

République Algérienne Démocratique et Populaire
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre: 104 / T.E / 2007
N° de Serie : 07 / SN / 2007

Thèse de Doctorat d'Etat
En Microbiologie Appliquée

Présenté par :
Allaoueddine BOUDEMAGH

Thème

***Isolement, à partir des sols Sahariens,
de bactéries actinomycétales productrices
de molécules antifongiques,
identification moléculaire de souches actives.***

Soutenue le : 01 / 12 / 2007

Devant le jury :

Président :	Mr. A. BENGUEDOUAR	Prof. Université de Constantine
Rapporteur :	Mr. A. BOULAHROUF	Prof. Université de Constantine.
Examineurs :	Mr. P. BOIRON	Prof. Université de Lyon.
	Mr. N. KARAM	Prof. Université d'Oran.
	Mr. L. LAROUS	Prof. Université de Sétif.

Année Universitaire: 2006-2007

Remerciements

Je tiens à exprimer en premier, ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à Monsieur Boulahrouf Abderrahmane, Professeur à l'université de Constantine pour ses conseils, son aide et sa disponibilité qui ont permis à la concrétisation de ce travail.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent aussi à Monsieur Benguedouar Amar , Professeur à l'université de Constantine qui me fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie également Monsieur Patrick Boiron, Professeur à l'université de Lyon pour avoir accepté de faire partie du jury et de juger mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Nouredine Karam, Professeur à l'université d'Oran, pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Merci à Mr Larbi Laarous, Professeur à l'université de Sétif de m'honorer par sa présence dans mon jury.

Des remerciements particuliers s'adressent à Mr le Professeur Boiron et son équipe du laboratoire de Mycologie Fondamentale et appliquée aux biotechnologies industrielles, pour avoir accepté de m'accueillir aussi chaleureusement.

Je remercie beaucoup Mr Koudil Mohamed, capitaine de la gendarmerie Nationale de Bechar, pour son aide à l'obtention des échantillons de sols.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidée et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.Les mycoses	5
1.1. Principaux agents des mycoses	5
1.2. Pathologies mycosiques les plus fréquentes	7
1.2.1. Mycoses superficielles	7
1.2.2. Mycoses sous-cutanées	7
1.2.3. Mycoses profondes	8
1.3. Antifongiques disponibles utilisés contre les mycoses	10
2.Les antifongiques	11
2.1. Historique	11
2.2. Principaux antifongiques utilisés en médecine humaine	12
2.2.1. Griséofulvine	12
2.2.2. Nystatine	13
2.2.3. Amphotéricine B	14
2.2.4. Autres agents polyènes antifongiques	15
2.3. Antifongiques de synthétiques	15
2.3.1. Le chlormidazole	15
2.3.2. Le tolnaftate	16
2.3.3. La flucytosine	16
2.3.4. Les imidazoles	17
2.3.5. Les antifongiques allylamines	19
*Naftifine	19
*Terbinafine	20
*Amorolfine	20
2.3.6. Les antifongiques non classés	21
2.4. Nouveaux antifongiques d'origine naturelle	21
2.4.1. Echinocandines	21
2.4.2. Nikkomycines	22
2.4.3. Pradimicines	22
3.Les Actinomycètes	22
3.1. Historique	22
3.2. Généralités	23
3.3. Morphologie	23
3.4. Ecologie et distribution dans la nature	24
3.5. Physiologie et métabolisme des actinomycètes	25
3.6. Biologie	26
3.6.1. Thermorésistance des spores	27
3.7. Structure pariétale	28
3.8. Génétique et structure de l'ADN	29
MATERIEL ET METHODES	
Partie 1 ETUDE DES CONDITIONS D'ISOLEMENT SELECTIF DES ACTINOMYCETES A PARTIR DES SOLS SAHARIENS	
Introduction	31
1. Prélèvement et traitement des échantillons	32
2. Antibiotiques testés	32
3. Milieux d'isolements	33
4. Dilutions et ensemencement	33
5. Dénombrement des colonies	33
6. Résultats et discussion	34

7.Conclusion	42
Partie 2 ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES ET MISE EN EVIDENCE DE L' ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES SOUCHES PURIFIEES	
Introduction	43
1.Ecosystèmes explorés	45
1.1.Environs de la ville de Batna	45
1.2.Grang Erg occidental	45
1.3.Grang Erg oriental	47
2.Echantillons analysés	50
2.1.Prélevements	50
2.2.Traitement	50
2.3.Dilutions	50
2.4.Ensemencement	50
3.Purification et conservation des souches isolées	51
4.Sélection des actinomycètes productrices de métabolites à activité antifongique	51
4.1.Milieus	51
4.2.Souches microbiennes cibles et contrôles	52
4.3.Test d'activité antifongique (technique des cylindres d'agar)	52
Résultats	53
Discussion	61
Conclusion	64
Partie 3 IDENTIFICATION DE DEUX ISOLATS D'ACTINOMYCETES PRODUCTEURS D'ANTIFONGIQUES CONTRE CANDIDA TROPICALIS	
Introduction	65
1. Identification moléculaire des actinomycètes retenus par séquençage d'un fragment de 400 pb de l'ADNr 16S	66
1.1.Extraction de l'ADN par la technique à la résine Chelex®.	66
1.2. Amplification du fragment d'ADNr 16S	66
1.3.Electrophorèse	67
1.4.Purification	67
1.5.Séquençage	67
1.6.Analyse de la séquence d'ADNr 16S	68
1.7.Comparaison des séquences avec la banque informatique	68
2. Identification moléculaire des actinomycètes retenus par séquençage de l'ADNr 16S (1400 pb) en utilisant les amorces SQ1-SQ6	68
2.1. Amplification de l'ADNr 16S	68
2.2. Séquençage de l'ADNr 16S	69
3. Etude des caractères phénotypiques	70
3.1. Préparation de l'inoculum général	70
3.2 Préparation de l'inoculum lavé	70
3.3. Caractérisation de la morphologie et de la pigmentation	70
3.3.1. Observation macroscopique	70
3.3.2. Observation du mycélium aérien et du mycélium du substrat par la technique de la culture sur lamelle	71
3.3.3.Détermination de la couleur du mycélium du substrat	71
3.3.4.Production de pigments mélanoides	71
3.4.Détermination des caractères physiologiques	71
3.4.1. Effet du pH sur la croissance des souches	71
3.4.2.Effet de la température sur la croissance des souches	71
3.4.3.Effet du chlorure de sodium sur la croissance des souches	72
3.4.4.Test de la croissance sur différentes sources de carbone	72
3.4.5.Test de la croissance sur différentes sources d'azote	72

3.5.Dégradation de certains composés	73
3.5.1.Hydrolyse de l'amidon	73
3.5.2.Hydrolyse de la caseine	73
3.5.3.Dégradation de l'urée	73
Résultats	74
1. Identification moléculaire	74
1.1.Séquençage par amorces universelles de la souche "30"	74
1.2.Séquençage par amorces universelles de la souche "C3"	76
1.3.Séquençage par amorces SQ1-SQ6 de la souche "30"	77
1.4.Séquençage par amorces SQ1-SQ6 de la souche "C3"	81
2. Identification phénotypique	84
Discussion	87
Conclusion	90
Partie 4 ETUDE DE LA NATURE POLYENIQUE OU NON POLYENIQUE DES ANTIFONGIQUES PRODUITS PAR LES SOUCHES DE STREPTOMYCES 30 et C3	
Introduction	91
1. Etude du spectre antibactérien des souches "30" et "C3"	92
2. Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique	92
3. Détermination du spectre UV-visible des extraits actifs	93
3.1. Culture des actinomycètes	93
3.2. Extraction des produits actifs à partir du culot	93
3.3. Extraction des produits actifs à partir du surnageant	93
3.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits (technique des disques en papier)	95
3.5. Etude du spectre d'absorption UV-Visible	96
Résultats	97
1. Spectre antibactérien	97
2. Effet de l'ergostérol	99
3. Activité antimicrobienne des extraits organiques	99
4. Etude du spectre d'absorption UV-Visible	100
Discussion	104
Discussion et conclusion générale	105
Références bibliographiques	108

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

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

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

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

Les choses ont peu évolué dans le traitement des infections fongiques depuis l'introduction du fluconazole (Triflucan®) et de l'itraconazole (Sporanox®) (**Rex et al., 1994**). Simultanément, le taux de résistance à ces dérivés azolés a beaucoup augmenté. Le rôle central de ces deux dérivés azolés dans le traitement des infections fongiques et la crainte des résistances ont amené un certain nombre de cliniciens à être prudents concernant leur utilisation en prophylaxie ou dans les cas légers de candidose (**Terrel et al., 1999**). Lorsque surgissent des infections fongiques résistantes aux dérivés azolés, on ne dispose que de peu d'alternatives (**Dismukes, 2000**).

La toxicité et l'aspect peu pratique de l'amphotéricine B en font le traitement de dernier recours (**Ellis et al., 1992, Bates et al., 2001, Eriksson et al., 2001**). Entre temps, on a longtemps attendu des données cliniques contrôlées concernant les formulations liposomiales bien tolérées de l'amphotéricine B et de la nystatine (**Hiemenz et al., 1996, Herbrecht et al., 2001**). Les formulations liposomiales sont obtenues en entourant la substance active de minces globules de graisse qui permettent aux médicaments d'atteindre leur cible avec moins d'effets secondaires sur les autres tissus. En dépit de leur meilleure tolérance ces composés liposomiaux doivent toujours être administrés par voie intraveineuse ce qui limite leur utilisation aux infections aiguës (**Cherin, 1998**). Cependant, le grand nombre de présentations consacrées à de nouveaux agents antifongiques à mode d'action différent suggère que le traitement des infections fongiques connaîtra d'importants changements au cours des prochaines années (**Dismukes, 2000**). La pradimicine est un nouvel antifongique, produit par une bactérie, qui agit en se liant aux sucres de la paroi cellulaire du champignon qui s'en trouve altérée.

Malheureusement, ces produits ne semblent pas être absorbés par voie orale. Par voie intraveineuse, certaines augmentations des enzymes hépatiques ont été observées dans les études de recherche de dose chez l'homme (**Dismukes, 2000**).

Les échinocandines, contrairement aux antifongiques azolés qui bloquent simplement la croissance des cultures fongiques, tuent les champignons en interrompant la synthèse d'un composant de leur paroi cellulaire (**Villanueva et al., 2002**). Cet élément de la paroi cellulaire ne se trouve pas dans les cellules de mammifères, ce qui permet d'espérer que le médicament sera moins toxique que l'amphotéricine B, qui peut induire la formation de canaux dans les parois des cellules fongiques mais aussi des cellules de mammifères (**Mora-Duarte et al., 2002**). In vitro et chez l'animal, les échinocandines semblent inactives sur les champignons responsables de la méningite cryptococcique, ces médicaments sont utiles dans le traitement de la pneumocystose aigüe puisqu'ils ne tuent pas la forme active du parasite qui en est responsable mais seulement sa forme latente enkystée (**Van der Host et al., 1997**).

Devant ce constat alarmant et malgré la découverte de ces nombreuses substances antifongiques certaines sont peu efficaces, d'autres sont très chères. En outre, les problèmes de résistances limitent l'utilisation de plusieurs d'entre eux.

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

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

- d'étudier les milieux et les conditions d'isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols arides et semi-arides du sud algérien.

- d'isoler et de sélectionner, à partir de ce type d'écosystème extrême, des souches d'actinomycètes rares.

- d'étudier l'activité antifongique vis à vis de champignons pathogènes

- d'identifier par caractérisation phénotypique et génétique les souches d'actinomycètes actives.

- de déterminer la nature polyènique ou non des métabolites synthétisés notamment l'activité antifongique contre *Candida tropicalis* R2 qui est résistante aux polyènes.

1- Les Mycoses :

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

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

1-1 Principaux agents des mycoses :

Les agents des mycoses peuvent avoir une origine endogène ou exogène. Les champignons d'origine endogènes sont déjà présents à la surface et à l'intérieur du corps (principalement le tube digestif). Ils sont représentés essentiellement par *Candida albicans*. Cette levure vit exclusivement dans le tube digestif de l'homme et de certains animaux. La présence de *C. albicans* sur la peau, n'est possible que dans des cas pathologiques. Par contre, une dizaine d'autres espèces de *Candida* (*Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida*

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

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

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

Les levures sont des champignons unicellulaires se reproduisant le plus souvent par bourgeonnement. Parmi les quelques 500 espèces connues, une trentaine peut être retrouvée en pathologie humaine (Pfaller, 2002, Boiron, 1999). Les levures induisent des infections de la peau et surtout des muqueuses. Dans la région génitale (mycose vaginale), dans la bouche (on parle du muguet ou de mycose oropharyngée), au niveau de l'œsophage (c'est une mycose œsophagienne). Les mycoses cutanées à *Candida* se manifestent en règle générale par des placards érythémateux (rouge sombre) à bords festonnés par une collerette de squames blanchâtres (Ainsworth, 1986, Anaissie *et al.*, 1996, Rex *et al.*, 2000).

Les moisissures déclenchent très rarement des mycoses cutanées. Elles peuvent cependant contribuer à aggraver une maladie déjà existante en colonisant secondairement des sites cutanés déjà infectés. Néanmoins, dans la plupart des cas, les moisissures, comme par exemple les *aspergillus*, sont à l'origine de mycoses systémiques (Yashuda, 2001, Stevens *et al.*, 2000). Les patients immunodéprimés, c'est-à-dire avec un système de défense affaibli, sont les plus menacés (Singh Navery *et al.*, 1996, Holding *et al.*, 2000). La transmission

s'opère généralement par inhalation de spores fongiques à travers les voies respiratoires: raison pour laquelle se sont en premier lieu les poumons qui sont touchés. On parle alors de mycoses profondes (mycoses des organes internes) (Stevens *et al.*, 2000). Parmi les moisissures les plus incriminées dans ces mycoses, les aspergillus prennent la tête de liste, mais d'autres sont aussi rencontrés (Walsh *et al.*, 2001).

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

1-2 Pathologies mycosiques les plus fréquentes :

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

1-2-1 Mycoses superficielles :

Ces mycoses attaquent les couches superficielles de la peau et des muqueuses et aussi les phanères (protecteur de l'épiderme comme les poils, les ongles...etc). Les *Candida sp* sont des levures saprophytes présentes dans le tube digestif, Certains sont également présents dans le tractus urogénital ou sur la peau. L'infection est opportuniste nous sommes notre propre source de *Candida*. Ces levures sont responsables de candidoses humaines touchant principalement la peau, les muqueuses, les phanères et peuvent même atteindre les organes internes. L'espèce la plus fréquente, *C. albicans*, est un saprophyte du tube digestif. Les pityrospores ou malassezioses sont des mycoses superficielles dues à des levures lipophiles du genre *Pityrosporum* (= *Malassezia*), faisant partie de la flore cutanée normale de l'homme. La principale espèce impliquée en pathologie humaine est *Pityrosporum* (= *Malassezia furfur*), se localisant dans la peau et dans les oreilles et le nez (Boiron, 1999, Pfaller, 2002).

1-2-2 Mycoses sous-cutanées :

Les agents responsables des chromomycoses sont des champignons pigmentés (noirs) du groupe des dématiés. Cinq espèces de champignons, regroupées en quatre genres, en sont responsables : *Cladosporium carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*,

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

1-2-3 Mycoses profondes :

Ce terme est utilisé par opposition au terme superficiel et concerne l'invasion des organes ou viscères profonds (synonymes : mycoses viscérales profondes, mycoses systémiques). Les mycoses profondes occupent une place de plus en plus importante dans la pathologie infectieuse. **Les champignons** du genre *Candida* peuvent provoquer des infections viscérales, elles peuvent se limiter à un organe ou disséminer à travers l'organisme (Rex et al., 2000). Les levures *Candida* sont souvent responsables d'infections nosocomiales systémiques (Richards et al., 1999). Au plan épidémiologique, l'espèce *Candida albicans* est responsable de la moitié des infections (McNeil et al., 2001, Vincent et al., 1998). **La Cryptococcose** est une infection grave, provoquée par le champignon *Cryptococcus neoformans*, une levure capsulée, survient chez les patients immunodéprimés, en particulier ceux atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La forme clinique la plus fréquente de cette infection est une méningo-encéphalite, fatale en l'absence de traitement. La principale espèce pathogène : *Cryptococcus neoformans*, comporte trois variétés : *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *gattii* et *C. neoformans* var. *grubii*. (Boiron, 1994, Maslin, 2002). **Aspergillus** est un champignon filamenteux dont les spores sont véhiculées par l'air et sont inhalées par tous les individus. Totalement inoffensif pour la majorité de la population, il peut cependant provoquer différentes formes de mycoses chez certains individus. Les aspergilloses sont des mycoses profondes qui occupent le second rang en fréquence des infections

mycotiques chez le patient immunodéprimé. *Aspergillus sp.* est isolé dans 30 % des séries autopsiques de patients immunodéprimés atteints d'infection fongique (Bodey, 1992). **L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique** est une maladie allergique assez commune chez les asthmatiques : on estime que 20% d'entre eux peuvent contracter cette pathologie à un moment donné de leur vie. Elle touche également les personnes atteintes de mucoviscidose à la sortie de leur adolescence (Maslin, 2004). Le champignon de **l'aspergillome** peut se développer dans une cavité préexistante dans le poumon et résultant d'une maladie antérieure, telle que la tuberculose ou la sarcoïdose. Les spores germent dans cette cavité pour former une boule "mycélienne". La maladie peut passer inaperçue, surtout dans les phases précoces. **Les zygomycoses** sont des affections cutanées, pulmonaires ou cérébrales dues à des champignons coenocytiques de la classe des Zygomycètes (Maslin, 2003). Les zygomycoses comprennent : l'entomophthoromycose à *Conidiobolus coronatus*, la basidiolobomycose à *Basidiobolus ranarum*, la rhinosporidiose qui est due au champignon *Rhinosporidium seeberi* et, enfin, la mucormycose (Maslin, 2004). Deux histoplasmoses strictement identiques en culture mais différentes par leurs aires de répartition géographique et leur tableau clinique, donnent une mycose profonde dues à deux champignons dimorphiques encapsulés *Histoplasma capsulatum var. capsulatum* et *Histoplasma capsulatum var. duboisii* (histoplasmosse africaine). **La coccidioïdomycose** appelé aussi maladie de Pasadas et Wernicke, est due à un champignon dimorphique *Coccidioides immitis*, présent dans le sol des régions chaudes, sèches, désertiques et semi-désertiques du continent américain (atmosphère poussiéreuse et vents de sable). **La blastomycose** dite aussi blastomycose nord américaine ou maladie de Gilchrist, est également due à un champignon dimorphique *Blastomyces dermatitidis*, isolé du sol et du bois. **La paracoccidioïdomycose** est une mycose profonde provoquée par un champignon dimorphique *Paracoccidioides brasiliensis*. C'est une maladie du continent américain (Amérique centrale et du sud, à l'exception du Chili), touchant en particulier les zones forestières et humides du Brésil et les zones productrices de café. **La pénicilliose** est due à un champignon dimorphique *Penicillium marneffei*, d'Asie du sud-est, qui a émergé avec le sida. Décrite au Vietnam en 1956, la pénicilliose a émergé depuis 1988 en Asie du sud-est. Le champignon a été isolé du sol, de terriers de rongeurs.

1-3 Antifongiques disponibles utilisés contre les mycoses :

Parmi tout l'arsenal de molécules naturelles ou de synthèses disponibles, l'antifongique universel, fongicide et bien toléré n'existe pas (**Montravers et al., 2003**). La thérapeutique antifongique dispose à vrai dire, d'un petit nombre de produits, en particulier contre les mycoses profondes (**Odds, 1995, Vincent et al., 1998, Terrel et al., 1999, McNeil et al., 2001, Carle, 2003**). L'amphotéricine B sous ces formes lipidiques surtout, est utilisé par voie intraveineuse, est considérée comme étant la molécule d'excellence et la plus efficace parmi les antifongiques systémiques (**Ainsworth, 1986, Gallis et al., 1990, Herbrecht et al., 2001**). D'autres composés comme la flucytosine, la griséofulvine, puis les dérivés azolés : miconazole, kétoconazole, fluconazole, itraconazole, ont constitué de grandes étapes dans la découverte des molécules antifongiques, les résistances contre ces molécules deviennent malheureusement répandues (**Patel et al., 1998, Terrell, 1999, Boiron, 2000, Carle, 2003**). Les dérivés allylamines et morpholines ont eux aussi participé à cet arsenal d'agents antifongiques (**Rex et al., 2000**) ; La nystatine est un polyène très actif contre de nombreuses espèces fongiques, levuriformes ou filamenteuses (**Medoff et Kobayashi, 1980**). La 5 fluorocytosine (ou flucytosine) est principalement active sur les levures et les agents de chromoblastomycoses (**Francis et Walsh, 1992**). Son efficacité est limitée par sa toxicité hématologique et digestive et l'apparition de résistances fréquentes, interdisant son administration en monothérapie (**Patel et al., 1998**). Les azolés, représentés par les imidazoles et les triazoles font partie de la liste. Parmi les imidazoles, on retrouve le miconazole et le kétoconazole, utilisables par voie générale pour le traitement des mycoses profondes. Le fluconazole et l'itraconazole font partie des triazolés. Le fluconazole est actif surtout sur les *Candida* et certains agents de mycoses exotiques. Il est utilisable par voie intra-veineuse, et présente une faible toxicité hépatique (**Terrell, 1999, Dismukes, 2000**). L'itraconazole possède l'avantage sur les autres azolés d'être actif sur *Aspergillus*. Outre ce champignon, cet antifongique est actif sur les levures, les dermatophytes, les dématiés et les champignons dimorphiques (**Espinel-Ingroff, 1998, DeBeule et Van Gestel, 2001**). Le voriconazole est un nouvel antifongique de structure proche du fluconazole, mais plus efficace avec un spectre d'activité plus large, notamment sur *C. glabrata*, *C. krusei* et *Aspergillus spp.* Le voriconazole est administrable par voie orale et par voie intraveineuse (**Potoski et Brown, 2002, Johnson et Kauffman 2003**).

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

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

2- Les antifongiques

2-1- Historique :

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

Au début du 20^e siècle, les produits chimiques de synthèse et les colorants ont remplacé tous ces mélanges rudimentaires anciens. Ainsi, pour le traitement des infections à dermatophytes du cuir chevelu, le dermatologue **Raymond Sabouraud** en 1910 a décrit une pâte à base d'amidon, de résine et de farine contenant du carbonate de cuivre en tant qu'ingrédient actif. Pour l'infection de la peau glabre, il recommandait la teinture d'iode. Depuis, plusieurs préparations contenant du soufre, du permanganate de potassium ou des sels de métaux lourds comme l'argent et le mercure, ont été utilisées pour le traitement topique des infections à dermatophytes (**Ainsworth, 1986**). Nombreuses préparations anciennes ont été abandonnées, seules trois préparations antifongiques topiques du début du siècle sont encore prescrites aujourd'hui. La première est à base d'acide benzoïque et d'acide salicylique sous

forme de pommade (**Whitfield, 1912**), la seconde est la teinture de triphénylméthane, le violet de gentiane (**Faber et Dickey, 1925**) et la troisième, rarement utilisée aujourd'hui, est «la teinture de Castellani» formulée à base de carbolfuchsine (**Castellani, 1928**). Tous les mélanges cités précédemment sont toxiques, ils montrent en plus d'une activité antifongique, une action antibactérienne aussi efficace, ce ne sont donc pas de véritables antifongiques spécifiques. Parmi les premiers composés antifongiques, certains ont été initialement considérés comme des agents antibactériens mais, plus tard, ils ont révélé une activité contre certains champignons. Ces composés étaient entre autres le cycloheximide (qui inhibe *Cryptococcus neoformans*) et les sulfonamides (la sulfadiazine inhibe *Paracoccidioides brasiliensis*). Les premiers antifongiques possédant exclusivement une activité inhibitrice contre les champignons pathogènes humains n'ont été découverts qu'après la seconde guerre mondiale et leur utilisation courante en clinique date seulement de la fin des années 50. Les premières molécules antifongiques à usage médical sont les composés appartenant à la série des polyènes et la griséofulvine. Elles ont toutes été découvertes grâce aux techniques de screening d'actinomycètes et de champignons. Les deux antifongiques pionniers introduits pour un usage clinique, sont la nystatine et la griséofulvine. La nystatine a été commercialisée pour des applications cliniques à la fin des années 50, la griséofulvine au début des années 60, bien qu'elle a été découverte (**Oxford et al., 1939**) avant la nystatine (**Hanzen et Brown, 1950**). La nystatine a été le point de départ du développement de nombreux autres antifongiques cliniques de nature polyénique.

2-2- Principaux antifongiques naturels utilisés en médecine humaine :

2-2-1-Griséofulvine :

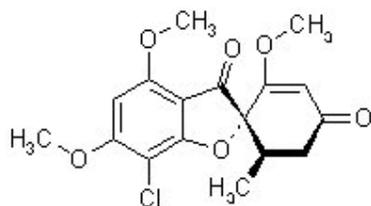


Figure 1 : Griséofulvine® Laboratoire Sanofi Winthrop

L'emploi et la commercialisation de la griséofulvine (**Fig. 1**) ont été d'abord comme agent fongicide en agriculture. L'efficacité clinique du traitement orale de la griséofulvine a été démontrée en premier, sur des infections à dermatophytes chez des animaux de laboratoire (**Gentiles, 1958**). Cette molécule antifongique est un métabolite produit par *Penicillium griseofulvum* d'où elle tire son nom. Parmi les champignons pathogènes pour l'homme, les genres inhibés sont : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Elle est utilisée, également, contre la plupart des dermatophytoses cutanées en particulier les teignes du cuir chevelu et les infections cutanées qui affectent la partie supérieure du corps. Son action s'oriente sur l'inhibition de la mitose des champignons sensibles. La griséofulvine est considéré comme étant un antifongique bon marché pour les pays pauvres.

2-2-2- Nystatine :

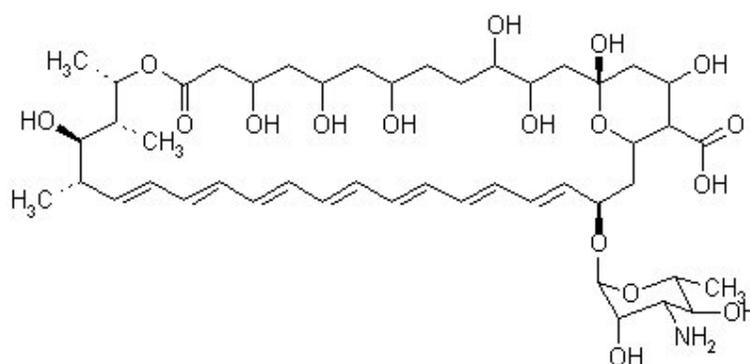


Figure 2 : Mycostatine ® Laboratoire Bristol Myers Squibb

Découvert par Hazen et Brown en 1950, l'appellation initiale était "fungicidin" ce nom a été changé par ses inventeurs en nystatine en l'honneur des laboratoires "New York STATE" pour lesquels ils travaillaient.

L'activité antifongique a été mise en évidence à partir d'une culture d'un actinomycète isolé de la terre de la ferme laitière de Nourse en Virginie, aux Etats-Unis, d'où son nom de *Streptomyces noursei*. Cette bactérie filamenteuse, produisait deux antibiotiques : La nystatine et le cycloheximide. La nystatine a été breveté et sa licence confiée à "E.R. Squibb et Sons" (connu maintenant sous le nom de Bristol Meyers-Squibb). La nystatine possède quatre

doubles liaisons conjuguées dans sa structure (**Fig. 2**). Le spectre antifongique de la nystatine *in vitro* est très étendu, il englobe plusieurs levures pathogènes comme les *Candida sp.*, les pathogènes dimorphes qui sont infectieux sous une forme levure et *Cryptococcus neoformans* (**Hildick-Smith et al., 1964**). La nystatine est également active contre la plupart des dermatophytes et à l'égard de nombreux agents responsables des mycoses profondes y compris *Aspergillus sp* ainsi que de nombreuses moisissures. La toxicité de la nystatine administrée par voie parentérale rend son utilisation clinique limitée uniquement pour des usages topiques. La nystatine agit comme tous les autres antifongiques polyènes, en dégradant la membrane cellulaire (**Kerridge et Whelan, 1984**). Cette toxicité sélective de la nystatine contre les membranes de champignons par rapport aux membranes des mammifères est due à une affinité de liaison avec l'ergostérol fongique supérieure à celle du cholestérol des mammifères (**Odds, 1995**).

2-2-3- Amphotéricine B :

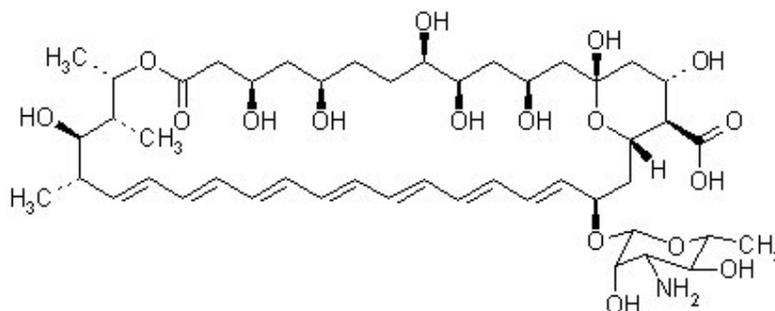


Figure 3 : Fungizone ® Laboratoire Bristol-Myers-Squibb

Molécule antifongique découverte par (**Gold et al., 1956**). Le germe producteur est un actinomycète isolé du bassin d'Orinoco dénommé *Streptomyces nodosus*. C'est un polyène heptène (**Fig. 3**) qui inhibe spécifiquement la croissance de nombreuses levures et moisissures et est sans action contre les bactéries. L'amphotéricine B, est un puissant antifongique qui inhibe la plupart des espèces pathogènes. En médecine humaine, l'amphotéricine B est le seule polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes. Toutefois, des effets secondaires indésirables sont remarqués lors de

ces traitements, mais ceux-ci peuvent être minimisés à l'aide de stratégies d'administration judicieuses.

