

République Algérienne Démocratique et Populaire

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**



Université Badji Mokhtar-Annaba

Faculté des Sciences

Département de Biochimie

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Microbiologie

Option : MICROBIOLGIE APPLIQUEE

Thème :

**Recherche de nouvelles souches d'actinomycètes
productrices de molécules antifongiques (cas des eaux du lac
Mellah d'El Kala)**

Présentée par : **Sarah BENOUGUENI**

Devant le jury :

Directrice de thèse:	Pr. Djamila GACEMI- KIRANE	Université d'Annaba
Présidente :	Pr. Houria CHETTIBI	Université d'Annaba
Examineur :	Pr. Dj. Eddine BENOURETH	Université de Guelma
Examineur :	Pr. Moussa HOUHAMDI	Université de Guelma
Examineur :	MCA. Tarek MERAD	Université d'Annaba

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2014-2015

Je dédie ce travail qui me tient a cœur à

*Ma mère, pour ses précieux conseils et son soutien et ses encouragement tout
au long de mes études.*

*Mon père, mon frère et ma sœur, le simple fait de leurs présences me donne la
force d'avancer*

Mon mari pour son soutien ses encouragements qui me sont indispensable

*Ma fille, ma raison de vivre, ce travail je te le dédie spécialement pour que tu
sois fier de ta maman.*

*A ma défunte grand-mère, toi qui n'est plus de ce monde tu demeure a jamais
dans mon cœur.*

Toute ma famille, ma belle famille, mes amis, mes collègues de travail.

*Je vous dédie ce travail, sans vous, sans votre aide ca n'aurait jamais aboutie,
quoi que je fasse vous êtes la pour moi, soyez fière de moi, que dieu vous
bénisse vous protège et vous garde.*

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Microbiologie appliqué à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba,

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu Tout puissant sur le quel je m'appuie avant toute chose.

Je remercie Spécialement ma directrice de thèse et mon mentor, le Professeur **KIRANE GACEMI Djamil**, pour ses conseils, sa disponibilité, ses précieux encouragements, sa patience, et sa confiance ; vous m'en avez tellement donné !

Je remercie également le Docteur **Stéphane RANQUE**, pour l'aide qu'il m'a apporté, pour ses conseils, sa patience, sa disponibilité, et son sérieux.

Le professeur **CHETTIBI Houria**, de l'Université de Badji Mokhtar, Annaba, de m'avoir fait honneur et un immense plaisir de présider le jury de ma soutenance.

C'est avec un grand plaisir que je remercie le Professeur **BENOUARETH Djamel Eddine**, de l'Université de Guelma d'avoir accepté de juger mon travail.

C'est aussi avec un grand plaisir que je remercie le Professeur **HOUHAMDI Moussa** de l'Université de Guelma d'avoir également bien voulu juger mon travail.

Je remercie tout particulièrement Monsieur **MERAD Tarek**, Maître de conférences à l'université Badji Mokhtar d'Annaba d'avoir préalablement jugé mon travail de Master et d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je vous exprime à toutes et à tous ma gratitude et mes respects les plus sincères.

Je remercie le Dr **Houda Morakchi** pour sa présence, ses précieux conseils qui m'ont été très utiles.

Les professeurs du département de Microbiologie pour leurs présences, leurs conseils, le travail remarquable qu'ils accomplissent chaque jour.

Les techniciens et techniciennes ainsi que l'administration de notre département et de tous les départements que j'ai sollicité.

Les professeurs de tous les départements que j'ai sollicité, et qui ont répondu présents.

Le professeur **Louisa Gillman** pour son aide précieuse ainsi que ses conseils et son amitié.

Le professeur **Zouioueche** et ses étudiants pour m'avoir aidé et m'avoir ouverts leurs portes.

Les étudiants de biochimie, de chimie, et tous les étudiants que j'ai sollicités.

La partie biologie moléculaire a été réalisée au laboratoire de Marseille Aussi je remercie vivement Le professeur Veronique tiroux pour son aide et ses conseils.

Tous mes collègues de travail, les doctorants notamment Ouargli Moufida et Bendjama Salma, tous ceux que je cite et ceux que je ne cite pas.

Et surtout et enfin je remercie toute ma famille, ma belle famille, ma mère, mon père, mon époux qui m'ont aidé et soutenue tout au long de mes études, je vous exprime toute ma gratitude.

LISTE DES ABBREVIATIONS

°C : degrés celsius

µl : micro-litres

5-FC : 5 fluorocytosine

5-FY5-fluoro-cytosine

A.M : Acétate d'éthyle – Méthanol

ADN : Acide désoxyribonucléique

AmphB : Amphotéricine B

AMY Amphotéricine B

AN.E : Acétonitrile –eau

ANY : Anidulafungine

ARN : Acide ribonucléique

Als : agglutinin-like-sequence

ATCC : American type culture collection

atpD: séquence allèle de gènes multilocus

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CA : caséine amidon.

CaChs1: isoforme 1 de la chitine synthase

CaChs2: isoforme 2 de la chitine synthase

CaChs3: isoforme 3 de la chitine synthase

CAY : Caspofungine

CCM : Chromatographie sur couche mince

Cdc21 : gène qui code pour la Thymidylate synthase

Cdr1 : *Candida* drug resistance 1

Cdr2 : *Candida* drug resistance 2

Chs : chitine synthase

Chr : chromosome

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMA corn meal agar

CMI: concentration minimale inhibitrice

ED : eau distillée

EF2 : elongation factor 2

EF2 : facteur d'élongation 2

EL : eau du lac.

EM: échantillon mère

EP : eau physiologique.

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

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FCY1 : gène qui code pour la cytosine désaminase

FCY2 : gène qui code pour la purine-cytosine perméase

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

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

FLY : Fluconazole

FTIR : Fourier Transmeter Infrared spectroscope

FUR1 : gène qui code une phosphoribosyl-transférase

G: Gausse

GPI : glycosyl phosphatidyl inositol

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

gyrB : séquence allèles des gènes multilocus

h: heures

ha : hectare

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

Hsp90 : heat shock protein

I : Intermédiaire

IPA : Institut Pasteur Alger

IR : Infrarouge

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

ITY Itraconazole

J : jour

Kbp : kilo paire de bases

L-DOPA : 3, 4-dihydroxy phényl-L- alanine

MA : Mycélium aérien

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation

MDR1 : multidrug resistance gene 1

Mg: milligramme

Min: minute

MIY : Micafungine

MI: millilitre
MLSA : multi locus sequences analysis
Mm : millimètre
MRP1 : multidrug resistance protein 1
MS : Mycélium du substrat
NaCl : chlorure de sodium
NCBI : National Center for Biotechnology Information
nm : nanomètre
PCB : pomme de terre, carotte, bile de bœuf
PCR : polymerase chain reaction
PéniG : pénicilline G.
PLP : protéines liant les pénicillines
PNEK : parc national d'el-kala
R : Résistante
RAT : rice tween agar
recA : séquence allèle de gènes multilocus
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique
Rpm : rounds per minuts
rpoB: séquence allèle de gènes multilocus
S : sensible
TAC1: gène qui code pour la Protachykinin-1
TAG: triacylglyceride
TOF : time of flight mass spectrometry
trpB : séquence allèle de gènes multilocus
URPT : l'uridine phosphoribosyl-transférase
UV: Ultra-violet
v/v: volume/volume
VIH: Virus de l'immunodéficience humaine
VOY: Voriconazole

LISTE DES TABLEAUX	PAGES
Tableau n° 1 : Mécanismes génétiques et fonctionnels de la résistance aux antifongiques.	17
Tableau n° 2 : types de paroi chez les actinomycètes et genres représentatifs	45
Tableau n° 3 : molécules produites par le genre <i>Streptomyces</i>	49
Tableau n° 4: Molécules produite par des Streptomycètes isolées de biotopes marins	49
Tableau n° 5 : maximum d'absorption UV des polyènes conjugués (en nm)	52
Tableau n° 6 : seuils critiques de sensibilité des souches de <i>C. albicans</i> déterminés par le CLSI (M27-A3)	63
Tableau n° 7 : amorces utilisées dans l'identification moléculaire de la souche active	68
Tableau n° 8 : Paramètres physicochimiques du lac El Mellah	72
Tableau n° 9 : différentes souches isolées par milieu de culture.	75
Tableau n° 10 : diamètre des zones d'inhibition pour la technique des stries croisés sur <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> et <i>E. coli</i> .	85
Tableau n° 11: Test d'activité des souches par la technique de stries croisées et la double couche sur <i>Candida albicans</i> IPA 549.	86
Tableau n° 12 : test d'activité sur les souches <i>Candida</i> nosocomiales et ATCC.	87
Tableau n° 13 : Antifongigrammes (CMI en µg/ ml) des souches nosocomiales <i>C. albicans</i>	88
Tableau n° 14 : résultats de la galerie ID 32C des levures nosocomiales A et B	96
Tableau n° 15 : résultats des caractères morphologiques des souches actives.	103
Tableau n° 16 : production des pigments mélanoides sur milieu ISP6, ISP7	103
Tableau n° 17: croissance des souches a différentes températures après 7j d'incubation.	104
Tableau n° 18 : halotolérance des souches actives	106
Tableau n° 19 : les tests enzymatiques des souches actives.	107
Tableau n° 20 : test d'assimilation des différentes sources de carbone	107
Tableau n° 21 : test d'assimilation des différentes sources d'azotes	108
Tableau n° 22 : récapitulatif des tests réalisés sur la souche E65	126
Tableau n° 23 : Résultats de la révélation des groupements spécifiques de l'extrait brut	131
Annexe n°1 : absorption caractérisant certains groupes fonctionnels	164
Annexes n° 2 : Composition des différents milieux de cultures utilisés (pour 1 litre).	166

LISTE DES FIGURES	PAGES
Figure n° 1 : cible d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote	9
Figure n°2 : mécanismes de résistance aux polyènes chez <i>C. albicans</i>	11
Figure n°3 : mécanismes de résistance aux 5-fluorocytosine	13
Figure n°4 : mécanismes de résistance aux azolés chez <i>C. albicans</i>	15
Figure n°5 : Mécanismes de résistance aux échinocandines chez <i>C. albicans</i>	16
Figure n° 6 : Mécanisme d'action des principaux antibiotiques	18
Figure n° 7 : Reproduction chez <i>Candida albicans</i>	25
Figure n° 8 : Structure et représentation schématique de la paroi cellulaire de <i>Candida albicans</i>	25
Figure n° 9 : Transition « White/opaque » d'une souche représentative de <i>C. albicans</i> et aspect microscopique des deux colonies	26
Figure n° 10 : développement du biofilm à <i>Candida</i> sur un cathéter	33
Figure n° 11 : Aperçu de certains mécanismes de pathogénicité sélectionnée chez <i>C. albicans</i>	36
Figure n° 12 : morphologie des différentes chaînes de spores chez les streptomycètes	43
Figure n° 13 : Secteur angulaire montrant la répartition de la production d'antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons et les bactéries	47
Figure n° 14 : Localisation des différents points de prélèvements	56
Figure n° 15 : Recherche de l'activité antimicrobienne par la technique de stries croisées	59
Figure n° 16 : Recherche d'activité en milieu liquide	61
Figure n° 17: Présentation des différentes étapes de l'étude microbiologique des souches d'actinomycètes	70
Figure n° 18 : Nombre de souches isolées par milieu de culture.	74
Figure n° 19 : Nombre de souches d'actinomycètes isolées par échantillon mère.	74
Figure n° 20 : diamètres d'inhibition par la technique des stries croisées et de la double couche sur <i>C. albicans</i> IPA 549.	86
Figure n° 21 : diamètre des zones d'inhibition sur les souches de <i>Candida</i> nosocomiales et ATCC.	87
Figure n° 22 : variation du pH des milieux de la souche 87p.	99
Figure n° 23 : Cinétique de production des métabolites secondaires de la souche E87p.	99
Figure n° 24 : variation du pH des milieux de la souche E76g.	100
Figure n° 25 : cinétique de production des métabolites secondaire de la souche E76.	100
Figure n° 26 : cinétique de production des métabolites secondaire de la souche E65.	100
Figure n° 27 : variation des pH des milieux de la souche E65.	101
Figure n° 28 : Séquence finale de la souche E65 après analyse par le logiciel ChromasPro.	123
Figure n° 29 : Arbre phylogénétique basés sur les séquences ARNr montrant les distances entre la souche <i>Streptomyces</i> E65 et les autres souches <i>Streptomyces</i> apparentées.	125
Figure n° 30 : cinétique de croissance de la souche E65 sur les milieux ISP1, ISP2 et GYEA.	128
Figure n° 31 : Spectre UV-Visible de l'extrait brut de la souche E65.	130
Figure n° 32: FTIR spectre infrarouge de l'extrait antifongique brut dans le chloroforme	133

LISTE DES PLANCHES	pages
Planche n° 1: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées	78
Planche n° 2: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées (suite)	79
Planche n° 3: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées (suite)	80
Planche n° 4: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées (suite)	81
Planche n° 5: Photos Gram réalisés sur les souches E23, E16, E59 et E60	82
Planche n° 6: Photos Gram réalisés sur les souches E74, E78, E82 et E107	83
Planche n° 7: Photos Gram réalisés sur les souches E130, E143, E121 et E113	84
Planche n°8: tests d'activité pour la souche E6, E13 et E14	89
Planche n°9: tests d'activité pour la souche E65, 76b et 76g	90
Planche n°10: tests d'activité pour la souche E87p, 165 et 182	91
Planche n° 11 : Gram réalisés sur les souches E6, E13 et E14	92
Planche n° 12: Gram réalisés sur les souches E65, E76b et E76g	93
Planche n° 13: Gram réalisés sur les souches E87p, E165 et E182	94
Planche n° 14: résultats de l'identification des levures A et B	95
Planche n° 15: Aspect sous loupe binoculaire des souches actives	110
Planche n° 16: aspect sur boîte de la E6, E13 et E14	111
Planche n° 17: aspect sur boîte de la E65, E76b et E76g	112
Planche n° 18: aspect sur boîte de la E87p, E165 et E182	113
Planche n°19 : Halotolérance des souches E6 et E13	114
Planche n° 20 : Halotolérance des souches E14 et E65	115
Planche n° 21: Halotolérance des souches E76b et E76g	116
Planche n° 22 : Halotolérance des souches E87p et E165	117
Planche n° 23: caractères morphologiques de la souche E6, E13 et E14	118
Planche n° 24: caractères morphologiques de la souche E65, E76b et E76g	119
Planche n° 25: caractères morphologiques de la souche E87p, E165 et E182	120
Planche n° 26: Tests enzymatiques des souches E6, E13, E14 et E65	121
Planche n° 27: Tests enzymatiques des souches E76b, E76g, E87p, E165 et E182	122

LISTE DES PHOTOS	PAGES
Photo n° 1 : Détermination de la CMI avec une bandelette E-test	38
Photo n° 2 : position géographique du lac El Mellah	55
Photo n° 3 : Plaque « Sensitive YeastOne [®] »	63
Photo n° 4 : résultats des galeries ID 32C des levures nosocomiales A et B.	96
Photo n° 5 : PCR du gène ARNr amplifié de la souche E65.	123
Photo n° 6 : photo de la révélation de la plaque CCM sous UV (254 nm) des spots de l'extrait brut.	129

Table des matières

Dédicaces	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des planches et photos	
Introduction.....	1

Partie Bibliographique

1. La chimiothérapie antifongique	5
1.1. Origine des antifongiques.....	5
1.2. Principaux traitements par antifongiques et leurs limites	5
1.2.1. Les polyènes.....	5
a. La nystatine	5
b. L'Amphotéricine B	5
1.2.2. Le 5-fluoro-cytosine.....	6
1.2.3. Les azolés : dérivés diazolés et triazolés.....	6
a. Les imidazolés	6
b. Les triazolés	6
1.2.4. Les échinocandines.....	6
1.3. Nouvelle classe d'antifongiques.....	7
1.3.1. La sordarine.....	7
1.3.2. La nikkomycine.....	7
1.4. Modes d'action des principaux antifongiques utilisés en thérapeutiques.....	8
1.4.1. Les polyènes.....	8
1.4.2. Le 5 fluoro-cytosine.....	8
1.4.3. Les azolés.....	8
1.4.4. Les échinocandines.....	10
1.5. Mécanismes de résistance aux principaux antifongiques.....	10
1.5.1. Les polyènes.....	10
1.5.2. Les fluoropyrimidines.....	12
1.5.3. Les azolés.....	14
1.5.4. Les échinocandines.....	16
2. La chimiothérapie antibactérienne.....	18
2.1. Origine des antibiotiques.....	18
2.2. Mécanisme d'action des antibiotiques.....	18
2.2.1. La platensimycine.....	19
2.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	19
2.3.1. Types de résistances	19

2.3.1.1.	La résistance naturelle.....	19
2.3.1.2.	La résistance acquise.....	19
a.	Chromosomique.....	19
b.	Plasmidique.....	19
2.3.2.	Principaux mécanismes biochimiques de résistances aux antibiotiques.....	19
2.3.2.1.	Inactivation enzymatique de l'antibiotique	19
2.3.2.2.	Modification de la cible.....	20
2.3.2.3.	Mécanisme d'efflux.....	20
2.3.2.4.	Diminution de la perméabilité membranaire.....	20
3.	Les infections nosocomiales.....	20
3.1.	Définition d'une infection nosocomiale.....	20
3.2.	Epidémiologie.....	20
3.3.	Les infections nosocomiales à <i>Escherichia coli</i>	21
3.3.1.	Physiopathologie.....	21
3.3.2.	Résistance aux antibiotiques des souches d' <i>E. coli</i>	21
3.4.	Les infections nosocomiales à <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.4.1.	Physiopathologie.....	21
3.4.2.	Résistance aux antibiotiques des infections à <i>S.aureus</i>	22
4.	Les levures.....	22
5.	Les infections fongiques.....	22
5.1.	Les mycoses cutanées ou superficielles.....	22
5.2.	Les mycoses sous-cutanées	23
5.3.	Les mycoses profondes ou viscérales	23
6.	<i>Candida albicans</i>	23
6.1.	Taxonomie	23
6.2.	Morphologie et reproduction.....	23
6.2.1.	Une paroi	24
6.2.2.	Une membrane plasmique	24
6.2.3.	Des organites intracellulaires	25
6.3.	La variation « white/opaque » chez <i>C. albicans</i>	26
6.4.	Outils d'identification des levures du genre <i>Candida</i>	26
6.4.1.	Conditions de culture chez <i>C. albicans</i>	26
6.4.2.	Outils d'identification traditionnels.....	27
6.4.2.1.	L'examen direct	27
a.	Les colorants non spécifiques.....	27
b.	La coloration spécifique	27
c.	Coloration fluorescente.....	27
6.4.2.2.	Culture	27
a.	Milieux non spécifiques.....	27
b.	Milieux spécifiques	28
c.	Milieux chromogènes.....	28

d. Milieux fluorogènes.....	28
6.4.2.3. Identification biochimique	28
6.4.2.4. Identification immunologique.....	29
a. Détection des anticorps	29
b. Détection des antigènes circulants.....	29
6.4.3. Identification moléculaire	30
6.4.4. Identification par Maldi-Tof	30
6.5. Pathologies dues à <i>Candida</i>	30
6.5.1. Candidoses cutanées superficielles.....	30
6.5.2. Candidose buccales.....	30
6.5.3. Intertrigo	31
6.5.4. Candidoses périnéales et vaginales	31
6.5.5. Candidoses œsophagiennes.....	31
6.5.6. Candidoses profondes.....	31
6.5.7. Candidoses allergiques	32
6.5.8. Candiduries.....	32
6.5.9. Biofilms à <i>Candida</i>	32
6.6. Épidémiologie des candidoses	33
6.7. Facteurs de virulence.....	34
6.7.1. Facteurs liés à l'hôte	34
6.7.2. Pathogénicité et facteurs liés au microorganisme.....	35
6.7.2.1. Le polymorphisme	35
a. Adhésion.....	35
b. Formation de biofilms	35
c. Thigmotropisme.....	35
d. Sécrétion d'hydrolases	36
6.8. <i>Candida albicans</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	36
6.9. Antifongigramme <i>C. albicans</i>	37
6.9.1. Techniques utilisées	37
6.9.1.1. M27-A2 du CLSI	37
6.9.1.2. Méthode européenne EUCAST.....	37
6.9.1.3. Technique ATB Fungus	38
6.9.1.4. Technique par bandelette E-Test	38
6.10. Résistance aux antifongiques des souches de <i>Candida</i>	38
7. La zone humide du lac El Mellah.....	40
7.1. Caractéristiques physicochimiques du lac.....	40
a. Le pH.....	40
b. La salinité.....	40
c. La conductivité.....	41
d. L'oxygène dissous et la saturation en oxygène	41
8. Les actinomycètes.....	41

8.1. Définition et caractéristiques	42
8.2. Types de spores	43
8.3. Thermo-résistance des spores	44
8.4. Ecologie.....	44
8.5. Classification des actinomycètes.....	45
8.5.1.Critères de classification	45
8.5.2.Evolution de la classification des actinomycètes	46
8.6. Halotolérance	47
8.7. Producteurs de molécules antimicrobiennes	47
8.8. la production des métabolites secondaires.....	50
8.8.1.Effet de la composition du milieu de culture.....	50
8.8.2. Influence du pH, température, agitation et le temps d'incubation	50
8.8.3. Production bi phasique.....	50
8.8.4. Pigmentation et production	51
9. Techniques d'extraction des métabolites secondaires.....	51
9.1. Chromatographie sur couche mince CCM/ CCM deux dimensions	51
9.2. Spectroscopie UV-Visible.....	52
9.3. Spectroscopie infrarouge	53

Matériels et méthodes

Objectif de travail.....	54
I. Le site d'étude	55
1. Isolement	55
2. Echantillonnage et prélèvement.....	56
3. Mesure des paramètres physicochimiques du lac	57
4. Isolement.....	57
4.1. Les milieux de cultures utilisés.....	57
4.1.1. Les milieux sélectifs.....	57
4.1.2. Les milieux électifs	57
5. Observation à la loupe binoculaire.....	58
6. Observation au microscope optique.....	58
7. Purification et conservation.....	58
II. Recherche de l'activité antimicrobienne	58
1. Recherche de l'activité en milieu solide.....	59
1.1. Technique de stries croisées	59
a. Technique	59
1.2. Technique de la double couche	60
a. Technique	60
1.3. Production des molécules bioactives en milieu liquide	60
a. Technique	60

