

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 Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes

Thème

Criblage de souches d'actinomycètes
productrices d'antifongiques non-polyéniques :
Identification des souches productrices et Essai
de caractérisation des antifongiques produits

Par M^{lle} BOUCHEFFA Karima

Soutenu leDevant le jury :

Mr BENALLAOUA S.	Professeur à l'UAMB	Président
Mme BENABDESSELAM F.	Maitre de conférences à L'UAMB	Examinatrice
Mr TOUATI A.	Maitre de conférences à l'UAMB	Examineur
Mr KECHA M.	Maitre de conférences à l'UAMB	Promoteur

Promotion 2010-2011

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 Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes

Thème

**Criblage de souches d'actinomycètes
productrices d'antifongiques non-polyéniques :
Identification des souches productrices et Essai
de caractérisation des antifongiques produits**

Par M^{lle} **BOUCHEFFA Karima**

Soutenu leDevant le jury :

Mr BENALLAOUA S.	Professeur à l'UAMB	Président
Mme BENABDESSELAM F.	Maitre de conférences à L'UAMB	Examinatrice
Mr TOUATI A.	Maitre de conférences à l'UAMB	Examineur
Mr KECHA M.	Maitre de conférences à l'UAMB	Promoteur

Promotion 2010-2011

REMERCIEMENTS

*J*e rends grâce à Dieu le seul et unique, qui m'a permis de supporter toutes les peines de la vie pour enfin arriver à ce que je suis.

*T*oute ma reconnaissance va à vous Mr KECHA, vous avez su être patient malgré mon caractère bien trempé. Merci pour votre sérieux, votre disponibilité ainsi que pour la totale confiance dont j'ai bénéficié

*J*e remercie Mr BENALLAOUA S., professeur à l'Université A/MIRA de Bejaia d'avoir présidé mon jury de soutenance, Mme BENABDESSELEM et Mr TOUATI pour avoir accepté la tâche d'examineur de ce mémoire.

*M*es remerciements vont également à l'ensemble du personnels des laboratoires où j'ai travaillé : merci pour votre accueil et disponibilité.

*M*es plus vifs et plus sincères remerciements à tous les Doctorants du système classique, vous avez su nous écouter, nous conseiller, et nous donner de votre précieux temps pour nous aider : Ibtissem, Samiha, Fahima, Betty, Karima, Sofiane et Mohamed et Bania ; trouvez ici la marque de ma reconnaissance éternelle.

*J*e ne peux oublier d'adresser un immense merci à toutes mes amies ; Ryma, Salima, Sabrina avec lesquelles j'ai partagé beaucoup de moments forts tout au long de ce mémoire entre rires et pleures, déprimés et bonheurs ; merci d'être la tous simplement.

*U*n grand merci à tous mes amis, vous êtes si nombreux que je ne peux citer tous le monde. Vous ne m'avez jamais laissé tomber, votre soutien je ne l'oublierai jamais : Yacine Zombie, Abderrahmane, Nabila, ammi Said, Naimati ...etc.

*J*e tiens absolument à dire que j'ai passé 2ans difficiles en Post-Graduation certes, mais pleins de moments inoubliables en compagnie des têtes brûlées de ma promotion (Vivent les filles ☺).

*J*e remercie tous les « ... » que j'ai oubliés de citer.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A la mémoire de ma mère, à qui je dois ce que suis devenue aujourd'hui, je regrette qu'elle ne soit plus là pour me fêter.

Regarde maman j'y suis presque, j'espère que tu es fière de moi .

Je t'aime maman

A toute ma famille pour son soutien de tous les instants.

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît
lorsqu'on la partage »

LISTE DES ABREVIATIONS

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 determine

R_f : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

UV-VIS : Ultraviolet-Visible.

INDEX DES ILLUSTRATIONS

N° Figure	Titre	Page
1	Structure d'une molécule menaquinone	08
2	Structure chimique de l'acide mycolique	09
3	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	13
4	Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P3D43	43
5	Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P4D10	43
6	Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P3D51	44
7	Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P4D1	44
8	Aspects des deux isolats P3D51 et P4D1 sur différents milieux de culture. a) Sur ISP1, b) sur ISP2, c) sur ISP3, d) sur ISP4, e) sur ISP5, f) sur ISP7, g) sur Bennett, h) sur GYEA	46
9	Aspect des mycelia des deux souches P3D51 et P4D1 sous microscope optique Gx40 : P4D1 (5a) et P3D51 (5b)	49
10	Profils chromatographiques des sucres obtenus pour les souches P4D1 et P3D51 : Profil Chromatographique sucres de la souche P4D1(6a), Profil Chromatographique des sucres de la souche P3D51 (6b).	52
11	Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat P3D51 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de champignons cibles	58
12	Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat P4D1 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de champignons cibles.	58
13	Effet du pH sur les extraits semi purs	64
14	Effet de différentes températures sur les extraits semi-purs.	65
15	Effet des surfactants sur les extraits méthanoliques semi-purs.	66
16	Evolution du pH sur milieux M2, ISP4, MSG, MSA, et MSAE de la souche P3D51.	69
17	Evolution du pH sur milieux M2, ISP4, MSG, MSA, et MSAE de la souche P3D51.	69
18	Cinétiques de production des antifongiques sur les milieux IM2, ISP4, MSG, MSA, MSAE par la souche P4D1.	70
19	Cinétiques de production de la souche P3D51 sur les milieux M2,ISP4,MSG,MSA,et MSAE	71

INDEX DES TABLEAUX

N° Tableau	Titre	Page
I	Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.	07
II	Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes.	08
III	Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes	11
IV	Les différentes classes d'antifongiques	18
V	Pics d'absorption en UV-visible des polyènes	19
VI	Liste des antibiotiques utilisés dans l'étude physiologique	34
VII	Les systèmes d'élution utilisés en CCM	36
VIII	Action antagoniste des 41 souches actinomycétales vis-à-vis de trois champignons filamenteux	41
IX	Caractéristiques macromorphologiques de la souche P4D1	47
X	Caractéristiques macromorphologiques de la souche P3D51	48
XI	Analyse des constituants cellulaires et pariétaux de l'isolat P4D1, par Chromatographie sur couche mince.	51
XII	Analyse des constituants cellulaires et pariétaux de l'isolat P3D51, par Chromatographie sur couche mince	51
XIII	Types de microorganismes halophiles	53
XIV	Caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat P4D1	55
XV	Caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat P3D51	56
XVI	Rapports frontaux du chromatogramme obtenu pour le système A/E	60
XVII	Les rapports frontaux des taches actives des deux souches	61
XVIII	Résultat du Test d'activité des extraits semi purifiés	61
XIX	Résultats des révélations chromogéniques de la souche P4D1	62
XX	Résultats des réactions chromogéniques de la souche P3D51	63
XXI	Effet de la durée de conservation sur les extraits méthanoliques	67
XXII	Résultats de l'analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P ₄ D ₁	72
XXIII	Résultats de l'analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P ₃ D ₅₁ .	72

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES ACTINOMYCETES : TAXONOMIE , ECOLOGIE , ET IMPORTANCE

1. Taxonomie des actinomycètes	3
1.1. L'Ordre des <i>Actinomycetales</i>	3
1.2. Evolution des critères d'identification	4
1.3. Critères actuels d'identification	5
1.3.1. Critères morphologiques	5
1.3.1.1. Caractères cultureux et macromorphologiques	5
1.3.1.2. Caractères micromorphologiques	5
1.3.2. Critères chimio taxonomiques	6
1.3.2.1. Les amino acides	6
1.3.2.2. Les sucres	6
1.3.2.3. Les lipides	7
1.3.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique	9
1.3.4. Critères moléculaires	9
1.3.4.1. Détermination du (G+C %).....	10
1.3.4.2. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S	10
1.3.4.3. Les hybridations ADN-ADN	10
1.3.4.4. Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes	11
2 .Ecologie des actinomycètes et distribution dans la nature.....	12
2.1. Ecologie des actinomycètes.....	12
2.2. Cycle de développement.....	12
2.3. Distribution dans la nature.....	13
2.4. Importance des actinomycètes.....	14
2.4.1. Importance en agronomie.....	14
2.4.2. Importance en biotechnologie	15

CHAPITRE III : INFECTIONS FONGIQUES ET TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES

1. Les infections fongiques	17
1.1. Les candidoses	17
1.2. Les aspergilloses	17
2. Classification des antifongiques	18
2.1. Les polyènes antifongiques	19
2.2. Les antifongiques non polyéniques	20

CHAPITRE II : TECHNIQUE DE PRODUCTION ET D'IDENTIFICATION DES ANTIFONGIQUES

1. Production de métabolites secondaires (antifongiques)	21
1.1. Effet de la composition du milieu de culture	21
2. Extraction	22
3. Purification des antifongiques	22
3.1. Chromatographie préparative sur plaque épaisse de gel de silice	22
3.2. Chromatographies préparatives sur colonne	23
3.3. Purification par HPLC	23
4. Identification des antibiotiques antifongiques	23
4.1. Spectroscopie en UV-visible	24
4.2. Spectroscopie dans l'infrarouge (IR)	24
4.3. Spectrophotométrie de masse	24
4.4. Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	24

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens	26
I-1 Origine et prélèvement des échantillons	26
I.2. Purification et conservation des souches	26
II. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes	26
II.1. Sélection des souches actives	27
II.2. Confirmation de l'activité antibiotique : test des cylindres d'agar	28
II.3. Etude des spectres UV-visible des extraits des souches sélectionnées	28
III. Etude taxonomique des actinomycètes sélectionnés	28
III.1. Etude morphologique	28
III.1.1. Macromorphologie	28
III.1.2. Micromorphologie	29
III.2. Etude chimiotaxonomique	29

III.2.1. Obtention de la biomasse mycélienne	29
III.2.2. Analyse des acides aminés pariétaux.....	29
III.2.3. Analyse des sucres cellulaires	30
III.2.4. Caractérisation des acides mycoliques	31
III.3. Etudes des caractères physiologiques	32
III.3.1. Production de pigments mélanoides	32
III.3.2. Production de nitrate réductase.....	32
III.3.3. Croissance sur milieu solide à différentes concentration en NaCl	32
III.3.4. Croissance à différents pH.....	32
III.3.5. Croissance à différentes températures	32
III.3.6. Utilisation des composés glucidiques.....	33
III.3.7. l'utilisation des acides aminés	33
III.3.8. Dégradation de divers autres composés organiques	33
III.3.9. Tests de sensibilité à divers agents chimiques.....	33
IV. Production, extraction, purification partielle et caractérisation des antibiotiques synthétisés	35
IV.1. Production des antibiotiques en Erlenmeyers	35
IV.2. Extraction des antibiotiques et antibiographie.....	35
IV.2.1. Extraction des antibiotiques	35
IV.2.2. Antibiographies et choix du solvant d'extraction	36
IV.3. Mise en évidence des antibiotiques par bioautographie	36
IV.3.1. Préparation des plaques de gel de silice	36
IV.3.2. Choix du système de solvants	36
IV.3.3. Développement des plaques	37
IV.3.4. Révélations microbiologiques ou bioautographie	38
IV.3.5. Révélations chimiques des antibiotiques.....	38
IV.4. Semi purification	39
V. Etude de la stabilité de l'antifongique	39
V.1. Effet du pH.....	39
V.2. Effet de la température	39
V.3. Effet des surfactants	40
VI. Cinétique de production en fonction des milieux de culture	40

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Criblage des actinomycètes producteurs d'antifongiques	41
I.1.Mise en évidence de l'activité antifongique	41
I.2. Détection des polyènes	43
II. Etude taxonomique des isolats d'actinomycètes	45
II.1. Etude morphologiques des souches P4D1 et P3D51	45
II.1.1.Macromorphologie.....	45
II.1.2.Micromorphologie	49
II.2. Etude Chimiotaxonomique	50
II.3 .Etude physiologique.....	52
II.3.1. Tolérance au NaCL.....	52
II.3.2. Croissance à différents pH.....	53
II.3.3. Détermination de la T°C optimale de croissance.....	53
II.3.4. Production de pigments mélanoides	54
II.3.5. Autres tests.....	54
III. Etude des antifongiques non polyéniques produits	58
III.1.Choix du meilleur solvant d'extraction.....	58
III.2.Détermination du meilleur système d'élution	59
III.3.Biautographies.....	60
III.4.Semi purification des antifongiques.....	61
III.5.Révélation chromogéniques	61
IV. Etude de la stabilité des molécules produites.....	64
IV.1.Stabilité par rapport au pH.....	64
IV.2. Stabilité à la température.....	64
IV.3.Stabilité en présence de surfactants (tensioactifs).....	65
IV.4.Effet de la conservation.....	66
V. Cinétique de production des antifongiques	68
V.1.Choix du meilleur milieu de production.....	68
V.2.Evolution du pH.....	68
V.3.Effet des milieux de cultures sur la production d'antifongiques	69
V.4.Analyse statistique	72
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	76
ANNEXES	

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

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

Les actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif, présente Malgré la lenteur de leur croissance et leur faible pouvoir compétitif, une aptitude formidable à produire de nombreuses substances probiotiques et antibiotiques leur conférant un rôle essentiel dans les interrelations entre les microorganismes en intervenant sur la distribution de certains groupes, ainsi que dans les interactions plantes-sols. Ces propriétés font que les actinomycètes sont souvent préconisés dans le cadre de la lutte biologique contre les maladies des végétaux (Goodfellow et Williams, 1983).

Cependant, les actinomycètes sont surtout connus pour leur grande faculté à produire des antibiotiques, avec plus de 70 % des substances actives d'origine microbienne (Omura, 1992) et en particulier le genre *Streptomyces* qui produit à lui seul la majorité de ces antibiotiques.

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

Candida albicans et certaines espèces d'*Aspergillus* telles que *A. fumigatus*, *A. flavus* ainsi que *A. niger*, *A. nidulans* et *A. terreus* sont notamment responsables de la majorité des mycoses invasives (Badji *et al*, 2006)

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

Cependant, nombre de composés, les polyènes en particulier, ne peuvent pas être utilisés à cause de leur toxicité, à l'exemple de la néphrotoxicité non négligeable de l'amphotéricine B (Georgopapadakou et al, 1994).

Les molécules antifongiques disponibles ne réunissent pas les critères définissant l'antibiotique idéal : toxicité spécifique vis-à-vis du champignon pathogène, bonne diffusion dans l'organisme, large spectre d'activité in vivo, absence de problèmes liés à l'apparition de souches résistantes et absence d'effets secondaires (Lacroix et al, 2003).

C'est pour cela que les recherches actuelles de nouvelles molécules sont orientées vers l'isolement de nouvelles souches et espèces de différents écosystèmes particuliers, souvent ignorés par le passé, avec une variété de nouvelles cibles (Cragg *et al.*, 1997), notamment les sols des palmeraies, des sebkha (Zitouni *et al.*, 2005 ; Boughachiche *et al.*, 2005), des sources thermales ainsi que les sols salins en vue de l'obtention de nouvelles biomolécules d'attraits.

Dans la même optique, nous avons cherché à étudier des souches d'actinomycètes productrices de métabolites antifongiques provenant de sols pollués d'une décharge publique de la région de Boulimat commune de Bejaia.

La première partie ce travail traite (bibliographie) traite de la taxonomie des actinomycètes, de leur écologie ainsi que de leur importance. Un aperçu sur les antifongiques existants est également donné.

La seconde partie dite expérimentale s'occupe de plusieurs aspects :

- la mise en évidence des activités antibiotiques des isolats d'actinomycètes ;
- l'étude taxonomique des souches pourvues d'activité ;
- l'extraction de ces activités avec des solvants organiques non miscibles avec l'eau, et essai de caractérisation des extraits bruts actifs.

Enfin la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi qu'à leurs discussions.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES ACTINOMYCETES : TAXONOMIE, ECOLOGIE, ET IMPORTANCE

1. Taxonomie des actinomycètes

1.1. L'Ordre des *Actinomycétales*

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes et sont rattachés à l'Ordre des *Actinomycétales* créée par Buchanan en 1917. Plusieurs réévaluations systématiques récentes de l'ordre reflètent l'intégration de données moléculaires notamment la séquence du gène ARNr 16s.

Actuellement, le phylum Actinobacteria tel qu'il figure dans le Bergey's manual (2007) renferme une seule classe : Actinobacteria, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des Actinomycétales), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces.

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 quant au développement de leur cycle de vie.

L'ordre des *Actinomycétales* comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *etc.*) (Oskay *et al.*, 2004 & Srivibool et Sukchotiratana, 2006).

Les Streptomycètes représentent l'un des taxa appartenant à l'ordre des Actinomycétales qui renferment une diversité de morphotypes, comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés. En effet, la famille *Streptomycetaceae* comprend 10 genres : *Streptoverticillium*, *Streptacidiphilus*, *Microellobosporia*, *Kitasatospora*, *Kitasatoa*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Actinosporangium*, *Actinopycnidium* et *Streptomyces* et plus d'une centaine d'espèces. Cependant, les genres *Actinosporangium*, *Actinopycnidium*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Microellobosporia* et *Kitasatoa*, suite à l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire, notamment, le séquençage de l'ADNr 16s, ont été assimilés au genre *Streptomyces*. (Bergey's manual, 2007).

Toutefois, le statut taxonomique des genres *Streptovercillium* et *Kitasatosporia* est devenu incertain depuis que les membres de ces genres ont fait l'objet d'analyses phylogénétiques. En effet, Witt et Stackebrandt, (1990) ont proposé l'unification des genres *Streptomyces* et *Streptovercillium*, alors que Wellington *et al.* (1992) ont proposé que le genre *Kitasatosporia* devait être synonyme du genre *Streptomyces* sur la base des analyses phénétiques et des homologies des séquences de l'ARNr 16s (Ochi et Hiranuma, 1994 et Kämpfer, 2006).

1.2. Evolution des critères d'identification

Au cours de cette évolution, quatre périodes distinctes ont marqué la systématique des actinomycètes.

La première période, qui s'est étendue jusqu'au début des années 1960, a vu une systématique essentiellement d'ordre descriptif, basée sur les caractéristiques macro et micro morphologiques (Pridham *et al.*, 1958). Ces critères ont trouvé leur limite à partir du moment où l'Ordre des *Actinomycétales* a commencé à s'agrandir.

La seconde période, qui a débuté à partir des années 60, a vu le développement de la chimie taxonomique. Ainsi, la composition des parois cellulaires en acides aminés et des cellules entières en sucres ont permis d'apporter plusieurs clarifications notamment chez les deux principaux genres, *Streptomyces* et *Nocardia*, où une grande confusion régnait auparavant (Becker *et al.*, 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1970a). Il en est de même pour l'analyse des lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques (Mordarska *et al.*, 1972; Minnikin *et al.*, 1977), les phospholipides (Minnikin *et al.*, 1977), les ménaquinones (Collins et Jones, 1981) et les acides gras (Grund et Kroppenstedt, 1990). Ces critères chimiques, combinés aux descriptions morphologiques, se sont révélés être, jusqu'à l'heure actuelle, un outil très efficace pour l'identification des genres d'actinomycètes.

La troisième période, qui a débuté dans les années 70, a vu l'avènement de la taxonomie numérique assisté par ordinateur. Le but était de clarifier l'identification des espèces. Le principe consiste à traiter avec un logiciel approprié les résultats de plusieurs dizaines de tests physiologiques et biochimiques dont chacun a le même poids taxonomique. Le logiciel permet d'obtenir un dendrogramme montrant les pourcentages de similitude entre les espèces dont la position taxonomique a ainsi été clarifiée pour plusieurs d'entre elles (Goodfellow, 1971; Athalye *et al.*, 1985; Goodfellow *et al.*, 1990; Grund et Kroppenstedt, 1990).

La quatrième période débuta à partir des années 80, avec le recours à l'outil moléculaire pour déterminer les parentés phylogénétiques entre les actinomycètes. Pour cela, plusieurs techniques ont été utilisées, telles que l'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine - cytosine), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et 23S, etc. (Stackebrandt et Woese, 1981). Ces analyses étaient d'un apport considérable dans la reconnaissance des parentés phylogénétiques entre les actinomycètes à l'échelle des espèces, des genres et même des familles composant l'Ordre des *Actinomycetales* (Stackebrandt *et al.*, 1997; Labeda *et al.*, 2001).

1.3. Critères actuels d'identification

1.3.1. Critères morphologiques

1.3.1.1. Caractères cultureux et macromorphologiques

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

Parmi les caractères cultureux importants

- La production d'un mycélium aérien (MA) (cas de nombreux genres) ou non (ex *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus* ;
- La présence ou non de mycélium du substrat (MS) ;
- La couleur du MA et du MS. La couleur exacte peut être définie à l'aide d'une charte de couleur ;
- La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

1.3.1.2 Caractères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants selon **Nouredine**, (2006) et **Boudjella, *et al.***, (2007) sont :

- La fragmentation ou non du MS ;
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur la MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes) ; la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) ;
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores
- La présence de spores mobiles (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*,

Actinoplanes) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres...);

- La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou la présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotés ou synnemata (*Actinosynnema*) (Demain et Solomon, 1986).

Mais bien qu'il soit parfois possible de classer une souche sur la base de critères morphologiques tout à fait évident, ceux-ci ne suffisent pas pour établir une détermination correcte et il est indispensable de considérer d'autres caractères (Lechevalier et Lechevalier, 1980).

1.3.2. Critères chimio taxonomiques

Les études menées 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.

1.3.2.1. Les amino acides

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée soit d'une :

- ❖ glycoprotéine contenant de la **lysine** ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustrées par le genre *Actinomyces*.
- ❖ glycoprotéine contenant le plus souvent l'**acide LL- 2,6 diaminopimélique (DAP)** ; ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, tel que les *Streptomyces*.

Les actinomycètes avec des parois cellulaires de type I possèdent principalement de l'acide diaminopimélique de forme LL, cependant que la forme méso de ce même acide est caractéristique des types II, III et IV.

La glycine est également présente en quantité importante chez les *Streptomyces* et les *Actinoplanetes* (Larpent et Sanglier, 1989).

1.3.2.2. Les sucres

La présence ou l'absence de quatre sucres (arabinose, galactose, xylose et madurose) dans les hydrolysats acides de cellules entières permet de classer les actinomycètes de type pariétal II, III et IV contenant du méso-DAP. Sur cette même base, il est aussi possible de

répartir en deux sous-groupes les actinomycètes de type pariétal III selon la présence ou l'absence de Madurose.

Becker *et al.*, (1965), Yamaguchi (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970b) divisèrent les actinomycètes en huit chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires, et dont les plus importants sont les quatre premiers. **(Tableau I).**

Tableau I : Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.

