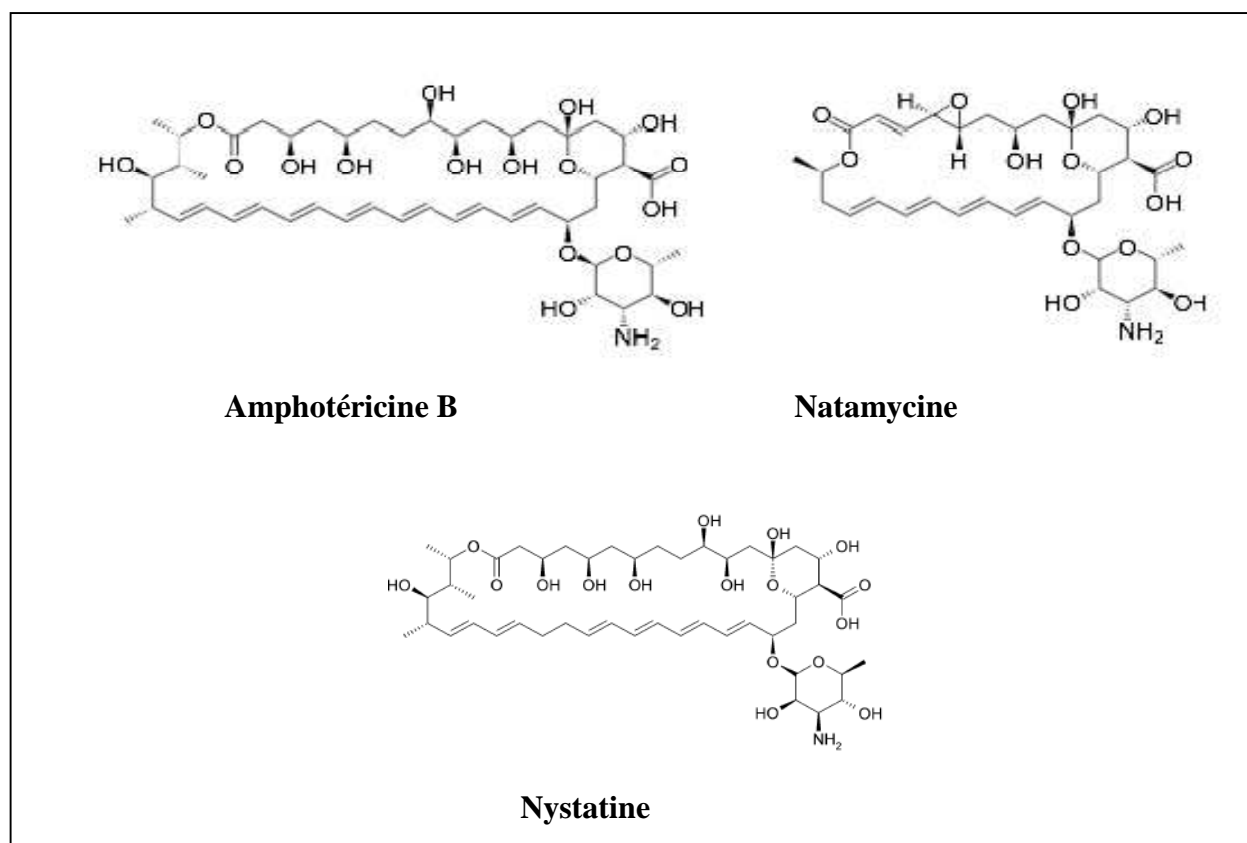


Figure 3: structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs (Vandeputte, 2008).

B. Les échinocandines

Parmi les échinocandines, on peut citer la caspofungine. Cette substance est issue d'un produit de fermentation de *Glarea lozoyensis*. Cette molécule est le premier d'une nouvelle classe d'antifongiques : les inhibiteurs de la synthèse du β (1,3) D-glucan, composant essentiel à la paroi cellulaire de plusieurs champignons pathogènes (Carle *et al.*; 2003).

Trois molécules sont actuellement disponibles ou en cours de développement : la caspofungine, anidulafungine et micafungine (Rautemaa *et al.*, 2008).

C. Les antifongiques non polyéniques

Les réactions secondaires et une certaine toxicité liée à la structure polyénique des antifongiques ont conduit à la recherche de nouveaux antibiotiques avec en priorité la production de dérivés de structure non polyénique (Benallaoua *et al.*, 1990).

Les antifongiques non polyéniques ont des structures assez variées. Ils sont moins importants en thérapie que les polyènes sauf pour quelques uns comme les aminoglycosides (kasugamycine), les quinones (anthracyclines), les hétérocycles azolés (blasticidine), les

aromatiques (griséofulvine), les composés alicycliques (cycloheximide). Leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans l'agriculture est parfois courante (Zitouni, 1995).

Leur spectre UV- visible est très variable mais en aucun cas ils ne présentent les trois pics caractéristiques des polyènes (Martin, 1979), (Badji, 2006).

Les antifongiques de structure non-polyénique sont surtout représentés par la griséofulvine, active sur les dermatophytes. D'autres substances non-polyéniques, telles que le cycloheximide, l'azalomycine F ou la saramycétine n'ont que des applications limitées (Rudzit 1978), (Bastide *et al.*, 1986).

4. Mode d'action des antifongiques

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

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

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

5. Effets post-antifongiques

L'utilisation des antifongiques entraîne des conséquences plus au moins considérables. Les azolés ont des effets secondaires qui peuvent être non négligeables comme une diminution de la synthèse de testostérone ou des glucocorticoïdes et des atteintes hépatiques ou gastro-intestinales sévères (Pont *et al.*, 1982; Lewis *et al.*, 1984). Enfin, de nombreuses interactions médicamenteuses ont été rapportées. C'est pour ces raisons que les triazolés ont fait leur apparition.

Les fluoropyrimidines ont des effets secondaires qui sont le plus souvent négligeables, bien que des effets plus graves, se traduisant par une hépatotoxicité et une atteinte de la moelle osseuse (Stamm *et al.*, 1987 ; Francis et Walsh, 1992; Kauffman et Frame, 1997 ; Vermes *et al.*, 2000b), puissent survenir. De façon surprenante, ces effets secondaires sont identiques à ceux observés lors d'une administration de 5-FU, bien que l'homme ne possède pas de cytosine désaminase, l'enzyme responsable de la conversion de la 5-FC en 5-FU au sein de la cellule fongique (Diasio *et al.* 1978 ; Williams *et al.*, 1981). Des travaux suggèrent que la flore intestinale serait responsable de cette conversion et à l'origine des effets secondaires graves de la 5-Fluorocytosine (Harris *et al.*, 1986), (Vandeputte, 2008).

6. Techniques d'étude et de caractérisation d'un antifongique

❖ 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).

❖ 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.

• 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 (100 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 (Dy尼亚 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 (CH₃, CH₂, CH, OH, NH₂, CHO, COOH, etc.), d'aromatiques, etc. Et ce, à l'aide de tables de corrélations (Williams et Fleming, 1989).

✓ Spectrophotométrie 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).

I) Criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques

A) Origine des souches

Les souches d'actinomycètes appartiennent à la collection du laboratoire de biochimie microbienne. Celles-ci ont été isolées en 2009.

Ces isolats d'actinomycètes proviennent des échantillons de sols de la décharge de Boulimat (site P1 et P2) ainsi qu'au niveau de la région de Boussaâda (site PB).

B) Méthode de purification et de conservation

✓ **Méthode de purification**

L'ensemencement des souches s'est effectué par la méthode de stries serrées à la surface de la gélose Williams (M_2), l'incubation est faite à 28°C pour une durée de 8 jours. Les colonies d'actinomycètes sont reprises sur le même milieu, jusqu'à obtention de souches pures exemptes de toutes contaminations aussi bien bactérienne que fongique. La composition des milieux de culture est donnée en annexes.

✓ **Méthode de conservation**

Les souches ainsi purifiées sont conservées dans des tubes de gélose inclinée contenant le milieu M_2 , à 4°C en plusieurs exemplaires pour une utilisation ultérieure.

C) Sélection des souches produisant des antifongiques non polyéniques

1. Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieu solide

L'activité antifongique des souches est évaluée par la méthode des cylindres d'agar.

▪ **Technique des cylindres d'agar**

Cette méthode consiste à ensemercer les souches à tester sur milieu M_2 en stries très serrées, puis à les incuber pendant 10 jours à 28°C. Au bout de l'incubation, des cylindres de gélose de 6mm de diamètres sont découpés stérilement à partir de ce milieu, et déposés à la surface du milieu à l'extrait de malt préalablement ensemençé par le germe cible à raison de 10^7 spores/ml. Les boîtes ensemençées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant

momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h d'incubation à 28°C à l'aide d'un pied à coulisse (Bastide *et al.*, 1986).

▪ **Microorganismes cibles**

Dans le but d'effectuer un criblage préliminaire, les isolats conservés ont été repris et testés pour leurs activités antifongiques vis-à-vis des microorganismes cibles de référence obtenus gracieusement de l'ENS de Kouba d'Alger et de l'université de Boumerdès.

Les germes cibles sont :

Aspergillus carbonarius (A731C)

Aspergillus niger (2CA936)

Aspergillus flavus (NRRL)

Aspergillus parasiticus(CB5)

Aspergillus ochraceus (NRRL3174)

Aspergillus flavus producteur d'aflatoxine B1(391)

Aspergillus flavus producteur d'aflatoxine B1(B3)

▪ **Standardisation de l'inoculum**

La méthode de standardisation des germes cibles utilisée est celle des suspensions dilutions ; accompagnée d'une mesure de la densité optique à différentes longueurs d'onde selon le germe étudié, (DO = 0,5) de la solution mère sur un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini. 1240) suivie par un dénombrement sur cellule de Malassez (suspensions de spores). La charge de l'inoculum utilisée est de 10⁷ spores /ml (Matan and Matan, 2008).

2. Production et détection des antibiotiques en milieu liquide

Cette étude est réalisée uniquement pour les souches sélectionnées par le test sur milieu solide, en égard à leur activité antagoniste vis-à-vis des germes cibles. Pour chaque souche, une préculture est préparée dans des tubes à essai contenant 3 ml de milieu Williams (M₂). Cette préculture sert à ensemercer 100 ml du même milieu liquide contenu dans des flacons de capacité de 500 ml. L'incubation à lieu à 28°C sous agitation permanente à 250 rpm. La durée d'incubation est de 10 jours.

Après incubation, les filtrats de culture sont extraits avec du butanol pour pouvoir sélectionner les polyènes des non polyènes.

▪ **Détection des antifongiques non polyéniques par Spectroscopie UV- visible**

L'étude spectroscopique permettant la distinction entre les polyènes et les non polyènes a été employée par plusieurs auteurs. Les polyènes présentent des spectres caractérisés par une série de pics entre 260 - 405 nm (Bastide *et al.*, 1986).

L'étude spectroscopique dans l'UV- visible permet d'avoir un aperçu sur la nature chimique des produits extraits. Pour cela, 40 ml de filtrat de culture de chacune des souches, sont extraits avec du n-butanol, vu qu'il extrait bien les polyènes (Iamari, 2006). Les extraits butanoliques sont évaporés à sec puis repris dans 5 ml de méthanol.

Les extraits sont solubilisés dans du méthanol pur puis analysés par le spectrophotomètre (Shimadzu UV 1800) précédemment étalonnés avec du méthanol.

II) Etude des antifongiques produits

Après avoir choisi les souches produisant des antifongiques non polyéniques, des cultures liquides sont réalisées afin de mieux étudier ces molécules.

1. Extraction des antifongiques par les différents solvants d'extraction

❖ A partir du filtrat de culture

Après avoir réalisé des cultures liquides sur Erlenmeyers pour chaque souche et obtenu le filtrat de culture, une extraction par des solvants organiques de différentes polarités est effectuée.

Cette première expérience nous permet de connaître le meilleur solvant d'extraction. Cinq solvants de polarité croissante sont utilisés ; le n-hexane, le benzène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Pour cela 100 ml de filtrat de culture sont extraits par le même volume de solvant à l'aide d'une ampoule à décanter, à température ambiante. La phase organique est récupérée séparément, filtrée sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau, puis évaporée sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est récupéré dans 1 ml de méthanol (Augustine *et al.* 2005).

Il est à signaler qu'ils ne seront testés que les phases organiques de chaque extraction et que les antibiotiques produits peuvent être extraits à partir du mycélium et/ou du filtrat de culture.

❖ A partir du mycélium

Le mycélium est récupéré après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation à 3000 g pour se débarrasser des impuretés et autres résidus du milieu. Le culot mycélien est égoutté, récupéré dans une fiole et immergé dans du méthanol (50 mg de mycélium dans 1 ml de méthanol). Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2h de manière à assurer une homogénéisation convenable (à température ambiante). L'extrait méthanolique est ensuite récupéré par filtration sous vide puis concentré à sec à 40°C à l'aide d'un Rotavapor. Le résidu sec est, enfin, repris dans 5ml de méthanol, stérilisé par filtration (filtre millipore 0,45µm) et ce, afin de tester son activité par antibiographie.

2. Détermination du meilleur solvant d'extraction

L'activité inhibitrice des différentes phases organiques obtenues est testée par antibiographie (méthode des puits). Le méthanol 95% est utilisé comme témoin négatif.

La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des puits après 24 à 48h d'incubation.

Le solvant donnant une zone d'inhibition meilleure, sera considéré comme étant le meilleur solvant d'extraction.

▪ Technique des puits

Un aliquote de 100 µl de chaque extrait est introduit dans des puits de 6 mm de diamètre, dans la gélose à l'extrait de malt préalablementensemencée avec le germe cible le plus sensible (10^7 spores /ml). Les diamètres des zones d'inhibition seront alors mesurés à l'aide d'un « pied à coulisse ».

3. Détermination du meilleur système de migration (Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM))

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

▪ Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice sont préparées en mélangeant 50 g de silice et 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 250 ml. Après une agitation manuelle vigoureuse, le gel obtenu est étalé de manière régulière et uniforme sur des plaques en verre (20 x 20 cm) à l'aide d'un étaloir de Desaga sous forme de fine couche (0,25mm). Les plaques sont par la suite, séchées durant une nuit à 37°C et régénérées à 105°C pendant 30 minutes à 1heure avant utilisation.

▪ Développement des plaques et sélection du système d'élution

A l'aide d'une micropipette, les extraits des différents solvants (30µl) sont déposés sous forme de spots sur les plaques (Boudjella, 2007). Ces dernières sont placées dans des cuves chromatographiques dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec l'un des systèmes de solvants suivants :

Tableau III: Différents systèmes solvants utilisés pour la migration des antifongiques

Système solvant	rapport (v/v/v)	référence
n- Butanol - Acide acétique - Eau (B.A.E)	(60 : 20 : 20)	Boudjella, 2007
Acétate d'éthyle – Méthanol(A.M)	(100 : 15)	Boudjella, 2007
Ethanol -Ammoniaque - Eau (E.A.E)	(80 :10 :10), (90 :5 :5), (60 :20 :20) et (40 :30 :30).	Boudjella, 2007
Acétonitrile – Eau (AN.E)	(30 : 70), (50 : 50) et (90 :10)	Boudjella, 2007, Hozzein <i>et al</i> , 2011
Hexane- Dichlorométhane – Méthanol	(70 :30 :4)	lamari, 2006
Acétone	(100)	Jois <i>et al.</i> , 1986
Chloroforme – Méthanol	(18 :1) et (9 :1)	Jois <i>et al.</i> , 1986
Acétate d'éthyle	(100)	Jois <i>et al.</i> , 1986
Heptane – Acétate d'éthyle	(3 :2)	Hozzein <i>et al</i> , 2011

Après développement, les plaques sont mises à sécher durant toute une nuit dans le but d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du microorganisme test lors de la bioautographie. Une fois séchées, les plaques sont observées sous lumière UV afin de localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 366 nm.

4. Bioautographie

Les plaques sont placées sur un support en verre dans une boîte en polyéthylène (22 x 24 cm). A la base de la boîte, une feuille de papier filtre imbibées d'environ 30 ml d'eau stérile afin de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est stérilisé durant 1 h sous UV à 254 nm. Un volume de 50 ml de gélose à l'extrait de malt molle (semi solide) en surfusion est inoculée avec 1ml de la suspension de germe cible contenant 10^7 UFC/ml (DO= 0,5). Ce milieu est réparti de façon homogène et uniforme avec une pipette stérile sur les plaques (Betina, 1973).

Après solidification, la boîte est mise à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion de (s) substance (s) antibiotique (s) dans le milieu puis incubée à 28°C.

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

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

5. Semi-purification des antifongiques

Les antibiotiques sont semi-purifiés sur couche épaisse de gel de silice (0,5 mm d'épaisseur) par chromatographie préparative et ce, dans le but d'avoir des quantités suffisantes d'antibiotiques pour les études ultérieures.

Un volume de 250 à 400 µl de chaque extrait concentré sont déposés 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 bandes actives (une bioautographie est toujours réalisée en parallèle). Une fois la migration terminée, la silice correspondant aux zones actives est alors grattée. Les antibiotiques sont récupérés dans 100 à 200 ml de méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice est par la suite éliminée après filtration (Lamari, 2006).

Le filtrat méthanolique limpide est recueillie et son activité est contrôlée par antibiographie, puis conservé dans un congélateur pour des utilisations ultérieures.

6. Révélation chimique des antifongiques

Après avoir sélectionné le meilleur système de migration et déterminé les Rf des différentes tâches d'extraits bruts ; d'autres plaques sont développées dans les mêmes conditions. Celles-ci vont servir à des révélations chimiques.

Les surfaces des plaques sont alors pulvérisées avec les différents révélateurs chimiques. Les taches apparaissent soit à froid, soit après un chauffage de 5 à 10 min à 100°C (Merck, 1975). Les différents révélateurs utilisés sont représentés dans le tableau ci-après:

Tableau IV : Révélateurs chimiques et composés révélés (Badji, 2006).

Révélateurs	Composés révélés
Anisaldéhyde- H_2SO_4	Glucides, stéroïdes, terpènes
Chlorure de fer ferrique ($FeCl_3$)	Phénols, acides hydroxamiques
Formaldéhyde- H_2SO_4	Aromatiques polycycliques
Ninhydrine	Amines, aminoacides, osamines
Vaniline- H_2SO_4	Alcools supérieurs, stéroïdes, huiles étherées
diphénylamine-aniline	Glucides
Le réactif de Tollens	Substances réductrices

La composition et le mode d'utilisation de ces révélateurs sont donnés en annexe

III) Etude de la stabilité des antifongiques

Après l'extraction et la semi-purification des fractions actives, il est indispensable d'étudier la stabilité de ces dernières en fonction de certains critères physicochimiques (pH, températures, ...etc.). Après chaque test, l'activité est testée par la méthode des puits sur le germe cible le plus sensible. Les résultats obtenus sont comparés à ceux des témoins n'ayant pas subi l'action de ces agents.

1. Effet du pH

Des fractions de l'extrait brut des cultures sont ajustées à des pH allant de 3 à 11. Après incubation pendant 24h à 25°C, les fractions sont neutralisées à pH 7. Une fraction à pH 7 est utilisée comme témoin (Badji *et al.*., 2006).

2. Effet de la température

D'autres fractions des extraits bruts à pH 7 ont subi de différents traitements thermiques : 60 min à 60 °C, 45 min à 80 °C et 30 min à 100 °C. Après refroidissement, leurs activités sont testées. Une fraction non traitée (à 25°C) est utilisée comme témoin. (Badji *et al.*, 2006). L'effet de la congélation (-20° pendant 24h) (Kitouni, 2007) ainsi que celui de l'autoclavage sont testés (Osman, 2004).

3. Effet des détergents

L'effet du Tween 20, Tween 80, Triton X-100, sodium dodecyl sulphate (SDS) sur les antifongiques est testé. Les détergents sont dissouts dans de l'eau distillée à raison de 0,01 g/ml.

Un volume de 100µl de l'extrait brut est mélangé avec 100µl des solutions des détergents puis incubés pendant 6 h à 30°C. Les solutions des différents détergents seules, sont utilisées comme témoins afin de vérifier l'effet de chaque détergent sur le germe cible (Augustine 2005).

4. Effet de la durée de conservation

L'effet de la durée de conservation sur l'activité des antifongiques est déterminé par la conservation de ces derniers à 4°C pendant 5 mois. Après conservation, 100 µl des extraits conservés sont testés à l'égard du germe cible (Augustine 2005).

IV) Etude taxonomique des souches sélectionnées

L'étude taxonomique a été réalisée sur des souches sélectionnées sur la base de leur activité antagoniste vis-à-vis des moisissures testées.

1. Etude des caractères morphologiques

Est basée sur les caractères culturels des colonies (croissance, couleur des mycéliums aériens et de substrat) et la micromorphologie qui consiste en l'étude de la forme et de la taille des spores. Cette étude consiste à noter, au 7^{ème} et 14^{ème} jour d'incubation à 28°C, la croissance des souches d'actinomycètes, l'aspect et la couleur des mycéliums, la production et la couleur des pigments diffusibles sur différents milieux de culture (ISP₁, ISP₂, ISP₃...ISP₉) et la gélose à l'extrait de malt, gélose nutritive, milieu GYEA et Bennett (Shirling et Gottlieb, 1966), (Smaoui, 2010).

1.1. Macromorphologie.

Cette étude consiste à déterminer la couleur des mycéliums aériens et de substrat ainsi que les pigments solubles produits sur les différents milieux de culture préconisés par l'«International *Streptomyces* Project » ou ISP (ISP₁, ISP₂, ISP₃, ISP₄, ISP₇) (Shirling et Gottlieb, 1966), ainsi que le milieu GYEA (Athalye *et al.*, 1981). (La composition de ces milieux est donnée en annexe).