1.4. Identification des levures nosocomiales A et B.....	61
a. Examen microscopique	61
b. Test de pseudo-filamentation	62
c. Identification biochimique des levures A et B	62
1.5. Antifongogramme des souches de <i>Candida</i> SC1 et SC2.....	62
a. Technique	62
III. Identification des souches actives.....	63
1. Aspect macroscopique des souches actives.....	63
2. Caractères morphologiques des souches actives	64
a. Technique.....	64
3. Aspect au microscope optique.....	64
4. Production des pigments mélanoïdes	64
a. Technique.....	64
5. Caractères physiologiques.....	65
5.1. Croissance à différentes température	65
5.2. Tolérance au chlorure de sodium	65
6. Caractères biochimiques	65
6.1. Hydrolyse de l'amidon	65
6.2. Hydrolyse de la gélatine	65
6.3. Hydrolyse de la caséine	66
6.4. Hydrolyse du tween 80	66
6.5. Utilisation de différentes sources de carbone	66
a. Technique.....	66
6.6. Utilisation de différentes sources d'azote	67
IV. Identification moléculaire de la souche E65.....	67
1. Extraction de l'ADN.....	67
2. Electrophorèse.....	67
3. Purification des bandes d'ADN et séquençage	67
4. Séquençage et analyse des séquences.....	68
V. Etude préliminaire des molécules produite par la souche représentative.....	68
1. Extraction de la molécule bioactive	68
2. Identification partielle de la molécule bioactive.....	69
2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	69
a. Technique.....	69
2.2. Révélation des chromatogrammes par des révélateurs chimiques	70
2.3. CCM deux dimensions	70
2.4. Spectre UV-Visible de l'extrait brut	70
2.5. Spectroscopie infrarouge	70

Résultats et discussion

I.	Echantillonnage et prélèvement	72
1.	Résultats.....	72
2.	Discussion.....	72
2.1.	pH	72
2.2.	Salinité.....	73
2.3.	Conductivité.....	73
2.4.	L'oxygène dissous et la saturation en oxygène.....	73
2.5.	Le lac el Mellah.....	73
II.	Isolement.....	73
1.	Résultats	73
2.	Discussion	76
III.	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	77
1.	Résultats	77
2.	Identification des levures nosocomiales A et B.....	88
2.1.	Examen microscopique.....	88
2.2.	Résultats du test de pseudo-filamentation	88
2.3.	Résultats de la galerie ID 32C	96
3.	Discussion	96
IV.	Choix de souches représentatives.....	99
1.	Etude de l'activité en milieu liquide des souches représentatives.....	99
1.1.	Résultats	99
1.2.	Discussion	101
V.	Caractéristiques des souches actives.....	102
1.	Observation au microscope optique	102
2.	Caractères morphologiques des souches actives.....	103
3.	Production des pigments mélanoides	103
4.	Discussion	103
5.	Caractères physiologiques.....	104
5.1.	Croissance a différentes températures	104
5.2.	Croissance et tolérance au chlorure de sodium	105
6.	Caractères biochimiques	107
7.	Discussion	108
VI.	Identification moléculaire de la souche E65.....	123
1.	L'extraction de l'ADN, séquençage et analyse des séquences.....	123
1.1.	Résultats	123
1.2.	Discussion	124
VII.	Etude préliminaire des molécules produites par la souche E65.....	128
1.	Cinétique de croissance de la souche E65	128
2.	Extraction de la molécule bioactive	128

3. Identification partielle de la molécule bioactive.....	129
4. Chromatographie sur couche mince CCM et spectroscopie UV-Visible.....	129
4.1. Résultats	129
4.2. Discussion	130
5. Révélation des chromatogrammes par des révélateurs chimiques.....	131
6. CCM deux dimensions	131
7. Spectroscopie infrarouge.....	132
7.1. Résultats	132
7.2. Discussion	134
Conclusion générale et perspectives	136
Références bibliographiques	139
Annexes	
Résumés	

Introduction

Les levures du genre *Candida* sont responsables d'infections invasives appelées « candidoses » dont le diagnostic est souvent confus principalement à cause des pathologies primaires des patients concernés, en effet l'immunodéficience représente un facteur de risque majeur favorisant les candidoses (**Shawn et al., 2014**).

Durant les années 1800, Albert Zenker fut l'un des premiers médecins à décrire un cas de candidose systémique, plus tard, avec l'introduction des antibiotiques, des infections par le mycète furent plus nombreuses, et l'incidence des maladies associées à *Candida* augmentaient (**Prescott et al., 2003**), cet agent saprophyte opportuniste cosmopolite, colonise la cavité cutanée et les muqueuses des individus sains, mais chez les hôtes immuno-déficients, le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisant, la colonisation peut évoluer vers l'invasion ce qui entraîne des pathologies comme le cas des candidoses profondes ou systémiques, la **candidémie** ou la **septicémie** représente la dissémination de la levure à travers l'organisme et l'atteinte des organes vitaux (**Ashley Dodds et al., 2012 ; Berceau et al., 2011 ; Talarmin et al., 2009**).

Dans les services hospitaliers, on observe d'une part, l'augmentation de la prévalence de *Candida albicans*, les études épidémiologiques mentionnent la levure au 4^{ème} rang des infections nosocomiales des soins intensifs et au deuxième rang des infections urinaires (**Zaoutis et al., 2005 ; Shawn et al., 2014 ; Hindron et al., 2008**), en Europe, une étude épidémiologique sérieuse menée sur plusieurs pays européens qui recense un total de 779 patients, elle se présente en première position des infections invasives avec 54% des cas recensés.

En parallèle, la toxicité relative des antifongiques actuellement commercialisés, comme le cas des polyènes qui présentent une toxicité rénale (élévation de la créatininémie) qui rend le traitement compliqué, voir impossible pour les patients ayant des insuffisances rénales (**Martin, 2008**).

D'autres parts, La résistance acquise des souches de *Candida* aux antifongiques utilisés couramment comme les polyènes, au 5-fluorocytosine utilisé en monothérapie (**Hope et al., 2004**) mais aussi aux échinocandines qui représentaient jusqu'à présent une alternative de choix au traitement des maladies fongiques (**Fournier et al., 2011**), tous cela augmente un besoin urgent de trouver des solutions aux problèmes thérapeutiques rencontrés.

Parmi les levures de ce genre, *C. albicans* est également la plus associée à la formation de biofilms, et les infections nosocomiales sont reliées à ce phénomène grave, la formation de biofilm peut se développer sur les différentes surfaces inertes des patients avec des dispositifs médicaux, tels que les patients sondés, porteurs de cathéters intraveineux ou de tube endotrachéaux, après l'implantation de prothèses en toutes sorte ou de *pacemaker*, ou bien suite à la transplantation de valves cardiaques artificielles, les biofilms peuvent être homogènes (présence d'un seul agent) ou hétérogènes (association de deux agents pathogènes ou plus) (**Allison et al., 2000 ; Douglas, 2003 ; Singh et al., 2011 ; Seghir et al., 2015**).

Il a été décrit l'association préférentielle de souches de *S. aureus* aux pseudofilaments de *C. albicans* pour produire un « biofilm poly-microbien » avec formation de micro-colonies pour *S. aureus* dans le sérum, un milieu qui normalement ne peut soutenir ce genre de formation pour *S. aureus* (**Harriott et Noverr, 2009**), tandis que l'étude **Harriott et Noverr, (2010)** a mis en évidence l'induction de la résistance à la vancomycine durant le processus de formation de ce type de biofilm.

La résistance aux antifongiques des souches de *Candida* augmente également avec la formation de biofilm, **Boucherit-Atmani et al., (2011)** démontrent que la résistance des biofilms de *C. albicans* (colonisant des cathéters et des sondes) augmente durant le processus, de la phase d'adhérence jusqu'à la phase de maturation.

Harriott et al., (2010) rapportent également l'induction du biofilm polymicrobien de souches de *C. albicans* mutantes avec *S. aureus* à développer une résistance à la vancomycine chez ce dernier, en expliquant que le gène BCR1 serait nécessaire pour médier l'interaction avec *S. aureus*. Les patients immunodéprimés présentent souvent des métastases staphylococciques multiples qui peuvent entraîner des maladies graves voire fatales (**Schaechter et al., 1999 ; Benhamou et al., 2005**).

L'incidence des infections fongiques invasives a considérablement augmenté, conséquence de l'amélioration des techniques médicales, l'industrie pharmaceutique se voit mesuré à une demande thérapeutique considérable et croissante, elle doit rechercher de nouvelles molécules antifongiques plus efficaces ayant la plus faible toxicité possible, le choix thérapeutique repose sur plusieurs critères à savoir l'état des patients, la durée du traitement, le caractère récidive de la pathologie, et enfin le prix coûteux de certaines molécules (**Martin, 2008 ; Grillot, 2013**).

Pour les champignons, une difficulté particulière pour le développement de la chimiothérapie antifongique se pose car les cellules fongiques sont des cellules eucaryotes et ressemblent beaucoup aux cellules animales et humaines, les agents antifongiques qui agissent sur les composants ou les voies métaboliques des cellules fongiques affectent souvent les voies correspondantes des cellules de l'hôte rendant ces molécules toxiques pour ce dernier, ainsi, les médicaments antifongiques idéales devraient cibler certaines voies métaboliques ou des composés spécifiques de la cellule fongique afin de réduire la possibilité d'endommager les tissus et d'induire des effets secondaires indésirables chez l'hôte (**Madigan et al., 2012**).

Malgré les indéniables avancées thérapeutiques et les prises en charge très sérieuses, on note une prévalence inquiétante des Candidémies recensées, mise à part le côté humain, l'aspect pharmaco-économique est tout aussi inquiétant, avec un coût global de ces maladies estimées à environ 100 million d'Euro par an en France (**Bitar et al., 2013 ; Grenouillet et al., 2013**), un constat qui doit absolument sensibiliser les professionnels de santé et inciter les organismes à réfléchir sur les stratégies nécessaires (**Talarmin et al., 2009 ; Hannequin et al., 2010 ; Grillot et al., 2013**).

Dans notre pays également, où les établissements de santé ne disposent malheureusement pas d'autant de moyens que les établissements d'Europe ou d'Amérique, la situation n'en est moins alarmante (**Boucherit-Atmani et al., 2011**), les manœuvres chirurgicales, les cathéters, les prothèses et les sondes expose particulièrement au risque de septicémie et de candidoses profondes (**Papasse et al., 2009 ; Freifeld et al., 2010**) ; Chez les patients hospitalisés, recevant des antibiothérapies pour le traitement des maladies primaires comme en chirurgie, des chimiothérapies anticancéreuse ou encore les traitements par corticoïdes répétés (**Papasse et al., 2009 ; Fournier et al., 2011 ; Alangaden, 2011**).

Tous les microorganismes, ou presque, sont concernés par le phénomène de résistance, qui est perçu comme une adaptation, un mode de survie, cette résistance peut résulter de plusieurs causes, à savoir, les prescriptions abusives (monothérapie) et/ou anarchiques des molécules antimicrobiennes comme le cas des pays en voie de développement, le transfert de gènes codant pour les enzymes responsables de cette résistance (évolution microbienne), le diagnostic incorrect suivi d'une antibiothérapie précipitée, voir même l'usage massif des biocides industriels ou domestiques et des désinfectants hospitaliers qui sont des facteurs de risque pour la sélections des mutants résistants.

Dans le souci de trouver de nouvelles échappatoires thérapeutiques, la recherche se tourne vers la réalisation de molécules semi-synthétiques à partir des structures connus, ou bien la découverte de nouveaux microorganismes naturellement producteurs d'antimicrobiens à partir d'écosystèmes peu ou non explorés.

Les actinomycètes sont devenus un groupe très important dans la microbiologie appliquée et l'industrie pharmaceutique. Durant les trente années qui suivent, la découverte de nouvelles molécules d'antibiotiques (dont la plupart est extraite des actinomycètes) explose dans une ère où les maladies infectieuses créaient de grandes épidémies (**Hopwood, 2007**).

Ces microorganismes ont été retrouvés dans plusieurs écosystèmes aquatiques, lacustres ou marins, sans pour autant pouvoir mettre l'accent sur leurs caractères autochtone, le genre *Micromonospora* est effectivement souvent isolé des échantillons de sédiments des milieux hydriques, cependant, et l'isolement la fréquence de l'isolement des souches du genre *Thermoactinomyces*, qui représentent les marqueurs de biotopes terrestres, sème le doute sur un réel caractère autochtone de ce groupe microbien, ceci n'exclue pas le fait que même si les actinomycètes sont d'origine tellurique, ils peuvent cependant s'adapter aux conditions de vie des biotopes aquatiques salées dans les quels ils s'y retrouvent (**Sigee, 2005; Das et al., 2008**).

Ces microorganismes « halotolérants » possèdent également la capacité de produire en plus des métabolites antimicrobiennes, d'autres molécules d'intérêt biotechnologique tels que les enzymes qui dégradent les polluants organiques en produisant des polymères des biosurfactants et des solutés compatibles (**Marhuenda-Egea et Bonete, 2002; Le Borge et al., 2008**).

La recherche ne cesse de recenser de nouvelles espèces appartenant au genre *Streptomyces*, les membres du vaste groupe des *Streptomyces violaceusniger* s'inscrivent

comme les plus grands producteurs de molécules antibactériennes et antifongiques ayant un potentiel pour des applications médicales contre le traitement des infections fongiques invasives (**Solanki et al., 2008 ; Kang et al., 2010 ; Kumar et Goodfellow, 2010**).

Depuis 2005, notre laboratoire s'est tourné vers la recherche de molécules antimicrobiennes dans zone du Parc National d'El-Kala, notamment avec les travaux déjà publié de **Morakchi et al.**, en 2009 et ceux de **Ayari et al.**, (2012) qui ont démontré la présence des souches d'actinomycètes au sein de la zone humide du lac Oubeira et de démontrer leurs activités antimicrobiennes.

Les zones humides du Parc d'El Kala figurent parmi la convention Ramsar qui s'engage à la conservation des ressources naturelles, et veiller à l'utilisation rationnelle de ces biotopes par des actions locales, régionales et nationales.

Aussi, l'objectif principal de notre étude consiste en l'isolement de souches d'actinomycètes des eaux du lac El Mellah (Parc national d'El Kala) productrices de substances antifongiques actives sur la levure nosocomiale *Candida albicans* et l'identification de ces molécules bioactives.

Les résultats de cette étude sont divisés en six parties à savoir :

1. L'isolement et la purification des souches d'actinomycètes des eaux du lac El Mellah.
2. Le screening des souches présentant une activité antimicrobienne.
3. La caractérisation des souches actives.
4. L'étude de la cinétique de production de souches représentatives sur différents milieux liquides.
5. L'identification moléculaire de la souche E65 productrice de molécules antifongiques active sur *Candida albicans* nosocomiales (sensible et résistante à la 5-fluorocytosine).
6. Et enfin l'extraction et l'identification partielle de cette molécule.

Partie

Bibliographique

1. La chimiothérapie antifongique

Les molécules antifongiques appartiennent à divers groupes chimiques comme les acides gras, les ammoniums quaternaires, les azolés, les composés hétérocycliques, des esters, des macrolides polyéniques, ou encore des phénols, l'utilisation des antifongiques doit être en générale prolongée pendant plusieurs semaines après la guérison apparente des mycoses, de crainte d'une rechute (**Euzéby, 2008 ; Fournier et al., 2011**).

1.1. Origine des antifongiques

Ces molécules peuvent être issue d'une voie naturelle, de synthèse chimique ou semi-synthétique, ceux d'origine naturelle sont produits par les actinomycètes ou par des champignons, nous pouvons citer l'exemple de l'Amphotéricine B produite par *Streptomyces nodosus*, les antifongiques de synthèse sont beaucoup plus nombreux, c'est le cas de la fluorocytosine, les azolés, les dérivés de l'imidazole, et les dérivés triazolés, et les antifongiques semi-synthétiques qui appartiennent aux échinocandines, comme l'acétate de caspofungine qui est un dérivé aminé semi-synthétique de la pneumocandine B, produit naturel de la fermentation de *Glarea lozoyensis* (**Ripert, 2013**).

1.2. Principaux traitements par antifongiques et leurs limites

Les principales molécules antifongiques commercialisées appartiennent à quatre familles les polyènes sont des molécules d'origine naturelle ; les analogues nucléosidiques et les azolés qui sont synthétisées par voie chimique au laboratoire ; et les échinocandines dont certaines sont naturelles et d'autres semi-synthétiques (**Martin, 2008 ; Mouly et Sellier, 2004**).

1.2.1. Les polyènes

Les polyènes (l'Amphotéricine B comme la nystatine) sont des molécules antifongiques d'origine naturelle caractérisé par une structure complexe avec un nombre de doubles liaisons conjuguées HC=CH, ce nombre permet de définir la nature du polyène, l'exemple du diène pour deux doubles liaisons, ou encore triène pour trois doubles liaisons.

a. La nystatine : le plus ancien des antifongiques naturels, a été isolée de *Streptomyces noursei* en 1950, elle n'est utilisée que par voie cutanée ou orale en raison de sa toxicité par voie parentérale (injectable), elle est le plus souvent indiquée pour le traitement courant des candidoses digestives, vaginales et cutanées (**Mouly et Sellier, 2004 ; Ripert, 2013**).

b. L'Amphotéricine B : Isolée de *Streptomyces nodosus* en 1955, est un macrolide polyénique amphotère (lactone avec 7 doubles liaisons conjuguées), elle est indiquée comme traitement des candidoses vaginales et cutanées, non absorbée par voie digestive, elle doit être administrée par voie veineuse (mycoses profondes) (**Pourriat et Martin, 2005**).

Les polyènes présentent une toxicité faible à modérée qui dépend de l'état du patient, on remarque comme effet indésirables, une fièvre, des frissons, nausées, vomissements, hypocalcémie, ou encore des troubles hépatiques, l'élévation de la créatininémie (altération de

la fonction rénale) est souvent réversible après arrêt du traitement, pour l'amphotéricine B, la forme lipidique est mieux tolérée par les reins et donc réservée aux patients avec une insuffisance rénale, ces molécules polyéniques sont coûteuses et doivent également être adaptées selon le degré de l'insuffisance rénale, cette toxicité relative rend cette classe d'antifongique de moins en moins désirée (Martin, 2008 ; Mouly et Sellier, 2004 ; Ripert, 2013).

1.2.2. Le 5-fluoro-cytosine

Le 5- fluoro-cytosine est un antifongique de synthèse du groupe des fluoropyrimidines également utilisée pour le traitement des candidoses, il peut être administré par voie générale (voie buccale et perfusion), il présente toutefois des inconvénients, à, savoir, une toxicité essentiellement digestive et hématologique, cette dernière est favorisée par les taux sériques très élevés ($> 100 \mu\text{g/ml}$), aussi, il favorise l'apparition rapide des mutants résistants (défaut de pénétration de l'antifongique), l'association à un autre antifongique afin d'obtenir une synergie est vivement conseillée, nous pouvons citer l'exemple de l'association flucytosine-Amphotéricine B qui retarde le phénomène de résistance tout en diminuant la néphrotoxicité de l'Amphotéricine B (Euzéby, 2008).

1.2.3. Les azolés : dérivés diazolés et triazolés

Cette famille d'antifongiques de synthèse chimique possède un noyau hétérocyclique pentagonal, dont au moins un atome d'azote est lié à un atome d'hydrogène, il en existe trois groupes en thérapeutique humaine :

a. **Les imidazolés** : comme le clotrimazole, le kétoconazol ou encore le miconazole.

b. **les triazolés** : comme le fluconazole, l'itraconazole et le voriconazole, ce dernier groupe agit plus sélectivement sur les champignons que les imidazolés et entraînent moins de troubles endocriniens (Euzéby, 2008).

Le traitement par les azolés présentent également des effets indésirables, c'est le cas du kétoconazole avec une toxicité hépatique non négligeable, il peut interférer avec les vitamines K, aussi avec le métabolisme de la testostérone (d'où la chute de cheveux), on remarque également une irrégularité menstruelle, une hypertension et une rétention liquidienne ; les risques hépatiques et hormonaux sont beaucoup moindres avec le fluconazole du fait de sa forte affinité pour les enzymes fongiques que celle des humains, le fluconazole n'a aucune répercussion significative sur les stéroïdes, l'itraconazole est moins utilisé contre les candidoses, le voriconazole est très bien toléré et efficace sur les espèces de *Candida* même celles résistantes au fluconazole, comme les formes lipidiques de l'Amphotéricine B, il représente une alternative au traitement des mycoses (Pourriat et Martin, 2005).

1.2.4. Les échinocandines

Les échinocandines appartiennent aux antifongiques du groupe des hexapeptides cycliques, autrefois appelées pneumocandines se référant aux deux pathogènes cibles majeures à savoir

Pneumocystis jirovecii et *Candida* sp., la première molécule a été élaborée par *Aspergillus* sp., en 1974, la modification de sa structure a donné la clinofungine qui fut vite abandonnée en raison de sa néphrotoxicité (**Datry et al., 2005 ; Euzéby, 2008**), aujourd'hui, la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine représentent les trois échinocandines d'origine semi-synthétiques actuellement utilisée en clinique (**Fournier et al., 2011 ; Ripert, 2013**). Avec un spectre d'activité plus large, elles sont efficaces sur les levures et moisissures notamment sur le genre *Candida*, représentant ainsi une alternative de choix pour lutter contre les levures de ce genre (**Ripert, 2013**).

En générale, les effets indésirables des échinocandines sont légers à modérés et nécessite rarement l'arrêt du traitement, des anomalies hépatiques ont été observées chez certains patients avec des pathologies sous-jacentes graves, elles sont utilisés pour le traitement des candidoses invasives chez l'adulte et un nombre limités des candidoses profondes (**Martin, 2008**).

1.3. Nouvelle classe d'antifongiques

1.3.1. La sordarine

Un antifongique d'origine naturelle découvert en 1971, il a été isolé de la moisissure *Sordaria araneosa*, par la suite, d'autres dérivés semi-synthétiques ont été développé à partir de cette molécule, comme la molécule FR290581 et la moriniafungine, le mécanisme d'action est unique, ils inhibent la synthèse protéique par un mécanisme induisant une liaison sélective au facteur d'élongation 2 (EF2) et les ribosomes des cellules fongiques uniquement. *In vitro*, la sordarine et ses dérivés possèdent une activité sélective contre certaines levures et moisissures et notamment contre *C. albicans*, (**Basilio et al., 2006 ; Hanadate et al., 2009**). Chez les animaux, elle à montré une activité fongicide contre les souches de *Candida*, à l'exception de *C. krusei* et *C. lusitaniae* (**Basilio et al., 2006 ; Carle, 2003**).

1.3.2. La nikkomycine

La nikkomycine est un antifongique d'origine naturelle isolé de *Streptomyces* sp., cet antifongique induit différents mécanismes d'action selon la composition du milieu de culture, il inhibe la chitine synthase (Chs) responsable de la formation de chitine de la paroi fongique, cependant, *C. albicans* se trouve être intrinsèquement résistante à cette molécule (**Feng et al., 2014**) ; **Kim et al., (2002)** explique ce phénomène par la présence de trois isoformes de la Chs, la CaChs1, CaChs2 et la CaChs3.

Feng et al., (2014) sont parvenue à synthétiser les analogues nikkomycine Px et Pz semi-synthétique de la molécule initiale qui possèdent un spectre d'action contre la levure *C. albicans*, *in vitro*, l'interaction synergétique de la nikkomycine avec les azolés ou d'autres antifongiques contre la levure a également été rapportée (**Li et Rinaldi, 1999 ; Sandovsky-Losica et al., 2008**).