Chimiotype	D.A.P.		Gly.	Lys.	Orn.	D.A.B.	Sucres			
	LL	DL					Ara. + Gal.	Xyl. +	Rha. +	Mad.
I C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
IIIC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IIIE	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IV A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
VI	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
VII	-	-	+	v	-	+	-	-	-	-
VIII	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Note : I, II, III, ..., VIII : définis par Becker *et al.*, (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique (DAP), la présence ou non de glycine (Gly.), de lysine (Lys.), de l'ornithine (Orn.) ou de l'acide diaminobutyrique (DAB). A, B, C, D et E : définis par Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur les sucres taxonomiquement importants : l'arabinose (Ara.), le galactose (Gal.), le xylose (Xyl.), le madurose (Mad.) et le rhamnose (Rha.).

+ : présent. - : absent. v : variable suivant les espèces d'un même genre.

1.3.2.3. Les lipides

Les lipides taxonomiquement important peuvent être représentés par trois groupes : les lipides polaires, les ménaquinones et les acides mycoliques.

▪ 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 (Tableau II).

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

Type de PL	PE	PC	PG	P Glycérol	Exemples de genres
PI	-	-	-	v	<i>Actinomadura</i> <i>Nocardioides</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> <i>Amycolatopsis</i> , <i>Kutzernia</i> <i>Saccharothrix</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiopsis</i> , <i>Pseudonocardia</i> <i>Saccharopolyspora</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Streptosporangium</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Micrtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i> <i>Cellulomonas</i>

Note : tous les actinomycètes possèdent le phosphatidyl inositol.

- **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).

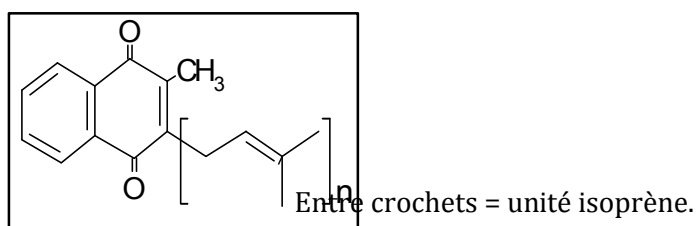


Figure n°1 : Structure d'une molécule ménaquinone (Lamari, 2006).

- **Les acides mycoliques**

Ce sont des composés pariétaux constitués de 20 à 90 carbones, présents uniquement chez certains genres tels que *Mycobacterium* (80 carbones), *Nocardia* (50 C) et *Corynebacterium* (30 C) (chimiotype IVA). Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence (Mordarska *et al.*, 1972). Leur structure générale est la suivante:

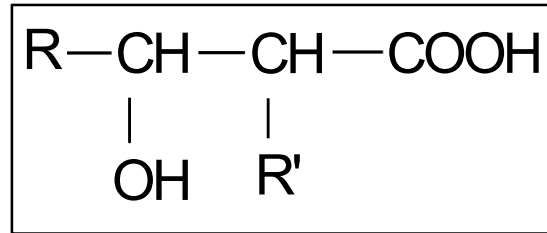


Figure n°2 : Structure chimique de l'acide mycolique (Zitouni, 2005).

- **Les acides gras :** ce sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre (Kroppenstedt *et al.*, 1990; Rainey *et al.*, 1996).

1.3.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents), ainsi que la tolérance au pH, à la température, à la salinité, etc.

Bien que les tests physiologiques aient été utilisés depuis très longtemps, en même temps que les descriptions morphologiques, leur efficacité réelle n'est apparue que lorsqu'ils ont été exploités en taxonomie numérique.

L'utilisation de la taxonomie numérique par le biais d'outils informatiques de calcul a permis de surmonter les difficultés inhérentes aux interprétations des grands résultats obtenus (ou matrices complexes) et rendre ainsi possible l'utilisation des résultats de ces tests dans la taxonomie des actinomycètes (Goodfellow, 1971).

Les taxons étudiés sont comparés entre eux pour déterminer les degrés de ressemblances. Ces degrés sont définis par un indice de similarité dont les plus utilisés en microbiologie sont ceux de Sokal et Michener et de Jaccard (Sneath, 1989).

1.3.4. Critères moléculaires

Dès 1936, Kluyver et Van Niel proposaient l'utilisation d'une taxonomie phylogénétique, mais les outils nécessaires au développement d'une telle taxonomie n'étaient pas disponibles et il fallut attendre la deuxième moitié du 20ème siècle pour qu'une taxonomie phylogénétique commence à se mettre en place.

1.3.4.1. Détermination du (G+C %)

En 1949, Chargaff et ses collaborateurs, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre. Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN.

1.3.4.2. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

C'est une technique très fiable pour l'identification des actinomycètes (Weisburg *et al.*, 1991 ; Cook et Meyers, 2003).

Stackebrandt et ses collaborateurs (1981, 1983), ont été les premiers à utiliser cette technique pour la taxonomie des actinomycètes. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un gène chromosomique d'une taille de 1500 paires de bases, présent chez toutes les bactéries, dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes.

L'étude de l'ADNr 16S, utilise deux techniques de base : la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage. Cette analyse de l'ADNr 16S a été utilisée ces dernières années pour les groupes à un niveau supra-génique (Famille, Ordre et même Classe) (Rainey *et al.*, 1996 ; Labeda et Kroppenstedt, 2000).

1.3.4.3. Les hybridations ADN-ADN

Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : Si les ADN des deux bactéries présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche. Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses (Smaoui, 2010).

1.3.4.4. Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes

L'identification des genres d'actinomycètes s'effectue sur la base des critères morphologiques et chimiques. Une clé d'identification est donnée dans le tableau III.

2 .Ecologie des actinomycètes et distribution dans la nature

2.1. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont retrouvés presque partout dans la nature. Ils constituent une part importante de la microflore tellurique: 10 à 20% ou parfois plus (Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95% du total des actinomycètes (Lacey, 1973 ; Elwan *et al.*, 1985). Après *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (Dommergues et Mangenot, 1970). Les autres genres ne constituent qu'une fraction minime et sont parfois peu fréquents ou même assez rares.

La plupart des Actinomycètes sont saprophytes mais quelques uns peuvent être pathogènes ou symbiotes des plantes et des animaux (Suzuki *et al.*, 1994).

En générale, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe (Ensign *et al.*, 1993).

Physiologiquement, il est possible de distinguer les formes aérobies qui sont de très loin les plus nombreuses, et des types anaérobies trouvés primitivement chez les animaux et l'homme. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant les 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

2.2. Cycle de développement

Les actinomycètes ont cycle de développement complexe (figure 3), il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifie. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (Kim *et al.*, 2004 ; Smaoui, 2010)

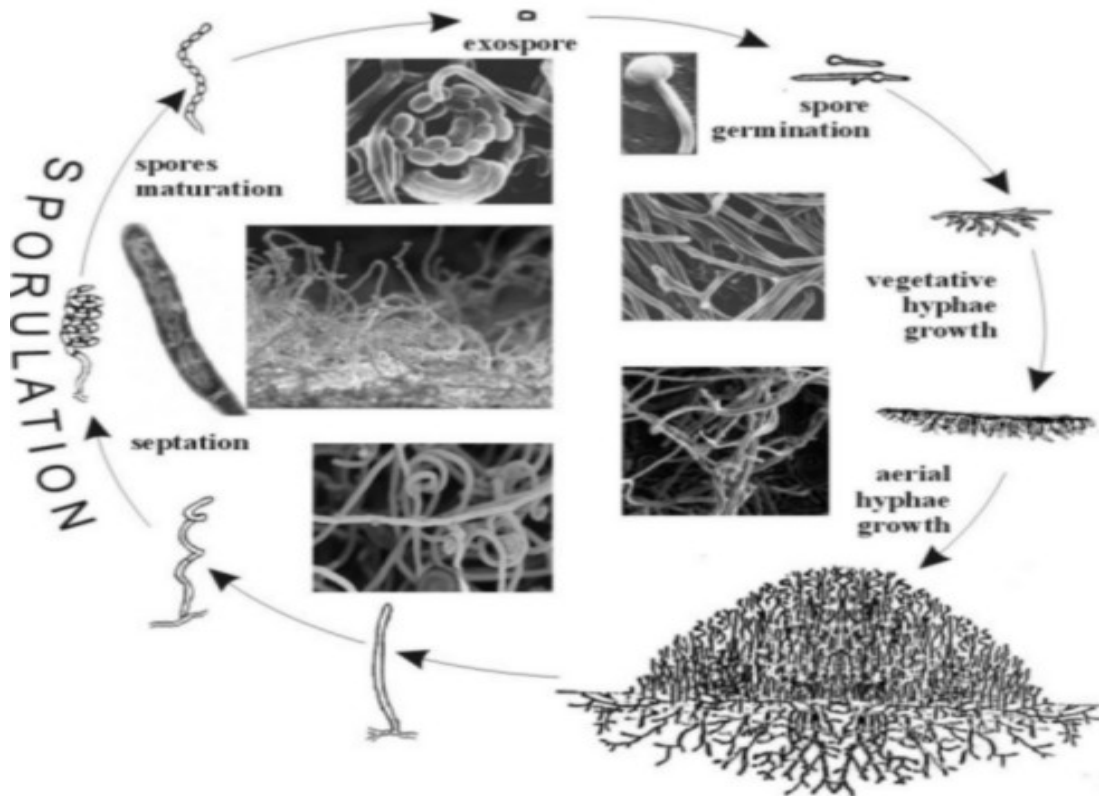


Figure 3 : Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Jakimowicz, 2007).

2.3. Distribution dans la nature

Les actinomycètes sont largement répandus dans le monde. Leur nombre dépend de nombreux facteurs, dont la nature et l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'aération et l'humidité (Theilleux, 1993).

- **Les sols :** Bien que les premières souches d'actinomycètes aient été isolées de sources humaines et animales respectivement par **COHN** en **1875** et **NOCARD** en **1888**, c'est le sol qui en est certainement le réservoir le plus riche, réservoir à partir duquel ces microorganismes peuvent envahir de nombreux biotopes.

Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui est responsable de l'odeur d'humus caractéristique des sols (Zaitlin *et al.*, 2003).

Ils sont retrouvés dans les sols polaires gelés en permanence tout comme dans des sols désertiques chauds et secs, les sols hautement contaminés par des métaux lourds, les sols pollués par les hydrocarbures et les grottes naturelles (Moncheva *et al.*, 2002).

Dans les sols sahariens d'Algérie, les *Streptomyces* constituent entre 15 et 60 % de la totalité des microorganismes et peuvent même dépasser les 85 % dans les horizons profonds des sols des palmeraies (Sabaou *et al.*, 1992).

- **Le milieu marin :** Certaines souches d'actinomycètes ont été retrouvées dans des environnements marins (Singh *et al.*, 2006 & Imada *et al.*, 2007), dans des sédiments situés à plus de 4000 m de profondeur (Khattabi *et al.*, 2002).

Ils sont présents dans les fonds fluviaux ou lacustres. La colonisation normale du milieu marin est un point controversé, selon les uns, il existerait une flore d'actinomycètes spécifique aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; selon d'autres, les actinomycètes isolés de ces milieux correspondraient à des souches terricoles adaptées à la salinité marine (Larpen et Sanglier, 1989).

Les actinomycètes sont également présents dans les lacs extrêmement alcalins, les lacs salés, en revanche il semblerait qu'ils sont absents dans les eaux minières très acides (pH <1) et les sources thermales très chaudes d'origine volcaniques (Lechevalier, 1981).

- **La faune, la flore et l'Homme :** Contrairement aux bactéries et aux champignons, seules quelques espèces d'Actinomycètes sont pathogènes (Badji, 2006). Des exemples d'espèces endophytiques et phytopathogènes ont été répertoriées, les meilleurs exemples : *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* et *Streptomyces turgiscabies*, responsables de la gale de la pomme de terre (Coombs et Franco, 2003).

En pathologie humaine, plusieurs genres sont responsables d'infections ou d'actinomycoses. Certaines espèces du genre *Actinomyces* semblent avoir un rôle dans le développement des caries dentaires (Sarkonen *et al.*, 2000). Le genre *Nocardia* comprend aussi, plusieurs espèces responsables de pathologies chez les animaux et chez l'Homme à l'exemple de *Nocardia asteroides*, responsable de la nocardiose humaine ; (Zhang *et al.*, 2003). D'autres espèces tels que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, agents de la tuberculose et de la lèpre.

2.3. Importance des actinomycètes

2.3.1. Importance en agronomie

Les actinomycètes représentent un pourcentage élevé de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires, qui leur

confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique dans le sol. En plus de leurs fonction de décomposition très actives, les actinomycètes apparaissent avoir de l'importance parmi la microflore de la rhizosphère. En effet les dernières années les différents aspects des interactions actinomycètes-plantes ont fait l'objet d'études étendues (Valois, 1996).

Le genre *Frankia* est très connu en foresterie pour son rôle dans la fixation d'azote atmosphérique en symbiose dans les nodules racinaires de certains arbres dicotylédones (autres que les légumineuses) comme le casuarina, l'orme, l'aulne, etc. (Becking, 1974).

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

Les actinomycètes ont un rôle important dans les processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Goodfellow *et al.*, 1984). Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, etc., (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Ils sont aussi capables de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (Holzapfel *et al.*, 2002).

2.3.2. Importance en biotechnologie

L'hétérogénéité biochimique des actinomycètes, leur diversité écologique et leur exceptionnelle capacité à produire des métabolites secondaires font d'eux des producteurs potentiels de nombreux composés intéressants en industrie pharmaceutique et alimentaire (Abbas, 2006).

Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent 50% de la population totale des actinomycètes telluriques, et 75-80% des antibiotiques dérivent de ce genre (Mellouli *et al.*, 2003)

Les actinomycètes gagnent en importance, car c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs (Valan arasu *et al.*, 2009), ce qui fait d'eux des producteurs intéressants en industrie pharmaceutique.

Ainsi, de nombreux métabolites sont synthétisés, qui peuvent être des : antibiotiques, enzymes telles que les enzymes alcalines (Li *et al.*, 2005), les transglutaminases, les xylanases et cellulases utilisées dans le traitement des sous-produits (Rawashdeh *et al.*, 2005),

des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des immunomodulateurs (Badji , 2006), des herbicides, des pesticides ou des antiparasitaires (Oskay *et al.*, 2004).

Actinomycètes sont de remarquables producteurs d'antibiotiques (figure), les *Streptomyces* sont particulièrement prolifiques (Oskay *et al.*, 2004). Ainsi, 80% des antibiotiques commercialisés proviennent de ce genre (Thakur *et al.*, 2007), à savoir : la streptomycine, la novobiocine, la nystatine, etc. D'autres genres producteurs peuvent être cités : *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardiopsis*, et *Saccharothrix*.

Parmi les molécules élaborées par les Actinomycètes, seulement 20% représentent des antifongiques (Sanglier *et al.*, 1993).

Tableau III : Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes basée sur les critères chimiques et morphologiques

caractéristiques chimiques						caractéristiques morphologiques	genres
DAP	glycine	sucres	acides mycoliques	Phospho-lipides (P)	ménaquinones (MK)		
LL	+	NC	-	PII	MK9 (H6,H8)	chaînes de spores sur MA	<i>Streptomyces</i>
LL	+	NC	-	PI	MK8 (H4)	MA et MS fragmentés	<i>Nocardioïdes</i>
LL	+	NC	-	PIII	MK9 (H4)	MA (-), sporanges sur MS avec une spore	<i>Kineosporia</i>
DL	+	xyl.-arab.	-	PII	MK9 (H4),10(H4)	MA (-), spores isolées sur MS	<i>Micromonospora</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4),10(H8)	MA (-), chaînes de spores sur MS	<i>Catellatospora</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4),10(H4)	MA (-), sporange globuleux avec nombreuses spores mobiles	<i>Actinoplanes</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4,H6,H8)	MA (-), sporange en masse avec peu de spores mobiles	<i>Dactylosporangium</i>
DL	+	" "	-	PI	MK9 (H4), 10(H4)	MA (-), chaînes de spores non mobiles	<i>Glycomyces</i>
DL	-	madurose	-	PI	MK9 (H6)	MA (+), 2 à 15 spores par chaîne sur MA	<i>Actinomadura</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H2,H4,H6)	MA (+), spores agencées par 2 sur MA	<i>Microbispora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H0,H2,H4)	MA (+), 2 à 15 spores par chaîne sur MA	<i>Microtetrastora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK10 (H4)	MA (-), 10 à 30 spores par chaîne au dessus du MS	<i>Herbidospora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H2)	MA (+), sporanges avec une spore mobile sur MA	<i>Planomospora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H2,H4)	MA (+), sporanges avec deux spores mobiles sur MA	<i>Planobispora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H2,H4)	MA (+), sporange avec nombreuses spores non mobiles sur MA	<i>Streptosporangium</i>
DL	-	"	-	PI, PII	MK9 (H4,H6)	MA (+), sporange avec nombreuses spores mobiles sur MA	<i>Spirillospora</i>
DL	-	Arab.-gal.	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	MA(+), MA et MS fragmentés	<i>Nocardia</i>
DL	-	" "	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	MAv (-), cycle mycélium-batonnet-cocci	<i>Rhodococcus</i>
DL	-	" "	-	PII	MK9 (H2,H4)	MA (+), MA et MS fragmentés	<i>Amycolatopsi</i>
DL	-	" "	-	PII	MK9 (H4)	MA (+), spores isolées sur MA	<i>Saccharomonosporas</i>
DL	-	" "	-	PIII	MK9 (H4)	MA (+), chaînes de spores sur MA	<i>Saccharopolyspora</i>
DL	-	Rham.-gal.	-	PII, PIV	MK9 (H'), 10(H4)	MA (+), chaînes de spores sur MA fragmenté	<i>Saccharothrix</i>
DL	-	NC	-	PIII	MK10 (H2,H4,H6)	MA (+), chaînes de spores sur MA fragmenté	<i>Nocardiopsis</i>
DL	-	NC	-	PII, PIV	MK9 (H2,H4), 10(H4,H6)	MA (+), spores isolées sur MA	<i>Thermomonospora</i>
DL	-	NC	-	ND	MK7 et MK9	MA (+), endospores isolées sur MA et MS	<i>Thermoactinomyces</i>

Note: DAP, acide diaminopimélique; NC, non caractéristique; ND, non déterminé; arab., arabinose; gala., galactose; xyl., xylose; MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat. Phospholipides: PI, pas de phospholipides azotés; PII, présence de phosphatidyléthanolamine (PE); PIII, présence de phosphatidylcholine; PIV, présence de PE et de phospholipide avec glucosamine (PG); PV, PG avec phosphatidylglycérol. Ménaquinones prédominants (=MK): exemple MK9 (H4) = ménaquinone à 9 unités isoprènes possédant 4 sites d'hydrogénation (2 unités isoprènes saturées par atomes d'hydrogènes.

CHAPITRE II : INFECTIONS FONGIQUES ET TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES

1. Les infections fongiques

Les infections fongiques systémiques restent des affections graves et leur incidence est en progression significative. A côté de l'apparition de mycoses d'importation dues à la multiplication des voyages, la cause principale de cette croissance réside dans l'augmentation considérable des facteurs de risques et plus particulièrement du nombre croissant de patients à risque immunodéprimés liés au virus du sida, aux avancées en transplantation et en oncologie, à l'utilisation de cathéters vasculaires et au recours fréquent à des antibiothérapies à large spectre.

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

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

1.1. Les candidoses

Les infections causées par les souches de *Candida* représentent la principale cause des infections fongiques nosocomiales (80 %). Les souches de *Candida* peuvent produire une grande variété d'infections, allant des infections légères mucocutanées aux infections invasives (septicémie). Il existe au-delà de 150 espèces de *Candida*. Cependant, le *Candida albicans* (*C. albicans*) est responsable de la majorité des infections (Rex et al, 2000 cité par Carle, 2003)

1.2. Les aspergilloses

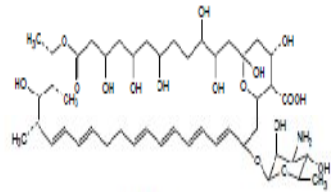
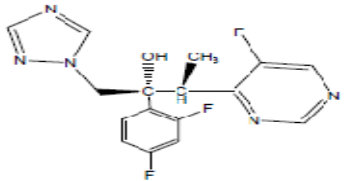
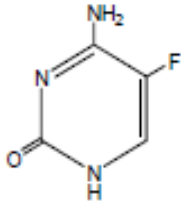
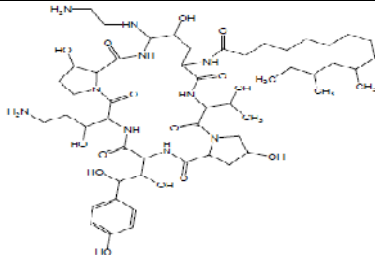
L'*Aspergillus* est le deuxième pathogène fongique après le *Candida*. Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment rencontrées en clinique sont l'*Aspergillus fumigatus* et l'*Aspergillus flavus*. Les autres espèces communes sont l'*A. niger*, l'*A. nidulans* et l'*A. terreus*. *Aspergillus fumigatus* est de loin l'espèce qui semble avoir le plus grand pouvoir pathogène.

Une aspergillose invasive chez l'humain représente une infection très sérieuse. Elle affecte principalement les poumons, mais parfois les sinus et le Système Nerveux Central de l'hôte (Carle, 2003).

2 .Classification des antifongiques

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), et sont résumées dans le tableau IV.

Tableau IV : les différentes classes d'antifongiques (Million, 2006 ; Tulkens, 2008)

Classes d'antifongiques	Cible	Mécanisme d'action	Structure chimique
Polyènes : -Nystatine (fongicide)	Membrane fongique	Augmentation de la perméabilité membranaire par formation de complexes avec l'ergostérol	 Nystatine
Azolés : -voriconazole (fongistatique)	Membrane fongique	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	 Voriconazole
Fluoro-pyrimidines -Flucytosine (Fongistatique)	Acides nucléiques	Perturbation de la synthèse protéique (substitution de la 5FU à l'uracyle dans l'ARN) Altération de la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthétase	
Candines -Caspofungine (Fongicides pour Candida Fongistatique pour Aspergillus)	Paroi fongique	Inhibition de la B (1-3) D glucane synthétase	

Cependant les antifongiques les plus utilisés dans le traitement des mycoses sont les molécules macrolides polyéniques.

2.1. Les polyènes antifongiques

Ils constituent une famille ayant plusieurs traits en communs :

- Structure chimique rapprochée, avec un noyau fermé par lactonisation (Macrolactone), avec des doubles liaisons conjuguées (-CH= CH) n , de caractère lipophile et une facette hydrophile avec des groupes hydroxyles ;
- Spectre très large ;
- Résistance fongique rare, et toxicité élevée par voie parentérale (Neuman, 1990).

Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores (Vandeputte, 2008) transmembranaires. La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite de composants intracellulaires, et notamment d'ions K^+ , à l'origine de la lyse cellulaire (Lemke *et al.*, 2005).

D'après Brautas *et al.*, (2000), les polyènes sont subdivisés en plusieurs sous groupes où chacun d'entre eux est caractérisé par des maxima d'absorption en UV- visible.