2-2-4-Autres agents polyènes antifongiques :

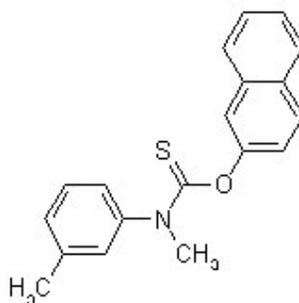
Outre l'amphotéricine B et la nystatine qui sont les plus connus parmi la série des polyènes, plusieurs autres molécules naturelles de la même classe ont été découvertes dans les années 50. Il s'agit de la candicidine, la candidine, l'étruscomycine (ou lucensomycine), la filipine, la natamycine (pimaricine ou tennecéline) et la trichomycine (hachimycine) (**Medoff et Kobayashi, 1980**). La mépartricine a été commercialisée au début des années 70 (**Simonetti et Strippoli, 1971**). Tous ces agents ont été utilisés pour le traitement des mycoses humaines et certains ont été (et sont encore) commercialisés dans certains pays, toujours dans des formulations destinées à un usage topique. Dans l'espoir de trouver de nouvelles formulations lipidiques pour administration intraveineuse, comme pour l'amphotéricine B, l'intérêt pour ces molécules polyéniques commence à augmenter ces dernières années (**Odds, 1995**).

2-3-Antifongiques de synthèse :

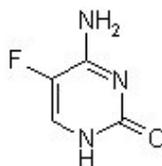
Jusqu'à la fin des années 50, les seules molécules à usage médicale étaient naturelles. Les premiers antifongiques de synthèse ont été utilisés en agriculture (**Odds, 1995**). Bien que, ces dernières années de nombreux nouveaux produits naturels à activité antifongique ont été décrits, on estime que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

2-3-1-Le chlormidazole :

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

2-3-2-Le tolnaftate :**Figure 4 : Sporiline®** Laboratoire Schering-Plough

Ce composé thiocarbamate (**Fig. 4**) découvert en 1962 est un antifongique topique actif contre les dermatophytes et il est vendu également sous forme de poudre pour le traitement du tinea pedis. C'est un inhibiteur de l'enzyme squalène époxydase dans la voie de biosynthèse des stérols (**Ryder *et al.*, 1986**). Le **tolciclate**, un thiocarbamate plus récent, possède des propriétés très similaires.

2-3-3-La flucytosine :**Figure 5 : Ancotil ®** Laboratoire Roche

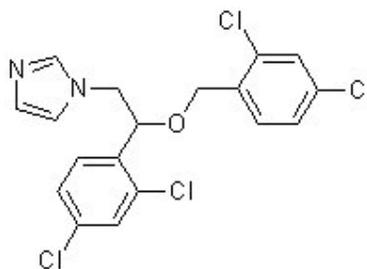
Le 5-fluorocytosine (**Fig. 5**) est la première molécule qui offrait la possibilité réelle de traiter par voie orale les infections fongiques profondes. C'est un inhibiteur de la synthèse de L'ARN de certains champignons. Après pénétration dans le cytoplasme fongique sous l'action d'une cytosine perméase, le 5-fluorocytosine se transforme en 5-fluorouracile qui se substitue à l'uracile dans la synthèse des ARN. Cette situation conduit au blocage de la synthèse protéique (**Scholer, 1980 ; Polak, 1990**). La spécificité d'action sur les cellules fongiques, est due à la spécificité de la cytosine perméase qui n'existe pas chez les mammifères. Son spectre d'action *in vitro*, se limite aux *Candida* sp ; *Cryptococcus neoformans* ; certaines moisissures dématiacées et certains isolats d'*Aspergillus* sp. A cause des multiples cas de résistance à cette molécule, la flucytosine est employée avec succès en

association avec d'autres antifongiques polyéniques comme l'amphotéricine B ou azolés ou encore avec une échinocandine, dans le traitement combiné de nombreuses mycoses systémiques.

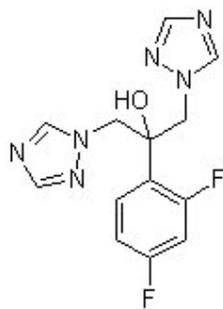
2-3-4-Les imidazoles :

Le benzimidazole, le chlormidazole, les arylimidazoles et d'autres font partie des composés imidazoles présentant une activité antifongique importante *in vitro*. Les premiers antifongiques imidazoles appartenant à la série des azolés ont été décrits par Janssen Pharmaceutica en Belgique, il s'agit du miconazole (**Fig. 6 a**) et l'éconazole (**Fig. 7**) (**Godefroi et al., 1969**). Le clotrimazole (**Fig. 8**) a été décrit par Bayer AG en Allemagne (**Marget et Adam, 1969**). Ces premières molécules ont été évalués dans de nombreux essais cliniques et ont prouvés leur efficacité dans le traitement topique des infections superficielles à *Candida* et des dermatophytoses. Leur spectre antifongique s'étale contre plusieurs pathogènes fongiques systémiques et contre de nombreux autres agents des mycoses superficielles. Le mode d'action de ces molécules a été élucidé par en 1978 par **Van den bossche et al.** Il a démontré que le miconazole inhibait la déméthylation du lanostérol en ergostérol conduisant ainsi à l'arrêt de la synthèse des stérols fongiques. Le succès des antifongiques azolés a été à l'origine d'une panoplie de découvertes de nouveaux composés du même type.

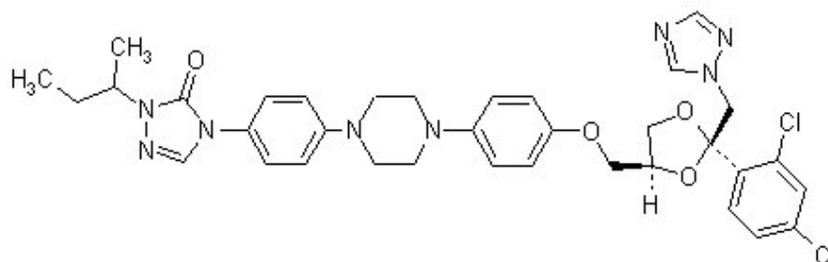
Le fluconazole (**Fig. 6 b**) et l'itraconazole (**Fig.6 c**) représentent les plus importants antifongiques triazolés. D'autres azolés comme, le voriconazole (**Fig. 9**), produit par Pfizer et le SCH 56592 de Schering-Plough seraient tous deux actifs vis-à-vis des *Candida* résistantes au fluconazole ; ces deux produits possèdent une activité nettement améliorée vis-à-vis d'autres affections fongiques telles que l'aspergillose et l'histoplasmosse.



(a)



(b)



(c)

Figure 6 : (a) **Daktarin®**, (b) **Triflucan®** Laboratoire Pfizer,
(c) **Sporanox®** Laboratoire Janssen Cilag

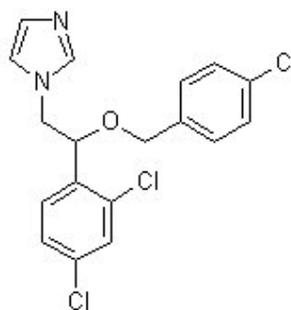


Figure 7 : Econazole (**Pevaryl®**) laboratoire Janssen-Cilag

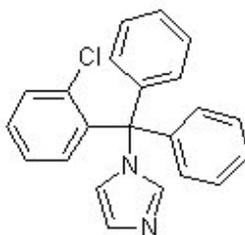


Figure 8 : Clotrimazole (**Trimysten®**), laboratoire Roger Bellon

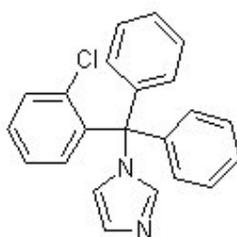


Figure 9 : Voriconazole (**Vfend®**),

2-3-5-Les antifongiques allylamines :

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

***Naftifine** : Découvert en 1974, il est le premier composé allylamine (**Fig. 10**) développé en clinique. La naftifine est utilisée contre les infections à dermatophytes.

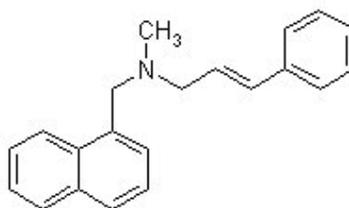


Figure 10 : Naftifine.

***Terbinafine** : La terbinafine (**Fig. 11**), succède à la naftifine, elle est active par voie orale et topique très utilisée dans le traitement des infections à dermatophytes, l'onychomycose comprise. Le spectre antifongique de la terbinafine *in vitro* est très large : il comprend non seulement les dermatophytes, mais aussi *Candida sp* et de nombreuses moisissures (**Mieth, 1993**). Cependant *in vivo*, le composé est presque complètement inactif par voie orale et est aussi nettement moins performant contre les infections superficielles à *Candida*. Ce grand écart entre les activités *in vitro* et *in vivo* est un point, encore, non élucidé.

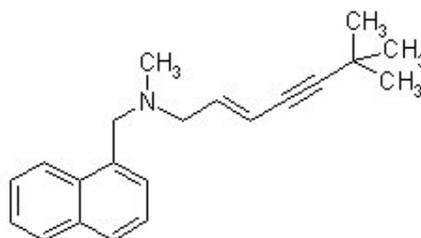


Figure 11 : Lamisil® Laboratoire Novartis Pharma

***Amorolfine** : C'est le seul composé de la classe des phénylmorpholines utilisé en médecine humaine, le reste des représentants de cette série sont employés en agriculture. L'amorolfine (**Fig. 12**) inhibe deux enzymes dans la voie de biosynthèse des stérols fongiques (**Hartman et polak, 1993**). Elle agit sur la plupart des champignons responsables des mycoses superficielles, y compris *Candida sp* et la dermatophytes et elle entre dans la composition de diverses préparations pour le traitement de l'onychomycose, des mycoses cutanées et des infections vaginales à *Candida*.

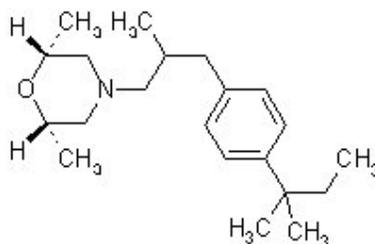


Figure 12 : Locéryl® Laboratoire Roche

2-3-6-Les antifongique non classés :

D'autres antifongiques de synthèse, moins populaires que les molécules précédemment décrites, sont utilisés en clinique ; les plus rencontrés sont la chlordantoïne, l'haloprogine, la ciclopiroxolamine et le nifuratel.

2-4-Nouveaux antifongiques d'origine naturelle :

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

2-4-1-Echinocandines :

Ces molécules sont des lipopeptides cycliques produits par divers isolats d'*Aspergillus* (**Benz et al., 1974**). Les pneumocandines sont des molécules similaires produites par un autre champignon le *Zalerion arboricola* (**Schwartz et al., 1989**). Contrairement aux antifongiques azolés, qui bloquent simplement la croissance des cultures fongiques, les échinocandines tuent les champignons en interrompant la synthèse des glycanes, qui est un important constituant de leur paroi cellulaire. Cet élément de la paroi cellulaire ne se trouve pas dans les cellules de mammifères, ce qui fait que le médicament est moins toxique que l'amphotéricine B. Dans le but d'élargir leur spectre d'action contre plusieurs moisissures pathogènes, ces deux molécules ont été optimisées par les laboratoires de recherche Merck au New Jersey en

produisant le L-724,872 et les laboratoires Lilly en Inde qui ont mis au point le LY303366. L'amélioration de la solubilité dans l'eau et leur biodisponibilité orale ont été également améliorées.

2-4-2-Nikkomycines :

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

2-4-3-Pradimicines :

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

3-Les Actinomycètes

3-1- Historique :

Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des Actinomycètes. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1990. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol, avec les travaux de **Kraisky**, de **Cohn**, de **Waksman** et de **Curtis**. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de **Waksman**, de **Lieske**, de **Krassilnikov** entre autre. La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de **Selman Waksman** lui est indissolublement lié (**Le minor, 1989**).

3-2- Généralités :

Les actinomycètes constituent l'ordre des actinomycétales. Ce sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, prenant généralement le Gram ; possédant un coefficient de chargaff (GC%) compris entre 60-70% (**Larpent, 1989**). La plupart d'entre eux sont toujours immobiles, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines. Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols, synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stéroïdes, etc.

Les Actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leur morphologie fongicoïde : filaments ramifiés, organes de sporulation, etc. Leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques, etc. les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères s'ajoutent à d'autres comme la sensibilité à des actinophages et à des antibiotiques antibactériens, cela confirme le bien-fondé de la classification des Actinomycètes parmi les bactéries (**Larpent, 1989**).

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

3-3- Morphologie :

La morphologie des différents groupes d'Actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes. Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif ou mycélium de substrat) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporangium ou conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses, ridées, etc, soit isolées soit groupées en chaînes, etc. Certains actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières. D'autres enfin, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires. L'analyse par image des

actinomycètes révèle la présence de deux catégories d'hyphes : Les hyphes dispersés et les hyphes en pellets. Dans les hyphes dispersés, la forme "Freely dispersed" et les "mycelial clumps" sont rencontrées. La première forme c'est des hyphes indépendants dispersés, la seconde est une masse ou agrégats de mycélium. Les actinomycètes donnant des hyphes en pellets, posent en fermentation des problèmes de limitation de diffusion de l'oxygène et des nutriments à travers l'hyphe. Ceci engendre une diminution de la croissance et peut conduire à une autolyse. Ce point doit être pris en considération, pour éviter ce genre de problème lors des fermentations industrielles. Heureusement, pour plusieurs souches productrices de métabolites secondaire, la forme "Clups" ou masse est la prédominante dans les fermenteurs (90% des cas) (Perry *et al.*, 2004).

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc. (Perry *et al.*, 2004).

3-4- Ecologie et distribution dans la nature :

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures (Tab. 1). Il ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint d'après (Goodfellow et Williams, 1983) généralement les 10^6 germes par gramme de sol séché. D'après (Waksman, 1967), le rapport Microorganisme totaux / Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries actinomycétales, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 centimètre ne contient que (40%) ou beaucoup moins jusqu'à seulement 16 %. Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Goodfellow et Williams 1983). La majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se

développer dans des endroits où l'activité de l'eau (a_w) est très basse (Davies et Williams, 1970, Goodfellow et Williams, 1983). Les sols sahariens sont caractérisés par une teneur minimale en eau avec un degré de pluviométrie souvent inférieur à 100 mm par an, des températures extrêmement élevées et de faibles quantités d'humus. Des travaux anciens ont prouvé définitivement que les sols désertiques ne sont pas stériles, ils sont peuplés d'une flore microbienne très variée (Killian et Feher, 1939). Parmi les bactéries isolées, les actinomycètes font partie essentielle de cette microflore, leurs présence est considérable dans ce type d'écosystème extrême (Killian et Feher, 1939).

Tableau 1 : Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983).

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplane</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, Eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière, Matière en décomposition
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Streptomyces</i>	Sol et Eau
<i>Streptosporangium</i>	matière en décomposition et en fermentation

3-5- Physiologie et métabolisme des actinomycètes :

Les Actinomycètes sont aérobies plus rarement anaérobies, les premiers à métabolisme oxydatif représentent les espèces telluriques, les seconds à métabolisme fermentatif correspondant aux espèces parasites saprophytes de la cavité buccale éventuellement pathogènes pour l'homme (*Actinomyces* par exemple). Ce sont généralement

des organismes hétérotrophes, qui ont des exigences réduites et tirent leur énergie à partir d'une source très variée de substrats azotés et carbonés. En conséquence, ils sont très largement distribués dans la nature. De nombreuses espèces sont fortement protéolytiques et agarolytiques (**Hsu et Lockwood, 1975**).

Les Actinomycètes sont fréquemment bactériolytiques grâce à des enzymes hydrolytiques capables de fragmenter les peptides de la paroi, leurs propriétés antimicrobiennes sont aussi bien connues et un bon nombre d'antibiotiques sont produits lors de leur croissance. L'équipement enzymatique des actinomycètes est très diversifié, il est à l'origine du rôle écologique majeur de ces organismes. Leur variété et leur importance quantitative, dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la matière organique, les saisons, traitement agricole, etc. Les actinomycètes sont aussi importants en milieu hydrique, dans les eaux douces, les rivières et les fleuves, les membres des genres : *Micromonospora*, *Actinoplana* prédominent. Ceux des eaux usées traitées par aération favorisent la multiplication de certains actinomycètes comme les *Nocardia*. En milieu marin de nombreuses espèces ont été isolées mais il est difficile de connaître l'importance de leur rôle dans la décomposition de la matière organique.

Les actinomycètes au cours de leur évolution dans les eaux de surface à usage alimentaire, peuvent produire des substances à forte odeur de terre ou de moisi ces odeurs indésirables qui caractérisent certaines eaux d'alimentation sont dues à des métabolites produits par les actinomycètes notamment la géosmine (le méthyle isobornéol). Certaines espèces d'actinomycètes sont dotées d'un pouvoir pathogène marqué on cite à titre d'exemple les suivants: *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* sont respectivement les agents de la tuberculose humaine ou bovine. Les *Nocardia* sont aussi des agents redoutables des nocardiose humaine ou animale.

3-6- Biologie :

Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes mais un cycle biologique semblable à certains champignons. La germination des spores passe par quatre étapes : L'activation, l'initiation, l'émergence du tube digestif et enfin la croissance. Le degré hygrométrique joue le rôle prépondérant dans la germination des spores. Dans certains cas, un choc thermique induit l'activation, par exemple un traitement de 5 minutes à 50 °C pour les

spores de certaines espèces de *Streptomyces*. Le tube de germination croit et donne des hyphes qui se ramifient intensément. Le mycélium se développe sur et dans le substrat il est dénommé, un mycélium primaire, ou mycélium végétatif ou même quelque fois du mycélium du substrat. La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme de parois transversale isolant les zones les plus âgées. Sur le mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, les hyphes sont peu ramifiés et pourvus d'une enveloppe hydrophobe. Le mycélium secondaire est plus épais que celui du primaire, il est généralement pigmenté.

Les spores se forment sur le mycélium aérien. Dans le cas de la majorité des actinomycètes, notamment les streptomycètes, il s'agit d'exospores. Des parois transversales se forment pour délimiter les spores, ces parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée. Des ornements externes peuvent se former, pour donner l'aspect externe important dans la taxonomie. Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorable à la croissance végétative, certaines spores de *Streptomyces* peuvent survivre plus de 20 ans, elle sont plus ou moins résistante à la chaleur. La formation et la maturation d'une colonies requière de 3 à 7 jours au laboratoire pour la plupart des espèces du genre *Streptomyces*. Dans la nature ce cycle est de durée variable parfois très brève. Les espèces des autres groupes d'actinomycètes présentent des différences plus ou moins marquées par rapport au cycle biologique des streptomycètes. Elles vont de la fragmentation du mycélium (Nocardioformes) à la formation de sporange (*Actinoplana* et *Streptosporangium*) à des mobiles (*Actinoplana* et *Actinosynemma*) ou au développement d'endospores semblables à celles des bacillacea (*Thermoactinomyces*). Ces caractères morphologiques constituent une des bases de la classification des actinomycètes.

3-6-1- Thermorésistance des spores :

En générale, la plus part des spores d'actinomycètes comme par exemple les *Streptomyces* ne résistent pas à des températures supérieures à 50°C en chaleur humide et à 70°C en température sèche (**Larpen et al., 1989**). Il existe cependant plusieurs autres espèces qui résistent à des températures plus élevées (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**). C'est le cas de l'espèce *Actinomyces invulnerabilis*, que les spores ne se détruisent qu'à une température de 130°C, le traitement à 120°C inhibe seulement leur germination. Les spores des genres

thermophiles tel que *Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, ou thermotolérants tel que *Pseudonocardia*, *Microbispora*, etc., sont également résistantes à des températures élevées.

3-7- Structure pariétale :

Les parois cellulaires des actinomycètes sont extraordinairement variées, cependant parmi les groupes, les parois ont souvent une composition constante conférant un rôle majeur dans la taxonomie de ces bactéries. L'étude de la paroi cellulaire des actinomycètes, montre qu'elle ne renferme ni chitine ni cellulose elle est composée soit de :

-Glycoprotéine contenant de la lysine (ce type de paroi est rencontré chez la forme fermentative).

-Glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide diaminopimélique (DAP), ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives. Les chaînes des glycanes sont reliés entre elles par des sub-unités peptidiques dont la composition en acides aminés ainsi que les liaisons entre ces derniers sont variables, ce qui explique l'existence de différents peptidoglycanes chez les actinomycètes. Les principaux composants pariétaux qui permettent de déterminer les différents types de paroi chez les actinomycètes sont regroupés dans le (**Tab. 2**).

Tableau 2 : Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires. (d'après Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Type pariétal	Constituants majeurs	Exemple de genre
I	LL-DAP	<i>Streptomyces</i>
II	Méso ou hydroxy-DAP Glycine, Xylose+Arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP, Madurose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP, Arabinose+Galactose	<i>Nocardia</i>
V	Lysine, Ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, Glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

D.A.P. : Acide 2,6-diaminopimélique. D.A.B. : Acide 2,4-diaminobutyrique.

La composition de la paroi en sucres a permis également de classer les actinomycètes en quatre classe distinctes (**Tab. 3**)

Tableau 3 : Composition de la paroi en sucres caractéristiques de quelques genres d'actinomycètes (**Parker, 2000**).

Type de paroi selon La composition en sucre	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
A	Arabinose, Galactose	<i>Nocardia, Rhodococcus,</i> <i>Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura,</i> <i>Dermatophilus,</i> <i>Streptosporangium</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora,</i> <i>Actinosynnema,</i> <i>Thermoactinomyces,</i> <i>Streptomyces...</i>
D	Arabinose, Xylose	<i>Micromonospora,</i> <i>Actinoplanes</i>

3-8- Génétique et structure de l'ADN :

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E.coli*, la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les bactéries actinomycétales possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujet à des réarrangements. A la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques (**Larpen et al., 1989**).

Les genres d'actinomycètes peuvent être définies par l'étude du coefficient de Chargaff ou GC % (**Tab. 4**), qui représente le nombre de paires de base Guanine Cytosine pour 100 paires de base dans l'ADN, les espèces ne sont pas identifiées par cette technique. Historiquement, la classification des bactéries était basée sur la similarité des caractères phénotipiques. Bien que cette méthode ait donné toute satisfaction, elle est coûteuse, lente et pas assez précise pour permettre la distinction ente les organismes les plus proches. L'étude des acides nucléiques a apporté des renseignements plus précis (**Williams et al., 1989**). Des auteurs insistent cependant, sur la nécessité de jumeler les études phénotipiques et moléculaires pour une identification encore plus précise (**Goodfellow, 2004**).

Tableau 4 : Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (d'après **Williams et al., 1989**).

Genre	G + C % (Moles)
<i>Actinomadura</i>	64 à 69
<i>Nocardia</i>	64 à 72
<i>Streptomyces</i>	69 à 78
<i>Micromonospora</i>	71 à 73
<i>Actinoplanes</i>	72 à 73
<i>Actinopolyspora</i>	64
<i>Agromyces</i>	71 à 77
<i>Frankia</i>	66 à 71
<i>Glycomyces</i>	71 à 73
<i>Nocardiopsis</i>	64 à 69
<i>Rodococcus</i>	63 à 72
<i>Streptosporangium</i>	69 à 71
<i>Streptoverticillium</i>	69 à 73
<i>Thermoactinomyces</i>	53 à 55

Les actinomycètes sont les microorganismes les plus recherchés pour leur capacité de produire beaucoup de métabolites primaires et secondaires essentiels pour la santé comme les antibiotiques (**Okami et hotta, 1988 , Barakat *et al.* 2002**).

L'isolement sélectif des actinomycètes, à partir de leur habitat, pose problème. En effet trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (**Williams *et al.* 1982, Crawford *et al.* 1993**).

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'isolement sélectif des bactéries actinomycétales. Elles reposent essentiellement sur le traitement des échantillons, le développement de milieux appropriés et l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices stoppant la croissance des germes envahisseurs (**Larpen *et al.* 1989, Ouhdouche *et al.* 2001, Hilali *et al.* 2002, Jung Yeop Lee 2002**).

Les objectifs de cette étude consistent à définir les conditions et les milieux d'isolement des actinomycètes à partir des échantillons provenant d'un sol aride de la région de Biskra, ville située à la porte du Sahara algérien.

1-Prélèvement et traitement des échantillons :

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

Chaque échantillon est partagé en deux lots de 50 g chacun. Un des deux lots subit un chauffage à 110°C pendant 10 minutes (**Agate et Bath, 1963**). 1 gramme de chaque sol chauffé ou non, et introduit dans un tube contenant 10 mL d'eau physiologique stérile et des billes en verre stériles de 2 mm de diamètre. Les échantillons sont homogénéisés par agitation au vortex pendant quelques minutes. Les suspensions ainsi obtenues constituent les solutions à analyser.

2-Antibiotiques testés :

Le milieu amidon caséine ajusté à pH 7.0 (**Küster et Williams, 1964**) et additionné de l'antibiotique concerné, a été utilisé comme milieu de base.

L'amphotéricine B, la pénicilline et la polymyxine B sont dissous dans de l'eau distillée stérile. Les antibiotiques insolubles dans l'eau, comme la nystatine et l'acide nalidixique, sont mis en suspension dans de l'éthanol de manière que la concentration finale du solvant ne dépasse pas 1mL par litre de milieu de culture (**Davet et al., 1997**). Les solutions sont préparées au moment de l'emploi et sont mélangées au milieu en surfusion à 45°C selon les combinaisons suivantes :

- Milieu sans antibiotiques.
- Milieu + nystatine à 50 µg/mL.
- Milieu + amphotéricine B à 50 µg/mL.
- Milieu + nystatine et amphotéricine B à 50 µg/mL chacun.
- Milieu + acide nalidixique à 10 µg/mL + nystatine à 50 µg/mL.
- Milieu + acide nalidixique à 10 µg/mL + amphotéricine B à 50 µg/mL.
- Milieu+ acide nalidixique à 10 µg/mL + nystatine à 50 µg/mL+ amphotéricine B à 50µg/mL.
- Milieu + sulfate de polymyxine B à 5 µg/mL + pénicilline sodique à 1 µg/mL + nystatine à 50 µg/mL + amphotéricine B à 50 µg/mL.

3-Milieux d'isolement :

Les actinomycètes ont été isolés et dénombrés sur les cinq milieux suivants :

- Glucose asparagine : Glucose, 10g ; asparagine, 0.5g ; K_2HPO_4 , 0.5g ; agar, 15g ; eau distillée, 1000 mL ; pH 7.2 ; autoclaver à 120 °C pendant 20 min.
- Milieu de Pridham : Glucose, 10g ; extrait de levure 4g ; extrait de malt, 10g ; agar, 20g ; eau distillée, 1000 mL ; pH 7.3 ajusté avec du KOH ; autoclaver à 120 °C pendant 20 min.
- GLM (Glucose extrait de malt et de levure) : Glucose, 10g ; extrait de levure, 3g ; extrait de malt, 3g ; peptone 5 g ; eau distillée, 1000 mL ; pH 7.2.
- Bennett : Glucose, 10g ; casaminoacide, 2g ; extrait de boeuf, 1g ; extrait de levure, 1g ; eau distillée, 1000 mL ; pH 7.3.
- WYE (water-yeast extract-agar) Modifié par Reddi et Rao: Extrait de levure oxoid, 0.25g; agar oxoid, 18g; eau distillée, 1000 mL ; pH 7.2.

Les milieux sont tous additionnés d'acide nalidixique à 10 µg/mL + nystatine à 50 µg/mL .

4-Dilutions et ensemencement :

Des dilutions décimales dans 9 mL d'eau physiologique ont été réalisées. 0,1mL de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-7}) est ensemencé en surface. Les boîtes (trois par milieu et par dilution) sont incubées à 28°C pendant 21 jours.

5-Dénombrement des colonies :

Les colonies d'actinomycètes dénombrées, après 21 jours d'incubation, sur les boîtes de Pétri sont celles qui présentent les caractéristiques macroscopiques caractéristiques des bactéries actinomycétales. L'aspect filamenteux des colonies actinomycétales est déterminé par observation microscopique après coloration de Gram.

Les colonies bactériennes ne présentant pas l'aspect des actinomycètes sont dénombrées après 48 heures d'incubation puis elles sont observées au microscopique après coloration de Gram.

Les colonies de champignons dénombrées sont reconnues après observation sous binoculaire puis sous microscope optique.

Les traitements des échantillons appliqués dans les différents programmes de screening des actinomycètes producteurs d'antimicrobiens tentent de favoriser la croissance d'actinomycétales par rapport aux bactéries et aux champignons (Shearer, 1987). D'après El-Nakeeb et Lechevalier (1963), le chauffage des échantillons de sol est l'une des techniques de traitement les plus utilisées. Une température allant de 55°C à 100°C pendant 1 heure, réduit considérablement le nombre de bactéries sans affecter celui des actinomycètes. Dans les travaux d'Agate et Bhat (1963), un prétraitement du sol à 110°C pendant 10 min a été employé, pour l'isolement sélectif des actinomycètes. Des sols ont aussi été traités à 120°C pendant 60 minutes ont été utilisés pour l'isolement sélectif des actinomycètes appartenants aux genres *Microbispora* et *Streptosporangium* (Nonomura et Ohara, 1969).

Les résultats rassemblés dans le **tableau 5** indiquent, qu'avec un traitement des échantillons à la chaleur, le nombre total des bactéries non filamenteuses est de $40 \cdot 10^4$ UFC/g, contre $74 \cdot 10^4$ UFC/g, soit presque le double, quand les échantillons ne sont pas traités. Toutes les bactéries qui ont poussé sont majoritairement à coloration de Gram positive. Le nombre des levures est réduit, également, de moitié quand les échantillons sont traités à la chaleur. Les moisissures ne sont, cependant, pas sensibles à ce type de traitement. Le chauffage des échantillons de sol entrave donc le développement des bactéries non filamenteuses et des levures et est sans aucun effet sur les moisissures.

Tableau 5 : Effet du traitement à la chaleur (10 min à 110°C) des échantillons de sol sur l'isolement des bactéries non filamenteuses, des levures et des champignons.

Milieu	Avec traitement à la chaleur			Sans traitement	
	Nombre moyen des Bactéries non filamenteuses (dilution 10^{-4})	Nombres moyen des levures (dilution 10^{-4})	Nombre moyen des champignons (dilution 10^{-4})	Nombre moyen des Bactéries non filamenteuses (dilution 10^{-4})	Noml de (di
Milieu + nyst.	5 ^(a)	0	0	12	
Milieu +ampho B.	8	2	0	18	
Milieu + nyst + ampho B.	6	0	0	10	
Milieu + an + nyst.	3	0	0	3	
Milieu + an + ampho B.	5	1	0	6	
Milieu + an +nyst +ampho B.	2	0	0	5	
Milieu + poly B + péni + nyst + ampho B.	2	0	0	1	
Milieu seul.	9	3	3	19	
Total	40	6	3	74	

(a) : nombre de répétition=3.