La sordarine et les analogues synthétiques de la nikkomycine appartiennent à une nouvelle classe d'antifongiques avec une bonne activité sur *C. albicans* qui n'ont, pour l'instant, pas de pharmacothérapie adaptée (**Feng et al., 2014 ; Hanadate et al., 2009**).

1.4. Modes d'action des principaux antifongiques utilisés en thérapeutiques

1.4.1. Les polyènes

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

1.4.2. Le 5 fluoro-cytosine

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

1.4.3. Les azolés

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

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

Le mode d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote est représenté par la figure n° 1.

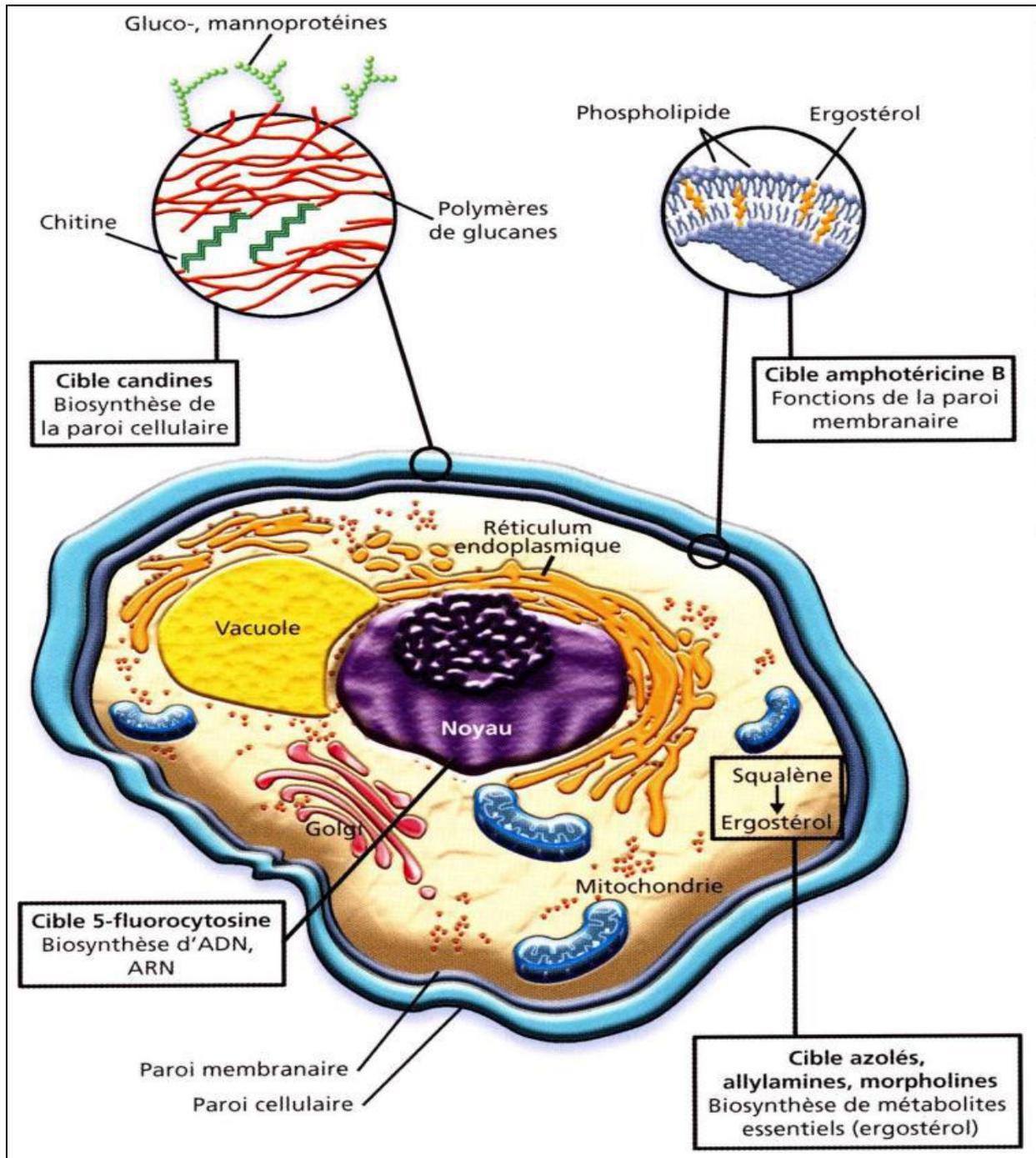


Figure n° 1 : cible d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote (Hulin et al., 2005).

1.4.4. Les échinocandines

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

1.5. Mécanismes de résistance aux principaux antifongiques

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

Comme dans toutes les conditions environnementales défavorables, l'exposition aux antifongiques active des voies de réponses de stress qui confèrent une protection cellulaire immédiate et favorisent ainsi la survie de la levure. L'un des principaux régulateurs des réactions au stress est le Hsp90 (figure n° 4 et 5), localisée à la surface de la cellule ainsi que dans le cytoplasme, cette protéine induite par le stress intervient comme régulateur de la signalisation cellulaire, elle régit la morphogénèse et influence la résistance aux antifongiques (Lucy Xie et al., 2014 ; Shapiro et al., 2012).

1.5.1. Les polyènes

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

Un phénomène qui est qualifié de rare mais existant, il s'agit d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques, voire une absence totale, par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (figure n° 2), les mécanismes de résistance aux polyènes sont décrits chez *Candida* et *Saccharomyces cerevisiae*, la délétion du gène ERG3 et ERG6 est responsable de ce type de résistance chez *C. albicans* (Spampinato et Leonardi, 2013).

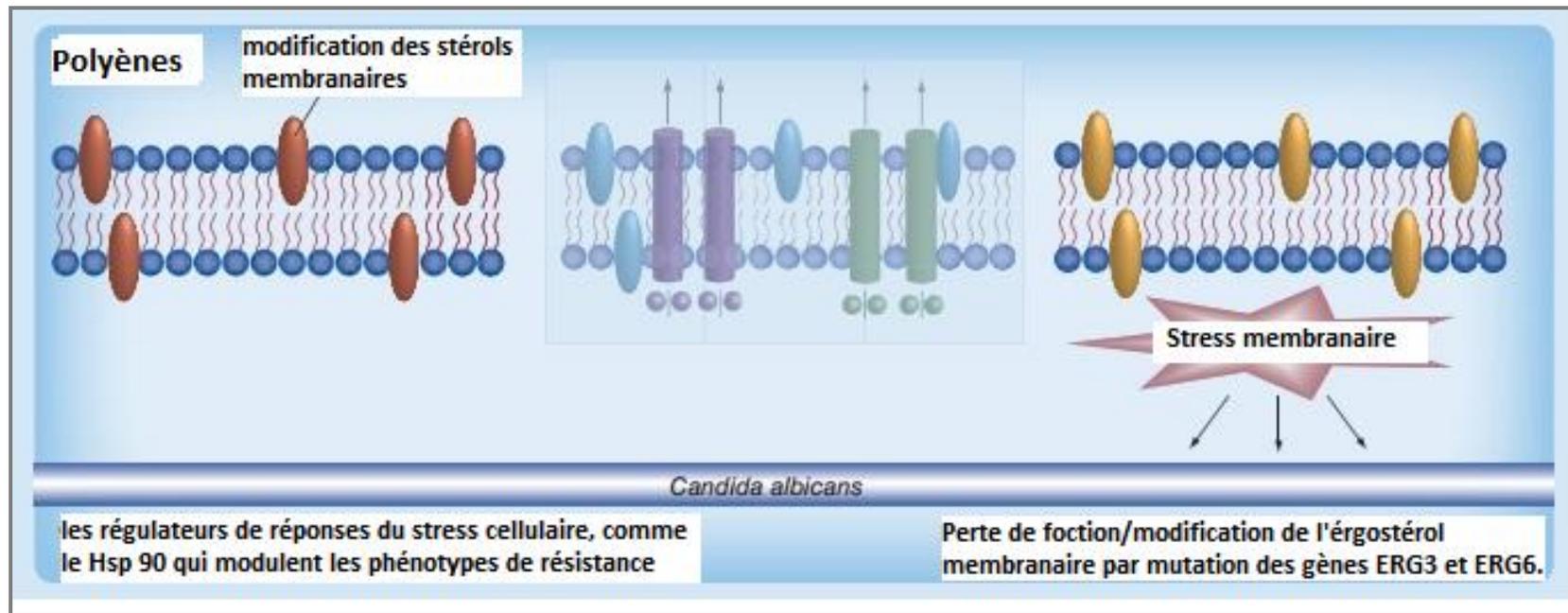


Figure n° 2 : Mécanismes de résistance aux polyènes chez *C. albicans* (Lucy Xie et al., 2014).

1.5.2. Les fluoropyrimidines

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

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

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

Le mécanisme de résistance au 5-fluorocytosine est résumé dans la figure n° 3.

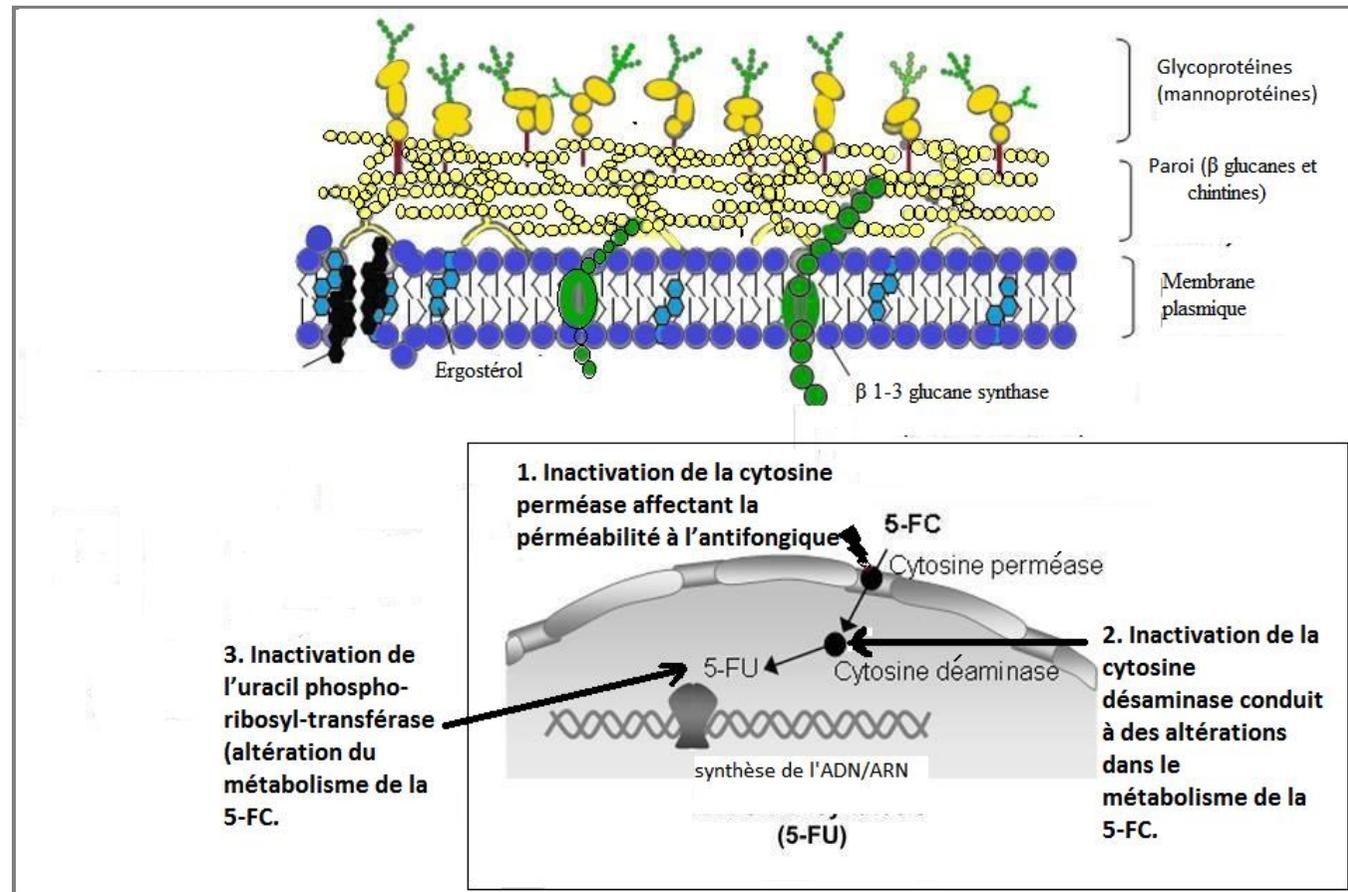


Figure n°3 : Mécanismes de résistance aux 5-fluorocytosine (Ben-Ami et al., 2008).

1.5.3. Les azolés

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

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

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

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

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

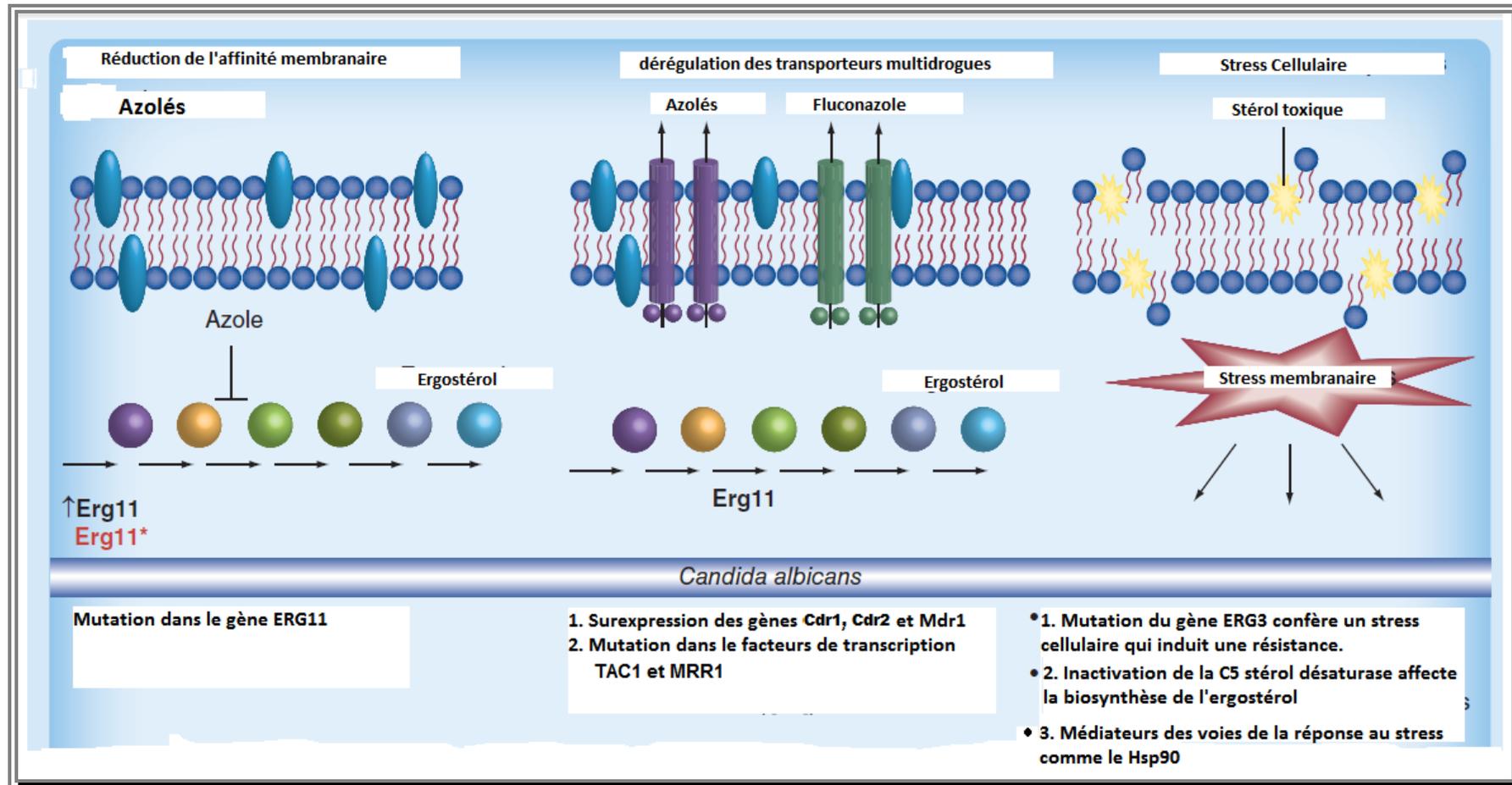


Figure n°4 : Mécanismes de résistance aux azolés chez *C. albicans* (Lucy Xie et al., 2014)

1.5.4. Les échinocandines

La résistance aux échinocandines reste un phénomène assez rare (**Espinel-Ingroff, 2008**), certains travaux ont pu mettre en évidence le mécanisme moléculaire de la résistance (figure n° 5), il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes FKS1 ou FKS2 gène codant pour la β 1,3-glucane synthase chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* (**Balashov et al., 2006 ; Park et al., 2005**), le mécanisme de résistance fut également observé chez *C. glabrata* (**Park et al., 2005**), et *C. krusei* (**Kahn et al., 2007**).

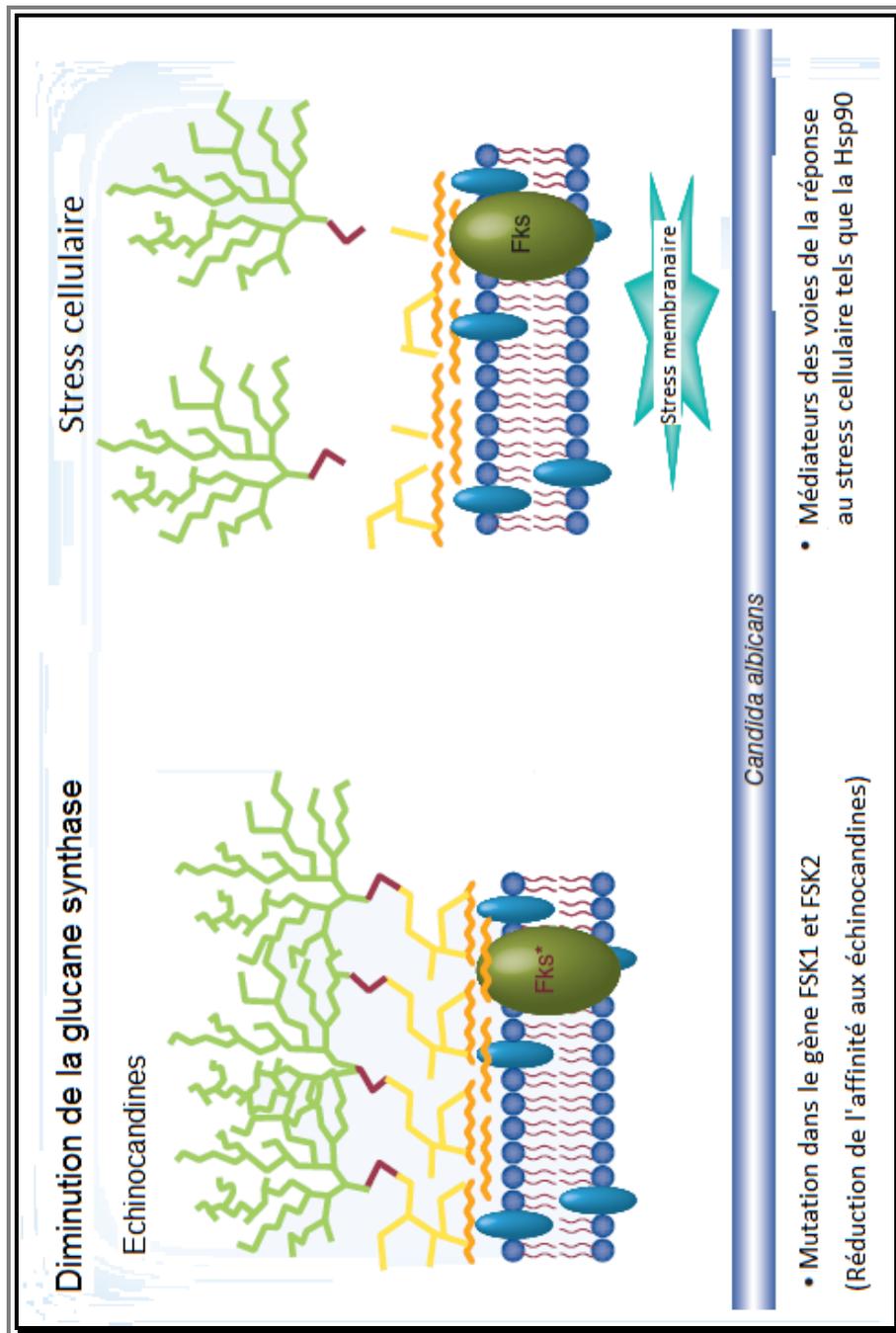


Figure n°5 : Mécanismes de résistance aux échinocandines chez *C. albicans* (Lucy Xie et al., 2014).

Le tableau n° 1 résume les mécanismes de résistance aux antifongiques chez *C. albicans*.

Tableau n° 1 : Mécanismes génétiques et fonctionnels de la résistance aux antifongiques.

Classe d'antifongique	Mécanisme génétique de la résistance	Mécanisme fonctionnel de la résistance
Polyènes (Espinel-Ingroff, 2008 ; Kelly et al., 1997 ; Vandeputte et al., 2007)	Mutation dans le gène ERG3 et ERG6	Diminuer, et/ou, supprimer l'ergostérol de la membrane.
5-Fluorocytosine (Espinel-Ingroff, 2008 ; Pemán et al., 2009)	Mutation dans le gène FCY2	Inactivation de la cytosine perméase affectant la perméabilité à l'antifongique.
	Mutation dans le gène FCY1	Inactivation de la cytosine désaminase conduit à des altérations dans le métabolisme de la 5-FC.
	Mutation dans le gène FUR1	Inactivation de l'uracile phosphoribosyl-transférase (altération du métabolisme de la 5-FC.
Azolés (Noël, 2012)	Dérégulation du Crd1/Crd2 et Mdr1 par mutation dans les facteurs de transcription TAC1 et MRP1.	Dérégulation dans les ABC transporteurs.
	Mutation dans le gène ERG11	Réduction de l'affinité par diminution de la 14- α -déméthylase.
	Duplication des facteurs de transcription par mutation du gène ERG11	Augmentation du nombre de la 14- α -déméthylase.
	Mutation dans le gène ERG3	Inactivation de la C5 stérol désaturase affectant la synthèse de l'ergostérol.
Echinocandines (Balashov et al., 2006 ; Kahn et al., 2007 ; Park et al., 2005)	Mutation dans le gène FKS1 et FKS2	Diminution de la glucane synthase (réduction de l'affinité aux échinocandines).