Tableau V : Pics d'absorption en UV-visible des polyènes (Martin, 1979)

Polyènes	Longueur d'ondes (nm)		
	1 ^{er} pic	2 ^{ème} pic	3 ^{ème} pic
Triènes	283	272	262
Tetraènes	318	304	291
Pentaènes	350	331	317

L'exemple type des macrolides polyéniques est l'amphotéricine B. Cette dernière secrétée par *Streptomyces nodosus*, est une molécule de référence qui représente le premier antifongique d'administration intraveineuse et qui possède un effet fongicide le plus efficace (Smaoui, (2010).

Malgré leur efficacité, les polyènes trouvent des limitations d'applications en thérapeutiques vue leur toxicité vis à vis des cellules hôtes ainsi que des effets secondaires importants notamment des fièvres, céphalées, collapsus et des réactions anaphylactiques.

Actuellement, l'attention est de plus en plus tournée vers la recherche de molécules antifongiques non polyéniques et d'origine naturelle, ayant comme site d'action des cibles autres que l'ergostérol.

2.2. Les antifongiques non polyéniques

D'après Berdy *et al.*, 1987, Ces substances appartiennent à plusieurs familles d'antibiotiques, et présente un mécanisme d'action autre que celui des polyènes.

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

Ils jouent un rôle moins important en thérapeutique que les polyènes, mais leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans la lutte contre certains champignons phytopathogènes est relativement courante (Vandamme, 1985).

Parmi tous les antifongiques non polyéniques commercialisés, la griséofulvine joue un rôle important en thérapeutique humaine dans le traitement des mycoses superficielles et sous cutanées. Cependant, de nombreuses molécules ont trouvés une application dans le domaine agricoles : l'antimycine A, l'auréofungine, la blasticidine S, le cycloheximide, l'ézomycine, la kasugamycine, les polymixines B et D, la gramicidine, la phytoactine, la validamycine, etc. (Deacon, 1984 ; Misato, 1982).

CHAPITRE III : TECHNIQUE DE PRODUCTION ET D'IDENTIFICATION DES ANTIFONGIQUES

1. Production de métabolites secondaires (antifongiques)

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. Pour découvrir de nouveaux composés ayant une bio activité prometteuse, plusieurs méthodes onéreuses, comme la recherche de nouveaux microorganismes producteurs par criblage de différentes sources biologiques particulières, ont été utilisées (Mellouli *et al.*, 2003 ; Miao *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2008)

Le rendement des composés bioactifs est généralement augmenté suite à l'optimisation des facteurs chimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligoéléments, etc.) et physiques (température, pH, aération, etc.) pour la croissance microbienne.

1.1.Effet de la composition du milieu de culture

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.

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 (essentiellement Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}), affectent fortement la production de la molécule antifongique de type macrolide non polyénique, la AK-111-81, par *Streptomyces hygroscopicus*.

La biosynthèse des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate : induction et répression de la biosynthèse, rétro inhibition et inactivation enzymatique (Martin et Demain, 1980). Les sels minéraux jouent un rôle de régulation non négligeable, mais leur épuisement n'altère pas pour autant l'initiation du métabolisme secondaire.

2. Extraction des antifongiques

L'extraction liquide-liquide à l'aide des solvants organiques non miscibles avec l'eau est considérée comme une étape de purification partielle. A l'issue de la fermentation, l'antibiotique est présent à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique (comprenant les cellules, des éléments du milieu et différents métabolites).

Généralement, les molécules bioactives passent dans la phase aqueuse. Le choix du solvant d'extraction est primordial. Il doit non seulement avoir une forte capacité d'extraction et une sécurité d'emploi, mais aussi assurer la stabilité des molécules lors de l'extraction ainsi que leur concentration par distillation.

3. Purification des antifongiques

Pour purifier les antibiotiques, de nombreuses techniques ont été décrites en littérature. Elles varient selon les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées. Parmi toutes les techniques décrites, celles se rapportant à la chromatographie liquide restent les plus utilisées et permettent une purification totale des antibiotiques.

3.1. Chromatographie préparative sur plaque épaisse de gel de silice

Les techniques analytiques utilisées précédemment ont été transposées en techniques préparatives pour de plus grandes quantités d'antibiotiques. La préparation des plaques et le protocole d'expérimentation sont les mêmes que pour les plaques de couches minces sauf que l'épaisseur est fixée cette fois-ci à 0,5 mm (donc 50 g de poudre de silice mélangé à 120 ml d'eau distillée). Deux cent à trois cent microlitres d'extrait concentré sont déposés progressivement en ligne continue à l'aide d'une micropipette, à 3 cm du bord inférieur et à 2 cm des bords latéraux des plaques (Badji, 2006).

La migration se fait conjointement avec des petites plaques qui servent à une bioautographie de manière à localiser avec précision les zones actives. Les zones présentant une activité intéressante sont récupérées par grattage de la poudre de silice. Les produits sont désorbés dans du méthanol sous agitation pendant 2 h à température ambiante.

Des verres frittés permettent de séparer le gel de silice du solvant avec aspiration par le vide à l'aide d'une pompe à eau. Le filtrat limpide obtenu est ensuite évaporé à sec au rotavapeur. Le résidu est repris dans un minimum de méthanol et son activité est contrôlée par antibiographie (Badji, 2006).

3.2. Chromatographie préparative sur colonne

L'objectif général de la chromatographie préparative est d'obtenir des quantités adéquates des produits, c'est une technique qui est capable à elle seule de remplacer une chaîne de méthodes chimiques telles que l'extraction liquide-liquide, la distillation, ou encore la cristallisation fractionnée (Rosset, 1999).

Les fractions obtenues sont repérées par leur couleur et recueillies séparément et leur temps de sortie est noté. Lorsque la récolte des fractions est terminée, on vérifie leur pureté par chromatographie sur couches minces ainsi que leur activité par antibiographie (Badji, 2006).

3.3. Purification par HPLC

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 (Badji, 2006). La colonne C18 est très souvent utilisée pour séparer les antibiotiques qui sont généralement de polarité moyenne (Zitouni, 2005).

La phase mobile la plus utilisée est un gradient méthanol-eau. Lorsque l'équilibre entre la silice greffée et le mélange est établi, les constituants les moins polaires de la phase éluant (solvant organique) s'adsorbent préférentiellement à la surface des chaînes hydrocarbonées.

La phase inverse est la plus utilisée pour purifier les antibiotiques notamment ceux extraits par des solvants organiques à polarité faible ou moyenne (Lamari, 2006).

4. Identification des antibiotiques antifongiques

Les techniques spectrales combinées à des réactions chromogéniques, sont utilisées pour rechercher la présence de certains groupements chimiques caractéristiques dans les molécules d'antibiotiques (liaison conjuguées, certains groupements fonctionnels ; etc.), ou encore pour détecter la présence de certains types d'antibiotiques comme les polyènes présentant des spectres d'absorption caractéristiques en UV-visibles (Charin et Aszalos, 2002).

4.1. Spectroscopie en UV-visible

Permet également de connaître le degré de saturation des molécules (présence ou non de doubles liaisons) (Lindenfelser *et al.*, 1964 & Bastide *et al.*, 1986).

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 (Dinya et Sztaricskai, 1986) sont aisément détectés par spectroscopie UV-visible.

4.2. 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).

Le domaine des infrarouges s'étend du spectre visible (environ 400 à 900 nm) jusqu'aux ondes hertziennes (environ 1010 à 1011nm), assurant ainsi la continuité du spectre des radiations électromagnétiques (Pouilly, 2009).

4.3. Spectrophotométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique qui permet de caractériser des molécules purifiées ou présentes en très faible quantité, de l'ordre du femtomole (soit 10⁻¹⁵), au sein d'un mélange. Cette technologie nécessite que les biomolécules soient volatilisées et ionisées pour être analysées (Auvin-Guette, 2002). Il existe deux méthodes différentes pour ioniser les biomolécules qui permettent d'avoir les masses molaires et parfois même la structure des substances analysées avec une grande certitude.

4.4. Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique polyvalente utile aussi bien en analyse quantitative que structurale. Elle est généralement utilisée en complément des autres méthodes de spectroscopie classiques et de la spectrométrie de masse pour localiser les atomes, de préciser la formule développée et la stéréochimie du composé étudié. 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 (Diop, 1998).

MATERIEL
ET
METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Isolement, purification et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens

I-1 Origine et prélèvement des échantillons

Des souches d'actinomycètes ont été recherchées dans des échantillons de sols, effectués dans l'environnement d'une décharge public dans la région de Boulimat située à l'ouest du chef lieu de la wilaya de Bejaia. Le prélèvement des échantillons a été mené en avril 2010, par l'équipe du Dr KECHA.

Les différents prélèvements ont été réalisés dans des conditions stériles, à proximité d'une flamme et jusqu'à 20 cm de profondeur et cela en utilisant un dispositif tubulaire stérile.

Les 3 premiers centimètres en surface ont été éliminés et le transport vers le laboratoire a été effectué à température ambiante. Les échantillons de sol ont été utilisés immédiatement sans conservation.

I.2. Purification et conservation des souches

Les souches d'actinomycètes isolées ont été purifiées par repiquages successifs sur milieu Williams (M2) en présence d'antifongique.

Les isolats ainsi purifiés sont conservés à 4°C sur des tubes de gélose inclinée contenant le même milieu, en vue d'études ultérieures.

II. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes

Les souches d'actinomycètes ré-isolées sur milieu M₂; ont fait l'objet d'une sélection pour leur activité antibiotique. Le test d'antagonisme (cylindres d'agar) vis-à-vis des germes cibles utilisés a permis de mettre en évidence l'activité de ces souches contre les champignons.

Les souches qui ont montré le plus large spectre d'activité vis-à-vis des germes cibles testés ont donc été retenues.

II.1. Sélection des souches actives

➤ Germes cibles

Pour la mise en évidence des activités antibiotiques des souches d'actinomycètes, 7 sept champignons filamenteux appartenant à un seul genre ont été utilisés.

- *Aspergillus carbonarius* A731C ;
- *Aspergillus flavus* NRLL
- *Aspergillus flavus* 391 : producteur d'aflatoxine B1
- *Aspergillus flavus* B3 : producteur d'aflatoxine B1
- *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 ;

Mises généreusement à disposition par le Dr RIBA A. de l'université de Boumerdés.

- *Aspergillus. niger* 2CA936 ;
- *Aspergillus parasiticus* CB5 ;

Appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie de l'ENS de Kouba dirigé par le Professeur SABAOU N.

➤ Standardisation de l'inoculum des germes cibles

La méthode utilisée est celle de la mesure de la densité optique (DO), à l'aide d'un Spectrophotomètre SHIMADZU UV 1240, d'une suspension (de spores pour les champignons), couplée à un dénombrement sur cellule de Malassez.

La charge de l'inoculum utilisé est de 10⁷UFC/ml (Matan and Matan, 2008).

➤ Culture des actinomycètes à tester

Les souches d'actinomycètes ont été testées par la méthode des cylindres d'agar (Bastide et al., 1986), vis-à-vis de tous les germes cibles. Ce test consiste à ensemençer l'actinomycète en stries serrées sur le milieu M₂.

Après incubation à 28°C pendant 10 jours, des cylindres de 6mm de diamètre sont découpés et déposés sur des boîtes de Pétri préalablement ensemençées avec les différents germes cibles.

Les boîtes sont incubées à 28°C/48h à 72h après un passage de 2 h au réfrigérateur. Les zones d'inhibition sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse.

II.2. Confirmation de l'activité antibiotique : test des cylindres d'agar

Il consiste à ensemencer par écouvillonnage (ou par inondation) les germes cibles (10^7 spores/ml) d'une culture (de 4 jours) sur milieu gélosé à l'extrait de malt. Des cylindres d'agar portant des colonies d'actinomycètes, de 06 mm de diamètre, découpés à l'aide d'un emporte pièce sont déposés sur les géloses précédemment citées. Avant l'incubation, les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 2 heures afin de permettre une bonne diffusion de (s) substance (s) antibiotique (s), éventuellement produite (s).

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en mm, après 48h à 4 jours d'incubation pour les champignons filamenteux.

II .3. Etude des spectres UV-visible des extraits butanoliques des souches sélectionnées

Cette étude vise à avoir une première idée générale sur les substances produites par les actinomycètes.

L'étude des spectres UV-visibles permettent la distinction entre les composés polyéniques à toxicité cellulaire prouvée, et les composés non polyéniques particulièrement recherchés comme substituts aux composés précédemment cités .cette étude spectroscopique a été employée par plusieurs auteurs (Lindenfelser *et al.*, 1964 & Bastide *et al.*, 1986).

Dans notre cas, les spectres des produits finaux purs solubilisés dans du méthanol sont déterminés entre 190 et 500 nm à l'aide d'un appareil UV-visible shimadzu UV 1800.

Le spectre UV-visible est déterminé en premier lieu sur les extraits butanoliques bruts, pour noter la présence ou non de polyènes, lesquels présentent 3 pics caractéristiques.

Insuffisante pour identifier une structure, cette technique elle permet toutefois de détecter les composés aromatiques et les systèmes insaturés et conjugués.

III. Etude taxonomique des actinomycètes sélectionnés

III.1. Etude morphologique

1. Macromorphologie

Cette étude consiste à déterminer la couleur des mycélia aérien et du substrat ainsi que celle des pigments solubles produits, sur différents milieux de culture : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5 préconisés lors de « l'International *Streptomyces* Project » ou ISP (Shirling et Gottlieb, 1966) et souvent aussi sur le milieu GYEA (Athalye *et al.*, 1981). La composition des milieux est donnée en annexe.

1. Micromorphologie

Elle est observée sur les différents milieux cités précédemment, à l'aide d'un microscope optique Zeiss, en utilisant les grossissements (10x10) et (10x40). Elle consiste à voir les structures en place et la sporulation caractéristique des souches étudiées, ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat.

III.2. Etude chimiotaxonomique

Cette étude consiste, en plus des études morphologiques, à compléter l'identification du genre. Les analyses sont effectuées sur des hydrolysats ou des extraits cellulaires, par chromatographie descendante sur papier pour la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique ou DAP (forme LL ou DL) et la présence ou non de glycine au niveau pariétal, par chromatographie ascendante sur couche mince, pour connaître la composition cellulaire en sucres et en phospholipides membranaires et pour noter la présence ou non d'acides mycoliques. L'étude chimique est un bon critère de distinction des différents groupes d'actinomycètes (Nouredine, 2006).

III.2.1. Obtention de la biomasse mycélienne

Les souches d'actinomycètes sont cultivées sur milieu M2 solide à 28°C pendant 10 à 14 jours. Le mycélium est alors récupéré par grattage et séché à 37°C pendant 2 à 3 heures.

III.2.2. Analyse 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 et de la lysine.

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

- Une hydrolyse acide des mycélia des deux souches dans du HCl 6N pendant 18h à 100°C.
- 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 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**

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** (1974) ;

- 15µl de chaque hydrolysat cellulaire sont déposés sur du papier Whatman n°1, et sur couche mince pour chacune des deux méthodes.
- 10µl de solution aqueuse de l'acide diaminopimelique (DAP) (FLUKA) contenant les deux isomères LL et DL (0,01M), et de solution de glycine et de la lysine (0,2% w/v) ;
- Un développement est effectué en utilisant le solvant méthanol-eau distillée-acide Chlorhydrique (6N)-pyridine (80/17,5/5/10 v/v) (*Awa et al.*, 2010 ; *Kitouni*, 2007).
- Séchage à température ambiante puis 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).

III.2.3. Analyse des sucres cellulaires

Les méthodes de caractérisation des sucres utilisées sont celles de **Lechevalier et Lechevalier** (1970b) et **Staneck et Roberts** (1974) modifiées. Comme pour la caractérisation des acides aminés pariétaux, ces deux techniques se différencient par le type de migration du chromatogramme à savoir, la chromatographie descendante à front perdu pour la première méthode et la chromatographie ascendante pour la seconde.

Les méthodes consistent en la caractérisation des sucres cellulaires après une hydrolyse ménagée avec du H₂SO₄.

- Hydrolyse des mycéliums secs par l'acide sulfurique 1N pendant 2h à 100°C ;
- Neutralisation des hydrolysats avec une solution saturée d'hydroxyde de baryum,
- Élimination du précipité blanc 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 chromatographies.

➤ **Analyse des chromatographique des hydrolysats**

- 20 µl de chaque hydrolysats sont déposés sur du papier Whatman n°1 et sur couche mince de même que 15 µl de chaque solution aqueuse standard des sucres suivants : arabinose, galactose, glucose, ribose, xylose, mannose, rhamnose.
- Les chromatogrammes sont développés chromatographie descendante dans un système de solvant composé par la partie supérieure : d'un mélange de *n*-butanol- eau distillée-pyridine-toluène (5/3/3/1 v/v/v/v) ;
- Le système de solvant utilisé pour la chromatographie ascendante est la partie supérieure du mélange *n*-butanol- eau distillée-pyridine-toluène (10/6/6/2 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.

III.2.3. Caractérisation des acides mycoliques

La présence ou pas d'acides mycoliques des les parois cellulaires est également un important critère dans la classification des Actinomycétales. La méthode utilisée est celle décrite par **Minnikin *et al.* (1975)** selon les étapes suivantes :

- 100mg de mycélium sec sont mélangés à 5ml de méthanol pur, 5ml de toluène et 0,2 de H₂SO₄ concentré (dans des tubes hermétiquement fermé), et mis dans un bain marie à 50°C/16H.
- 2 ml de *n*-hexane sont ajoutés au mélange refroidi.
- Après décantation, on obtient deux phases distinctes, seule la phase supérieure est retenue pour la chromatographie

➤ **Analyse chromatographique des hydrolysats**

- 10µl sont déposés sur des plaques minces de gel de silice.
- Les plaques sont développées dans un système solvant composé d'un mélange d'éther de pétrole (b.p.60 – 80°C) et d'éther di éthylique (85 – 15, v/v).

- Les plaques sont séchées à température ambiante, et développées une seconde fois dans un mélange méthanol – eau (5/2 ; v/v).
- La révélation est effectuée à l'aide d'une solution d'acide chromique diluée au 1/10^{ème} dans de l'eau (solution mère: 5g K₂Cr₂O₇ + 5 ml H₂O + qsp. 100 ml H₂SO₄ concentré) et les taches sont visualisées après chauffage pendant 5 à 10 min. à 150°C (coloration noir).

III.3. Etudes des caractères physiologiques

1. Production de pigments mélanoïdes

L'observation des pigments mélanoïdes est réalisée sur les milieux gélosés ISP6 et ISP7 recommandés à cet effet par Shirling et Gottlieb (1966).

2. Production de nitrate réductase

La mise en évidence du nitrate réductase se fait sur bouillon nitrate. La recherche du nitrate réductase est effectuée grâce au réactif de Griess (Marchal et Bourdon, 1973).

3. Croissance sur milieu solide à différentes concentration en NaCl

Une colonie d'actinomycète estensemencée sur de gélose M₂ à différentes concentrations de NaCl. Les concentrations étudiées sont 0%, 1,5%, 3%, 5%, 7%, 10%, 13%, 15%. Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivie par observation des colonies chaque 24h pour toutes les souches. Le nombre de colonies et les caractéristiques macromorphologiques pour chacune des concentrations sont notés. Pour chacune des concentrations, trois essais ont été réalisés.

4. Croissance à différents pH.

La même procédure que précédemment est suivie. Les valeurs de pH étudiées sont les suivantes : 3 ; 5 ; 7 ; 9 et 11.

5. Croissance à différentes températures

La croissance des isolats a été étudiée à huit températures différentes (20, 25, 30, 35, 37, 40, 45 et 50°C) sur le milieu M₂. La lecture a été faite après 5 jours en comparaison avec le témoin cultivé à 28°C (Smaoui, 2010).

6. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone

Le milieu de base utilisé est l'ISP9, préconisé par **Goodfellow (1971)**. Les glucides sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1 %. 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. Les glucides testés comme seule source de carbone sont les suivants : glucose, galactose, fructose, maltose, ribose, mannose, saccharose, arabinose, raffinose, rhamnose, xylose, lévulose, lactose, tréhalose, sorbitol, inositol, et glycérol

7. l'utilisation des acides aminés (Gordon *et al.*, 1974).

Le milieu préconisé est l'ISP9 additionnée par 1ml d'une solution saline. La concentration d'acide aminé est de 10g/L. Les acides aminés testés sont : méthionine, asparagine, cystéine, arginine, leucine, alanine, histidine, tyrosine, serine et thréonine.

Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des acides aminés et en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant de l'acide aminé sert de témoin positif.

8. Dégradation de divers autres composés organiques

- Hydrolyse de la tyrosine (Goodfellow 1971, Gordon *et al.*, 1974). La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.
- Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974). L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.
- Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1973). Une goutte d'une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.
- Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957). La dégradation du tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.
- Utilisation des sels de sodium. Les sels utilisés sont : oxalate, citrate, tartrate et acétate. La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré de l'orange au rouge-rose (Gordon *et al.*, 1974).

9. Tests de sensibilité à divers agents chimiques

- **Sensibilité aux antibiotiques** : ce test est réalisé sur gélosé M2 semi-molle.

Tableau VI : Liste des antibiotiques utilisés dans l'étude physiologique.

Antibiotique	Concentration	Famille
Ticarcilline (TIC)	75	B-lactamines
Gentamycine(CN)	15	Aminosides
Acide Nalidixique(AN)	30	Quinolones
Colistine (CS)	50	Polypeptides
Amykacine (AK)	10	Aminosides
Trimethoprim	1,25	Sulfamides
Sulfamethoxazole (SXT)	23,75	

- **La sensibilité au Crystal violet** (à 0,001 %),
- **La sensibilité au téllurite de potassium** (à 0,005 et 0,01 %),
- **La croissance en présence de l'azide de sodium** (à 0,001 % et 0,01 %), **et du phénol** (à 0,05 % et 0.1%).

Le milieu utilisé durant les tests cités plus haut est le milieu GYEA préconisé par **Athalye et al. (1985)**.

IV. Production, extraction, purification partielle et caractérisation des antibiotiques synthétisés.

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

IV.1. Production des antibiotiques en Erlenmeyers

Deux méthodes sont utilisées pour la production des antibiotiques.

Méthode N°1 :

Elle utilise en premier lieu des prés cultures (volume de 3ml) qui serviront à ensementer des volumes plus importants (50ml). Ces pré cultures âgées de 3 jours sont préparées dans des tubes à essai contenant le milieu M2 liquide à partir de mycélium raclé sur boîtes de Pétri incubées de 7 à 10 jours.

Méthode N°2 :(Taddei *et al.*, 2005)

Celle-ci ne nécessite pas des cultures préalables. Des volumes de 50 ml sont directement inoculés avec 2cm² d'une culture âgée de 7 à 10 jours incubée 7 jours à 28°C.

IV.2. Extraction des antibiotiques et antibiographie

IV.2.1. Extraction des antibiotiques

L'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de culture est réalisée à l'aide de divers solvants organiques, après une durée (définie lors des expériences précédentes) correspondant à la production optimale de ces substances.