1.2. Micromorphologie

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique (Optika) à deux grossissements (x400 et x100) après 7 à 14 jours d'incubation. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation du mycélium du substrat (Williams *et al.*, 1989).

2. Analyse des constituants cellulaires et / ou pariétaux

L'étude chimique est un bon critère de distinction des différents groupes d'actinomycètes (Iamari, 2006). Cette analyse consiste à déterminer d'une part l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) (LL ou DL = méso), la présence ou non de la glycine qui sont des composés présents au niveau des parois cellulaires des actinomycètes et de l'autre part, la composition de ces derniers en sucre.

2.1. Obtention de la biomasse

Les isolats sélectionnés et retenus pour la suite de l'étude sont ensemencés dans des tubes contenant 10 ml de milieu Williams liquide modifié et incubés sous agitation à 28°C pendant 10 à 14 jours, le mycélium est récupéré par filtration, lavé à l'eau distillée puis séché.

2.2. Détermination des acides aminés pariétaux

Elle consiste en la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) et de rapporter la présence ou l'absence de la glycine.

Deux méthodes sont utilisées, celle de **Becker et al.** (1964) et celle de **Staneck et Roberts** modifiée (1974) qui consistent en une hydrolyse cellulaire à chaud en présence de l'acide chlorhydrique selon le protocole suivant :

- ✓ 10 mg du mycélium sec de chaque isolat d'actinomycète sont hydrolysés pendant 18 h à 100°C par 1 ml de HCl 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés ;
- ✓ Les hydrolysats sont recueillis après filtration sur membrane en verre ou sur du papier Whatman N°1 puis concentrés à sec à l'aide d'un bain de sable à chaud;
- ✓ Des lavages répétés à l'eau distillée sont effectués jusqu'à l'élimination totale de l'HCL ;
- ✓ Le résidu sec est finalement repris dans 0,3 ml d'eau distillée puis analysé par chromatographie.

Analyse chromatographique des hydrolysats

La méthode de **Becker et al.**, (1964) et celle de **Staneck et Roberts** modifiée (1974) diffèrent entre elles, par le type de migration du chromatogramme.

Les acides aminés pariétaux sont déterminés par chromatographie descendante à front perdu sur papier pour la méthode de **Becker et al** (1964), et par une chromatographie ascendante sur papier pour la méthode de **Staneck et Roberts** modifiée (1974) ;

- 15 µl de chaque hydrolysat cellulaire sont déposés sur des plaques de gel de silice ;
- 10 µl de solution aqueuse standard de l'acide diaminopimélique (DAP) contenant les deux isomères LL et DL (0,01M), de glycine et de la lysine (0,2% w/v) ;
- Un développement des plaques CCM en utilisant le système solvant méthanol-eau distillée-acide chlorhydrique-pyridine (40/13/2/5v/v), (Awa, 2005).

• Séchage des plaques à température ambiante puis une révélation à l'aide d'une solution de ninhydrine à 0,2% (w/v dans de l'acétone), suivie d'un chauffage à 100°C pendant 5 min, où les taches de DAP apparaissent de couleur brun olive virant au jaune vif. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL ; par contre la glycine et la lysine apparaissent de couleur violette et migrent plus rapidement que les isomères de l'acide diaminopimelique (DAP).

2.3. Caractérisation des sucres cellulaires

Les méthodes de caractérisation des sucres utilisées sont celles de **Lechevalier et Lechevalier (1970)** et **Staneck et Roberts (1974)**.

Comme pour la caractérisation des acides aminés pariétaux, les deux techniques se différencient par le type de migration du chromatogramme à savoir, la chromatographie descendante à front perdu pour la méthode de Lechevalier et Lechevalier et la chromatographie ascendante pour la méthode de Staneck et Roberts. Elles consistent à caractériser les sucres cellulaires après une hydrolyse ménagée avec du H₂SO₄.

▪ 50 mg de mycélium sec sont hydrolysés par 1 ml d'acide sulfurique 1N (dans des tubes à vis hermétiquement scellés) pendant 2 h à 100°C ;

▪ Les hydrolysats acides sont neutralisés avec une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de Baryum jusqu'à obtention d'un pH neutre, le précipité blanc formé est éliminé par centrifugation à 4000 tr/min durant 20 min.

▪ Le surnagent est recueilli, évaporé à sec et le résidu final obtenu est dissout dans 0,3 ml d'eau distillée puis analysé par CCM.

Analyse chromatographique des hydrolysats

- ✓ 20 µl de chaque hydrolysat sont déposés sur une plaque CCM, de même que 15 µl de chaque solution aqueuse standard des sucres suivants : glucose, galactose, arabinose, ribose, mannose, rhamnose, xylose.
- ✓ Les plaques CCM sont développées dans un système de solvant composé par la partie supérieure : d'un mélange de *n*-butanol-eau distillée-pyridine-toluène (10/6/6/1 v/v/v/v).
- ✓ Après séchage à température ambiante, la révélation est effectuée à l'aide d'une solution de diphénylamine –aniline, après un chauffage de 5 min à 100°C, les taches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et violettes à bleues pour les hexoses.

3. Etude des caractères physiologiques

Une série de tests physiologiques a été réalisée pour la différenciation des espèces d'actinomycètes. Les tests effectués sont cités ci-dessous. Les méthodes ainsi que la composition des milieux de culture utilisés sont détaillés en annexe.

3.1. Production de pigments mélanoïdes.

La production de pigments mélanoïdes par les isolats est observée sur milieu gélosé ISP7 dont le virage, du milieu, au brun marron est reconnaissable (Shirling et Gottlieb, 1966).

3.2. Production de nitrate réductase.

Le test de nitrate réductase est effectué sur bouillon nitraté (Marchal *et al.*, 1987). La réduction des nitrates est constatée par la mise en évidence des nitrites formés à l'aide du réactif de Griess. La lecture s'effectue après 7 à 10 jours d'incubation en ajoutant quelques gouttes de ce dernier au bouillon. Le test positif se manifeste par l'apparition d'un halo de couleur rouge.

3.3. Tests de dégradation des composés glucidiques

Cette étude est réalisée sur milieu ISP9 par **Shirling et Gottlieb**, (1966). Les sources de carbone testées sont : D-glucose, arabinose, fructose, Sorbitol, cellobiose, glycérol, galactose, lactose, maltose, mannitol, ribose, raffinose, Inositol, rhamnose, Lévulose saccharose, Tréhalose, xylose et mannose. Les solutions à 1% sont stérilisées séparément puis ajoutés aux milieux lors de la préparation.

Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant du glucose sert de témoin positif (Smaoui, 2010).

3.4. Utilisation des acides aminés.

Les acides aminés sont ajoutés au milieu ISP9 à raison de 1%. Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des acides aminés ou en leur absence (témoin négatif) (Gordon *et al.*, 1974).

Autres tests sont réalisés et qui sont les suivants :

- Hydrolyse de l'amidon (Marchal *et al.*, 1987),
- Hydrolyse de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974)

- Hydrolyse du tween 80 (Sierra, 1957).
- Utilisation des sels de sodium : Acétate, citrate, tartrate et oxalate (Gordon *et al.*, 1974).

3.5. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Pour évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis de certains composés, à des concentrations définies, certains tests préconisés dans la taxonomie des actinomycètes (Athalye *et al.*, 1985) sont choisis à savoir :

- **Sensibilité à l'azide de sodium** (à 0,001 et 0,01%) et au phénol (à 0,05 et 0,1%). Le milieu de base utilisé est le GYEA (Athalye *et al.*, 1985).
- **Sensibilité aux pH** : allant de 5 à 11 sur le milieu M₂.
- **Croissance a différentes températures** : 12, 20, 30, 37, 40, 45 et 50°C sur milieu Williams solide (Boudjella, 2007).
- **Sensibilité à différentes concentrations de NaCl** sur milieu M₂ à savoir : 0, 5, 7 et 10% de NaCl.
- **La sensibilité au phénol (0,005%)**, (Athalye *et al.*, 1985).
- **La sensibilité au Tellurite de potassium (0,01% et 0,05%)** sur milieu GYEA et Williams solides (Athalye *et al.*, 1985).
- **Sensibilité aux antibiotiques** : Les antibiotiques testés sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau VI: Antibiotiques testés à l'égard des souches d'actinomycètes

Antibiotiques	Charge (µg)	familles
Ticarcilline (TIC)	75	B-lactamines
Gentamicine (CN)	15	Aminosides
Acide nalidixique (NA)	30	Quinolones
Colistine (CS)	50	polypeptides
Amikacine (AK)	10	Aminosides
Trimethoprime-sulfamethoxazole (SXT)	1,25 + 23,75	Sulfamides

V) Cinétique de production des antifongiques non polyéniques et Optimisation de la composition du meilleur milieu de production

Les souches d'actinomycètes ayant montré une activité antibiotique intéressante lors des tests précédents, sont retenues pour l'étude des antibiotiques qu'elles synthétisent.

1. Choix du meilleur milieu de production

Pour déterminer le meilleur milieu de culture menant à une production acceptable d'antibiotiques en un temps optimal, nous avons comparé la production d'antibiotiques dans quatre milieux contenant diverses sources de carbone, d'azote et de sels minéraux. L'expérience a été menée sur les milieux suivants: milieux synthétiques à base de glucose (MSG), à base d'amidon (MSA), ou bien à base d'amidon et de l'extrait de levure (MSAE) (Zitouni, 2005) et le milieu M₂ (la composition de ces milieux est donnée en annexe).

Le pH a été ajusté à 7,2. Les expériences sont menées sur milieux liquides. Des précultures sont préalablement préparées à partir de cultures d'actinomycètes poussant sur milieu solide M₂. Les spores sont ainsi récupérées en surface et inoculées dans des tubes à essais contenant chacun 3 ml de milieu liquide. Les suspensions sont incubées à 28°C durant 3 jours. Un seul tube (meilleure croissance) servira à ensemercer 50 ml du même milieu liquide contenu dans des flacons de 250 ml. Ces derniers sont incubés 14 jours à 28°C dans un bain-marie agitateur.

2. Evolution du pH, de la croissance et de production des antifongiques sur les différents milieux

L'évolution du pH du milieu est suivie quotidiennement. Parallèlement, l'évolution de la biomasse durant la fermentation est suivie par mesure du poids sec selon la méthode de Pfefferle *et al.* (2000), (Iamari, 2006). Pour cela 1 ml de culture sont prélevés tous les jours et centrifugés à 7000 g/ 15 minute dans des tubes eppendorffs préalablement tarés. Le culot est lavé par centrifugation à deux reprises avec de l'eau distillée puis les eppendorffs sont incubés à 100°C durant 24 h puis pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare.

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des puits. Pour cela, le germe cible est ensemercé dans le milieu M₂ semi solide (12 g/l d'agar) maintenu en surfusion à 45°C, lequel est coulé par la suite dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre. Après solidification, des puits de 10 mm de diamètre sont creusés dans la gélose. Chaque puit reçoit 0,2 ml de filtrat de culture (prélevé quotidiennement). Les boîtes sont

mises à 4°C pendant 2 h pour puis incubées à 28°C pendant 24 à 36 h. Les diamètres d'inhibition autour des disques sont alors mesurés.

3. Détermination des concentrations optimales des sources d'azote et de carbone.

Différentes concentrations de la source de carbone (amidon) ainsi que la source d'azote (caséine) ont été évaluées en milieu M₂. Ce test a pour but de déterminer les meilleures concentrations des deux éléments qui permettent une meilleure croissance et de production des antifongiques des souches étudiées.

Une cinétique de croissance et de production des antifongiques ainsi qu'un suivi du pH sont réalisés pour les différents milieux. Il est à signaler, qu'on fait varier une seule concentration à la fois.

Les différentes concentrations en source d'azote ainsi que la source de carbone sont représentées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau V : Composition des différents milieux de culture testés

Milieu	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Caséine (g/l)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Amidon (g/l)	10	10	10	10	10	2	4	6	8	10

Analyse statistique

Les résultats de ce chapitre fait l'objet d'une analyse statistique avec le logiciel **XLSTAT – CCR 2011.4**. L'analyse de la variance (ANOVA) avec un risque d'erreur de 5%, sera utilisée pour l'interprétation de nos résultats.

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et les discussions des Cinq parties de ce travail, relatifs au criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques, l'étude des antifongiques produits, l'étude de la stabilité de ces derniers, l'étude taxonomique des souches productrices de ces substances et enfin, la cinétique de production des antifongiques non polyéniques et l'essai d'optimisation du milieu de production.

I) Criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques

1. Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieu solide

Au total, 23 souches présentant une morphologie caractéristique des actinomycètes ont été obtenues à partir de 03 prélèvements : le sol de la décharge de Boulimat (site P₁ et P₂) ainsi qu'un sol de Boussaâda a M'sila (site P_B). Ces souches appartiennent à la collection du laboratoire de Biochimie Microbienne.

Les résultats des tests des cylindres d'agar des souches d'actinomycètes sont illustrés dans la **figure 4**.

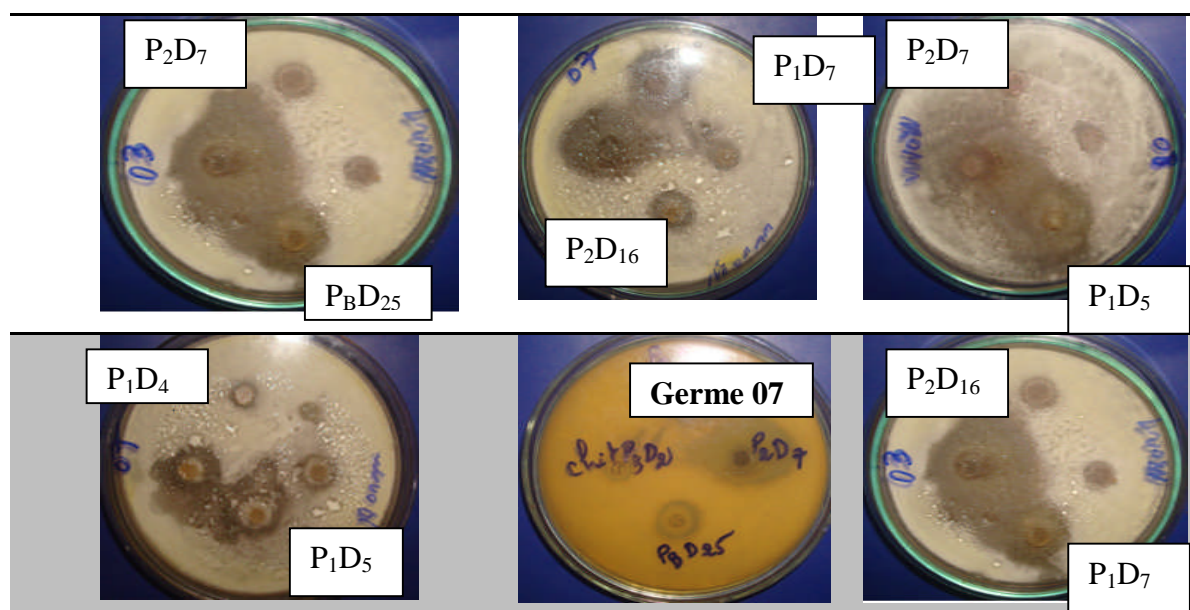


Figure 4: Illustration du test des cylindres d'agar de souches d'actinomycètes vis-à-vis des germes cibles sur gélose à l'extrait de malt

Germe cible (03) : *Aspergillus flavus* (NRRL)

Germe cible (07) : *Aspergillus flavus* producteur d'aflatoxine B1(391)

Germe cible (08) : *Aspergillus flavus* producteur d'aflatoxine B1(B3)

Parmi les souches testées, 15 souches ont présenté une activité antifongique vis-à-vis les champignons filamenteux. Les résultats des tests d'activité sur milieu solide sont rassemblés dans le **tableau VII** ci-après.

A partir de ce tableau, on constate que les zones d'inhibition les plus importantes à l'égard des germes cibles testés sont obtenues avec la souche P₂D₇ et les plus petites sont obtenues avec la souche P₁D₃. On remarque aussi que le germe cible (03) est le plus sensible vis-à-vis des substances synthétisées par les différentes souches d'actinomycètes. Pour cette raison, il ne sera testé que ce germe dans la suite de notre démarche expérimentale.

Tableau VII : Activités des souches d'actinomycètes à l'égard des germes cibles après 24h d'incubation.

Souche test	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	Germe cible (03)	Germe cible (07)	Germe cible (08)
P _B D ₁₆	16	14	18
P _B D ₂₀	16	13	18
P ₁ D ₈	20	/	/
P ₁ D ₇	12	14	22
P ₁ D ₄	26	18	09
P _B D ₅	14	15,5	16
P _B D ₂	/	12	/
P ₁ D ₃	/	10	11
P _B D _{20'}	14	20	12
P ₂ D ₇	35	30	36
P ₁ D ₅	11	23	16
P _B D ₂₅	20	17	24
P _B D ₁₈	/	17	12
P ₂ D ₁₆	20	20	09
Chit P _B D ₂	10	16	10

Selon le diamètre des zones d'inhibition ainsi que les spectres d'activité, le test a révélé que les souches P₁D₄, P₁D₇, P₂D₇, P₂D₁₆, P_BD₅, P_BD₁₆, P_BD₂₀, P_BD_{20'} et P_BD₂₅ présentent une activité antifongique importante. D'où l'intérêt de réaliser des cultures liquides pour ces dernières, afin de sélectionner les souches productrices des antifongiques non polyéniques.

2. Production et détection des antibiotiques en milieu liquide

Des cultures liquides des neuf souches sélectionnées a partir du test précédent ont été réalisées. Les filtrats des cultures ont subi une extraction par le butanol pour pouvoir déceler les antifongiques polyéniques des non polyéniques.

▪ **Détection des antifongiques non polyéniques par Spectroscopie UV- visible**

Vu que le butanol est un solvant qui extrait les polyènes, nous avons réalisé une analyse spectrale afin de savoir si ces composés sont présents dans les phases butanoliques brutes des souches testées. Les extraits butanoliques sont vaporisés à sec puis solubilisés dans du méthanol puis analysés par un spectrophotomètre UV, précédemment étalonnés avec du méthanol.

Le spectre UV-visible est déterminé entre (190 - 500 nm) sur les extraits butanoliques bruts, afin de noter la présence ou l'absence de composés polyéniques lesquels présentent 3 pics caractéristiques à chaque type de polyènes. A titre d'exemple, les Triènes : le premier pic apparaît à une longueur d'onde de 283 nm, le second à 272 nm et le troisième à 262 nm (Iamari, 2006 et Boudjella, 2007).

Dans **la figure 5** suivante, nous présentons quelques spectres UV-visible des phases butanoliques brutes des deux souches testées, obtenus lors de la réalisation de ce test.

A partir des spectres UV-visible, on constate que, seuls les extraits butanoliques des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ ne contiennent pas des pics caractéristiques des antifongiques polyéniques. La première souche présente un pic à 275 nm et la deuxième souche, le présente à 215nm. De ce fait, ces deux souches feront l'objet de notre étude concernant la nature des substances produites, leurs stabilités ainsi que l'identification des souches productrices.

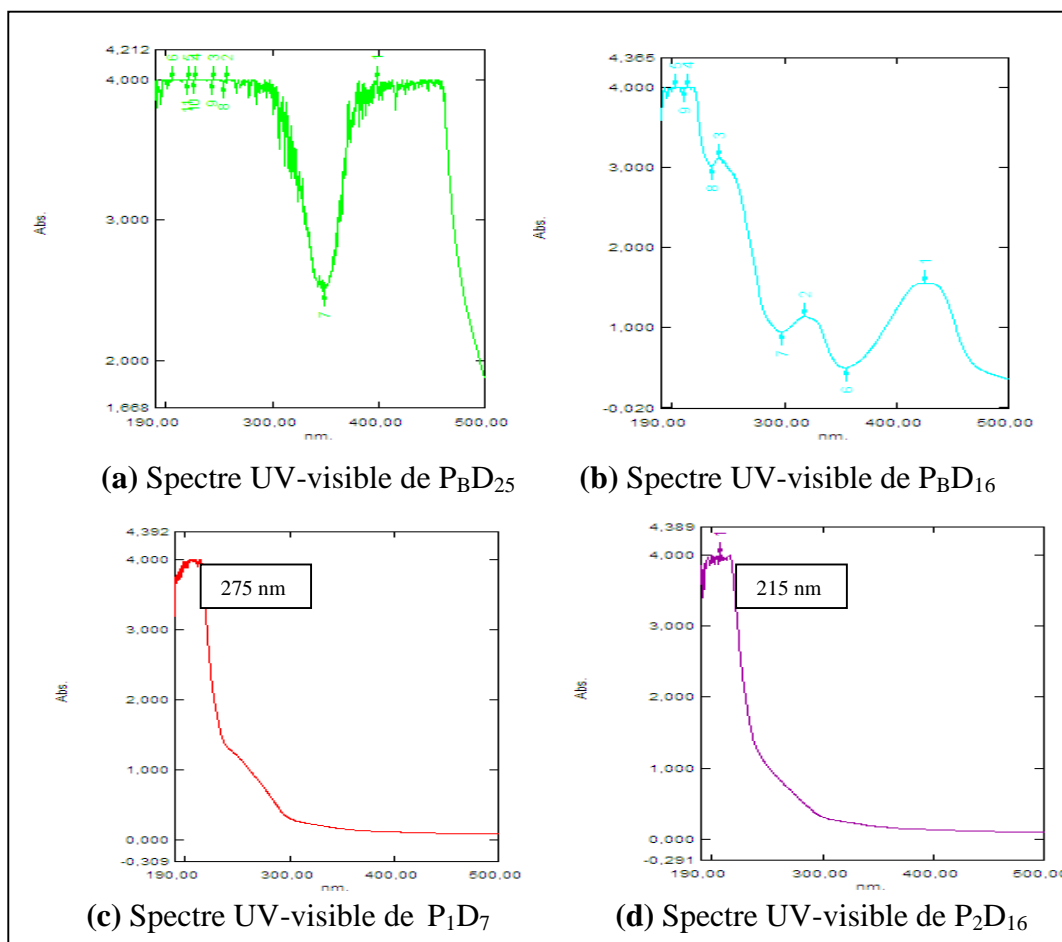


Figure 5 : Spectres UV-visible des extraits butanoliques bruts des filtrats de culture de quelques souches d'actinomycètes.