2. La chimiothérapie antibactérienne

2.1. Origine des antibiotiques

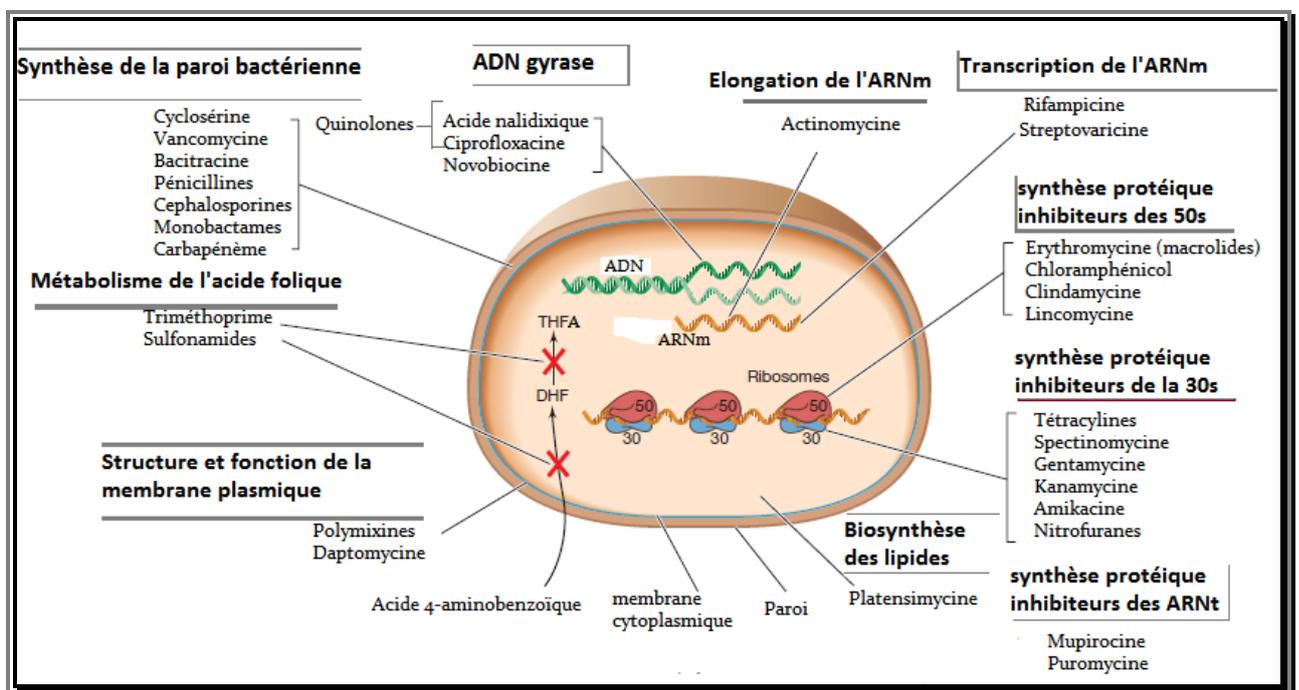
L'antibiothérapie est désignée comme une chimiothérapie antibactérienne, un traitement par antibiotique à des fins curatives ou préventives (prophylactiques), il s'agit le plus souvent d'une monothérapie, parfois une bithérapie, voire une trithérapie dans certains cas comme pour le traitement de la tuberculose (Denyer et al., 2004). Les antibiotiques sont obtenus par voies :

Naturelles issues de microorganismes, la majorité des antibiotiques d'origines naturelles commercialisés sont produits par les actinomycètes comme la streptomycine.

Ou semi-synthétiques, représentées par des molécules d'origine naturelle ayant subi une modification par l'addition de groupes chimiques supplémentaires dans le but de les rendre moins sensibles à l'inactivation par les microorganismes, aussi, beaucoup d'antibiotiques semi-synthétiques présentent un spectre d'activité plus large que la molécule d'origine, la pénicilline V et la méthicilline en sont de bons exemples (willey et al., 2008).

2.2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les mécanismes d'action des principaux antibiotiques au niveau de la cellule bactérienne sont illustrés par la figure n° 6.



DHF : acide dihydrofolique ; THFA : acide tétrahydrofolique (précurseur de l'acide folique).

Figure n° 6 : Mécanisme d'action des principaux antibiotiques (Madigan et al., 2012).

2.2.1. La platensimycine

Une molécule antibactérienne d'une classe précédemment inconnue, d'origine naturelle isolée de *Streptomyces platensis*, découverte en 2006, cette molécule montre une activité à large spectre contre les bactéries Gram positives, son mode d'action réside dans l'inhibition de la biosynthèse lipidique cellulaire, par ciblage spécifique des beta-cétoacyl-ACP synthase I/II (FabF/B) (une enzyme de type acyltransférase) dans la voie de synthèse des acides gras, aussi cette molécule a montré une activité sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, vancomycine intermédiaire (Allahverdiyev et al., 2013 ; Wang et al., 2006).

2.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est principalement rencontrée chez les microorganismes pathogènes, spécialement aux soins intensifs, elle se présente par plusieurs formes et fait intervenir une multitude de mécanismes.

2.3.1. Types de résistances

2.3.1.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est présente chez toutes les souches d'une espèce bactérienne donnée, par l'expression d'une protéine innée empêchant l'antibiotique d'accéder à sa cible, C'est par exemple le cas des *Escherichia coli* vis-à-vis de la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosae* face à l'ampicilline (Madigan et al., 2012).

2.3.1.2. La résistance acquise

Elle est apparue avec l'emploi d'une antibiothérapie chez une espèce bactérienne initialement sensible, elle est donc évolutive, il en existe deux types.

a. Chromosomique : conséquence d'une mutation qui apparaît dans le chromosome, elle peut inclure toute la famille d'un antibiotique, c'est un processus spontané qui se produit par exemple dans le gène qui code pour une protéine ciblé par l'antibiotique, rendant ce dernier inefficace contre ce mutant.

b. Plasmidique : le plasmide qui contient le gène de résistance peut se transmettre en générale par conjugaison permettant ainsi la propagation rapide des résistances, souvent plusieurs gènes de résistance peuvent se regrouper chez un seul plasmide (Madigan et al., 2012).

2.3.2. Principaux mécanismes biochimiques de résistances aux antibiotiques

2.3.2.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Dans l'espace extracellulaire (bactéries Gram positives) ou périplasmique (bactéries Gram négatives), les pénicillines peuvent rencontrer des β -lactamases (pénicillinases et céphalosporinases) produites par la bactérie, et qui ouvre le cycle β -lactame de l'antibiotique (Gaudy et Buxeraud, 2005).

2.3.2.2. Modification de la cible

Celle-ci peut se produire à la suite d'une seule mutation sur le site de fixation de l'antibiotique, La résistance est consécutive à la diminution de l'affinité du β -lactame vis-à-vis des PLP (protéines liant les pénicillines), une augmentation de la biosynthèse des PLP ou l'induction de nouvelles PLP de faible affinité pour l'antibiotique. Chez les Gram positifs, ces divers mécanismes sont à la base de la résistance de *Staphylococcus aureus*, de *Streptococcus pneumoniae* et des entérocoques (**Gaudy et Buxeraud, 2005**).

2.3.2.3. Mécanisme d'efflux

Par rejet de l'antibiotique une fois qu'il parvient à entrer dans la cellule, par le biais de « pompes effluentes » présentes dans la membrane plasmidique, des transloquases qui permettent d'expulser l'antibiotique, ce mécanisme se trouve notamment chez *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* et *S. aureus* (**Gaudy et Buxeraud, 2005 ; Prescott et al., 2003**).

2.3.2.4. Diminution de la perméabilité membranaire (absence de pénétration)

Ce phénomène peut être naturel ou acquis, certains antibiotiques ne pénètrent dans la cellule que grâce à une perméase spécifique, c'est le cas de la streptomycine, l'absence ou le non fonctionnement de cette perméase rend la cellule imperméable à l'antibiotique en question (**Gaudy et Buxeraud, 2005 ; Prescott et al., 2003**).

3. Les infections nosocomiales

3.1. Définition d'une infection nosocomiale

Une infection nosocomiale est une maladie provoquée par des microorganismes contractée dans un établissement de santé, absente lors de l'admission du patient à l'hôpital, elle se développe dans les 48 heures au moins après l'admission, ce délais s'allonge jusqu'à 30 jours dans le cas d'une infection post opératoire, et jusqu'à un an s'il y a mise en place de matériel prothétique c'est-à-dire même si le patient est sorti de l'hôpital (**Le Loir et Gantier, 2009**).

3.2. Epidémiologie

Sur le plan financier une infection nosocomiale entraîne un surcout en raison de la prolongation de la durée d'hospitalisation (plus de 10 jours) et de l'emploi supplémentaire de médicaments et de matériel de soins, l'importance de ce problème a conduit la plupart des établissements hospitaliers à consacrer des ressources importante et des programmes pour la surveillance et le contrôle de ces infections (**Pebret, 2003 ; Prescott et al., 2003**).

Sur le plan statistique, les infections nosocomiales les plus fréquentes sont :

Des infections urinaires (32%).

Des infections post opératoires (chirurgicales) (22%).

Des infections respiratoires (15%).

Bactériémies et septicémies (14%)

Autres (17%) (**Madigan et al., 2012**).

Sur le plan bactériologique, les bacilles à Gram négatif (*E.coli* essentiellement) représentent environ 60% des germes responsables, et les cocci à Gram positif (*S.aureus*) en représentent pré de 30% (**Pebret, 2003**).

Enfin, les champignons et les levures avec *C. albicans* en tête des infections nosocomiales graves (**Euzéby, 2008**). Tous ces germes sont d'autant plus redoutables parce qu'ils présentent dans la plupart des cas une résistance multiple aux antibiotiques (**Prescott et al., 2003**).

3.3. Les infections nosocomiales à *Escherichia coli*

3.3.1. Physiopathologie

Les infections nosocomiales urinaires sont le plus souvent causées par *E. coli*, elles représentent pré de 90% des infections des cas recensés (**Madigan et al., 2012**), avec pour facteurs de risques principaux, le sexe féminin, la grossesse, le diabète, la diarrhée, l'alitement et une antibiothérapie préalable (**Berrebi, 2005**), de plus, la pathologie ne se présente pas de la même façon chez l'homme, la femme et l'enfant (**Page et al., 1999**).

3.3.2. Résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli*

La résistance des souches d'*E. coli* aux quinolones survient principalement par mutation chromosomique ou le transport transmembranaire. Il a été observé que l'acide nalidixique permettait une résistance plus rapide et facile, et n'est donc plus recommandée dans le traitement des infections urinaires, depuis lors, la sensibilité des souches d'*E.coli* a cet antibiotique ainsi qu'à la classe des fluoroquinolones est vivement observée (**Batard et al., 2012**), l'étude de **Fabre et al., (2010)** montrent que Les fluoroquinolones restent actives sur les souches d'*E.coli* responsables d'infections urinaires de la femme âgée de 15 à 65 ans alors que les taux de résistance acquise à ces molécules peuvent poser problème chez l'homme et chez la femme de plus de 65 ans (**Fabre et al., 2010**).

3.4. Les infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus*

3.4.1. Physiopathologie

Cet agent commensale de la peau et des muqueuses et également présent sur les surfaces inertes (d'où la transmission facile) qui peut être à l'origine d'infections suppuratives fréquentes qui apparaissent sous des aspects cliniques très variées, appartenant au groupe des bactéries « pyogènes », elles conduisent à la formation d'abcès ou d'inflammations diffuses des tissus sous cutané ou sous-muqueux, capable de produire une batterie d'enzymes et de toxines, ces facteurs de virulences ont pour rôle soit d'empêcher la phagocytose, soit de survivre à l'intérieur même des phagocytes et de détruire les tissus. (**Benhamou et al., 2005 ; Schaechter et al., 1999**).

3.4.2. Résistance aux antibiotiques des infections à *S.aureus*

Le traitement des infections staphylococciques se fait d'abord par le drainage de l'abcès ensuite une antibiothérapie appropriée est administrée au patient, la survenue précoce des souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline dès les années 60, par la suite l'émergence rapide des souches résistantes à la méthicilline (SARM) dès les années 80 a posé de graves problèmes thérapeutiques, c'était sans surprise connaissant les facultés d'adaptation de cet organisme (**Benhamou et al., 2005**).

La résistance à la méthicilline et aux β -lactamines relève de deux mécanismes, l'hydrolyse par des pénicillinases et modification des PLP (protéines de liaison aux pénicillines), cette résistance est souvent liée à une résistance aux fluoroquinolones, cependant ces souches restent sensibles aux glycopeptides, la rifampicine, la fosfomycine et certains aminosides, cependant l'utilisation de ces aminosides doit être discutée en tenant compte de la néphrotoxicité de l'association glycopeptide- aminoside ; reste la rifampicine qui semble être rapidement actif contre *S. aureus*, toutefois, la sélection de plus de mutant résistant pose un réel problème thérapeutique.

Récemment, la découverte de la platensimycine produite par *Streptomyces platensis* qui possède un large spectre sur les bactérie Gram positives et sur les *S. aureus* résistants à la méthicilline a donné un nouvel issue thérapeutique (**Madigan et al., 2012**).

Cependant, selon la littérature médicale, la vancomycine demeure le traitement de première intention des infections causées par le SARM, sauf dans le cas d'allergie, d'intolérance ou de contre indications (**Michel, 2013**).

4. Les levures

Les levures sont des organismes microscopiques eucaryotes, unicellulaires ou qui présentent dans leur cycle biologique une phase unicellulaire prépondérante, dépourvus de chlorophylle, de formes ovoïdes ou sphériques possédant une paroi cellulaire rigide, la majorité d'entre elles se divisent par bourgeonnement, une minorité par division binaire comme les bactéries, et certaines d'entre elles peuvent donner une forme mycélienne (thalles pluricellulaires) (**Meyer et al., 2004**).

5. Les infections fongiques

Les mycoses ou infections fongiques sont des maladies causées par des levures ou des moisissures, en pathologie humaine, elles sont classées en trois catégories selon la profondeur des tissus atteints :

5.1. Les mycoses cutanées ou superficielles

Touchent la couche extérieure de la peau (l'épiderme), les cheveux et les ongles, également appelée dermato-mycoses ou teignes inflammatoires, elles sont cosmopolites, très courantes

mais le plus souvent bénignes comparé aux mycoses profondes, généralement causées par les dermatophytes (**Liozon, 2010**).

5.2. Les mycoses sous-cutanées

Elles touchent la peau, les tissus sous-cutanés et parfois les os. Les dermatophytes causant les mycoses sous-cutanées sont des saprophytes du sol et des végétaux en décomposition, introduits dans le tissu sous-cutané par contamination des plaies, la maladie se répand lentement (parfois après des années suivant la contamination) elle touche en générale les fermiers, les éleveurs et les professions en étroite relation avec la terre et les végétaux (**Ripert, 2013**).

5.3. Les mycoses profondes ou viscérales

Touchent principalement les organes internes, les poumons en premier lieu, elles sont le plus souvent causées par les spores de moisissures inhalées par des sujets dont le système immunitaire est plus au moins affaiblie, elles trouvent le terrain favorables, disséminées dans l'organisme par voie hématogène (**Alangaden, 2011**).

6. *Candida albicans*

6.1. Taxonomie

La classification du genre *Candida* donnée par **Euzéby, (2008)** est comme suit :

Règne : *Fungi*

Division : *Ascomycota*

Subdivision : *Ascomycotina*

Classe : *Ascomycetes*

Ordre : *Saccharomycetales*

Famille : *Saccharomycetaceae*

Genre : *Candida*

6.2. Morphologie et reproduction

Une caractéristique frappante chez *C. albicans* est sa capacité à croître sous différentes formes morphologiques, à l'état commensal, elle est présente sous forme de blastospores (**Figure n° 6**, schéma a), de petites cellules qui se reproduisent par bourgeonnement, dans les conditions favorables (milieu de culture spécifique, invasion dans le sérum ou chez les individus) les blastospores filles restent attachées les unes aux autres donnant ainsi naissance à un pseudo-mycélium, forme caractéristique du genre *Candida* (**figure n° 6**, schéma c) (**Gil et al., 1990 ; Ripert, 2013**).

L'organisation cellulaire de *C. albicans* renferme les composants cellulaires des cellules eucaryotes à savoir :

6.2.1. Une paroi : est une structure très importante qui donne à la cellule sa forme et sa rigidité, les principales fonctions de la paroi sont le maintien de la pression osmotique et la résistance aux agressions physiques, chimiques et biologiques, aussi étant la première structure en contact avec l'extérieur, elle contribue à la reconnaissance des surfaces, à la réception des stimuli externes, et à la perméabilité sélective, et enfin à l'accumulation de molécules importantes pour la physiologie de la cellule et de sa nutrition (figure n° 7) (**Ruiz-Herrera et al., 2006 ; Ruiz-Herrera, 2012**).

Environ 80% de la composition de la paroi de *C. albicans* est représentée par des carbohydrates (polysaccharides) à savoir :

Des polymères ramifiés de glucose branchés en β 1,3-glucane et β 1,6-glucane ; cette composition varie en fonction de l'état morphologique des blastospores aux formes mycélienne, ces glucanes forment un squelette rédige grâce aux liaisons glycosidiques avec la chitine, autre composant de la paroi fongique (**Ruiz-Herrera et al., 2006**), ils auraient également un rôle dans la pathogénicité en inhibant les fonctions des monocytes et des cellules T de façon indirecte (**Nakagawa et al., 2003**).

Des polymères de mannoses appelés mannanes, associés à des protéines (manno-protéines) par des liaisons covalentes, représentent environ 40% des polysaccharides et forment ainsi la matrice de la paroi, les mannanes sont fortement immunogène et sont impliqués dans la réponse immune, grâce aux techniques immunologiques performantes, il est possible de détecter les résidus oligomannoses liés en α relargués dans le sérum, cependant, ce test fut abandonné en conséquence, d'une part, de la non distinction entre les patients colonisés et infectés, et d'autres part, l'absence de réponse anticorps chez les immunodéprimés qui sont souvent transfusés (**Bretagne, 2007**).

Et des polymères de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) associés par des liaisons β -1,4 (**Ruiz-Herrera, 2012**), malgré leur pourcentage réduit dans la paroi, ces molécules jouent un rôle majeur dans la formation d'un anneau de constriction pour la séparer la cellule mère de la cellule fille (**Molano et al., 1980**).

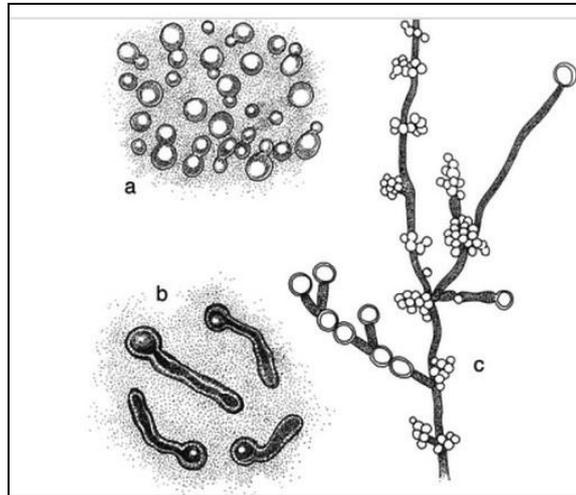
Il existe également des protéines, certaines sont N- et/ou O-glycosylées et possède des caractéristiques tels que chez les glycosyl phosphatidylinositol ou GPI, les protéines GPI sont les plus importantes (**Ruiz-Herrera et al., 2006**), il existe également des enzymes tels que la N-acétyl-glucosamidase, la phosphatase acide, la protéinase, la glucanase et la chitinase (**Chaffin et al., 1998**).

Les lipides, composés mineurs de la paroi de *C. albicans*, ils existent sous formes de phospholipides, triglycérides, et de stérols libres ou estérifiés, ils jouent un rôle important dans l'adhérence aux cellules épithéliales chez les humains (**Chaffin et al., 1998**).

6.2.2. Une membrane plasmique : qui est constituée de deux feuillet membranaires, elle assure le transport actif d'acides aminés, d'oses et de différents ions, aussi elle joue un

rôle dans la régulation d'efflux servant ainsi à maintenir la pression osmotique dans la cellule (Prescott et al., 2010).

6.2.3. Des organites intracellulaires : un noyau, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des vacuoles digestives et une batterie enzymatique qui varie en fonction du stade morphologique surtout durant la germination (Ripert, 2013).



a : levures et blastospores en culture sur milieu à l'extrait de mal (3jours à 25°C), **b :** filamentation en sérum (blastospores bourgeonnantes) (2heures à 37°C), **c :** pseudo-mycélium avec amas de blastospores et chlamydospores (milieu gélosé à la pomme de terre à 25°C).

Figure n° 7 : Reproduction chez *Candida albicans* (Ruiz-Herrera et al., 2006).

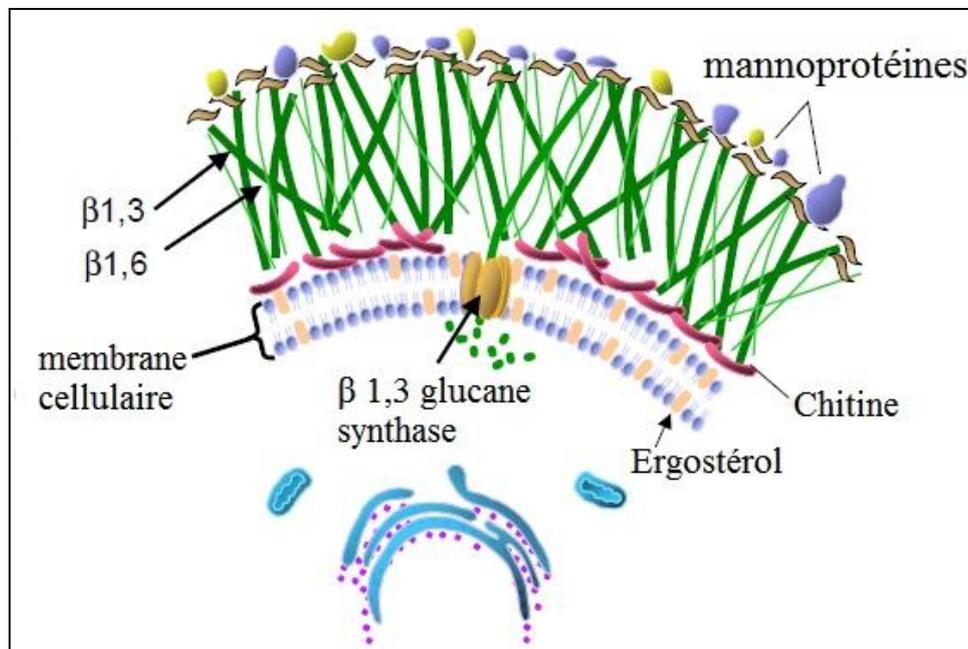
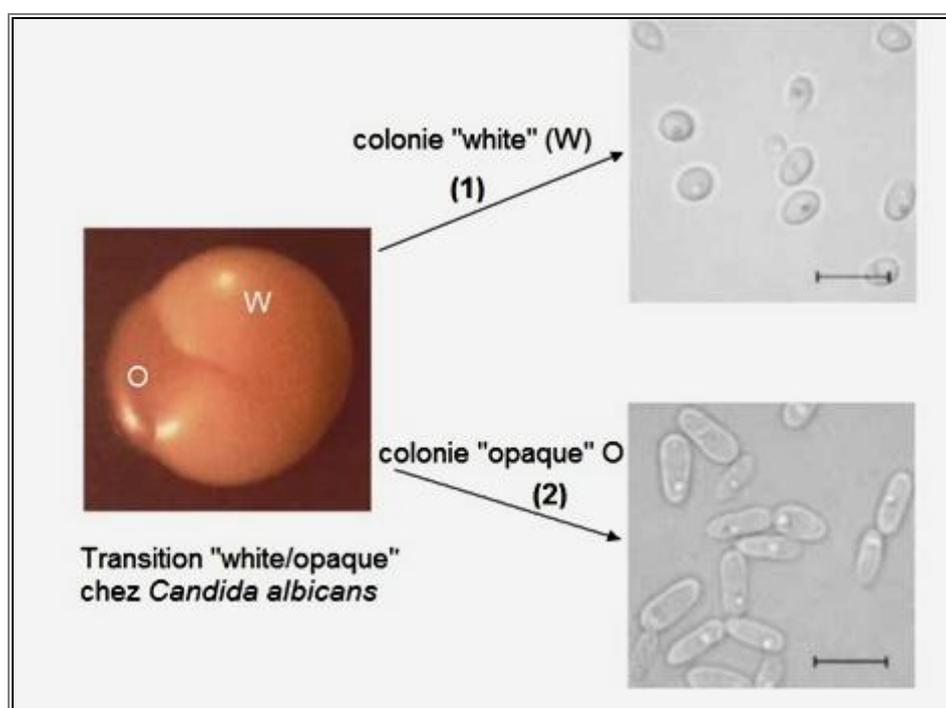


Figure n° 8 : Structure et représentation schématique de la paroi cellulaire de *Candida albicans* (Diamond, 2000).