L'utilisation du milieu de base sans aucun antibiotique et sans traitement à la chaleur a permis l'isolement de 9.10^4 UFC/g actinomycètes, contre 5.10^4 UFC/g en utilisant le même milieu sans antibiotique et avec traitement thermique. Le nombre total des bactéries actinomycétales est de 38.10^4 UFC/g quand les échantillons de sol sont chauffés et de 92.10^4 UFC/g sans chauffage (**Tab. 6**).

Tableau 6 : Effet du traitement à la chaleur des échantillons de sol aride (Biskra) sur l'isolement des actinomycètes.

Milieu	Avec traitement à la chaleur nb d'actinomycètes (dilution 10^{-4})	Sans traitement à la chaleur. nb d'actinomycètes (dilution 10^{-4})
Milieu + nyst.	4 ^(a)	18
Milieu + ampho B.	4	13
Milieu + nyst + ampho B.	6	6
Milieu + an + nyst.	8	21
Milieu + an + amph B.	3	12
Milieu + an + nyst + amph B.	5	8
Milieu + poly B + péni + nyst + ampho B.	3	5
Milieu Seul	5	9
Total	38	92

(a) : Nombre de répétition=3.

Le traitement à la chaleur a réduit donc à plus de 50% le nombre des actinomycètes isolés à partir de ce type d'échantillon. Il en ressort des résultats obtenus que le traitement à la chaleur diminue de moitié les germes indésirables mais agit, également, de la même manière contre les actinomycètes. Ces résultats s'accordent parfaitement avec ceux obtenus par **Nonomura et Ohara, 1969**, qui montrent que le traitement des échantillons de sol à la chaleur est utilisé pour l'isolement sélectif de quelques genres d'actinomycètes, alors que d'autres genres comme les *Streptomyces* ne résistent pas à ce type de traitement. En plus cela s'explique par le fait que la plupart des spores des *Streptomyces* ne résistent pas à des températures supérieures à 50°C en chaleur humide et à 70°C en chaleur sèche. (**Larpent et al., 1989**). En plus, les actinomycètes en phase de croissance mycélienne ne peuvent pas résister aux conditions de chaleur imposée lors du traitement thermique des échantillons (**Takizawa et al., 1993**).

Les antibactériens les plus utilisés dans l'isolement sélectif des actinomycètes sont la polymyxine à 5 µg/ mL et la pénicilline à 1 µg/mL (**Williams 1965; Cavala 1994**). Les avis concernant l'utilisation des antibactériens sont cependant controversés. Selon **Porter et al., (1960)**, la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, **Dalaney et al., (1955)** et **Williams (1965)** recommandent l'utilisation d'un mélange d'antifongiques et d'antibactériens pour l'isolement des actinomycètes.

L'utilisation du milieu amidon caséine additionné de sulfate de polymyxine B à 5 µg/mL, de pénicilline sodique à 1 µg/mL et de nystatine+ amphotéricine B à 50 µg/mL chacun, permet l'isolement d'un nombre très réduit de bactéries, de levures et de champignons indésirables (**Tab. 5**). Cependant, l'isolement des actinomycètes à partir de ce milieu n'est pas satisfaisant, seules $8 \cdot 10^4$ UFC/g actinomycètes ont été isolés à partir des échantillons de sol, traité ou non à la chaleur, contre $22 \cdot 10^4$ UFC/g à partir du même milieu de base additionné de nystatine (**Tab. 6**). Plusieurs travaux montrent que l'utilisation des antibactériens inhibent les *Streptomyces* (**Cavala, 1994**) et conduisent seulement à l'isolement sélectif de quelques genres d'actinomycètes (**Porter, 1960, Palleroni, 1980, Athalye, 1981, Rake, 1986, Shearer, 1987**).

Dans notre étude, l'acide nalidixique testé comme agent sélectif additionné dans les milieux d'isolement, donne de très bon résultats en inhibant seulement les bactéries à coloration de Gram négative. Comme le montre les résultats qui figurent dans le **tableau 7**. Cet antibactérien utilisé, avec tous les milieux d'isolement testés, réduit sensiblement le nombre de bactéries autres que les actinomycètes en comparaison avec les milieux sans acide nalidixique et ce avec ou sans prétraitement à la chaleur. Les bactéries qui ont poussé sont toutes à coloration de Gram positive. Par ailleurs, dans les milieux additionnés de nystatine, le nombre d'actinomycètes isolés, augmente en présence de l'acide nalidixique de $18 \cdot 10^4$ UFC/g à $21 \cdot 10^4$ UFC/g sans traitement des échantillons à la chaleur et de $4 \cdot 10^4$ UFC/g à $8 \cdot 10^4$ UFC/g, quand les échantillons sont traités à la chaleur. Contrairement aux milieux contenant de l'amphotéricine B où le nombre d'actinomycètes isolés reste pratiquement inchangé (**Tab. 7**).

Dans les sols non traités à la chaleur, et en présence de l'acide nalidixique, le nombre d'actinomycètes isolés est de $41 \cdot 10^4$ UFC/g colonies morphologiquement différentes et seulement $14 \cdot 10^4$ UFC/g petites colonies de bactéries non filamenteuses. En absence de l'acide nalidixique le nombre d'actinomycètes isolés est de $37 \cdot 10^4$ UFC/g colonies contre $40 \cdot 10^4$ UFC/g colonies bactériennes non filamenteuses (**Tab. 7**). Dans cette étude l'effet combiné du non traitement à la chaleur et l'utilisation de l'acide nalidixique donne les meilleurs résultats. Ces résultats s'accordent parfaitement avec ceux de **Takizawa *et al.*, 1993** qui a utilisé avec succès pour la première fois cet antibactérien à une concentration de $10 \mu\text{g/mL}$, dans un screening d'actinomycètes de sédiments d'une baie.

Tableau 7 : Effet combiné du traitement à la chaleur et de l'acide nalidixique des échantillons du sol aride (Biskra) sur l'isolement des actinomycètes et des autres bactéries

Milieu	Avec traitement à la chaleur				Sans t	
	An +		An-		An +	
	Actino (dilution 10^{-4})	Bact (dilution 10^{-4})	Actino (dilution 10^{-4})	Bact (dilution 10^{-4})	Actino (dilution 10^{-4})	I (dilu
Milieu + nyst	8 ^(a)	3	4	5	21	
Milieu + ampho B	3	5	4	8	12	
Milieu+ nyst + amph B	5	2	6	6	8	
Total	16	10	14	19	41	

(a) : Nombre de répétition=3.

L'actidione (cycloheximide) à 50 – 100 µg/mL et la nystatine à une concentration de 50 µg/mL sont les antifongiques les plus utilisés comme additifs dans les milieux d'isolement des actinomycètes (**Dulaney et al., 1955, Porter et al., 1960**).

Les deux antifongiques testés dans ces travaux, sont la nystatine et l'amphotéricine B, à des concentrations de 50 µg/mL chacun. D'après les résultats rassemblés dans le **tableau 5**, le milieu amidon caséine, additionné de nystatine inhibe les champignons présents dans ces échantillons de sol et laisse pousser seulement $1 \cdot 10^4$ UFC/g levures, parmi les $11 \cdot 10^4$ UFC/g présents dans le milieu sans antifongiques pris comme témoin. L'amphotéricine B inhibe totalement les champignons filamenteux présents et permet néanmoins l'isolement de $4 \cdot 10^4$ UFC/g levures. Le mélange de ces deux antifongiques agit de la même manière que la nystatine seule. L'actidione n'a pas été utilisé dans cette étude pour sa toxicité élevée.

La présence dans le milieu d'isolement, de la chitine, de l'amidon, du glycérol, de l'arginine, de l'asparagine, de la caséine ou des nitrates conduit à un isolement sélectif des actinomycètes alors que les bactéries et les champignons poussent faiblement (**Williams et Davies, 1965**). L'utilisation de la paraffine favorise l'isolement des souches appartenants au genre *Nocardia* (**Cavala, 1994**).

L'isolement effectué sur cinq milieux choisis dans la littérature, montre que le milieu qui favorise l'isolement d'un nombre important d'actinomycètes, à partir des sols arides de cette région, est le GLM (**Tab. 8**). Ce milieu complexe est composé de glucose comme source de carbone il ressemble de ce fait à la majorité des milieux testés dans cette étude, cependant sa composition diffère des autres milieux par la présence de différentes sources d'azotes organiques tel que les extraits de malt, la levure et la peptone. Les autres milieux offrent, néanmoins, une importante flore actinomycétale, ils sont par conséquent à ne pas écarter dans ce genre de screening.

Tableau 8 : Nombre d'actinomycètes isolés, à partir de différents milieux d'isolement.

Milieu d'isolement	Nombre moyen d'actinomycètes (UFC/g)
Glucose-asparagine	$1.8 \cdot 10^5$ ^(a)
Pridham	$3 \cdot 10^5$
GLM	$9 \cdot 10^5$
Bennett	$4 \cdot 10^5$
WYE	$0.03 \cdot 10^5$
Amidon caséine	$2.1 \cdot 10^5$

(a) : Nombre de répétition=3.

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinomycètes n'existe pas. Il faut toujours varier les stratégies et les milieux d'isolement dans un même screening, afin de réussir l'isolement de la plupart de la flore actinomycétale qui compose l'échantillon étudié (Cross, 1982).

Le prétraitement à la chaleur des échantillons de sols non désertiques, est l'une des techniques de traitement les plus utilisées dans les programmes de screening des actinomycètes, il conduit lors des isollements, à une réduction importante du nombre de bactéries indésirables (Agate et Bath, 1963, Pisano *et al.*, 1987, Nonomura et Hayakawa, 1988, Kyung et Yong, 1996). Ces techniques de chauffage, utilisent la grande résistance des arthrospores des actinomycètes vis-à-vis des conditions de sécheresse et de température (Agate et Bath, 1963, Shearer, 1987, Nonomura et Ohara, 1969, Cavala, 1994).

Les travaux d'isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols arides sont relativement récentes et rares (Hacène *et al.*, 1994, Ouhdouch *et al.*, 2001, Zitouni *et al.*, 2005). L'étude des conditions optimales qui favorisent l'isolement de ces microorganismes sont encore plus rares voire carrément absentes dans la littérature. Ces conditions sont d'une importance capitale et conditionnent la réussite de ces recherches, en multipliant les chances de l'isolement sélectif de ces microorganismes.

Dans nos investigations, l'isolement des actinomycètes à partir des échantillons de sol aride, provenant de la région de la ville de Biskra, est favorisé par certaines conditions. **Le traitement des échantillons de sol à la chaleur est déconseillé**, il réduit considérablement la flore actinomycétale. L'introduction dans le milieu d'isolement de substances antibactériennes comme le sulfate de polymyxine et de la pénicilline inhibe les bactéries indésirables mais agit négativement sur certains actinomycètes.

L'emploi dans le milieu d'isolement, **de l'acide nalidixique à 10 µg/mL et de la nystatine à 50 µg/mL** permet l'élimination totale des champignons, de la plupart des levures et des bactéries à Gram négatif. Par conséquent, l'isolement des actinomycètes à partir de ces échantillons est favorisé par ce traitement.

Le **milieu GLM** donne un nombre élevé de colonies d'actinomycètes. Ainsi, nous préconisons, que dans une étude d'isolement d'actinomycètes à partir d'échantillons de sols désertiques comparables à celui de la région de Biskra, d'utiliser un milieu riche tel que **le GLM additionné de l'acide nalidixique à 10 µg/mL et de la nystatine à 50 µg/mL**. Il est également, recommandé **d'éviter de traiter les échantillons de sols à la chaleur**.

Les agents antifongiques sont utilisés dans plusieurs domaines : en thérapie humaine et animale, en agriculture, en industrie alimentaire et dans le traitement du bois (**Ouhdouch et al., 2001**). Contre les bactéries nous disposons actuellement de plusieurs molécules capables de détruire la majorité des bactéries pathogènes non résistantes. La situation reste, cependant, complètement différente pour les agents antifongiques. La plupart des antifongiques découverts à ce jour utilisés en thérapie humaine sont de nature polyénique et sont très toxiques car ils attaquent en plus des champignons pathogènes, les cellules eucaryotes hôtes. En outre, l'augmentation des mycoses causées par des champignons opportunistes développés sur les patients immunodéprimés les greffes d'organes, les nouveaux champignons pathogènes, les résistances etc., posent également de sérieux problèmes (**Yashuda et al., 2001**). Devant cette situation, les efforts de recherches consacrés aux antifongiques se sont développés ces dernières années. Malgré la découverte de nombreuses substances antifongiques de synthèse, comme par exemple la caspofungine et la terbinafine qui sont efficaces mais très chères, les agents antifongiques prometteurs dans le secteur médical sont des produits de fermentation (**Perez et al., 2002**).

Les actinomycètes sont les bactéries les plus répandues pour leur capacités de produire des métabolites à activité antimicrobienne (**Finance et al., 1985, Larpent et al., 1989, Hilali et al., 2002**). .

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles molécules antimicrobiennes bien que son rendement soit réduit, il est pratiqué par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus extrêmes (**Larpent et al., 1989, Ouhdouch et al., 2001, Khettabi et al., 2002, Lemriss et al., 2003**) et en mettant au point des méthodes de sélection favorisant des espèces rares (**Hacène et al., 1994, Shearer et al., 1997, Hilali et al., 2002**).

La littérature rapporte de nombreux travaux sur l'isolement des actinomycètes à partir des sols fertiles ils ont débuté sérieusement avec les travaux de **Waksman en 1967** et ne cessent de continuer jusqu'à ce jour (**Goodfellow et Williams, 1983, Wellington et al., 1987, Sanglier et al., 1993, Ouhdouch et al., 2001, Lee et al., 2002, Jun Wang, 2006**). Les travaux sur les sols désertiques suscitent, ces dernières années, de plus en plus d'intérêt chez

plusieurs chercheurs (**Hilali et al., 2002, Zitouni et al., 2005, Kitouni et al., 2005**). Les raisons principales sont d'étudier la biodiversité de ces sols en microflore notamment les actinomycètes et de tester leur capacité de produire de nouvelles molécules à diverses activités biologiques. Ces travaux restent, encore, très rares (**Finance et al., 1985, Larpent et al., 1989, Hacène et al., 1994, Ouhdouch et al., 2001, Zitouni et al., 2005**).

Ce sont les anciens travaux de **Killian et Feher (1939)** qui ont montré que les sols désertiques ne sont pas stériles et qu'ils sont peuplés d'une microflore très variée. Ces écosystèmes extrêmes par leur pluviosité très irrégulière, par leur température extrêmement élevée et de faibles quantités d'humus, peuvent renfermer une flore actinomycétale très variée qui s'est adaptée à ces conditions défavorables (**Killian et Feher, 1939**).

Dans cette partie, nous proposons dans une première étape, d'isoler sélectivement et de purifier des souches actinomycétales à partir de plusieurs échantillons provenant des sols arides et semi-arides du sud algérien. La seconde étape consiste à tester l'activité antifongique des bactéries actinomycétales purifiées contre des cibles fongiques pathogènes.

1-Ecosystèmes explorés

Les échantillons proviennent de plusieurs niches écologiques des zones semi-arides et arides suivants :

1-1-Environs de la ville de Batna (Longitude 006°E11',Latitude 35°N33') :

Capitale des Aurès, région semi-aride, située à 425 kms au Sud-Est de la capitale, culmine à 980 mètres d'altitude. La température moyenne est de 4°C en janvier et de 35°C en juillet. Durant l'hiver la température descend en dessous de zéro la nuit avec souvent des gelées. Durant l'été la température peut atteindre les 45°C à l'ombre. La pluviométrie moyenne est de 210 mm par an, alors que la neige est très rare.



Photographie 1 : Echantillons de sols rhizosphériques de la région de Batna.

1-2-Grand Erg occidental

Le Grand Erg Occidental est une immense mer de sable en forme de croissant de 80 000 km² limitée au sud et sud-est par l'immense haut plateau du Tademaït, à l'Ouest par l'Erg er-Raoui et au nord-ouest par l'imposante chaîne montagneuse de l'Atlas. Les villes qui ont servis de zones de prélèvement sont les suivantes :

-**Béchar** (Longitude 002°O 14', Latitude 031°N 57'), capitale administrative de la saoura, se trouve à 950 km au Sud Ouest d'Alger, d'une superficie de plus de 5000 km² dont plus de 2000 hectares de terres agricoles. Le climat est chaud et sec en été et très froid en hiver, la pluviométrie ne dépassant pas les 100 mm par an.



Photographie 2 : Echantillons de sols de Bechar

-**Abadla** (Longitude 002°E 45', Latitude 031°N 02') connue par son oued dit "Oued GUIR", par sa plaine de 3000 hectares de terres fertiles. L'abadla se situe à 80 Km au sud de Béchar.



Photographie 3 : Echantillons de sols de l'Abadla

-**Taghit** (Longitude 002°O 1', Latitude 030° N55') située à l'ouest du Grand Erg Occidental entre Béchar et Béni Abbès, c'est une oasis de la Saoura localisée à 93 km au sud de Béchar, elle culmine à une altitude de 558 mètres et son sol apparaît d'une couleur rouge-terre.



Photographie 4 : Echantillons de sols de Taghit

1-3- Grand Erg oriental

Le Grand Erg Oriental (190.000 km²), deux fois plus grand que le Grand Erg Occidental, est occupé à plus des deux tiers par une immense mer de sable. Il se trouve à l'est de l'Erg Occidental dont il est séparé par un haut plateau pierreux. Cette partie du désert saharien est caractérisée par d'abondantes dunes de sable et des conditions climatiques extrêmement sévères. Les rares traces de végétation se concentrent dans de petites oasis situées au périmètre du désert; parmi les plus grandes, on trouve au nord celle d'El-Oued. Les échantillons ont été prélevés des villes suivantes :

-**Ouargla** (Longitude 005°E19', Latitude 031°N57') capitale du désert se situe à 128 mètres d'altitude. Elle est localisée à 388 km au Sud de Biskra.



Photographie 5 : Echantillons de sols de Ouargla.

-**Biskra** (Longitude 005°E 44', Latitude 034°N51) appelée, à l'époque romaine, Vescer. Elle est la porte du grand Sud, appelée aussi la ville aux deux millions de palmiers. Elle se situe à 243 km au Sud de Constantine, Le paysage alentour est déjà nettement saharien, le sol est partout de couleur rouge ou fauve.



Photographie 6 : Echantillons de sols de Biskra

-**El-Oued** (Longitude 006°E53', Latitude 033°N20') chef lieu de la wilaya qui porte le même nom. Elle se situe au Nord de la mer de grand erg oriental, avec une superficie de 82800 Km². Cette région est aussi appelée Oued-souf, selon le dialecte employé à cause d'un grand fleuve souterrain qui traverse la wilaya. La ville est aussi surnommée « La ville aux mille coupoles », elle se trouve à 720 Km au Sud d'Alger.



Photographie 7 : Echantillons de sols de El-oued

-**Touggourt** (Longitude 006°E 8',Latitude 033°N07') est une ville du Sud-est algérien, elle se situe à une altitude de 85 mètres.



Photographie 8 : Echantillons de sols de Touggourt

2-Echantillons analysés

2-1-Prélèvement

Ils sont prélevés à l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur) 100 à 150 g de terre, qui sont déposés sur une feuille d'aluminium. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.) et environ 50 g sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire pour analyse (**Pochon et Tardieux, 1962**).

2-2-Traitement

Chaque échantillon de sols est partagé en deux lots. Les premiers lots ne subissent aucun traitement. Les autres lots sont traités de la manière qui suit : Un gramme de chaque sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 g de CaCO_3 et incubé à 26°C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité (**Cavala, 1994**).

2-3-Dilutions

Le gramme de sol séché ou non est dilué dans 10 ml d'eau physiologique (NaCl 9 g.L⁻¹) dans des tubes contenant des billes en verre stériles de deux millimètres de diamètre et agité au vortex à vitesse maximale. Cette suspension mère sert à réaliser des dilutions décimales.

2-4- Ensemencement

-milieux d'isolement utilisés

Les milieux utilisés dans cette étude sont les suivants:

-W.Y.E « Water-Yeast extract-Agar » modifié par Reddi et Rao. Composé de (Extrait de levure oxoid, 0,25 g/L, Agar oxoid, 18 g/L, pH 7,2).

-Bennett (Extrait de levure, 1 g/L, Extrait de viande, 1 g/L, Casaminoacide, 2 g/L, Glucose, 10 g/L, Agar, 15 g/L, pH 7,3).

-GLM « Glucose-Extrait de levure-Malt » (Extrait de levure, 3 g/L, Extrait de malt, 3 g/L, Peptone, 5 g/L, Glucose, 10 g/L, Agar, 20 g/L, pH 7,2).

Les trois milieux sont additionnés de 10 µL/mL d'acide nalidixique et 50 µg/mL de nystatine.

- Incubation

Cent microlitres des dilutions 10^{-1} jusqu'à 10^{-5} sont ensemencés en surface sur les trois milieux d'isollements. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28 °C pendant 21 jours. Des observations régulières sont effectuées chaque semaine.

3- Purification et conservation des souches isolées

Les colonies d'actinomycètes obtenues subissent une purification, en réalisant les repiquages successifs nécessaires. Les souches obtenues sont conservées selon trois techniques :

- Conservation en gélose inclinée sur milieu GLM à 4 °C pour une durée de deux mois environ.
- Au congélateur à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.
- Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sur milieu GLM sont remplis de l'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation.

4-Sélection des actinomycètes producteurs de métabolites à activité antifongique

4-1-Milieux

-Milieu Casitone :

Ce milieu est utilisé pour la mise en évidence de l'activité antifongique contre les champignons. Il est composé comme suit :

[Bacto casitone (Difco laboratories, Sparks, U.S.A.), 9g/L, extrait de levure (Merck K Ga A, Darmstadt, Germany), 5g/L, citrate de sodium (Prolabo, Paris, France), 10g/L, Glucose (Merck), 20g/L, phosphate dipotassique (Merck), 0,54g/L, phosphate di-sodique (Merck), 3,34g/L, agar (Merck), 18g/L].

-Milieu Y.M.A :

L'étude de l'activité antifongique contre les levures (antilevurienne) est effectuée sur ce milieu. (Lemriss *et al.*, 2003). La composition est la suivante : [(yeast nitrogen base (Difco), 6,5g/L, asparagine (Prolabo), 1,5g/L, glucose (Merck), 10g/L, agar (Merck), 20g/L] .

4-2 Souches microbiennes cibles et contrôles :

-**Les souches cibles** utilisées pour les tests d'activité antifongique proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) et de l'Unité de Mycologie de l'Institut Pasteur (UMIP). Ces souches sont : *Candida albicans* UMIP 48.72, *Candida albicans* UMIP 884.65, *Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.81. *Aspergillus fumigatus* MUIP 1082.74. *Aspergillus niger* ATCC 16 404 et *Fusarium oxysporum* MUIP 625.72. Toutes les souches sont maintenues à 28 °C sur milieu de Sabouraud.

-**Les souches contrôles** proviennent de la collection NRRL de l'USDA/ Agricultural Research Service (National center for Agricultural Utilization Research, Microbial properties Research, 1815 N. University street, Peoria, Illinois 61604,USA). Ces souches sont : *Streptomyces noursei* NRRL B-1714 (productrice de nystatine) et *Streptomyces nodosus* NRRL B-2371 (productrice d'amphotéricine B).

4-3- Test d'activité antifongique (Technique des cylindres d'Agar)

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées simultanément sur milieu de Bennett et GLM et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Des cylindres de 3 mm de diamètre sont coupés et placés sur le milieu Casitone ou YMA, préalablement, ensemencé par les microorganismes tests. Les boîtes sont laissées à 4 °C pendant 4 heures, pour une bonne diffusion du métabolite antifongique, puis incubées à 28 °C. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après 24 heures d'incubation pour les *Candida albicans* et 48 heures pour *Candida tropicalis* R2 et les champignons filamenteux (Lemriss *et al.*, 2003).

1- Isolement des Actinomycètes

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat. Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage dans le milieu GLM et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Les résultats montrent clairement, que le milieu GLM est le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes à partir de tous les écosystèmes arides et semi-aride testés, et ceci quel que soit le type de sol analysé (**Tab. 9, 10, 11**). A partir du sol semi-aride de la région de Batna, 39 souches d'actinomycètes ont été isolées, c'est le plus grand nombre d'actinomycètes obtenu dans cette étude (**Tab. 11**). Vingt quatre souches d'actinomycètes ont été également récoltées du sol de Biskra, il s'agit aussi du plus grand nombre d'actinomycètes isolés parmi les sols arides de toutes les villes du sud-est et du sud-ouest du pays étudiés dans ces travaux (**Tab. 9 et Tab. 10**).

D'après les résultats obtenus, les actinomycètes sont beaucoup plus présents dans les sols rhizosphériques que dans les sols non rhizosphériques.

Tableau 9 : Actinomycètes isolés par milieu à partir des sols arides des villes du Sud-Est algérien : Ouargla, Biskra, El-oued et Touggourt.

Echantillons	Sol de Ouargla			Sol de Biskra			Sol d'El-oued			Sol de Touggourt		
	WYE	Ben	GLM	WYE	Ben	GLM	WYE	Ben	GLM	WYE	Ben	GLM
Nombre d'actinomycètes isolés des sols rhizosphériques	2	3	6	1	4	9	2	4	6	1	3	5
Nombre d'actinomycètes isolés des sols non rhizosphériques	1	2	5	1	3	6	0	2	3	0	2	3
Total	19			24			17			14		

Tableau 10 : Actinomycètes isolés par milieu à partir des sols arides des villes du Sud-Ouest algérien : Bechar, Abadla et Taghit.

Echantillons	Sol de Bechar			Sol d'Abadla			Sol de taghit		
	WYE	Ben	GLM	WYE	Bent	GLM	WYE	Ben	GLM
Nombre d'actinomycètes isolés des sols rhizosphériques	3	4	5	2	3	7	1	4	6
Nombre d'actinomycètes isolés des sols non rhizosphériques	1	2	4	1	3	5	0	2	5
Total	19			21			18		

Tableau 11 : Actinomycètes isolés par milieu à partir des sols semi-arides de la région de Batna.

Echantillons	Sol rhizosphérique de la région de Batna			Sol non rhizosphérique de la région de Batna		
	WYE	Ben	GLM	WYE	Ben	GLM
Nombre d'actinomycètes Isolés	4	9	13	2	4	7
Total	26			13		
	39					

2- Activité antifongique :

Parmi les 171 souches d'actinomycètes isolées, dix-sept souches présentent une activité antifongique (**Tab.12**) sur au moins un microorganisme cible de levures et de champignons filamenteux (**Planches 1, 2, 3 et 4**), soit environ un pourcentage de 10 % de la population actinomycète isolée, Le pourcentage le plus élevé des souches actives s'observe sur les actinomycètes cultivés sur le milieu GLM (**Tab.13**).

Tableau 12 : Activité antifongique des souches isolées

Souches	Origine des souches	Activité contre					
		<i>C.tropicalis</i> R2	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>A.niger</i>
		UMIP1275.81	UMIP48.72	UMIP884.65	UMIP625.72	UMIP1082.74	ATCC19404
30	El-oued (NR)	+(1)	+	+	-	-	+
E10	El-oued (R)	-	+	+	-	-	-
C3	El-oued (NR)	+	+	+	+	+	+
L2	Adadla (NR)	-	-	-	+	+	+
L10	Abadla (R)	-	+	+	-	-	+
T7	Taghit (R)	-	-	-	-	+	+
T9	Taghit (R)	-	+	+	-	-	-
T12	Taghit (NR)	-	+	+	-	-	+
Be2	Bechar (NR)	-	+	-	-	+	-
Be18	Bechar (NR)	-	+	-	-	+	+
Ba3	Batna (R)	-	+	+	-	-	+
Ba11	Batna (R)	-	-	+	-	+	+
Ba13	Batna (NR)	-	+	+	-	-	+
Bi4	Biskra (NR)	-	-	+	-	+	+
Bi10	Biskra (NR)	-	+	-	-	+	+
Bi12	Biskra (NR)	-	-	-	+	-	-
Ou5	Ouargla (R)	-	-	+	-	+	-

(1) + : Inhibition positive (diamètre >3 mm). - : Pas d'inhibition (diamètre =3 mm)

(NR) : Sol non rhizosphérique (R) : Sol rhizosphérique.

Tableau 13 : Nombre et pourcentage de souches cultivées sur milieu de Bennett ou sur milieu GLM présentant une activité antifongique.

Milieu	Activité contre					
	<i>C.tropicalis</i> R2 UMIP1275.81	<i>C. albicans</i> UMIP48.72	<i>C.albicans</i> UMIP884.65	<i>F.oxysporum</i> UMIP625.72	<i>A.fumigatus</i> UMIP1082.74	<i>A.niger</i> ATCC 16404
Ben	0	6 (3.5) ^a	3 (1.7)	1 (0.6)	2 (1.2)	3 (1.8)
GLM	2 (1.2)	11 (6.5)	11 (6.5)	3 (1.8)	9 (5.3)	12 (7.0)

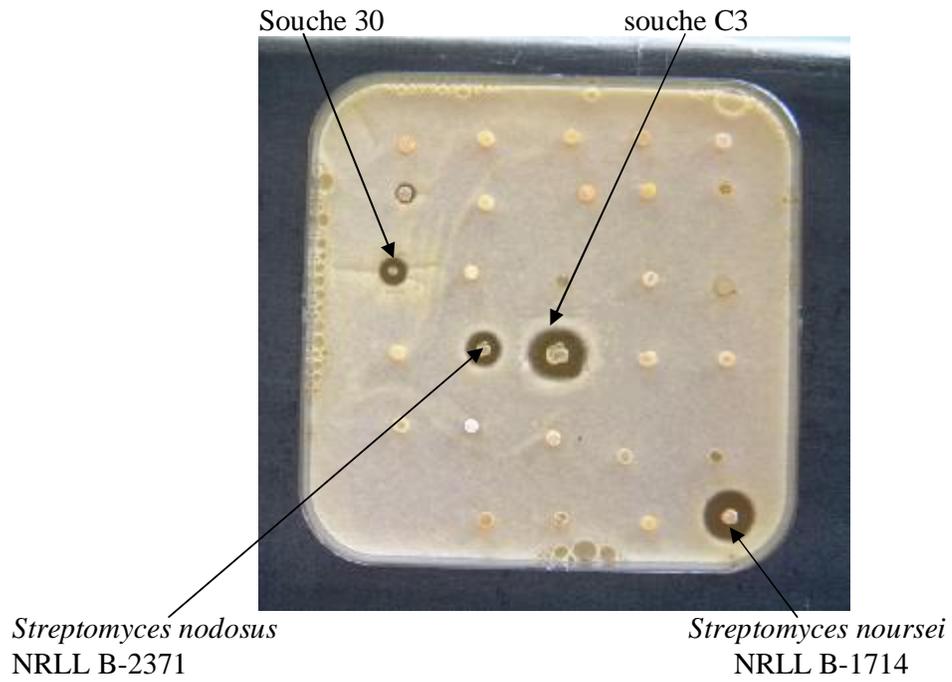
a : Entre parenthèse: Pourcentage des souches actives (n= 171).