II) Etude des antifongiques non polyéniques produits

Des cultures liquides sont réalisées pour les souches produisant des antifongiques non polyéniques (P₁D₇ et P₂D₁₆).

1. Détermination du meilleur solvant d'extraction

Afin de mieux étudier ces molécules, les filtrats des cultures ont été extraits par cinq solvants d'extraction de polarité différente. L'activité de chaque extrait est testée par antibiographie sur les six germes cibles. Les résultats de ce test sont représentés dans les figures 6 et 7 :

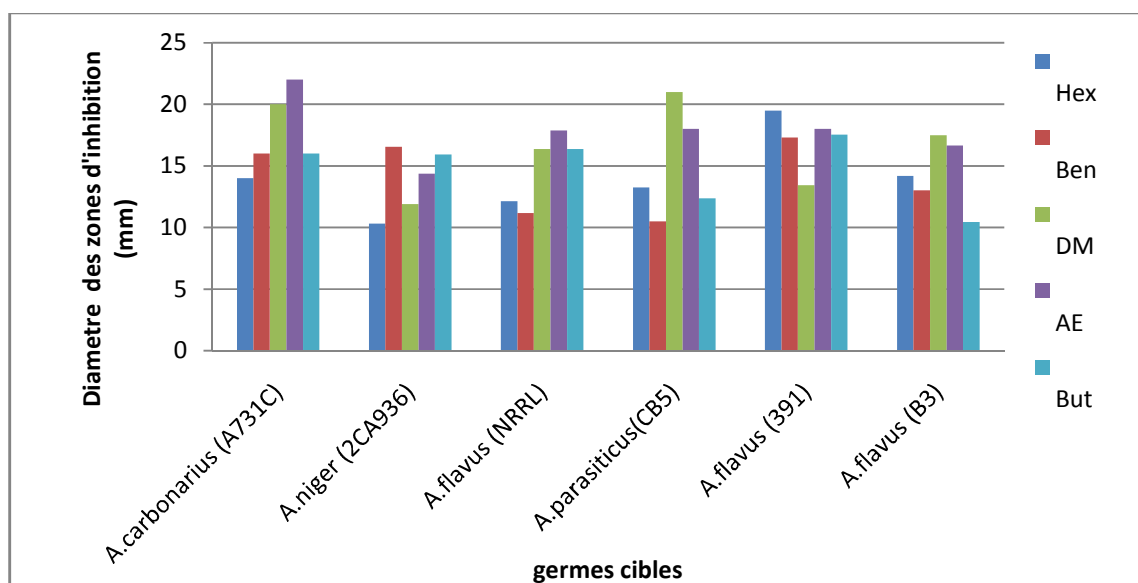


Figure 6: Diamètre des zones d'inhibition de l'antifongique de P₁D₇ extraits avec les différents solvants après 24h d'incubation.

Il est à signaler que les extraits méthanoliques des mycéliums des deux souches n'ont présenté aucune activité. Donc, on ne s'intéressera dans le reste de notre travail qu'aux surnageants des cultures des deux souches.

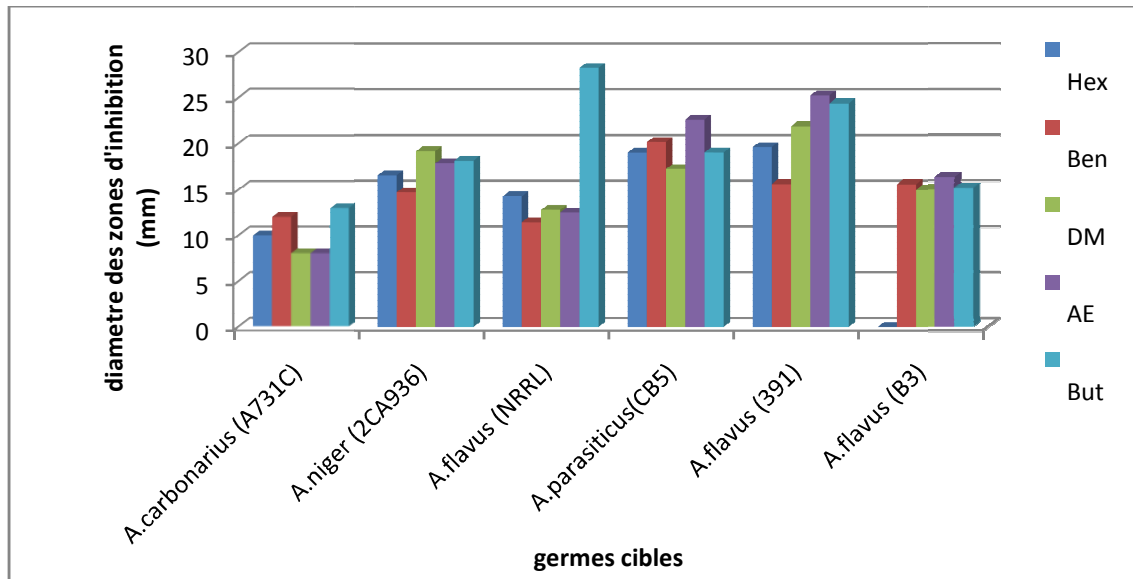


Figure 7: Diamètre des zones d'inhibition de l'antifongique de P₂D₁₆ extrait avec les différents solvants après 24h d'incubation.

A partir des histogrammes précédents (figures 6 et 7), on constate que le meilleur solvant d'extraction pour la souche P₁D₇ est l'acétate d'éthyle. Par contre celui de P₂D₁₆, est le butanol. Sachant que les cinq solvants testés ont tous permis l'extraction des activités antifongiques, ce qui suppose que les activités mesurées par antibiographie sont dues à un grand nombre de molécules ayant des structures différentes (polaires, de polarité moyenne ou apolaires).

Selon Franco et Countinho, (1991) cité par **Augustine et al.**, (2005), la plupart des antifongiques connus à ce jour, sont surtout extraits par l'acétate d'éthyle. Du même point de vue, Remya et Vijayakumar, (2008) cité par **Oskay**, (2011) rapportent que l'acétate d'éthyle est le meilleur extracteur des molécules antibactériennes et antifongiques de la souche *Streptomyces* RM42. Ahmed (2007) cité par **Hozzein et al.**, (2011), rapporte aussi que l'activité antimicrobienne de *Streptomyces violachromogenes* est mieux extraite avec ce même solvant.

Il est à signaler aussi que de nombreux travaux ont confirmé l'efficacité du butanol par rapport aux autres solvants, entre autres, celui réalisé par **Boudjella et al.**, (2006) sur le genre *Streptosporangium* qui indique, clairement, que le solvant le plus approprié pour l'extraction des substances actives était le *n*-butanol. **Zitouni et al.**, (2005), ont aussi obtenu des taux d'extraction importants avec le *n*-butanol et le dichlorométhane sur le genre *Saccharothrix*. Par contre, pour le genre *Nocardioopsis*, le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle étaient les plus efficaces.

2. Détermination du meilleur système de migration

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

La détection du meilleur système de migration se fait grâce à la visualisation sous UV et les résultats des chromatogrammes élués par les différents systèmes de migration sont représentés dans le **tableau VIII** suivant :

Tableau VIII: Rapports frontaux des différents systèmes éluants des CCM

Système	Rapport frontal (Rf)	
	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
Acétate d'Ethyle/Méthanol	Pas de migration	Pas de migration
EAE (8/1/1)	0,11	Pas de migration
Acétonitrile/eau (50/50)	Pas de migration	Pas de migration
Acétonitrile/eau (70/30)	0,66	0,70
Acétonitrile/eau (90/10)	0,70	0,80

La visualisation sous UV (à 254 nm) et la détection des molécules fluorescentes (à 365 nm) des chromatogrammes des extraits bruts développés sur les différents systèmes de solvants, révèle que celui qui permet une bonne séparation des bandes est le système Acétonitrile/eau (90/10) et ce, pour les deux souches.

3. Bioautographie

Après avoir sélectionné les solvants d'extraction ayant permis une meilleure récupération des activités antifongiques par antibiographie, et avoir procédé au choix du système d'éluion qui permet une bonne séparation des substances présentes dans les extraits bruts à savoir l'Acétonitrile/Eau (90/10 v/v). Les antibiotiques sont détectés sur ces mêmes plaques par bioautographie contre le germe cible le plus sensible qui est le germe cible (*A. flavus* NRRL).

Bien que la migration des substances soit bonne, il a été néanmoins impossible de distinguer l'activité antifongique des extraits vis-à-vis du germe cible utilisé et cela malgré le nombre de répétition (4).

Cela, s'explique très probablement, par la faible quantité d'antibiotiques produite. En effet, la production a été réalisée dans un volume de 100 ml seulement et une bonne partie des substances actives a été perdue durant les étapes successives d'extraction.

4. Semi-purification des antifongiques non polyéniques

Un volume de 400 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 au préalable, afin de localiser avec précision les bandes actives.

Après migration et grattage des différentes bandes séparément, le contenu des taches actives révélées par UV à 254 nm sont dissoutes dans 1ml de méthanol. Après une centrifugation à 5000 rpm pendant 15 minutes, la silice est éliminée et la solution en conséquence est testée pour sa contenance des biomolécules.

Les rapports frontaux des taches actives détectées par UV ainsi que les résultats des tests d'activité de ces derniers sont représentés dans les **tableaux IX** et **X** respectivement.

Tableau IX: Rapports frontaux des taches actives des deux souches

Souche	Rapport frontal (Rf)
P₁D₇	0,95
P₂D₁₆	0,93

Tableau X: Résultat du Test d'activité des extraits semi purifiés

Diamètre des la zone d'inhibition (mm)	
P₁D₇	P₂D₁₆
16	11

A partir de ces tableau, on constate que l'Acétonitrile/eau avec un rapport de 90/10 n'a permis d'avoir qu'une seule tache pour les deux extraits. Le résultat du test d'activité confirme l'existence des molécules antifongiques dans le surnageant des taches grattées. Mais avec une diminution des diamètres d'inhibition. Cela, peut être expliqué par la faible concentration de l'antifongique existante dans les taches récupérées.

5. Révélation chimique des antifongiques

Suite à la sélection du meilleur système de migration, d'autres plaques de gel de silice sont développées dans les mêmes conditions dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des antibiotiques produits. La surface des plaques est alors pulvérisée avec différents révélateurs chimiques (Merck, 1975). Les résultats de ce test sont regroupés dans le **tableau XI** ci-après :

Tableau XI: Révélation chimique des taches activités produites

Élément révélé	Couleur de la tache	Rapport frontal (Rf)	
		P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
Sucre	Grise	0,79	0,64
Substances réductrices	Grise	0,42	
	Violette		0,29
Alcools supérieurs /stéroïdes/huiles éthers	Grise	0,80	
Acides aminés	Néant		
Phénols et acides hydroxamiques	Néant		

▪ Révélation chimique des activités antimicrobiennes produites par P₁D₇

Des révélations positives ont été obtenues avec le diphénylamine-aniline ; la vanilline – H₂SO₄ et le réactif de Tollens.

Ces résultats suggèrent que l'extrait contient un ou plusieurs sucres. La présence d'alcools supérieurs, stéroïdes, d'huiles éthers ou de substances réductrices n'est pas exclue. En revanche, cela suppose l'absence de phénols et d'acides hydroxamiques.

Nous remarquons que certaines tâches de même Rf (rapport frontal) ont été révélées positivement à la fois avec la vanilline (alcool supérieurs, stéroïdes ou huiles éthers) et avec le diphénylamine-aniline (glucides). Ce résultat peut être expliqué par l'appartenance de ces molécules à la famille des polyéthers comme rapporté par certains auteurs (Dembitsky, 2005).

Selon **Liu et al.**, (1978), ces molécules constituent une large classe d'antibiotiques comportant un grand nombre de composés découverts depuis la mise en évidence de la nigéricine en 1951. Jusqu'en 1980, une soixantaine d'antibiotiques polyéthers ont été mis en évidence (Westley et al., 1981).

Les antibiotiques polyéthers sont des métabolites d'origine microbienne, produits largement par le genre *Streptomyces* mais également par d'autres genres d'actinomycètes tels que : *Streptoverticillium* (Cassinelli *et al.*, 1967).

▪ **Révélation chimique des activités antimicrobiennes produites par P₂D₁₆**

Des révélations positives ont été obtenues uniquement avec le diphénylamine-aniline et le réactif de Tollens.

Cela suggère que l'extrait butanolique de cette souche contient un ou plusieurs sucres ainsi que des substances réductrices. A ce stade, nous pouvons déduire l'absence des composés ayant des fonctions alcool supérieurs, stéroïdes ou huiles éthers (révélées par la vanilline-H₂SO₄) et de composés de phénols et acides hydroxamiques (révélés par le FeCl₃).

El sheekh, (2006) rapporte que la molécule active de *Nostoc muscorum* ne contient ni sucre, ni protéine ou phosphore. Il est évident que cette dernière ne fait pas partie des macrolides ni des tétracyclines.

Il est évident que les hypothèses avancées sur les éventuelles structures chimiques doivent être confirmées par des tests complémentaires indispensables ; notamment : la purification des substances actives et leur caractérisation par différentes méthodes (bioautographie, HPLC, RMN, IR, spectroscopie de masse...etc.).

Après avoir eu une idée sur la structure de ces molécules, il serait évident de tester la stabilité de ces dernières.

III) Etude de la stabilité des antifongiques non polyéniques

Afin de déterminer le degré de stabilité de ces antifongiques dans des conditions hostiles, les effets de quelques paramètres ont été testés. Ces paramètres sont : l'effet du pH, l'effet de la température, l'effet des détergents, et l'effet de la durée de conservation.

1. Effet du pH

Pour déterminer l'effet du pH sur la stabilité de l'antifongique, 1 ml de l'extrait méthanolique sont mélangés avec d'une solution NaOH ou HCl afin d'avoir des pH allant de 3 à 11. Ces solutions sont incubées pendant 24h à température ambiante. Après incubation, les fractions sont neutralisées et l'activité résiduelle de chaque tube est déterminée à l'égard du germe cible *Aspergillus flavus* (NRRL) (Voir tableau XII).

Tableau XII: Effet du pH sur l'activité des extraits méthanoliques

pH	Diamètre des zones d'inhibition (mm)	
	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
03	13,5	14,5
04	10,5	11,3
05	7	9,5
06	18,33	19,8
07	16,7	17,5
08	13,5	15
09	11	13
10	0	0
11	0	0
Témoin à pH 7	16,3	16,9

A partir du tableau précédent, On constate que les extraits sont stables uniquement aux alentours de la neutralité. À des pH supérieurs à 9, les activités sont complètement perdues. Par contre à des pH acides (de 3 à 5), On remarque des diminutions progressives des activités jusqu'à la perte de 50% de leurs activités à pH 5. De ces résultats, on peut déduire que nos

antifongiques perdent 50% de leurs activités à pH 5 et la totalité des activités à des pH alcalins.

Badji et al ., (2006) Ont obtenu les mêmes résultats. Il a été observé que l'antifongique a perdu son activité antifongique à des pH supérieurs à 10 et une diminution de l'activité à des pH acides. Donc l'antifongique produit par *Actinomadura* sp. *AC104* est sensible aux pH alcalins.

Reghioua et al., (2008) ont constaté que les molécules antibactériennes du mycélium sont actives à des pH allant de 2 à 8. Cette activité est optimale à pH 4 et devient inexistante en milieu très alcalin (pH 9 et 10).

Belkherroubi, (2009) remarque que lorsque le pH de la solution mère d'amphotéricine B varie de 4 à 10,8, l'activité antifongique est maintenue vis-à-vis *Candida albicans*. Par contre à pH 3,8, elle perd 50% de son efficacité.

2. Effet de la température

Afin de déterminer l'effet la température sur nos molécules, des aliquotes de ces dernières sont incubes a différentes températures : -20°C, 60°C, 80°C, 100°C et a 120°C, puis testés sur le germe *Aspergillus flavus* (*NRRL*). Les résultats de ce test sont représentés dans le **tableau XIII**.

Tableau XIII: Effet de la température sur l'activité des extraits méthanoliques

Température	Diamètre des zones d'inhibition (mm)	
	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
-20°C	16,2	15,96
60°C	13,8	11
80°C	12	9,82
100°C	11	9,50
120°C	00	9,60
Témoin à 25°C	16,3	16,9

De ce tableau, on remarque que les extraits méthanoliques des deux souches ne sont pas sensibles à la congélation, mais on remarque une diminution progressive des activités avec l'augmentation de la température jusqu'à sa disparition chez l'extrait méthanolique de la souche P₁D₇.

Il a été également observé que le traitement thermique pendant 30 min à 100°C affecte l'activité antifongique de l'extrait brut d'*Actinomadura sp. AC104*. Il est alors clair que l'antifongique produit par cette souche est sensible à la chaleur (Badji *et al.*; 2006).

Par contre, **Reghioua *et al.***, (2008) constatent que l'extrait méthanolique testé garde son activité après chauffage de 30 min à 50, 70 et à 100°C et même après la congélation à -20°C.

Dans le but de tester la thermostabilité de l'antifongique produit par *Streptomyces sp KEH23*, le surnageant de la culture est traité par la chaleur puis testé à l'égard de *Candida albicans*. L'antifongique a perdu la totalité de son activité après autoclavage (Oskay, 2009).

3. Effet des détergents

La susceptibilité des antifongiques à l'effet dénaturant des détergents, est vérifiée par l'ajout des agents suivants : Tween 20, Tween 80, Triton X-100 et le sodium dodecyl sulphate (SDS). Ces agents sont mélangés avec les solutions antifongiques et après incubation, les activités résiduelles sont testées. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **tableau XIV** suivant :

Tableau XIV: Effet des détergents sur l'activité des extraits méthanoliques

Détergent	Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆	Détergent seul
Tween 20	15,15	14,65	20
Tween 80	18,80	18,08	/
Triton X 100	16,35	16,61	19,90
SDS	28,8	21,6	27,2
Témoin	16,3	16,9	

Les antifongiques seuls montrent des diamètres de zones d'inhibitions de 16 à 17mm. Par contre celles obtenues avec les mélanges "antifongique + détergent" sont comprises entre 14 et 28 mm. L'augmentation de ces zones d'inhibition est due à l'effet additionnel de chaque détergent, sur le germe cible. Il est alors évident que ces détergents n'affectent pas les antifongiques issus des deux souches.

Les travaux d'**Augustine**, (2005) confirment nos résultats. L'antibiotique seul a montré une zone d'inhibition de 16mm de diamètre à l'égard de *Candida albicans* et les zones d'inhibition de l'antibiotique additionné des différents détergents sont comprises entre 15 à 17 mm. Cela, indique que ces détergents n'ont pas d'effet significatif sur la stabilité de cette molécule.

4. Effet de la durée de conservation

L'effet de la durée de conservation de nos molécules antifongiques est déterminé par la conservation de ces dernières à 4°C pendant 5 mois. Après cette période, l'activité des extraits est testée. Après incubation à 28°C, les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau XV** suivant.

Tableau XV: Effet de la durée de conservation sur l'activité des extraits méthanoliques

Temps	Diamètre des zones d'inhibition (mm)	
	P₁D₇	P₂D₁₆
5 mois	15,01	15,5
Témoin	16,3	16,9

A partir de ce tableau, on constate que les diamètres des zones d'inhibition des témoins sont aux alentours de 16mm. Alors que ceux des extraits conservés pendant 5 mois sont au voisinage de 15mm. De la, on peut conclure qu'une conservation à 4°C des extraits méthanoliques des deux souches n'affecte pas leurs activités.

Les mêmes résultats ont été obtenus par **Osman**, (2004). Dans ce cas, les spores d'*Aspergillus flavus* n'ont pas pu croître dans une culture de *Brevibacterium linens* préalablement conservée pendant 3 mois à -18°C, 4°C et 30°C. Ceci indique que

l'antifongique produit, n'est pas affecté par la conservation par congélation, réfrigération ou bien à la température ambiante.

Dans le même sens, l'antibiotique testé par **Augustine**, (2005) est stable pendant 12 mois à 4°C. Il en est de même pour les suspensions de nanoparticules de griséofulvine conservées à 4°C et à 25°C durant 6 mois. Celles-ci, ont pu garder leur activité après cette durée de conservation (Zili *et al* , 2005).

Il est à noter aussi que l'antifongique issu de la culture de *Streptomyces sp KEH23* est stable pendant 12 mois de conservation à 4°C (Oskay, 2009).

Dans le but de tester l'effet de la durée de conservation du miconazole, les résultats obtenus par **Kovács et al.**, (2010) montrent que tout les échantillons sont stables pour une durée de conservation supérieure à 12 mois.

Après avoir sélectionné les souches productrices des antifongiques non polyéniques et avoir étudié ces derniers, il serait impératif d'identifier les germes producteurs de ces substances.