6.3. La variation « white/opaque » chez *C. albicans*

Cette levure est caractérisée par une variation alternative qui correspond à une différenciation morphologique et physiologique des cellules, ces transitions sont réversibles, mais elles restent stables pendant de nombreuses divisions cellulaires (Soll et al., 1993), la variation « white/opaque » figure parmi les transitions les plus étudiées, les cellules ronds formant des colonies blanches « white » se transforment en cellules plus allongées à paroi rugueuse caractérisées par des colonies plus foncées « opaque », ces cellules diffèrent des premières par l'expression de leurs gènes (Miller et Johnson, 2002), ces derniers sont impliqués dans certaines fonctions tels que la conjugaison, l'adhésion, la réponse au stress ainsi que la résistance aux antifongiques, ils sont également considérés comme facteur de virulence (figure n° 9) (Kvaal et al., 1999).



La transition est observé sur la colonie, (1) aspect microscopique de la colonie « white » blastospores de formes ronds, (2) représente l'aspect allongé de la colonie opaque. La barre est égale à 10µm.

Figure n° 9 : Transition « White/opaque » d'une souche représentative de *C. albicans* et aspect microscopique des deux colonies d'après Miller et Johnson (2002).

6.4. Outils d'identification des levures du genre *Candida*

6.4.1. Conditions de culture chez *C. albicans*

Ces levures sont peu exigeantes sur le plan nutritif, elles ont la capacité de croître sur différents milieux de cultures, à savoir, la gélose nutritive, Sabouraud, Sabouraud + chloramphénicol ou Sabouraud + gentamicine, ces deux derniers sont utilisés afin d'inhiber la croissance bactérienne.

La mise en culture peut se faire à 25°C, 28°C et 37°C, la lecture se fait après 24 ou 48 heures, les colonies sont petites, de 1 à 2 mm de diamètre, blanches, crémeuses, lisses et brillantes l'examen microscopique montre des formes ovoïdes caractéristique des blastospores (Vaubourdolle, 2007).

6.4.2. Outils d'identification traditionnels

Dans un laboratoire de mycologie médicale, un des rôles principaux est d'identifier les levures isolées à partir de prélèvements biologiques superficiels ou profonds, en générale, l'identification d'espèces de *Candida* fait appel à la détermination de caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et antigéniques, il existe sur le marché, de nombreuses outils et techniques d'identification commerciales (Chabasse et al., 2008).

6.4.2.1. L'examen direct (Vaubourdolle, 2007).

Cette stratégie est basée sur l'examen direct des prélèvements biologiques, en utilisant des colorations spécifiques ou non spécifiques de ces agents fongiques ou des réactifs pour la mise en évidence instantanée de blastopores et/ou de pseudo-filaments.

a. Les colorants non spécifiques

Le bleu de méthylène : coloration des levures en bleu.

Le noir de chlorazole : qui colore la paroi des éléments mycéliens en vert

Le May-Grunwald-Giemsa (MGG) : principalement utilisée en hématologie, contient un colorant acide (éosine) et un autre basique (bleu de méthylène) colore les constituants fongiques (rose et violet).

b. La coloration spécifique de Musto (coloration de Gomori-Grocott modifiée) permet l'imprégnation argentique de chitine, composant de la paroi fongique

c. Coloration fluorescente

La valeur de cet examen varie en fonction de la nature du prélèvement et le caractère pathogène de la levure ne pourra être affirmé qu'après confrontation aux symptômes, en parallèle, la croissance sur les milieux chromogènes est privilégiée afin d'isoler l'agent pathogène et notamment, pour réaliser un antifongigramme.

6.4.2.2. Culture

La croissance de ces levures peut se faire sur les milieux de cultures, commerciaux ou préparés aux laboratoires, avec comme référence, le milieu Sabouraud (milieu d'isolement des levures).

a. Milieux non spécifiques comme le milieu Sabouraud.

b. Milieux spécifiques (Euzéby, 2008)

Destinés à la mise en évidence de l'aptitude de *C. albicans* à produire des chlamydospores, après culture à 37°C pendant 24 heures.

Le milieu CMA « corn meal agar » : gélose à la farine de maïs.

Le milieu PCB : gélose l'extrait de pommes de terre, de carottes et de bile de bœuf.

Le milieu RAT : « Rice Tween Agar » gélose à la crème de riz et contenant du tween 80.

c. Milieux chromogènes (Pihet et Marot, 2013)

La culture sur milieu chromogène est basée sur l'activité enzymatique de type hexosaminidase, la croissance des bactéries y est également inhibée, la forme et taille des colonies nécessite 48 h d'incubation (vitesse de croissance est plus lente) par ailleurs, ces milieux offrent un gain de temps puisque l'identification de *C. albicans* est donné dès l'isolement sans repiquage ultérieur, *C. albicans* se présente avec des colonies **bleu** sur les milieux Candida ID 2 (bioMérieux), Candichrom (ELITech Microbio), ChromID (bioMérieux) ; et en **vert** sur les milieux : CHROMagar *Candida* (Becton- Dickinson), OCCA (Oxoid) ou **en rose-violet** sur le milieu CandiSelect 4 (Bio-Rad)

d. Milieux fluorogènes (Euzéby, 2008)

Des milieux de cultures commercialisés destinés à l'identification rapide de *C. albicans* (moins de 5 heures d'incubation), utilisés pour la détection de la β -galactosaminidase, la fluorescence est observée sous lumière noire :

Le milieu fluoroplate avec comme substrat la 4 méthyl umbelliféryl-N-acétyl- β -D galactosaminide.

Le milieu SDCA-MUAG avec comme substrat le 4MU N-acétyl galactosaminide.

6.4.2.3. Identification biochimique (Pihet et Marot, 2013)

Les tests biochimiques utilisables sur les colonies isolées (pures) peuvent également être réalisées afin d'identifier *C. albicans*, trois dispositifs sont actuellement commercialisés, basées sur la recherche de la β -galactosaminidase et L-proline amino-peptidase, uniquement pour *C. albicans*, les autres espèces peuvent présenter une des activités mais pas les deux associées.

Le test Murex *C. albicans* (Murex Diagnostic) est un test colorimétrique dont le résultat est obtenu en 30 minutes.

Les deux tests Albicans-sure (Clinical Standards Laboratories) et Bactocard *Candida* (Remel CO) utilisent un substrat couplé à un dérivé de l'umbelliférol (composé chimique) et nécessite un dispositif de lecture de la fluorescence émise (lampe à lumière noire).

Les galeries biochimiques se base sur la capacité que possède certaines levures généralement et les *Candida* spécifiquement à assimiler ou fermenter une multitude de sucres, un large

panel de dispositifs miniaturisé et standardisé est commercialisé, ces tests restent limités du fait que certaines galeries peuvent être identiques pour deux espèces différentes, cette identification doit aussi prendre en compte les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

Galerie API 20 C AUX : qui permet l'identification des levures les plus couramment rencontrées et *C. albicans* notamment.

Galerie API CANDIDA® qui assure l'identification en 18 à 24 heures de *C. albicans* et de dix autres espèces.

Galerie ID32C : concerne un plus grand nombre de levures, plus utilisée, la galerie ID32C contient 32 cupules contenant chacune un substrat glucidique déshydraté, utilisant un milieu minimal semi-solide, le résultat positif se traduit par un trouble observé au niveau de la cupule.

Test d'agglutination sur des particules de latex.

Test de germination : appelé également test de blastère, après 2 à 4 heures à 37°C, le résultat positif se traduit par la formation de tubes germinatifs à partir d'une blastospore.

Bichrolatex albicans Fumouze : le résultat positif se traduit par une agglutination en 5 mn.

6.4.2.4. Identification immunologique

Une identification utile que dans les candidoses systémiques.

a. Détection des anticorps

L'étude antigénique de *C. albicans* a révélé la présence de 2 sérotypes A et B, les principales techniques utilisées en sérodiagnostic sont : l'Elisa, l'immunofluorescence indirecte, et l'immunoélectrophorèse (Pihet et Marot, 2013).

b. Détection des antigènes circulants

Elle est utilisée chez les immunodéprimé où la synthèse des anticorps peut être faible, la recherche d'antigènes mannanes peut être réalisée par des techniques d'agglutination ou par Elisa (Vaubourdolle, 2007).

Les meilleurs résultats ont été obtenus en couplant la recherche de Mn (Platelia®Candida Ag, BioRad) et celle d'Ac circulants anti-Mn (Platelia®Candida Ac, BioRad). Les évaluations rétrospectives ont porté sur des populations diverses, incluant des patients neutropéniques ou non. Ainsi, 84 % des patients avec une candidose tissulaire à *C. albicans* sont positifs à l'un des deux tests (Bretagne, 2007).

6.4.3. Identification moléculaire

Utilisées dans le diagnostic, malgré les avancées des techniques moléculaire, ce genre d'identification reste limité, en raison de longue durée (48 à 96) avant d'identifier l'espèce, et le coût relativement élevé par rapport aux autres techniques, les cibles visées correspondent à des séquences hautement conservées chez les champignons, notamment les région ITS situées sur les gènes codant pour l'ARN ribosomal 5S, 8S, 18S, et 28S sont les plus utilisées (**Pihet et Marot 2013**).

6.4.4. Identification par Maldi-Tof (Dhiman et al., 2011)

L'instrument Maldi-Tof est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF : *time of flight mass spectrometry*), cette nouvelle technique permet l'identification de microorganismes en analysant directement leurs protéines.

Un des avantages majeurs de cette technique réside dans sa rapidité d'analyse, l'identification d'une colonie obtenue à partir d'une culture, le résultat est connu en quelques minutes, contrairement aux autres techniques qui nécessitent 24 à 48 heures, ces heures qui peuvent être précieuse lors du diagnostic.

Dans l'étude de **Dhiman et al.**, (2011), cette a été estimée à environ 0,5 \$ (soit environ 0,3 €), cout qui est largement inférieure à celui des techniques traditionnels.

6.5. Pathologies dues à *Candida*

Les infections provoquées par les levures du genre *Candida* touchent le plus souvent les muqueuses, mais dans les cas les plus graves, elles se répandent sous formes de candidoses systémiques parfois mortelles, le principal pathogène est *C. albicans* bien que d'autres espèces comme *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, et *Candida krusei* puissent également infecter l'homme (**Pfaller et Diekema, 2007 ; Ripert, 2013**).

6.5.1. Candidoses cutanées superficielles

Elles touchent aussi bien l'épiderme, les replis cutanés chauds et humides, les plis de l'aîne sous mammaire, touche également l'épithélium des muqueuses (cavité buccale et vaginale) dont le diagnostic est plus au moins facile (**Pfaller et Diekema, 2007**).

6.5.2. Candidose buccales

Egalement appelées « muguet », ces candidoses sont plus fréquente chez les nouveau-nés, le diagnostic n'est vraiment difficile du fait de la présence de petites taches blanchâtre qui couvrent progressivement toute la langue et la face interne de la bouche donne ce qu'on appel une stomatite aigue, une fois que le nouveau-né développe sa propre flore commensale, l'incidence de ces candidoses diminue en conséquence (**Prescott et al., 2010 ; Saint-Jean et al., 2010**).

6.5.3. Intertrigo

Ce sont des dermatites qui touchent les plis cutanés, à savoir les surfaces inter-mammaires, axillaires, inguinales, interdigitales, ou encore les plis de peau redondante chez les personnes en surpoids (**Kalra et al., 2014 ; Janniger et al., 2005**), l'intertrigo des doigts est plus fréquent chez la femme, marqué par un aspect fissuraire et macéré, aux pieds, l'atteinte au niveau des plis est appelée « pied d'athlète » en référence à son grande incidence chez les sportifs (**Molinier et al., 2008**).

6.5.4. Candidoses périnéales et vaginales

Chez l'homme, les candidoses périnéales, sont rares et dues le plus souvent à une contamination sexuelle, plus sensibles chez les immunodéprimés notamment les sidéens et les diabétiques.

Chez la femme, les candidoses vaginales sont plus fréquentes chez les femmes adultes, elles peuvent être modérées ou récidives allant à 4 épisodes dans l'année, représentent une pathologie assez sensible car elles provoquent un gêne physique et social réel.

Chez le jeune enfant, elles peuvent être due à la prise d'antibiotiques, avec notamment la présence d'un muguet ou d'une diarrhée, elles touchent le plus souvent les plis anales et parfois la vulve chez le sexe féminin (**Viguié-Vallanet, 2005**).

6.5.5. Candidoses œsophagiennes

Elles représentent la principale infection opportuniste digestive chez les sidéens, avec près de 90% des patients sont touchés par cette pathologie au cours de leurs vies (**Vazquez, 2010 ; Nishimura et al., 2013**), caractérisée par une symptomatologie non spécifique, elle se manifeste avec une plaque blanchâtre adhérent à la muqueuse et parfois ulcérée, dans les cas les plus graves elles peuvent complètement obstruer la lumière œsophagienne, la mise en évidence de *Candida* nécessite le frottis de la muqueuse par brossage (**Girard et al., 2007**).

6.5.6. Candidoses profondes

Représentées par une **candidémie** et une **septicémie** qui se traduit par la dissémination de la levure à travers l'organisme et l'atteinte des organes vitaux, elles sont caractérisées par une prévalence inquiétante durant ces vingt dernières années et avec un taux de mortalité important, malgré le développement des dispositifs de surveillance et de prévention, certains facteurs de risques augmentent cette incidence, chez les patients, l'immunodéficience (pathologies affectant l'immunité, greffes d'organes, l'implantation de cathéters ou de sondes urinaires), et du côté médicale, les dispositifs prophylactiques tels que l'antibiothérapie à large spectre (**Ashley Dodds et al., 2012 ; Berceanu et al., 2011 ; Boucherit-Atmani et al., 2011 ; Quatresooz et al., 2003 ; Talarmin et al., 2009**).

6.5.7. Candidoses allergiques

Représenté comme le « syndrome allergique à *C. albicans* », un phénomène relativement rare, il a depuis longtemps été décrit (**Pacheco et al., 1998**), mais le rôle de cet agent comme allergène n'est toujours pas clair, **Roig et al., (1997)** rapporte le cas d'une étude observationnelle d'une hypersensibilité chez les patients présentant des broncho-pneumonies allergiques à aspergillose, **Asero et al., (2004)** suggèrent que la longue exposition à la levure est reliée à cette hypersensibilité et l'atteinte des voies respiratoires inférieures par certaines molécules protéines secrétées par la levure (**Asero et al., 2004**).

6.5.8. Candiduries

Les candiduries ascendantes, sont des infections fongiques urinaires à *Candida*, et comme pour les autres infections, *C. albicans* prédominent dans ce genre de pathologies, elles se produisent le plus souvent chez la femme en conséquence de la colonisation de la levure par la cavité vaginale, favorisées aussi par l'immunodéficience des patients mais surtout par l'installation de sondes, les pratiques chirurgicales sur l'appareil urinaire et l'antibiothérapie à large spectre utilisée (**Lavigne et Sotto, 2005 ; Papasse et al., 2009**)

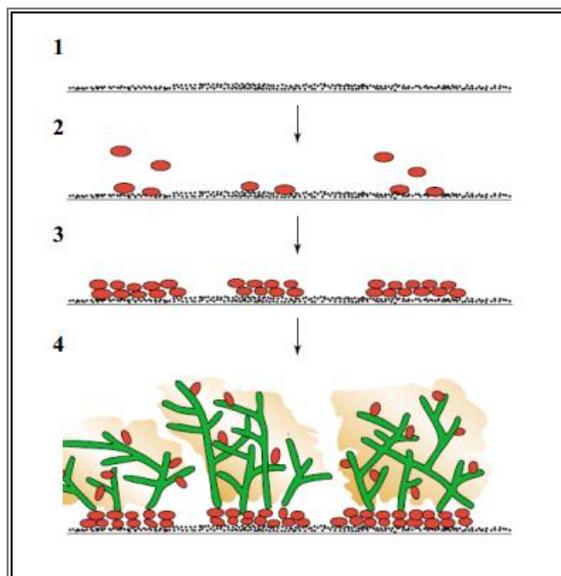
6.5.9. Biofilms à *Candida*

Le biofilm mature affiche une structure tridimensionnelle complexe, il entraîne une augmentation de la résistance aux antifongiques (**Singh et al., 2011**), processus de la formation du biofilm comprend quatre phases (figure n° 9), à savoir :

- a. L'adhérence des cellules aux surfaces, ce processus fait intervenir des facteurs non spécifiques tel que l'hydrophobicité des surfaces et des facteurs spécifiques tel que la les forces électrostatiques.
- b. Phase de formation des pseudo-filaments de la levure et la croissance sur la surface inerte.
- c. Formation de la matrice tridimensionnelle, avec la production de plusieurs composants spécifiques du biofilm tels que les polysaccharides, les carbohydrates et certaines protéines.
- d. Relargage des microorganismes, les levures générées à la surface sont relâchées pour permettre la dissémination dans l'organisme.

La complexité du processus dépend ainsi de l'influence des nutriments à disposition et la nature de la surface inerte (**Cao et al., 2005 ; Douglas, 2003**).

Le processus de formation de biofilm chez *C. albicans* est également complexe, quoique pas encore complètement compris (**Ramage et al., 2009 ; Seneviratne et al., 2008**), il implique la coordination de plusieurs mécanismes moléculaires, en partie contrôlés par le « quorum sensing », et la production de farnésol chez la levure intervient comme étant une molécule clé dans ce mécanisme de communication intercellulaire (**Langford et al., 2009**).



Surface d'un cathéter recouverte d'un film formé des protéines de l'hôte (points noir), 2- attachement initial des blastospores (rouge) à la surface, 3- formation de couches basales des micro-colonies, 4- développement des micro-colonies par ajout d'une couche supérieure formée principalement par les formes filamenteuses (verte) et par la production d'une matrice extracellulaire (jaune) qui enveloppe les deux couches de la micro-colonie.

Figure n° 10 : développement du biofilm à *Candida* sur un cathéter (Douglas, 2003).

6.6. Epidémiologie des candidoses

Les données épidémiologiques des infections à *Candida* sont vraisemblablement hétérogènes, elles dépendent de plusieurs facteurs tels que la zone géographique étudiée et le type de population en question (Zilberberg et al., 2008 ; Brissaud et al., 2012).

Aux Etats-Unis, les infections fongiques à *Candida* se présente au quatrième rang des infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs (Shawn et al., 2014 ; Wisplinghoff et al., 2004 ; Zaoutis et al., 2005) et la deuxième cause d'infections urinaires nosocomiales (Hidron et al., 2008 ; Shawn et al., 2014).

L'aspect clinique de ces infections est très déroutant car il présente peu de symptômes spécifiques et qui sont souvent confondus avec les pathologies primaires des patients admis (Chandenier et Desoubeaux, 2015), ces infections entraînent des examens supplémentaires, une prolongation de séjour hospitalier et une thérapie antifongique parfois conséquente, l'impact financier est tout aussi important, Ashley Dodds et al., (2012), dans une étude allant de l'année 2004 à 2005, avec un total de 409 patients présentant des infections fongiques invasives diagnostiquées, et en comparant avec d'autres patients présentant les mêmes pathologies comme témoins, cette étude a permis d'estimer le coût total de la prise en charge financière à plus de 32 000 dollars par an et par établissement de plus que les patients témoins, avec un cout moyen de 4524 dollars par patient rien que pour les traitements

antifongiques nécessaires, et avec plus de 11 000 dollars pour les 119 patients présentant des candidoses invasives (**Ashley Dodds et al., 2012**).

En Europe, une autre étude intéressante menée de l'année 2006 à 2008 dans 72 unités des soins intensifs de réanimation chirurgicale de 14 pays différents incluant la France, sur les infections invasives à *Candida*, avec un total de 779 patients (dont 62% de sexe masculin ayant un âge moyen de 63 ans), *C. albicans* se présente en première position avec 54% des cas recensés, et une prévalence de 42,3% chez les patients âgés de moins de 18 ans représentés par un total de 42 patients (**Klingspor et al., 2015**).

Dans la région méditerranéenne de l'Afrique du nord, la situation n'en est pas moins alarmante, au Maroc, dans une étude de l'année 2007 à 2009, sur 816 prélèvements et 143 hémocultures au sein d'un hôpital, *C. albicans* était l'espèce la plus fréquente (25,6%) suivie de *C. tropicalis* et *C. glabrata*, durant cette période, 4,33% des patients hospitalisés présentaient une candidose systémique prouvée (**Massou et al., 2013**).

En Tunisie, dans une étude rétrospective portant sur les infections superficielles et profondes à levures entre 1993 et 2006, *C. albicans* est dominante avec 51,9% des cas de candidoses enregistrés (sur 9712 cas) suivie de *C. tropicalis* (**Makni et al., 2010**).