La souche C3 par exemple, quand elle est ensemencée sur milieu GLM montre une activité antifongique très importante contre la totalité des souches tests utilisées ; elle présente cependant peu ou pas d'activité lorsqu'elle est cultivée sur milieu de Bennett (**planches 1, 2, 3 et 4**). La souche 30 quand elle est cultivée sur milieu GLM, agit contre toutes les levures tests et *Aspergillus niger* (**Planches 2 et 3**), elle devient complètement inactive quand elle est mise en croissance sur milieu de Bennett. Les germes contrôles utilisés montrent cependant qu'ils ont une préférence au milieu de Bennett pour une bonne production d'antibiotiques (**Planches 1, 2, 3 et 4**), (**Tab. 14**) (**Boudemagh et al., 2005**).

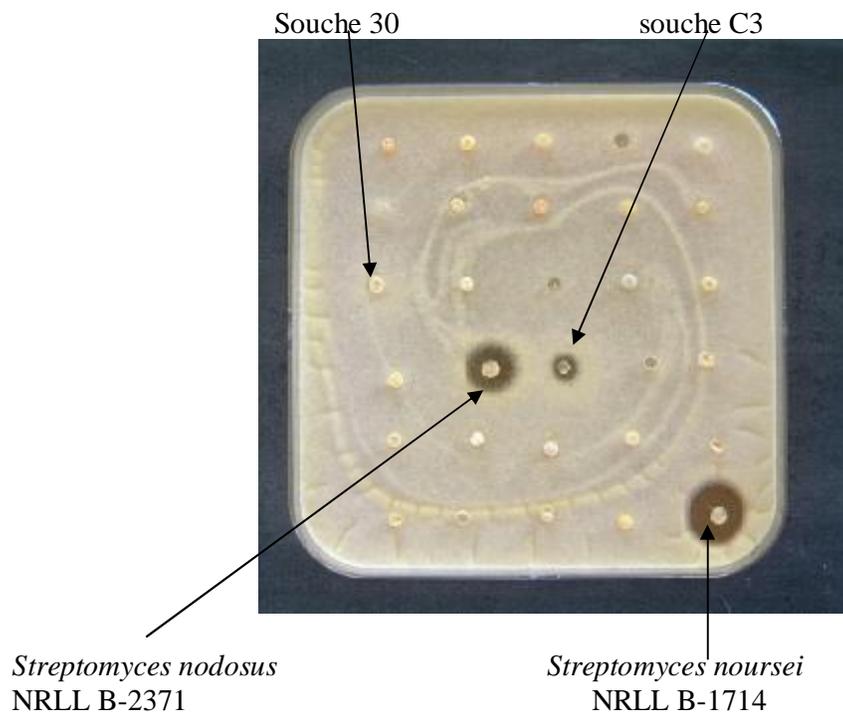
Tableau 14 : Diamètres d'inhibitions, milieux et origine de deux souches actinomycètes isolées et de deux souches contrôles, présentant une activité antifongique (**Boudemagh et al., 2005**).

Origine Des souches	Milieu de Culture	Activité contre					
		<i>C.tropicalis</i> UMIP1275.72	<i>C.albicans</i> UMIP48.72	<i>C.albicans</i> UMIP884.65	<i>F.oxysporium</i> UMIP625.72	<i>A.fumigatus</i> UMIP1082.74	<i>A.niger</i> ATCC 16404
30 (El-oued)	GLM	10 ^a	14	12	-	-	7
	Bennett	-	-	-	-	-	-
C3 (El-oued)	GLM	32	16	13	17	12	18
	Bennett	-	-	-	8	10	4
<i>S.nodosus</i> NRRL b-2371	GLM	-	15	8	-	9	9
	Bennett	-	17	16	5	13	10
<i>S.noursei</i> NRRL b-1714	GLM	-	7	17.5	5	13	13
	Bennett	-	27	22	5	20	19

^a: Diamètre des zones d'inhibition en (mm).

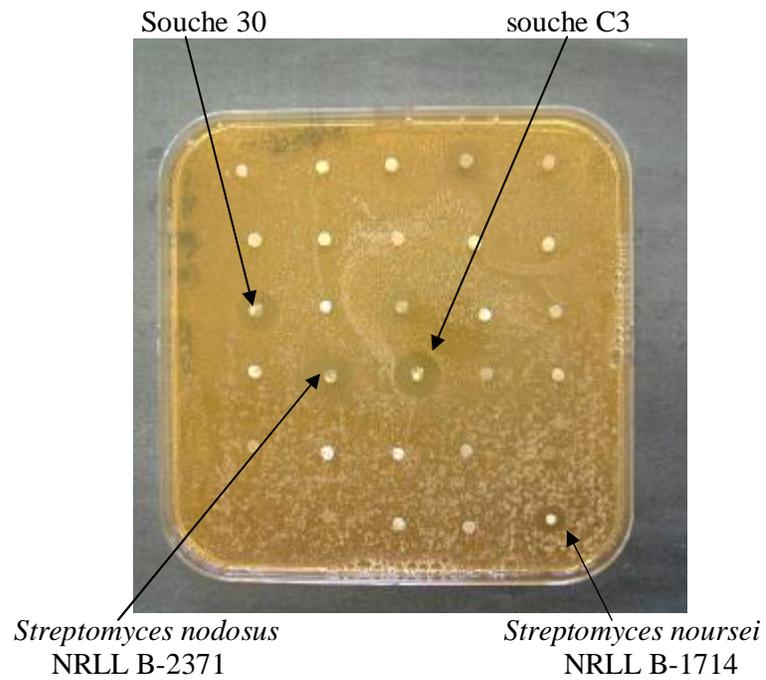


Souches cultivées sur milieu GLM

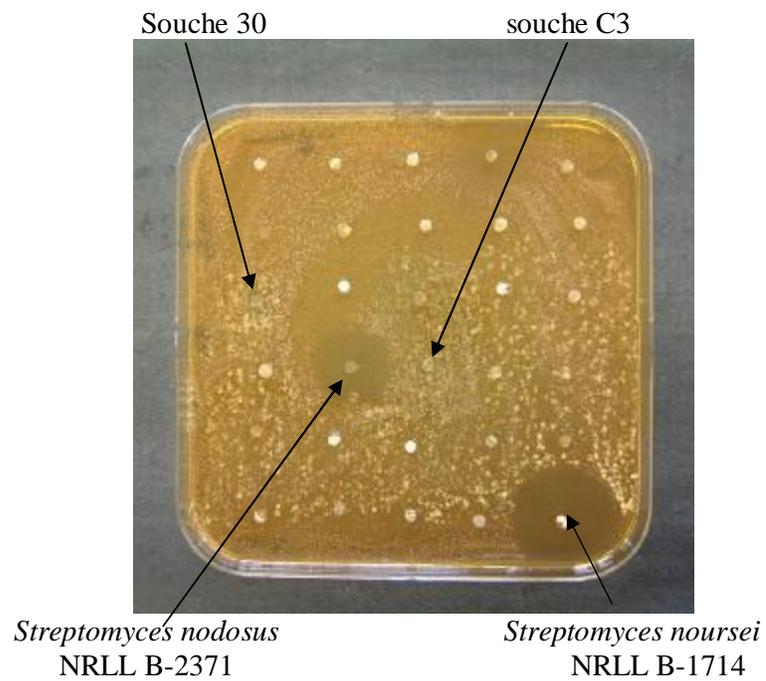


Souches cultivées sur milieu Benett

Planche 1: Activité antifongique sur milieu Casitone des souches 30, C3 et deux souches contrôles contre *A.niger* ATCC 16404

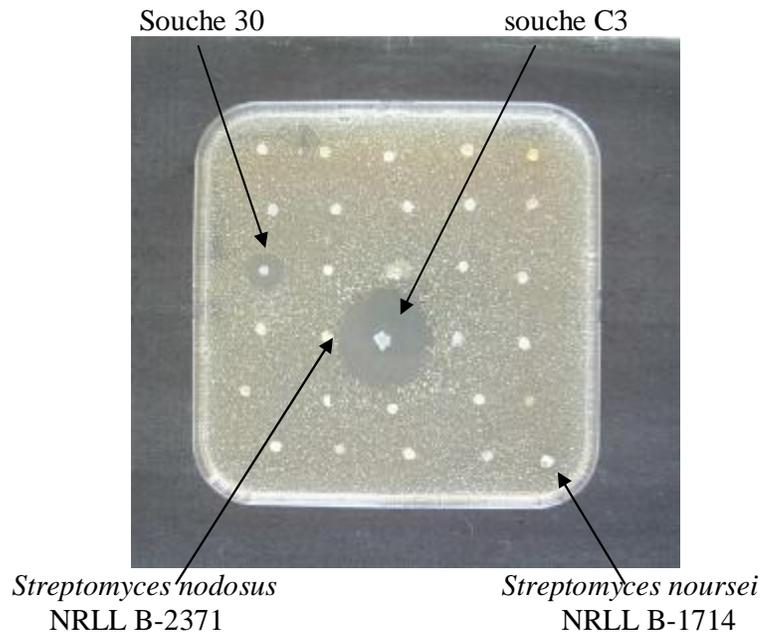


Souches cultivées sur milieu GLM

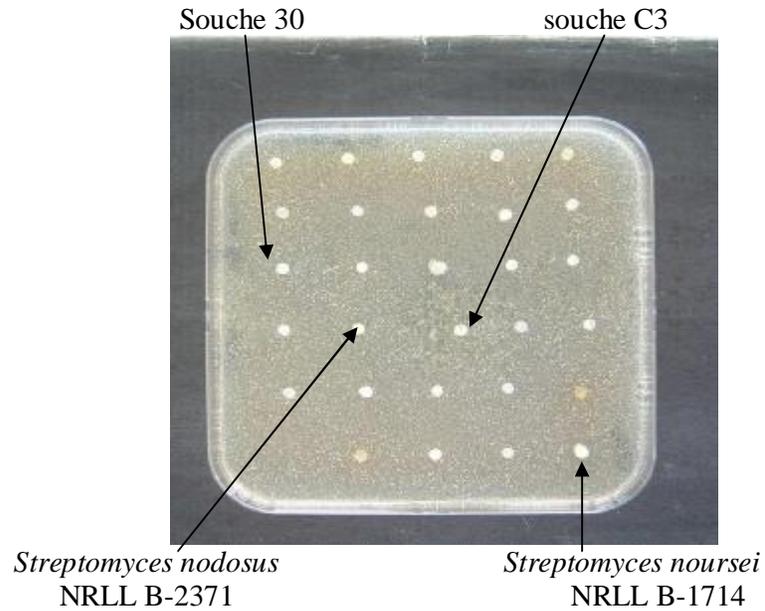


Souches cultivées sur milieu Benett

Planche 2: Activité antifongique sur milieu YMA des souches 30, C3 et deux souches contrôles contre *C. albicans* UMIP 48.72

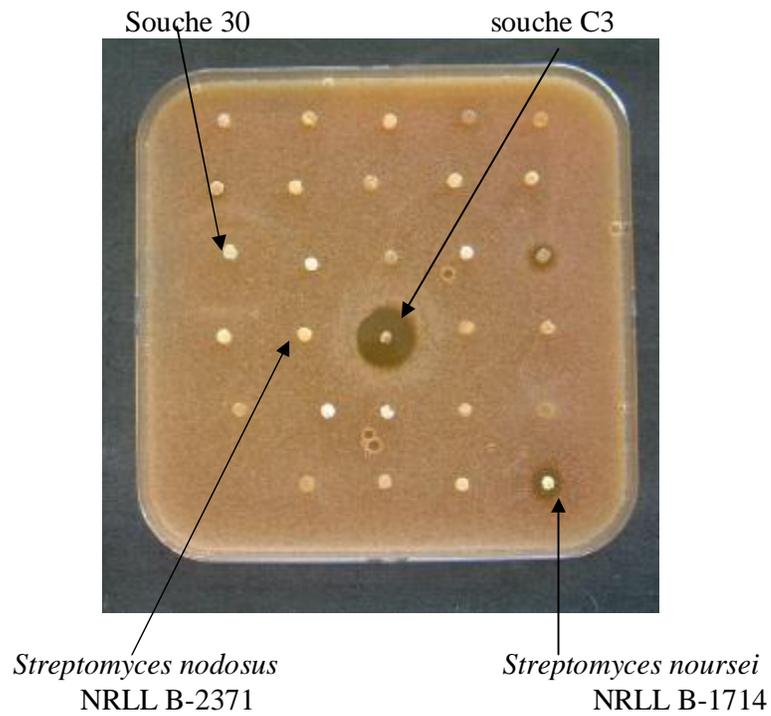


Souches cultivées sur milieu GLM

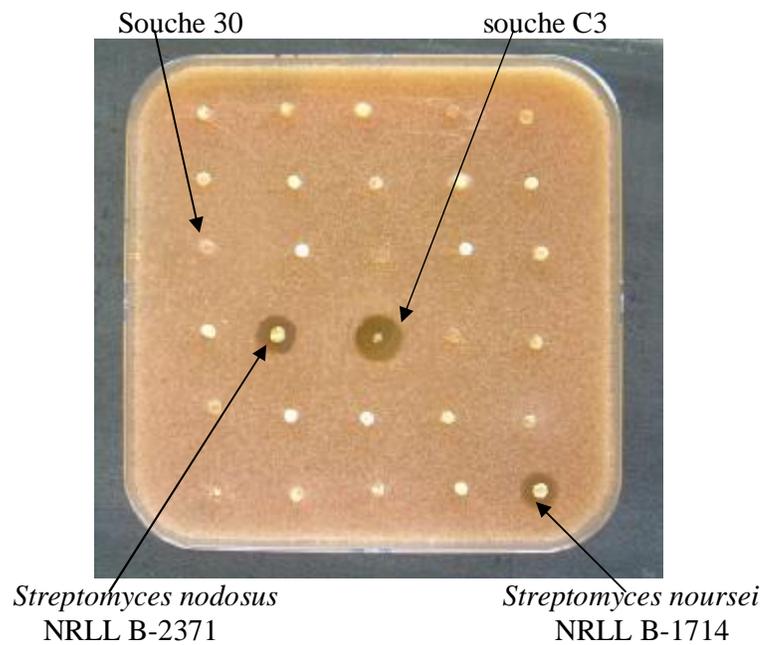


Souches cultivées sur milieu Benett

Planche3: Activité antifongique sur milieu YMA des souches 30, C3 et deux souches contrôles contre *C. tropicalis* R2 UMIP 1275.81



Souches cultivées sur milieu GLM



Souches cultivées sur milieu Benett

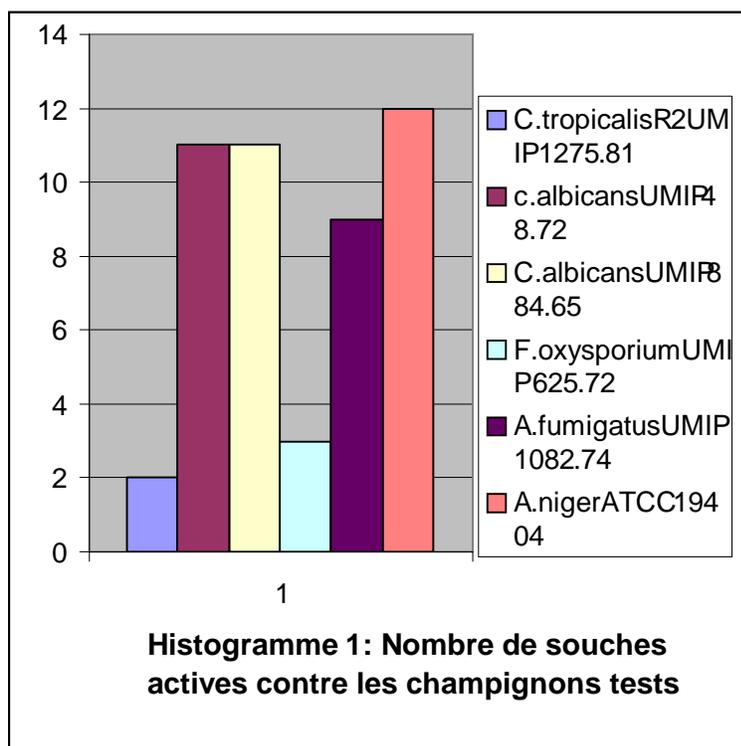
Planche 4: Activité antifongique sur milieu Casitone des souches 30, C3 et deux souches contrôles contre *F.oxysporum* UMIP 625.72

Les sols rhizosphériques de tous les écosystèmes testés dans ce travail, offrent le plus grand nombre d'actinomycètes. Dans le **tableau 11** par exemple, les résultats montrent que le nombre d'actinomycètes récoltés des sols rhizosphériques de la région de Batna est de 26, il est le double de celui isolé des régions non rhizosphériques de la même région. Cette supériorité de nombre est également observée dans tous les autres écosystèmes étudiés (**Tab.9** et **Tab.10**). Un résultat similaire est rapporté par **Miller et al., 1989**, et **Crawford et al.,1993**, qui montrent que les sols rhizosphériques sont les plus abondants en actinomycètes. La présence d'un nombre élevé d'actinomycètes dans les sols rhizosphériques ne justifie pas une recherche uniquement dans ce genre de niche écologique. Les résultats obtenus dans nos investigations indiquent que sur les 17 souches présentant une activité antifongique, 10 proviennent des sols non rhizosphériques (**Tab.12**).

D'après cette étude, le milieu GLM est plus favorable pour l'isolement des actinomycètes à partir des sols arides et semi-arides de ces régions, il offre à lui seul 95 actinomycètes soit près de 56 % du total des souches isolées, les milieux Bennett et WYE donnent respectivement 54 et 22 colonies d'actinomycètes (**Tab. 9, 10 et 11**). Ce résultat confirme ceux obtenus dans la première partie de ce travail, où il a été montré que le milieu GLM est le plus adapté pour l'isolement des actinomycètes à partir de ces écosystèmes extrêmes. Le GLM est un milieu riche en sources de carbones et d'azotes, il permet un bon développement des actinomycètes. Le WYE est un milieu pauvre en carbone organique, il est généralement utilisé pour l'isolement des microorganismes à croissance lente comme les actinomycètes. D'après les résultats obtenus dans notre étude, les milieux WYE et Bennett ne donnent pas beaucoup d'actinomycètes. Il est à noter cependant, que plusieurs auteurs emploient dans un screening de ce genre, en plus du milieu d'isolement de choix, plusieurs autres milieux d'isollements, afin d'augmenter les chances d'obtenir une grande variété de microorganismes (**Cross et al., 1982**).

Le résultat du criblage effectué sur 171 actinomycètes isolés à partir des sols semi-arides et des sols arides du sud-est et du sud-ouest algérien montre, que seulement 10 % des souches présentent une activité antifongique. L'activité est relativement importante vis à vis d'*Aspergillus niger*, avec 12 actinomycètes actifs. La faible activité des souches, est

remarquée contre *C. tropicalis* où 2 actinomycètes seulement ont présenté une activité contre cette levure résistante (**Histogramme 1**).



le faible pourcentage de l'activité antifongique remarquée, s'accorde avec les travaux de Hacène *et al.*, 1994, qui montrent que 11,18 % de l'ensemble des actinomycètes isolés du Sahara algérien ont une activité antifongique. Les travaux de **Hilali *et al.*, 2002** montrent également lors d'un criblage initial de 85 souches d'actinomycètes isolés de plusieurs milieux naturels (sol, eaux et sédiments marins) 18 souches seulement ont présenté une activité antifongique contre *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*.

L'augmentation des diamètres d'inhibition de l'activité antifongique observée chez la souche C3 cultivée sur milieu GLM par rapport à ceux mis en culture sur milieu Bennett, la réduction du nombre d'actinomycètes actifs quand ils sont cultivés sur le milieu de Bennett (**Tab. 13**) et l'absence totale de l'activité antifongique de la souche 30, lorsqu'elle est cultivée sur milieu Bennett (**Tab. 14**), montrent l'importance de la

composition du milieu de culture sur la production d'antifongiques. Par contre les germes contrôles testés dans cette étude, ont montré une préférence au milieu de Bennett (**Tab. 14**). Ces résultats convergent parfaitement avec ceux de **Dick et al., 1994, Haque et al., 1995, Theobald et al., 2000**, qui montrent l'influence de la composition des milieux sur production d'antibiotiques. C'est pour ces raisons, il est impératif de tester l'activité antibiotique des souches isolées sur plusieurs milieux avant de se prononcer.

L'étude de l'activité antifongique contre *Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.81 est d'une importance capitale dans l'espoir de trouver des molécules parmi les non polyéniques. En effet les agents antifongiques d'origine microbienne actuellement disponibles et couramment utilisés en clinique (l'amphotéricine B et la nystatine) sont de nature polyéniques. Ces molécules ont des effets indésirables très dangereux, l'amphotéricine B, par exemple, cause une toxicité rénale sévère (**odds, 1995**). Le criblage orienté en utilisant comme germe cible, une souche résistante aux polyènes est très utile, car il permet de diriger les investigations vers les molécules non polyéniques très mal connues jusqu'à ce jour (**Hacène et al., 1994, Finance et al., 1985, Ouhdouche et al., 2001, Lemriss et al., 2003**,). Par conséquent, les actinomycètes présentant une activité antifongique contre cette levure pathogène, ouvrent une possibilité de trouver des molécules non polyéniques tellement recherchées. Dans cette étude, l'activité antifongique contre cette levure est très limitée. Parmi les 17 souches actinomycetales testées seules deux actinomycètes « 30 et C3 », montrent une activité vis-à-vis de *Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.81, où les souches contrôles de références testés à savoir *S. nodosus* et *S. noursei* (producteur respectivement d'amphotéricine B et de nystatine), sont inactives contre cette levure (**Tab. 14**). Ces deux souches isolées des sols non rhizosphériques d'El-oued sont très intéressantes et nécessitent des travaux complémentaires, notamment la caractérisation d'une éventuelle activité antibactérienne, l'activité en présence d'ergostérol et la détermination du spectre UV-visible, pour confirmer la nature non polyénique des molécules synthétisées.

171 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir de différents sols sahariens algériens. Ces **écosystèmes très rudes sont donc peuplés d'actinomycètes**. Parmi cette population isolée, seules 17 souches soit **10 %**, **ont présenté une activité antifongique** contre au moins une souche fongique testée. Cette activité antifongique, est bien mise en évidence quand les souches sont cultivées dans leur **milieu d'isolement, à savoir le GLM**. Parmi les 17 souches actives, **l'actinomycète dénommé 30**, isolés des sols non rhizosphériques d'El-oued, a montré une activité antifongique très marquée contre la plus part des champignons tests étudiés dans ces investigations. **L'isolat C3**, est actif contre toute la flore fongique pathogène test. En outre, ces deux souches ont montré une activité très particulièrement recherchée. Il s'agit d'une action antifongique contre ***Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.8**, souche levurienne doublement résistante aux deux polyènes couramment utilisés en médecine, à savoir l'amphotéricine B et la nystatine. Pour la poursuite de nos investigations, nous nous sommes orientés vers l'étude de ces deux souches d'actinomycètes intéressantes pouvant produire des molécules de nature non polyènique très recherchées.

L'identification des genres d'actinomycètes repose principalement sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien, la présence de spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, la présence de sporanges de sclérotés, ou de synnémata. En plus, d'autres examens au microscope électronique doivent également être effectués afin de déterminer l'ornementation des parois sporales (**Larpent *et al.*, 1989**). La chimiotaxonomie est un système de classification basé sur les caractères chimiques de la paroi cellulaire, les composants des acides aminés, des glucides, des lipides et des acides nucléiques constituent les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (**O'donnell, 1988**).

L'identification des espèces appartenant aux genres d'actinomycètes, nécessite en plus des caractères morphologiques et chimiques, des caractères physiologiques (température, pH optimaux et utilisation des sources carbonées et azotées...) et biochimiques (dégradation de certains substrats comme la gélatine, l'amidon, la caséine, les nitrates, les lipases, etc.).

Ces méthodes d'identification ont été abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires. Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leurs rapidité et efficacité (**Provost *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1999, Labeda et Kroppenstedt, 2000, Cook *et al.*, 2003**). Parmi les méthodologies employées, la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est largement pratiquée. Le gène ADNr 16S est l'outil principalement utilisé pour l'identification moléculaire des bactéries. Dans notre étude, nous avons en premier lieu, commencé l'identification par amplification d'un fragment de 400 pb de l'ADNr 16S, en utilisant des amorces universelles, cette technique a permis dans plusieurs travaux d'identifier beaucoup de bactéries et d'actinomycètes (**Simo-Nikkari, 2002**). La deuxième technique est la plus utilisée et consiste à amplifier une séquence plus grande d'environ 1400 pb du gène de l'ADNr 16S.

1- Identification moléculaire des actinomycètes retenus par séquençage d'un fragment de 400 pb de l'ADNr 16S:

L'identification des deux souches actives (**30 et C3**) a été réalisée d'abord, par le séquençage d'un fragment de 400 pb du gène codant à la petite sous-unité 16S de l'ARNr. L'amplification a été effectuée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Deux amorces dites universelles (la 91E et la 16S₂) ont été utilisées dans cette étude, la concentration de chacune est de 0,66 pmol/μL d'eau qualité biologie moléculaire.

- 91E (3' TCA AAK GAA TTGACG GGG GC 5') K: C ou G.
- 16S₂ (5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC-3').

1-1-Extraction de l'ADN par la technique à la résine Chelex ®.

L'ADN de chaque bactérie a été extrait en ajoutant dans un microtube quelques colonies d'actinomycètes, 500 μL d'eau qualité biologie moléculaire stérile et 150 μL d'une solution de résine Chelex (15 % [p/v] Chelex 100 résin®, 0,1 % [p/v] SDS, 1 % [v/v] Nonidet P40, 1 % [v/v] Tween 80). Le mélange est agité au vortex pendant deux minutes puis chauffé à 100 °C pendant 30 minutes, ensuite centrifugé à 10.000 g pendant 8 minutes. Le surnageant constitué de l'ADN extrait est prélevé puis congelé à -20°C pour une utilisation ultérieure (**Provost, 1997**).

1-2- Amplification du fragment d'ADNr 16S

Dix microlitres du surnageant de l'ADN extrait dilué au 1/50^e et 15 μL du mélange des deux amorces sont introduits dans un tube Ready-To-GoTM PCR (Pharmacia Biotech) contenant 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de chaque déoxynucléotide triphosphate, 2,5 Unités de Hi-Taq DNA polymérase.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Hybaid, Omnigene Teddington, Royaume-Uni) ; elle débute par un cycle de dénaturation initiale à 94 °C pendant 10 minutes ensuite 45 cycles comportant 30 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes d'hybridation à 58 °C, 30 secondes d'élongation à 72 °C et 10 minutes d'élongation finale à 72 °C.

1-3-Electrophorèse

*** Préparation du gel d'agarose**

2g d'agarose (Ultapure, Bio-Rade Laboratories) ont été mélangés à 100 mL de tampon TAE 1X (40 mM de Tris-Acétate+ 2 mM Na₂ EDTA 2H₂O). Le mélange a été chauffé jusqu'à ébullition, puis refroidi à 50°C environ sous l'eau, ensuite additionné de 0.5 µg.mL⁻¹ de bromure d'ethyidium. La préparation a été versée dans un support muni d'un applicateur. Après solidification de gel, l'applicateur a été enlevé pour que les puits apparaissent.

*** Migration**

Après amplification, 1 µL de chaque amplifiât + 3 µL d'eau qualité biologie moléculaire + 1 µL de bleu de Bromophénol ont été préparés séparément, puis déposés sur le puit du gel pour une analyse par électrophorèse horizontale pendant 2 heures à 90 V, dans un tampon TAE 1X. Dans un autre puit, 1 µL d'un marqueur de poids moléculaire 100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019) a été déposé comme ADN contrôle. Après migration, le gel a été retiré de l'appareil pour observation sous UV.

*** Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de (100 paires de base) utilisé comme témoin.

1-4-Purification

Le Kit EZNA (Biofidal) a été utilisé pour purifier les ADN qui présentent des bandes parasites le protocole de purification d'ADN à partir de gel d'agarose est détaillé dans l'**annexe**.

1-5-Séquençage :

Le séquençage est effectué selon la technique de Sanger automatisée au laboratoire Biofidal 170, Avenue Gabriel Péri 69120 Vaulx en Velin.Lyon. France.

1-6-Analyse de la séquence d'ADNr 16S

Les résultats du séquençage des souches d'actinomycètes ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts sous logiciel Chromas®. Les alignements du couple des séquences sens / antisens sont effectués par le logiciel Clustal X® pour définir la séquence consensus.

1-7-Comparaison des séquences avec la banque informatique

Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée « GenBank ». Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches.

2-dentification moléculaire des actinomycètes retenus par séquençage de l'ADNr 16S (1400 pb) en utilisant les amorces SQ1-SQ6:

2-1-Amplification de L'ADNr 16S

L'identification des deux souches actives a été aussi réalisée, par le séquençage des 1400 pb du gène codant la petite sous-unité 16S de l'ADNr. L'amplification a été effectuée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Deux amorces appelées SQ1 et SQ6 ont été utilisées dans cette étude.

-SQ1 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

-SQ6 (5'-CGGTGTGTACAAGGCC-3')

Dix microlitres du surnageant de l'ADN extrait par la technique à la résine Chelex® (voir 1.1) dilué au 1/50^e et 15 µL du mélange des deux amorces SQ1 et SQ6 à concentration de 0.2 µM, ont été ajoutés à un tube Ready-To-Go™ PCR (Pharmacia Biotech), contenant 10 mM Tris-Hcl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de chaque déoxy nucléotide triphosphate (d'ATP, CTP, GTP et TTP), ainsi que 2,5 Unités de Hi-Taq DNA polymérase.