IV) Etude taxonomique des souches d'actinomycètes sélectionnées

1. Etude des caractères morphologiques

Vu l'importance des activités antifongiques des deux souches P₁D₇ et P₂D₁₆, nous nous sommes proposés d'approfondir leur identification. Plusieurs critères classiques sont utilisés dans la classification et l'identification de ces microorganismes qui peuvent être globalement classés en: les critères morphologiques, chimiotaxonomiques et physiologiques.

Cette étude a pour but la détermination de la morphologie, la fragmentation ou non des mycéliums ainsi que les autres caractéristiques de ces germes. Les mycélia des deux souches sont cultivés sur les différents milieux utilisés pour l'étude de la macromorphologie (l'ISP₁, ISP₂, ISP₃, ISP₄, l'ISP₇, GYEA et M₂ solide), puis observées sur boîtes de Pétri sous microscope optique après 7 et 14 jours d'incubation à 28°C.

1.1. Macromorphologie.

D'après les résultats présentés sur les **tableaux XVI et XVII** nous pouvons déduire que:

▪ **La souche P₁D₇** présente une croissance et une sporulation abondantes sur les milieux ISP₃, ISP₄, ISP₅, ISP₇. La croissance est aussi bonne sur M₂ mais avec une faible production de mycélium aérien; elle est par contre très faible sur la gélose nutritive, GYEA et sur le milieu Bennett.

La couleur du mycélium végétatif est globalement jaune et celle du mycélium aérien est généralement grise.

Les milieux ISP₁ et ISP₇, conçus spécialement pour la production des pigments, n'ont pas changé de couleur, ce qui implique que cette souche ne produit pas de pigments mélanoïdes.

Tableau XVI : Croissance de la souche P₁D₇ sur différents milieux de culture après 7jours

Caractère	Souche P ₁ D ₇				
	croissance	Sporulation	MA	MS	PS
ISP ₁	+	-	-	Jaune pale	-
ISP ₂	++	+	Gris	Jaune	-
ISP ₃	+++	+++	Gris foncé	Brun	-
ISP ₄	+++	+++	Gris	Bleu gris	-
ISP ₅	+++	++	Blanc à gris souris	Beige à gris	-
ISP ₇	+++	++	Gris verdâtre	Jaune verdâtre	-
GN	+	-	-	Jaune pale	-
Bennett	+	-	-	Jaune pale	-
GYEA	+	-	-	Jaune pale	-
M ₂	++	Rare	Blanc	Orange brique	-

Tableau XVII: Croissance de la souche P₁D₇ sur différents milieux de culture après 14jours

caractère	P ₁ D ₇				
	Croissance	sporulation	MA	MS	P.S
ISP ₁	+	-	-	Jaune pale	-
ISP ₂	+	+	Gris	Jaune pale à gris	-
ISP ₃	+++	+++	Gris foncé	Gris foncé	-
ISP ₄	+++	+++	Gris foncé	Gris	-
ISP ₅	+++	+++	gris	Gris	-
ISP ₇	+++	+++	Gris	Gris	-
GN	+	+/-	Gris	Jaune pale	-
Bennett	+	-	-	Jaune pale	-
GYEA	+	-	-	Jaune pale	-
M ₂	++	Rare	Blanc	Orange brique	-

NB : Sporulation et croissance +++ : Très bonne ++ : Bonne
 + : Faible - : Absence

Tableau XVIII : Croissance de la souche P₂D₁₆ sur différents milieux de culture après 7jours

caractère	Souche P ₂ D ₁₆				
	croissance	sporulation	MA	MS	P S
ISP ₁	+	-	-	Jaune pale	-
ISP ₂	+	-	-	Jaune avec reflet orangé	-
ISP ₃	+	-	Rose	Rose foncé	-
ISP ₄	++	+	Gris	Rose violacé	-
ISP ₅	+	-	-	Jaune a marron aux bords	-
ISP ₇	+++	++	Blanc	Jaune au centre et orange aux bords	-
GN	+	-	-	Jaune pale	-
Bennett	+	-	-	Orange pale	-
GYEA	+	-	-	Orange pale	-
M ₂	++	+	Gris	Gris	-

Tableau XIX: Croissance de la souche P₂D₁₆ sur différents milieux de culture après 14jours

caractère	P ₂ D ₁₆				
	Croissance	sporulation	MA	MS	P.S
ISP ₁	+	-	-	Jaune pale	-
ISP ₂	+	-	-	Orange pale	-
ISP ₃	+	-	-	Violet	-
ISP ₄	+	+	Gris	Orange violacé	-
ISP ₅	+	-	-	Jaune à marron aux bords	-
ISP ₇	+++	+++	Blanc	Jaune au centre et orange aux bords	-
GN	+	-	-	Jaune pale	-
Bennett	+	-	-	Orange pale	-
GYEA	+	-	-	Orange pale	-
M ₂	+++	+	Gris	Gris	-

A partir des **tableaux XVIII** et **XIX**, on constate que :

▪ **La souche P₂D₁₆** présente une croissance et une sporulation abondantes sur le milieu ISP₇. Elle est par contre bonne sur l'ISP₄ ainsi que le milieu M₂ et elle est très faible sur le reste des milieux.

La couleur du mycélium végétatif est globalement jaune à orange et celle du mycélium aérien est généralement grise.

Les milieux ISP₁ et ISP₇ n'ont pas changé de couleur, ce qui implique que celle-ci ne produit pas de pigments mélanoides. (L'aspect des souches sur les différents milieux de culture est donné en annexe).

1.2. Micromorphologie

Ces observations microscopiques des deux souches sont représentées dans la **figure 8**. Ces observations sont effectuées directement sur boîte de Pétri, des colonies des deux souches cultivées sur le milieu M₂ pendant 14 jours à 28°C indiquent que les filaments des mycéliums de substrat (MS) des deux souches sont non fragmentés, non cloisonnés portant des chaînes de spores du type RF (*Rectus-Flexibilis*) pour les deux souches. Ce type de mycélium est caractéristique du genre *Streptomyces*.

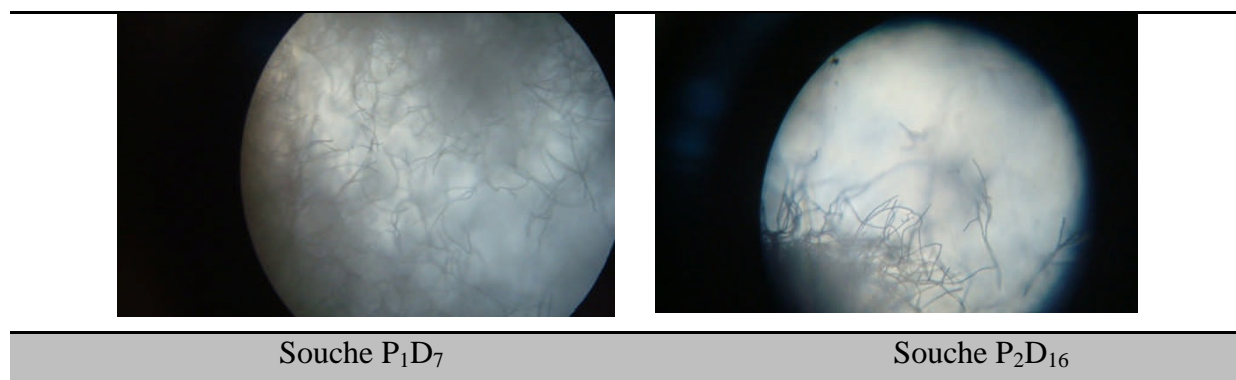


Figure 8: Observations micro morphologiques des isolats d'actinomycètes cultivés sur le Milieu M₂ pendant 14 jours à 28°C au grossissement (10 x 40).

2. Analyse des constituants cellulaires et / ou pariétaux

Cette étude a été effectuée pour confirmer les résultats des tests de caractérisation morphologique afin de pouvoir affilier ces souches aux genres correspondants. Les résultats ainsi obtenus de la détermination de la forme de l'isomère de l'acide diaminopimélique DAP ou la présence de la lysine qui le remplace chez certains genres d'actinomycètes ; la présence

ou non de la glycine ainsi que le type de sucres présents dans les hydrolysats cellulaires des isolats sont résumés dans les **tableaux XX et XXI**.

Tableau XX: Analyse des constituants cellulaires pariétaux de la souche P₁D₇, par CCM.

P ₁ D ₇					
constituant cellulaire	Couleur des taches	Rapport frontal (Rf)	Réactif de Détection	Identification des composés cellulaires	Rf des témoins
Acide aminé	• Violette	Rf= 0,85	Ninhydrine	• Glycine	Rf=0,82
	• Rose	Absence		• Lysine	Rf= 0,76
	• Brune	Rf= 0,79		• LLDAP	Rf= 0,79
Sucre	N.D	N.D	Diphenylamine Aniline	N.D	

Tableau XXI: Analyse des constituants cellulaires pariétaux de la souche P₂D₁₆, par CCM

P ₂ D ₁₆					
constituant cellulaire	Couleur des taches	Rapport frontal (Rf)	Réactif de Détection	Identification des composés cellulaires	Rf des témoins
Acide aminé	• Violette	Rf= 0,86	Ninhydrine	• Glycine	Rf= 0,82
	• Rose	Absence		• Lysine	Rf= 0,76
	• Brune	Rf= 0,78		• LL DAP	Rf= 0,79
Sucre	N.D	N.D	Diphenyl Amineaniline	N.D	

D'après nos expériences, nous avons révélé dans la paroi des deux souches, la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique, la présence de glycine et l'absence de la lysine et des sucres caractéristiques (figure 9).

Ces résultats indiquent que la paroi des deux souches est du type I. En effet, d'après **Murray et al.**, (1989) cité par **Smaoui**, (2010) , la présence ou l'absence de quelques glucides dans la paroi cellulaire permet la classification des actinomycètes en différents groupes.

L'analyse des acides aminés et des sucres pariétaux ont révélé que la paroi des deux souches TN17 et Fr10, contient l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et la glycine. Ces

résultats indiquent que la paroi des deux souches est du type I. Ce dernier est caractéristique des bactéries du genre *Streptomyces* (Smaoui, 2010)

Les résultats de la chimiotaxonomie couplés à ceux de l'étude morphologique, permettent d'affilier les deux souches au genre *Streptomyces*. Ces mêmes résultats ont été rapportées par d'autres auteurs à savoir **Houssam et al.**,(2011) qui ont démontré la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique, la présence de glycine et l'absence des sucres (xylose, arabinose, galactose et rhamnose) dans la paroi de la nouvelle bactérie de *Streptomyces gulbargensis*.

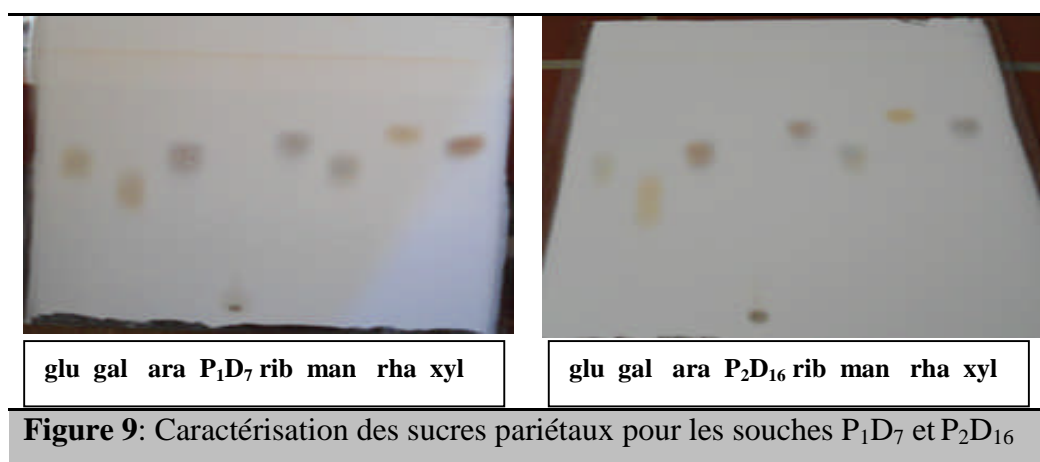


Figure 9: Caractérisation des sucres pariétaux pour les souches P₁D₇ et P₂D₁₆

3. Etude des caractères physiologiques

La détermination des espèces est basée sur des critères physiologiques et les critères moléculaires. Les tableaux suivants illustrent les résultats des tests physiologiques réalisés sur les deux souches étudiées.

A partir du **tableau XXII**, on constate que les deux souches peuvent croître à des températures allant de 20 à 50°C avec un optimum de croissance à 40°C pour P₁D₇ et de 30°C pour P₂D₁₆, sachant que celle-ci ne pousse pas à 50°C.

Concernant la température, la souche marine *Streptomyces* BT-408 possède une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 40°C avec un optimum à 30°C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide SBR-22 est beaucoup plus étroite et varie entre 25 et 33°C (Sujatha et al., 2005), (Smaoui, 2010).

Tableau XXII : Détermination de la température optimale de croissance des souches P₁D₇ et P₂D₁₆

Température	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
20°	+	+
25°	+	+
30°	++	+++
35	++	++
37°	++	+
40°	++++	+
44°	++	+
45°	++	+
50°	+	-

Tableau XXIII: Dégradation des sucres par les souches P₁D₇ et P₂D₁₆

Sucre	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
Témoin sans sucre	-	-
Rhamnose	+	+
Ribose	+	+
Tréhalose	+	+
Saccharose	+	+
Glucose	+	+
Lévulose	+	+
Glycérol	+	+
Raffinose	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Fructose	+	+
Xylose	+	+
Sorbitol	+	+
Inositol	+	+
Galactose	+	+
arabinose	+	+

Concernant la dégradation des sucres et des acides aminés, on remarque les deux souches ont la capacité de dégrader tout les sucres et les acides aminés testés, à l'exception de l'Asparagine qui n'est pas dégradé par la souche P₂D₁₆. (**Tableaux XXIII et XXIV**).

Tableau XXIV : Dégradation des acides aminés par les souches P₁D₇ et P₂D₁₆

Acide aminé	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
Témoin sans acide aminé	-	-
Glycine	+	+
Serine	+	+
Cystéine	+	+
Tyrosine	+	+
Asparagine	+	-
Histidine	+	+
Lysine	+	+
Alanine	+	+
Leucine	+	+
Arginine	+	+

Suite à l'étude du métabolisme des deux souches, il serait logique d'étudier leurs machineries enzymatiques. Pour cette raison, quelques tests ont été réalisés et les résultats sont rassemblés dans le **tableau XXV** suivant :

Les deux souches ont la capacité d'hydrolyser la caséine et l'amidon, par contre le carboxyméthyl-cellulose (CMC) et le nitrate ne sont pas dégradés

Tableau XXV: Production de quelques enzymes par les souches P₁D₇ et P₂D₁₆.

Test	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
dégradation du CMC	-	-
hydrolyse de la caséine de lait	+	+
hydrolyse de l'amidon	+	+
production de nitrate réductase	-	-

Autres tests sont indispensables pour l'identification de nos souches, à savoir : le pH, la concentration en NaCl, la croissance en présence de quelques sels et la sensibilité vis-à-vis de quelques antibiotiques. Les résultats de ces tests sont répartis dans les différents tableaux ci-après.

Concernant le pH (**tableau XXVI**), ces souches poussent à des pH allant de 4 à 11. Elles ont un optimum de croissance à pH 6. Même résultat est obtenu avec la souche *Streptomyces malaysiensis* sp. Celle-ci est caractérisée par sa possibilité de croître à des pH allant de 5 à 10 (Al-Tai *et al.*, 1999).

Tableau XXVI : Détermination des pH optimaux de croissance des deux souches.

pH	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
4	+	+
5	++	++
6	+++	+++
7	++	++
8	++	++
9	++	+
10	+	+
11	+	+

Tableau XXVII : Détermination de la concentration optimale de croissance en NaCl des deux souches

[NaCl]	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
0%	++++	++
1,5%	++	++
3%	+	+++
5%	+	++
7%	+	+
10%	-	-
13%	-	-
15%	-	-

Pour les concentrations de NaCl tolérées par ces souches (**tableau XXVII**), on remarque qu'elles peuvent croître dans des milieux contenant de 0% à 7% mais avec un optimum de croissance à 0% pour P₁D₇ et de à 3% pour P₂D₁₆. Les concentrations supérieures à 7% ne permettent pas leur croissance.

Tableau XXVIII: Croissance des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ en présence de certains composés chimiques

Milieu	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
Oxalate	+	+
Acétate	+	+
Citrate	+	+
Tartrate	+	+
Cristal violet	+	+
Tellurite de potassium à 0,01%	+	+
Tellurite de potassium à 0,001%	+	+
Azide de sodium 0,01%	+	+
Azide de sodium 0,001%	+	+
Phénol à 0,05%	+	+
Phénol à 0,1%	+	+
Tween 80	+	+

Il est à signaler que ces acides organiques testés sont dégradés par les deux souches (**tableau XXVIII**). Houssam *et al.*, (2011) ont identifié une souche de *Streptomyces albidoflavus*-143 qui tolère des concentrations allant de 0.5% à 7% de NaCl. Cette souche est aussi caractérisée par citrate positive et nitrate négative.

Selon les recommandations du CA-SFM de 2010, on remarque que les antibiogrammes réalisés pour les deux souches montrent qu'elles sont résistantes à la Ticarcilline et la Gentamicine. Pour l'Acide nalidixique, P₁D₇ lui résiste, par contre P₂D₁₆ est intermédiaire. Concernant les autres antibiotiques, à savoir la Colistine, l'Amikacine ainsi que l'association « Triméthoprime-sulfaméthoxazole », les deux souches sont sensibles vis-à-vis ces derniers (**tableau XXIX**).

Tableau XXIX : Tests de sensibilité des souches aux différentes familles d'antibiotiques

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	P ₁ D ₇	P ₂ D ₁₆
Ticarcilline (TIC)	R	R
Gentamicine (CN)	R	R
Acide nalidixique (NA)	R	18,19
Colistine (CS)	16,17	18,61
Amikacine (AK)	32,35	26 ,8
Trimethoprim- sulfamethoxazole (SXT)	39,14	47,6

La résistance des souches à certains antibiotiques suggère fortement leur aptitude à la production de ces molécules car dans la nature, la production d'antibiotiques suppose que le microorganisme possède un mécanisme de résistance à ces métabolites. Les gènes de résistance et ceux de biosynthèse des antibiotiques, situés dans le même « cluster », sont transcrits simultanément, ce qui assure la protection du germe producteur (Martin, 1992).

En plus de cette résistance, toutes les souches ont la capacité de dégrader la majorité des composés organiques, de croître à des pH acide ou basique et à des températures supérieures à 40°C.

Actuellement, la détermination de nouvelles espèces de microorganismes s'effectue non seulement par des méthodes phénotypiques (études morphologique et physiologique) mais aussi par des critères chimiques (chimiotaxonomie) et des critères moléculaires qui s'avèrent être essentiels.

Dans notre cas, nos souches ont fait l'objet d'une étude morphologique, chimique et physiologique limitée. Il est donc impossible de confirmer l'espèce à ce stade de l'étude.

Après avoir identifié les souches productrices des antifongiques non polyéniques et avoir déterminé leurs conditions optimales de croissance, il serait évident de faire un essai d'optimisation des milieux de culture permettant la production de ces substances bioactives. Pour cette raison, le chapitre suivant sera consacré à la cinétique de production de ces molécules en milieu liquide ainsi qu'à l'essai d'optimisation de ce dernier.

V) Cinétique de production des antifongiques non polyéniques et essai d'optimisation de la composition du meilleur milieu de production

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs.

En effet, la composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires (Smaoui, 2010).

Pour augmenter la productivité des molécules antifongiques, il serait intéressant de choisir un milieu de culture qui permet une bonne production de ces dernières et essayer d'optimiser ce milieu en fonction des besoins de chaque souche.

1. Choix du meilleur milieu de production

Une approche d'optimisation efficace des conditions de production de biomolécules à partir de la souche sélectionnée peut être réalisée à travers des études et des analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de croissance et de production (Smaoui, 2010).

Dans cette optique, nous avons testé plusieurs milieux à savoir : MSA, MSG, MSAE et le M₂ (la composition de ces milieux est donnée en annexe) pour choisir parmi eux, celui qui permet une meilleure production des antifongiques en question.

Dans cette expérience, trois paramètres sont suivis : l'évolution du pH des milieux au cours de la fermentation, la cinétique de croissance des deux souches d'actinomycètes par la mesure des poids secs des différents prélèvements effectués et la cinétique de production des antifongiques non polyéniques par la mesure du diamètre des zones d'inhibition des surnageant des prélèvements quotidiens. Ces paramètres sont suivis pendant 14 jours de culture.