Dans notre pays également, **Boucherit-Atmani et al., (2011)** rapportent l'implication de *C. albicans* dans la formation des biofilms d'origines fongiques des services des soins intensifs, de gynécologie et de la chirurgie générale à partir de cathéters, de sondes après leurs ablations (**Boucherit-Atmani et al., 2011**).

Seddiki et al., 2010 ont étudié le risque infectieux fongique (au CHU de Tlemcen) lié au cathétérisme vasculaire, les résultats obtenus ont montré que le taux de colonisation des cathéters vasculaires était de 19 % pour les levures du genre *Candida*.

Et enfin, mais pas seulement, l'étude bactériologique menée dans le service des grands brûlés du CHU d'Annaba (de l'année 2003 à 2005), sur les 633 prélèvements effectués, les infections fongiques dues à *C. albicans* sont présentes à 20 % sur les cathéters, 20 % au niveau des hémocultures, et de 50 % pour les urocultures ; elle intervient au premier rang des infections nosocomiales d'origine fongique dans ce service (**Chaibdraa et Bentakouk, 2008**).

6.7. Facteurs de virulence

De façon générale, l'infection par *C. albicans* semble être favorisée par une combinaison de facteurs liés aux statuts immunologique et physiologique de l'hôte, et d'autres liés au microorganisme.

6.7.1. Facteurs liés à l'hôte

Comprennent les facteurs physiologiques et immunologiques liés à l'hôte.

Parmi les facteurs physiologiques nous pouvons citer les âges extrêmes, l'incidence ces infections opportunistes augmente chez les nouveau-nés, le jeune enfant et les personnes

âgés ; la grossesse, l'altération des muqueuses buccales et génitales (irritations, blessures) favorisent également ces pathologies (**Brissaud et al., 2012 ; Papasse et al., 2009**).

Parmi les facteurs immunologiques, les maladies qui entraînent un affaiblissement de l'état générale du patient comme le cancer, le sida, le diabète, ou encore les maladies endocriniennes, traitements par antibiothérapie, chirurgies, prothèses et sondes (**Alangaden, 2011 ; Fournier et al., 2011 ; Papasse et al., 2009**).

6.7.2. Pathogénicité et facteurs liés au microorganisme

La pathogénicité chez *C. albicans* fait intervenir un large éventail de molécules spécifiques et des processus divers y compris la transition morphologique des blastospores en formes mycéliennes (**Calderone et Fonzi, 2001**).

6.7.2.1. Le polymorphisme

Cette levure possède un caractère polymorphe, des cellules ovoïdes aux formes mycéliennes, ces dernières sont le plus souvent impliquées dans le processus d'infection.

D'autres morphologies caractéristiques de cette levure, tels que la forme opaque avec des cellules allongées, cette transition est également reliée au caractère virulent de la levure (**Mayer et al., 2013 ; Staib et Morschhäuser, 2007**).

Des signaux environnementaux affectent la morphologie de la levure, par exemple, à pH acide, les cellules de *C. albicans* sont majoritairement sous formes ovoïdes, tandis qu'un pH élevé influence les formes pseudo-mycéliennes ; aussi, le manque de nutriments, la présence de sérum, de CO₂, mais également, le phénomène du « quorum sensing » qui inclue certaines molécules tel que la farnésol, le tyrosol, et le dodécanol (**Harriott et Novor, 2009 ; Ramage et al., 2002a ; Ramage et al., 2002b**).

a. Adhésion

Cette levure possède un ensemble de protéines ou adhésines qui sont responsables du processus d'invasion, les protéines Als « agglutinin-like-sequence » qui forment une série de huit membres (de l'Als1 à l'Als7 et l'Als9) sont les plus étudiées, les gènes Als codent pour des glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) lié aux glycoprotéines de surface, l'Als3 est la plus importante pour le processus d'adhésion aux surfaces (**Liu et Filler, 2011**).

b. Formation de biofilms

La formation de biofilms sur les surfaces biotiques ou abiotiques, et la pseudo-filamentation représente la première étape dans ce processus, la phase de relargage s'ensuit d'une infection souvent récidive de la levure (figure n° 11) (**Harriott et Novor, 2009**).

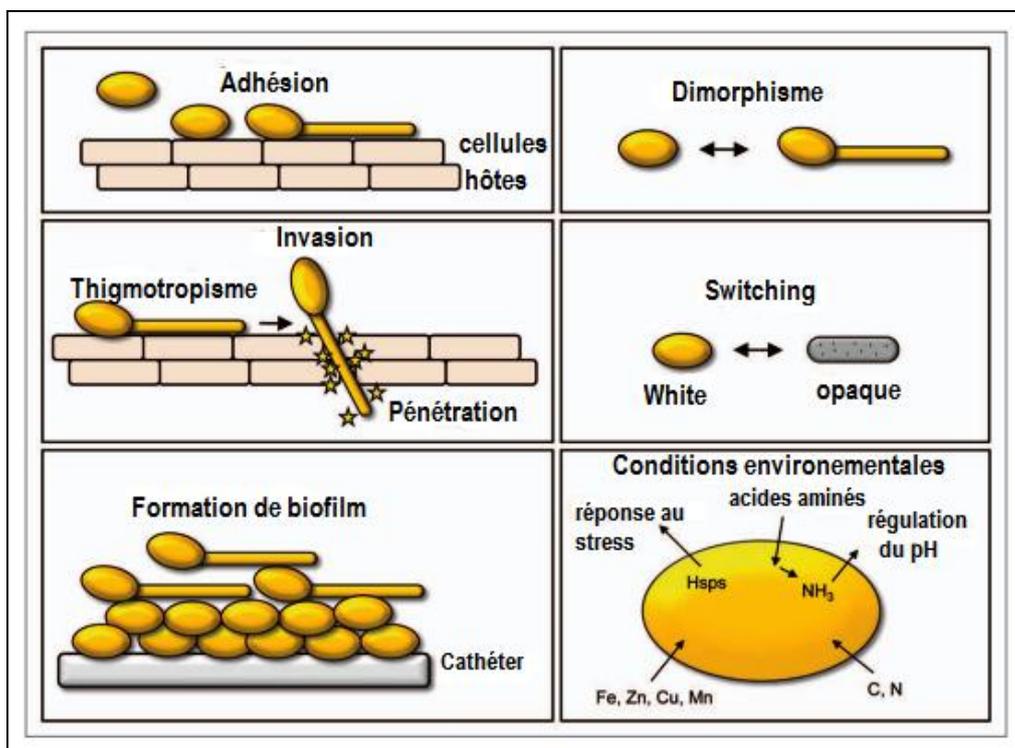
c. Thigmotropisme

Lors du contacte avec les cellules hôtes, une pseudo-filamentation se produit sur certains substrat tels que les muqueuses, le processus d'invasion est alors déclenché, et sur des

topologies particulières tel que la présence d'arêtes, la croissance fongique directionnel appelée thigmotropisme peut se produire, **Brand** et ses collaborateurs démontrent que le thigmotropisme chez *C. albicans* est régulé par l'absorption de calcium extracellulaire à travers des canaux calciques, chez les souris, ce processus conduit à la destruction des cellules épithéliales (**Brand et al., 2009**).

d. Sécrétion d'hydrolases

Suite à l'adhésion aux cellules de l'hôte et la formation de pseudo-filaments, la levure déclenche la sécrétion d'hydrolases pour faciliter la pénétration active à l'intérieur de ces cellules, notamment des protéases, des phospholipases et des lipases dont le rôle n'est pas aussi clarifié (**Mayer et al., 2013**).



Hsps (heat shock protein) : protéines du choc thermique, NH₃- excrétion d'ammoniac, Fe.Zn.Cu.Mn- absorption de différents minéraux, C.N- sources de carbone et d'azote.

Figure n° 11 : Aperçu de certains mécanismes de pathogénicité sélectionnée chez *C. albicans* (Mayer et al., 2013).

6.8. *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*

Plusieurs auteurs ont rapporté le co-isolément des agents pathogènes opportunistes *C. albicans* et *S. aureus* dans les cas d'infections associées aux biofilms, ils semblent pointer une certaine synergie dans la virulence quand ces deux espèces coexistent (**Baena-Monroy et al., 2005; Cuesta et al., 2010; Gupta et al., 2005; Pate et al., 2006; Tawara et al., 1996; Timsit et al., 2001; Valenza et al., 2008**), par ailleurs ces études ont rapporté l'association sans

donner la cause ; ainsi, dans le but de démontrer la capacité d'association des souches de *S. aureus* sur les biofilms de *C. albicans*, l'étude de **Schlecht et al., (2015)** est remarquable, puisqu'elle met l'accent sur la capacité *in vitro* d'adhésion très rapide d'une densité élevée des cellules de *S. aureus* sur les pseudo-filaments de *C. albicans* (en impliquant les récepteurs Als3p), elle témoigne également de la formation d'un biofilm mixte mature en 5 minutes seulement de l'initiation du processus d'adhésion (photos prises par microscope électronique à fluorescence en temps réel).

Ces deux agents pathogènes opportunistes peuvent créer ce qu'on appelle une co-infection, l'exemple dans l'étude de **Peters et Noverr, (2013)** qui ont démontré, dans le cas d'une co-infection du péritoine, qu'une même dose de ces deux agents pathogènes associés induisait un taux de mortalité d'environ 40%, tandis qu'une infection par l'un des deux ne soit en générale pas létale, ils ont également démontré l'implication d'un sous-ensemble unique de cytokines pro-inflammatoires innées : (interleukine-6), facteur stimulant les colonies de granulocytes G-CSF, keratinocyte chemoattractant, « monocyte chemoattractant protein 1 », et des protéines inflammatoires des macrophages-1 dans ce processus de co-infection remarquable.

6.9. Antifongogramme *C. albicans* (Letscher-Bru, 2011 ; Rieu et al. 2009)

Malgré l'arrivée de nouveaux antifongiques (échinocandines) dans la thérapeutique, la mortalité des candidoses systémiques demeure élevée (**Eggimann et al., 2014 ; Lockhart et al., 2014**), la prise en charge de ces infections doit être précoce et adaptée à une levure identifiée, la détermination de la sensibilité aux antifongiques (en déterminant les concentrations minimales inhibitrices CMI) de ces souches permet de guider la thérapeutique, mais aussi, la surveillance de l'émergence de résistance chez ces levures (**Talarmin et al., 2009**).

6.9.1. Techniques utilisées (Paugam, 2005 ; Rieu et al., 2009).

De nombreux progrès ont été réalisés afin de standardiser les méthodes et de les simplifier pour une meilleure utilisation (**Paugam, 2005**), il existe actuellement quatre techniques standardisées et automatisées à savoir,

6.9.1.1. M27-A2 du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), utilisée en milieu liquide, c'est une technique longue et laborieuse qui a été initialement réalisée en tubes, puis rapidement adaptée en microplaques pour une utilisation plus simplifiée.

6.9.1.2. Méthode européenne EUCAST, Une autre technique en milieu liquide dite ASFT-EUCAST (Antifungal Susceptibility Testing - European Committee on Antimicrobial Susceptibility) qui est basée sur la technique NCCLS M27-A, avec quelques modifications, à savoir une augmentation de 2% du taux de dextrose du milieu et une lecture après 24 h en spectrométrie afin de déterminer ce qu'on appelle la CMI à 50% d'inhibition par rapport au témoin, cette technique apporte une meilleure appréciation des seuils critiques et une meilleure reproductibilité.

6.9.1.3. Technique ATB Fungus (Biomérieux) en milieu semi-gélosé (Kit commercialisé).

6.9.1.4. Technique par bandelette E-Test (AB Biodisk)

Réalisée sur milieu gélose RPMI avec une première lecture après 24 h et une définitive après 48 h d'incubation (photo n° 1).

Parmi ces tests disponibles, la technique de la bandelette E-Test est la plus recommandée, car elle permet non seulement d'obtenir des CMI proches de celles obtenues avec la technique de référence NCCLS, mais aussi de tester les antifongiques les plus récents, ajouté à cela, les erreurs possibles aux autres techniques qui sont effectuées sur des milieux liquides ou semi-gélosé, chez les quels la lecture se fait par absorption d'un faisceau lumineux à travers les cupules des microplaques.

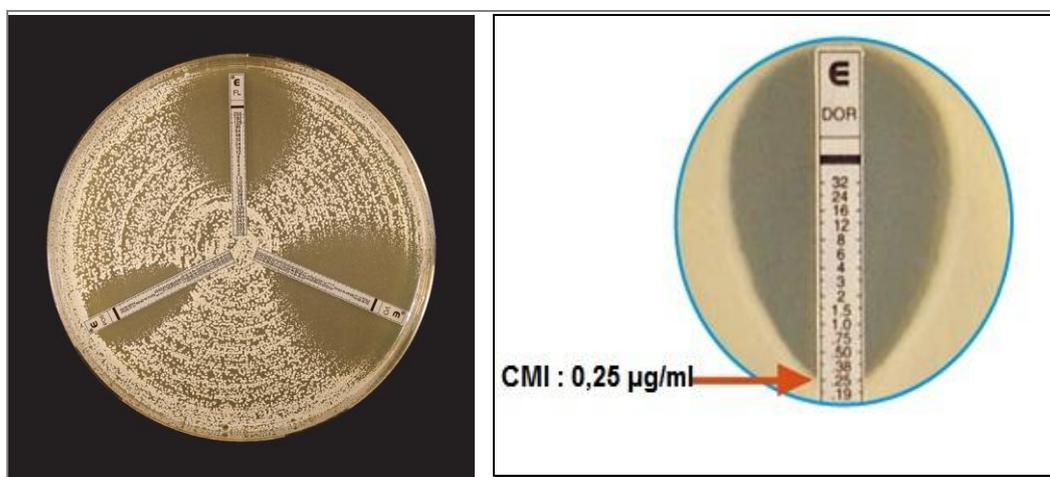


Photo n° 1 : Détermination de la CMI avec une bandelette E-test (Pihet et Marot, 2013).

6.10. Résistance aux antifongiques des souches de *Candida*

Comme chez les bactéries, les levures possèdent deux types de résistances à savoir la résistance naturelle et la résistance acquise, cette dernière survient rarement et principalement après l'exposition plus au moins prolongée à un antifongique faisant intervenir des mécanismes moléculaires et biochimiques spécifiques (Sanglard et Odds, 2002).

La résistance naturelle peut être observée chez cinq souches de *Candida* les plus fréquemment isolées en pathologie humaine vis-à-vis des antifongiques utilisés en thérapeutique, à savoir, les azolés (voriconazole, Itraconazole Fluconazole et Posaconazole), la 5-FC, l'amphotéricine B et les échinocandines est comme suit :

Pour *C. albicans* et *C. tropicalis* pas de résistance naturelle observée.

Pour *C. parapsilosis*, une résistance naturelle rare aux échinocandines peut être observée.

Pour *C. glabrata* une sensibilité dose dépendante pour certaines souches tandis que d'autres possèdent une résistance aux azolés.

Pour *C. krusei* une résistance à la voriconazole et au 5-FC, une sensibilité dose dépendante pour l'itraconazole et sensibilité variable (sensible à intermédiaire) pour l'amphotéricine B (**Papasse et al., 2009**).

L'incidence des complications infectieuses fongiques est telle que les stratégies de prophylaxie ont été développées depuis longtemps dans chaque service à haut risque (**Berceanu et al., 2011**).

La résistance acquise des souches de *Candida* est apparue suite au développement de la chimiothérapie et de son utilisation courante, cette résistance repose sur différents mécanismes génétiques qui témoignent de la flexibilité du génome de *C. albicans* et de son adaptation impressionnante, la résistance aux molécules azolés est fréquente et se produit sur différentes formes, la mutation qui se traduit par une surexpression des gènes TAC1 et ERG11 induisent une affinité réduite du fluconazole (**Coste et al., 2007**).

En présence de cet antifongique (condition de stress), un processus complexe est mis en place, faisant intervenir, en plus des altération des gènes précédemment décrits, un réarrangement chromosomal et une adaptation aux conditions de stress lors d'une infection, une addition du chromosome Chr 4b, qui est une extension de 260-kbp du chromosome Chr 5, générant une nouvelle copie de ce dernier (**Coste et al., 2007**).

L'exposition aux azolés induit également une mutation du gène ERG2 et ERG3 qui se traduit par des altérations en stérols membranaires et l'inactivation de la cible d'action de l'antifongique, ce genre de mutation induit également une résistance aux polyènes dont la cible d'action se trouve être l'ergostérol (**Tobudic et al., 2012**).

Résistance aux polyènes a depuis longtemps été observée pour l'amphotéricine B comme pour la nystatine, elle est causée par remplacement de la composition en stérols membranaire (réduction d'affinité membranaire), par mutation dans le gène ERG2 qui code pour la synthèse de la C-8 stérol isomérase (production du épistérol) et le gène ERG3 qui code pour la synthèse de la C-5 stérol désaturase (conversion de l'épistérol en ergostérol) (**Sheikh et al., 2013**).

La résistance à la 5-fluorocytosine apparaît lors d'une monothérapie par l'antifongique, avec une mutation au niveau de la cytosine perméase (bloque l'entrée de l'antifongique dans la cellule), qui induit à une résistance primaire, ou bien, la diminution ou l'absence des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'antifongique, ou encore par dérégulation de la voie de biosynthèse de la pyrimidine (**Cannon et al., 2007**).

La sensibilité réduite à la capofungine est possible lorsqu'une mutation dans le gène FKS1 qui code pour la β -1,3-D glucane synthase se produit, la perte progressive de la sensibilité aux échinocandines est lié aux mutations dans les gènes HS1 et HS2 chez *C. albicans*; une résistance croisée aux caspofungines avec la micafungine ou de la caspofungine avec

l'anidulafungine a également été rapportée (**Perlin, 2007**). Les valeurs de CMI relative à la micafungine et la caspofungine d'une souche type sauvage sont plus élevées par rapport à l'anidulafungine (**Espinel-Ingroff, 2008**).

Fournier et al., (2011), dans une étude de six ans dans les soins intensifs, ont surveillé la susceptibilité de la sensibilité/résistance des souches de *Candida* par rapport à l'utilisation des antifongiques en thérapeutique, les résultats ont montré que la baisse de l'utilisation du fluconazole a été accompagné d'une meilleure sensibilité de *C. albicans* à cet antifongique, en contre partie l'utilisation accrue de la caspofungine a été reliée par l'augmentation des CMI pour les souches de *C. glabrata* et *C. parapsilosis* ; nous pouvons en conclure que la consommation de ces antifongiques devrait être plus rigoureuse compte tenue des mécanismes l'adaptation rapide par ces microorganismes.

Pour conclure, l'incidence des candidoses invasives dans les différentes unités de soins et surtout chez les patients les plus démunis (VIH, soins intensifs, grands brûlés), les mécanismes de pathogénicité, les différents facteurs de virulence, ainsi que la résistance aux antifongiques couramment utilisés en thérapeutiques de cette levure ont font un acteur redoutable dans les établissement de santé, malgré le développement des mesures de surveillance qui semblent être insuffisantes face à ce problème.

7. La zone humide du lac El Mellah

Les zones humides sont des écosystèmes très précieux pour les peuples du monde, et depuis longtemps la convention Ramsar souligne qu'il faut reconnaître leurs vraies valeurs du fait des nombreux services qu'elles procurent à l'homme et de leur importance pour le maintien de la diversité biologique, le lac El Mellah s'inscrit dans ce cadre, représentant le seul milieu lagunaire en Algérie, cet écosystème abrite une biodiversité végétale et animale méditerranéenne très riche, cette richesse biologique repose sur la nature des eaux qui sont un mélange d'eau de mer, d'eau douce et d'eaux usées, cependant, le lac subit de fortes pressions anthropiques qui se sont nettement amplifiées au cours du 20^{ème} siècle (**De Groot et al., 2007 ; Galewski et al., 2008**).

7.1. Caractéristiques physicochimiques du lac

a. Le pH

Le pH est étroitement lié à des phénomènes complexes, température, oxygène dissous, salinité, un pH inférieur à 7 peut conduire à une corrosion tandis qu'un pH supérieur pourrait favoriser des dépôts incrustants dans des circuits de canalisation, et de façon générale, le pH joue aussi un rôle dans la détermination de la flore biologique (poissons) et surtout microbienne existante dans l'eau (**Rodier et al., 2009**).

b. La salinité

La salinité représente un facteur déterminant dans la répartition et la dynamique de la communauté biotique qui vit dans l'eau (**Farid et al., 2009**).

Le domaine lagunaire du lac El Mellah est caractérisé par une salinité inférieure à celle de la mer, la lagune se comporte comme un bassin de dilution caractérisé par une rotation des eaux dans le sens des aiguilles d'une montre, les variations halines sont influencées par les échanges avec la mer et les apports d'eau douce par les précipitations et les déversements d'oueds (**Guelorget et al., 1989**).

c. La conductivité

De façon générale une conductivité inférieure à 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ est définie par une minéralisation faible à très faible, une conductivité comprise entre 333 et 666 $\mu\text{S}/\text{cm}$ est définie par une minéralisation moyenne à accentuée, et au-delà de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ par une minéralisation importante et élevée de l'eau (**Rodier et al., 2009**).

d. L'oxygène dissous et la saturation en oxygène

Les eaux superficielles comme le cas des eaux du lac El Mellah peuvent contenir des quantités importantes d'oxygène proche de la saturation, par contre les eaux profondes n'en contiennent le plus souvent que quelques milligrammes par litre, des teneurs inférieures à 80% peuvent entraîner une altération organoleptique, ces variations sont provoquées par les apports en déchets organiques et la présence d'organismes biologiques tels que les plantes ou les microorganismes (**Rodier et al., 2009**).

La zone humide du lac El Mellah fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques ainsi que des rapports qui s'inscrivent comme un plus dans la valorisation et la protection de ce site, cette étude visant à déterminer la richesse du lac en microorganismes producteurs naturels de molécules antimicrobiennes et antifongiques et leurs spectre d'action sur les levures nosocomiales de *Candida albicans* sensibles et résistantes.

8. Les actinomycètes

Dans le cadre d'étudier les propriétés biochimiques d'un groupe microbien du sol, encore mal connu des scientifiques, en 1943, Selman Waksman, Arthur Henrici et leurs collaborateurs fut les premiers à découvrir la streptomycine produite par *Streptomyces griseus*, qui semblait être d'une grande efficacité contre la tuberculose, ce qui a valu à Selman Waksman le prix Nobel en 1952 (**Prescott, 2003**).

Ces microorganismes sont souvent isolés d'écosystèmes particuliers,

Terrestres, comme les forêts inexploités du nord-est Indien, **Thakur et al., (2007)**, ont rapporté l'isolement de souches du genre *Streptomyces* possédant un large spectre contre les microorganismes bactériens et fongiques testés.

Ou bien les sols ultramafique (riches en métaux) de la Nouvelle Calédonie, **Saintpierre et al., (2003)** ont pu isoler *Streptomyces yatensis*, souche qui a également montré une activité antibactérienne et antifongiques contre certains microorganismes testés.

L'isolement à partir des sédiments d'écosystèmes aquatiques marins, tels que les sédiments au large de la zone côtière (Japon) (Anzai et al., 2008), ou encore l'isolement d'une souche d'actinomycète à activité antifongique des eaux de la rivière du Nile (Egypte) (Rifaat, 2003).