❖ Extraction à partir des filtrats de culture

Le filtrat de culture, débarrassé du mycélium, subit une extraction avec différents solvants non miscibles avec l'eau et de polarité différente (*n*-hexane, benzène, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Cette première expérience nous permettra ainsi de connaître le meilleur solvant d'extraction pour la suite de notre travail. Pour cela un volume de filtrat de culture est extrait avec le même volume de solvant dans 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 2 à 3 ml de méthanol avant les tests d'antibiographie.

IV.2.2. Antibiographies et choix du solvant d'extraction

L'activité inhibitrice des différentes phases organiques obtenues est testée par antibiographie (méthode des puits).

❖ Méthode des puits (Nouasri, 1996)

Le milieu gélose à extrait de malt est utilisé pour l'antibiogramme. C'est un milieu semi solide (16g/l d'agar), permettant une bonne diffusion des substances testées. Après solidification du milieu, 10^7 spores / ml de germe cible sont ensemencés par écouvillonnage. Des puits de 6mm de diamètre sont formés à l'aide d'un emporte- pièce. 100µl de chaque extrait sont introduit dans le puits. Le méthanol 95% est utilisé comme témoin négatif. Les boites sont gardées à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, puis incubées à 28°C pour les champignons. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour du puits après 48h à 5jours.

IV.3. Mise en évidence des antibiotiques par bioautographie

IV.3.1. Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice sont préparées après mélange de 50 g de gel de silice dans 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 500 ml. Après une forte et brève agitation (environ 30 s), la pâte est étalée de manière uniforme sur des plaques en verre propres (20 x 20 cm ou 10 x 10 cm) en utilisant l'étaleur de Desaga réglé de manière à obtenir une couche de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont séchées à 40°C pendant une nuit avant d'être utilisées.

IV.3.2. Choix des systèmes de solvants

Les systèmes de solvants retenus sont souvent utilisés pour la séparation des antibiotiques sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau VII : Les systèmes d'élution utilisés en CCM.

Système d'élution	Proportions (v/v)	Références
B.A.E. : <i>n</i> -butanol - acide acétique - eau	3/1/1	Zitouni <i>et al.</i>, 2005
E.A.E. : éthanol - ammoniacque - eau	80/10/10; 60/20/20 ; 40/30/30 ; 90/5/5	Boudjella <i>et al.</i>, 2007
A.M.: acétate d'éthyle - méthanol	100/15	Badji <i>et al.</i>,2006
HDM : <i>n</i> -hexane-dichlorométhane méthanol	70/30/4	Nouredine, 2006.
AN. E : acétonitrile – eau	30/70 ; 50/50 ; 70/30 : 80/20 ; 90/10	Boudjella <i>et al.</i>, 2007 Hozzein <i>et al.</i>, 2011
H.AE : heptane – acétate d'éthyle	3/2	Hozzein <i>et al.</i>, 2011
AE : Acétate d'éthyle	100	Jois <i>et al.</i>, 1986
A : acétone	100	Jois <i>et al.</i>, 1986
C.M : chloroforme – méthanol	18/1 ; 9/1	Jois <i>et al.</i>, 1986
CTD : Cyclohexane– Toluène - Diéthylamide		

IV.3.3. Développement des plaques

Après avoir déposé les échantillons (filtrats de culture) sur les plaques sous forme de spots (30µl par spot) à l'aide d'une micropipette, le développement est effectué dans des cuves saturées 2 h auparavant par les systèmes de solvants de migration.

Après développement et au moment où le front du solvant a parcouru une distance d'environ 15 cm à partir du dépôt, les plaques sont retirées des cuves, séchées à température ambiante puis observées à l'œil nu puis aux U.V. à 254 nm (absorption) et à 365 nm (fluorescence). Les tâches sont alors délimitées, ce qui permettra de situer nos antibiotiques entre eux et par rapport aux composés non actifs. Ceci facilitera ultérieurement le processus de purification.

IV.3.4. Révélations microbiologiques ou bioautographie

La méthode utilisée pour la réalisation de la bioautographie est celle de Betina (1973). Elle consiste, d'une part, à détecter les tâches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur Rf, et d'autre part, à choisir le meilleur système de solvant de migration permettant de séparer le mieux les antibiotiques entre eux ou des autres composés non actifs.

Les plaques de gel de silice sont placées à l'étuve (37°C) pour évaporer les solvants qui empêcheraient les microorganismes de croître. Chaque plaque est ensuite placée horizontalement sur des supports en verre dans une boîte en polyéthylène (22 x 24 cm) contenant à sa base un papier filtre imbibé d'eau stérile qui maintiendra une atmosphère humide et retardera ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est ensuite stérilisé sous UV à 254 nm durant 45 min. Parallèlement, 50 ml d'une gélose molle d'ISP₂ (à 7 g/l d'agar) en surfusion (45°C), sontensemencés avec 2 ml d'une suspension de germe-test. Le milieuensemencé est réparti avec une pipette stérile sur les plaques de gel de silice sous forme de film fin et uniforme. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h puis incubées à 30°C. La lecture se fait après 24 à 36 h. Les zones d'inhibition des tâches actives sont alors observées et le Rf (rapport frontal) des antibiotiques est calculé selon la formule :

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

IV.3.5. Révélations chimiques des antibiotiques (Merck, 1975)

Après avoir choisi le meilleur solvant de migration et déterminé les Rf des antibiotiques par bioautographie, d'autres plaques sont développées dans les mêmes conditions. Celles-ci vont servir à des révélations chimiques et ce, dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des antibiotiques.

La surface des plaques est alors pulvérisée par les différents révélateurs chimiques. Les tâches apparaissent soit à froid, soit après un chauffage de 5 à 10 min à 100°C. Les différents révélateurs utilisés sont :

- ❖ Chlorure de fer ferrique (FeCl₃) : révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.
- ❖ Diphénylamine-Aniline : révélateurs des glucides.

- ❖ Ninhydrine : révélateurs des fonctions amines.
- ❖ La vanilline-acide sulfurique : révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.
- ❖ Le réactif de Tollens, Zaffaroni : révélateur des substances réductrices.

La composition et le mode d'utilisation sont donnés en annexe.

IV.4. Semi purification

Les antibiotiques sont semi-purifiés sur couche épaisse de gel de silice G 60 (0,5 mm d'épaisseur) par chromatographie préparative et ce, dans le but d'avoir des quantités suffisantes d'antibiotiques pour les études ultérieures.

Dans ce cas, des plaques de 20 cm de côté sont préparées de la même manière que les plaques fines. 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 précédemment. Une fois la migration terminée, la silice correspondant aux zones actives est alors grattée. Les antibiotiques sont désorbés dans 1 à 2 ml de méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice est par la suite éliminée après filtration. Le filtrat méthanolique limpide est recueilli et son activité est contrôlée par antibiographie.

V. Etude de la stabilité de l'antifongique

Après extraction et 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.

V.1. Effet du pH

Des fractions de l'extrait semi pur 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 a pH 7 est utilisée comme témoin (Badji et *al.* , 2006).

V.2. Effet de la température

D'autres fractions de l'extrait semi pur 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). La congélation (-20° pendant 24h) (Kitouni, 2007) ainsi qu'à l'autoclavage (121°C pendant 15 min) (Osman, 2004) sont testés.

V.3. Effet des surfactants

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. 100µl de l'extrait brut sont mélangés avec 100µl des solutions de détergents puis incubés pendant 6 h à 30°C. Les solutions des différents détergents seuls, sont utilisées comme témoins afin de vérifier l'effet de chaque détergent sur les antifongiques (Augustine 2005).

VI. Cinétique de production en fonction des milieux de culture

La cinétique de production des antibiotiques a été réalisée sur différents milieux de culture : MSA, MSAE, MSG, ISP4 et M2, en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées et de comparer cette production entre les milieux de culture sélectionnés. La composition des milieux est donnée en annexe.

Des prés cultures sont préparées à partir de cultures mures âgées de 10 j et poussant sur milieu solide M2. Les spores sont ainsi récupérées et inoculées dans des tubes à essais contenant chacun 3 ml de milieu liquide. Les suspensions sont homogénéisées au vortex puis les tubes sont incubés à 28°C pendant 2 j. Un seul tube servira à ensemercer 50 ml du même milieu liquide contenu dans des Erlenmeyers de 250 ml. Ces derniers sont incubés plusieurs jours à 28°C.

L'évolution de l'activité antibiotique et du pH sont suivies quotidiennement.

- L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des puits. Pour cela, le germe cible (*Aspergillus flavus*) est ensemercé dans le milieu gélosé à extrait de malt. Des puits de 10 mm de diamètre sont réalisés dans le milieu (5 à 6 par boîte). Chaque puits reçoit 0,2 ml du filtrat de culture de l'actinomycète (prélevé quotidiennement). Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles. Elles sont ensuite incubées à 28°C pendant 24 à 36 h. Les diamètres d'inhibition autour des disques sont alors mesurés.
- L'évolution du pH du milieu est mesurée grâce à un pH mètre .

Analyse statistique

Les résultats de la cinétique de production sont analysés en utilisant le logiciel XLSTAT-CCR 2011.4. Le test statistique employé à cet effet est l'ANOVA avec 5% de risque d'erreur.

RESULTS
ET
DISCUSSION

I. Criblage des actinomycètes producteurs d'antifongiques

1. Mise en évidence de l'activité antifongique

Au total une centaine de souches présentant une morphologie caractéristiques des actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de sols pollués provenant de la région de Boulimat de la wilaya de Bejaia (P1, P3, P4), d'un autre prélèvement d'un sol de Boussaâda (PB) ainsi qu'un autre échantillon provenant d'un sol de Tikjda par l'équipe activant au sein du laboratoire de Biochimie Microbienne sous la direction de Dr KECHA M.

Ces souches ont fait l'objet d'une purification sur milieu Williams, et d'une conservation à 4C° sur le même milieu.

Un criblage préliminaire pour la recherche d'activité antifongique a été effectué sur 42 souches préalablement retenues sur la base de leurs caractéristiques morphologiques jugées intéressantes. La technique utilisée pour la mise en évidence des antagonismes est celle des cylindres d'agar.

Les résultats obtenus montrent un antagonisme intéressant de plusieurs isolats à l'égard du champignon utilisé (*A flavus*).

L'*Aspergillus flavus* étant un champignon filamenteux producteur d'une mycotoxine : aflatoxine, considérée comme cancérigène pour l'homme. Cette toxine provoque notamment des pathologies pulmonaires, des kératites, des infections des sinus et des otomytoses.

Les résultats des tests d'activités sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Action antagoniste des 42 souches d'actinomycètes vis-à-vis de trois champignons filamenteux (Zones d'inhibition mesurée en mm)

Germes	<i>Aspergillus flavus</i> (3)	<i>Aspergillus flavus</i> (Afla)(7)	<i>Aspergillus flavus</i> (Afla)(8)
Souches			
P1D2	11.5	12	16
P1D8	00	00	00
P3D10	16	14.6	00
P3D7	20	13.7	14
P3D16	12.6	00	11
P3D17	12.5	14	16.5
P3D18	11.5	18	17.6
P3D20	10	12	11.9
P3D22	11.8	00	11
P3D25	14.5	15	16.4
P3D26	16.5	12.8	27
P3D28'	11.4	13	11.9

P3D32	13.8	10	19.5
P3D38	13.9	00	12
P3D39	13	00	14.7
P3D40	15.5	15.6	19
P3D41B	10.6	14.4	21.5
P3D41	14.7	20	22.5
P3D42	11.6	11.8	11
P3D43	18.5	17.8	29
P3D46	12	12.3	11
P4D13	11	10.3	11
P4D15	00	00	00
P4D18	13	21.7	23
P4D2	12	10	10
P4D3	20	13	21
P4D4	13	10.6	11
P4D5	15.5	14.5	23
P4D6	09	20	10.6
PBD11	00	00	00
PBD19	10	11	19
PBD19'	13	12	13
PBD26	17.2	00	00
T1D1	15.7	22	14
T1D85	14	27.7	14.5
T2D15	16.8	23	17
T2D16	13.6	11.8	11
T2D17	00	12.7	12
T2D7	17	15.5	15
P3D50	14	13	10
P4D1	21.5	15	13
P4D10	18	16.8	20.5

On constate que plusieurs souches montrent des activités intéressantes notamment P3D43, et T2D15, d'autres souches au contraire n'ont montré aucun antagonisme vis à vis des germes utilisés. Ces résultats indiquent aussi que le germe 3 est le plus sensible, c'est pour cette raison que la suite des tests d'activités se fera à son encontre.

Considérant les performances des souches testées, ainsi que l'attrait macromorphologique qu'elles offrent ; qui serait une présomption de souches pouvant s'avérer originales, 16 souches actinomycétales ont été retenues.

Souches retenues	P3D18 ; P3D17 ; P3D25 ; P3D26 ; P3D28 ; P3D39 ; P3D40 ; P3D43 ; P4D18 ; P4D5 ; P4D1 ; P4D10 ; P3D51 ; T1D1 ; T1D85 ; T2D15
-------------------------	--

Avant de poursuivre notre expérimentation, il fallait s'assurer de l'absence de molécules polyéniques produites.

2. Détection des polyènes

La recherche éventuelle de polyènes dans les extraits butanolique bruts actifs (Lamari, 2006) des souches présélectionnées sur les germes testés est réalisée par spectrophotométrie UV-visible à des valeurs se situant entre 210nm et 400nm (Thakur *et al.*, 2007). Aucun extrait n'a montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes.

Ces molécules sont écartées des programmes de recherche de nouvelles biomolécules antifongiques en raison des problèmes liés à leur stabilité, leur solubilité, leur absorption et surtout à leur toxicité.

Les spectres que nous avons obtenus sont représentés dans les figures suivantes.

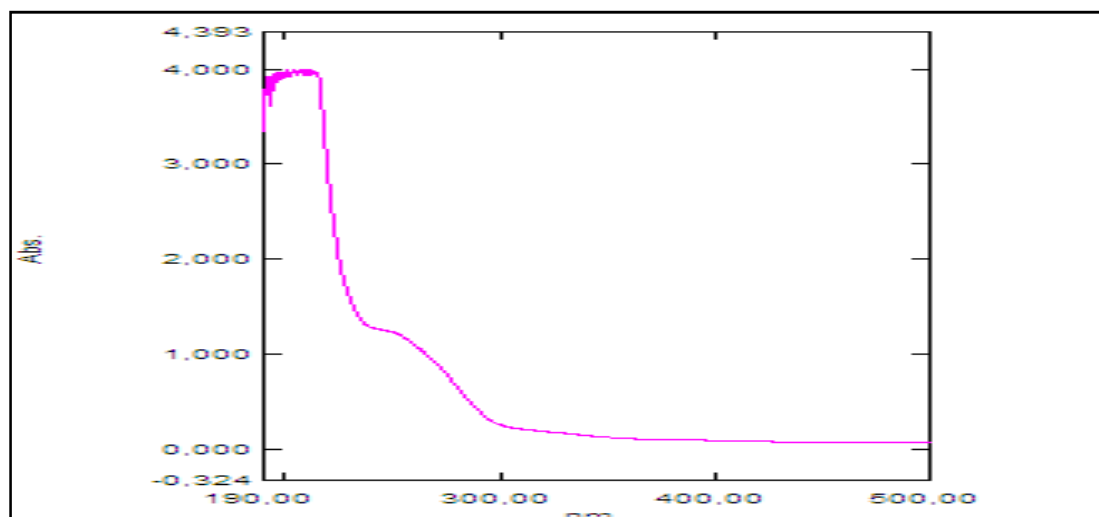


Figure 4 : Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P3D43

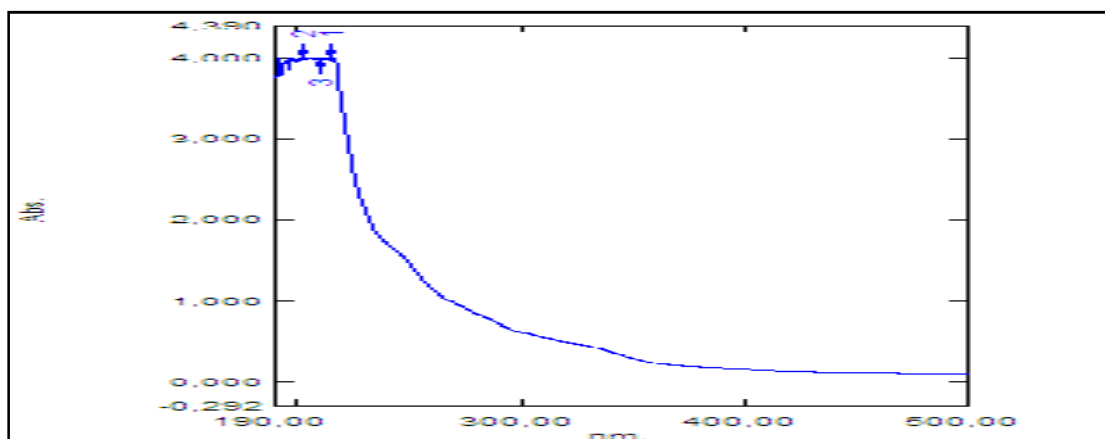


Figure 5: Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P4D10

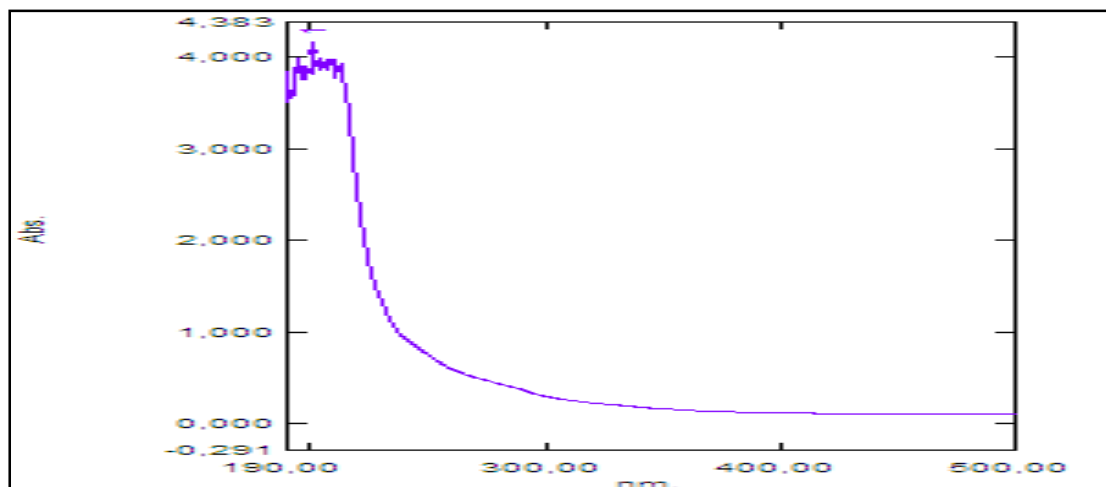


Figure 6 : Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P3D51

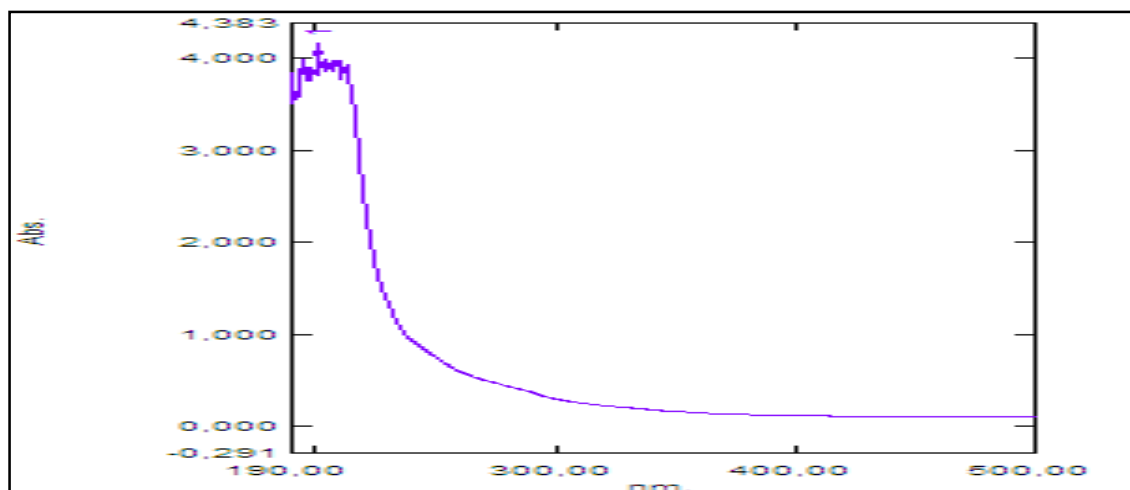


Figure 7: Spectre UV-visible de l'extrait butanolique brut de l'isolat P4D1

En partant des spectres UV-visible obtenus, les extraits butanoliques des souches P₄D₁ et P₃D₅₁ ne contiennent pas les pics caractéristiques des polyènes.

Le premier extrait présente un pic d'absorbance à 207 nm, tandis que le second extrait offre un pic d'absorption 212 nm.

L'extrait butanolique de la souche P₄D₁₀, quant à lui, présente 3pics ; vraisemblablement caractéristiques des molécules polyéniques.

A partir de ces lectures, il paraît évident que la suite des expérimentations : essai de caractérisation des molécules, étude de la stabilité, et l'identification des souches se porteront sur les deux isolats P₄D₁ et P₃D₅₁.

II. Etude taxonomique des isolats d'actinomycètes

Les souches P3D51, et P4D1 isolées lors d'un programme de criblage visant la recherche de nouvelles souches actinomycétales éventuellement productrices de nouvelles molécules antifongiques, et ce à partir d'un nouvel habitat (sol pollué : décharge publique).

En raison d'une activité antifongique produite par ces souches d'une part, et l'aspect morphologique intéressant d'une autre part, nous nous sommes proposé d'approfondir leur identification. Plusieurs critères classiques sont utilisés dans la classification et l'identification de ces microorganismes ; notamment les critères morphologiques, chimio taxonomiques et physiologiques.

1. Etude morphologiques des souches P4D1 et P3D51

1.1. Macromorphologie

Les analyses morphologiques sont importantes en taxonomie microbienne, elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives vu que les critères morphologiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables.

Dix milieux de cultures ont été utilisés : milieux ISP1 à ISP7 (sauf l'ISP6), milieu Bennett, milieu gélose nutritive, milieu GYEA et milieu Williams. Ces différents milieux sont généralement utilisés pour les bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb, 1966).