❖ Evolution du pH des différents milieux de culture

Le suivi des pH des cultures des deux souches d'actinomycètes sont représentés dans les figures 10 et 11 suivantes

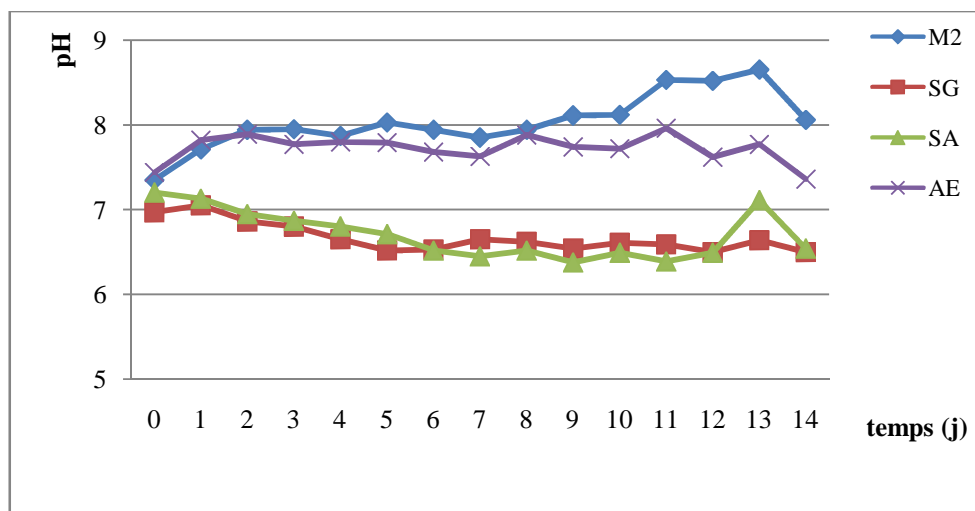


Figure 10: Evolution du pH des différents milieux de culture de la souche P₁D₇

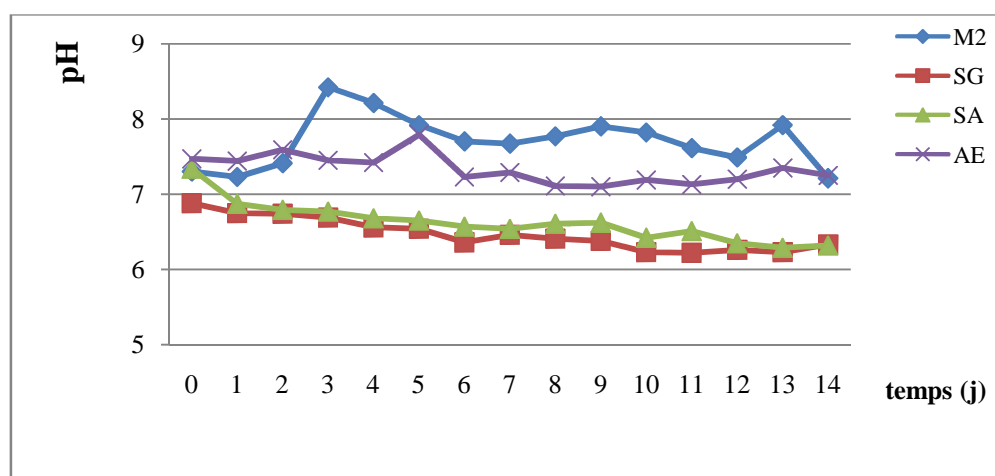


Figure 11: Evolution du pH des différents milieux de culture de la souche P₂D₁₆

A partir des figures précédentes, on remarque d'une part, une légère alcalinisation du milieu MSAE et une autre plus importante du milieu M₂ et d'une autre part, une légère acidification des milieux MSG et MSA.

Augustine *et al.*, (2005) rapportent que lors de la production de plusieurs métabolites secondaires à savoir la production d'un antifongique par la souche *Streptomyces rochei*

AK39, la production de cet antifongique peut être stimulée ou inhibée par des variations de pH.

Dans le même point de vue, Asanza-Teruel *et al.*, (1997) constatent que chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture. Un pH acide favorise la production du chlorotétracycline alors que le pH basique favorise la sécrétion de tétracycline (Smaoui, 2010).

❖ Effet du milieu de culture sur la croissance des souches d'actinomycètes

Les bio-productions microbiennes peuvent être améliorées par deux approches distinctes. La première approche est d'améliorer la production de la molécule d'intérêt. La seconde est d'augmenter la quantité de biomasse produite (Strub, 2008).

L'évolution de la biomasse des souches productrices des antifongiques sont représentées dans les **figures 12 et 13** ci-après :

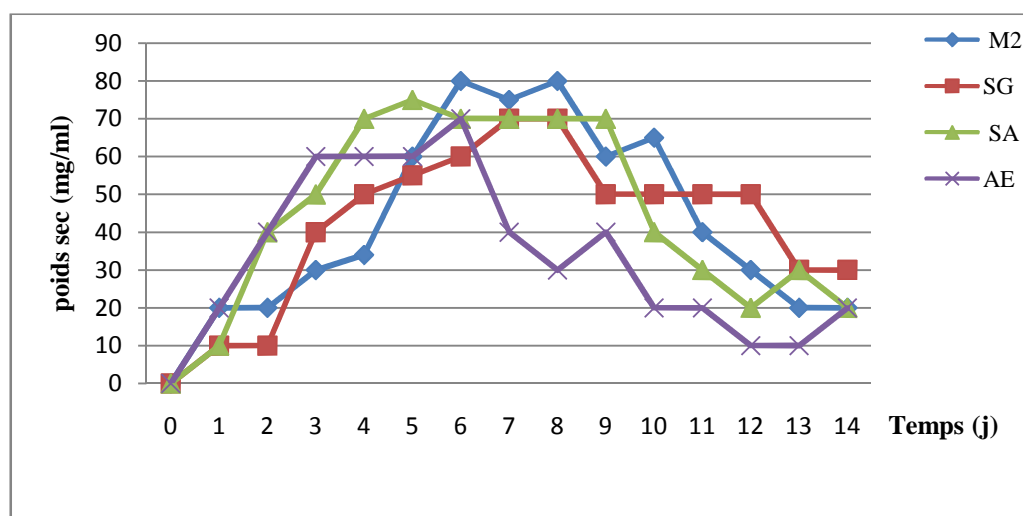


Figure 12: Effet du milieu de culture sur la croissance de la souche P₁D₇ par détermination du poids sec

Comparée aux trois autres milieux de culture, la biomasse est élevée sur le milieu M₂. Elle atteint sa valeur maximale au 6^{ème} jour de culture puis elle diminue à partir du 8^{ème} jour (figure 12).

Alors que de la figure 13, on constate que la souche P₂D₁₆ croit mieux sur le milieu M₂. Elle atteint une valeur maximale au 4^{ème} jour de la culture ou elle se stabilise pendant 3 jours puis elle diminue à partir du 8^{ème} jour.

De ces observations, on peut conclure que le milieu de culture qui permet une bonne croissance des deux souches étudiées est le milieu M₂.

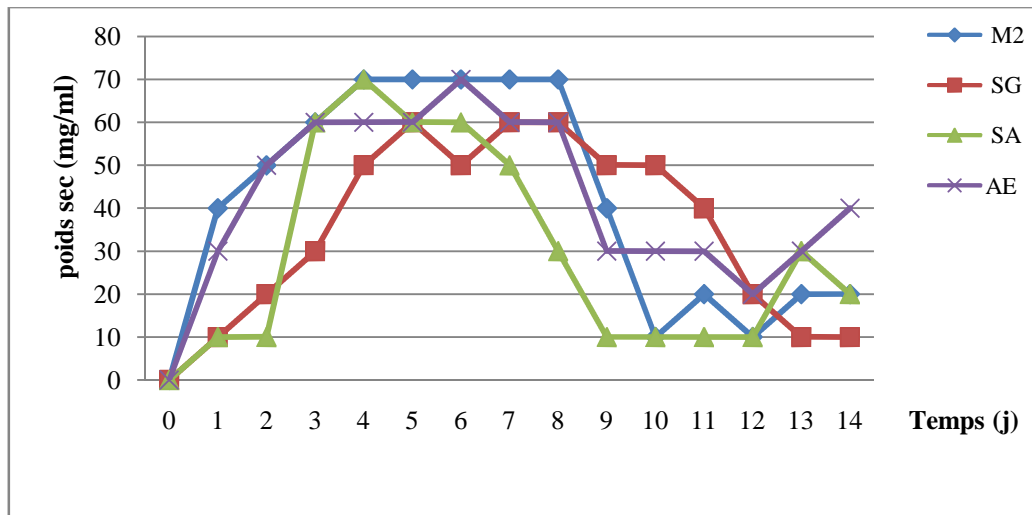


Figure 13: Effet du milieu de culture sur la croissance de la souche P₂D₁₆ par détermination du poids sec

❖ Effet du milieu de culture sur la production des antifongiques

Les cinétiques de production des antifongiques des souches testées cultivées sur les différents milieux de culture sont présentées dans les figures 14 et 15.

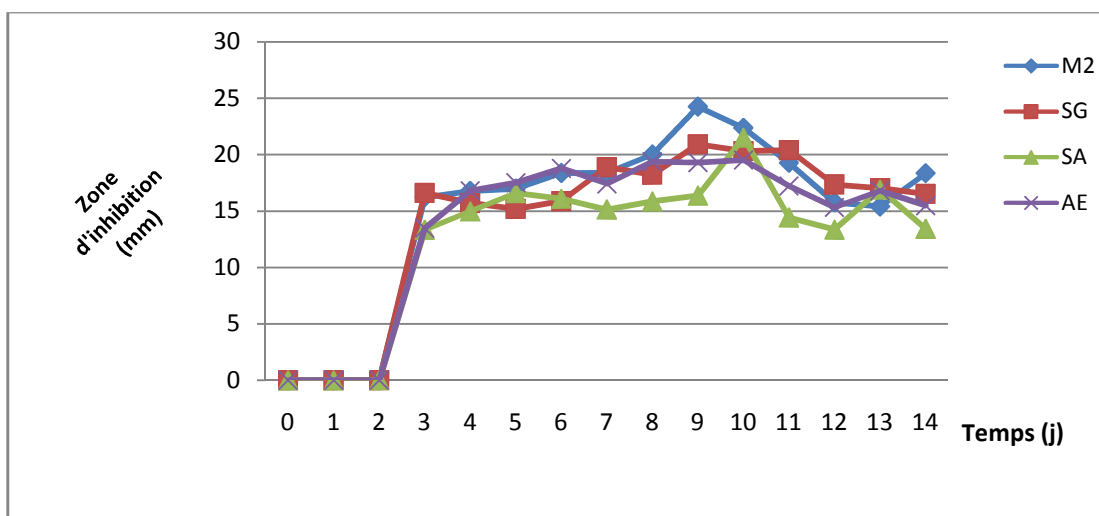


Figure 14: Effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de P₁D₇

L'activité antifongique apparait dès le 3^{ème} jour de la culture sur les quatre milieux testés. L'activité maximale est observée dans le milieu M₂, au 9^{ème} jour de la culture. Ces observations sont valables pour les deux souches d'actinomycètes testées.

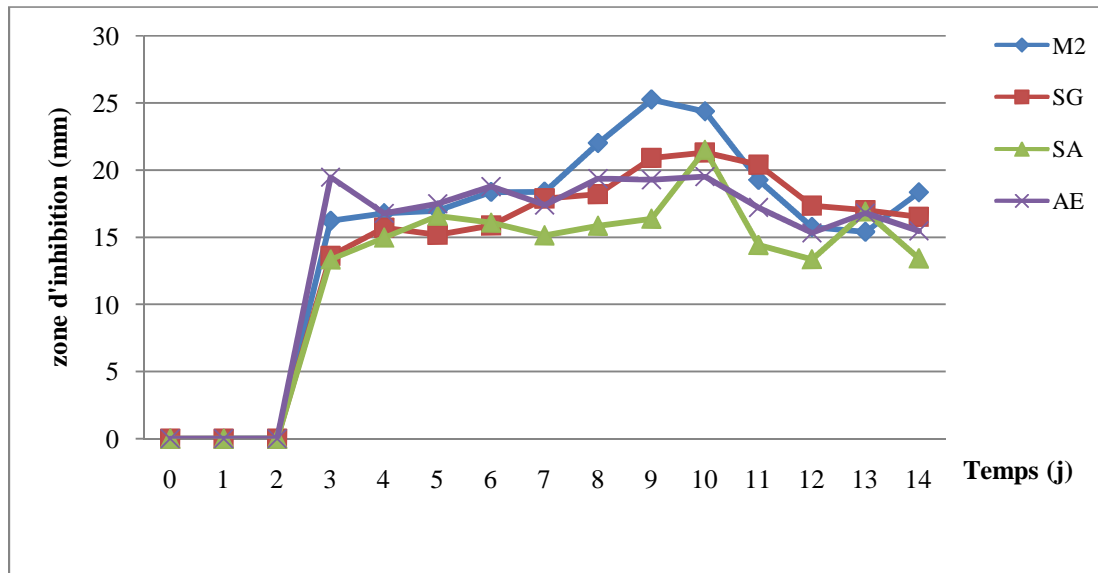


Figure 15: Effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de P₂D₁₆

De même, pour la souche *Streptomyces rochei* AK39, qui produit un métabolite antifongique, la production commence après quatre jours d'incubation pour atteindre un maximum après huit jours (Augustine *et al.*, 2005).

Ces résultats ont été aussi obtenus par **Zitouni** (2005). Ils ont montré que les activités apparaissent dès le 3^{ème} jour de culture. Cette production a lieu durant les phases exponentielles et de ralentissement de la croissance.

L'expérience réalisée nous permet de conclure que l'amidon est la meilleure source de carbone pour la production des antifongiques non polyéniques. Dans la même optique, plusieurs travaux ont prouvé l'efficacité de l'amidon par rapport à d'autres sources de carbone dans le procédé de synthèse des substances bioactives.

Houssam *et al.*, (2011) ont montré que l'amidon est la meilleure source de carbone pour la biosynthèse des substances antifongiques.

Yassin *et al.*, (2006) prouvent également que parmi les différents sucres utilisés, l'amidon, la chitine et le maltose sont les meilleurs sources de carbone pour la production d'antifongiques. En présence d'amidon des valeurs maximales de production d'antifongiques et de protéines extracellulaires sont obtenues pour la souche *Streptomyces kanamyceticus* EHE-68.

Tereshin, (1976) rapporte que l'amidon et le glucose sont les meilleures sources de carbone pour la production de la mycoheptine.

De même, **Raytapadar and Paul** (2001) rapportent que le glucose et l'amidon sont les meilleures sources de carbone pour la production d'antifongiques par la souche *Streptomyces aburaviensis* IDA-28 (Yassin *et al.*, 2006).

De nos résultats, on remarque aussi que l'extrait de levure existant dans le milieu MSAE, a un effet négatif sur synthèse des antifongiques. Dans le même sens, **Yassin *et al.***, (2006) rapportent que l'extrait de levure inhibe la croissance et la production d'antibiotique de la souche *Streptomyces kanamyceticus* EHE-68.

En comparant la composition du milieu M₂ avec celle du milieu MSA, on remarque que la différence réside au niveau de la source d'azote. De la, on peut déduire que la source d'azote organique qui est la caséine, favorise la production des antifongiques de nos souches. Ce qui n'est pas le cas avec la source inorganique d'azote.

L'étude menée par **Yassin *et al.***, (2006) confirme nos résultats. Parmi les sources organiques d'azote, la caséine donne la valeur maximale de croissance de la souche *S. kanamyceticus* EHE-68 et de production de l'antifongique.

Afin de confirmer ou d'infirmer ces observations, une étude statistique est réalisée. Après utilisation du logiciel XLSTAT-CCR (Component Correlated Regression) 2011.4. Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux **XXX** et **XXXI** suivants :

Tableau XXX: Analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P₁D₇

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
M ₂	17,082	A
SG	16,376	A
AE	15,921	A
SA	14,456	A

Tableau XXXI: Analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P₂D₁₆

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
M₂	17,466	A
AE	16,382	A
SG	16,145	A
SA	14,456	A

A partir des tableaux précédents on remarque que les 4 milieux appartiennent au même groupe, ce qui signifie que l'effet du facteur «milieu» n'est pas statistiquement significatif sur l'activité antifongique des actinomycètes. Autrement dit, la différence entre ces derniers n'est pas significative. Donc le taux de production est statistiquement le même dans les différents milieux de production pour les deux souches d'actinomycètes.

Vue la composition du milieu M₂, ce dernier sera utilisé dans le reste de notre travail : c'est un milieu peu contaminable car la source de carbone est complexe et elle n'est pas hydrolysable par tout les microorganismes. Ce qui n'est pas le cas pour le glucose.

Une autre raison pour le choix de ce milieu, est la connaissance exacte de sa composition. D'où la possibilité de l'amélioration de sa composition pour une éventuelle optimisation de ce milieu.

2. Détermination des concentrations optimales de la source d'azote et de carbone.

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, les travaux de **Gesheva *et al.*, 2005** ont montré que la nature des sources : de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace éléments minéraux affectent fortement la production de la molécule antifongique de type macrolide non polyénique.

❖ Détermination des concentrations optimales de la source d'azote.

Afin de déterminer la concentration permettant une bonne production des antifongiques non polyéniques, la concentration de la caséine a été varié de 0,1 à 0,5 g/l avec des pas de 0,1 à chaque fois.

Dans les figures suivantes, les concentrations de la caséine sont symbolisées par : 1C, 2C,...et 5C. Trois paramètres sont suivis : le pH, la croissance de la souche et la production des antifongiques. Les résultats sont représentés ci-après

- **Effet de la concentration en caséine sur l'évolution du pH**

A partir de la **figure 16**, on constate que les différentes courbes de la souche P₁D₇ ont la même allure : une alcalinisation du milieu de culture à partir du 2^{ème} jour d'incubation puis une diminution du pH aux alentours de pH 7.

Une lecture de cette figure, nous permet de constater que les pH des milieux ne varient pas trop : ils augmentent des le 2^{ème} jour et continuent à augmenter jusqu'au 5^{ème} jour pour atteindre un pH8 puis diminuent dès le 7^{ème} jour pour atteindre la neutralité. À l'exception du milieu ayant une concentration de 0,3 g/l de caséine qui diminue des le 4^{ème} jour d'incubation pour atteindre la neutralité au 9^{ème} jour.

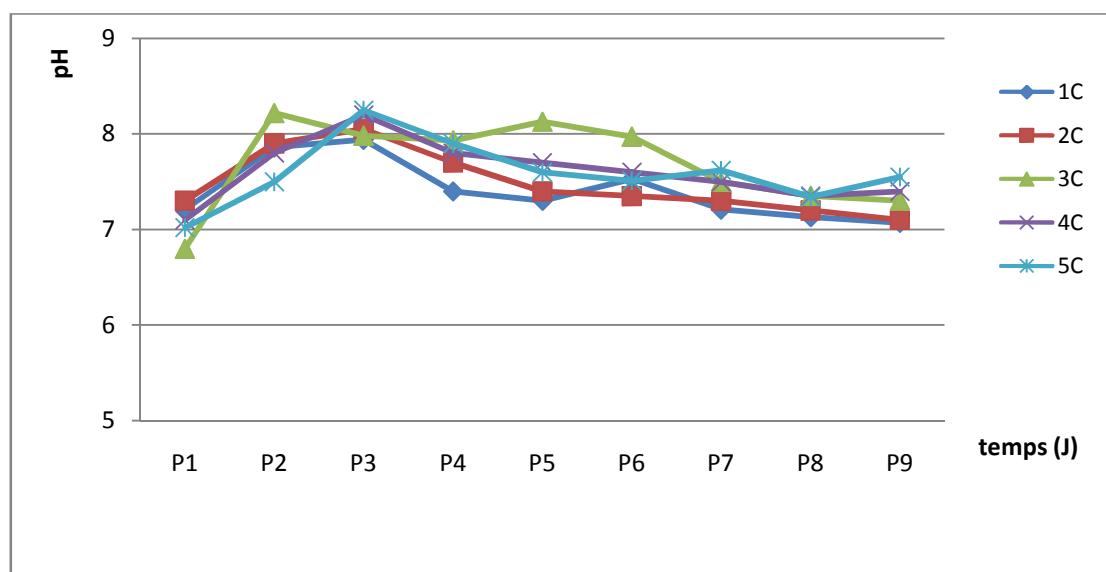


Figure 16: Effet de la concentration en caséine sur l'évolution du pH des cultures de P₁D₇

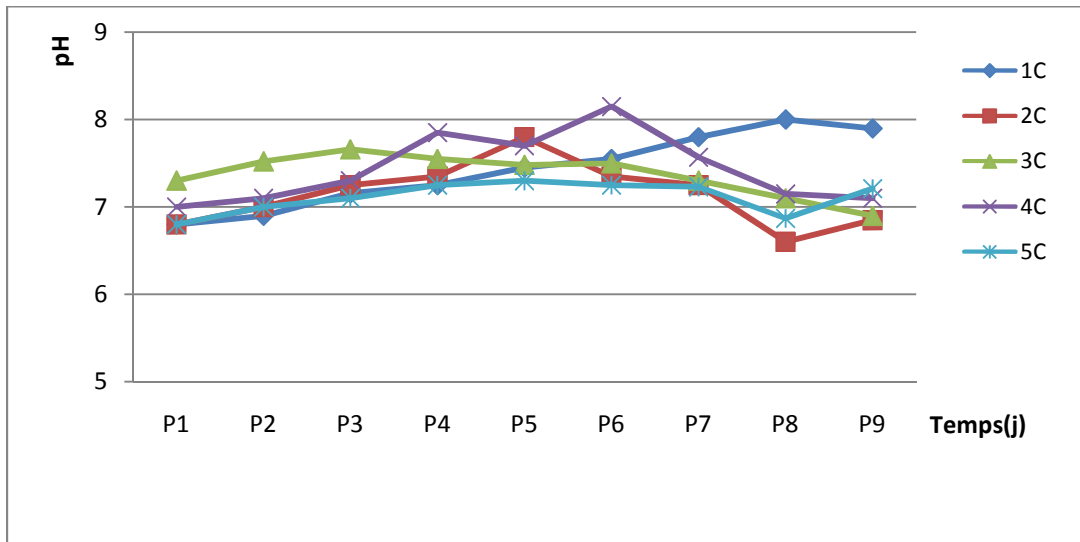


Figure 17: Effet de la concentration en caséine sur l'évolution du pH des cultures de P_2D_{16}

- **Effet de la concentration en caséine sur la croissance des souches**

De la **figure 18**, on remarque que la biomasse de la souche P_1D_7 est variable d'un milieu de culture à un autre. Elle est plus importante dans le milieu ayant une concentration de 0,1 g/l, faible dans le milieu contenant 0,3 g/l et elle est intermédiaire dans le reste des milieux de culture.