L'amplification est réalisée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans un thermocycleur (Hybaid, Omnigene Teddington, Royaume-Uni) selon les conditions suivantes : un cycle de dénaturation initiale à 98 °C pendant 5 minutes, 35 cycles comportant 30 secondes de dénaturation à 98 °C, 30 secondes d'hybridation à 58 °C et 30 secondes d'élongation à 72 °C, suivi de 10 minutes d'élongation à 72 °C.

Après amplification, 1 µL de chaque amplifiât est analysé par électrophorèse horizontale sur gel à 2 % d'agarose (Ultrapure, Bio-Rad) et 0,5 µg de bromure d'éthyldium (BET) par mL, dans un tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 2 mM Na₂ EDTA.2 H₂O). Un marqueur de poids moléculaire 100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019) est déposé dans un puit comme ADN contrôle.

Le gel d'agarose est ensuite exposé aux rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de (100 paires de base) utilisé comme témoin.

2-2- Séquençage de l'ADNr 16S

A l'aide d'un séquenceur d'ADN « ABI 377 » (Applied Biosystems, Foster City, USA), le séquençage du gène ADNr 16S a été effectué par la technique de Sanger. L'opération est réalisée par un Kit de séquençage travaillant avec les amorces suivantes :

SQ1 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'),

SQ2 (5'-AAACTCAAAGRATTGACGGG-3'),

SQ3 (5'-CCCGTCAATYCTTTGAGTTT-3'),

SQ4 (5'-CGTGCCAGCAGCCGCG-3'),

SQ5 (5'-CGCGGCTGCTGGCACG-3'),

SQ6 (5'-CGGTGTGTACAAGGCC-3').

Le résultat du séquençage est obtenu sous forme d'électrophorégrammes bruts sous logiciel Chromas®. Les alignements du couple des séquences sens / antisens sont effectués par le logiciel Clustal X® pour définir la séquence consensus. Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast, pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée

« GenBank ». Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches.

3-Etude des caractères phénotypiques :

3-1 Préparation de l' inoculum général

Chaque souche d'actinomycète a été ensemencée en stries serrées sur milieu ISP3 (**annexe**) et incubées à 28°C pendant 7 jours. Après croissance, 20 mL d'eau distillée stérile sont versés dans chaque boîte de Pétri, les colonies sont raclées à l'aide d'un râteau puis récupérées par pipette Pasteur dans un tube stérile. Cette suspension contenant des fragments de mycélium et de spores est utilisée comme inoculum pour tous les tests effectués à l'exception de la fermentation des substrats carbonés. (**Shirling et Gottlieb 1966**).

3-2 Préparation de l'inoculum lavé

Dans un Erlenmeyer de 250 mL de volume, Cinq millilitres de l'inoculum général sont ensemencés dans 50 mL du milieu liquide ISP1 (**annexe**). Après incubation à 28°C pendant 48 heures sous forte agitation, la culture a été centrifugée à 5000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot repris dans de l'eau distillée stérile. Une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions a été réalisée et le culot est mis en suspension dans de l'eau distillée stérile. Cette préparation est conservée à 4°C, pour servir à la détermination des sucres utilisés par les actinomycètes étudiés.

3-3 Caractérisation de la morphologie et de la pigmentation

3-3-1 Observation macroscopique

Sur quatre milieux de croissance préconisés par **Shirling et Gottlieb 1966** : ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5 (**annexe**), 0.05 mL de l'inoculum général de chaque souche actinomycétale sont ensemencés en surface. La présence ou l'absence des chaînes de spores, la disposition des hyphes, la couleur des spores de surface et du pigment soluble

autre que mélanoïde sont recherchés sur tous les milieux utilisés, par observation macroscopique après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C.

3-3-2 Observation du mycélium aérien et du mycélium du substrat par la technique de la culture sur lamelle

Des lamelles stériles sont insérées dans le milieu ISP2 en faisant un angle de 45°C environ avec la surface du milieu. Dix microlitres de l'inoculum général de chaque souche sont déposés au point d'intersection de la lamelle et de la gélose. Après 15 jours d'incubation à 28°C, les lamelles sont soigneusement retirées, puis déposées sur des lames propres et observées au microscope optique.

3-3-3 Détermination de la couleur du mycélium du substrat

Un disque d'Agar de chaque culture mature d'actinomycète est prélevé à l'aide d'un perceur bouchon puis déposé sur un papier filtre saturé avec une solution d'alcool à 90°. La couleur du mycélium du substrat est appréciée après avoir écarté l'Agar par un rasoir.

3-3-4 Production de pigments mélanoïdes

La production de pigments mélanoïdes est considérée positive quand une couleur brune apparaît après culture de quatre jours de chaque souche d'actinomycète sur milieu ISP6 et ISP7 (annexe).

3-4 Détermination des caractères physiologiques

3-4-1 Effet du pH sur la croissance des souches

Cinq boîtes contenant le milieu de Bennett sont préparées à différents pH (3.3, 5.3, 7.3, 9.3, 12.3). 0.05 mL de l'inoculum général sont introduits dans ces boîtes. Après 4 et 7 jours d'incubation à 28°C, la croissance des souches est appréciée.

3-4-2 Effet de la température sur la croissance des souches

0.05 mL de l'inoculum général de chaque souches ont étéensemencés sur cinq boîtes de Pétri contenant le milieu de Bennett. L'incubation a été réalisée aux températures

suivantes : 4°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C. La croissance a été évaluée bonne, moyenne ou médiocre après 14 jours d'incubation à différentes températures.

3-4-3 Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches

0.05 mL de l'inoculum général de chaque souche sont ensemencés sur plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu de Bennett additionné de différentes concentrations d'NaCl. Les concentrations testées sont 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% (p/v). La croissance des souches sur ces milieux est comparée avec celle d'un milieu sans NaCl pris comme témoin.

3-4-4 Test de la croissance sur différentes sources de carbone

Le milieu ISP 9 (**annexe**) a été utilisé dans cette étude. Ce milieu est exempt de toutes formes de carbone, sa composition est citée en annexe. Les différentes sources de carbone testées sont celles recommandées par **Shirling et Gottlieb, 1966** et par **Pridham et Gottlieb, 1948**, elles sont les suivantes: saccharose, D-fructose, L-arabinose, D-glucose, D-xylose, L-inositol, lactose, D-mannitol, cellulose, rhamnose, raffinose, acétate de sodium, maltose, et galactose.

Des solutions de ces sources de carbone, à 10 % (p/v) de concentration, sont préparées et stérilisées par filtration. La cellulose et L'inositol sont stérilisés dans une solution d'acétone et d'éthyl-éther, après évaporation des solvants ces composés sont repris dans de l'eau distillée. L'ensemble des sources de carbones sont additionnées aseptiquement au milieu de base de manière à obtenir une concentration finale de 1 % (p/v). Ces différents milieux ont été répartis dans des boîtes de Pétri, ensemencés par 0.01 mL de l'inoculum lavé préparé précédemment et incubés pendant sept jours à 28°C. La croissance sur ces milieux est comparée avec un témoin négatif (milieu sans source de carbone) et un témoin positif (milieu avec glucose). Si la croissance obtenue est supérieure à celle du témoin négatif, le résultat est considéré positif.

3-4-5 Test de la croissance sur différentes sources d'azote

Ce test est utilisé afin de déterminer les préférences nutritionnelles en sources d'azotes des souches actinomycétales testées. Les différents composés azotés testés dans

cette étude sont les suivants : sérine, cystéine, arginine, histidine, méthionine, proline, valine, nitrate de potassium.

Chaque source d'azote est mise en solution dans de l'eau distillée puis stérilisée à 100°C pendant 15 minutes ensuite additionnée au milieu de base (**annexe**) à raison de 0.1 % (p/v). 0.01 mL de l'inoculum général sont ensemencés en stries dans chaque boîte contenant une seule source d'azote. La lecture des résultats est effectuée après incubation des boîtes à 28°C pendant sept jours. Le résultat est considéré comme étant positif, si la croissance est plus abondante que celle obtenue sur le milieu de base sans source d'azote (témoin négatif).

3-5 Dégradation de certains composés

3-5-1 Hydrolyse de l'amidon

Pour ce test, des boîtes de pétri contenant le milieu de Bennett additionné de 1 % d'amidon soluble sont préparées. 0.01 mL de l'inoculum général sont déposés en touches sur ces boîtes et incubés à 28°C pendant sept jours. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'inondation des boîtes avec une solution de lugol. L'absence de la coloration autour des colonies indique que l'amidon a été hydrolysé. Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

3-5-2 Hydrolyse de la caséine

Ce test a été réalisé sur le milieu pour hydrolyse de la caséine (**annexe**) additionné de 5 % de lait écrémé. Les boîtes ensemencées

+ont été observées après 14 jours d'incubation à 28°C. La clarification autour de colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

3-5-3 Dégradation de l'urée

La dégradation de l'urée est mise en évidence, après ensemencement du milieu contenant du rouge de phénol (**annexe**) par 0.05 mL de l'inoculum général. Le résultat est considéré positif quand la couleur du milieu vire à l'orangé après incubation pendant sept jours à 28°C.

1- Identification moléculaire

Les résultats du séquençage des deux ADN des souches d'actinomycètes C3 et 30 ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts sous logiciel Chromas. Les alignements du couple des séquences sens / antisens sont effectués par le logiciel Clustal X® pour définir la séquence consensus. Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast, pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique (GenBank).

1-1 Séquençage par amorces universelles de la souche "30" :

La séquence consensus de la souche "30" est la suivante :

```
atgtggcctaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggcttgacatataccgaaagcatcagagatgggtgcccccttg  
gtcggatacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtcgtgagatgtgggtaagtcccgaacgagcgcaaccttgttctg  
tgtgccagcatgcccttggggatggggactcacaggagactccgggggtaactcggagggaaggtgggacgacgtcaa  
gtcatcatgcccttatgtcttgggctgcacacgtgctacaatggccggtacaatgagctgcgatccgagggcggagcgaatc  
tcaaaaagccggtctcagttcggattggggtctgcaactcagcccatgaagtcggagtgtagtaatcgagatcagcattgct  
gcggtgaatacgttccc.
```

La comparaison de cette séquence ADN avec les séquences de Gen Bank a donné les résultats suivants :

* [Streptomyces caviscabies](#) strain SAFR-024 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length = 1332

Score = 878 bits (443), Expect = 0.0
Identities = 443/443 (100%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 2 atgtggcctaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggcttgacatataccgaaag 61  
|||||  
Sbjct: 833 atgtggcctaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggcttgacatataccgaaag 892
```

Query: 62 catcagagatgggcccccttggtcggatatacaggtggatggctgctcagct 121

|||||

Sbjct: 893 catcagagatgggcccccttggtcggatatacaggtggatggctgctcagct 952

(Partie 3) RESULTATS

Query: 122 cgtgctgagatgtgggtaagtcccgaacgagcgcaaccctgttctgttgcca 181

|||||

Sbjct: 953 cgtgctgagatgtgggtaagtcccgaacgagcgcaaccctgttctgttgcca 1012

Query: 182 gcatgcccttcggggtgatgggactcacaggagactgccgggtcaactcggaggaagg 241

|||||

Sbjct: 1013 gcatgcccttcggggtgatgggactcacaggagactgccgggtcaactcggaggaagg 1072

Query: 242 tggggacgacgtcaagtcatcatgcccttatgtcttgggctgcacacgtgtacaatgg 301

|||||

Sbjct: 1073 tggggacgacgtcaagtcatcatgcccttatgtcttgggctgcacacgtgtacaatgg 1132

Query: 302 ccggtacaatgagctgcatgccgagcgagcgcaatctcaaaaagccggtctcagtt 361

|||||

Sbjct: 1133 ccggtacaatgagctgcatgccgagcgagcgcaatctcaaaaagccggtctcagtt 1192

Query: 362 cggattggggtctgcaactcgacccatgaagtcggagtgctagtaatcgagatcagc 421

|||||

Sbjct: 1193 cggattggggtctgcaactcgacccatgaagtcggagtgctagtaatcgagatcagc 1252

Query: 422 attgctcgggtgaatacgttccc 444

|||||

Sbjct: 1253 attgctcgggtgaatacgttccc 1275

* *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene

Length = 1478

Score = 878 bits (443), Expect = 0.0

Identities = 443/443 (100%)

Strand = Plus / Plus

* *Streptomyces setonii* 16S ribosomal RNA, complete sequence

Length = 1532

Score = 878 bits (443), Expect = 0.0

Identities = 443/443 (100%)

Strand = Plus / Plus

(Partie 3) RESULTATS

1-2 Séquençage par amorces universelles de la souche "C3" :

La séquence consensus de la souche "30" est la suivante :

```
ggcttaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggctgacatataccggaagcattagagatagtgcccccttggtcgcg  
gtatacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgtgggtaagtcccgaacgagcgaacccttgcctgtgtt  
gccagcatgcccttcggggatggggactcacaggagaccgccgggtcaactcggaggaaaggtggggacgacgtcaagt  
catcatgcccttatgtcttgggctgcacacgtgctacaatggccggtacaatgagctgcgataccgtgaggtggagcgaatctca  
aaaagccggtctcagttcggattggggtctgcaactcgacccatgaagtcggagtcgctagtaatcgagatcagcattgctgc  
ggt
```

Les résultats de comparaison des séquences sont :

* *Streptomyces himgiriensis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1487

Score = 839 bits (423), Expect = 0.0

Identities = 426/427 (99%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ggcttaattcgacgcaacgcaagaaccttaccaggctgacatataccggaagcatt 60

|||||

Sbjct: 892 ggcttaattcgacgcaacgcaagaaccttaccaggctgacatataccggaagcatt 951

Query: 61 agagatagtcccccttggtcggtatacagggtgcatggctgctcagctcgtg 120

|||||

Sbjct: 952 agagatagtcccccttggtcggtatacagggtgcatggctgctcagctcgtg 1011

Query: 121 tcgtgagatgtgggtaagtcccgaacgagcgcaaccctgtcctgtgtgccagcat 180

|||||

Sbjct: 1012 tcgtgagatgtgggtaagtcccgaacgagcgcaaccctgtcctgtgtgccagcat 1071

Query: 181 gccctcgggggatggggactcacaggagaccgccgggtcaactcggaggaaggtggg 240

|||||

Sbjct: 1072 gccctcgggggatggggactcacaggagaccgccgggtcaactcggaggaaggtggg 1131

Query: 241 gacgacgtcaagtcacatcatgcccttatgtctgggctgcacacgtgctacaatggccgg 300

|||||

Sbjct: 1132 gacgacgtcaagtcacatcatgcccttatgtctgggctgcacacgtgctacaatggccgg 1191

(Partie 3) RESULTATS

Query: 301 tacaatgagctgcgataccgtgaggtggagcgaatctcaaaaagccggtctcagttcgga 360

|||||

Sbjct: 1192 tacaatgagctgcgataccgtgaggtggagcgaatctcaaaaagccggtctcagttcgga 1251

Query: 361 ttgggtctgcaactcgacccatgaagtcggagtcgtagtaatcgagatcagcattg 420

|||||

Sbjct: 1252 ttgggtctgcaactcgacccatgaagtcggagttgtagtaatcgagatcagcattg 1311

Query: 421 ctgCGGT 427

|||||

Sbjct: 1312 ctgCGGT 1318

* [Streptomyces virginiae](#) DNA for 16S rRNA, strain IFO 3729

Length = 1514

Score = 835 bits (421), Expect = 0.0

Identities = 425/427 (99%)

Strand = Plus / Plus

* [Streptomyces lavendulae](#) DNA for 16S rRNA, strain IFO 14028

Length = 1514

Score = 829 bits (418), Expect = 0.0

Identities = 424/427 (99%)

Strand = Plus / Plus

* [Streptomyces subrutilus](#) 16S rRNA gene, strain DSM 40445

Length = 1516

Score = 823 bits (415), Expect = 0.0

Identities = 425/427 (99%), Gaps = 1/427 (0%)

Strand = Plus / Plus

1-3 Séquençage par amorces SQ1-SQ6 de la souche "30" :

La séquence obtenue est la suivante :

agagtttgatcctggctcaggacgaacgttggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagccttcggggtggattagt
ggcgaacgggtgagtaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaacgggtctaataccggataaact
ctgtcccgcatgggacggggttaaagctccggcgggtaaggatgagcccggcctatcagcttgttggggtaatggcct
accaaggcgacgacgggtagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacggga
ggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgccgcgtgagggatgacggccttcgggtgtaaa
cctcttcagcagggagaagcgaagtgacggtacctgcagaagaagcggcggtaactacgtgccagcagccgggtaata
cgtagggcgcaagcgtgtccggaattattgggcgtaaagagctcgtagggcgtgtcacgtcggatgtgaaagccggggctt
aaccggggtctgcattcgatacgggctagctagagtgtgtaggggagatcggaaattcctggtgtagcgggtgaaatcgcgagat
atcaggaggaaacaccgggtggcgaagcggatctctggccattactgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacagg
attagataccctggtagtcacgccgtaaacgttgggaactaggtgttggcgacattccacgtcgtcgggtgccgagctaacgcat

(Partie 3) RESULTAS

taagttccccctggggagtacggccgcaaggctaaaactcaaggaattgacgggggcccgcacaagcagcggagcatgt
ggcttaattcgacgcaacgcgaagaacctaccaaggcttgacatataccggaaagcatcagagatggtgcccccttgggtcg
gtatacaggtggtgcaaggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggtaagtcccgaacgagcgaacccctgttctgttt
gccagcatgcccttcgggggtgatggggactcacaggagactccggggtaactcggaggaaggtggggacgacgtcaagtc
atcatgcccccttatgtcttgggctgcacacgtgctacaatggccggtacaatgagctgcgatgccgagggcggagcgaatctca
aaaagccggtctcagttcggattggggtctgcaactcgaacccatgaagtcggagttgctagtaatcgagatcagcattgctcgcg
gtgaatacgttccccggccttgtacaca

La comparaison de cette séquence ADN avec les séquences de Gen Bank a donné les résultats suivants :

* *Streptomyces griseus* ribosomal RNA operon rrnE gene region

Length = 2617

Score = 2704 bits (1364), Expect = 0.0

Identities = 1370/1372 (99%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 agagtttgatcctggctcaggacgaacgttggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgaac 60

|||||

Sbjct: 697 agagtttgatcctggctcaggacgaacgttggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgaac 756

Query: 61 gatgaagccttcggggtgattagtgccgaacgggtgagtaacacgtgggcaatctgcc 120

|||||

Sbjct: 757 gatgaagccttcggggtgattagtgccgaacgggtgagtaacacgtgggcaatctgcc 816

Query: 121 cttcactctgggacaagccctggaacgggtctaataccggataacactctgtcccgca 180

|||||

Sbjct: 817 cttcactctgggacaagccctggaacgggtctaataccggataacactctgtcccgca 876

Query: 181 tgggacggggttaaagctccggcggtaaggatgagcccggcctatcagcttgttg 240

|||||

Sbjct: 877 tgggacggggttaaagctccggcggtaaggatgagcccggcctatcagcttgttg 936

Query: 241 tgggtaatggcctaccaaggcgacgacggtagccggcctgagagggcgaccggccaca 300

|||||

Sbjct: 937 tgggtaatggcctaccaaggcgacgacggtagccggcctgagagggcgaccggccaca 996

(Partie 3) RESULTATS

Query: 301 ctgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaat 360

|||||

Sbjct: 997 ctgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaat 1056

Query: 361 gggcgaaagcctgatgcagcgacgccgctgagggatgacggccttcgggtgtaaact 420

|||||

Sbjct: 1057 gggcgaaagcctgatgcagcgacgccgctgagggatgacggccttcgggtgtaaact 1116

Query: 421 cttcagcaggaagaagcgaagtacgtacgtacctgcagaagaagcggcctaactacg 480

|||||

Sbjct: 1117 cttcagcaggaagaagcgaagtacgtacgtacctgcagaagaagcggcctaactacg 1176

Query: 481 tgccagcagccgcggaataacgtagggcgcaagcgtgtccggaattattggcgtaaag 540
|||||

Sbjct: 1177 tgccagcagccgcggaataacgtagggcgcaagcgtgtccggaattattggcgtaaag 1236

Query: 541 agctcgtaggcggctgtcacgtcggatgtgaaagcccgggctaaccgggtctgca 600
|||||

Sbjct: 1237 agctcgtaggcggctgtcacgtcggatgtgaaagcccgggctaaccgggtctgca 1296

Query: 601 ttcgatacgggctagctagagtgtgtaggggagatcggaattcctggttagcggtgaa 660
|||||

Sbjct: 1297 ttcgatacgggctagctagagtgtgtaggggagatcggaattcctggttagcggtgaa 1356

Query: 661 atgcgagatcaggaggaacaccggtggcgaaggcggatctctggccattactgacg 720
|||||

Sbjct: 1357 atgcgagatcaggaggaacaccggtggcgaaggcggatctctggccattactgacg 1416

Query: 721 ctgaggagcgaagcgtggggagcgaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaa 780
|||||

Sbjct: 1417 ctgaggagcgaagcgtggggagcgaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaa 1476

Query: 781 acgttgggaactaggtgttggcgacattccacgtcgtcggtgccgcagctaacgcattaa 840
|||||

Sbjct: 1477 acgttgggaactaggtgttggcgacattccacgtcgtcggtgccgcagctaacgcattaa 1536

Query: 841 gttccccgcctggggagtacggccgaaggctaaaactcaaaggaattgacgggggcccg 900
|||||

Sbjct: 1537 gttccccgcctggggagtacggccgaaggctaaaactcaaaggaattgacgggggcccg 1596

Query: 901 cacaagcagcggagcatgtggcttaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggcttg 960
|||||

Sbjct: 1597 cacaagcagcggagcatgtggcttaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggcttg 1656

Query: 961 acatataccggaagcatcagagatggtgcccccttggtcggtatacaggtggtgca 1020

|||||

Sbjct: 1657 acatataccggaagcatcagagatggtgcccccttggtcggtatacaggtggtgca 1716

Query: 1021 tggctgctgcagctcgtgctgagatgtgggtaagtcccgcaacgagcgcaaccct 1080

|||||

Sbjct: 1717 tggctgctgcagctcgtgctgagatgtgggtaagtcccgcaacgagcgcaaccct 1776

Query: 1081 tgttctgtgtgccagcatgcccttcggggatggtgggactcacaggagactgccgggg 1140

|||||

Sbjct: 1777 tgttctgtgtgccagcatgcccttcggggatggtgggactcacaggagactgccgggg 1836

Query: 1141 caactcggaggaaggtggggacgacgtcaagtcacatgcccccttatgtcttgggctgca 1200

|||||

Sbjct: 1837 caactcggaggaaggtggggacgacgtcaagtcacatgcccccttatgtcttgggctgca 1896

Query: 1201 cacgtgctacaatggccggtacaatgagctgcatgccgagggcgagcgaatctcaaa 1260

|||||

Sbjct: 1897 cacgtgctacaatggccggtacaatgagctgcatgccgagggcgagcgaatctcaaa 1956

Query: 1261 aagccggtctcagttcggattggggtctgcaactcgaccccatgaagtcggagttgctag 1320

|||||

Sbjct: 1957 aagccggtctcagttcggattggggtctgcaactcgaccccatgaagtcggagttgctag 2016

Query: 1321 taatcgagatcagcattgctgcggtgaatacgttcccggccttgtagaca 1372

|||||

Sbjct: 2017 taatcgagatcagcattgctgcggtgaatacgttcccggccttgtagaca 2068

* [Streptomyces caviscabies](#) strain ATCC51928 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length = 1523

Score = 2676 bits (1350), Expect = 0.0
Identities = 1370/1374 (99%), Gaps = 2/1374 (0%)
Strand = Plus / Plus

* [Streptomyces setonii](#) 16S ribosomal RNA, complete sequence
Length = 1532

Score = 2676 bits (1350), Expect = 0.0
Identities = 1370/1374 (99%), Gaps = 2/1374 (0%)
Strand = Plus / Plus

(Partie 3) RESULTATS

* [Streptomyces flavogriseus](#) partial 16S rRNA gene, type strain CBS
101.34T
Length = 1518

Score = 2672 bits (1348), Expect = 0.0
Identities = 1366/1372 (99%)
Strand = Plus / Plus

* [Streptomyces argenteolus](#) gene for 16S rRNA
Length = 1484

Score = 2668 bits (1346), Expect = 0.0
Identities = 1355/1358 (99%)
Strand = Plus / Plus

* *Streptomyces ornatus* 16S rRNA gene, strain DSM40307

Length = 1518

Score = 2642 bits (1333), Expect = 0.0

Identities = 1365/1373 (99%), Gaps = 2/1373 (0%)

Strand = Plus / Plus

1-4 Séquençage par amorces SQ1-SQ6 de la souche "C3" :

La séquence consensus obtenue est la suivante :