D'après les résultats présentés sur les tableaux IX et X, nous pouvons déduire que:

- L'isolat P4D1 présente une croissance et une sporulation abondantes sur les milieux ISP3, ISP4, et ISP7. La croissance est aussi abondante sur ISP5, et M2 mais avec un mycélium aérien peu développé; elle est par contre moyenne sur ISP2, et Bennett ; et faible sur ISP1, GYEA, et GN.
- Le mycélium aérien présente une coloration bleue avec du blanc aux extrémités des colonies pendant les premiers jours d'incubation pour ensuite évoluer en donnant des nuances de bleu : bleu gris et bleu vert.
- La coloration de mycélium végétatif est très variée, on retrouve du jaune pale sur ISP1, ISP2, GYEA, et GN, du vert noirâtre sur ISP3, bleu noirâtre sur ISP7, et un jaune verdâtre sur M2 après 7jours. La pigmentation du MS change après 14 jours d'incubation pour donner une palette de couleur allant du jaune verdâtre sur ISP2, du vert (clair et foncé) sur ISP1, ISP5, ISP7 et Bennett, jusqu'au gris sur ISP3 et ISP4.

- Les pigments solubles ne sont produits sur aucun des milieux utilisés à l'exception du M2, ou on a noté un PS de couleur verte. Les pigments mélanoides ne sont pas produits sur ISP1, et ISP7 (milieux conçus spécialement pour la production de ces pigments).
- ❖ La souche P3D51 offre une très bonne croissance sur les milieux ISP4, ISP5, et ISP7 tandis qu'elle est faible sur ISP1, Bennett et GYEA. La sporulation quand à elle est très abondante sur ISP5 et ISP7, et inexistante sur ISP1, Bennett et GYEA.
- ❖ On a noté une croissance ainsi qu'une sporulation nulle sur le milieu gélose nutritive.
- ❖ La coloration du MA est beige durant les premiers jours de croissance, et se transforme en gris rosâtre après 14 jours.
- ❖ Le mycélium de substrat offre une couleur brune, relativement constante avec le temps.

Des pigments diffusibles de couleur brune sont observés sur deux milieux ISP7, et M2. Aucun pigment mélanoides n'est produit par la souche P3D51.

La figure suivante illustre l'aspect et la couleur des deux souches ensemencées conjointement sur les différents milieux testés.

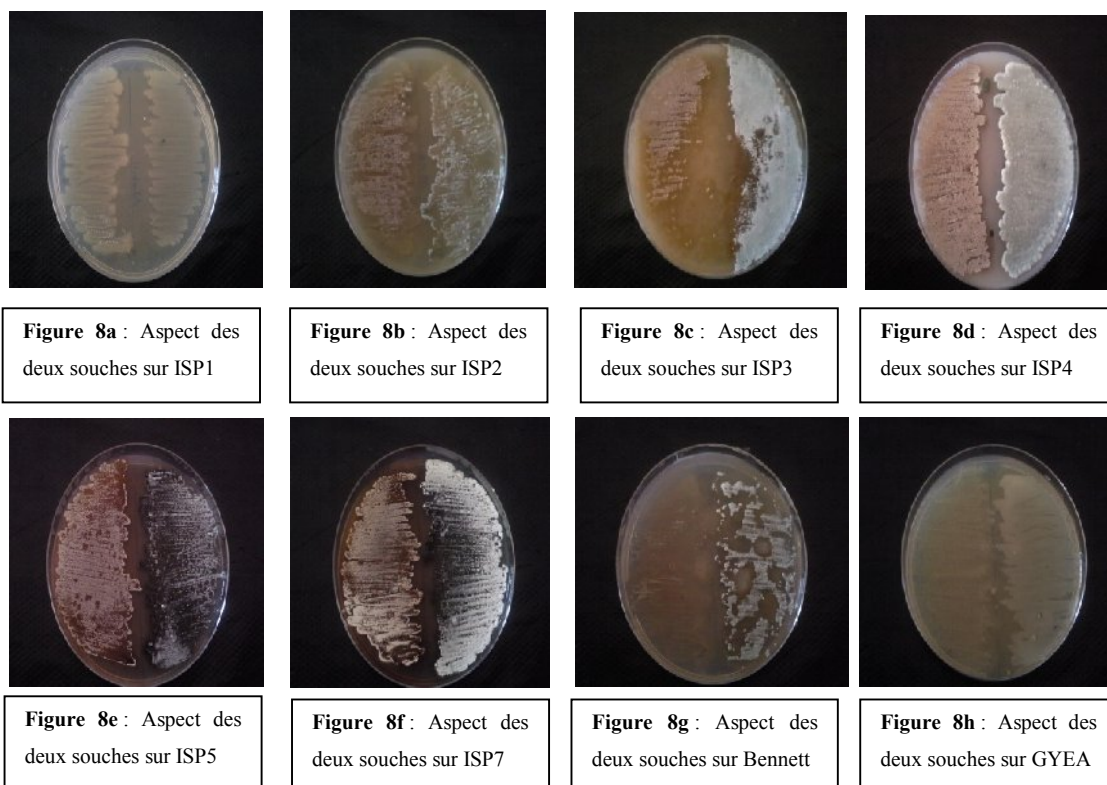


Figure 8: Aspects des deux isolats P3D51 et P4D1 sur différents milieux de culture.

Tableau IX: Caractéristiques macromorphologiques de la souche P4D1

+++++ : Très bonne croissance et sporulation ; +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible ; - : nulle

<i>Isolat</i>	<i>Milieux de culture</i>	<i>Croissance</i>	<i>Sporulation</i>	<i>Couleur et aspect du mycélium aérien</i>	<i>Couleur et aspect du mycélium de substrat</i>	<i>Pigments solubles</i>
P4D1 7 ^{eme} jr	ISP 1	+	-	-	jaune pale	-
	ISP2	+	+	Bleu	Jaune clair	-
	ISP3	++	++	Blanc à bleu	Vert noirâtre	-
	ISP4	+++	+++	Bleu Blanc sur les bords	Jaune à bleu clair	-
	ISP5	+++	+++	Blanc	Bleu noirâtre	-
	ISP7	+++	+++	Blanc	Bleu très foncé (noirâtre)	-
	BENNETT	+	+	Bleu	Bleu vert	-
	GYEA	+	-	-	Jaune pale (NC)	-
	WILLIAMS	++	++	Blanc à bleu ciel	Jaune verdâtre	+ vert
	GN	+	-	-	NC	-
P4D1 14 et 21 ^{eme} jrs	ISP 1	++	-	-	Vert clair	-
	ISP2	++	++	Bleu vert	Jaune verdâtre	-
	ISP3	+++	+++	Bleu vert	Gris foncé	-
	ISP4	++++	++++	Bleu gris	gris	-
	ISP5	+++	+++	Verdâtre clair	Vert noirâtre	-
	ISP7	+++	+++	Blanc	Vert noirâtre	-
	BENNETT	++	+	Bleu vert	vert	-
	GYEA	++	-	-	NC	-
	WILLIAMS	++	++	Blanc à bleu ciel	Jaune verdâtre	+ vert
	GN	++	-	-	NC	-

Tableau X: Caractéristiques morphologiques de la souche P3D51

++++ : Très bonne croissance et sporulation ; +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible ; - : nulle

<i>Isolat</i>	<i>Milieux de culture</i>	<i>Croissance</i>	<i>Sporulation</i>	<i>Couleur et aspect du mycélium aérien</i>	<i>Couleur et aspect du mycélium de substrat</i>	<i>Pigments solubles</i>
P3D51 7 ^{eme} jr	ISP 1	+	-	-	jaune pale	-
	ISP2	+	+	Bleu	Jaune clair	-
	ISP3	+	+	Beige	brun	-
	ISP4	+++	++	Marron et blanc	brun	-
	ISP5	+++	+ (sur les bords)	Beige	Brun orangée	-
	ISP7	+++	+++	Blanc à beige	Marron jaune orangé	+ brun
	BENNETT	+	+	Beige	crème	-
	GYEA	+	-	-	Jaune pale (NC)	-
	WILLIAMS	++	+	Blanc	brun	+ brun
	GN	-	-	-	-	-
P3D51 14 et 21 ^{eme} jrs	ISP 1	++	-	-	Jaune pale	-
	ISP2	+++	++	Rose pale + gris	Brun clair	-
	ISP3	++	++	Gris rosâtre	brun	-
	ISP4	+++	++	Gris	brun	-
	ISP5	+++	+++	Gris rosâtre	marron	-
	ISP7	+++	+++	Rose pale	Marron chocolat	+ brun
	BENNETT	+	-	-	NC	-
	GYEA	++	-	-	NC	-
	WILLIAMS	++	+	Blanc	brun	+ brun
	GN	-	-	-	-	-

1.2. Micromorphologie

Les colonies des isolats cultivés sur les milieux utilisés pour l'étude de la macromorphologie (l'ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, l'ISP7, GYEA et M2 solide), sont directement observées sur boîtes de Pétri sous microscope optique OPTIKA- 180 et à l'objectif x40 après 14 jours d'incubation à 28°C.

➤ Isolat P3D51

Le mycélium est très dense, très ramifié, fragmenté, et organisé parfois en pelottes, d'où émergent des filaments fins, longs et ondulés portant des spores coccoïdes de type RA *Retinaculum Apertum* ou *Retinaculiaperti* (chaînes en crochets ou en boucles fermées).

Toutes autres structures telles que les sporanges, les synnemata ou encore les sclérotés sont absentes.

➤ Isolat P4D1

Le mycélium du substrat est ramifié et non fragmenté sur les milieux solides. Le mycélium aérien se présente sous forme de filaments épais et longs non segmentés portant des chaînes de spores en forme de ressort très compacte de types S (*Spira*), de 5 à 8 tours de spires. Les spores de cet isolat ont une forme ovoïde. Les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents.

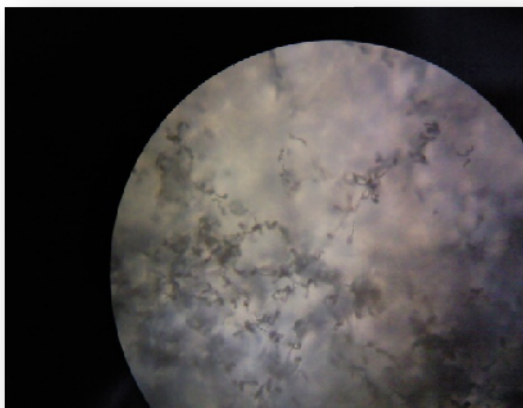


Figure 9a : Aspect microscopique de l'isolat P4D1

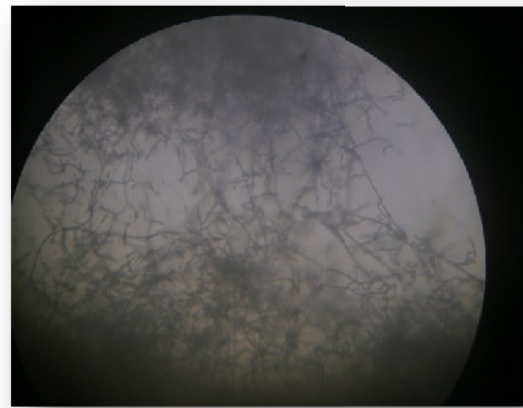


Figure 9b : Aspect microscopique de l'isolat P3D51

Figure 9: Aspect des mycelia des deux souches P3D51 et P4D1 sous microscope optique Gx40.

Sur la base des observations macroscopiques (croissance, aspect et coloration) et microscopiques (chaines de spores de type S et RA), les deux isolats montrent les traits typiques liés aux *Streptomycètes*, ce qui laisse supposer leur appartenance à ce genre actinomycétale. En effet D'après Locci *et al.*, (1989) cités par Thakur *et al.*, (2007), les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieu de culture, montrent généralement une morphologie typique des *Streptomycètes*.

Les travaux menés par Muiru et ses collaborateurs en 2008, stipulent que les milieux de culture utilisés pour l'identification des actinomycètes n'ont pas d'impact sur les caractères morphologiques, mais plutôt sur les caractéristiques physiologiques comme la production de pigments mélanoides. Ceci corrobore les résultats obtenus lors de notre travail où l'on a enregistré la même observation concernant l'aspect des souches sur les différents milieux, ainsi que les mêmes observations microscopiques, alors que la production de pigments solubles et mélanoides n'est possible que sur certains substrats.

Toutes ces spécificités culturelles et sub-culturelles citées plus haut renvoient au genre *Streptomyces*, tel qu'il est rapporté dans le *Bergey's*, ainsi que dans les travaux de Anderson et Wellington, (2001).

Les deux actinomycètes sont identifiés comme appartenant au genre *Streptomyces*, ceci confirme le fait que les meilleurs producteurs d'antibiotiques appartiennent à ce genre (Mustafa *et al.*, 2004).

2. Etude chimiotaxonomique

Parmi les différentes techniques de chromatographie utilisées, seule la chromatographie ascendante sur gel de silice de Stanek et Roberts (1974) a permis d'avoir des profils chromatographiques clairs et lisibles. Les tableaux XI et XII font état des résultats obtenus lors de notre étude. La figure n°10 donne un aperçu sur les chromatogrammes obtenus.

L'étude chimique des constituants cellulaires des isolats P4D1 et P3D51 a révélé la présence dans la paroi de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et la présence de la glycine. L'absence de lysine dans leur paroi est notée. Ceci se traduit par l'apparition de taches brunes virant au jaune et violettes, révélées par la ninhydrine et correspondant au LL-DAP, ainsi qu'à la glycine respectivement.

Ces résultats correspondent à la paroi de type I d'après Lechevalier et Lechevalier (1970).

Les sucres taxonomiquement importants sont le rhamnose et le galactose, ainsi que le glucose, le mannose et le ribose, l'analyse chimique n'a révélé la présence d'aucun de ces sucres, l'hydrolyse cellulaire acide, montre l'absence de tous les sucres testés.

Ces résultats correspondent au chimiotype IC selon Labeda et Kroppensted (2000). La mise en évidence des acides mycoliques est effectuée suivant la méthode de Minnikin *et al.*, (1975), par chromatographie ascendante sur gel de silice.

Après migration, aucune tache noire synonyme de la présence des acides mycoliques n'a été notée, et ce pour les deux souches testées.

Tableau XI: Analyse des constituants cellulaires et pariétaux de l'isolat P4D1, par Chromatographie sur couche mince.

Isolat P4D1				
Constituants cellulaires	révélateurs	Couleurs des taches	Rapports frontaux	Identification des composés
Acides amines	Ninhydrine	Violette	Rf =0,79	Glycine
		Brune virant au jaune	Rf =0,77	LL-DAP
Sucres	Diphénylamine aniline	ND	ND	Pas de sucre caractéristique

Tableau XII: Analyse des constituants cellulaires et pariétaux de l'isolat P3D51, par Chromatographie sur couche mince.

Isolat P3D51				
Constituants cellulaires	révélateurs	Couleurs des taches	Rapports frontaux	Identification des composés
Acides amines	Ninhydrine	Violette	Rf =0 ,80	Glycine
		Brune virant au jaune	Rf =0,76	LL-DAP
sucres	Diphénylamine aniline	ND	ND	Pas de sucre caractéristique



Figure 10a : Profil Chromatographique des sucres de la souche P4D1

Figure 10b: Profil Chromatographique des sucres de la souche P3D51

Figure 10: Profils chromatographiques des sucres obtenus pour les souches P4D1 et P3D51.

Ces données, que nous avons présenté ci-haut, ont été rapportées par d'autres auteurs à savoir Dastager *et al.*, (2007), Al-Tai *et al.*, (1999), 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 sp. nov.* et *Streptomyces malaysiensis sp. nov.* Respectivement.

Les mêmes résultats : la présence dans le peptidoglycane de l'isomère LL-DAP, et l'absence de sucres dans la paroi ont été obtenus également par Wu *et al.*, (2001).

Ainsi les résultats obtenus à ce niveau, permettent d'attester que les deux isolats étudiés sont des actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces*.

3. Etude physiologique

3.1. Tolérance au NaCl

La souche P3D51 offre une croissance optimale à 3% en NaCl. Néanmoins une croissance moyenne est observée à 5% et à 7% en NaCl. A contrario, la souche P4D1 présentent un optimum en absence total de sel ajouté, mais croit sur des concentrations allant jusqu'à 5%.

Kuchner, 1987 cité par Tang *et al.*, (2003), a classé les actinomycètes selon leur aptitude à croître en présence de NaCl en plusieurs classes (tableau XIII).

Sur la base de cette classification, L'isolat P3D51 pourrait appartenir aux actinomycètes modérément halophiles, tandis que l'isolat P4D1 appartiendrait au groupe des actinomycètes halotolérants.

Par ailleurs, les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées mais non Obligatoires de sels pour leur croissance (**DasSarma et Arora, 2001 & Lefebvre, 2005**).

Tableau XIII: Types de microorganismes halophiles (**Kushner, 1987 cité par Tang *et al.*, 2003**),

Microorganismes	Concentration optimal (NaCl)
Non halophiles	≤ 0,2 mole/L (≤ 1,77%)
Faiblement halophiles	0,2 – 0,5 mole/L (1,77 – 2,93%)
Modérément halophiles	0,5 – 2,5 mole/L (2,93 – 14,63%)
Halophiles extrêmes	2,5- 5,2 mole/L (14,63 – 30,4%)
halotolérants	0,2 à 5,2 mole/L (1,77 à 14,63%)

3.2. Croissance à différents pH

- la souche P4D1 croit à des pH allant de 4 à 11, avec un optimum de croissance à pH =4 (pH acide).
- L'isolat P43D51 est plus sensible aux variations du pH, son optimum de croissance se situe à pH 6.

D'après Lonsdale, 1985, les actinomycètes acidophiles et neutrophiles croient dans une gamme de pH allant de 3-5 à un pH neutre, avec un optimum situé entre 5 et 5,5, ce qui correspond au pH de croissance de l'isolat P3D51

Les souches strictement acidophiles montrent une croissance dans une gamme de pH restreinte, avec un optimum autour de 4 à 5, c'est la souche P4D1 qui semblerait appartenir à ce groupe.

Les membres d'actinomycètes appartenant aux neutrotolérants sont moins capables d'utiliser les sources de carbones que leurs homologues acidophiles (Seong *et al.*, 1995 cités par Kim *et al.*, 2004).

3.3. Détermination de la T°C optimale de croissance

- On a noté une meilleure croissance à 30C° qui se traduit par un développement plus important du MA, tandis qu'elle est moyenne à 37 et 35C° avec la production de

pigments solubles à cette dernière T°. On a constaté que la croissance commence à diminuer à 40C° avec une absence du MA, puis une absence totale de développement à partir de 45C°.

- Cet isolat croit à différentes températures, notamment celle supérieure à 37°C. L'optimum de croissance est observée à 40°C, on a noté la capacité de la souche à croître à 50C° (thermo tolérante). Une croissance faible est notée pour les températures inférieures à 30°C.

3.4. Production de pigments mélanoides

Les pigments mélanoides sont des produits de la transformation de la tyrosine en DOPA-mélanine responsable de la couleur. Ils possèdent des propriétés radioprotectrices et antioxydantes, et peuvent éventuellement protéger le microorganisme vivant des ultraviolets. (Vinarov *et al.*, 2002).

La production est testée sur deux milieux destinés à cet effet: ISP1 et ISP7, et Aucun pigment n'a été produit par les deux souches sur ces deux milieux.

3.5. Autres tests

Souche P4D1 :

- Le nombre de glucides (et dérivés) utilisé par cette souche Actinomycétale est assez important puisque sur les 16 testés, seuls le raffinose et le fructose, ne sont pas dégradés.
- La souche P4D1 métabolise presque tous les composés organiques utilisés : la tyrosine, la caséine, le tween 80, l'amidon, l'acétate, le tartrate, l'oxalate, et le citrate. Elle ne réduit pas les nitrates en nitrites et ne dégrade pas le CMC.
- La souche P4D1 est capable d'utiliser les acides aminés (serine, cystéine, tyrosine, lysine, leucine, arginine) comme seule source d'azote.
- Une résistance vis-à-vis du cristal violet, du téllurite de potassium ainsi qu'au phénol à différentes concentrations se traduit par une croissance de l'isolat en leur présence. Cependant, une sensibilité à l'égard de l'azide de sodium (0,01%) est observée.
- La souche P4D1 montre une résistance vis-à-vis de l'acide nalidixique ainsi qu'à la gentamycine(CN), tandis qu'on observe une sensibilité à l'égard des autres antibiotiques utilisés.

Tableau XIV : Caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat P4D1.

Tests	Réactions	Tests	Réactions
Production de pigments mélanoides	-	Croissance en présence de :	
Production de nitrate réductase	-	NaCl 0%	++++
Dégradation de :		NaCl 1,5%	+
Rhamnose	+	NaCl 3%	++
Ribose	+	NaCl 5%	++
Tréhalose	+	NaCl 7%	-
Saccharose	+	NaCl 10%	-
Glucose	+	NaCl 13%	-
Levulose	+	NaCl 15%	-
Glycérol	+	Téllurite de K (0,001%)	+
Raffinose	-	Téllurite de K (0,01%)	+
Lactose	+	Azide de Na (0,001%)	+/-
Maltose	+	Azide de Na (0,01%)	-
Fructose	+/-	Phénol (0,05%)	+
Xylose	+	Phénol (0,1%)	+
Sorbitol	+	Cristal violet	+
Inositol	+	Croissance à :	
Galactose	+	20C°	++
Arabinose	+	25C°	++
Amidon	+	28C°	+++
Caséine	+	30C°	+++
Tyrosine	+	35C°	++
Tween 80	+	37C°	++
CMC	-	40C°	+(MS)
Utilisation des acides aminés :		45C°	-
Glycine	-	50C°	-
Serine	+	pH 4	++++
Cystéine	-	pH5	++++
Tyrosine	+	pH6	+++
Asparagine	-	pH7	+
Histidine	-	pH8	++
Lysine	+	pH9	++
Alanine	+	pH10	++
Leucine	+	pH11	+
Arginine	+	Résistance aux antibiotiques (zones d'inhibition en mm)	
Décarboxylation des sels de Na :		TIC	16,35
Acétate	+	CN	R
Oxalate	+	CS	20
Citrate	+	AN	R
Tartrate	+	SXT	43,4
		AK	38,25

Tableau XV : Caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat P3D51

Tests	Réactions	Tests	Réactions
Production de pigments mélanoides	-	Croissance en présence de :	
Production de nitrate réductase	-	NaCl 0%	+
Dégradation de :		NaCl 1,5%	+/-
Rhamnose	+	NaCl 3%	+++
Ribose	+	NaCl 5%	++
Tréhalose	+	NaCl 7%	+
Saccharose	+	NaCl 10%	-
Glucose	+	NaCl 13%	-
Lévulose	+	NaCl 15%	-
Glycérol	+	Téllurite de K (0,001%)	+
Raffinose	-	Téllurite de K (0,01%)	+
Lactose	+	Azide de Na (0,001%)	+
Maltose	+	Azide de Na (0,01%)	-
Fructose	+/-	Phénol (0,05%)	+
Xylose	+	Phénol (0,1%)	+
Sorbitol	+	Cristal violet	+
Inositol	+	Croissance à :	
Galactose	+	20C°	+
Arabinose	+	25C°	+
Amidon	+	28C°	++
Caséine	+	30C°	++
Tyrosine	+	35C°	++
Tween 80	+	37C°	+++
CMC	-	40C°	+++
Utilisation des acides aminés :		45C°	++
Glycine	+	50C°	+
Serine	+	pH 4	+++
Cystéine	-	pH5	++
Tyrosine	+	pH6	++++
Asparagine	-	pH7	+
Histidine	-	pH8	+
Lysine	+	pH9	++
Alanine	-	pH10	+
Leucine	+	pH11	+
Arginine	-	Resistance aux antibiotiques (zones d'inhibition en mm)	
Décarboxylation des sels de Na :		TIC	R
Acétate	+	CN	R
Oxalate	+	CS	22,34
Citrate	+	AN	14,15
Tartrate	+	SXT	44
		AK	34,85

NOTE : += positif ; - = négatif

++++ = très bonne croissance ; +++ = bonne ; ++ = moyenne ; + = faible ; - = nulle ; R : résistant

Isolat P3D51

- La souche dégrade toutes les sources de carbones utilisées à l'exception du lévulose, raffinose et sorbitol. L'utilisation de lactose et du fructose est incertaine.
- L'isolat P3D51 utilise presque tous les composés organiques testés, la tyrosine, la caséine, le tween 80, l'amidon et les sels de sodium. Il ne produit pas de nitrate réductase, et ne dégrade pas le CMC.
- Sur les dix (10) acides aminés testés, l'asparagine, l'histidine, l'alanine, et l'arginine ne sont pas utilisés comme unique source d'azote.
- Une résistance vis-à-vis du cristal violet, du téllurite de potassium ainsi qu'au phénol à différentes concentrations est observée et qui se traduit par une croissance de l'isolat en leur présence. Cependant, une sensibilité à l'égard de l'azide de sodium (0,01%) est notée.
- sur les six (6) antibiotiques testés, quatre d'entre eux : AN, CS, AK, et SXT présentent une activité à l'égard de notre actinomycète.
-

En dépit du nombre conséquent de tests effectués (75 tests), il est impossible d'attribuer ces souches à des espèces actinomycétales types sans le recours à la taxonomie numérique et à l'application de tests statistiques (Zitouni, 2005).