Tous ces écosystèmes sont uniques, avec des caractéristiques propres à chaque biotope, certains auteurs ont même développés des techniques d'isolement spécifiques comme les prétraitements des échantillons mères au phénol afin d'isoler les membres du groupe des *Streptomyces violaceusniger* (Kang et al., 2010).

Depuis, ce groupe de microorganismes n'a cessé de faire l'objet de plusieurs études qui ont aboutit à la découverte incessante de nouvelles molécules antibactériennes comme les mannopeptimycines produite par *Streptomyces hygrosopicus* LL-AC98 (Singh et al., 2003) des molécules antifongiques comme les substances SH-1 et SH-2 produites par *Streptomyces humidus* (Hwang et al., 2001) les molécules antitumorales comme les actinofuranones retrouvées chez *Streptomyces* sp. CNQ766 (Cho et al., 2006).

Ils sont également producteurs de molécules à effet insecticides, c'est le cas de *Streptomyces* sp. 173 (Xiong, et al., 2004) et même des enzymes tels que la L-asparginase produite par *Streptomyces* sp EPD 27 (Gulve et Deshmukh, 2011).

Aussi, après la découverte d'un nombre important d'espèces appartenant au genre *Streptomyces*, de nombreux auteurs ont contribué à la clarification de la taxonomie de la famille *Streptomycetaceae* en utilisant de nouveaux outils en biologie moléculaire et des outils phénotypiques (Kumar et Goodfellow, 2010 ; Labeda et al., 2012).

8.1. Définition et caractéristiques

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

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

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

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

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

8.2. Types de spores

Les actinomycètes sont particuliers par la formation de différents types de spores, leurs différenciations rentrent dans leurs critères de classifications, pour les streptomycètes filamenteuses, les spores sont disposées sur le mycélium aérien, les chaînes de spores peuvent être droites, flexueuses ou en spirales, elles sont résumées dans la figure n° 10. Leurs dispositions peuvent être en spores libres, ou attachés les unes aux autres pour atteindre jusqu'à 50 spores sur un seul hyphes ou dans des sacs appelés sporanges, cette formation peut résulter d'une segmentation ou désarticulation de ces hyphes (**Hopwood, 2007**).

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

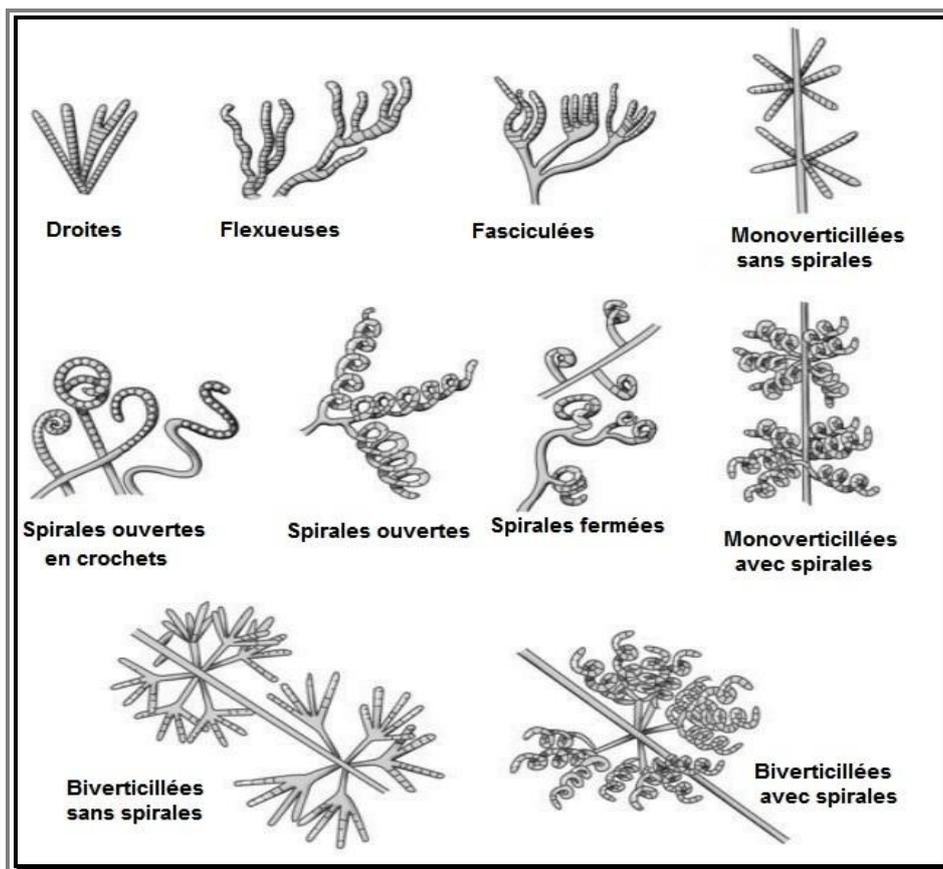


Figure n° 12 : morphologie des différentes chaînes de spores chez les streptomycètes (**Madigan et al., 2011**).

Dans le sol, les spores des actinomycètes peuvent survivre pendant une longue période, lorsque les conditions sont favorables en présence de nutriments, les spores germent et envahissent des substrats carbonés, lorsque les éléments nutritifs sont épuisés, les spores sont produites à nouveau, ceci représente le cycle de vie caractéristique de ce groupe microbien.

La particularité que possèdent les membres du genre *Thermoactinomyces* est que la germination ne se déroule qu'après une « activation » qui consiste en un choc thermique (Locci, 2005).

Plusieurs groupes d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges (sac de spores) qui peuvent contenir des spores flagellées mobiles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles (*Streptosporangium*), à maturation, le sac est rompu en libérant les spores, elles sont disséminées par le vent ou la pluie (Locci, 2005).

8.3. Thermo-résistance des spores

Comme chez les bactéries sporulées, les spores d'actinomycètes résistent à la température, l'acquisition de la thermo-résistance de la spore, en plus de sa réfrigérance, les deux variables selon les souches, est dépendante de la synthèse du dipicolinate de calcium, composé qui assure à la cellule son imperméabilité et son état de déshydratation (Leclerc et al., 1994).

8.4. Ecologie

Les actinomycètes sont aussi importants en écologie qu'en médecine, le sol constitue un biotope naturel pour la plupart, ils sont capables en effet de dégrader plusieurs molécules comme la pectine, la kératine ou encore certaines molécules aromatiques, ils contribuent ainsi à la minéralisation et la fertilisation des sols (Prescott et al., 2010).

Quelques souches ont la capacité de décomposer certaines molécules comme le caoutchouc et se développer ainsi dans les usines de traitements des eaux usées créant de véritables mousses colmatantes.

Elles produisent également une molécule appelée Géosmine qui donne au sol son odeur caractéristique, et qui joue également un rôle de minéralisation du sol (Goodfellow et al., 2012).

Certaines sont symbiotiques de certaines plantes légumineuses, notamment le genre *Frankia*, qui infecte les racines, ou parfois les tiges formant des nodules qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique (Cournoyer et Blaha, 2003).

La distribution des actinomycètes des écosystèmes extrêmes a également été rapportée par plusieurs auteurs, dans le but d'étudier leurs métabolismes secondaires suggérant que ces niches abiotiques rares renferment de nouvelles souches et/ou de nouvelles molécules d'intérêt pharmaceutique (Gurielidze et al., 2010 ; Rojas et al., 2009 ; Lazzarini et al., 2000).

8.5. Classification des actinomycètes

La classification des actinomycètes est passée par plusieurs phases, depuis, elle a pris de l'ampleur et elle ne cesse d'être clarifiée et corrigée.

8.5.1. Critères de classification

Pridham et al., (1948) ont attribué une grande importance à la morphologie des chaînes de spores des streptomycètes, ils ont regroupé ces espèces dans des sections morphologiques primaires qui se base sur ce critère, en **1961**, avec les travaux de **Tresner** et ses collaborateurs, et avec le développement des techniques de microscopie électronique, une **classification morphologique** est donné sur la base du réarrangement des chaînes de spores et la surface de ces dernières (rugueuses ou lisses).

En 1965, **Pridham** et ses collaborateurs, ont mis en place un autre dispositif de caractérisation des souches d'actinomycètes en se basant sur la couleur du mycélium de substrat et aérien, une nomenclature a été proposée pour chaque code de couleur, un travail colossal a été mis en place dans le but d'établir une classification morphologique de ces microorganismes.

Ensuite, une autre classification basée sur les similarités des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches cultivées dans les mêmes conditions a été proposée, c'est la taxonomie numérique, les résultats obtenus ont permis de classer les actinomycètes en plusieurs « Clusters » (**Williams et al., 1983**), technique beaucoup moins sensible, elle est sujette à des erreurs d'interprétations, et suite à l'expansion remarquable principalement des espèces du genre *Streptomyces*, une investigation intensive permet plus tard de mettre en évidence les compositions chimiques de la paroi cellulaire de ces microorganismes, et jusqu'à présent utilisée, c'est l'étude chimique des constituants cellulaires (**Becker et al., 1965**), elle a permis de mettre en évidence quatre types de paroi résumées dans le tableau n° 2.

Tableau n° 2 : types de paroi chez les actinomycètes et genres représentatifs (Prescott et al., 2002).

Type de paroi	Isomère Diamino-pimélique	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
I	L, L	ND	<i>Nocardia, Streptomyces</i>
II	mésoméso	ND	<i>Micromonospora, Pilimelia, Actinoplanes</i>
III	mésoméso	ND	<i>Actinomadura, Frankia</i>
IV	mésoméso	Arabinose, galactose	<i>Saccharomonospora, Nocardia</i>

ND : non définie

Des techniques moléculaires plus récentes basées sur la PCR et l'étude de l'ARN ribosomique 16S, pas seulement pour les actinomycètes ; avec le nombre croissant des nouvelles espèces émergentes, et dans le besoin urgent de les classer, l'étude de la séquence de l'ARNr 16S, sa comparaison après alignement avec celles déjà connues et la construction d'un arbre qui met en évidence la distance phylogénétique entre les espèces s'avère être une technique plus rapide et plus fiables (**Prescott, 2010**).

S'ajoute à cela, la détection des génomes similaires avec les techniques d'hybridation ADN-ADN des souches les plus proches avec celle étudiée se basant sur la complémentarité de leur séquences, un pourcentage élevé ou égale à 97% considère deux souches comme appartenant à la même espèce (**Madigan et al., 2011**).

Si le développement des outils d'identification moléculaire avec les techniques PCR et le séquençage de l'ADNr 16S chez les bactéries ont vraisemblablement simplifié l'identification des espèces proches d'entre elles (**Prescott et al., 2010**).

chez les actinomycètes, le processus d'identification n'en reste pas moins complexe, ce groupe microbien est caractérisé par des séquences ADN hautement conservées même chez espèces différentes et l'étude phylogénétique seule ne suffit plus à la classification, en cause aussi, les découvertes incessantes de nouvelles espèces recensées au cours de ces dernières années, et donc, la complémentarité entre les différentes techniques d'identification reste nécessaire.

Notamment, l'exemple des travaux de **Kumar et Goodfellow (2010)**, qui tentent d'apporter des rectifications taxonomiques chez six espèces du groupe des *Streptomyces violaceusniger*, ils expliquent qu'une étude taxonomique polyphasique qui se base sur la similarité des caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques et l'étude phylogénétique est nécessaire à la classification correcte de ces espèces très proches même si le pourcentage d'alignement est supérieur à 99 %.

Un grand pas dans la taxonomie des espèces du genre *Streptomyces* a été accompli avec l'analyse des séquences multilocus (MLSA), qui repose sur l'étude des gènes domestiques spécifiques (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* et *trpB*) en plus des séquences de l'ARNr 16S et les résultats de l'hybridation ADN-ADN, c'est une méthode alternative pour créer et maintenir des protocoles opérationnels pour l'affectation des nouvelles espèces au genre *Streptomyces* (**Rong et Huang, 2012**).

8.5.2. Evolution de la classification des actinomycètes

La classification des actinomycètes proposée par **Stackebrandt et al., (1997)** regroupe les actinomycètes dans la classe *Actinobacteria*, divisé en cinq sous classe à savoir : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, et la principale sous classe, celle des *Actinobacteridae*, cette dernière comprend deux Ordres, les *Bifidobacteriales* et les *Actinomycetales*.

L'ordre des *Actinomycetales* regroupe les sous ordres suivants : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Psuedonocardineae*, *Streptomycineae* qui comprend la famille *Streptomycetaceae*, *Streptosporangineae*, *Frankinea*, *Glycomycineae* (Stackebrandt et al., 1997).

Le 3^{ème} volume de la seconde édition du manuel de Bergey de la systématique bactérienne (Vos et al., 2009) regroupe la famille *Thermoactinomycetaceae* dans l'ordre *Bacillales* dans la classe *Bacilli*, cette famille comporte les genres *Thermoactinomyces*, *Laceyella*, *Mechercharimyces*, *Planifilum*, *Seinonella*, *Shimazuella*, *Thermoflavimicrobium* (Vos et al., 2009).

8.6. Halotolérance

Tresner et al., (1968) et Gottlieb (1973) étaient les premiers à avoir isolé les actinomycètes d'échantillons salés et à avoir établie la technique appropriée pour la recherche des actinomycètes halotolérants.

On rencontre dans le monde microbien, ceux qui ne supportent que de faibles doses d'NaCl (environ 1% poids/vol), des halotolérant modérés avec un développement de croissance en présence de 6 à 8% d'NaCl, et les halotolérants extrêmes qui supportent de grandes concentrations d'NaCl (Tiquia, 2007). Les halophiles par contre, sont ceux qui exigent dans leur croissance une présence de NaCl (DasSarma, 2001) comme le cas de la souche *Streptomonospora alba* par Li et al., (2003) qui a été cultivé sur un milieu ISP₂ gélosé additionné de 15% d'NaCl.

Plus de 70 espèces de souches d'actinomycètes halophiles et halotolérantes ont été isolées, ces derniers dont le métabolisme secondaire peut être intéressant, ont été isolées de différents écosystèmes extrêmes tels que les sols sahariens désertiques de l'Algérie (Kitouni et al., 2005) ou encore des écosystèmes marins (chine) par Cai et al., (2009).

8.7. Producteurs de molécules antimicrobiennes

La production d'antibiotiques est relayée par trois groupes microbiens, les actinomycètes représentent les acteurs principaux, avec plus de 75 % des molécules antimicrobiennes naturelles; les champignons, avec pré de 15 % et enfin les bactéries non filamenteuses confondues qui produisent les 10 % restantes (figure n° 11) (Berdy, 2005).

Le biosynthèse des molécules antimicrobiennes était principalement attribuée aux streptomycètes, cependant, cette production régresse au profit des autres genres tel que *Actinomadura* (Badji et al., 2005 ; Lee et al., 2006) et *Micromonospora* (Huang et al., 2008).

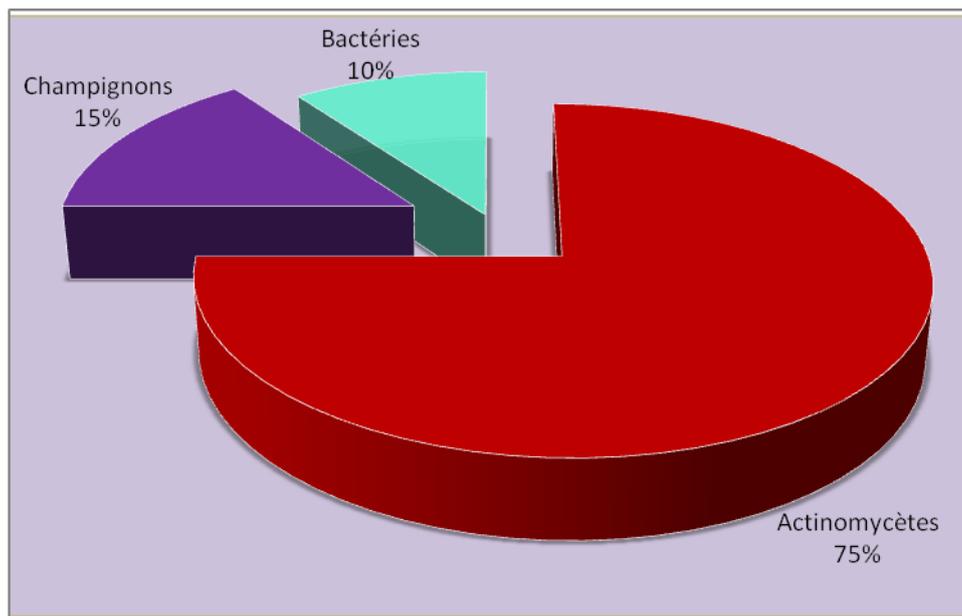


Figure n° 13 : Secteur angulaire montrant la répartition de la production d'antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons et les bactéries (Berdy et al., 2005).

La production des métabolites secondaires n'est pas directement associée à la phase de croissance mais survient juste après, elle est en revanche sensiblement affectée par les conditions environnementales. Le développement de la fermentation requiert quatre étapes en industrie, la première dans des Erlenmeyer de 20 à 300 ml, ensuite ce volume est conduit dans de petits fermenteurs de laboratoire de 2 à 15 litres, après vérification et optimisation du processus dans des fermenteurs pilotes de 20 à 500 litres, la production est reconduites dans de grands fermenteurs de 10 000 à 300 000 litres pour une ultime production. Cette vaste gamme d'échelle de fermentation fournit au scientifique ou l'ingénieur un défi particulier à cause des inconvénients qu'ils génèrent tels que la formation de mousses dans les réacteurs (Demain, 2000 ; van Wezel et al., 2006).

La différenciation cellulaire est accompagnée de la différenciation métabolique, en milieu liquide, la production des métabolites secondaires est principalement influencée par la composition du milieu de culture, l'exemple de la streptomycine, l'une des anciennes molécules produites par *Streptomyces griseus* (Prescott et al., 2010).

Le Tableau n° 3 et 4 résument les différentes molécules antimicrobiennes et antifongiques produites par les espèces du genre *Streptomyces*.

Tableau n° 3 : molécules produites par le genre *Streptomyces* (Solanki et al., 2008).

molécule	Source	Activité
Cinerubine R	<i>Streptomyces eurythermus</i>	Antimicrobienne
Scopafungine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. enhygrus var. nova UC-2397	Antifongique, Antibactérienne
Resormycine	<i>Streptomyces platensis</i>	herbicide, Antifongique
Ileumycine	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Antifongique
Lomofungine	<i>Streptomyces lomodensis</i>	Antifongique, Antibactérienne
Kalafungine	<i>Streptomyces tanashiensis</i> souche Kala UC5063	Antifongique, Antibactérienne , Anti- protozoaire
Axenomycines	<i>Streptomyces lisandri</i> nov. sp.	anthelminthique, Anti-protozoaire, Antifongique
Dunaimycines	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Immunosuppresseur, Antimicrobienne
Kanchanamycines	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Antifongique, antibactérienne
Pimaricine	<i>Streptomyces natalensis</i>	Antifongique
Blasticidine S	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Antifongique
Leptomycine	<i>Streptomyces lividans</i>	Antifongique, anti-tumorale
RS-22 A, B et C	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	Antifongique, antibactérienne

Tableau n° 4: Molécules produites par des Streptomycètes isolées de biotopes marins (Manivasagan et al., 2013 ; Solanki et al., 2008 ; Xu et al., 2014 ; Zotchev, 2012).

Molécules	Source	Activité
Daryamides	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-085	Anticancéreuse, antifongique
2-Allyloxyphenol	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobienne, conservateur, désinfectant orale
Rapamycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Immunosuppressive, antifongique
Hygromycine	<i>S. hygroscopicus</i>	Antimicrobienne, immunosuppressive
Daryamides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifongique; anticancéreuse
Antimycine	<i>Streptomyces</i> sp.	antifongique
azalomycine F4a 2-ethyl-pentyle ester	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifongique (<i>C. albicans</i>)
azalomycine F5a 2-ethyl-pentyle ester	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifongique (<i>C. albicans</i>)

8.8. Production des métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires par voie microbienne est généralement influencée et connecté au métabolisme primaire, il existe des métabolites intermédiaires issue du métabolisme primaire qui servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires, la variation des conditions de cultures affectent les capacités métaboliques de l'organisme et la nature des métabolites secondaires produites (**Prescott et al., 2010**).

8.8.1. Effet de la composition du milieu de culture

Thakur et al., (2009) ont démontré que les variations des sources de carbone et d'azote affectaient fortement la croissance de la souche *Streptomyces* sp. 201, ils ont également réussi à optimiser la production des métabolites antimicrobiennes par variations des substrats carbonés et azotés ; **Mellouli et al.,** (2003) ont aussi rapporté l'influence du magnésium et les oligoéléments sur la production d'une métabolite macrolide produite par *Streptomyces* sp. US24.

8.8.2. Influence des conditions de culture

Ces conditions de cultures affectent énormément et sensiblement la croissance et la production, ces observations ont été constatés dans plusieurs travaux (**Badji et al., 2006 ; Mellouli et al., 2003 ; Thakur et al., 2009**).

L'agitation représente un paramètre très important dans la culture en milieu liquide, **Mellouli et al.,** (2004) ont signalé l'optimum de production des métabolites entre 200 et 250 rpm, pour des agitations plus faibles ou plus fortes, la production chute énormément.

La plupart des souches d'actinomycètes affichent un début de production au bout de 4 a 6 jours (**Badji et al., 2006 ; Saurav et Kannabiran, 2010**), mais certaines, comme le cas de la souche d'*Actinomadura* isolée par **Badji et al.,** (2005) n'a montré aucune activité avant le 9^{ème} jour d'incubation.

8.8.3. Production bi phasique

Il a antérieurement été rapporté que les streptomycètes sont capable d'accumuler les nutriments lorsque les conditions de cultures deviennent limités, la synthèse du glycogène et du tréhalose chez *Streptomyces antibioticus* est régulée par la disponibilité de l'azote, avec initiation de la synthèse qui coïncide avec l'épuisement de ce dernier (**Brana et al., 1986**).

Le rôle exacte de ces réserves carbonées n'a pas encore été clairement élucidés, **Homerova et al.,** (1996) ont suggéré que la phase de formation des hyphes aérien et la maturation des spores sont étroitement lié au métabolisme des réserves glycogènes, et que les tréhalose est une molécule de stockage importante pour les spores. Les molécules de stockage pour la biosynthèse d'antibiotiques tels que l'acétate et le propionate pourraient provenir de deux

acides aminés hydrophobes tel que la valine, l'isoleucine et la leucine, et des lipides neutres tels que les triacylgérol (TAG) accumulés lors du métabolisme primaire.