En ce qui concerne la croissance de la souche P_2D_{16} (figure 19) en présence des différentes concentrations de caséine, on constate qu'elle est bonne dans le milieu ayant 0,3g/l de cet élément.

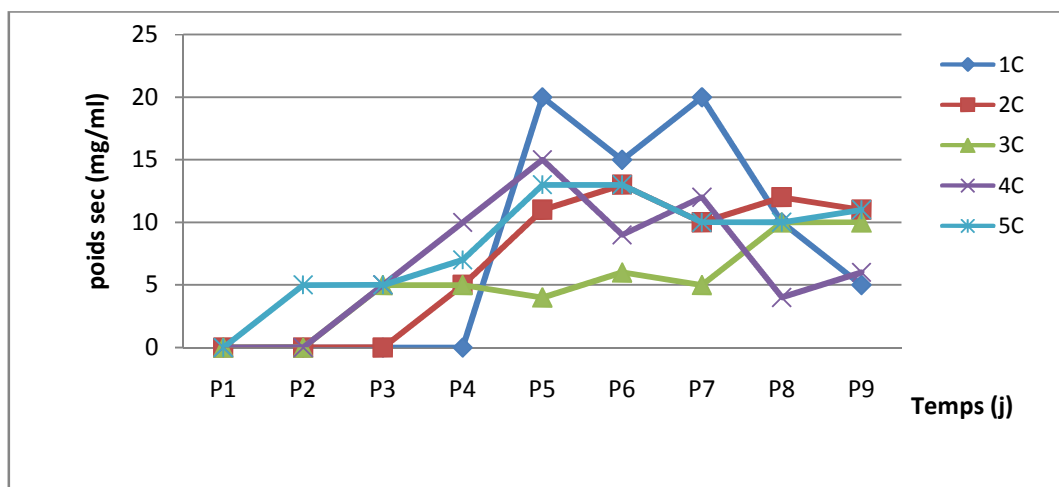


Figure 18: Effet de la concentration en caséine sur la croissance de la souche P_1D_7

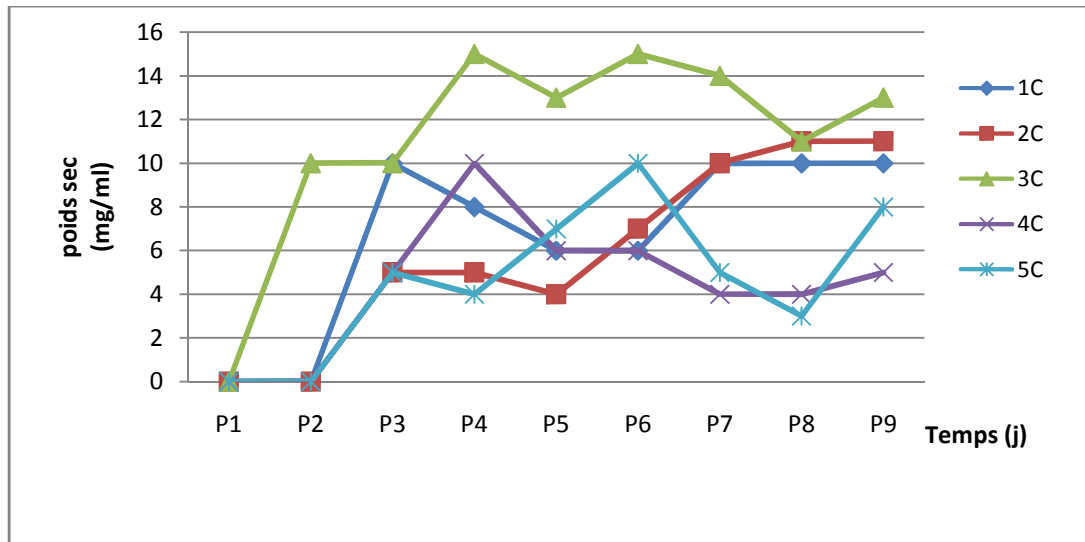


Figure 19: Effet de la concentration en caséine sur la croissance de la souche P₂D₁₆

- **Effet de la concentration en caséine sur la production des antifongiques non polyéniques**

La production de l'antifongique par la souche P₁D₇ (figure 20) est caractérisée par une phase de latence dans les différents milieux de culture. Dans le milieu à 0,4g/l de caséine, la production commence dès le 3^{ème} jour de culture pour atteindre son maximum au 7^{ème} jour.

Dans les milieux à 0,2, 0,3 et 0,5g/l de caséine, la production commence dès le 4^{ème} jour de la culture. Il est à signaler que la production est nulle dans le milieu à 0,1 g/l de caséine.

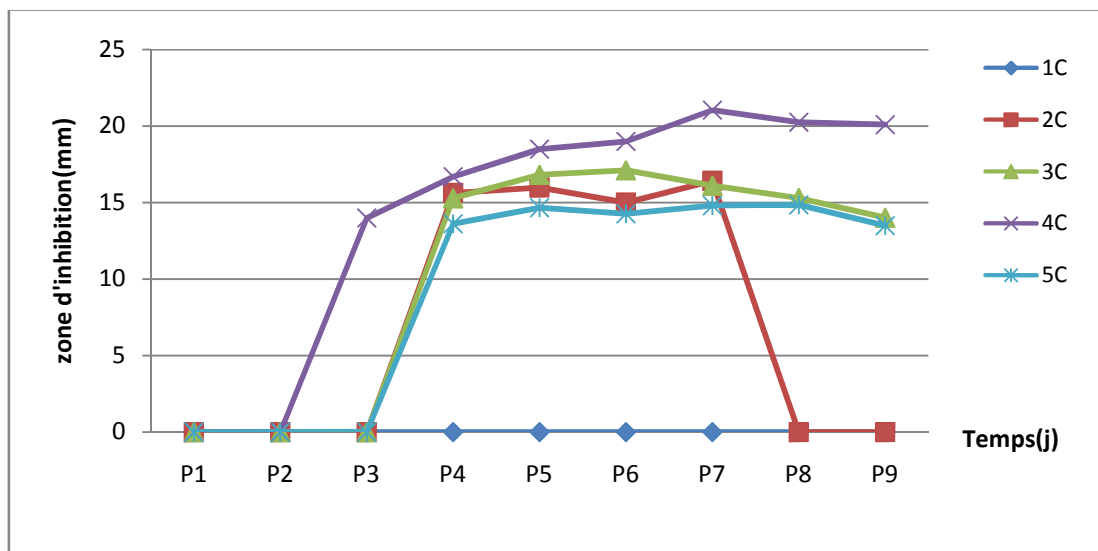


Figure 20: Effet de la concentration en caséine sur la production de l'antifongique non polyénique de la souche P₁D₇

A partir de la figure 21, on remarque que les 5 concentrations de la caséine permettent une production de l'antifongique de la souche P₂D₁₆. Cette activité est caractérisée par une phase de latence dans les milieux à 0,1 et 0,5g/l de caséine puis elle commence dès le 4^{ème} jour d'incubation pour atteindre son maximum au 5^{ème} et au 6^{ème} jour respectivement.

En ce qui concerne le milieu contenant 0,3g/l de caséine, la production est maximale dès le 1^{er} jour. Les milieux à 0,2 et 0,4g/l de caséine ont la même allure que le milieu à 0,3g/l de cet élément.

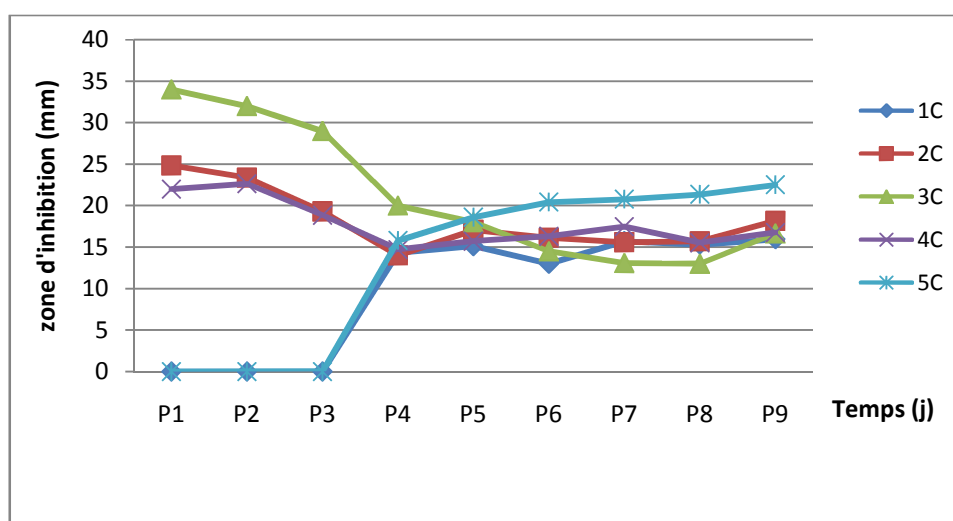


Figure 21: Effet de la concentration en caséine sur la production de l'antifongique non polyénique de la souche P₂D₁₆

Une analyse statistique est réalisée et les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux XXXII et XXXIII suivants :

Tableau XXXII: Analyse statistique de l'effet de la concentration de la caséine sur la production de l'antifongique de P₁D₇

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
4C	14,401	A
3C	10,514	A
5C	9,522	A
2C	7,007	A
1C	0,000	B

Une étude statistique par analyse de la variance des résultats obtenus a démontré que l'apparition des différentes activités antimicrobiennes chez une souche d'actinomycète est fonction des milieux de culture.

Pour la souche P₁D₇, les milieux ayant une concentration de 0,2 à 0,5 g/l de caséine appartiennent au même groupe. D'où l'absence d'une différence significative entre ces milieux de culture. Alors que le milieu contenant 0,1g/l de caséine forme un autre groupe vu l'absence d'activité dans ce dernier.

Pour des raisons d'économie, on prendra la concentration 0,2g/l de caséine comme étant la concentration optimale de production de l'antifongique de cette souche.

Tableau XXXIII: Analyse statistique de l'effet de la concentration de la caséine sur la production de l'antifongique de P₂D₁₆

Modalité	Moyenne estimée	Groupes	
3C	21,137	A	
2C	18,237	A	B
4C	17,778	A	B
5C	13,272	A	B
1C	9,929		B

En ce qui concerne la souche P₂D₁₆, on remarque que le milieu contenant 0,3g/l de caséine représente le meilleur milieu de production de l'antifongique. De ce fait, cette concentration est considérée comme étant l'optimale pour la production de l'antifongique non polyénique de cette souche.

Après avoir déterminé les concentrations optimales en caséine, il est nécessaire de déterminer celles de l'amidon.

❖ Détermination des concentrations optimales de la source de carbone.

Afin de connaître la concentration en amidon permettant une bonne production des antifongiques, la concentration de l'amidon a été varié de 2 à 10 g/l avec des pas de 2 à chaque fois.

Dans les figures ci-après, ces concentrations sont symbolisées par 2A, 4A,...et 10A. Trois paramètres sont suivis : le pH, la croissance de la souche et la production des antifongiques. Les résultats des cultures réalisées sont représentés ci-après

- **Effet de la concentration d'amidon sur l'évolution du pH des milieux de culture**

On observant la **figure 22**, on remarque que les pH des milieux de P₁D₇ ne varient pas trop. On constate également que les milieux à 6 et a 10g/l ont la même allure : un pH maximal de 8 dès le 2^{ème} jour d'incubation puis une diminution de ce dernier. Alors que le pH des trois autres milieux est variable, allant de 7 à 9.

Par contre de la figure 23, on constate que tous les milieux de culture de la souche P₂D₁₆ ont presque la même allure, prenant des valeurs comprises entre 6,5 et 8,5. La valeur maximale des différents milieux est notée à partir du 5^{ème} jour de la culture puis elle diminue des le 7^{ème} jour.

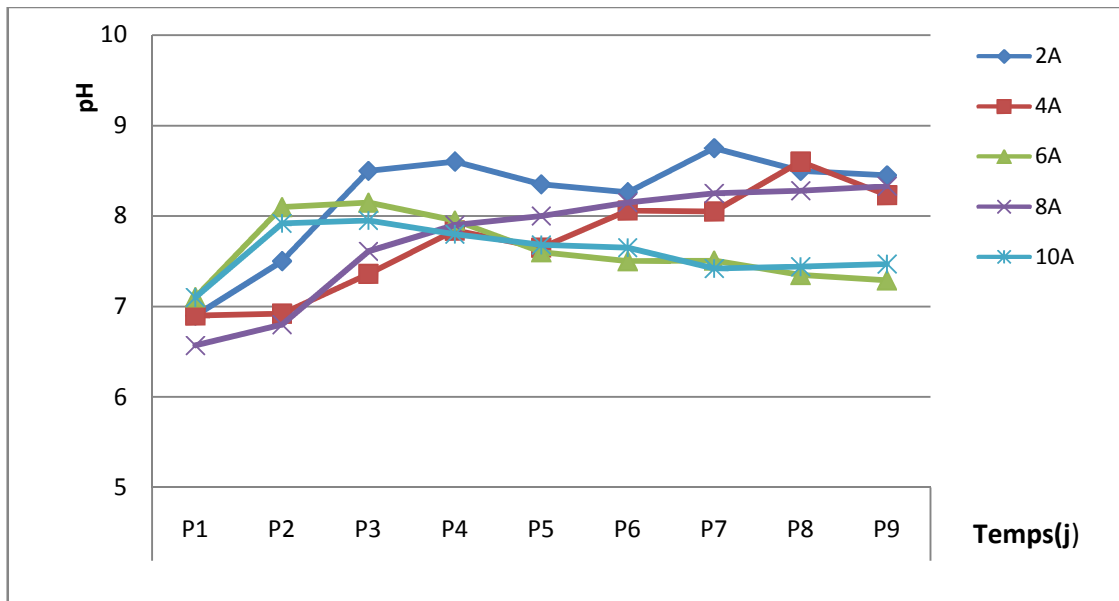


Figure 22: Effet de la concentration d'amidon sur l'évolution du pH des milieux de culture de P₁D₇

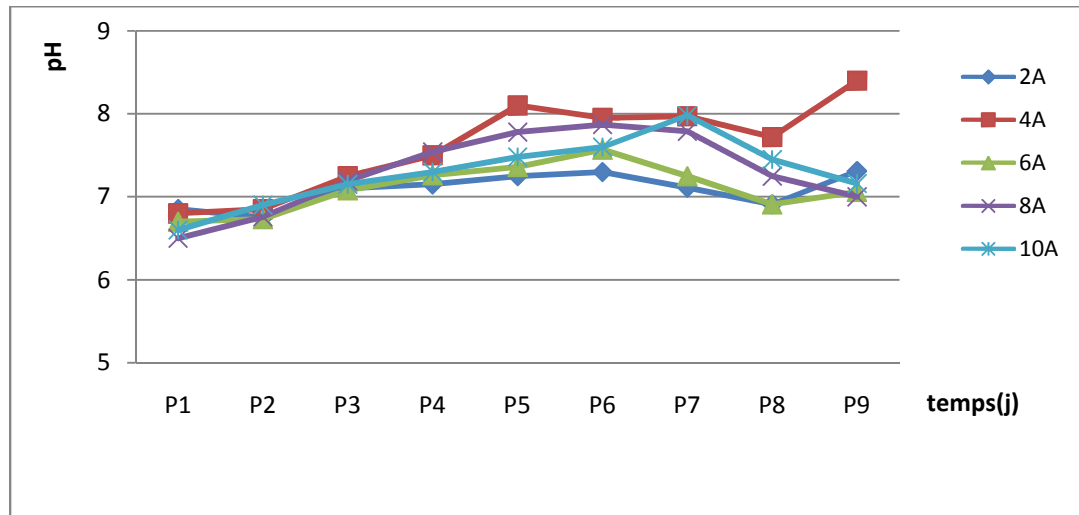


Figure 23: Effet de la concentration d'amidon sur l'évolution du pH des milieux de culture de P₂D₁₆

- **Effet de la concentration d'amidon sur la croissance des deux souches**

A partir de la **figure 24**, on remarque que le milieu permettant une bonne croissance de la souche P₁D₇ est le milieu contenant 2g/l d'amidon, suivi par le milieu à 10g/l puis celui de 8g/l et le dernier est celui de 6g/l.

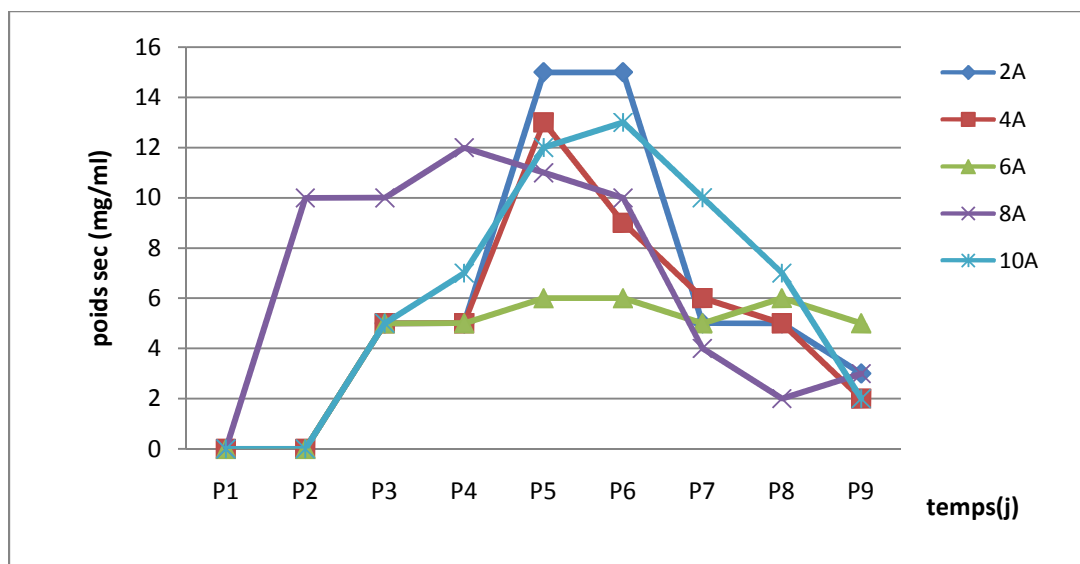


Figure 24: Effet de la concentration d'amidon sur la croissance de la souche P₁D₇

De la **figure 25**, on constate que la souche P₂D₁₆ ne se comporte pas de la même manière que la souche précédente. Celle-ci croit mieux dans le milieu de culture contenant 6g/l d'amidon, suivi par le milieu qui contient 4g/l, 8g/l et enfin celui à 2g/l d'amidon.

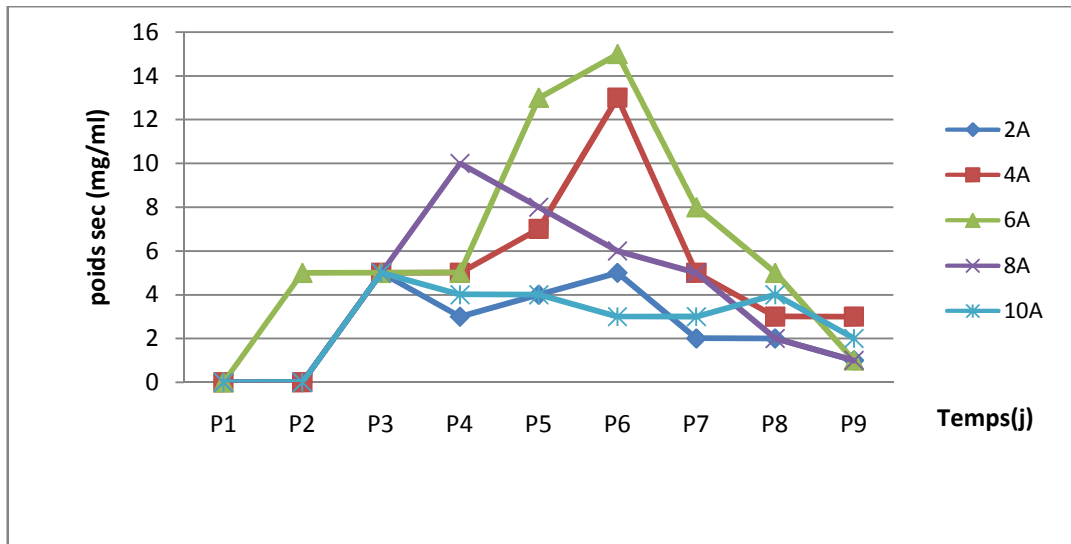


Figure 25: Effet de la concentration d'amidon sur la croissance de la souche P₂D₁₆

- **Effet de la concentration d'amidon sur la production des antifongiques**

La **figure 26** illustre la production de la souche P₁D₇ sur les cinq milieux ayant des concentrations variable en amidon. On remarque qu'ils sont caractérisés par des phases de latence de 3 jours puis une production considérable dès le jour suivant.

A partir de cette figure, la valeur maximale est enregistrée au 8^{ème} jour dans le milieu ayant une concentration de 4g/l d'amidon.