Il est par conséquent impossible d'affilier avec certitude ces souches. Cependant, ces tests restent intéressants par le fait qu'ils indiquent certaines caractéristiques physiologiques importantes pouvant être utiles pour la sélection de ces isolats tel que la résistance des 2 isolats à au moins 2 antibiotiques parmi ceux utilisés.

La résistance des souches à certains antibiotiques sous-entend leur aptitude à la production de ces molécules. Vraisemblablement, tant qu'une souche est sensible à ses propres antibiotiques dans une certaine mesure, elle est encore plus sensible aux autres substances antibiotiques.

Certaines souches de *Streptomyces griseus* sont moins sensibles à la streptomycine que la plupart des cultures de *S. griseus*, et l'exposition à la streptomycine est utilisée comme méthode de sélection de nouvelles cultures, présumées hautement productrices de streptomycine (Perleman 1949)

III. Etude des antifongiques non polyéniques produits

III.1.Choix du meilleur solvant d'extraction

Les différents extraits organiques obtenus à partir des cultures de P4D1, possèdent une activité vis à vis de tous les germes cibles testés (activité supérieure à 16mm). Cependant, les meilleurs activités antifongiques a été obtenue grâce à l'extrait du dichlorométhane, et ce à l'égard de tous les germes avec un diamètre d'inhibition atteignant 19mm.

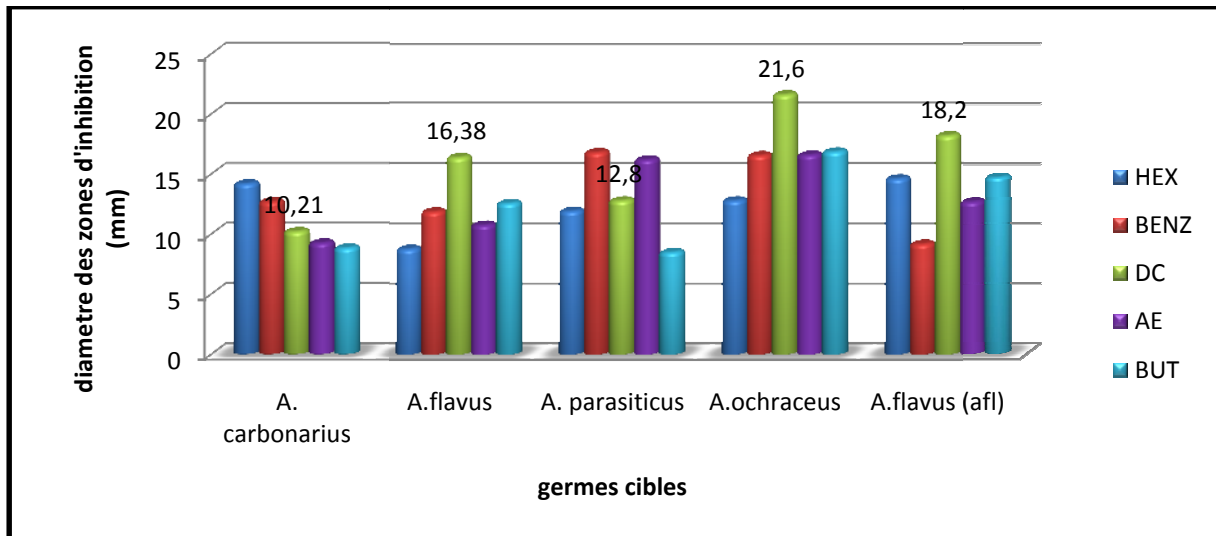


Figure 11: Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat P3D51 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de champignons cibles.

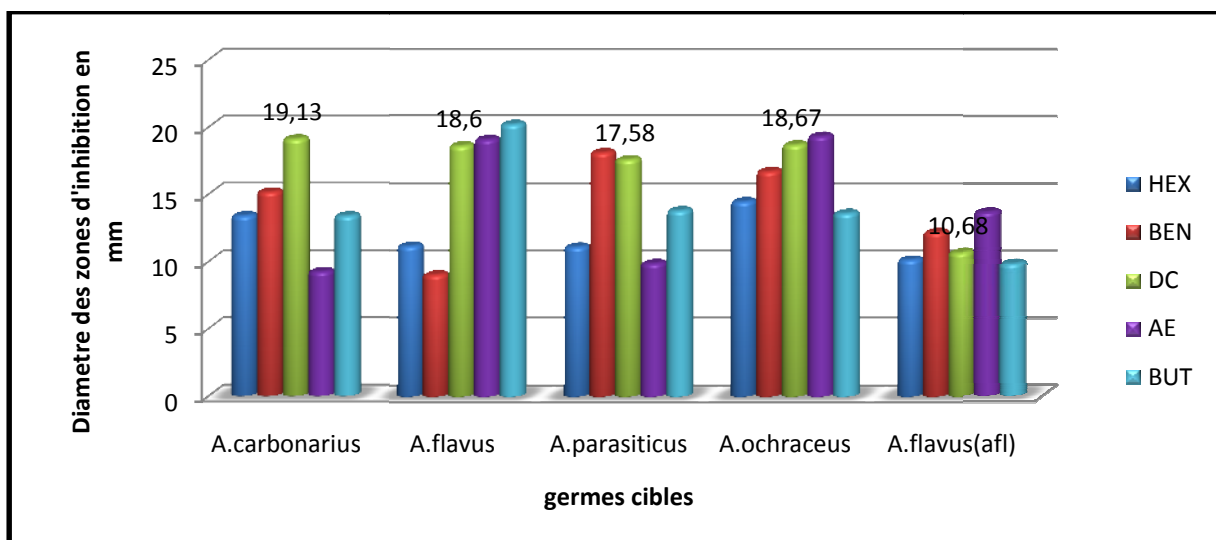


Figure 12: Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat P4D1 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de champignons cibles.

La même observation est effectuée pour l'isolat P3D51, où l'on a constaté une activité certaine vis à vis des moisissures testées, mais à un degré moindre comparativement à l'activité produite par P4D1. Toutefois, la souche présente une zone d'inhibition de 21mm à l'égard d'*A. ochraceus*.

➤ Discussion

Le dichlorométhane s'est avéré être le meilleur solvant d'extraction ; c'est un solvant très peu soluble dans l'eau mais miscible avec la plupart des solvants organiques. En outre le dichlorométhane dissout de nombreux produits tels que les graisses, les huiles et les résines.

Singh *et al.*, (1985) cités par Sacramento *et al.*, (2004), ont utilisé également le même solvant d'extraction : le dichlorométhane pour extraire une molécule antimicrobienne produite par un *Streptomyces*, active aussi bien sur les champignons les levures et les bactéries.

Toujours selon Sacramento et ses collaborateurs, le dichlorométhane extrait des composés non peptidiques, ce qui peut donner une indication sur la nature éventuelle de la biomolécule.

Le dichlorométhane est aussi le meilleur extracteur des dithiopyrrolones (Bourass, 2005). Les dithiopyrrolones étant des composés aromatiques constitués de deux cycles condensés : un cycle dithiol et un cycle pyrrole.

Les dérivés dithiopyrrolones ont une très forte activité contre une variété de Gram-positif et Gram-négatif, ainsi que vis à vis des eucaryotes (levures, moisissures et parasites (Lamari *et al*, 2002).

III.2. Détermination du meilleur système d'élution

Cette étude est effectuée sur les extraits bruts actifs. Selon leur spectre d'action, les résultats du test des puits révèlent que les extraits au dichlorométhane (extraits organiques) des deux isolats P4D1 et P3D51 présentent le plus large spectre d'action sur les germes cibles testés; d'où le choix de ces derniers pour la suite de l'étude.

Les phases organiques actives ayant montrés les meilleures activités antibiotiques sont analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice (0,25 mm d'épaisseur).

Dix systèmes d'élution ont été testés avec des rapports frontaux différents.

- ***n*- Butanol - Acide acétique - Eau (B.A.E)** (60 : 20 : 20) (v/v/v),
- **Acétate d'éthyle – Méthanol (A.M)** : (100 : 15) (v/v),

- **Ethanol – Ammoniaque – Eau (E.A.E)** : (80 : 10 : 10), (90 : 5 : 5), (60 : 20 : 20), (40 : 30 :30) (v/v/v),
- **Acétonitrile - Eau** : (30 : 70), (50 : 50) (70 :30), (80 :20),(90 :10) (v/v),
- **Hexane – dichlorométhane – méthanol** : (70 :30 :4) ;
- **Acétone** : (100) ;
- **Acétate d'éthyle** : (100) ;
- **Heptane – acétate d'éthyle** : (3 :2) ;
- **Chloroforme – méthanol** : (18 :1), (9 :1) ;

Les plaques sont observées sous lumière UV afin de localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm et une fluorescence à 366 nm.

Le système d'élution ayant présenté la meilleure séparation est le système Acetonitrile-eau (90 :10). Les rapports frontaux enregistrés pour le système d'élution Acetonitrile-eau (90/10) sont notés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVI: Rapports frontaux du chromatogramme obtenu pour le système A/E.

Système d'élution	Rapports frontaux Rf	
	P3D51	P4D1
Acetonitrile-eau (90/10)	0,72	0,79

III.3. Biautographies

Après sélection du solvant d'extraction ayant permis la meilleure récupération des activités antifongiques par antibiographie, et après choix du meilleur système d'élution permettant une bonne séparation des substances présentes dans les extraits bruts à savoir l'Acétonitrile/Eau (90/10 v/v) ; les phases organiques sont analysée par Chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les antibiotiques sont détectés par bioautographie contre *Aspergillus flavus*.

Bien que la migration des substances soit bonne, il a été néanmoins impossible de distinguer l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis du germe test utilisé et cela malgré le nombre de répétition (6).

Cela s'explique, très probablement, par la faible quantité d'antibiotiques produite. En effet, la production a été réalisée dans un volume de 150 ml seulement et une bonne partie des substances actives a été perdue durant les étapes successives d'extraction et de purification.

III.4. Semi purification des antifongiques

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 auparavant.

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

Les rapports frontaux des taches actives détectées sous UV ainsi que les résultats des tests d'activité de ces derniers sont représentés dans les tableaux XVII et XVIII respectivement.

Tableau XVII: Les rapports frontaux des taches actives des deux souches

Souche	Rapport frontal (Rf)
P ₃ D ₅₁	0,91
P ₄ D ₁	0,89

Tableau XVIII: Résultat du test d'activité des extraits semi purifiés

Souches	Zones d'inhibition (mm)
P3D51	14
P4D1	11

A partir de ces tableaux, 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, et ne présentant aucune fluorescence. Le résultat du test d'activité confirme l'existence des molécules antifongiques dans le surnageant des taches éluées. Une réduction des diamètres d'inhibition est toutefois notée. Cela, peut être du à la faible teneur en antifongique des taches éluées.

III.5. Révélations chromogéniques

Elles permettent la détection de certaines fonctions chimiques présentes dans les extraits bruts actifs et d'avoir un aperçu sur la nature chimiques de ces dernières. Plusieurs chromatogrammes sont préparés et développés sur le système de solvant sélectionné

précédemment puis révélées avec différents révélateurs chimiques spécifiques de certaines fonctions.

Les résultats des réactions chromogéniques obtenus pour la souche P4D1 et P3D51 sont représentés dans les tableaux XIX et XX.

Des révélations positives ont été enregistrées avec le diphénylamine aniline (révélateur des glucides) pour les deux extraits des deux souches étudiés, ce qui suggère la présence d'un ou de plusieurs sucres dans ces extraits.

Les sucres participent habituellement dans l'interaction de la molécule avec la cible cellulaire, leur présence étant importante si ce n'est essentiel pour l'activité biologique.

Parmi les microorganismes, les actinomycètes sont une grande source de substances naturelles bioactives, et comptabilisent les deux tiers des molécules produites par les microorganismes.

Les produits naturels bioactifs sont fréquemment glycosylés, avec des chaînes saccharidiques de différentes longueurs, et dans lesquels ces sucres contribuent dans les interactions spécifiques avec la cible biologique (Mendes et Salas, 2007).

Tableau XIX: Résultats des révélations chromogéniques de la souche P4D1

Isolat P4D1			
Révélateurs	Couleur et Rf des taches obtenues		Nature chimique de la substance
	Extrait au dichlorométhane		
Diphénylamine aniline	Tache grise	Rf= 0,83	Les glucides
Vanilline- H₂SO₄	ND	ND	Alcools supérieurs, stérols, éthers
Réactif de Tollens	ND	ND	Substances réductrices
FeCl₃	ND	ND	Phénols et acides hydroxamiques
Ninhydrine	ND	ND	Acides aminés

Tableau XX: Résultats des réactions chromogéniques de la souche P3D51

Isolat P3D51			
Révélateurs	Couleur et Rf des taches obtenues		Nature chimique de la substance
	Extrait au dichlorométhane		
Diphénylamine aniline	Tache grise	Rf = 0,66	Glucides
Vanilline- H₂SO₄	ND	ND	Alcools supérieurs, éthers et stérols
Réactif de Tollens	Tache violette	Rf = 0,36	Substances réductrices
FeCl₃	ND	ND	Phénols et acides hydroxamiques
Ninhydrine	ND	ND	Acides amines

Ces observations restent toutefois à relativiser, ces résultats doivent être menés avec des tests complémentaires essentiels tel qu'une purification préalable (chromatographie sur colonne, HPLC), et l'utilisation des techniques spectroscopiques, (IR, RMN, spectroscopie de masse)

IV. Etude de la stabilité des molécules produites

IV.1. Stabilité par rapport au pH

La stabilité des antifongiques a été testée en mélangeant 100 μ l d'extrait avec des solutions de NaOH et de HCl pour obtenir une gamme de pH allant de 3 à 10.

Les solutions sont incubées à température ambiante, et neutralisées avant antibiographie (figure 13)

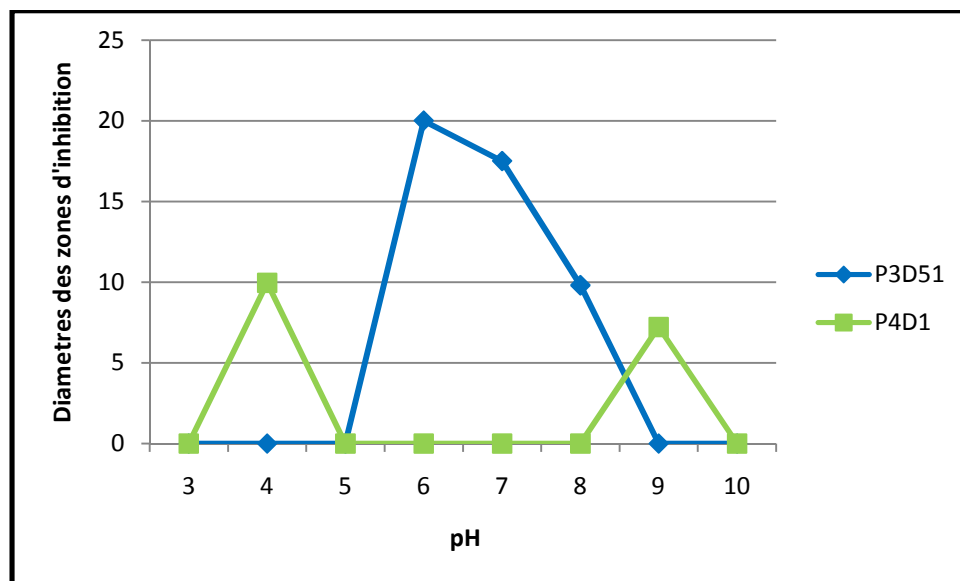


Figure 13 : Effet du pH sur les extraits semi purs.

- Les activités relatives de l'extrait de la souche P3D51 sont stables à des pH voisins de la neutralité. A des pH inférieurs acides et alcalins l'activité est perdue.
- On note que l'extrait de la souche P4D1 est actif uniquement à certains pH : 4, 9. L'activité antifongique est complètement absente aux pH neutres.

IV.2. Stabilité à la température

La connaissance de l'effet de différentes températures sur nos extraits (contenant les molécules antifongiques) est très importante pour la suite des expérimentations.

A cet effet une palette de température est testée : -20, 60, 80, 100, et 120°C, couplée avec des durées de temps bien définies. Les résultats de ce test sont illustrés dans la figure 14.

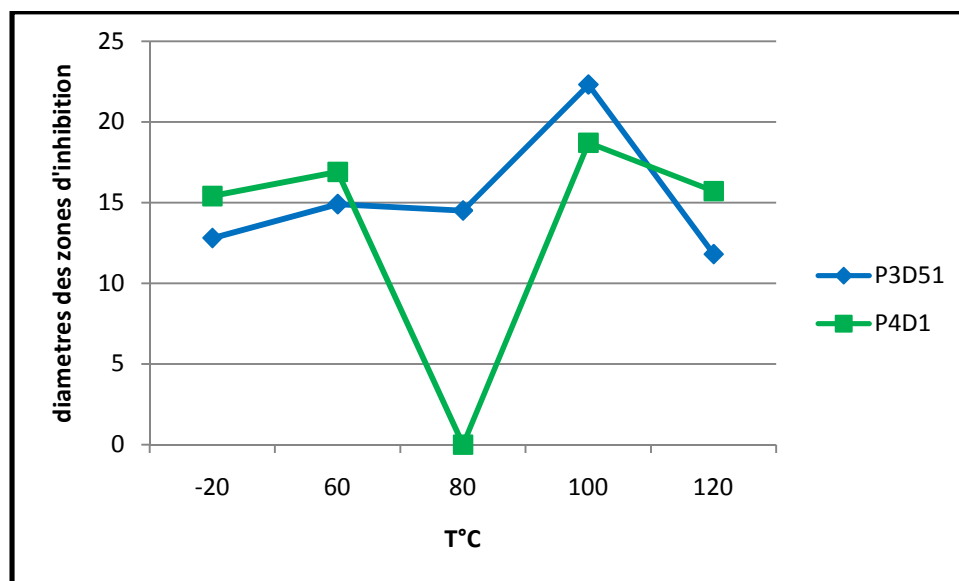


Figure 14: Effet de différentes températures sur les extraits semi-pures.

D'après les résultats obtenus, on note que les extraits résistent aussi bien à la congélation (-20°C), qu'aux divers autres traitements (60, 80, 100) et même à l'autoclavage (120°C/20min). Il semblerait que l'extrait méthanolique de la souche P4D1 est sensible à un traitement prolongé de 80°C/40min.

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

Les mêmes observations ont été relevées par Nythia *et al.*, (2010). La molécule produite par une espèce marine de *Bacillus* est également stable à des températures allant de 30 à 80°C.

Ces observations indiquent que les molécules produites par ces deux isolats sont de nature thermostable.

La thermostabilité pouvant être due à la présence d'un noyau aromatique ainsi que des groupements carboxyles dans le squelette de la molécule (Nythia *et al.*, 2010).

IV.3. Stabilité en présence de surfactants (tensioactifs)

Les tensioactifs ou agents de surface sont des composés qui modifient la tension superficielle entre deux surfaces. Ils comprennent une large gamme de composés : les détergents, les agents moussants, mouillants, dispersants, et les émulsifiants.

La stabilité des extraits méthanoliques semi-purifiés est testée vis à vis de quatre tensioactifs ; le triton X100 (détergent), le SDS, et les tweens 20 et 80.

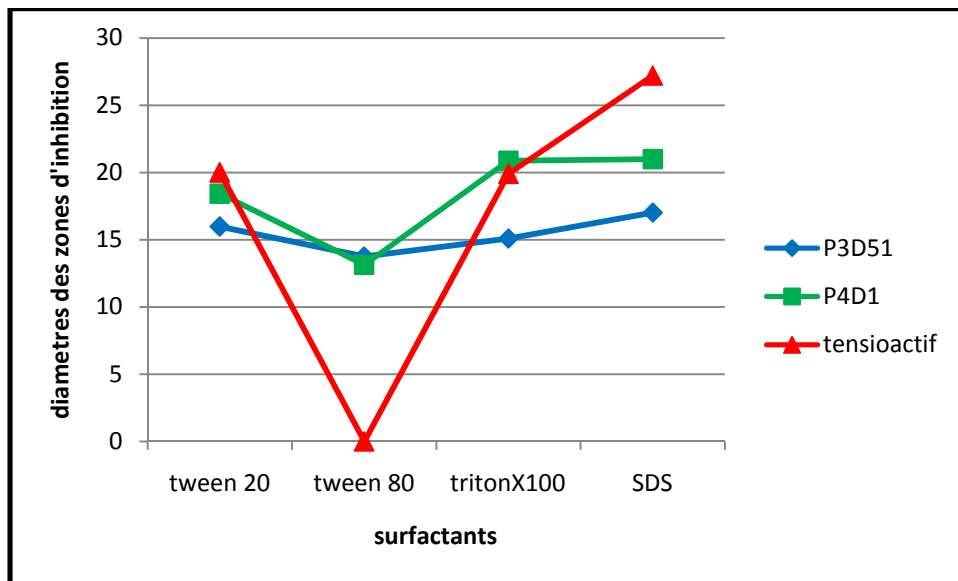


Figure 15: Effet des surfactants sur les extraits méthanoliques semi-purs.