```
agttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagccctcgggggtgattagtg
gcgaacgggtgagtaaacacgtgggcaatctgcccttcaactctgggacaagccctggaaacgggggtctaataccggatacactg
cggaaggcatcttctgtggtggaaagctccggcggggaaggatgagcccggcctatcagcttgttgggtgggtaatggcctac
caaggcgacgacgggtagccggcttgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagg
cagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgccgctgaggggatgacggcctcgggtttaaacc
tctttcagcaggaagaagcgaagtgacggtacctgcagaagaagcggcggtaactacgtgccagcagccggtaatacag
tagggcgcaagcgttgcggaattattggcgtaaaagagctcgtagggcggctgtcacgtcggatgtgaaagcccaggcctaa
cctcgggtctgcattcgatacgggctagctagagtgtggtaggggagatcggaaattcctggtgtagcgggtgaaatgcgcagatat
caggaggaacaccgggtggcgaaggcggatctctgggccattactgacgctgaggagcgaagcgtgggggagcgaacaggat
tagataccctggtagtcacgccgtaaacgtgggaactaggtgtggcgacattccacgtcgtcgggtccgcagctaacgcatta
agttccccgcctggggagtacggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacggggggcccgcacaagcggcggagcatgtg
gcttaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggcttgacatataccgaaagcattagagatagtcccccttgggtcgggt
atacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgaacgagcgaacccttgcctgtgttc
cagcatgcccttcgggggtg
```

(Partie 3) RESULTATS

La comparaison de cette séquence ADN avec les séquences de GenBank a donné les résultats suivants :

* *Streptomyces lavendulae* DNA for 16S rRNA, strain IFO 14028

Length = 1514

Score = 2119 bits (1069), Expect = 0.0

Identities = 1098/1110 (98%)

Strand = Plus / Plus

Query: 3 agtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgctaacacatgcaagtccaacga 62

|||||

Sbjct: 1 agtttgatcctggctcaggacgancgctggcggcgtgctaacacatgcaagtccaacga 60

Query: 63 tgaagccctcggggtaggattagggcgaacgggtgagtaacacgtgggcaatctgcct 122

|||||

Sbjct: 61 tgaagccctcggggtaggattagggcgaacggntgagtaacacgtgggcaatctgcct 120

Query: 123 tcactctgggacaagccctggaacgggtctaataccggatacactgccaagcctc 182

|||||

Sbjct: 121 tcactctgggacaagccctggaacgggtctaataccggatacactgccaagcctc 180

Query: 183 ttctgtggtgaaagctccggcgggtgaaggatgagcccggcctatcagctgttggtg 242

| |||||

Sbjct: 181 tcctgtggtgaaagctccggcgggtgaaggatgagcccggcctatcagctgttggtg 240

Query: 243 gggtaatggcctaccaagcgacgacgggtagccggctgagagggcgaccggccacact 302

|||||

Sbjct: 241 gggtaatggcctaccaagcgacgacgggtagccggctgagagggcgaccggccacact 300

Query: 303 gggactgagacacggcccagactcctacggaggcagcagtggggaatattgcacaatgg 362

|||||

Sbjct: 301 gggactgagacacggcccagactcctacggaggcagcagtggggaatattgcacaatgg 360

Query: 363 gcgaaagcctgatgcagcagcccgctgaggatgacggcctcgggtgtaaacctct 422

|||||

Sbjct: 361 gcgaaagcctgatgcagcagcccgctgaggatgacggcctcgggtgtaaacctct 420

Query: 423 ttcagcaggaagaagcgaagtgacgggtacctgcagaagaagcggcgtaactacgtg 482

|||||

Sbjct: 421 ttcagcaggaagaagcggagagtgacgggtacctgcagaagaagcggcgtaactacgtg 480

(Partie 3) RESULTATS

Query: 483 ccagcagccggtataatcgtagggcgcaagcgttgccggaattattgggcgtaaagag 542

|||||

Sbjct: 481 ccagcagccggtataatcgtagggcgcaagcgttgccggaattattgggcgtaaagag 540

Query: 543 ctcgtaggcgctgtcacgtcggatgtgaaagcccgaggctaacctcgggtctgcatt 602

|||||

Sbjct: 541 ctcgtaggcgctgtcacgtcggatgtgaaagcccgaggctaacctcgggtctgcatt 600

Query: 603 cgatacgggctagctagagtgtgtaggggagatcggaattcctggttagcggtgaaat 662

|||||

Sbjct: 601 cgatncgggctgtagagtgtgtaggggagatcggnntcctggttagcggtgaaat 660

Query: 663 ggcagatatcaggaggaacaccgggtggcgaaggcggatctctggccattactgacgt 722

|||||

Sbjct: 661 ggcagatatcaggaggaacaccgggtggcgaaggcggatctctggccattactgacgt 720

Query: 723 gaggagcgaagcgtggggagcgaacaggattagataccctgtagccacgccgtaaac 782

|||||

Sbjct: 721 gaggagcgaagcgtggggagcgaacaggattagataccctgtagccacgccgtaaac 780

Query: 783 gttgggaactaggtgtggcgacattccacgtcgtcgggtccgagctaacgcattaagt 842

|||||

Sbjct: 781 gttgggaactaggtgtggcgacattccacgtcgtcgggtccgagctaacgcattaagt 840

Query: 843 tccccgcctggggagtacggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacgggggcccgca 902
|||||

Sbjct: 841 tccccgcctggggagtacggccgcaaggctaaaactcanaggaattgacgggggcccgca 900

Query: 903 caagcggcggagcatgtggcttaattcgacgcaacgcgaagaacctaccaaggcttgac 962
|||||

Sbjct: 901 caagcggcggagcatgtggcttaattcgacgcaacgngaagaacctaccaaggcttgac 960

Query: 963 atataccgaaagcattagagatagtcccccttgggtcggtatacaggtggtgcatg 1022
|||||

Sbjct: 961 atataccgaaagcattagagatagtcccccttgggtcggtatacaggtggtgcatg 1020

Query: 1023 gctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggtaagtcccgcaacgagcgcaacccttg 1082
|||||

Sbjct: 1021 gctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggtaagtcccgcaacgagcgcaacccttg 1080

Query: 1083 tcctgtgtgccagcatgcccttcggggtg 1112
|||||

Sbjct: 1081 tcctgtgtgccagcatgcccttcggggtg 1110

(Partie 3) RESULTATS

* [Streptomyces subrutilus](#) 16S rRNA gene, strain DSM 40445

Length = 1516

Score = 2070 bits (1044), Expect = 0.0

Identities = 1096/1112 (98%), Gaps = 1/1112 (0%)

Strand = Plus / Plus

* [Streptomyces virginiae](#) DNA for 16S rRNA, strain IFO 3729

Length = 1514

Score = 2058 bits (1038), Expect = 0.0

Identities = 1091/1110 (98%)

Strand = Plus / Plus

2- Identification phénotypique :

L'étude des caractères macroscopiques de la **souche 30** (Annexe) montre qu'elle pousse bien sur les quatre milieux de culture (ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5) préconisés par **Shirling et Gottlieb**. L'observation au binoculaire révèle la présence de longues chaînes de spores, de couleur blanchâtre. Un pigment soluble autre que mélanoïde de couleur marron est produit par cette souche. Le mycélium du substrat de la **souche 30** (Annexe), est peu ramifié et les hyphes du mycélium aérien sont au contraire très enchevêtrés. La couleur du mycélium est brune et il y a présence de pigment mélanoïde. Cette souche pousse bien à pH 7.3 et 9.3, avec un optimum à 7.3, elle se développe cependant mal en pH acide (3.3 et 5.3) et en pH très alcalin (12.3). La température optimale de croissance de cet isolat, est de 45°C, mais pousse aussi à une température de 30, 37 et 55°C, alors qu'une température de 4 °C inhibe sa croissance. L'actinomycète dénommé **30**, ne pousse pas à des concentrations très élevées en NaCl dépassant les 8 %, une bonne croissance est observée aux concentrations de 3, 4, 5 et 6 % , avec un optimum à 6%. Les sources de carbone et d'azote utilisées par cette souche sont rassemblées dans le tableau 15. **L'isolat 30** hydrolyse la caséine et l'amidon mais pas l'urée.

(Partie 3) RESULTATS

Tableau 15: Utilisation des différentes sources de carbone et d'azote par la souche 30

Sources de carbones et d'azotes	souche 30
Saccharose	(+)
D-fructose	(+)

L-arabinose	(+)
D-glucose	(+)
D-xylose	(+)
L-inositol	(-)
Lactose	(+)
D-mannitol	(+)
Cellulose	(+)
Raffinose	(-)
Rhamnose	(+)
Acétate de sodium	(+)
Maltose	(-)
Galactose	(+)
Sérine	(+)
Cystéine	(-)
Arginine	(+)
Histidine	(+)
Méthionine	(-)
Proline	(-)
Valine	(+)
Nitrate de potassium	(+)

La souche **C3** (voir annexe), pousse également bien sur les quatre milieux de **Shirling et Gottlieb**, elle se présente sous binoculaire sous forme d'hyphes se terminant par de longues chaînes de spores de couleur brune. Un pigment soluble jaune est produit par cet actinomycète. Au grossissement X 40, le mycélium du substrat apparaît peu ramifié alors que son mycélium aérien présente des ramifications importantes (Annexe). La couleur du mycélium est crème et le pigment mélanoïde est présent. Plusieurs caractères physiologiques de cet isolat, ressemblent curieusement à ceux de l'isolat 30. L'optimum de croissance de la souche **C3** est observé en pH 7.3, elle se développe cependant mal en pH acide (3.3 et 5.3) et en pH alcalin (9.3 et 12.3). La température de croissance de cette souche est de 45°C, mais pousse aussi à une température de 30, 37 et 55°C, alors qu'une température de 4 °C inhibe

(Partie 3) RESULTATS

sa croissance. Au delà d'une concentration en NaCl égale ou supérieure à 8 %, l'isolat **C3**, ne se développe pas. Les concentrations 3, 4, 5 et 6 % en NaCl testées dans cette étude, donnent cependant une bonne croissance, avec un optimum de 6%. Les résultats observés

concernant l'utilisation par la souche C3 des sources de carbone et d'azote sont rassemblés dans le tableau 16. L'actinomycète **C3**, hydrolyse la caséine et l'amidon mais pas l'urée.

Tableau 16: Utilisation des sources de carbone et d'azote par la souche C3

Sources de carbones et d'azotes	souche C3
Saccharose	(+)
D-fructose	(-)
L-arabinose	(-)
D-glucose	(+)
D-xylose	(-)
L-inositol	(+)
Lactose	(+)
D-mannitol	(+)
Cellulose	(+)
Raffinose	(+)
Rhamnose	(-)
Acétate de sodium	(-)
Maltose	(+)
Galactose	(-)
Sérine	(+)
Cystéine	(+)
Arginine	(-)
Histidine	(-)
Méthionine	(+)
Proline	(+)
Valine	(-)
Nitrate de potassium	(-)

(Partie 3) DISCUSSION

Contrairement aux méthodes d'identification traditionnelles des actinomycètes, qui sont lentes, laborieuses et très coûteuses, les approches moléculaires de l'identification sont souvent utilisées pour leurs rapidité et efficacité (**Provost, 1997, Labeda, 2000,**

Cook, 2003). Le gène ADN_r 16S utilisé pour l'identification moléculaire des bactéries est un gène chromosomique présent chez toutes les espèces bactériennes (gène universel) 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. Le résultat d'identification par amorces universelles obtenu pour la souche C3, présente une ambiguïté entre *Streptomyces himgiriensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces lavendulae*, et *Streptomyces subrutilus* avec un même pourcentage d'homologie de 99%. Le résultat est le même pour la souche 30 où une incertitude est observée entre *Streptomyces caviscabies*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces setonii* avec un pourcentage identique de 100 %. Les amorces utilisées dans cette étude, indiquent l'appartenance des deux souches d'actinomycètes C3 et 30 au genre *Streptomyces*. L'identification au niveau de l'espèce des deux souches est cependant incertaine. Les amorces universelles, semblent suffisantes pour identifier les genres mais pas les espèces. Pour compléter l'identification des espèces de ces deux *Streptomyces* (30 et C3), nous avons procédé à une identification moléculaire en se basant sur l'étude d'environ 1400 pb du gène ARN 16S. Il en ressort après séquençage, que la **souche 30** est à 99% d'homologie similaire aux trois espèces précédemment décrites avec les amorces universelles, mais elle est également identique au même pourcentage de similitude à *Streptomyces flavogriseus*, *Streptomyces argenteolus* et *Streptomyces ornatus*. Pour la **souche C3**, le deuxième séquençage confirme sa ressemblance aux *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces subrutilus* et *Streptomyces virginiae* à 98 % de pourcentage d'homologie. Dans la dernière édition du Bergey manuel ces trois dénominations d'espèces sont rapportées comme étant des synonymes. La souche *S. lavendulae* a été décrite par Waksman et Curtis en 1916, l'espèce type est sous le nom de code ATCC 8664. *S. subrutilus* a été classée par Arai, Kuroda, Yamagishi et Katch, 1964 sous le code ATCC 27467. *S. virginiae* est une souche découverte par Grundy, *et al.*, 1952, elle est référencée ATCC 19817. Les études morphologiques montrent que notre isolat C3 ressemble parfaitement à ces trois souches. Cependant, la comparaison de quelques caractères physiologiques et biochimiques, de la souche C3 avec *S. lavendulae*,

(Partie 3) DISCUSSION

ont permis de confirmer que la position taxonomique de notre isolat C3. En effet, plusieurs points de différences existent entre *S. lavendulae* et l'isolat C3. Citons par exemple l'utilisation du sucre Mannitol, elle est positive chez la souche C3 contrairement

à *S. lavendulae*. (**Tab. 16**). En plus, Un pigment soluble jaune est produit par l'espèce C3, il est absent chez *S. lavendulae*. Une clé d'identification basée sur l'utilisation des sucres utilisée dans les travaux de **Pridham et Gottlieb, 1948**, permet également de confirmer la non ressemblance de ces deux souches. D'après cette clé, le Rhamnose et le Raffinose ne sont pas utilisés par *S. lavendulae*, alors que chez l'isolat C3, la réponse vis à vis de ces deux sucres est différente. Elle est positive pour le Raffinose et négative pour le Rhamnose (**Tab. 16**). D'après l'étude de ces caractères discriminants, nous pouvons affirmer que l'isolat C3 est différent de la souche *S. lavendulae*.

Pour la **souche 30** et d'après une étude récente de **Liu et al., (2005)**, *S. argenteolus*, *S. caviscabies* (Goyer et al. 1996) *S. setonii* (Millard and Burr 1926) Waksman 1953 et *S. griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948, sont identiques du point de vue génomique et se ressemblent également par leurs propriétés phénotypiques. Elles sont reclassées et font dorénavant partie de l'espèce *S. griseus*. La souche 30 diffère de *S. griseus* en trois points : Elle pousse bien à 45°C, n'utilise pas le Rhaffinose et produit le pigment mélanoïde. L'espèce *S. flavogriseus* (Duché 1934, CBS 101.34), ne produit pas de pigment mélanoïde, contrairement à l'isolat 30. Concernant la souche *S. ornatus* elle est aussi classée synonyme de *S. griseus* (**Okanishi et al., 1972**). Ces résultats s'accordent parfaitement avec les travaux **Goodfellow (2004)** et de **Liu et al., (2005)**. L'auteur recommande de considérer à la fois les aspects génétiques et phénotypiques pour confirmer l'identification des actinomycètes.

Dans cette étude, il apparaît clairement que l'identification moléculaire par amplification d'un fragment de 400 pb de l'ADNr 16S en utilisant des amorces universelles, n'est nullement sans importance. Cette méthodologie est facile, rapide et permet de réduire considérablement les tests phénotypiques en se limitant à quelques caractères discriminants pouvant départager et identifier les espèces d'actinomycètes.

(Partie 3) DISCUSSION

Cette approche nous paraît très indiquée l'ors d'un criblage rapide d'un grand nombre de souches afin d'identifier les genres d'actinomycètes présents dans les différents échantillons.

L'amplification d'un fragment important ou de la totalité du gène ARN 16 S peut ou ne pas conduire à enlever toutes les ambiguïtés d'identification des espèces d'actinomycètes.

(Partie 3) CONCLUSION

D'après les résultats obtenus dans ces investigations, la PCR universelle conduit à identifier les deux souches actives, comme étant des *Streptomyces*. La PCR reposant sur

l'amplification de presque tout le gène codant pour l'ARN 16 S, ainsi que les caractères phénotypiques essentiels confirme qu'il s'agit bien de deux *Streptomyces*. Cependant, tous ces mêmes caractères ne permettent pas d'assimiler nos deux isolats à aucune des espèces actinomycètes connues à ce jour. Il semble donc très plausible, que nos deux actinomycètes soient de nouvelles souches. L'hybridation ADN-ADN entre nos souches (30 et C3) et les souches de références présentant les mêmes ressemblances moléculaires est nécessaire pour permettre une confirmation de leur appartenance taxonomique.

(Partie 4) INTRODUCTION

Les polyènes sont des macrolides comportant un cycle lactone et une chaîne carbonée avec des doubles liaisons conjuguées. Afin de confirmer la nature polyénique ou

non polyènique des molécules antifongiques produites par les bactéries actinomycétales, trois critères de détermination de cette nature sont utilisés par plusieurs auteurs (**Hacène et al., 1994, Hilali et al., 2002, Lemriss et al., 2003**). Le premier critère est l'activité contre les bactéries. En effet, les polyènes agissent contre les stérols membranaires et l'action des molécules produites contre les membranes bactériennes réputées sans stérols, nous oriente vers la possibilité que ces substances bioactives sont de nature non polyènique. Le second critère est l'inhibition de l'activité antifongique par la présence d'ergostérol dans le milieu. Ce critère nous informe, si le diamètre d'inhibition de l'activité antifongique diminue en présence d'un apport exogène en ergostérol dans le milieu de culture, que les molécules produites sont de nature polyènique. Si par contre, les diamètres d'inhibition ne changent pas, cela implique que les stérols ne sont pas la cible de ces substances actives et sont par conséquent des molécules non polyéniques. Le dernier critère est l'analyse spectrophotométrique en lumière UV-visible des extraits actifs. Le spectre d'absorption enregistré en variant les longueurs d'ondes entre 200 et 500 nm montre des pics caractéristiques des molécules polyéniques.

(Partie 4) MATERIEL ET METHODES

1-Etude du spectre antibactérien des souches "30" et "C3" :

Les deux souches actinomycètes retenues ont été testées pour leur activité antibactérienne. Ces souches sont cultivées en stries serrées sur le milieu GLM et incubées

à 28°C pendant 7 jours. À partir de ces milieux, des cylindres d'Agar de 3 mm de diamètre sont prélevés à l'emporte pièce et déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries-tests. Les bactéries contrôles, proviennent de l'American Type culture collection (ATCC), il s'agit de deux bactéries à Gram positif : *Streptococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* Mu 50 et de deux autres à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 13315. Ces souches sont ensemencées par inondation après culture à 37°C pendant 18 heures sur bouillon nutritif (**annexe**). Les boîtes sont placées à 4°C pendant 4 heures pour une bonne diffusion de l'agent antibactérien puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les diamètres des zones de lyses sont mesurés à l'aide d'une règle (**Lemriss, 2003**).

2-Etude de l'action de l'ergostérol sur l'activité antifongique :

Les deux actinomycètes retenus, ainsi que deux souches témoins (*Streptomyces noursei* NRRL B-1714 et *Streptomyces nodosus* NRRL B-2371 produisant deux antifongiques de nature polyénique très connus et qui sont, respectivement, la nystatine et l'amphotéricine B), sont ensemencés en surface par stries serrées sur milieu GLM puis incubées pendant 7 jours à 28°C. A l'aide d'un emporte pièce, des disques d'Agar d'environ 3 mm de diamètre contenant la culture des souches ont été recueillis de chaque culture. Deux lots de boîtes de Pétri sont préparés, le premier lot est composé de boîtes de milieu Casitone ensemencé dans la masse par *Aspergillus niger* ATCC 16404 et contenant 50 µg/mL d'ergostérol. Le second est constitué de boîtes de milieu Casitone sans ergostérol. Les disques d'Agar préparés, précédemment, sont déposés sur les deux types de boîtes, puis laissées à +4°C pendant 4 heures pour faciliter la diffusion des substances. Après incubation à 28°C pendant 48 heures, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle (**Hacène, 1994**).

(Partie 4) MATERIEL ET METHODES

3-Détermination du spectre UV-Visible des extraits actifs :

3-1- Culture des actinomycètes

Dans des Erlenmeyers de 250 mL de volume, une colonie de chaque souche d'actinomycètes estensemencée dans 50 mL du milieu GLM liquide. Les cultures sont incubées dans un bain-marie agité à 28°C pendant 48 heures. Ces cultures sont considérées comme pieds de cuve, elles sont entièrement versées dans un autre Erlenmeyer de 500 mL de volume contenant 200 mL du milieu GLM liquide. Ces nouvelles cultures sont, également, incubées dans un bain-marie agité à 28°C pendant 7 jours.

3-2- Extraction des produits actifs à partir du culot :

Les cultures sont centrifugées à 5000 g pendant 15 minutes, le mycélium présent dans le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile. Un volume du culot est traité pendant 12 heures environ, sous agitation à température ambiante, avec cinq volumes de méthanol. La solution obtenue est centrifugée à 5000 g pendant 5 minutes. Ces extraits méthanoliques sont concentrés sous vide à 40°C à l'aide d'un Rotavapor (**figure 13**).

3-3- Extraction des produits actifs à partir du surnageant :

Une batterie de solvants non miscibles à l'eau sont testés, afin de déterminer le ou les solvants capables de dissoudre les produits actifs présents dans le surnageant de chaque culture en Erlenmeyer. Les solvants testés sont les suivants : Le n-butanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'hexane, le dichlorométhane et le chloroforme.

Après séparation des phases dans les ampoules à décanter, les parties organiques et aqueuses obtenues pour chaque souche ont été concentrées par évaporation au Rotavapor à 40°C (**figure 14**). Ces extraits sont testés pour leur activité antibactérienne et antifongique par la technique des disques en papier.

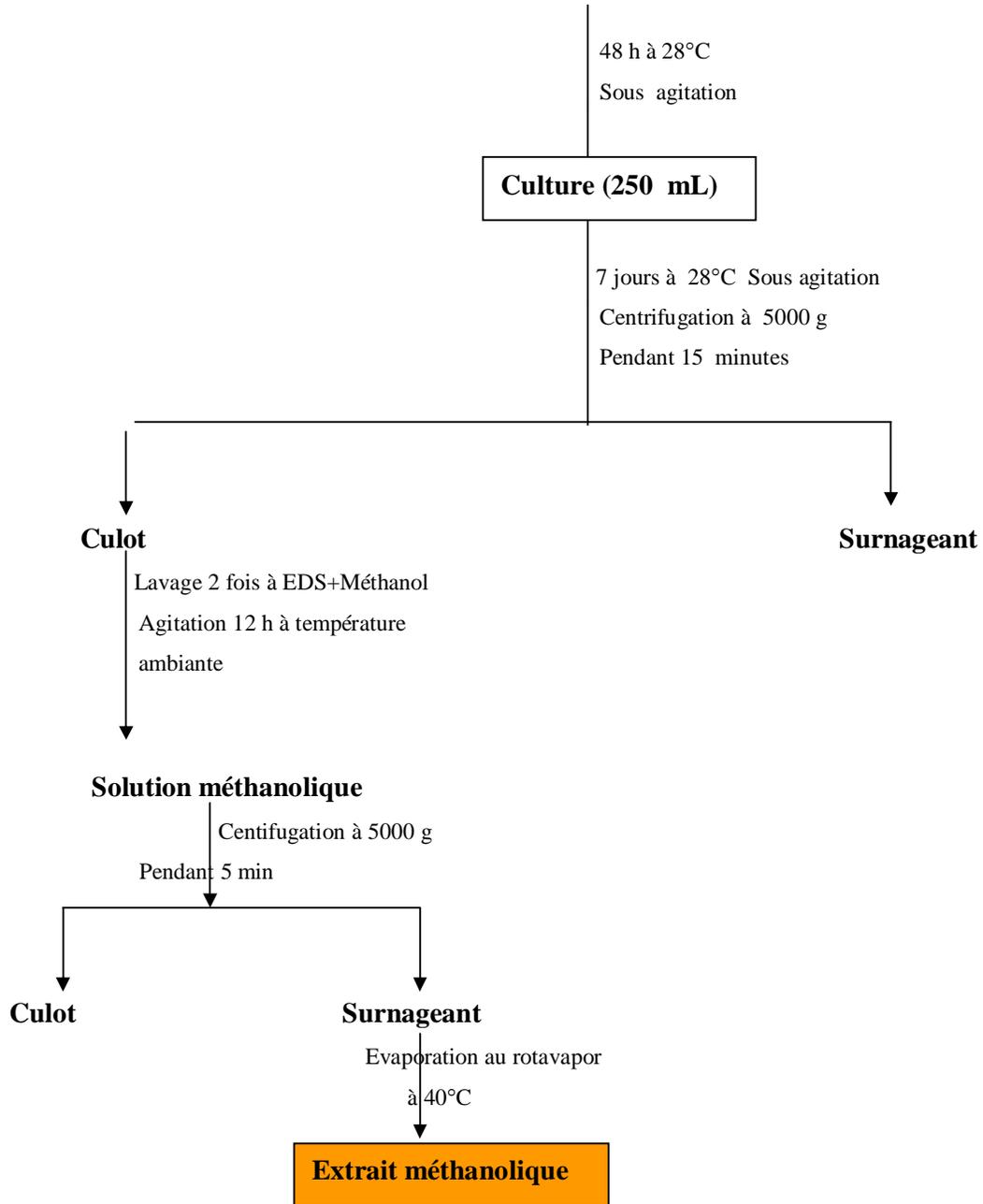


Figure 13 : Protocole d'extraction des produits actifs à partir du culot de la culture.

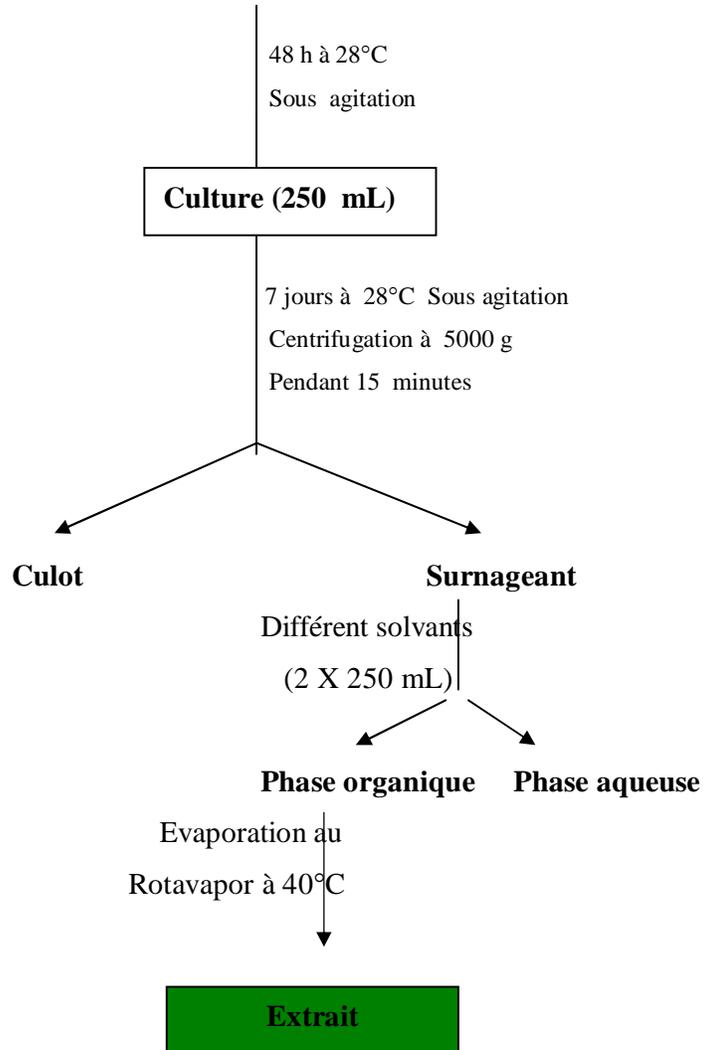


Figure 14 : Protocole d'extraction des produits actifs à partir du surnageant de culture.

3-4- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits

(technique des disques en papier)

Des disques en papier Wathman de (4mm de diamètre) sont imprégnés avec 15 µL de chaque extrait. Ces disques sont séchés à température ambiante, ensuite déposés à la surface du milieu Casitone, préalablement, ensemencé par les microorganismes tests.

(Partie 4) MATERIEL ET METHODES

et qui sont : *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* UMIP 1082.74, *Fusarium oxysporium* UMIP 625.72. Sur le milieu YMA les levures testées sont : *Candida*

albicans UMIP 48.72, *Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.81 (résistante à l'amphotéricine B et à la Nystatine). Sur le milieu Mueller Hinton les bactéries cibles testées sont : *Streptococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* Mu 50 (provenant de l'Hopital Juntendo, Tokyo Japon, résistante à la vancomycine), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 13315.

Les boîtes sont laissées à +4 °C pendant 4 heures, pour une bonne diffusion puis incubées à 28 °C pour les levures et les champignons et à 37°C pour les bactéries. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après 24 heures d'incubation pour les bactéries et les levures et après 48 heures pour *Candida tropicalis* R2 et les champignons filamenteux (**Lemriss, 2003**).

3-5- Etude du spectre d'absorption UV-Visible

Tous les extraits actifs (présentant une activité antimicrobienne) sont solubilisés dans le méthanol. Le spectre d'absorption de ces extraits, en lumière UV-Visible entre des longueurs d'ondes allant de 200 à 500 nm, a été effectué en utilisant un spectrophotomètre. Les résultats sont présentés sous forme de graphes en valeurs d'absorbance en fonction des différentes longueurs d'ondes (**Hacène, 1994 , Lemriss, 2003**).

(Partie 4) RESULTATS

1- Spectre antibactérien :

Les deux souches "30" et "C3" présentent une activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes testées (**Planches 5, 6, 7, et 8**).

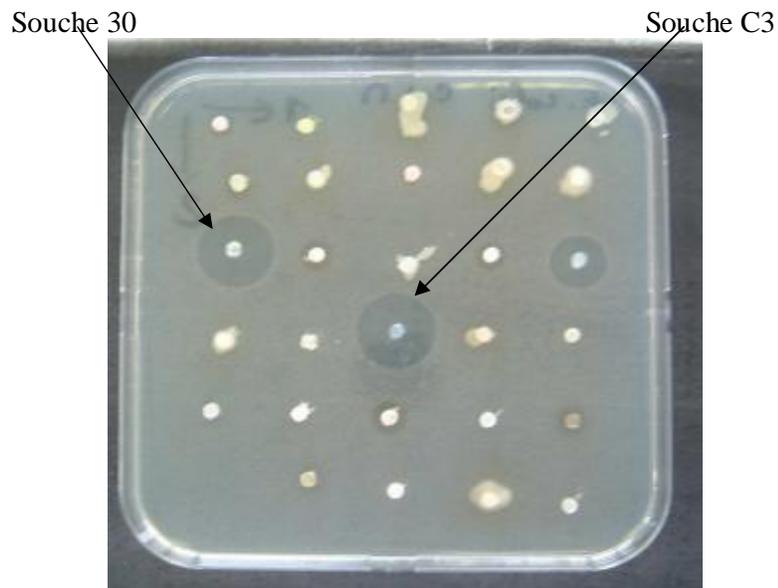


Planche 5 : Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton des souches 30 et C3 contre *E-coli* ATCC 25922

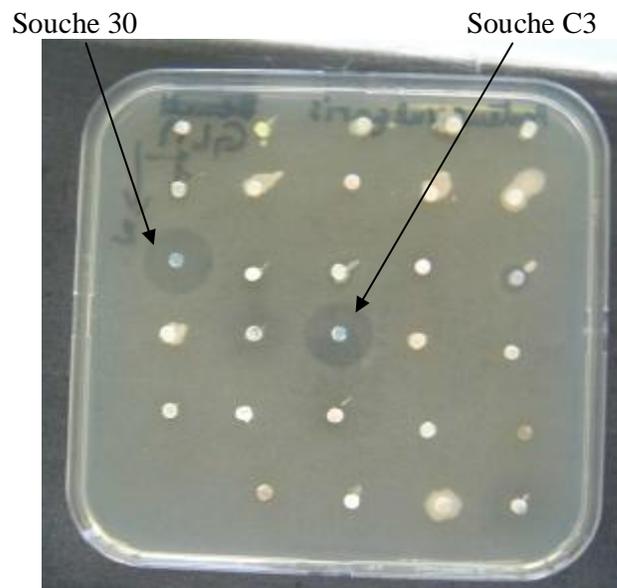


Planche 6 : Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton des souches 30 et C3 contre *Proteus vulgaris* ATCC 13315

(Partie 4) RESULTATS

Souche 30

Souche C3

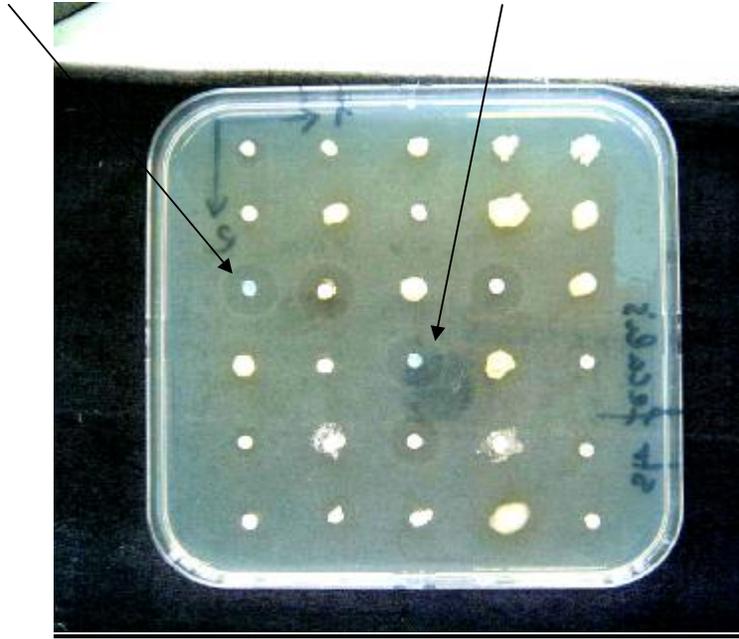


Planche7 : Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton des souches 30 et C3 contre *Streptococcus faecalis* ATCC 19433

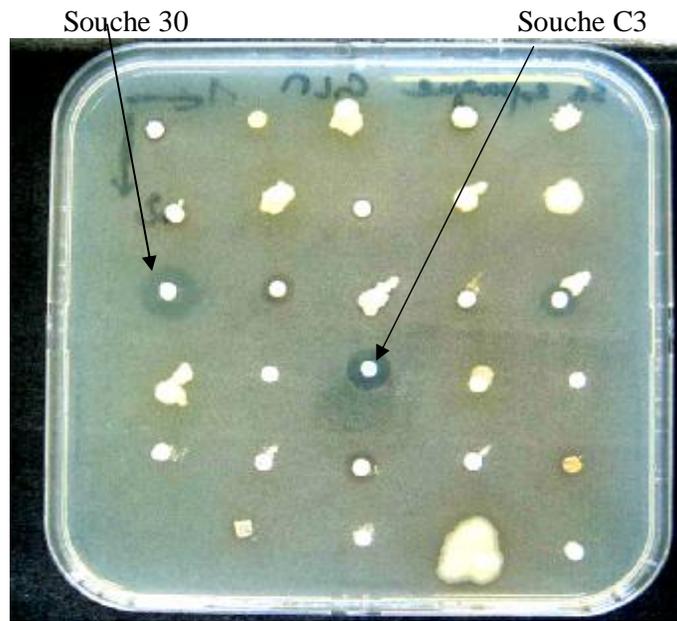


Planche 8 : Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton des souches 30 et C3 contre *Staphylococcus aureus* MU 50.

(Partie 4) RESULTATS

2- Effet de l'ergostérol :

L'ajout dans le milieu de culture d'une quantité d'ergostérol n'influe en rien sur le diamètre d'activité des zones de lyses de ces deux souches de *Streptomyces* 30 et C3 étudiées (**Tableau 17**). La souche 30 présente un diamètre de 20 mm en absence ou en présence de l'ergostérol. Le diamètre d'inhibition de la souche C3 est de 32 mm dans les deux cas de figure. Ces deux souches produisent donc des molécules antifongiques dont le spectre d'action n'agit certainement pas sur les stérols membranaires.

Tableau 17 : Diamètres d'inhibition de l'activité antifongique des souches 30 et C3, contre *Aspergillus niger* en présence et en absence d'ergostérol.

Souches actinomycètes	Diamètre d'inhibition milieu sans ergostérol (en mm)	Diamètre d'inhibition milieu avec ergostérol (en mm)
Souche C3	32	32
Souche 30	20	20

3- Activité antimicrobienne des extraits organiques :