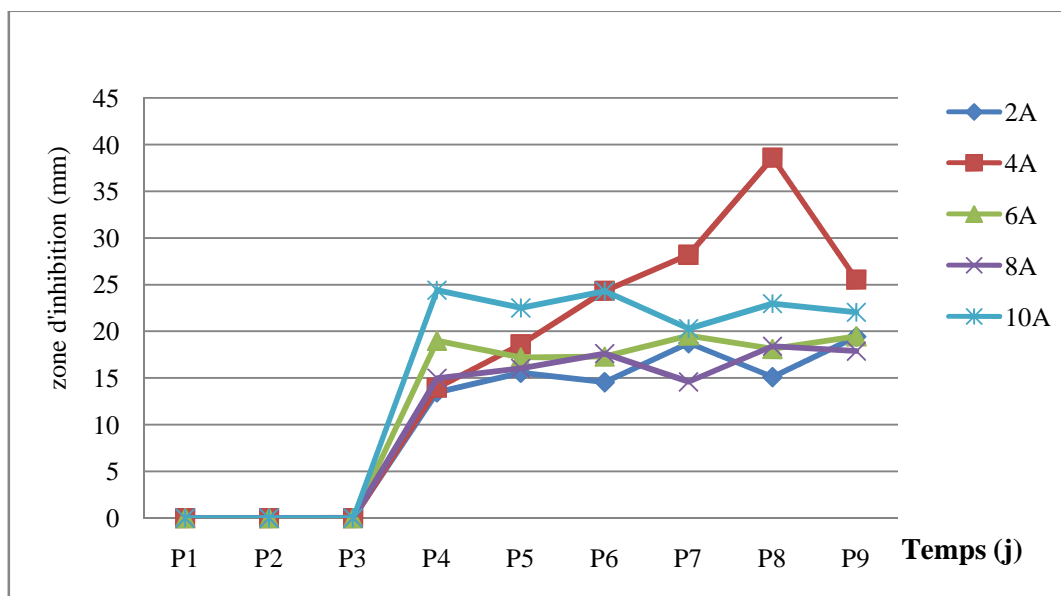


Figure 26: Effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P₁D₇

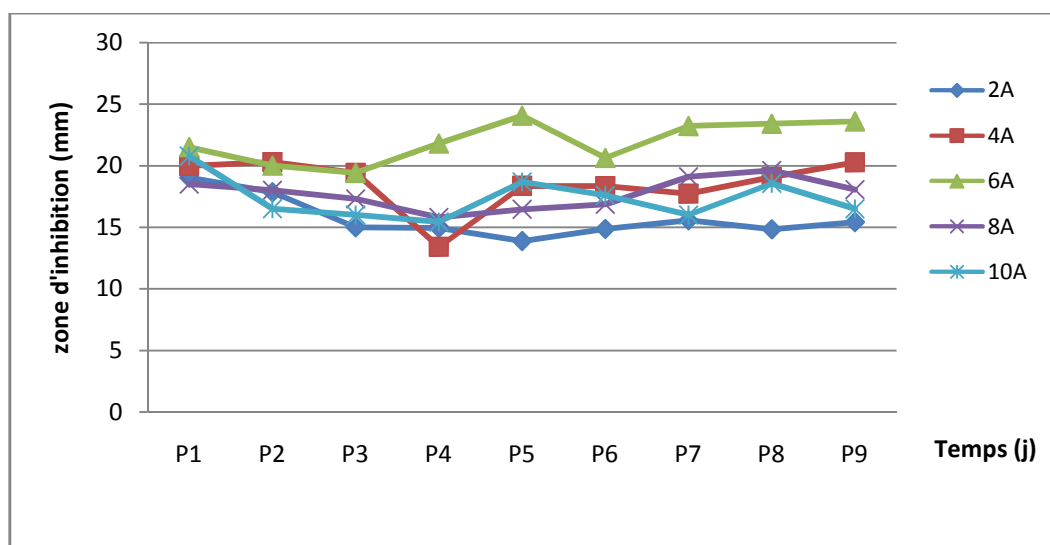


Figure 27: Effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P₂D₁₆

La **figure 27** représente la production de l'antifongique non polyénique de la souche P₂D₁₆ en fonction des différentes concentrations d'amidon. D'après cette figure, on signale l'absence de la phase de latence dans tous les milieux de culture testés.

La production maximale est enregistrée dans le milieu de culture contenant 6g/l d'amidon et la production la plus faible caractérise le milieu de culture ayant 2g/l d'amidon.

Pour pouvoir confirmer la différence de production des antifongiques dans ces différents milieux de culture, L'analyse statistique est réalisée grâce au logiciel XLSTAT-CCR (Component Correlated Regression) 2011.4 et les résultats sont regroupés dans les tableaux **XXXIV** et **XXXV** ci après.

Tableau XXXIV: Analyse statistique de l'effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P₁D₇.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
4A	16,582	A
10A	15,167	A
6A	12,278	A
8A	11,043	A
2A	10,750	A

Tableau XXXV: Analyse statistique de l'effet de la concentration d'amidon sur la production de l'antifongique de P₂D₁₆.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
6A	21,957	A
4A	18,541	B
8A	17,746	B
10A	17,336	B C
2A	15,706	C

Le **tableau XXXIV** montre que la variation de la concentration d'amidon n'a pas d'effet significatif pour la production de l'antifongique de la souche P₂D₁₆. Alors que le **tableau XXXV** répartit les différents milieux dans trois groupes distincts, en classant le milieu contenant 6 g/l d'amidon comme étant le meilleur milieu de production d'antifongique pour la souche P₁D₇.

A partir des résultats obtenus, on peut déduire que la concentration optimale de la source d'azote, qui est la caséine, pour la production des antifongiques est de 0,2g/l pour la souche P₁D₇ et elle est de 0,3g/l pour la souche P₂D₁₆.

Par contre celle de la source de carbone (amidon), est de 2g/l pour la souche P₁D₇ et de 6g/l pour la souche P₂D₁₆.

Il est alors clair que nos résultats sont semblables à ceux de Tanaka (1992). Ce dernier rapporte que l'addition de la source de carbone a une concentration de 0 – 5% et une source d'azote a une concentration de 0 – 3% dans le milieu de culture améliore la production des antibiotiques (Ismet *et al.*, 2004).

Dans ce présent travail, qui entre dans le cadre de l'axe de recherche de métabolites secondaires biologiquement actifs du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia, nous nous sommes intéressés aux aspects microbiologiques, taxonomiques, biochimiques et spectroscopiques des activités antimicrobiennes de deux souches actinomycétales.

Dans le cadre de cette étude, on s'est fixé des objectifs. Ces derniers sont détaillés dans différentes parties qui se succèdent :

- Le criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non polyéniques : ce test a permis de mettre en évidence l'activité de deux souches (P₁D₇ et P₂D₁₆) parmi les vingt trois étudiées. Ce rapport est assez faible, mais cela peut être traduit par la difficulté de la mise en évidence de ce type de molécules parmi les antifongiques polyéniques qui sont plus abondants.
- Etude taxonomique : Sur la base de ces résultats, les deux souches étudiées semblent appartenir au genre *Streptomyces*. Sachant que nos souches n'ont fait l'objet que d'une étude morphologique, chimique et physiologique limitées. Sans l'étude moléculaire, il est impossible d'affirmer avec certitude l'espèce de chaque souche.
- L'étude de ces molécules produites par ces souches, passe d'abord par:
 - ✓ Le choix du meilleur solvant d'extraction de ces substances, qui se sont révélés être l'acétate d'éthyle et le butanol pour de P₁D₇ et P₂D₁₆ respectivement.
 - ✓ La détermination du meilleur système de migration. C'est l'Acétonitrile/eau (90/10), qui a permis une séparation optimale des substances bioactives des deux souches.
 - ✓ La semi-purification et la révélation chimique des antifongiques : les réactions chromogéniques de ces extraits montrent qu'ils contiennent des fonctions glucidiques, des fonctions alcool supérieures ou stéroïdes, ainsi que des substances réductrices. les méthodes d'étude des extraits actifs obtenus restent à compléter.

Il est à signaler qu'il serait nécessaire d'approfondir l'étude sur les antifongiques purifiés de manière à connaître leur toxicité vis-à-vis des cellules animales et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) contre divers champignons pathogènes.

En effet, d'autres analyses plus fines visant à la purification et à la détermination des structures chimiques des antibiotiques telles que l'HPLC, la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie de masse ainsi que la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont indispensables pour affiner nos résultats.

- ✓ les différents agents physico-chimiques (pH, température et détergents) ont un effet sur l'activité de nos molécules. Par contre la durée de conservation (5 mois) n'affecte pas ces dernières. Il est alors, nécessaire de faire une étude complète sur l'antifongique pour pouvoir déterminer les conditions permettant une meilleure conservation de son activité et une meilleure action in-situ.

- Essai d'optimisation du milieu permettant la production de ces substances : Cette étude n'a concerné que les sources d'azote et de carbone (caséine et amidon) du milieu de culture M₂. Il serait intéressant d'optimiser les autres composés de ce milieu de culture.

Ces investigations ont permis de répondre à un certain nombre de questions. Mais, vu le besoin accru d'antifongiques lié à la forte incidence des infections fongiques ainsi que le nombre restreint en antifongiques non polyéniques existant actuellement, une recherche dans ce domaine paraît prometteuse. Les résultats obtenus bien que préliminaires, sont très intéressants et méritent d'être approfondis.

A

Al-Tai, A., Kim, B., Kim, S. B., Manfio, G. P. & Goodfellow, M. (1999). *Streptomyces malaysiensis* sp. nov., a new streptomycete species with rugose, ornamented spores. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1395–1402.

Athalye, M., Lacey, J., Goodfellow, M., (1981). Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *Appl. Bacteriol.* **51**: 289–297.

Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985). Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 86-98.

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

Augustine. S.K; Bhavsar. S.P; Baserisalehi M and Kapadnis. B.P. (2004). Isolation,characterisation and optimisation of antifungal activity of an actinomycete of soil origin ;*Ind. J. Exp. Biol.* **42**: 928-932

Awa Y., Iwai N., Ueda T., Suzuki K., Asano S., Yamaguishi J., Nagai K., et Wachi M.,(2005). Isolation of a new Antibiotic, Alaremycin, structurally related to 5-aminolevulinic Acid From *Streptomyces* sp. A012304. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **69**(9), 1721-1725.

B

Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N., (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J. Mycol. Méd.* **15** : 211–219.

Badji. B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*.Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.226 p

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

Barrett D. (2002). From natural product to clinically useful antifungals. *Bioch & Bioph Acta.*, 1587, 224-233.

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

Becker. B; Lechevalier. M.P; Gordon. R.E; and Lechevalier. H.A. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* 12: 421-423.

Becker. B; Lechevalier. M. P. and Lechevalier. H. A. (1965). Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 13(2), 236-243

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

Benallaoua S.,Nguyen Van P.,De Meo M P.,Coulon J.,Dumenil G et Bonaly R.(1990). Recherches sur le mode d'action d'un antifongique non polyénique (desertomycine) produit par une souche de *Streptomyces spectabilis*. *Can .J. Microbiol.*36: 609-616.

Berdy J., Aazalos A. and Mc Nitt K.L., (1987). CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.

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

Betina. V. (1973). Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatogr. 78 : 41-51.*

Boudjella. H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des Streptosporangium des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches.**Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger). pp177.**

Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N., (2006).Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sg 10* isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res. 161: 288-298.*

C

Cappuccino J G and Sherman N (1999). Microbiology-A laboratory manuel Harlow :Benjamin 263-264

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

Cassinelli. G ; Grein. A ; Orezzi. P ; Pennella. P ; and Sanfilippo. A. (1967). New Antibiotics Produced by Streptoverticillium orinoci, n. sp. *Archiv. für Mikrobiol. 55 : 358-368.*

Choulet. F. (2006). Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. **Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1, pp 210**

Coates. A; and Hu. Y. (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Brit. J. Pharmacol. 152 : 1147-1154.*

Colombié. V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. **Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.**

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

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2010.

D

Dairi. T. (2005). Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by Actinomycetes. *J. Antibio*, 58 (4), 227-243.

Danilenko. V.N; Mironov. V.A; and Elizarov. S.M. (2005). Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *App. Biochem. Microbiol.* 41(4)319–329.

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

Dembitsky V. M. (2005). Astonishing Diversity of Natural Surfactants: 2. Polyether Glycosidic Ionophores and Macrocyclic Glycosides. *Rev. Department of Organic Chemistry and School of Pharmacy, Hebrew University, Jerusalem, Israel.*, In: *Lipids*, 40: 219–248.

Deshayes. C ; Falconer. C ; Mazière. N ; Saddler. G ; Sanglier. J.J. et Sire. B. (1989). Sélection des souches productrices et caractérisation des molécules actives in Larpent. J.P ; Sanglier. J.J, *Biotechnologie des antibiotiques.*

Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A.M. (2002). Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.*, 99 (3), 187-198.

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

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

E

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

El-Sheekh M.M., Mohamed E.H. Osman, Mohamed A. Dyab, Mohamed S. Amer.(2006) Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Envir. Toxicol. Pharmacol.* **21**: 42–50

Euzeby J.P., (2002). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>.

G

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

Gesheva Victoria, (2009). Optimization of the Production Medium for Biosynthesis of Antifungal Antibiotic Ak-111-81 by Phosphate-Deregulated Mutant of *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**:20–24

Geursen R.,Heer P.,Kirkness B.,Loewenstein P .,Mees S.,Muschart J M.,Pickaert M. (2008). Mycoses.Des médicaments au service de l'humanité :1-3

Gordon. R.E; Barnett. D.A; Handarhan. J.E; and Hor-Nay-Pang. C. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24** : 54-63.

H

Harvey. I. (1999). Sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque. **Thèse de Doctorat. Université Laval (Canada). pp127.**

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

Houssam M. A, Bahobail A.S. and El-Sehrawi, M.H.,(2011). Studies on Isolation, Classification and Phylogenetic Characterization of antifungal substance produced by *Streptomyces albidoflavus*-143. *New York Science Journal*. 4(3)

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

I

Ismet1 A., Vikineswary S., Paramaswari1 S., Wong W.H., A. Ward, T. Seki, H.P. Fiedler and M. Goodfellow.(2004). Production and chemical characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. *World J Microbiol & Biotec* 20: 523–528.

J

Jakimowicz D., (2007). Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 61: 565-575.

Jois H.R.Y., Sarkar A., Gurusiddaiah S.,(1986). Antifungal macrodiolide from *Streptomyces* sp. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 30 (3), 458-464.

K

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

Kitouni. M; Boudemagh. A; Oulmi. L; Reghioua. S; Boughachiche. F; Zerizer. H; Hamdiken. H; Couble. A; Mouniee. D; Boulahrouf. A; Boiron. P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale* **15 : 45–51.**

Kitouni, (2007). isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques a partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. **Thèse de doctorat. pp 149**

Kovács.K., Antal.I., Stampf.G., Klebovich.I., and Ludányi.K. (2010). Composition Optimization and Stability Testing of a Parenteral Antifungal Solution based on a Ternary Solvent System. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **11(1) :285-293**

L

Lacey. J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* **4 :113–121.**

Lamari L., (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. **Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.pp153**

Larpent. J.J. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens, ed : *Tec et Doc, pp 280.*

Larpent JP, Sanglier JJ.(1989). In: Biotechnologie des antibiotiques. Paris: Ed. Masson. p. 481.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A., (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20:** 435-443.

Liu. W.C; Slusarchyk. D.S; Astle. G; Trejo. W.H; Brown. W.E; and Meyers. E. (1978). Ionomycin, a new Polyether Antibiotic. *J. Antibio.* **31 (9),** 815-819.

Loria A., (1986). The national institute of health quality control program. III. Fllox-up studies (phase 3). *Rev. Invest. Clin.,* **38: 435-440.**

M

Marchal. N; Bourdon; J.L. and Richard. Cl. (1987). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. **Doin editor. Paris,** pp. 67-122.

Martin J.E. (1992). Clusters of genes for biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *J. Indus. Microbiol.* **9: 73-90.**

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

Mc Manus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W. and Jones A.L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Ann. Rev. Phytopathol.,* **40: 443-465.**

Merck. E. (1975). Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. **Darmstadt. 149 p.**

Minnikin. D.E; Patel. P.V; Alshamaony. L; and Goodfellow. M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.,* **27: 104-117.**

Muiru W.M., Mutitu E.W., Mukunva D.M., (2008). Identification of selected actinomycetes isolated and characterisation of their metabolites. *J. Biol. Sci.*, **8** (6), 1021-1026.

N

Newman D.J., Cragg G.M. and Snader K.M. (2003). Natural product as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, **66** (7), 1022-1037.

O

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

Oskay M., (2011). Isolation and Purification of Two Metabolites (KGG32-A & KGG32-B) from a Soil Bacterium, *Streptomyces* sp., KGG32 *Int. J. Agric. Biol.*, **13**(3):369–374

Oskay M., (2011). Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp., KGG32. *Int. J. Agric. Biol.* **13**:317–324

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

Osman.M. M.(2004). Factors affecting the antifungal properties of *Brevibacterium linens*. *International Dairy Journal* **14**: 713–722

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

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

P

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

Pizzul.L. (2006). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. **Thèse de Doctorat. Université d’Uppsala (Suède).** pp 39.

R

Rautemaa R.,Richardson M.,Michael A.,faller P., Perheentupa J., saxen H.(2008). Activity of Amphotericin B, Anidulafungine, Caspofungin, Micafungin, Posaconazole and Voriconazole against *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 62 :182-185

Reghioua S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahfrouf A. (2008). Separation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolés de sol aride de la région de Biskra. *Sci & Technol c*. 28 : 59-64.

Rouessac F. (1992). Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. *Masson & Cie Ed, Paris*.

S

Schwarz. S ; Kehrenberg. C; Walsh. T.R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17:431–437.

Shirling. E.B; and Gottlieb. D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 16 (3), 313-340

Sierra. G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *J. Microbiol. Serol.*, 23: 15-22.

Singh. S.L; Baruah. I; and Bora. T.C. (2006). Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnol, 5 (2), 217-221.*

Smaoui.S (2010). Génie de Procédés et Environnement : Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. **Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.pp182.**

Staneck. J.L; and. Roberts. G.D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Environ. Microbiol, 28 (2), 226-231.*

Strub. C; Brandam. C; Meyer. X and Lebrihi. A. (2008). Investigations of *Saccharothrix algeriensis* Growth on Synthetic Media. *Journal of Bioscience and Bioengineering. 106 (2),148-153.*

T

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

Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in : *Microbiologie Industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier , Tech et Doc, V 612p, pp*

V

Vandeputte. V. (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France).pp 168.

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

Vijayakumar. R; Muthukumar. C; Thajuddin. N; Panneerselvam. A; and Saravanamuthu. R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, *21* (2), 59-65.

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

W

Westley. J.W; Evans. R.H Jr; Sello. L.H; Troupe. N; Liu. C; Blount. J.F; Pitcher. R.G; Williams.T.H; and Miller. P.A. (1981). Isolation and characterization of the first halogen containing polyether antibiotic x-14766a, a product of *Streptomyces malachitofuscus subsp. downeyi*. *J. Antibio.*, *34* (2), 139-147.

Williams S.T. and Fleming I., (1989). Spectroscopic methods in organic chemistry. 4th Ed. : Mc Graw Hill book company, London, p 264.

Yassin M.H; Shash S.M. and El-doraidy E.H., (2006). potentiality of actinomycete isolates against dermatophytic fungi biological, taxonomical studies and nutritional requirements for antifungal production of *streptomyces kaamyceticus* ehe-68. *proceeding of first scientific environmental conference*, , *zagazig univ.*, 133-152.

Yamaguchi. T. (1965). Comparison of the Cell-Wall Composition of Morphologically Distinct Actinomycetes. *J. Bacteriol.*, *89* (2), 444-453

Z

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

Zili.Z., Sfar.S., Fessi.H. (2005). Preparation and characterization of polycaprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Inter. J. Pharm.* *294* 261-267

Zitouni. A; Boudjella. H; Lamari. L; Badji. B; Mathieu. F; Lebrihi. A; and Sabaou. N. (2005). *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.*, 156 : 984–993.

Zitouni. A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp SA 103. **Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, (Algérie). pp 230.**

ANNEXE1

RÉVÉLATEURS CHIMIQUES UTILISÉS POUR LES ANTIBIOTIQUES

1- Diphénylamine-aniline : révélateur des glucides

* Solution à vaporiser : dissoudre 4 g de diphénylamine, 4 ml d'aniline et 20 ml d'acide phosphorique dans 200 ml d'acétone

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

2- Chlorure de fer ferrique (FeCl₃) : révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.

*Solution de vaporisation : solution de FeCl₃ de 1 à 5% dans HCl 0,5 N.

Les taches correspondant aux phénols sont colorées au bleu vert et celles des acides hydroxamiques, en rouge.

3- Ninhydrine : révélateur des amines, des acides aminés et des oses amines.

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

* Traitement complémentaire:chauffer à 105 °C jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette, rose).

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

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

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

5- Réactif de Tollens, Zaffaroni : révélateur des substances réductrices.

* **Solution a** : solution de nitrate d'argent 0,1 mol/l.

* **Solution b** : ammoniaque 5 mol/l.

* **Solution de vaporisation** : avant emploi, mélanger 1 volume de a et 5 de b.

* Traitement complémentaire : chauffer pendant 5 à 10 min à 105°C jusqu'à la coloration foncée maximale des tâches.

ANNEXE 2

MILIEUX DE CULTURE D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES ACTINOMYCETES

I. MILIEU D'ISOLEMENT : un seul milieu été utilisé

Milieu WILLIAMS (Williams et Kuster, 1964) (composition du milieu Williams modifié)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl : (50/75g); K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g; CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g; agar : 15g; glucose : 1g ; Eau distillée : 1000 ml. pH 7,2.

II. MILIEUX D'IDENTIFICATION

1. Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

1.1. Milieu ISP1

Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p : 1000 ml. pH = 7,2

1.2. Milieu ISP2

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

1.3. Milieu ISP3

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

* Solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O: 0.1 g ; eau distillée q.s.p. 100 ml.