Les extraits méthanoliques seuls des souches P3D51 et P4D1 expriment une activité à l'égard de *A. flavus* allant de 15 à 19mm respectivement.

Les résultats de ce test indiquent que ces extraits combinés à l'action des différents surfactants augmentent l'activité antifongique.

Cela suppose que les agents de tensions utilisés n'ont pas d'effet sur les molécules antifongiques produites, mais il semblerait qu'ils contribuent à faciliter l'action de ces molécules sur les champignons en abaissant la tension superficielle de l'eau, ou bien en dégradant la membrane cytoplasmique (triton x100).

IV.4.Effet de la conservation

La conservation de l'activité antibiotique pour une longue période est un critère déterminant pour la suite des expérimentations (Kitouni, 2007).

Les extraits ont été conservés à 4°C dans des tubes à hémolyse en verre et conservés pendant 5mois, l'activité de ces extraits est alors mesurée par antibiographie vis à vis de la moisissure *Aspergillus flavus*.

Les résultats de l'antibiographie sont transcrits dans le tableau XXI.

Tableau XXI: Effet de la durée de conservation sur les extraits méthanoliques.

Souche	Diamètre d'inhibition	
	P3D51	P4D1
5 mois	14,23	15,81
Témoin	15,73	19,37

Les zones d'activités enregistrées après 5mois de conservation sont légèrement inférieure à celle obtenues au tout début des expérimentations (avant conservation), ce qui laisse entendre que la conservation à 4°C pour une longue durée n'altère pas les propriétés inhibitrices de ces molécules, ou du moins non celles produites par P4D1.

Des suspensions de nanoparticules de griséofulvines ont été placés à 4°C/6mois lors d'une étude menée par Zili, (2005), ces dernières ont gardé leur pouvoir antifongiques tout le long de cette durée.

En effet la stabilité d'un antibiotique à une conservation de 12mois à 4°C a également été rapportée par Augustine, (2005).

Dans le même sillage, Kovacs *et al.*, 2010, ont conservé pendant 12mois des échantillons de miconazoles, et dont l'activité n'a pas été altérée par la durée de la conservation.

Tous ceci conforte l'hypothèse selon laquelle le stockage à 4°C n'as pas d'impact concret sur l'activité antibiotiques de nos extraits.

V. Cinétique de production des antifongiques

V.1.Choix du meilleur milieu de production

Le métabolisme secondaire intègre la production des antibiotiques et des molécules permettant un meilleur accès aux nutriments comme les sidérophores, connus pour présenter une activité antibiotique (**Wang *et al.*, 1999 & Challis et Hopwood, 2003**).

Le métabolisme secondaire des actinomycètes est affecté par la nature et les taux des sources de carbone et d'azote ainsi que par la disponibilité du phosphore (**Ou *et al.*, 2008 & Tarkka et Hampp, 2008**)

La biosynthèse des métabolites secondaires est régulée par divers mécanismes dont la répression par les sources nutritionnelles, l'induction, la répression ou l'inhibition d'enzyme des voies de biosynthèse par le métabolite final (**Theilleux, 1993**).

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

Afin d'accroître le rendement des actinomycètes en molécules antifongiques, il est avantageux de sélectionner un milieu qui permette une bonne production de ces dernières.

A cet effet, plusieurs milieux de cultures complexes ; ISP4, M2 ; et semi synthétiques additionnés de glucose (MSG), d'amidon (MSA), et d'amidon +extrait de levure (MSAE). Une cinétique de production des antifongiques par les deux souches sélectionnées est réalisée sur ces différents milieux. Les activités journalières sont testées par antibiographie vis-à-vis d'*Aspergillus flavus*.

Seuls deux paramètres sont pris en compte durant cette cinétique : l'évolution du pH des milieux au cours de la fermentation, et la cinétique de production des antifongiques non polyéniques par la mesure du diamètre des zones d'inhibition des surnageant prélevés quotidiennement pendant 12 jours.

V.2.Evolution du pH

Le suivi journalier du pH des cultures des deux souches sur les 5 milieux de cultures sont dépeints dans les figures suivantes.

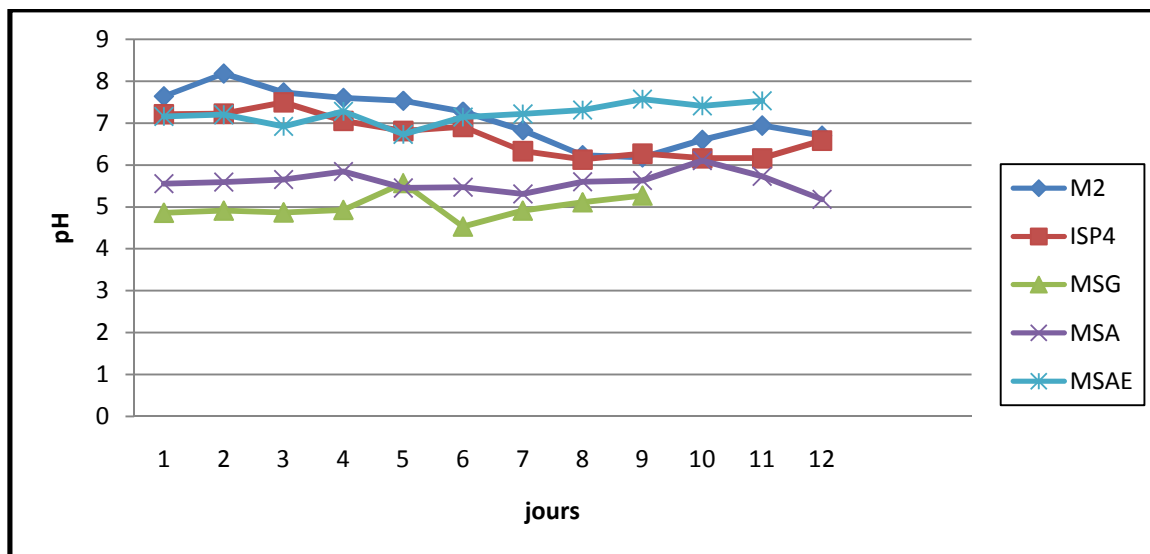


Figure 16: Evolution du pH sur milieux M2, ISP4, MSG, MSA, et MSAE de la souche P3D51.

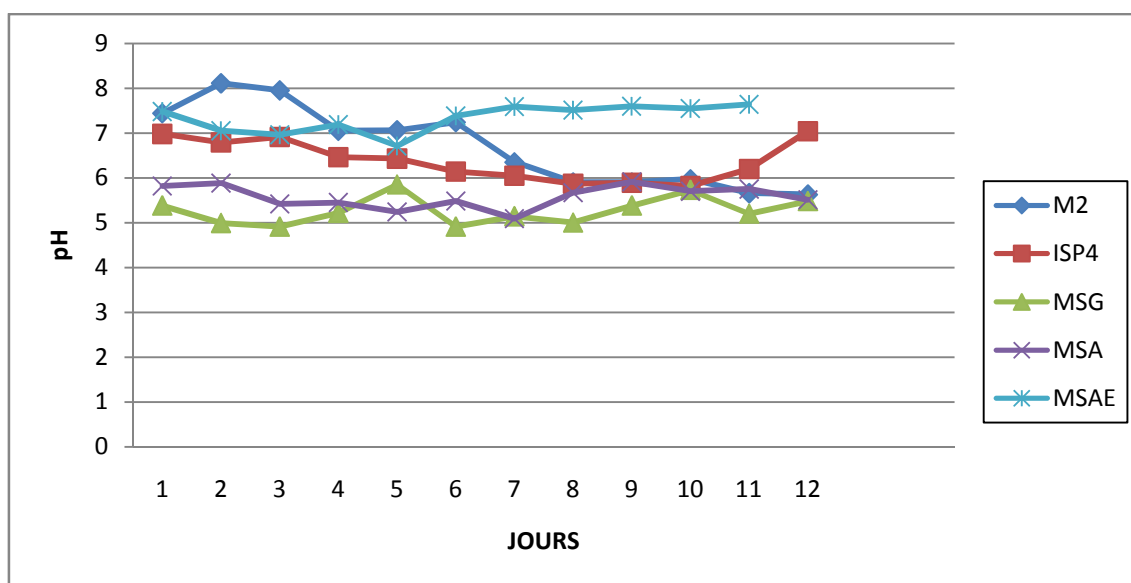


Figure 17: Evolution du pH sur milieux M2, ISP4, MSG, MSA, et MSAE de la souche P4D1

On relève d'après les figures, une stabilité du pH au alentour de 7 pour le milieu MSAE, une légère acidification des milieux M2, et ISP4, ainsi qu'une acidification prononcée des milieux MSG et MSA, et tend ensuite à se stabilise jusqu'à la fin de la fermentation.

V.3.Effet des milieux de cultures sur la production d'antifongiques

Les cinétiques de production des antifongiques des souches testées cultivées sur les différents milieux de culture sont présentées dans les figures 21 et 22.

▪ **Isolat P4D1 :**

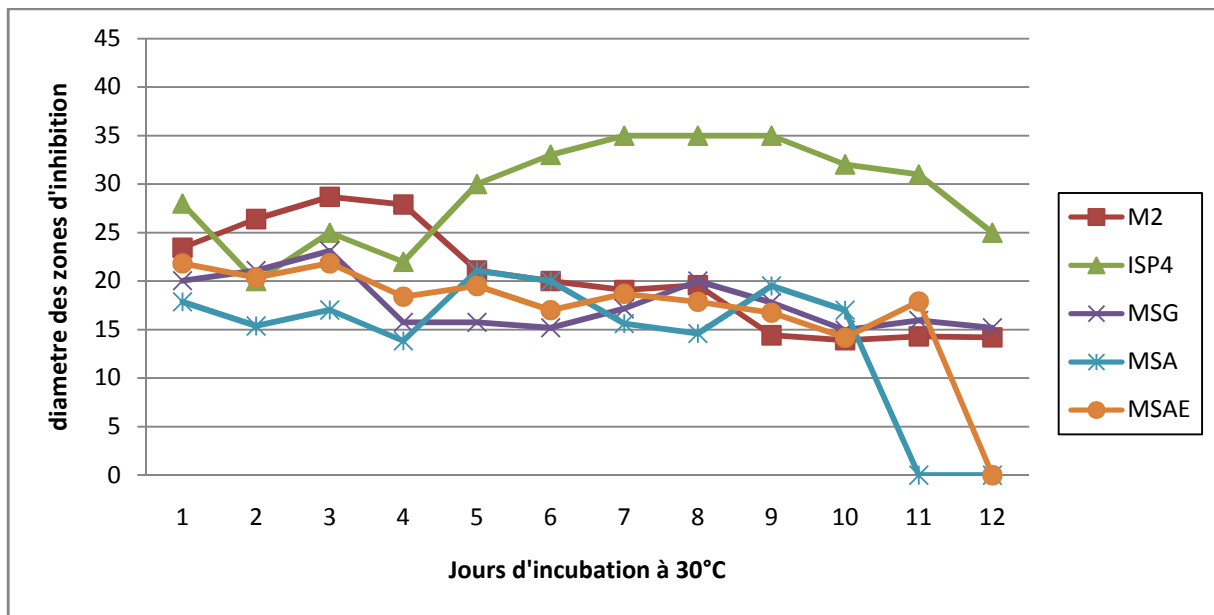


Figure 18 : Cinétique de production des antifongiques sur les milieux IM2, ISP4, MSG, MSA, MSAE par la souche P4D1.

- La production démarre dès le 1^{er} jour sur le M2, et augmente progressivement pour atteindre son maximum au 3^{ème} jour (30mm). L'activité antifongique commence alors à diminuer progressivement sans toutefois disparaître.
- La production d'antifongique sur l'ISP4 commence très bien et atteint son apogée au septième jour d'incubation (35mm). Des activités relativement proches sont notées tout au long de la cinétique.
- L'activité antibiotique est rapidement produite sur MSG, et atteint son maximum au 3^{ème} jour avec un diamètre de 23mm
- La production des antifongiques par la souche P4D1 sur MSA est beaucoup moins uniforme que pour les autres milieux. Le maximum de production est enregistré après 5 jours d'incubation (21mm). Il faut noter que la production devient nulle dès le 10^{ème} jour.
- le milieu MSAE offre une production d'antifongique étalée sur 11 jours avec des diamètres appréciables atteignant le maximum dès le 3^{ème} jour (22mm).

Isolat P3D51

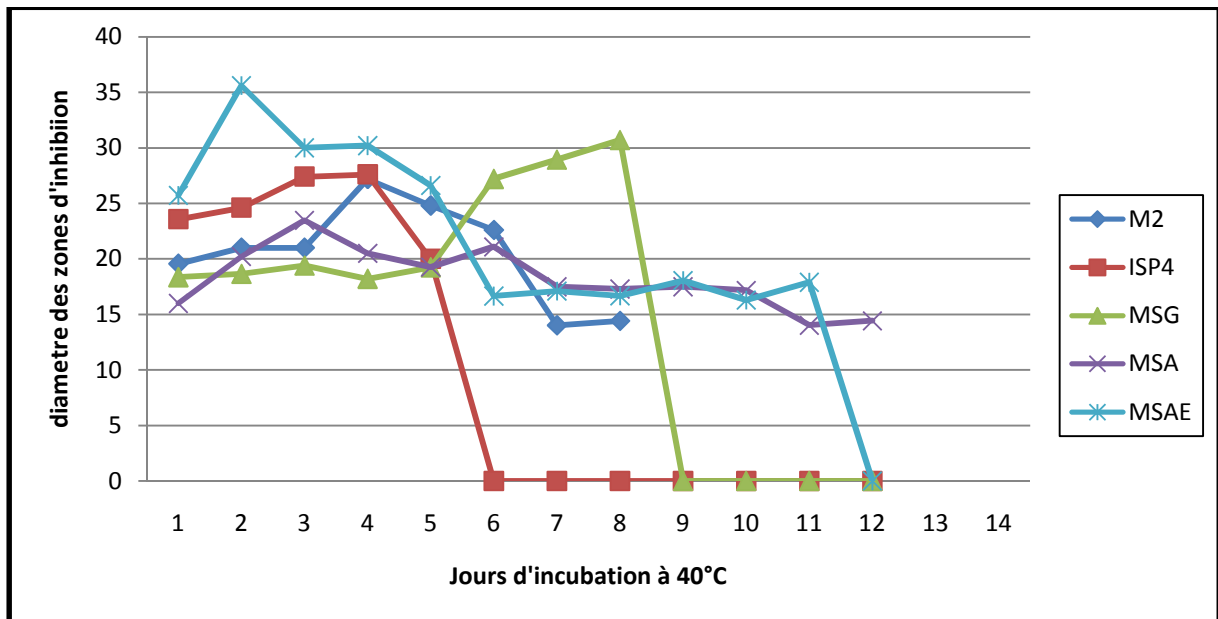


Figure 19: Cinétique de production de la souche P3D51 sur les milieux M2, ISP4, MSG, MSA, et MSAE

- Pour le M2, la production débute au premier jour, et augmente crescendo jusqu'à atteindre son apogée au 4^{ème} jour avec 27mm de diamètre. L'activité diminue progressivement et disparaît totalement après le 8^{ème} jour.
- Une bonne production est notée dès le 1^{er} jour (23mm) sur ISP4, suivi d'un accroissement pour atteindre 27mm de diamètre au 4^{ème} jour. La production est cependant nulle à partir du 6^{ème} jour.
- La production des antibiotiques par cet isolat débute timidement sur MSG pour croître légèrement au bout de 5 jours d'incubation pour atteindre 30mm de diamètre. Au-delà du 8^{ème} jour l'activité est égale à zéro.
- l'optimum de production (MSA) est atteint au 3^{ème} jour, mais néanmoins une activité moindre comparativement aux autres milieux de production. On note cependant le maintien de la production durant les 12 jours.
- Une activité très intéressante de la souche P3D51 sur MSAE, est notée avec un maximum de production enregistré au 2^{ème} jour (35mm).

L'activité diminue alors progressivement jusqu'à disparition totale (au 12^{ème} jour).

➤ **L'analyse statistique**

Le test statistique utilisé est l'ANOVA analyse de la variance, qui est un test de comparaison multiple. L'analyse est faite avec le logiciel XLSTAT 2011-CCR (corrélation-composants-régression) 2011.4.

La variable dépendante dans notre cas est l'activité antifongique (production) vis à vis du germe cible testé, et les différents milieux de culture utilisés sont la variable dite explicative. Les résultats de l'ANOVA sont transcrits dans les tableaux ci-après.

Tableau XXII: Résultats de l'analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P₄D₁

Modalité	Moyenne estimée	Groupes		
ISP4	30,000	A		
M2	20,253		B	
MSG	17,758		B	C
MSAE	17,034		B	C
MSA	14,318			C

Tableau XXIII: Résultats de l'analyse statistique de l'effet du milieu de culture sur la production de l'antifongique de la souche P₃D₅₁.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
MSA	19,107	A
MSAE	18,379	A
MSG	15,057	A
M2	13,844	A
ISP4	10,264	A

L'étude statistique révèle que les 5 milieux relèvent du même groupe, ce qui nous fait dire qu'il n'y a pas d'effet milieu statistiquement significatif sur la production d'antifongiques par l'isolat P3D51.

Cependant, l'analyse ANOVA a détecté un effet significatif du milieu ISP4 sur la production d'antibiotiques par la souche P4D1. Le M2, MSAE et MSG se révèlent néanmoins être de bons milieux de production. Le milieu synthétique à base d'amidon (MSA) était le moins intéressant pour la production.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques. Ceux-ci ont été largement étudiés surtout chez le genre *Streptomyces*, largement dominant dans de nombreux écosystèmes. Cependant, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les recherches ont été orientées vers des genres peu fréquents à rares et provenant d'environnements peu communs voir extrêmes (**Demain et Lancini, 2006**).

Ainsi, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinomycètes est crucial pour la découverte de nouvelles espèces et par conséquent la découverte de nouveaux produits naturels bioactifs (**Hozzein et al., 2008**).

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. Trois parties ont été développées :

Dans la première partie, on s'est intéressé à la recherche des activités antifongiques potentiellement produites par des souches isolées lors de travaux antérieurs ainsi qu'à la sélection des souches produisant des molécules dites non-polyéniques.

A l'issue de cette partie, deux souches actinomycétales désignées P3D51 et P4D1 sont retenues pour la suite de l'expérimentation.

La seconde partie a porté sur la classification des deux actinomycètes présélectionnés P3D51 et P4D1. Pour se faire nous avons réalisé plusieurs analyses qui sont :

- Des tests morphologiques utilisant les milieux de cultures solides. Les résultats obtenus laissent fortement supposer que les deux souches étudiées sont des actinomycètes du genre *Streptomyces*.
- Des analyses chimiotaxonomiques qui se fondent sur l'analyse des constituants de la paroi. On s'est employé à l'étude des acides aminés et des sucres pariétaux.

Nous avons constaté que la paroi des deux souches P3D51 et P4D1 renferment l'isomère LL de l'acide diaminopimelique ainsi que la glycine, mais cependant dépourvue de sucres. Ces indications amènent à suggérer que la paroi de nos deux souches est du type IC. Ce dernier est caractéristique des bactéries du genre *Streptomyces*.

- Des études physiologiques qui s'intéressent à la capacité des isolats à dégrader les

glucides, les acides aminés, les surfactants et les sels de sodium, à réduire les nitrates, à produire des pigments mélanoides, à tolérer différentes températures, différents pH, le phénol, l'azide de sodium, le Crystal violet, le chlorure de sodium et les antibiotiques. Ces résultats ont permis de connaître certains caractères de cultures pouvant être utilisés pour la sélection.

En perspectives pour cette première partie de travaux, il est recommandé de compléter les différentes analyses citées ci-dessus, par des études chimiotaxonomiques plus approfondies tels que l'analyse des phospholipides et des acides gras éléments discriminants dans l'identification, mais également par une étude moléculaire outil nécessaire pour la détermination précise de l'appartenance des espèces.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons effectué des fermentations en erlenmeyers afin de produire les molécules antifongiques en question, d'essayer de les purifier et de les caractériser partiellement.

- Le test d'activité des extraits organiques indique que le dichloromethane serait le meilleur extracteur de ces activités car il permet d'exprimer les meilleurs spectres d'action à l'égard des germes cibles testés.

- Le système d'élution ayant permis une bonne séparation des molécules est L'acetonitrile-eau (90/10 v/v).

- La révélation microbiologique (bioautographie) réalisée n'a donné aucun résultat malgré la bonne migration des substances, et le nombre de répétition conséquent. Les révélations chromogéniques des extraits de l'isolat P3D51 a permis de suggérer la présence de composés glucidiques, ainsi que de substances réductrices, tandis que la souche P4D1 semblerait ne contenir que des substances glucidiques. Malheureusement, avec ces données il nous est impossible d'émettre la moindre hypothèse quand à la structure possible de ces molécules.

Il est évident que ces résultats doivent être complétés par des tests indispensables, notamment l'obtention de substances purifiées (bioautographie, HPLC) et une caractérisation plus poussée avec des techniques performantes tels l'IR, la RMN, la spectroscopie de masse...etc.

L'ensemble des résultats obtenus pour les quatre isolats donne un aperçu général sur le potentiel de ces souches à produire des antifongiques de nature non-polyéniques.

En troisième et dernière partie, on s'est penché sur l'impact ou à l'influence de la composition des milieux de cultures sur la production des métabolites antifongiques par nos

deux souches P3D51 et P4D1 en effectuant des cinétiques étalées sur une période de 12 jours et sur divers milieux.

Il s'est avéré que les milieux complexes (ISP4 et M2) sont légèrement meilleurs producteurs de biomolécules.

En perspective de cette étude, il est suggéré d'établir ou de définir l'apport des différents éléments qui composent ces milieux et de connaître l'élément limitant dans la production des dites molécules.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Abbas I.H., (2006).** A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *J. Appl. Sci. Res.* **2.10**:809-815.
- **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.
- **Anderson, A.L. & Wellington, E. (2001).** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **51**, 797–814.
- **Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985).** Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 86-98.
- **Athalye, M., Lacey, J., Goodfellow, M., (1981).** Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *Appl. Bacteriol.* **51**, 289–297.
- **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.
- **Auvin-Guette.C. (2002).** Nouvelles techniques de spectrométrie de masse appliquées à l'étude des venins. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **95**, 3, 212-213.
- **Awa Y., Iwai N., Ueda T., Suzuki K., Asano S., Yamaguishi J., Nagai K., et Wachi M., (2010).** 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., (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 p 226.
- **Badji. B ; Zitouni. A; Mathieu. F; Lebrihi. A; and Sabaou. S. (2006).** Antimicrobial compound produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol*, **52**, 373–382.
- **Bastide A., De Méo M., Andriantsoa M., Laget M. and Duménil G., (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. J.*, **2**, 453-466.