Les extraits organiques obtenus à partir des cultures des souches 30 et C3 ont été tous testés pour leurs activités antifongique et antibactérienne. Certains n'ont montré aucune activité anticellulaire, d'autres sont actifs. À partir de la culture de la souche 30, trois extraits actifs ont été obtenus : **EM-30** est obtenu par extraction avec le méthanol, **EDM-30** provient de l'extraction avec le dichlorométhane et le **EH-30** est une fraction d'origine hexanique. À partir de la culture de la souche C3, deux extraits, seulement, sont actifs. Il s'agit du **EM-C3** qui est obtenu après extraction par le méthanol et le **EAE-C3** qui correspond à l'extraction par de l'acétate d'éthyle (**Tab. 18 et 19**). Les résultats de l'effet inhibiteur de ces fractions sur les différents champignons, levures et bactéries sont présentés dans **les tableaux 18 et 19**.

(Partie 4) RESULTATS

Tableau 18 : Activité antifongique des extraits organiques des cultures des souches 30 et C3.

Extrait actif	<i>A.niger</i> ATCC 16404	<i>A.fumigatus</i> UMIP 1082.74	<i>F.oxysporium</i> UMIP 625.72	<i>C.albicans</i> UMIP 4872	<i>C.tropicalis</i> UMIP 1275.81
EM-C3	+	+	+	+	+
EAE-C3	+	+	+	+	+
EM-30	+	-	-	+	+
EDM-30	+	-	-	+	+
EH-30	+	-	-	+	+

Tableau 19 : Activité antibactérienne des extraits organiques des cultures des souches 30 et C3.

Extrait actif	<i>Str.feacalis</i> ATCC 19433	<i>St.aureus</i> (<i>Mu</i> 50)	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>Pr.vulgaris</i> ATCC 13315
EM-C3	+	+	+	+
EAE-C3	+	+	+	+
EM-30	+	+	+	+
EDM-30	+	-	-	+
EH-30	+	-	-	+

4- Etude du spectre d'absorption UV-Visible

* Souche 30

L'analyse des spectres UV-visible des extraits organiques actifs de la souche 30 sont présentés dans **la figure 15**.

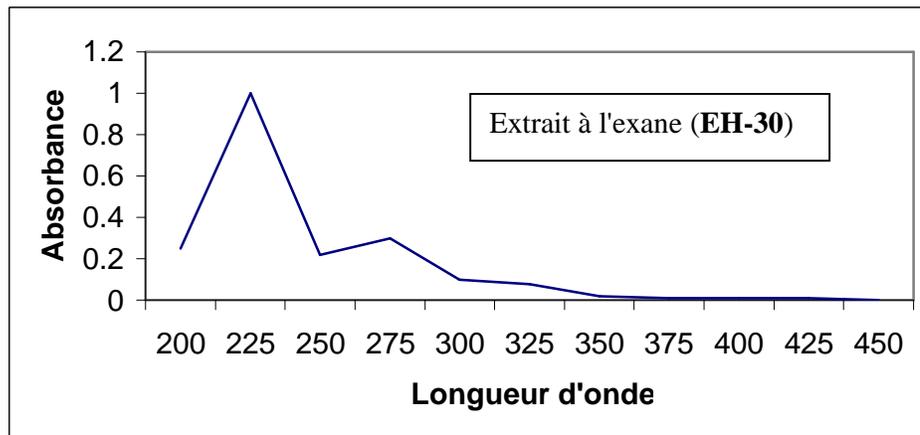
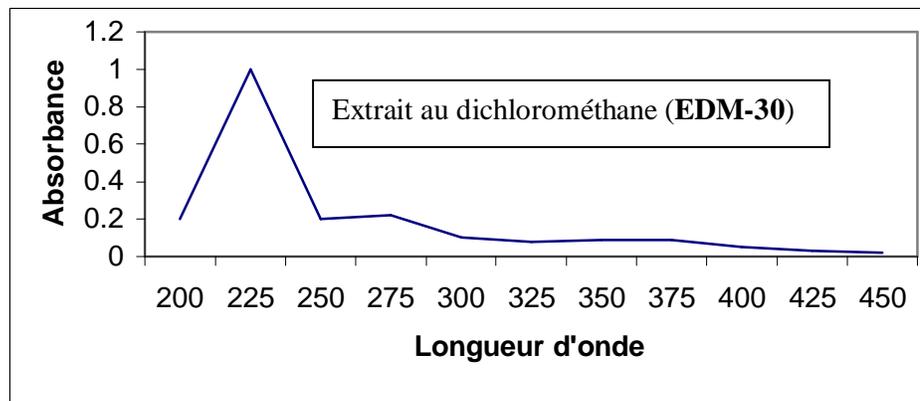
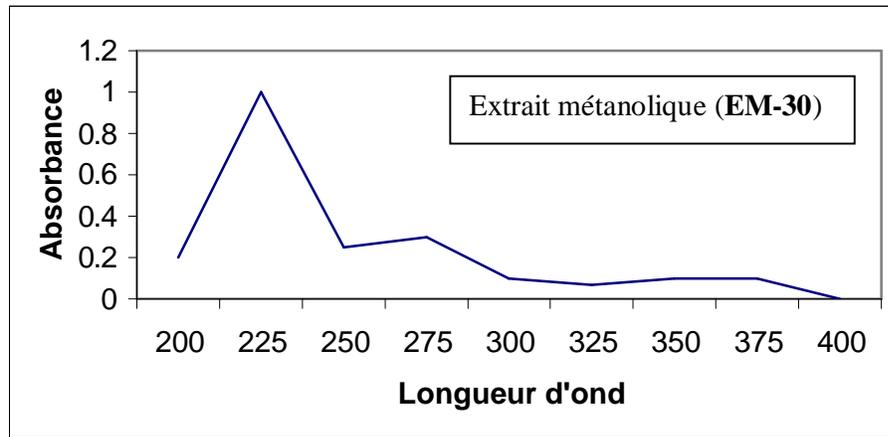


Figure15 : Spectre d'absorption UV-Visible des extraits actifs de la souche 30

Les spectres d'absorption des extraits organiques actifs de la souche C3 sont présentés dans la **figure 16**.

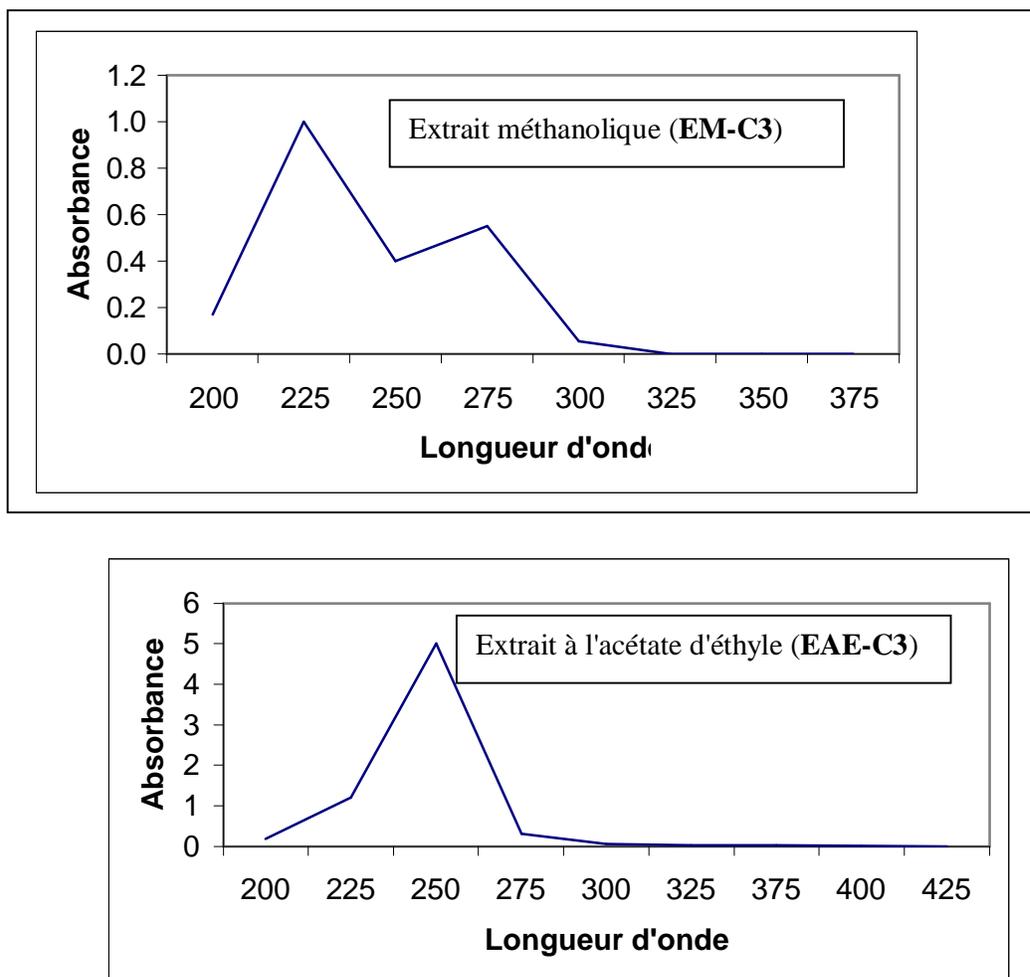


Figure 16 : Spectre d'absorption UV-visible des extraits provenant de la souche *Streptomyces sp* (C3).

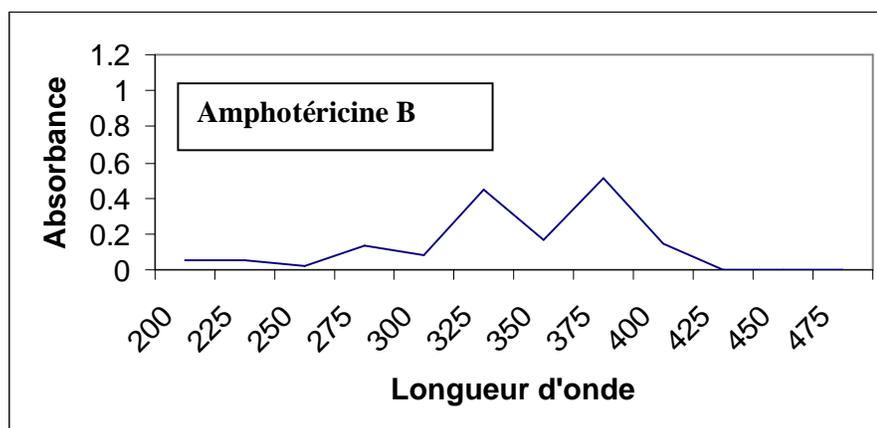


Figure 17 : Spectre d'absorption UV-Visible de l'amphotéricine B

Tous les spectres d'absorption UV-Visible des extraits organiques actifs des deux souches sélectionnées ne ressemblent pas au spectre d'absorption de l'amphotéricine B pris comme témoin.

Les deux souches , la « 30 » et la « C3 » présentent une **activité antibactérienne importante** contre toutes les bactéries testées. Ces bactéries cibles utilisées dans cette étude sont des souches pathogènes, il s'agit de deux Gram + et deux Gram-. Cette action antibactérienne, est d'une importance certaine, car les molécules produites par ces deux microorganismes peuvent être de nature non polyénique. En effet, Le **mode d'action de ces substances est différent de celui des polyènes**, ces derniers agissent uniquement contre l'ergostérol, composant membranaire majeur des champignons, alors que les bactérie en sont généralement dépourvues. D'après les résultats obtenus, il apparaît claire que ces **molécules n'agissent pas contre l'ergostérol** et peuvent par conséquent, être de nature non polyénique. Les deux autres tests à savoir l'effet de l'ergostérol et le spectre UV-visible confirmeront cette structure chimique.

L'action positive de nos deux actinomycètes vis à vis de *Staphylococcus aureus* Mu 50 (souche résistante isolée de l'Hopital Juntendo au Japon) attire notre attention. Une étude mérite selon nous, d'être approfondie dans des travaux avenir. Ce genre de bactéries dites « Superbugs », sont redoutables dans les hopitaux et causent des infections nosocomiales mortelles. En effet, la vancomycine considérée comme la molécule de dernière ligne dans le traitement des infections staphylococciques devient dans ces cas inactive. Des travaux récents, publiés dans la revue Nature, révèlent la découverte d'une nouvelle classe d'antibiotique dont la platensimycine, active contre ce Staphylocoque (**Wang, 2006**). Cet antibiotique est produit à partir d'une nouvelle souche de *Streptomyces platensis* isolée du sol de l'Afrique du sud.

Le test de l'effet de l'ergostérol est en faveur de la nature non polyénique des molécules produites par les souches « 30 » et « C3 ». Le spectre UV- Visible de tous les extraits actifs ne ressemble pas à celui de l'amphotéricine B pris comme témoin et confirme sans aucun doute que **nos deux isolats produisent des molécules non polyéniques**.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Les sols arides et semi arides du Sud Algérien **sont peuplés de bactéries actinomycétales**. La région de Batna offre le plus grand nombre d'actinomycètes isolés, par rapport à tous les autres sols testés dans cette étude. les actinomycètes semblent beaucoup plus présents dans **les sols rhizosphériques** que dans les sols non rhizosphériques.

D'après cette étude, il a été démontré que l'isolement sélectif des actinomycètes à partir de ce type d'échantillon est favorisé par **le non traitement des échantillons de sol à la chaleur**, car il réduit la flore bactérienne contaminante mais aussi la flore actinomycétale. L'emploi des antibactériens à **large spectre est inutile**, l'**acide nalidixique à 10 µg/mL** agit contre les bactéries Gram négatives et favorise les actinomycètes. **La Nystatine** additionnée dans le milieu d'isolement à raison de **50 µg/mL est indiquée** également. le **GLM est le milieu de choix** pour l'isolement des actinomycètes à partir de ce type de sol.

171 souche actinomycétales ont été isolées et purifiées dans cette étude. Parmi cette microflore, 17 souches soit **10 % de cette population** ont montré des activités antifongiques contre au moins un champignon test. Ce faible pourcentage est similaire à plusieurs travaux de screening antécédents.

Deux souches dénommées **30 et C3** ont présenté une activité antifongique marquée contre la plus part des champignons filamenteux et levures tests utilisés dans cette étude. Ces isolats, ont montré une activité antifongique très importante car ils sont actifs **contre *Candida tropicalis* R2**. Cette levure résistante aux deux antifongiques polyènes très utilisés en médecine humaine à savoir l'amphotéricine B et la nystatine. Pour leur importance, ces deux souches actives ont été sélectionnées pour une identification.

L'identification de ces deux isolats a été réalisée par outil moléculaire en se basant sur l'amplification par PCR **de l'ADN 16S**. Des amorces universelles et d'autres dites SQ1-SQ6, ont été utilisées dans cette étude. Après comparaison des séquences d'ADN avec la banque de données « Gen-banque », les deux souches ont été assimilés au **genre**

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Streptomyces avec des pourcentages d'homologies de 99 à 100 %. Tous les caractères **phylogénétiques et phénotypiques** de nos deux souches, ne permettent pas de les assimiler à aucune des espèces connues à ce jour, ce sont **fort probablement des souches nouvelles**. Des tests génétiques plus rigoureux comme l'hybridation ADN/ADN, doivent être utilisés pour pouvoir proposer ces souches comme étant nouvelles.

D'après certains auteurs, les ressources en molécules d'intérêts pharmaceutiques à partir des *Streptomyces* ont été largement exploitées et ils affirment qu'il faut s'orienter vers l'isolement des actinomycètes rares afin de s'alimenter en substances nouvelles (Shearer, 1997, Ouhdouche, 2001, Lamari *et al.*, 2002, Zakharova, 2003, Zitouni *et al.*, 2005). En parallèle, plusieurs laboratoires se sont lancés dans des screening de toute la flore actinomycétale sans écarter les *Streptomyces*. Leurs travaux ont aboutis à des résultats très satisfaisants permettant l'obtention de plusieurs molécules très intéressantes à partir des *Streptomyces* (Hwang, 2001, Woo, 2002, Hayakawa, 2004). Il semble donc que le genre *Streptomyces* n'a pas encore épuisé ces ressources et continue même très récemment à offrir des antibiotiques et divers substances pharmaceutiques très intéressantes (Duangmal *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2006, Hu *et al.*, 2007, Boramore *et al.*, 2007).

L'activité des deux souches de *Streptomyces* isolées **contre *Candida tropicalis* R2**, est d'une importance capitale dans nos investigations. D'après les résultats obtenus, les molécules biosynthétisées, n'attaquent pas les stérols membranaires comme les polyènes. Cela s'explique par le fait que leur activité antifongique n'est pas affectée par la présence ou l'absence de **l'ergostérol** dans le milieu et que **l'activité contre les bactéries** (où les stérols sont absents dans la membrane) est également présente. Le **spectre d'absorption UV-visible** est différent de celui de l'amphotéricine B (représentant incontesté des antifongiques polyéniques pris comme témoin). Les deux souches produisent donc des **antifongiques puissants de nature non polyénique**.

Ces résultats sont d'après nous d'une **grande importance**, ils peuvent contribuer à renforcer et à enrichir le pauvre arsenal antifongique qui existe à ce jour, et dont il a du mal à contrecarrer le développement de la résistance des champignons pathogènes et à la recrudescence d'agents fongiques redoutables. Des études complémentaires comme

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

l'analyse du spectre de résonance magnétique nucléaire, spectre infrarouge, HPLC, tests de toxicité in vitro et in vivo aideront certainement à atteindre le fastidieux dernier stade avant la mise au point finale **de ces molécules prometteuses.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGATE A.D., BHAT J.V., (1963). A method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **29**: 297-304.

AINSWORTH G.C.(ed). (1973). *The fungi, an advance treatise*. Academic. Press. New York. N.Y.

AINSWORTH G.C., (1986). *Introduction to the history of medical and veterinary mycology*. University Press. Cambridge.

ALBENGRES E., LOUET H., TILLEMENT J.P. (1998). Drug interactions of systemic antifungal agents. *Drug Safety*. **18**: 83-97.

AMPEL N.M., (1996). Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. *Emerging Infect. Dis.* **2(2)**: 109-116.

ANAISSE E.J., DAROUICHE R.O., ABI- SAID D., *et al.*, (1996). Management of invasive candidal infections : results of a prospective, randomized, multicenter study of fluconazole versus amphotericin B and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **23** : 964-72.

ASCIOGLU S., REX J.H., DE PAUW B., *et al.*, (2002). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplantants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis.* **34**: 7-14.

ARATHOON E.G., GOTUZZO E.G., NORIEGA L.M., *et al.*, (2002). Randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis. *Antimicro. Agents. Chemother.* **46**: 451-7.

ATHALYE M., LACEY J., GOODFELLOW M., (1981). Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* **51**: 289-297.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARAKATE M., OUHDOUCH Y., OUFDOU K.H. BEALIEU C., (2002). Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats, and their antimicrobial activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 49-54.

BATES D.W., SU L., YU D.T., *et al.*, (2001). Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int.* **60**: 1452-93.

BENZ F., KNUSEL F. NUESCH J., TREICHLER H., VOSER W., (1974). Echinocandin B, ein neuartiges polipeptid- antibiotikum aus *Aspergillus nidulans* var. *Echinatus*. Isolierung und bausteine. *Helv. Chim. Acta.* **57**: 2459-2477.

BODEY G, BUELTMANN B, DUGUID W, *et al.*, (1992). Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **11** : 99-109.

BOIRON P., (1994). Cryptococcus et cryptococose. *Option/Bio*, N°122:I-VII.

BOIRON P., (1998). Le point sur les infections rares. *Option/Bio*, N°219 : 1-4.

BOIRON P., (1999). Etude des infections fongiques : des avancées multiples. *Option/Bio*, N°238 : 4-5.

BOIRON P., (2000). Les antifongiques s'engagent dans de nouvelles voies thérapeutiques. *Option/Bio*, N°251 : 4-5.

BORAMORA A., ATTILI A., ARENGHI F., *et al.*, (2007). A novel chimera : "the truncated hemoglobin-antibiotic monooxygenase" from *Streptomyces avermitilis*. *Gene*, **393** : 52-61.

BOUDEMAGH A., KITOUNI M., BOUGHACHICHE F., HAMDIKEN H., OULMI L., REGHIOUA S., ZERIZER H., COUBLE A., MOUNIEE D., BOULAHROUF A. et BOIRON P., (2005). Isolation and molecular identification of actinomycetes microflora of

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

some saharian soils of South-East Algeria (Biskra, El-Oued and Ouargla). Study of antifungal activity of isolated strains. *Journal of Medical Mycology*. **15**, 39-44.

BOW E.J., LOEWEN R., CHEANG M.S., *et al.*, (1997). Cytotoxic therapy- induced D-xylose malabsorption and invasive fungal infection during remission-induction therapy for acute myeloid leukemia in adults. *J. Clin. Oncol.* **15** : 2254-61.

BRADBURY B.D., JICH S.S., (2002). Itraconazole and fluconazole and certain rare serious adverse events. *Pharmacotherapy*. **22(6)**:697-700.

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

CASTELLANI A., (1928). The treatment of epidermohytosis of the toes (mango toe) and certain forms of epidermophytosis by fuchsin paint. *Lancet*. **2**: 595-596.

CAVALA M., EBERLIN T., (1994). Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron*. **4**: 13-7.

CHERIN P., (1998). Abelcet: Structure, intérêt thérapeutique, stratégies d'utilisation. *La lettre de l'infectiologue*. **13** : 31-6.

COOK AE, MEYERS R., (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Inter J Syst and Evol Microbiol*. **53**:1907-15.

COX G. et PERFECT J. (1993). Fungal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis*. **6** : 422-426.

CRAWFORD D.L., LYNCH J.M., WHIPPS J.M., OUSLEY M.A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol* **59**:3899-905.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CROLL A.H., PISCITELLI S.V., WALSH T.J. (2001). Antifungal pharmacodynamics : Concentration effect relationship in vitro and in vivo. *Pharmacotherapy*. **21(12)**: 1335-1485.

CROLL A.H., WALSH T.J. (2002). Invasive fungal infections in the neutropenic cancer patient: Current approaches and future strategies. *Infect. Med.* **19(7)**: 326-334.

CROSS T., (1982). Actinomycetes a continuing source of new metabolites. *Development in industrial Microbiology*. **23**: 1-8.

CROSS T., (1994). The actinomycetes groups. In : HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T., WILLIAMS S.T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9^{ème} édition Williams et Wilkins. Baltimore.

DAVET P., ROUXEL F., (1997). Détection et isolement des champignons du sol. *Techniques et pratiques*, INRA (ed.). 203 p.

DAVIES F.L. et WILLIAMS S.T., (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 1/ The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* **2**: 227-238.

DE BEULE K., VAN GESTEL J. (2001). Pharmacology of itraconazole. *Drugs*. **61**: 27-37.

DENDIEVEL J., AUBRY P., (2006). Mycétome fongique à *Exophiala janselmei* : à propos d'un cas dépisté à Mayotte. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **99**: 72-77.

DENING D.W., (2002). Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 889-91.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DICK O., ONKEN U., SATTLER I. ZEECK A., (1994). Influence of increased dissolved oxygen concentration on productivity and selectivity in cultures of a colobamycin-producing strain of *Streptomyces griseoflavus*. *Appl Microbiol Biotech.***4**:373-7.

DISMUKES W.E. (2000). Introduction to antifungal drugs. *Clin. Infect. Dis.* **30**: 653-7.

DUANGMAL K., WARD A.C., GOODFELLOW M., (2005). Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceruber* clade from soil. *FEMS Microbiology Letters.* **245**: 321-327.

DULANEY E.L., LARSEN A.H. et STALEY E.O., (1955). A note on the selective isolation of microorganisms from natural sources. *Mycologia.* **47**: 420- 422.

EL-NAKEEB M.A., LECHEVALIER HA., (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol.* 75-7.

ELLIS M.E., AL-HOKAIL A.A., CLINK H.M. *et al.*, (1992). Double-blind randomized study of the effect of infusion rates on toxicity of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemoter.* **36**: 172-9.

ERIKSSON U., SEIFERT B. SCHAFFNER A., (2001). Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomised controlled trial. *BMJ*, **322**:579-82.

ERNEST E.J. (2001). Investigational antifungal agents. *Pharmacotherapy.* **21**:165S-174S.

ESPINEL-INGROFF A., (1998). Comparison of in vitro activities of the new azoles SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2950-6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FABER K.K., DICKEY L.B., (1925). The treatment of thrush with gentian violet. Am. J. Dis. Child. **34**: 408-417.

FIEDLER H.P., SCHUZ T., DECKER H., (1993). An overview of nikkomycins; history, biochemistry, and applications. In "cutaneous antifungal agents" (Rippon J.W., Fromfling R.A., eds) Marcel Dekker, New York, pp 325-352.

FINANCE C., OUHDOUCHE Y., JAQUES A., BONALY R., (1985). Nouvelles substances à action antifongique produites par des souches d'actinomycétales isolées à partir des milieux naturels. Ana. Biol. Clin (Paris). **43**: 652.

FLEMING R.V., KANTARJIAN H.M., HUSNI R. *et al.*, (2001). Comparison of amphotericin B lipid complex (ABLCL). Ambisome in the treatment of suspected or documented fungal infections in patients with leukemia. Leuk. Lymphoma. **40 (5-6)**: 511-20.

FRANCIS P., WALSH T.J., (1992). Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics and antifungal therapy. Clin. Infect. Dis. **15**: 1003-18.

GALLIS H.A., DREW R.H., PICKARD W.W. *et al.*, (1990). Amphotericin B: 30 years of clinical experience. Rev. Infect. Dis. **12**: 308-29.

GENTIES J.C., (1958). Experimental ringworm in guinea pigs : oral treatment with griseofulvin. Nature, **182**: 476-477.

GODEFROI E.F., HEERES J. VAN- CUTSEM J., JANSSEN P.A.J., (1969). The preparation and antimycotic properties of 1-phenethyl imidazole. J. Med. Pharm. Chem. **12**: 784-791.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GOLD W., STOUT H.A., PAGANO J.S., DONOVICK R., (1956). Amphotericin A and B: antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Annu.* **56**: 579-586.

GOODFELLOW M. et WILLIAMS S.T., (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 189-216.

GOODFELLOW M. et HAYNES J.A., (1983). Actinomycetes in marine sediments. pp: 453-472. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. et Yakoleff V. (ed.), *Biological, biochemical and biochemical aspect of actinomycetes*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.

GOODFELLOW M, JONES AL, MALDONADO LA, SALANITRO J. (2004). *Rodococcus aethrivorans* sp. Nov., a new species that contains methyl-t-butyl ether degrading actinomycetes. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**:61-5.

HACENE H., SABAOU N., BOUNAGA N., LEFEVRE G., (1994). Screenig for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbios.* **79**:81-5.

HAQUE SF, SEN SK, PAL SC. (1995). Nutrient optimisation for production of broad spectrum antibiotics by *Streptomyces antibioticus* Sr 15.4. *Acta Microbiol. Hung* **42**:155-62.

HARBARTH S., BURKE J.P., LLOYD J.F., *et al.*, (2002). Clinical and economic outcomes of conventional amphotericin B- associated nephrotoxicity. *Cli. Infect. Dis.* **35**: 120-127.

HARTMAN P.G., POLAK A., (1993). The action of amorolfine: from molecule to cell. In "Cutaneous antifungal agents" (Rippon J.W., Fromlting R.A., eds). Marcel Dekker, New York. 27-36.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HAYAKAWA M., YOSHIDA Y., LIMURA Y., (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. J.Appl. Microbiol. 1-9.

HAZEN E.L., BROWN R., (1950). Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. Proc. Soc. Exp. Biol., (NY). **76** : 93-97.

HERBRECHT R., AUVRIGNON A., ANDERS E., *et al.*, (2001). Efficacy of amphotericin B lipid complex in the treatment of invasive infections in immunosuppressed paediatric patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **20** : 77-82.

HIEMENZ J.W., WALSH T.J., CAPIZZI R.L., R.L., (1996). Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. Clin. Infect. Dis. **22** Suppl 2 : S133-44.

HILALI L, KHATTABI A, NSSARLAH N, MALKI A, FINANCE C., (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel Marocain. Rev Biol Biotech. **2**:49-53.

HILDIK-SMITH G., Blank H., SARKANY I., (1964). Fungus diseases and their treatment. Little, Brown, Co., Boston U.S.A., 370-377.

HOANG A.T. (2001). Caspofungin acetate: An antifungal agent. Am. J. Health-Syst. Pharm. **588**: 1206-14.

HOLDING K.J., DWORKIN M.S., WAN P.C. *et al.*, (2000). Aspergillosis among people infected with human immunodeficiency virus. Incidence and survival adult and adolescent spectrum of HIV disease project. Clin. Infect. Dis. **31**: 1253-7.

HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALY J.T. et WILLIAMS S.T., (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9^{ème} édition. The Williams and Williams Co. Baltimore.

HSU S.C., LOCKWOOD J.L., (1975). Powder chitin agar as selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol. Technol.* **66**: 559-565.

HU Y., PHELAU V., NTAI I., *et al.*, (2007). Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuinus*. *Chimistry et biology.* **14** : 691-701.

HWANG BYUNG KOOK LIM SONG WON *et al.*, (2001). Isolation and in vitro and in vivo antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Envir. Microbiol.* **67**: 3739-3745.

JANSSEN J.J., STRACK VAN SCHIJNDEL R.J., VAN DER POEST CLEMENT E.H., *et al.* (1996). Outcome of ICU treatment in invasive aspergillosis. *Intensive Care Med;* **22** : 1315-22.

JOHNSON L.B. et KAUFFMAN C.A., (2003). Voriconazol : a new triazole antifungal agent. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 630-7.

KHATTABI A., HILALI L., DARI K., ASSOBEI O., GAVINI F., (2002). Isolement de microorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. *Rev Biology Canada* **2**:28-32.

KERRIDGE D., WHELAN W.L., (1984). The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine: molecular actions and interactions. In “ Mode of action of antifungal agents” Cambridge University Press. Cambridge. 343-376.

KILLIAN CH. et FEHER D., (1939). Microbiology of desert soils. pp: 21-127. *Encyclopedie Biologique.*

KITOUNI M., BOUDEMAGH A., OULMI L., REGHIOUA S., BOUGHACHICHE F., ZERIZER H., HAMDIKEN H., COUBLE A., MOUNIEE D., BOULAHROUF A., et BOIRON P., (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from

water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal of Medical Mycology*. **15**,45-51.

KUMARASIGHE S.P., KUMARASINGHE M.P., (1999). Itraconazole pulse therapy in chromoblastomycosis. *Eur. J. Dermatol*; **10** : 220-222.

KUSTER E., WILLIAMS S.T., (1964). Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*. **202**: 928-929.

KYUNG MAN YOU and YONG KEUN PARK (1996). A new method for selective isolation of actinomycetes from soil. *Biotechnology Techniques*. **10**: 541-546.

LABEDA D.P., KROPPESTEDT R.M., (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Inter J Syst and Evol Microbiol*. **50**:331-36.

LACEY J., (1988). Actinomycetes in biodegradation and as pollutants of working environment. In: "Actinomycetes in biotechnology" (Goodfellow M., Williams S.T. et Mordarski M., coord). Ac. Press., London.

LAMARI L., ZITOUNI A., *et al.*, (2002). New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot*. **55**:696-701.

LARPENT J.P. et SANGLIER J.J., (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Ed. Masson, Paris 481 p.

LARPENT J.P., (1997). *Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire*. Lavoisier Tec-Doc. 1073p.

LECHEVALIER H.A. et LECHEVALIER M.P., (1967). Biology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol., **21**, 71-100.

LECHEVALIER H.A. et LECHEVALIER M.P., (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In: "Actinomycete taxonomy". (Dietz A. et Thayer D.W., Eds) pp : 226-291. Soc. Ind. Microbiol. SIM special publication n° 6. Arlington, Virginia, U.S.A.

LECHEVALIER M.P et LECHEVALIER H.A., (1970). Chemical composition as a criterion in the clasification of aerobic actinimycetes. Inter.J. Sys.Bacteriol. **20 (4)**,435-443.

LECHEVALIER M.P., (1988). Actinomycetes in agriculture and forestry. In: "Actinomycetes in biotechnology" (Goodfellow M., Williams S.T. et Mordarski M., coord). Ac. Press., London.

LEE JUNG YEOP et HWANG BYUNG KOOK, (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. **48**, 407-417.

LEMNOR L., VERON M., (1989). Bacteriologie médicale. 2 ème édition. pp 335-349.