1.4. Milieu ISP4

Amidon: 10 g ; K₂HPO₄: 1 g ; MgSO₄, 7H₂O: 1 g ; NaCl: 1 g ; (NH₄)₂SO₄: 2 g ;

CaCO₃: 2 g ;

Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

1.5. Milieu Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A) (Athalye et al., 1981)

Extrait de levure : 10g; glucose : 10g; agar : 18g; eau distillée q.s.p : 1000 ml. pH = 6,8.

2. Etude physiologique

2. 1. Dégradation des glucides et dérivés

-Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH₄)₂S₀4 : 2,64g ; KH₂PO₄ : 2,38g ; K₂HPO₄ : 5,65g; MgSO₄, 7H₂O : 1g; Solution saline* : 1 ml; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20g; pH : 6,8-7.

Solution saline: CuSO₄, 5H₂O: 0,64g; FeSO₄, 7H₂O: 0,11 g; MnCl₂, 4H₂O: 0,79 g; ZnSO₄, 7H₂O: 0.15 g; eau distillée : 1000 ml.

2. 2. Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80 : 10 ml ; NaNO₃ : 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline: 50 ml ; CaCl₂, 2H₂O: 0,1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml; agar : 18 g. pH 7,2.

* solution saline: K₂HPO₄: 0,25 g ; MgSO₄, 7H₂O: 0,125 g ; NaCl: 0,125 g ; FeSO₄, 7H₂O: 0,00 1 g ; MnSO₄ : 0,00 1 g ; eau distillée q.s.p. 50 ml.

La dégradation du tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

2. 3. Dégradation de la tyrosine, (Goodfellow, 1971 ; Gordon *et al.*, 1974)

0,4 g de tyrosine est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile pH 7,5 et maintenue en surfusion à 50°C.

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

2. 4. Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1987)

10 g d'amidon dans 100 ml de gélose nutritive. Une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

2. 5. Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles.

L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

2. 6. Dégradation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1974)

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

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

2. 7. Production de pigments mélanoides.

Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966)

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

2. 8. Production de nitrate réductase

La recherche de la nitrate réductase est effectuée grâce au réactif de Griess.

2. 9. Sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Le milieu Williams solide pour le test de sensibilité aux pH 5, 7, 9 et pH 11 et solide pour les tests de sensibilité au phénol, au tellurite de potassium et au chlorure de sodium.

ANNEXE 3

MILIEUX DE CULTURE POUR LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES

Milieu WILLIAMS modifié (Williams et Kuster, 1964)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl : (50 ou 75g); K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g; CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g; glucose : 1g ; Eau distillée : 1000 ml.
pH 7,2.

Milieu synthétique a base d'amidon (MSA)

MS (0,2 % (NH₄)₂SO₄; 0,02 % MgSO₄, 7H₂O; 0,05 % KH₂PO₄; 0,1 % K₂HPO₄; 0,2 % NaCl; eau distillée 1000 ml; pH 7,2) additionné d'amidon (0,5 %)

Milieu synthétique a base d'amidon (MSG)

MS (0,2 % (NH₄)₂SO₄; 0,02 % MgSO₄, 7H₂O; 0,05 % KH₂PO₄; 0,1 % K₂HPO₄; 0,2 % NaCl; eau distillée 1000 ml; pH 7,2) additionné de glucose (0,5 %)

Milieu synthétique a base d'amidon (MSEA)

MS (0,2 % (NH₄)₂SO₄; 0,02 % MgSO₄, 7H₂O; 0,05 % KH₂PO₄; 0,1 % K₂HPO₄; 0,2 % NaCl; eau distillée 1000 ml; pH 7,2) additionné d'amidon (0,5 %) et d'extrait de levure (0,3 %).

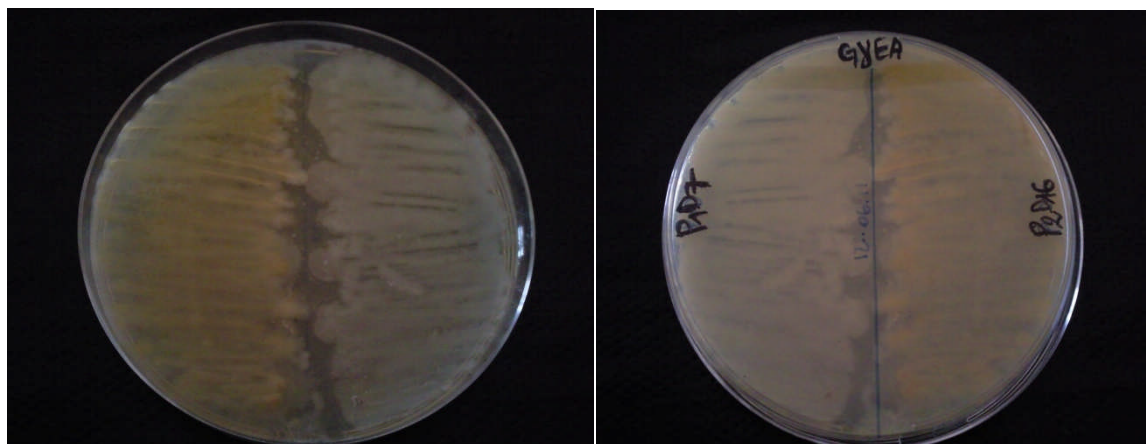


Figure 1 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu GYEA

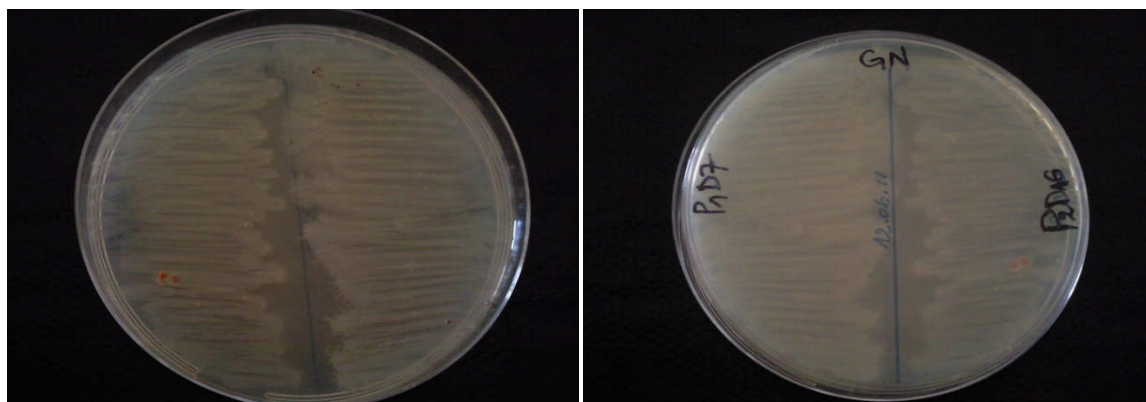


Figure 2 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu GN

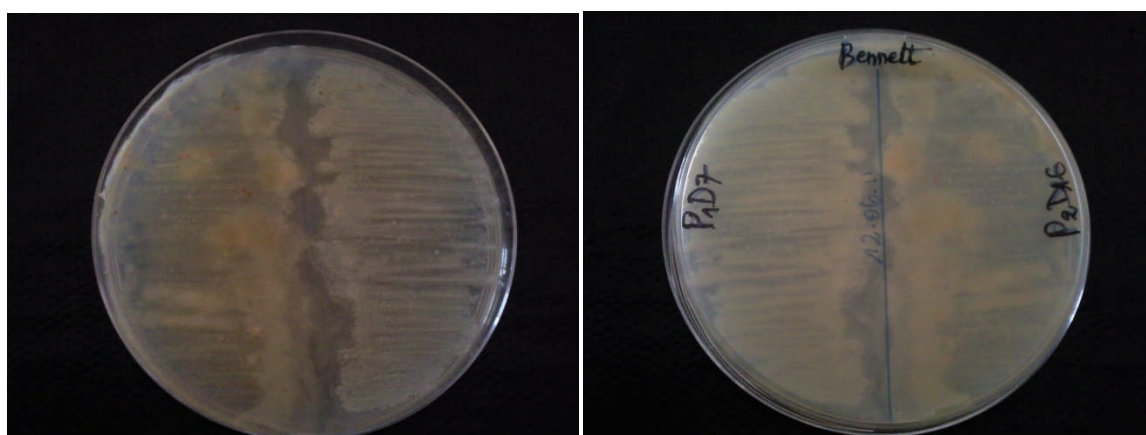


Figure 3 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu Bennett

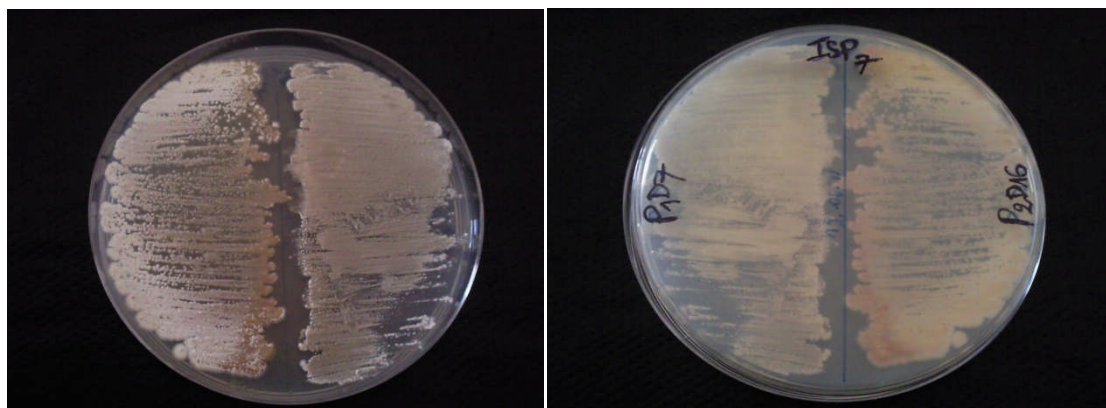


Figure 4 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu ISP₇

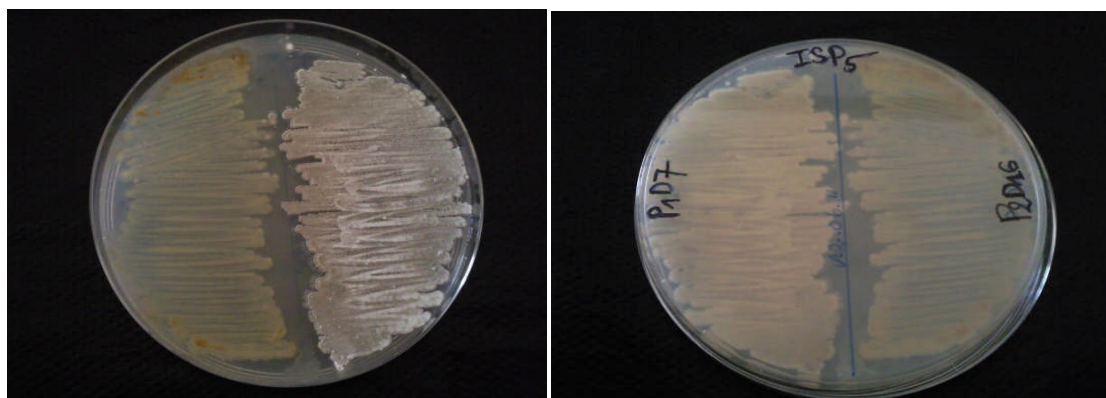


Figure 5 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu ISP₅



Figure 6 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu ISP₄



Figure 7 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu ISP₃



Figure 8 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu ISP₂

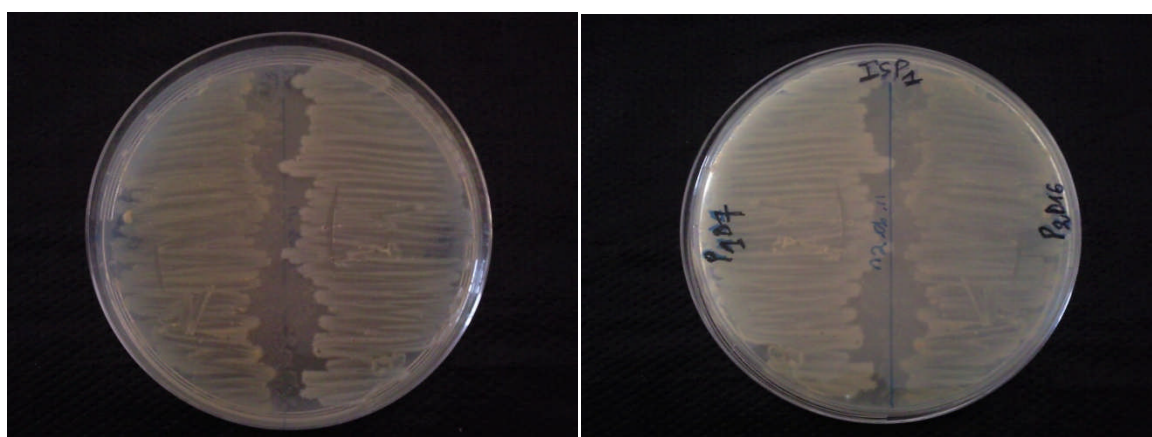


Figure 9 : Aspect des souches P₁D₇ et P₂D₁₆ sur le milieu ISP₁

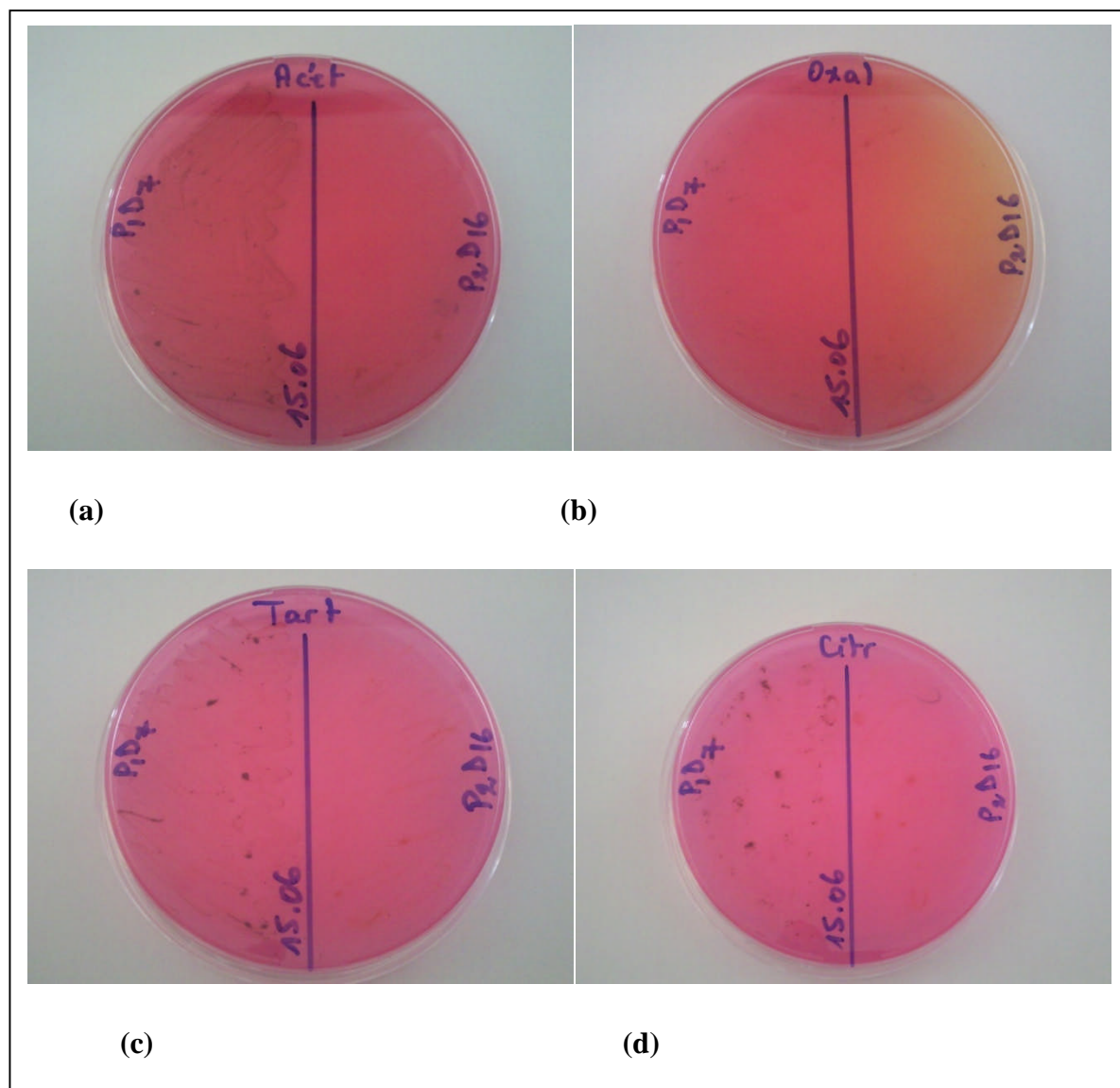


Figure 10 : Dégradation de quelques composés par les souches P₁D₇ et P₂D₁₆

- (a) : Acétate
- (b) : Oxalate
- (c) : Tartrate
- (d) : Citrate

ملخص

23 عزلة من صنف الاكتنوميستات تم عزلها من عينات من تربة Boulimat بولاية بجاية و Boussaâda بولاية مسيلة. من بينها، تسعة عزلات لديها نشاط كبير مضاد للفطريات الضارة. أشارت أطياف الأشعة فوق البنفسجية و المرئية للمستخلصات البوتانولية الخامة للعزلتين P1D7 و P2D16 انهما منتجتين لمضادات فطرية خالية من مركبات متعددة الروابط الهيدروجينية. لقد تم استخلاص المضادات الحيوية المنتجة من طرف العزلتين باستعمال خمس مديبات عضوية ان خلات الإيثيل و η بوتانول كانا الأفضل. سمح المزيج المذيب المتكون من أسيتونتريل / الماء (10/90) من فصل المضادات الحيوية للعزلتين. بين التفاعل اللوني للمستخلصات أنها تحتوي على الكربوهيدرات والكحولات. لقد تم كذلك اختبار استقرار هذه الجزيئات لفعل العديد من العوامل الفيزيائية والكيميائية. كشفت الدراسة المورفولوجية و الفزيولوجية ان العزلتين تابعتين للصنف *Streptomyces* كما بينت الدراسة الفزيولوجية امكانية نموها في اوساط تحتوي على 7 ٪ من كلوريد الصوديوم وقدرتها على النمو في درجة الحموضة تتراوح بين 4 و 11 و 6 درجة الحموضة كونها الأمثل. ويلاحظ كذلك قدرتها على النمو في 45 درجة مئوية. وكشفت دراسة أخرى أن الوسط M2 هو أفضل وسط لإنتاج هذه الجزيئات. وبعد ذلك تم تعديل تراكيز كلا من مصادر العنصرين الكربون والنيتروجين لهذا الوسط لتحسين انتاجها. الأخيرة.

الكلمات الرئيسية : عزلة ، النشاط المضاد الحيوي، استخراج المضادات الحيوية، توصيف، والتحسين.

Résumé

23 souches d'actinomycètes ont été isolées des sols de Boulimat de la Wilaya de Béjaïa et de Boussaâda de la wilaya de M'sila. Parmi celles-ci, 9 ont une activité antifongique importante. Les spectres UV-Visible des extraits butanoliques bruts actifs ont indiqué que les souches P₁D₇ et P₂D₁₆ produisent des antifongiques non polyéniques. L'acétate d'éthyle et le η-butanol se sont révélés comme étant les meilleurs solvants d'extraction de ces molécules. Le système Acétonitrile/eau (90/10) a permis une séparation optimale des substances bioactives. Les résultats des réactions chromogéniques de ces extraits montrent qu'ils contiennent des fonctions glucidiques, des fonctions alcool supérieurs ou stéroïdes, ainsi que des substances réductrices. La stabilité de ces molécules à l'action de plusieurs agents physico-chimiques est testée. L'étude morphologique et chimiotaxonomique indique l'appartenance des deux souches, au genre *Streptomyces*. Leur étude physiologique, a révélé leur tolérance de 7% de NaCl et leur capacité à se développer à des pH variant de 4 à 11 et le pH 6 étant l'optimum. Leur possibilité croître à 45°C est notée. Une autre étude a révélé que le milieu M₂ est le meilleur pour la production de ces molécules. Les sources de carbone et d'azote de ce dernier, ont été optimisées.

Mots clé : Actinomycètes, *Streptomyces*, activité antibiotiques, antifongique non polyénique, extraction des antibiotiques, caractérisation, optimisation.

Abstract

23 samples of actinomycetes were isolated from soils of Boulimat from Béjaïa and Boussaâda from M'sila. Among these isolates, 9 have an activity against pathogenic fungi. The UV-Visible spectra of the active butanolic extracts indicated that only the substances produced by P₁D₇ and P₂D₁₆ are non polyenic ones. The ethyl acetate and the η-butanol appeared like the best solvents of extraction of these substances. Acétonitrile/eau (90/10) allowed optimal separation of these ones. The results of the chromogenic reactions of these extracts show that they contain glucidic, alcohol superiors or steroids functions as well as reducing substances. The stability of these substances against the action of different physicochemical agents was tested. The morphological and the chimiotaxonomic studies indicate the membership of the samples to the *Streptomyces* kind. The physiological study of the strains revealed their tolerance until concentrations of 7% of NaCl, the capacity of them to develop at pH from 4 to 11 with an optimum at pH6. Their possibility to grow at 45°C was noted. Another study revealed that M₂ medium was the best one for the production of these molecules. The carbon and nitrogen sources of this medium are optimized.

Keywords: Actinomycetes, *Streptomyces*, antibiotic activity, non polyenic antifungal, antibiotic extraction, characterization, optimization.