- **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. Microbiol.*, **13**, 236-242.
- **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.
- **Becking J.H. (1974).** Family III. *Frankiaceae*. In: Bergey Manual of Determinative Bacteriology. 8th Eds. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.
- **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 Manual, (2004).** Systematic of bacteriology, Taxonomic outline of the prokaryotes. Second edition. Garrity. G.M; Bell. J.A; Lilburn. T.G, Springer, New York Berlin Heidelberg.
- **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. Copyright, 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.
- **Billaud E.M. (2007).** Interactions métaboliques des antifongiques azolés. *J de Mycol Méd.* **17** : 168-176.
- **Blanchet B., Huet E. ; Astier A., Hulin A. (2004).** Suivi thérapeutique des médicaments antifongiques. *Revue Française des laboratoires*, n ° 365.
- **Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N., (2007).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sg 10* isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, **161**, 288-298.
- **Boughachiche. F ; Reghioua. S; Oulmi. L ; Zerizer. H ; Kitouni. M. ; Boudemagh. A ; Boulahrouf. A. (2005).** Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia de Ain Mlila. *Sci & Tech C.* **23**, 5-10.

- **Bouras, N. (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- **Brautas T., Sekurova O.N., Sletta H., Ellingsen T.E., Strom A.R., Valla S. and Zotchev S.B., (2000).** Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.*, **7**, 395-403.

C

- **Carle S. (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*, **36** (1), 25-41.
- **Challis. G.L and Hopwood. D.A. (2003).** Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *The National Academy of Sciences of the USA, PNAS*, **100** (2), 14555–14561.
- **Charin T. and Aszalos A. (2002).** TIC and UV-light spectrometry. *In*: “modern analysis of antibiotic, Aszalos A., (Eds), Vol. 27, Marcel Dekker Inc, New-York. p. 1982.
- **Collins M.D. and Jones D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic amplification. *Microbiol. Rev.*, **45**, 316-354.
- **Collins M.D., Goodfellow M. and Minnikin D.E. (1980).** - Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 29-37.
- **Cook A.E. and Meyers P.R. (2003).** - Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S-rRNA gene restriction fragment patterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1907-1915.
- **Coombs J.T., and Franco. (2003).** Isolation and identification of actinobactéria from surface sterilised wheat roots. *Ame. Soc. Microbiol.*, **69** (9), 5603-5608.
- **Cragg G.M., Newman D.J. and Snader K.M. (1997).** - Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, **60**, 52-60.

D

- **DasSarma. S; and Arora. P. (2001).** Halophiles in Encyclopedia of life sciences. London, Nature Publishing Group, 8, 458-466.
- **Dastager S. G., Li W. J., Agasar D., Sulochana M.B., Tang S. K., Tian X. P. and Zhi X.Y.(2007)** *Streptomyces gulbargensis* sp. nov., isolated from soil in Karnataka, India. *Antonie van Leeuwenhoek.* **91**:99–104.
- **Deacon J. W. (1984).** "Introduction to modern mycology". Vol.7, 2nd.Ed., 239 p.
- **Demain A.L. and Salomon N.A. (1986).** Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology Press, Washington.
- **Demain A.L; et Lancini G. (2006).** Bacterial pharmaceutical products in procaryotes, 1, 812-833.
- **Diop. C.A.K. (1998).** Synthèse et étude par spectroscopie infrarouge, RAMAN, Mossbauer, RMN et par diffraction aux rayons X de quelques dérivés organostanniques de type A (Sn Ph₃)_n (n= 1,2,3 ; A= oxoanion) et de leur interaction avec les bases de Lewis, complexes organostanniques de Sn Cl₄, de l'ion hydrogéoarséniate et contenant Sb₂Cl₈. Thèse de Doctotat. Université Cheikh Antan Diop de Dakar, (Sénégal).pp231.
- **Dommergues Y., et Mangenot F., (1970).** Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.
- **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

- **Elwan S.H., Dab A. and Al-Gounaim Y. (1985).** Ecology of the Streptomyces flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**, 99-104.
- **Ensign J.C., Normand p., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* **144**, 657-660.

G

- **Gellen-Dautremer. J ; Lanternier. F. ; Dannaoui. E ; Lortholary. O. (2010).** Associations antifongiques dans les infections fongiques invasives. *La Revue de médecine interne* 31 :72–81.
- **Georgopapadakou NH, Walsh TJ. (1994).** Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science*; 264:371—3.
- **Gesheva. V; Ivanova. V; Gesheva. R. (2005).** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological Research*, **160**, 243- 248.
- **Goodfellow M. (1971).** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **69**, 33-90.
- **Goodfellow M. and Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.
- **Goodfellow M., Stalon L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. (1990).** Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 19-36.
- **Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (1984).** Introduction to and importance of the actinomycetes. *In: « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, pp. 1-6.*
- **Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handarhan, J.E., Pang, C.H.-N. (1974).** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**, 54–63.
- **Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990).** Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.

H

- **Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P. S., Teniola D., Addo P. (2002).** Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . *PCT Int. Appl.*, p. 19.
- **Hozzein WN., Ahmed MB., Abdel Tawab MS. (2008).** Microbial community structure in a wastewater treatment plant in Beni-Suef City. *New Egypt. J. Microb.* **20**: 189-201.

I

- **Imada. C; Koseki. N; Kamata. M; Kobayashi. T; and Hamada-Sato. N. (2007).** Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, **21** (1), 27-31.
- **Ishizawa S. and Araragi M. (1976).** Composition of actinomycetes population in soil. *In: Actinomycetes, the boundary microorganisms.* Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107.

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **30** (3), 458-464.

K

- **Kämpfer. P. (2006).** The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. **538–604.** *in Prokaryotes*, V 3, Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Dworkin. M; Falkow. S; Rosenberg. E; Heinz-Schuelfer. K; Stackbrandt. E. ed: Springer New York.
- **Khattabi A, Hilali L, Dari K, Assobhei O, Gavini F. (2002).** Isolement de microorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. *Rev. Biol. Biotech.*;2:28–32.
- **Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M., (2004).** Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 211-214.
- **Kitouni M., (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine (Algérie).pp 205.
- **Kovács K., Antal I., Stampf G, Klebovich I., et 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).

- **Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E., Goodfellow M. (1990).** Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **13**, 148-160.

L

- **Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 331-336.
- **Labeda D.P., Hatano K., Kroppenstedt R.M., and Tamura T. (2001).** Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, **51**, 1045- 1050.
- **Lacey J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, **2**, 231-51.
- **Lacroix C., Dubach M., Feuilhade M. (2003).** Les échinocandines: une nouvelle classe d'antifongiques. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **33**, 183-191.
- **Lamari L, Zitouni A, Boudjella H, Badji B, Sabaou N, Lebrihi A, Lefebvre G, Seguin E., and Tillequin F. (2002).** New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **55**, 696-701.
- **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.
- **Larpent JP, Sanglier JJ. (1989).** In: Biotechnologie des antibiotiques. Paris: Ed. Masson. p. 481.
- **Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970b).** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- **Lechevalier M.P. (1981).** Ecological associations involving actinomycetes. In: *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**, 159-166.
- **Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970a).** Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: « *The Actinomycetales* » Prauser H. (Eds.) Fisher Verlag, Jena, pp. 311-316.

- **Lechevalier M.P., De bievre C. and Lechevalier H.A. (1977).** - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**, 249-260.
- **Lefebvre. O. (2005).** Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins. Thèse de doctorat. **Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. pp 271.**
- **Lemke, A., Kiderlen, A.F., and Kayser O. (2005).** Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:151-162.
- **Li S., Chena C., Zhang H., Guo H., Wang H., Wang L., Zhang X., Huac S., Yu J., Xiao P.,Li R., Tan X. (2005).** Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiv. Res.*, **67**, 18–23
- **Lindenfelser. L.A., Shotwell. O.L, Bachler. M.J., Shannon G.M., and Pridham T.G. (1964).** Antibiotics against plant disease. VIII. Screening for non polyenic antifungal antibiotics produced by Streptomycetes. *Appl. Microbiol*, **12 (6)**, 508-512.
- **Locci R. (1989).** Streptomycetes and related genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie. Eds: S.T.Williams, M.E. Sharpe et J.G. Holt.. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. **4**, 2451-2508
- **Lonsdale, J. T. (1985).** Aspects of the biology of acidophilic actinomycetes. PhD thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.

M

- **Marchal N. et Bourdon J.L. (1973).** Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds.), Paris.
- **Martin J.F. (1979).** Polyene macrolide antibiotics. *In: « Economic Microbiology »* (Rose A.F., Eds.) Academic Press, London, **3**, 355-387.
- **Martin J.F. and Demain A.L. (1980).** – Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, **44**, 230-261.
- **Matan. N and Matan. N. (2008).** Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Inter Biodeterioration & Biodegradation*, **62**, 75–78.
- **Mellouli L, Mehdi RB, Sioud S, Salem M, Bejar S. (2003).** Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated Streptomyces sp. US24 strain. *Res Microbiol*; **154**:345—52.

- **Merck E., (1975).** Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt. p 149.
- **Miao L., Kwong T. F. N. and Qian P. Y. (2006)** Effect of culture conditions on mycelia growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 1063-1073.
- **Million L. (2006).** Antifongiques : traitement des mycoses invasives. DIU chimiothérapie anti infectieuse.
- **Minnikin D.E., Alshamaony L. and Goodfellow M. (1975).** Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J. Gen. Microbiol.*, **88**, 200-204.
- **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.
- **Misato T., (1982).** Present status and future prospect of agricultural antibiotics. *J. Pest. Sci.*, **7**,301-30.
- **Moncheva. P; Tishkov. S; Dimitrova. N; Chipeva. V; Antonova-Nikolova. S; and Bogatzevska. N. (2002).** Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *J of Culture Collections*, **3** (1), 3-14.
- **Mordarska H., Mordarski M. and Goodfellow M. (1972).** Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **71**, 77-86.
- **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.
- **Mustafa S.A., Tamer U.A., et Azer C. (2004).**Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.*, **3**:441-446.

N

- **Neuman M., (1990).** Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux. Masson (5^e Eds). Paris.
- **Nithya S.,Pandian S.K., (2010).** Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiol. Res.*, **165**, 578—593.

- **Nouasri A. (1996).** Les genres *Micrellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (*Actinomycétales*) dans les sols sahariens: Taxonomie numérique; production, extraction, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. Thèse de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.
- **Nouredine. L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algerie). pp 186.

O

- **Ochi. K; and Hiranuma. H. (1994).** A Taxonomic Review of the Genera *Kitasatosporia* and *Streptoverticillium* by Analysis of Ribosomal Protein AT-L30. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **44 (2)**, 285-292.
- **Omura S. (1992).** Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. ind. Microbiol.*, **10**, 135-156.
- **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*. *Int. Dairy. J.* **14**, 713–722
- **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

- **Perleman D. (1949).** Physiological studies on the Actinomycetes.
- **Pouilly. J.C. (2009).** Spectroscopie IR et spectrométrie de mobilité ionique appliquées aux structures de systèmes chargés isolés d'intérêt pharmaceutique. Thèse de Doctorat. Université Paris XIII, (France).pp 231.
- **Pridham T.G., Hesseltine C.W. and Benedict R.G. (1958).** A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups: placement of strains in morphological selection. *Appl. Microbiol.*, **6**, 5-79.

R

- **Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M. and Stackebrandt E. (1996).** The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct

actinomycete lineage proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 1088-1092.

- **Rawasheh R., Saadoun I., et Mahasneh A., (2005).** Effect of culture conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *Afri. J. of Biotechnol.* **4**: 251-255.
- **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, pp.59-64.
- **Rosset R., Caude M., Jardy A. (1990).** Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Masson, 2^e édition, Paris.

S

- **Sabaou N., Hacene H., Bennadji A., Bennadji H., Bounaga N. (1992).** Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne, *Can. J. Microbiol.* **38** :1066–1073.
- **Salas J. A., Mendes C. (2007).** Engineering the glycosylation of natural products in actinomycetes. *TRENDS in Microbiology*.15(5).
- **Sanglier J.J., Haag H., Huck T.A., Fehr T. (1993).** Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, **144** (8), 633-642.
- **Sarkonen N., Könönen O., Summanen P., Kanervo A., Takala A., et Jousimies-Somer H., (2000).** Oral Colonization with Actinomyces Species in Infants by Two Years of Age. *J Dent Res.* **79**: 864-867.
- **Seong, C. N., Park, S. K., Goodfellow, M., Kim, S. B. & Hah, Y. C. (1995).** Construction of probability identification matrix and selective medium for acidophilic actinomycetes using numerical classification data. *J Microbiol.*, **33**, 95–102.
- **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. *Antoni Van Leeuwenhoek* ., **23**, 15-22.

- **Singh, S.K., Gurusiddaiah, S. & Whalen, J.W. (1985)** .Treponemyn, a nitrile antibiotic active against *Treponema hyodysenteriae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, **27**, 329–345..
 - **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)**. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, (France). pp251.
 - **Sneath P.H.A. (1989)**. Numerical taxonomy. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. **4**. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 2303-2305.
 - **Srivibool R. and Sukchotiratana M. (2006)**. Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **28**, 493-499.
 - **Stackebrandt E. and Woese C.R (1981)**. The evolution of procaryotes. *Synopsia of the society for general microbiology*, **32**, 1-31.
 - **Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M. and Fowler V.J. (1983)**. A phylogenetic analysis of the family *Dermatophilaceae*. *J. Gen. Microbiol.*, **129** (6), 1831-1838.
 - **Stackebrandt E., Rainey F.A and Ward-Rainey N.L. (1997)**. A proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* clasis nov. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **47**, 479-491.
 - **Staneck, J.L. and G.D. Robert, (1974)**. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.*, **28**: 226-231.
 - **Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. and Suzuki Y. (1994)**. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, **8**, 122–127.
- T**
- **Taddei, A., Valderrama M., Giarrizzo J., Rey M., Castelli C. (2005)**. Chemical screening: A simple approach to visualizing *Streptomyces* diversity for drug discovery and further research. *Resin Microbiol*, **157**. 291–297
 - **Tang. S. K; Li. W. J; Dong. W; Zhang. Y. G; Xu. L; and Jiang. C. L. (2003)**. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant

Actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. *Actinomycetologica*, **17** (1), 06–10.

- **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.
- **Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., et Bora T.S., (2007)**. Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Microbiol. Médi.*, **17** : 242-249.
- **Theilleux J., (1993)**. Les actinomycètes *In* : Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Lavoisier, Tech et Doc, V 612p, pp 425.
- **Tulkens P.,Van Bambeke V. (2008)**. Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse. Syllabus national belge de pharmacologie.

✓

- **Valan Arazu. M; Duraiyadiyan. V; Agastian. P; Ignacimuthu. S. (2009)**. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India).
- **Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., De'Ry C., Brezezinski R., et Beaulieu C. (1996)**. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent raspberry root rot. *Applied and Environment Microbiol.* **62. 5** : 1630-1635..
- **Vandamme E.J. (1985)**. Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences. Vol. **22**. New-York. Marcel Dekker. p 808.
- **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.
- **Vicente MF, Basilio A, Cabello A, Pelaez F. (2003)**. Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect*; **9**:15—32.

W

- **Wang. Y; Zhang. Z.S; Ruan. J.S; Wang. Y.M; and Ali. S.M. (1999).** - Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J of Industrial Microbiol and Biotechnol*, **23**, 178-187.
- **Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703.
- **Wellington. E.M; Cresswell. N; Herron. P.R. (1992).** Gene transfer between streptomycetes in soil. *Gene*, **115**, 193-198.
- **Williams S.T and Fleming I. (1989).** Spectroscopic methods in organic chemistry. Fourth edition. Mc Graw Hill book company, London, 264p.
- **Williams S.T. and Kuster E. (1964).** Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*, **202**, 928.
- **Witt. D; and Stackebrandt. E. (1990).** Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces Waksman* and *Henrici* 1943, 339. *Sys. App. Microbiol.*, **13** (4), 361.

Y

- **Yamaguchi T., (1965).** Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **89**: 444-453.
- **Yu. J; Liu. Q; Liu. Q; Liu. X; Sun. Q; Yan. J; Qi. X; Fan. S. (2008).** Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology*, **99**, 2087–2091.

Z

- **Zaitlin.B; and Watson. S.B. (2006).** Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: *Myths, tenets ant truths*. **40** (9), 1741-1753.
- **Zhang J., Liu Z. et Goodfellow M. (2003).** *Nocardia caishijiensis* sp. nov., a novel soil Actinomycete. *Inter J of Syst and Evol Microbiol*. **53** : 999–1004.
- **Zili Z., Sfar S., Fessi H.,(2005).** Preparation and characterization of poly caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Inter J of Pharmaceutics.*, **294**, 261–267
- **Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N., (2005).** *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria:

Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res in Microbio*, **156**, 984–993.

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

ANNEXES

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

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

Milieu WILLIAMS (Williams et Kuster, 1964) (composition du milieu Williams modifié)
Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl : 2g; K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g;
CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g; agar : 18g; 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.

1.6. Milieu gélose nutritive (GN)

Peptone : 5g ; Extrait de levure : 2g ; Extrait de viande : 1g ; NaCl : 5g ; Agar : 15g ; Eau distillée q.s.p 1000ml ; .pH 7,5

1.7. Milieu Bennett

Peptone : .2g ; Glucose : 10g ; Extrait de viande : 1g ; Extrait de levure : 1g ; Agar : 18g ; Eau distillée q.s.p 1000ml ; pH = 7,2.

2. Etude physiologique

2.1. Dégradation des glucides et dérivés

- **Milieu ISP9 (Milieu de base)**

(NH₄)₂SO₄ : 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: 0,001 g ; MnSO₄ : 0,001 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.

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

10 g de caseine de lait 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.

2.8. 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.

2.9. Production de pigments mélanoides.

- **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.

2.2.10. Production de nitrate réductase

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

2.11. Sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Le milieu Williams liquide 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.

III. Milieu de production d'antibiotiques :

- **Milieu WILLIAMS modifié** (Williams et Kuster, 1964)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl : 2g; K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g; CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g; Eau distillée : 1000 ml. pH 7,2.

- **Milieu MSG :**

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

- **Milieu MSA**

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

- **Milieu MSAE**

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

RÉVÉLATEURS CHIMIQUES UTILISÉS POUR LES ANTIBIOTIQUES

(Merck, 1975)

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- 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)

4- Ninhydrine : révélateur des amines, des acides aminés et des osesamines.

- Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol.
- Traitement complémentaire: chauffer à 105 °C jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette, rose).
-

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

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

« Patience et longueur de temps Font plus que force ni que rage. »

Jean de la Fontaine (Les Fables , Livre II, Fable 11)

Résumé

Lors d'un programme de recherche de nouveaux métabolites antifongiques à partir des actinomycètes, une quarantaine de souches a été isolées du sol pollué ; d'une décharge publique de la région de Bejaia. Deux souches actinomycétales, baptisées P₃D₅₁ et P₄D₁ produisent d'après les analyses spectroscopiques UV-visible des molécules antifongiques non polyéniques. Les études morphologiques, chimiques ont permis de rattacher les deux souches au genre *Streptomyces*. L'étude physiologique met en relief différents caractères intéressants, tels que la croissance à différentes températures, à différentes concentrations en NaCl...etc.

Les activités antifongiques des filtrats de cultures des souches d'actinomycètes ont été extraites par 5 solvants organiques. Le dichlorométhane s'est révélé être le meilleur solvant d'extraction. Le système d'éluion ayant permis une bonne séparation est l'acétonitrile/eau (90/10 v/v). Les résultats des réactions chromogéniques de ces extraits montrent qu'ils contiennent des fonctions glucidiques pour la souche P₄D₁, et des groupements glucidiques et des substances réductrices pour P₃D₅₁. La stabilité des molécules a été testée vis à vis de différents agents physiques et chimiques. La cinétique de production indique que le meilleur milieu de production est l'ISP4 pour la souche P₄D₁, et le M2 pour P₃D₅₁.

Mots clés : antifongique, non polyénique, production, extraction, caractérisation *Streptomyces*, identification.

Abstract

In a research program for new antifungal metabolites from actinomycetes, a forty strains was isolated from soil polluted; a landfill in the region of Bejaia. Two strains of Actinomycetales, called P4D1 P3D51 and produce from the UV-visible spectroscopic analysis of non-polyene antifungal molecules. Morphological studies, chemical allowed to link the two strains to the genus *Streptomyces*. The physiological study highlights various interesting characters, such as growth at different temperatures, different concentrations of NaCl ... etc.. The antifungal activities of culture filtrates of actinomycetes strains were extracted by organic solvents 5. Dichloromethane proved to be the best extraction solvent. The elution system that allowed a good separation is acetonitrile / water (90/10 v / v). The results of the chromogenic reactions of these extracts show that they contain functions for the strain P4D1 carbohydrate, and carbohydrate moieties and reducing substances to P3D51. La stable molecules has been tested with respect to various physical and chemical agents. The kinetics of production indicates that the best production environment is ISP4 for strain P4D1, and M2 for P3D51.

Keywords: antifungal, non polyene, production, extraction, characterization of *Streptomyces*, identification.

ملخص

في برنامج بحثي لأبحاث جديدة مضادة للفطريات من Actinomycete ، تم عزل حوالي 40 سلالة من التربة الملوثة؛ مكب النفايات في منطقة بجاية. سلالتان من actinomycète ، P4D1 و P3D51 تنتجان طبق التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية مرئية جزيئات مضادة للفطريات غير بوليين. سمحت الدراسات المورفولوجية والكيميائية بربط السلالتين للجنس *Streptomyces*. الدراسة الفسيولوجية سمحت بتسليط الضوء على ملامح مختلفة مثيرة للاهتمام ، مثل النمو في درجات حرارة مختلفة ، وتركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم... الخ. تم استخراج اللانشطة المضاد للفطريات من الرواشح بواسطة 5 مذيبات عضوية. اتضح ان ثنائي كلورو ميثان يكون أفضل مستخلص لمضادات الفطريات. أفضل نظام سمح بفصل جيد هو أسيتونتريل / الماء (90 / 10 / 90). نتائج ردود الفعل مولد اللون تبين أنها تحتوي على وظائف للكربوهيدرات للسلالة P4D1 ، و كربوهيدرات إضافة الى مواد مخفضة للسلالة P3D51. وقد تم اختبار استقرار الجزيئات المستخرجة ضد. مختلف العوامل الفيزيائية والكيميائية. حركية الإنتاج يشير إلى أن أفضل بيئة لإنتاج هذه الجزيئات هو ISP4 ل P4D1 و M2 ل P3D51.

الكلمات الرئيسية : مضاد للفطريات، غير بوليين، الإنتاج، الاستخراج ، وتوصيف *Streptomyces* ، وتحديد الهوية.