LEMRISS S., LAURENT F., COUBLE A., CASOLI E., LANCELIN J.M., SAINTPIERRE-BONACCIO D., RIFALI S., FASSOUANE A., BOIRON P., (2003). Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Can J Microbiol **49**:669-74.

LIU ZHIHENG, SHI YANLIN, ZHANG YAMEI, ZHOU ZHIHONG, LU ZHITANG, LI WEI, HUANG YING, RODRIGUEZ C. GOODFELLOW M. (2005). Classification of the *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of *Microstreptospora cinerea* to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp.nov. IJSEM. **55**: 1605-1610.

LOMAESTRO B.M., (2001). Caspofongin: An Echinocandin antifungal for treatment of of invasive aspergillosis. *Formulary*. **36**: 427-36.

MARGET W., ADAM D., (1969). Erste Erfahrungen mit dem breibandantimykotikum bay b5097. *Med. Klim.* **64**: 1235-1239.

MARTY P., BRUN S., GARI-TOUSSAINT M., (2000). Les mycoses profondes tropicales. *Med. Trop.*, **60**, 28-290.

MC NEIL M.M., NASH S.L., HAJJEH R.A., *et al.*, (2001). Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in united states, 1980-1997. *Clin. Infect. Dis.* **33** : 641-7.

MASLIN J., MORAND J.J., CIVATTE M., (2001). Les chromomycoses (Chromoblastomycoses). *Med. Trop.* ; **61** : 459-461.

MASLIN J., MORAND J.J., CAMPARO P., (2003). Zygomycoses et Blastomycoses. *Méd. Trop.*, **63**, 23-27.

MASLIN J., MORAND J.J., MENARD G., CAMPARO P., (2002). Les cryptococcoses. *Med. Trop.*, **62**, 480-484.

MASLIN J., DEVELOUX M, (2004). Actualités thérapeutiques des mycoses rares en dehors des mycoses opportunistes. *Encycl. Med. Chir., Maladies infectieuses*, **8**, 603-20.

MEDOFF G., KOBAYASHIG.A., (1980). The polyènes. In ''Antifungal Chemotherapy''. (Speller D.C.E. ed). John Wiley & Sons. Ltd. Chichester. U.K. 3-33.

MIETH H., (1993). In vitro and in vivo activities of terbinafine in cutaneous antifungal agnts. (rippon J.W., Fromtling R.A., eds), Marcel Dekker, New York. 137-149.

MILLER J.J., HENKEN G., VAN VEEN J.A., (1989). Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Can J Microbiol.* **35**:656-60.

MONTRAVERS PH., CARGEAC A, REZZOUG A., (2003). Choix d'un antifongique
Conférences d'actualisation, p. 673-692.

MORA-DUARTE J., BETTS R., ROTSTEIN C., *et al.*, (2002). Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. Med.* **347**: 2020-9.

MULLER E. et LOEFFLER W., (1976). *Mycology : an outline for science and medical students.* G. Thieme Publisher. Stuttgart. Germany.

NOLLA-SALAS J, SITGES-SERRA A, LEON-GIL C, *et al.* (1997) . Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study Group of Fungal Infection in the ICU. *Intensive Care Med*; **23** : 23-30.

NOMURA H., OHARA Y., (1969). The distribution of actinomycetes, in soil. VI. A selective plate-culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. Part 1. *J. Ferment. Technol.* **47**: 463-469.

NONOMURA H., HAYAKAWA (1988). New methods for selective isolation of soil actinomycetes. In “ Okami y., Beppu T. and ozawara H., (ed.) *Biology of actinomycetes.* Japan scientific societies Press Tokyo. pp 288-293.

ODDS F. C., (1995). Les antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **10 (4)**, 285-293.

O'DONNELL A.G., (1988). Recognition of novel actinomycete. In Goodfellow M. Williams S.T., and Mordarski M. (eds.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press. London.

OKAMI Y., HOTT A., K., (1988). Search and discovery of new antibiotics. In “Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski M. (eds.) *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press. London. pp 33-67.

OKANISHI M., AKAGAWA H., UMEZAWA H., (1972). An evaluation of taxonomic criteria in streptomycetes on the basis of deoxyribonucleic acid homology. *J Gen Microbiol* **72**: 49–58.

OKI T., (1992). Pradimicin, a novel antifungal agent. In “ New approaches for antifungal drugs” (Fernandes PV., ed.), Boston, pp. 64-87.

OUHDOUCH Y., BARAKATE M., FINANCE C., (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur.j.Soil.Biol.* **37** :69-74.

OXFORD A.E., RAISTRICK H., SIMONART P., (1939). Studies in the biochemistry of micro-organisms. 60. Griseofulvin, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochem. J.*, **33**: 240-248.

PALLERONI N.J., (1980). A chemotactic method for isolation of *Actinoplanaceae*. *Arch. Microbiol.* **128**: 53-55.

PATEL R., (1998). Antifungal agents. Part 1. Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo. Clin. Proc.* **73**: 1205-25.

PARKER M.M. (2000). *Biology of microorganisms* Brock (ed.) pp 637-743.

PEREZ S., PATTERSON T.F., (2002). Antifungale resistance in pathogenic fungi. Clin. Infect. Dis. **35**: 1073-80.

PFALLER M.A., (2002). Focus on fungal infections. 12, Phonix Arizona March.

PFALLER M.A., DIEKEMA D.J., JONES R.N., *et al.* (2001). International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol. **39** : 3254-9.

PISANO M.A., SOMMER M. J., *et al.*, (1987). Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments.**27**: 214-217.

POCHON J., TARDIEUX P., (1962). Technique d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourtourelle, Saint-Mandé.

POLAK A., (1990). Mode of action studies. In " Chemotherapy of fungal diseases" (Ryley J.F., ed), Springer-Verlag. Berlin, pp,155-182.

PORTER J.N., WILHE J.J. TRESNER H.D., (1960). Method for preferential isolation of actinomycetes from soils. Appl. Microbiol. **8**: 174-178.

POTOSKI B.A. BROWN J., (2002). The safety of voriconazole. Clin. Infect. Dis. **35** : 1273-5.

PRIDHAM T.G. et GOTTLIEB D. (1948). The utilization of carbon compounds bu some actinomycetales as an acid for determination. J. Bacteriol. **56**: 107-114.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PROVOST F., LAURENT F., CAMACHO UZCATEGUI L.R., BOIRON P., (1997). Moleculaire study of persitence of *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. J Clin Microbiol. **35**:1157-60.

RAKE J.B., GERBER R., METHA R.J., NEWMAN Y. K., PHELEN O.H.C., SHEARER M.C., SITRIN R.D., NISBET L.J., (1986). Glycopeptide antibiotics: a mechanism-based screen employing a bacterial cell wall receptor mimetic. J. Antibiot. **39**: 58-67.

RECEVEUR M.C., ROUSSIN C., MIENNIEL B. *et al.*, (2005). Entomophthromycose ehinofaciale. A propose de deux nouveaux cas diagnostiqués à Mayotte. Bull. Soc. Path. Exot., **98**: 350-353.

REX J.H., BENNETT J.E., SUGAR A.M. *et al.*, (1994). A randomized trial comparing fluconazol with amphotericin B for treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. N. Engl. J. Med. **331**: 1325-30.

REX J.H., WALSH T.J., SOBEL J.D., *et al.*, (2000). Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases. Society of America. Clin. Infect. Dis. **30**: 662-78.

RICHARDS MJ, EDWARDS JR, CULVER DH, *et al.* (1999) . Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med. **27** : 887-92.

RYDER N., FRANK I., DUPON M.C., (1986). Ergosterol biosynthesis inhibition by the thiocarbamate antifungal agents tolnafate and tolcliate. Antimicrob. Agents. Chemother. **29** : 858-860.

SABOURAUD R., (1910). Les Teignes. Masson et Cie. Paris.

SANGLIER J.J. et TRUJILL M., (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes, strategie de selection de souches. Bull.Soc.Fr. Microbiol. **12(3)**, 269-276.

SANGLIER J.J, HAAG H., HUCK T.A. et FEHR T., (1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes. Res. Microbiol. **144**, 661-663.

SCHOLER H. (1980). Flucytosine. In “Antifungal chemotherapy” (Speller D.C.E. Ed.). Chichester, U.K. 35-106.

SCHWARTZ R.E., GIACOBBE R.A., BLAND J.A., MONAGHAN R.L., (1989). L-671329, a new antifungal agent. I. Fermentation and isolation. J. Antibiot. **42** : 163-167.

SHEARER MC., (1997). Methods for the isolation of non-streptomycetes actinomycetes. J Ind Microbiol **28**: 91-8.

SELITRENNIKOFF C. (2001). Antifungal proteins. Appl. Envir. Microbio. **67**: 2883-2894.

SHIRLING E.B. et GOTTLIEB D., (1966). Methods for characterisation of *Streptomyces* species. Int.J.Syst.Bacteriol. **16(3)**: 313-340.

SIMO-NIKKARI F.A., LOPEZ P.W., LEPP P.R., CIESLAK S., LADD-WILSON, *et al.*, (2002). Broad-range Bacterial Detection and the analysis of Unexplained Death and critical Illness. Infectious Diseases.**8**:188-94.

SIMONETTI N., STRIPPOLI V., (1971). Azione della metilpatricina sulfa *Candida albicans*. Antibiotica. **9**: 5-19.

SINGH NAVERY R.K., MUNOZ P., PRUETT T. L *et al.*, (2003). Trends in risk profiles for and mortality associated with invasive aspergillosis among liver transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 46-52.

STEVENS DA, KAN VL, JUDSON MA, *et al.*, (2000). Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*; **30** : 696-709.

SUPPARATATPIYO K. KHAMWAN C., BAOSOUNG V., NELSON K.E., SIRISANTHANA T. (1994). Disseminated *Penicillium marneffi* infection in southeast Asia. *Lancet*, **344**, 110-113.

TANUMA H., HIRAMUSU M., MUKAI H. *et al.*, (2000). A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. *Mycoses.* **43** : 79-83.

TAKIZAWA M., COLWELL R.R. et HILL R.T., (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 997-1002.

THEOBALD U., SCHIMANA J., FIEDLER H.P., (2000). Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 307-13.

TERRELL C.L. GOA K.L. BARRADELL L.B. (1999). Antifungal agents. Part II. The azoles. *Mayo. Clin. Proc.* **74**: 78-100.

VAN DER HORST C.M., SANG M.S., CLOUD G.A., *et al.*, (1997). Treatment of *Cryptococcal meningitis* associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **337**: 15-21.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VILLANUEVA A., GOTUZZO E., ARATHOON E.G. *et al.*, (2002). A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for treatment of esophageal candidiasis. *Am.J.Med.* **113**: 294-9.

VINCENT J.L., ANAISSIE E., BRUINING H., *et al.*, (1998). Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med.* **24**:206-16.

VINCENT JL, BIHARI DJ, SUTER PM, *et al.* (1995). The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *Jama* ; 274 : 639-44.

WALSH T.J., GOODMAN J.L., PAPPAS P. *et al.*, (2001). Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patient infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**: 3487-96.

WALSH T.J., PAPPAS P., WINSTON D.J. *et al.*, (2002). Voriconazole versus amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N. Engl. J. Med.* **346**: 225-34.

WAKSMAN S.A., (1967). Distribution, isolation and methods of study. In : The actinomycetes- a summary of current knowledge. The Ronald Press Company. New York. pp: 9-21

WAKSMAN S.A. (1963). *Ma vie avec les microbes*. Albin. Michel (ed.), 280 p.

WAKSMAN S.A., HENRICI A.T., (1943). The nomenclature and classification of the actinomycete. *J. Bacteriol.* **46**: 337-341.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

WANG J., SOISSON S.M. *et al.*, (2006). Platensimycine is a selective Fab F inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*. **441**: 358-361.

WELLINGTON E.M.H., AL-DJAWADI M., BANDONI R., (1987). Selective isolation of *Streptomyces* species groups from soil. *Dev. Ind. Microbiol.* **28** : 99-110.

WOO JUNG-HEE, KITAMURA ETSUSHI *et al.*, (2002). An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strains AP77 is specific for phythium porphyrae, a causative agent of red rot disease in porphyra spp. *Appl. Envir. Microbiol.* **68**: 2666-2675.

WILLIAMS S.T., DAVIES F.L., (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* **38**: 251-261.

WILLIAMS S.T., WELLINGTON E. M. H., (1982). Principales and problems of selective isolation of microbes. In: *Bioactive microbial products: Search and discovery*. Academic Press, London. 9-26.

WILLIAMS S.T, GOODFELLOW M., ALDERSON G., (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In “*Bergeys manual of systematic bacteriology*, Vol 4 ed. Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.P. Baltimore: Williams and Wilkins. Pp. 2452-2492.

WINGARD J.R., KUBILLIS P., LEE L., *et al.*, (1999). Clinical signficience of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Cli. Infect.Dis.* **29** : 1402-7.

WINGARD J.R., WHITE M.H., ANAISSIE E., *et al.*, (2000). A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. L. Amph/ABLC collaborative study group. *Cli. Infect. Dis.* **31**: 1155-63.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

WITFIELD A., (1912). Eczematoid ringworm of the extremities and groins. Proc. Roy. Soc. Med. **5**: 36-43.

YASHUDA J.M. (2001). An update on antifungal therapy; A focus on systemic Agents for nvasive fungal infection. California J. Health System. Pharm. 4-42.

ZAKHAROVA O. S., RENOVA G.M., ZVYAGINTSEV D.G., (2003). Some approaches to the selectives isolation of actinomycetes of the genus actinomadura from soil. Microbiology. **72**: 110-113.

ZITOUNI A., LAMARI L., BOUDJELALE H., BADJI B., SABAOU N., GAOOUAR A., *et al.*, (2005). *Saccharothrix algeriensis* sp. Nov., isolated from a sahara soil. IJSEM

Protocole de purification d'ADN à partir de gel d'agarose

1-Sous UV, découper le gel où se trouve la bande d'ADN à purifier en prenant garde de prendre le moins d'agarose possible. Travailler rapidement pour minimiser l'exposition de l'ADN aux UVA, toujours porter une protection pour les yeux .

2-Peser un tube stérile avec et sans le morceau de gel prélevé, afin de déterminer son poids. On assume alors, une densité de 1 gr de gel/1 mL, le volume de gel est alors calculé comme suit : un morceau de gel de 0.2g aura un volume de 0.2 mL.

3- Ajouter 4 volumes de tampon de solubilisation-fixation « Binding buffer » pour 1 volume de gel. Incuber la mixture environ 10 minutes à 55-65°C. jusqu'à ce que tout le gel ai fondu. (si le tampon vire au rose, ajouter 10µL de AcNa 3M, pH 5.0)

Remarque : Pour purifier un fragment d'ADN inférieur à 500 pb, ajouter en plus, 1 volume d'isopropanol. Par exemple pour un morceau de gel de 0.2 g, ajouter 0.8 mL de « Binding Buffer » puis 0.2 mL d'isopropanol.

4-Déposer 700 µL de la mixture dans une colonne HiBind ® DNA préassemblée dans un tube de 2 mL (fourni) et centrifuger 1 minute à 10000 g à température ambiante. Jeter l'éluat et replacer la colonne dans le tube.

Remarque : Si le volume total de votre mixture est supérieur à 700 µL, déposer à nouveau dans la colonne le reste du mélange, comme ci dessus.

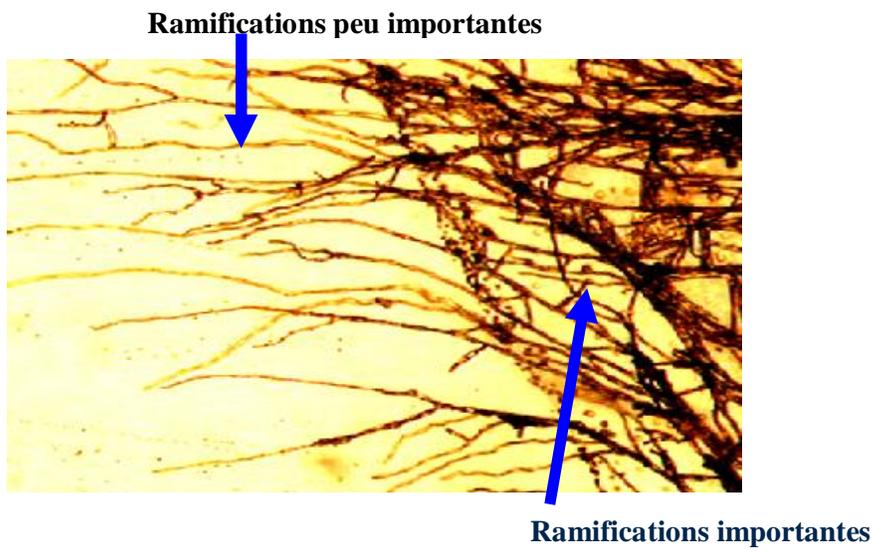
5-Laver la colonne en ajoutant 650 µL de tampon de lavage « DNA Wash Buffer » Centrifuger à 10000 g pendant 1 minute à température ambiante.

6- Jeter l'éluat, replacer la colonne dans son tube de 2 mL, centrifuger la colonne vide, bouchon ouvert à 10000 g pendant 3 minutes pour sécher la membrane de silice. Cette étape est très importante pour de bons résultats d'élution à l'étape suivante.

7- Placer la colonne dans un microtube stérile de 1.5 mL. Ajouter 30-50 µL (selon la concentration désirée) de tampon d'élution (fourni) directement au centre de la colonne. Centrifuger 1 minute à 10000 g pour éluer l'ADN.



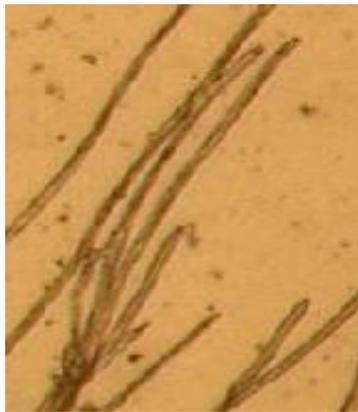
Photographie 9 : Culture de l'isolat C3 sur milieu ISP 2



Photographie 10: Observation microscopique du mycélium de substrat et du mycélium aérien de l'isolat C3



photographie 11: Culture de l'isolat 30 sur milieu ISP 2



Photographie 12: Observation microscopique du mycélium de substrat de l'isolat 30



Photographie 13: Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat 30

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules **bioactives**. Les travaux d'isolement de ces microorganismes à partir des écosystèmes extrêmes comme les **sols arides et semi-arides de l'Algérie sont rares**. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche de **molécules antifongiques** à partir de ces actinomycètes. En effet, la **pauvreté** de l'arsenal antifongique existant et l'augmentation des **infections fongiques** généralement mortelles ont font un des grands problèmes de santé de ces dernières années. Dans la première partie de ce travail, toutes les conditions de l'isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols sahariens ont été définies. Les résultats montrent que le **traitement des échantillons de sol à la chaleur**, habituellement effectué dans les autres sols, est **déconseillé** pour les sols sahariens. L'emploi de **l'acide nalidixique à 10 µg/mL et la nystatine à 50 µg/mL** dans le milieu d'isolement permettent l'élimination des germes indésirables et conduisent à l'isolement sélectif des actinomycètes. Parmi plusieurs milieux testés dans ces investigations, le milieu **GLM** est le plus favorable pour l'isolement de ces organismes.

Dans la deuxième partie, 171 souches actinomycétales ont été isolées à partir de plusieurs sols sahariens du sud Algérien. 17 souches ont présenté une activité antifongique importante contre au moins un champignon test utilisé. Deux isolats provenant des sols non rhizosphériques de la région d'El-oued ont montré une activité antifongique importante, contre tous les germes tests utilisés.

Ces deux actinomycètes ont été identifiés par des méthodes moléculaires, par réaction de polymérase en chaîne (**PCR**) en employant dans un premier temps, des amorces universelles de l'ADNr de la sous unité ribosomique 16S. Cette technique a permis de classer ces deux souches actives dans le genre *Streptomyces*. Une PCR en utilisant 1600 pb de l'ADNr 16S ainsi que plusieurs autres caractères phénotypiques ont également été testés pour identifier ces deux *Streptomyces* au niveau de l'espèces. Les résultats montrent que ces deux souches ne ressemblent **à aucune espèce actinomycète** connue à ce jour.

Les molécules produites sont de nature non polyéniques actives contre *Candida tropicalis* R2 (résistante aux polyènes).

Mots clés : Actinomycètes ; Sols Sahariens ; Identification moléculaire ; Activité antifongique.

Abstract

The actinomycetes are bacteria responsible for the production of most bioactive molecules. Research work related to the isolation of these microorganisms from extreme ecosystems such as arid and semi-arid soils of Algeria are rare. In this thesis, we are interested in searching antifungal molecules from actinomycetes. Indeed, the paucity of the existing antifungal arsenal, has made it one of the great health problems of these last years.

In the first part of this work, all conditions of selective isolation of actinomycetes from Saharian soils have been defined. The results obtained showed that the processing of soil samples by heat, usually carried out in other soils is not recommended for Saharian soils. The use of nalidixic acid at 10 µg/mL and the nystatine at 50 µg/mL in the isolation medium allow the elimination of undesirable germs and lead to the selective isolation of actinomycetes. Among several tested mediums, the GLM medium is the most appropriate for the isolation of these organisms.

In the second part, 171 actinomycetes strains have been isolated from several Saharian soils of the south Algeria. 17 strains have presented an important antifungal activity against at least one test fungi used. Two isolates from soils non rhizospheric of El-Oued region have shown an important antifungal activity against all the germs used.

These two actinomycetes have been identified by molecular methods, by polymerase chain reaction (PCR) by employing in a first time, universal primer of DNA r of the ribosomal sub-unit 16 S. This technique allows to classify these two active strains in the *Streptomyces* genus. A PCR using 1600 pb of the DNA r 16 S as well as several other phenotypic characters have also been tested to identify these two *Streptomyces* at the species level. The results showed that these two strains do not look like to any actinomycetes species known until now.

The produced molecules are of non polyenic nature, they are active against *Candida tropicalis* (resistant to polyenes).

Key Words: actinomycetes, Saharian soils, molecular identification, antifungal activity.

التلخيص

الأكتينومييسات هي بكتيريا مسؤولة عن إنتاج أغلبية الجزيئات النشطة ضد الميكروبات. الدراسات التي تختص بعزل هذه الكائنات الدقيقة من المصادر البيئية القاسية مثل الأتربة الجافة و الشبه الجافة الجزائرية هي نادرة. في هذه الدراسة كان إهتمامنا موجه للبحث عن المواد المضادة للفطريات الناتجة عن الأكتينومييسات. نظرا لظهور فقر في المواد المضادة للفطريات و تصاعد الإصابات الفطرية القاتلة أدت بكون هذا النوع من الإصابات هو الأخطر في أواخر هذه السنوات.

في القسم الأول من هذا العمل، تم التعرف على كل الشروط اللازمة لعزل الأكتينومييسات من الأتربة الصحراوية، فأكدت النتائج أن معاملة عينات التربة بالحرارة الذي كان عادة يستعمل في التربة الأخرى غير مرغوب فيه في التربة الصحراوية. إستعمال حمض الناليديكسيك بكمية 10 ميكروغرام / مل و النيستاتين بقيمة 50 ميكروغرام / مل في تركيبة بيئة العزل، يؤدي بالتخاص من الميكروبات الغير مرغوب فيها و يسمح بعزل بكتيريا الأكتينومييسات. تعتبر بيئة GLM هي الأحسن من بين كل البيئات المختبرة في هذا العمل لعزل هذه الكائنات.

في القسم الثاني عزلت 171 سلالة أكتينومييسات من عدة أتربة صحراوية بالجنوب الجزائري. 17 سلالة أظهرت فعالية كبيرة ضد فطر واحد على الأقل. سلالتين معزولتين من تربة قريبة من الجذور بمنطقة الواد أضرمت نشاط ضد فطري هام، ضد كل الفطريات المختبرة. هاتين البكتيريتين تم التعرف عليها بالطرق الجزيئية باستعمال آلية تسلسل البوليميراز بواسطة البادئات العالمية كمرحلة أولى . هذه الطريقة سمحت بتصنيف هاتين البكتيريتين ضمن جنس *Streptomyces* . إستعملت كذلك آلية تسلسل البوليميراز بواسطة 1600 زوج قاعدة و كذلك عدة صفات ظاهرية سمحت بالتعرف على هاتين السلالتين حتى سلم النوع. فكانت النتيجة أنهما لا تشبهان أي نوع آخر من الأكتينومييسات المعروفة ليومنا هذا..

فهما تنتجان جزيئات غير بوليبيدية (non polyèniques) نشطة ضد *Candida tropicalis* (ذات مقاومة ضد كل الجزيئات البولينية).

الكلمات المفتاحية : الأكتينومييسات، التربة الصحراوية، التعرف الجزيئي، النشاط ضد الفطريات

Nom : Boudemagh		
Prénom : Allaoueddine		
Thème : Isolement à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives.		
Résumé :		
<p>Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Les travaux d'isolement de ces microorganismes à partir des écosystèmes extrêmes comme les sols arides et semi-arides de l'Algérie sont rares. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche de molécules antifongiques à partir de ces actinomycètes. En effet, la pauvreté de l'arsenal antifongique existant et l'augmentation des infections fongiques généralement mortelles ont font un des grands problèmes de santé de ces dernières années. Dans la première partie de ce travail, toutes les conditions de l'isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols sahariens ont été définies. Les résultats montrent que le traitement des échantillons de sol à la chaleur, habituellement effectué dans les autres sols, est déconseillé pour les sols sahariens. L'emploi de l'acide nalidixique à 10 µg/mL et la nystatine à 50 µg/mL dans le milieu d'isolement permettent l'élimination des germes indésirables et conduisent à l'isolement sélectif des actinomycètes. Parmi plusieurs milieux testés dans ces investigations, le milieu GLM est le plus favorable pour l'isolement de ces organismes.</p> <p>Dans la deuxième partie, 171 souches actinomycétales ont été isolées à partir de plusieurs sols sahariens du sud Algérien. 17 souches ont présenté une activité antifongique importante contre au moins un champignon test utilisé. Deux isolats provenant des sols non rhizosphériques de la région d'El-oued ont montré une activité antifongique importante, contre tous les germes tests utilisés.</p> <p>Ces deux actinomycètes ont été identifiés par des méthodes moléculaires, par réaction de polymérase en chaîne (PCR) en employant dans un premier temps, des amorces universelles de l'ADNr de la sous unité ribosomique 16S. Cette technique a permis de classer ces deux souches actives dans le genre <i>Streptomyces</i>. Une PCR en utilisant 1600 pb de l'ADNr 16S ainsi que plusieurs autres caractères phénotypiques ont également été testés pour identifier ces deux <i>Streptomyces</i> au niveau de l'espèces. Les résultats montrent que ces deux souches ne ressemblent à aucune espèce actinomycète connue à ce jour.</p> <p>Les molécules produites sont de nature non polyéniques actives contre <i>Candida tropicalis</i> R2 (résistante aux polyènes).</p>		
Les mots clefs : Mots clés : Actinomycètes ; Sols Sahariens ; Identification moléculaire ; Activité antifongique.		
Laboratoire de recherche : Laboratoire de génie microbiologique et applications		
Président :	Mr. A. BENGUEDOUAR	Prof. Université Mentouri Constantine
Rapporteur :	Mr. A. BOULAHROUF	Prof. Université Mentouri Constantine
Examineurs	Mr. P. BOIRON	Prof. Université de Lyon (France)
	Mr. N. KARAM	Prof. Université d'Oran
	Mr. L. LAROUS	Prof. Université de Sétif