Chez *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1, dans le quel une mutation a été effectuée dans le but d'optimiser la production, les variations de sources de carbone, de CaCO₃, KH₂PO₄ et de FeSO₄ ont significativement influencé la production de milbemycine, la quantification de l'accumulation des nitrates et de l'ammonium ont montré que pendant la phase croissance les deux sources de nitrogènes furent consommées, a la fin de fermentation ces molécules furent relarguées (**Baoxin et al., 2011**).

8.8.4. Pigmentation et production

Certaines souches des actinomycètes ont la capacité de produire des pigments de couleurs très variables, cette pigmentation est souvent diffusible dans la gélose, elle apparaît avec la phase de croissance, la couleur peut être variable selon la composition du milieu de culture.

Selvameenal et al., (2009) ont constaté la présence d'un pigment jaune chez une souche d'actinomycètes *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Ossamyceticus* isolée de sol désertique, l'extraction du pigment jaune a permis de mettre en évidence son activité antimicrobienne.

Aussi les travaux de **Varalakshmi et al., (2014)** qui ont isolé mis en évidence l'activité antimicrobienne d'un pigment jaune d'une souche d'actinomycète.

Si certains auteurs s'accordent à dire que ces pigmentations sont à l'origine des molécules antimicrobiennes, ce n'est pas toujours vrai puisqu'il existe de nombreuses souches non pigmentés et qui produisent une large gammes de molécules dont la plupart sont des antibiotiques (**Hopwood, 2007 ; Wu et al., 2007**).

9. Techniques d'extraction des métabolites secondaires

En biotechnologie, la production naturelle des métabolites d'intérêt (cas des antibiotiques) à partir de microorganismes se fait à l'échelle industrielle dans des cuves immenses appelées fermenteurs, les microorganismes y sont mis en culture dans un milieu spécifique et complexe, les conditions de cultures doivent être prédéfinies et contrôlés, en fin de culture, l'extraction des métabolites secondaires recherchées constitue une étape délicate qui repose sur différentes techniques.

Au laboratoire, les métabolites secondaires ne sont pas toujours connus, après extraction, la caractérisation afin d'élucider la structure chimique des molécules antimicrobiennes organiques se fait par combinaison des techniques spectroscopiques tels que la spectroscopie UV-Visible ou la spectroscopie infrarouge (**Badji et al., 2006 ; Denyer et al., 2004 ; Madigan et al., 2011**).

9.1. Chromatographie sur couche mince CCM/ CCM deux dimensions

Une technique d'analyse qualitative très sensible qui permet de suivre l'avancement d'une réaction, de vérifier la pureté d'un produit, ou de connaître la composition d'un mélange, elle

repose principalement sur un phénomène d'adsorption entre l'éluant (phase mobile) et le solvant (ou mélange de solvants), ce dernier se déplace le long de la phase stationnaire (gel de silice) qui est fixée sur une plaque de verre, ou un support en plastique ou aluminium (**Mendham et al., 2006 ; Mesplède et Saluzzo, 2004**).

Lorsque plusieurs solvants ne permettent pas la séparation des mélanges même en utilisant successivement plusieurs systèmes de solvants, ou bien afin de vérifier la pureté du dépôt, une chromatographie à deux dimensions ou bidimensionnelle est réalisée pour la même plaque chromatographique, cette dernière est de forme carrée (ex : 10 X 10 cm), un premier développement de la plaque avec un système de solvants A en mettant le dépôt initiale sur le coin gauche de la plaque, le chromatogramme est retiré, séché, retourné à 90° contre le sens des aiguilles d'une montre, un nouveau développement est réalisé avec un second système de solvants B, les résultats permettent de vérifier ou de réfuter la présence d'un seul produit (**Mendham et al., 2006**).

9.2. Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible utilise le rayonnement ultraviolet et la lumière visible pour aider à déterminer la structure chimique d'une solution donnée, la région UV correspond aux longueurs d'ondes allant de 200 à 400 nm et la région visible celle adjacente de 400 à 800 nm, elle permet la caractérisation qualitative d'une sensibilité élevée d'un composé chimique, elle agit comme un complément à la spectroscopie infrarouge, l'analyse structurale qualitative est ainsi possible en comparant les spectres enregistrés avec des spectres de référence figurant dans des banques de données (**Biemont, 2008**), les pics d'absorptions des polyènes sont résumés dans le tableau n° 5.

Tableau n° 5 : maximum d'absorption UV des polyènes conjugués (en nm) (Rabek, 1995)

molécule									
triènes	240	248	257	268					
tétraènes				267	278	290	304		
Pentaènes					279	290	304	317	334
Hexaènes							300	313	328
Heptaènes								316	332
Octaènes									332
*				267	278	290	303	315	331

* : moyenne des maximum d'absorption des longueurs d'onde.

9.3. Spectroscopie infrarouge

En chimie organique, la spectrométrie moléculaire dans le domaine infrarouge est utilisée pour déterminer les différences d'énergie entre les différents états vibrationnels d'une molécule solide ou liquide, le spectre d'absorption infrarouge d'un composé peut être considéré comme une empreinte digitale, chaque groupement fonctionnel (ex C=O, C=C) aura des fréquences caractéristiques chaque liaison possède son propre pic d'absorption.

L'identification d'un composé chimique à partir de son spectre consiste d'abord à déterminer la nature des groupements fonctionnels susceptibles d'être présents, il convient cependant de ne pas se baser sur une région spectrale limitée dans cette identification, cette technique est souvent utilisée en parallèle avec d'autres techniques comme la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire (**Biemont, 2008**).

Matériels et Méthodes

Objectif de travail

Ce projet de thèse débuté en Janvier 2010, reposait sur le criblage des souches d'actinomycètes des eaux du lac el Mellah, de les identifier, et d'étudier leur propriétés antifongiques.

Nous nous sommes intéressés à l'activité des souches d'actinomycètes sur les souches bactériennes et fongiques nosocomiales qui sont connues pour leurs incidence dans les infections intra hospitalière et la prévalence de leurs résistances aux traitements thérapeutiques actuels ; le recherche de l'activité est également testée sur *Candida albicans*, une levure commensale, pathogène opportuniste dotée d'importantes facultés adaptatives, bien connue des milieux hospitaliers et très souvent étudiée pour pathogénicité et ses mécanismes de résistance aux antifongiques.

L'isolement des souches d'actinomycètes de l'eau salée (le lac El Mellah) en essayons d'obtenir des souches potentiellement différentes et/ou nouvelles et de démontrer leur potentiel antifongique sur *C. albicans*, en essayant d'extraire et d'identifier partiellement la molécule en question.

Les souches d'actinomycètes les plus performantes sur la levure feront l'objet d'une étude morphologique et physiologique dans le but de les identifier et de les caractériser.

I. Le site d'étude

1. Isolement

Le Parc National D'El-kala situé à l'extrême nord est Algérien a été créé en 1983 par un décret présidentiel dans le besoin de conserver et de protéger des richesses naturelles que recèle ce territoire, il est inscrit en tant que réserve de la biosphère par l'UNESCO depuis 1990, il figure parmi les zones les plus prestigieuses d'Algérie protégée par la convention Ramsar, représenté par un ensemble de forêt remarquable, il est également composé d'un complexe de zones humides unique en Algérie le lac Tonga, Oubeira et la lac El Mellah, représentés dans la photo suivante



Photo n° 2 : position géographique du lac El Mellah (google.com).

La zone humide du lac el Mellah est bordé, au nord, par la mer méditerranée entre les deux Cap Rosa et Roux, au sud par la forêt, à l'Est par l'agglomération du pont de « Melha » et la forêt de Boumalek, et à l'Ouest par les plaines de Boutheldja et de Ben M'hidi (**Boumezbeur et Bouteldji, 2005**), le site est entouré d'une forêt humide, une végétation dense à la limite des eaux et d'un cordon dunaire important, son emplacement géographique et ses caractéristiques écologiques (eau douce et eau marine) conditionnent également les espèces aviaires qui s'y installent (sédentaires et migratrices), les eaux du lac font l'objet d'une productivité de plusieurs espèces de poissons essentiellement d'anguilles, de soles, et de quelques variétés de mullets (**Boumezbeur et Bouteldji, 2005 ; De Groot et al., 2007**).

La valeur socioéconomique du site par sa productivité piscicole et ses richesses et caractéristiques biologiques en font un écosystème unique de la Méditerranée, cependant les agressions naturelles (les incendies multiples), urbaines (déchets urbains) et l'activité anthropique (élevage des bovins, ovins, et caprins) constituent une menace pour l'équilibre

naturel du site d'étude et la convention s'inscrit dans le but de conserver et de protéger ce patrimoine naturel (**Boumezbeur et Bouteldji, 2005**).

Le lac est un bassin ovoïde peu profond (profondeur maximale de 6m) d'environ 865 ha allongé nord nord-est sud sud-est, connecté avec la mer par un chenal versant de 900 m de longueur assurant ainsi les apports en eau salée, par ailleurs, l'apport en eau douce est acheminé par les rejets des oueds, à savoir, l'Oued Erguibet par l'Ouest, l'Oued Mellah et Aroug par le sud, ce dernier se jette dans le lac sous la forme d'un delta (**Boumezbeur et Bouteldji, 2005**).



Figure n° 14 : Localisation des différents points de prélèvements (google.com).

2. Echantillonnage et prélèvement

L'échantillonnage a été effectué dans la période de Mars 2010, dans le souci d'obtenir des échantillons représentatifs, et compte tenu de la difficulté d'accessibilité au lac nous avons prélevé six échantillons allant de l'extrême Nord-est au sud du lac, la figure n° 14 nous montre localisation des points de prélèvements.

Le site est caractérisé par un déversement d'oued El Aroug au Sud-Ouest (**Boumezbeur et Bouteldji, 2005**). Par ailleurs aucun déversement n'est présent sur la partie Est du lac, les

prélèvements ont été maintenus à 4°C dans des glacières et transportés au laboratoire, l'isolement a été réalisé le même jour.

3. Mesure des paramètres physicochimiques du lac

Les paramètres physicochimiques comme le pH, la salinité, la conductivité l'oxygène dissous et la saturation en oxygène ont été mesurés.

4. Isolement

4.1. Les milieux de cultures utilisés

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des actinomycètes sont des milieux sélectifs et électifs.

Tous ces milieux ont été préparés avec l'eau distillée, physiologique (9 g/L d'NaCl), l'eau du lac et l'eau du robinet pour le milieu Cross selon **Larpen et Larpen Gourgaud (1997)**, l'isolement employant différents milieux, températures, ou pH fournit souvent différents microorganismes (**Okami, 1982**).

4.1.1. Les milieux sélectifs

Les milieux de cultures sélectifs sont des milieux de cultures qui favorisent la croissance de microorganismes particuliers en excluant celle des autres, par addition d'un agent dit « sélectif » (**Delarras, 2014**).

Dans notre étude, le milieu caséine amidon à été rendu sélectif par l'addition d'antibiotiques et d'antifongiques pour limiter la croissance bactérienne et fongique.

Le milieu caséine amidon est additionné d'Amphotéricine B à raison de 75µg/ ml pour limiter la croissance fongique (**Kitouni et al., 2005**).

Le milieu caséine amidon est additionné de Pénicilline G à raison de 25µg/ ml afin d'inhiber la croissance bactérienne (**Badji et al., 2005**).

4.1.2. Les milieux électifs

Le milieu de culture électif favorise la croissance de microorganismes particuliers en limitant celle des autres (**Delarras, 2014**).

Dans notre étude, les milieux dont la composition suffit à assurer la croissance et la sporulation des actinomycètes par un rapport aux bactéries à croissance rapide.

Les milieux utilisés sont le milieu ISP₁, ISP₂, ISP₄, ISP₅, le milieu Cross et enfin le milieu Gausse (Annexe n° 2).

Les boîtes de Pétri sontensemencées par inondation, incubées à 28°C, puis observées après 7, 14, et 21 jours d'incubation.

5. Observation à la loupe binoculaire

Après 7 jours d'incubation, les boîtes contenant des colonies suspectes sont observées à la loupe binoculaire, avant d'être repiqué sur le même milieu d'isolement, en parallèle un état frais est effectué pour vérifier l'aspect microscopique des colonies suspectes.

6. Observation au microscope optique

L'observation microscopique des actinomycètes a été effectuée à l'état frais au grossissement x10 et x40 ensuite après une coloration de Gram, nous recherchons des bactéries Gram positives, formant des filaments ou des spores (chaines de spores), des conidies, des sporanges ou tout autres formes caractéristiques des actinomycètes (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

7. Purification et conservation

Les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique, puis observé sur une lame à l'aide d'un microscope photonique, elles sont alors purifié sur le milieu ISP₂, puis conservés sur le même milieu en tubes inclinés (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

II. Recherche de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées a été testée sur :

Staphylococcus aureus nosocomiale (laboratoire de microbiologie de l'hôpital « Dorban » d'Annaba).

Escherichia coli nosocomiale (laboratoire de microbiologie de l'hôpital « Dorban » d'Annaba).

Deux souches de levures nosocomiales souche A et B (laboratoire de parasitologie-mycologie de l'hôpital « Ibn Sina » d'Annaba).

Candida albicans IPA 549 (Institut Pasteur d'Alger).

Candida albicans SC1 nosocomiale (isolée d'un crachat d'un patient mâle de 60 ans avec une maladie pulmonaire chronique)

Candida albicans SC2 nosocomiale (isolée d'une aspiration bronchique d'une patiente de 73ans avec une détresse respiratoire)

Candida parapsilosis ATCC 22019

Candida krusei ATCC 6258

Les souches nosocomiales de *Candida* SC1 et SC2 ainsi que l'ATCC de *C. parapsilosis* et *C. krusei* nous ont été envoyés du laboratoire de parasitologie-mycologie, hôpital de la Timone à Marseille (France).

1. Recherche de l'activité en milieu solide

1.1. Technique de stries croisées (Duraipandiyar et al., 2010 ; Valan Arasu et al., 2009).

La recherche de l'activité antimicrobienne par la technique des stries croisées est réalisée sur l'ensemble des souches nosocomiales et ATCC préalablement citées.

Cette étape permet de cribler les souches productrices de molécules antimicrobiennes actives en mettant en évidence des zones d'inhibitions de la croissance (figure n°15).

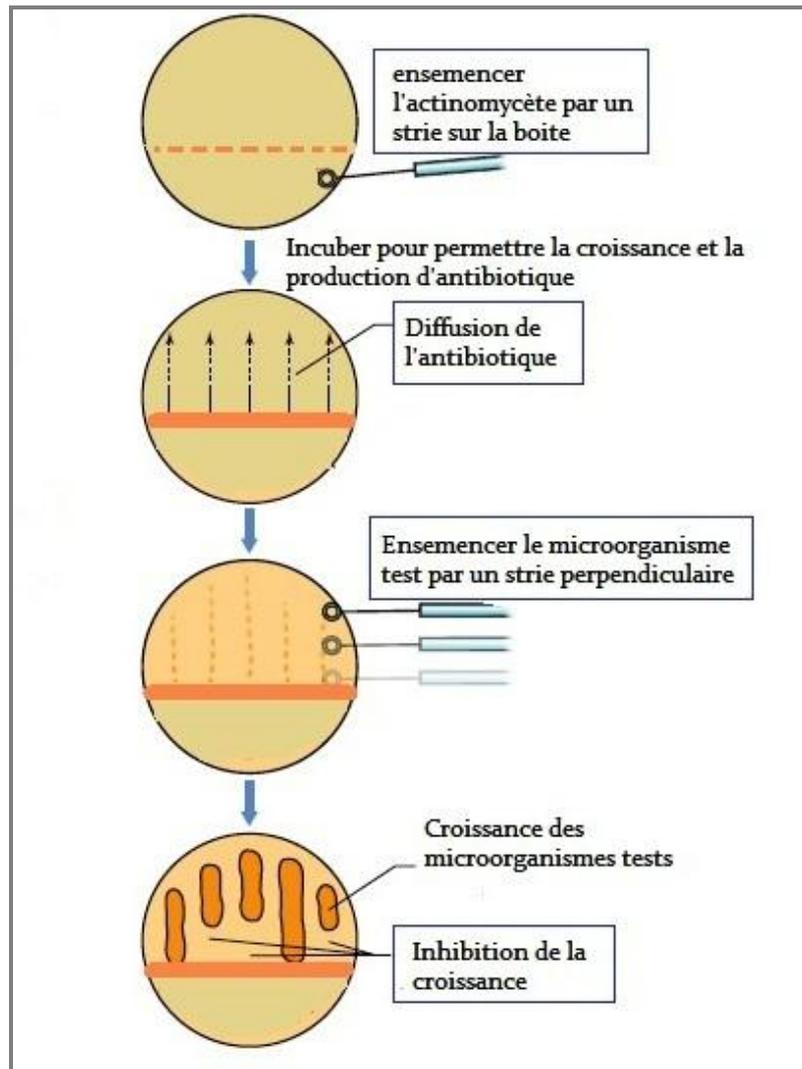


Figure n° 15 : Recherche de l'activité antimicrobienne par la technique de stries croisées (Madigan et al., 2012).

a. Technique

La technique des stries croisées consiste à ensemencer la souche d'actinomycètes par un strie central dans une boîte de Pétri contenant le milieu ISP₂, d'incuber pendant 7 jours à 28°C, ensuite les souches tests seront ensemencées par un strie croisant perpendiculairement celui de l'actinomycète, incuber à 37 °C pendant 24 à 48 h, une autre boîte du milieu ISP₂ est

également ensemencée avec les souches testes seules et incubée dans les mêmes conditions, cette boîte servira de témoin négatif (absence d'inhibition) (Valan Arasu et al., 2009).

La production de molécules antimicrobiennes se traduira par une inhibition partielle ou totale de la souche test (figure n° 14).

Cette technique présente l'avantage de pouvoir utiliser plusieurs microorganismes tests pour la même souche d'actinomycète et sur la même boîte.

1.2. Technique de la double couche (Bastide et al., 1986).

L'activité antifongique des souches d'actinomycètes est aussi évaluée par la technique de la double couche.

a. Technique

Cette technique consiste à ensemencer l'actinomycète ponctuellement sur la boîte de Pétri contenant le milieu ISP₂, après incubation 7 jours à 28°C, on coule à la surface 2,5 ml de milieu semi solide de Sabouraud (agar 8 g/l) préalablement ensemencé avec *C. albicans* (1 ml d'inoculum avec 9 ml de milieu), incubation à 37°C de 24 à 48 h, on obtient ainsi une concentration finale, à la surface de chaque boîte de 10⁴ levures/ ml.

Le résultat positif se traduit par absence de croissance de la souche test autour de la colonie d'actinomycète (Bastide et al., 1986).

1.3. Production des molécules bioactives en milieu liquide (Badji et al., 2006).

La production des métabolites bioactives en milieu liquide est détectée par la formation d'une zone d'inhibition de croissance de la souche test autour du disque, l'activité est proportionnelle au diamètre de cette zone, le suivi de cette activité par rapport à la croissance des actinomycètes est appelée cinétique de **croissance** (des actinomycètes en milieu liquide) et de **production** (des métabolites secondaires), la cinétique **de pH** des milieux est également suivie (Badji et al., 2006).

a. Technique

A partir d'une culture sur boîte de l'actinomycète (2 à 4 semaines), préparer une suspension dense qui servira d'inoculum, la densité optique de l'inoculum est mesurée par spectroscopie.

Préparer des Erlenmeyer de 150 ml de trois milieux de cultures différents ISP₁, ISP₂ et GYEA (annexe n° 2), afin de déterminer le milieu qui donne la meilleure production.

Inoculer (à raison de 1 ml/ 100 ml de milieu) les trois Erlenmeyer qui seront placés dans un incubateur agitateur à 28°C sous rotation continue de 150 tours/ min pendant 15 jours.

Chaque jour, 10 ml sont prélevés stérilement, centrifugés, 50 µl du surnageant sont pipetés (micropipette) et placés sur un disque de papier Wattman n°1, séchés à l'étuve (37°C pendant 30 min), le pH du surnageant est calculé à l'aide d'un pH mètre.

Le culot est récupéré, lavé trois fois avec de l'eau distillée stérile (centrifuger entre les lavages), puis séché à l'étuve, le poids sec est mesuré en mg/ ml de surnageant (**Badji et al., 2006**).

A partir d'une culture jeune (18 h) pour *S.aureus* et de l'*E.coli* et de 24 h pour *C.albicans*, préparer une suspension d'une densité de 0,5 McFarland pour les bactéries (une densité optique égale à 0,2 lue à 650 nm) et une suspension de 2 McFarland pour les levures.

Après inoculation du milieu avec les microorganismes tests, les disques sont placés à la manière d'un antibiogramme, placés à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 h pour les bactéries et à 28°C pendant 24 h pour les levures (figure n° 16) (**Joffin et Leyral, 2001 ; Joffin et Leyral, 2006**).

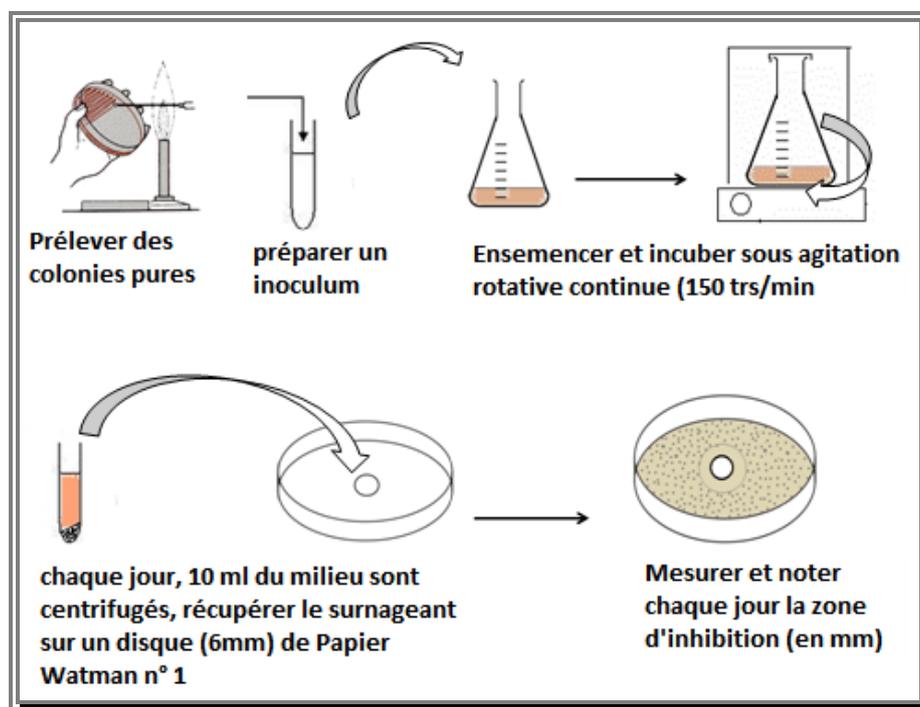


Figure n° 16 : Recherche d'activité en milieu liquide (Badji et al., 2006).

1.4. Identification des levures nosocomiales A et B

Les levures nosocomiales qui nous ont été fournis par le laboratoire de parasitologie - mycologie de l'Hôpital Ibn Sina ont été isolées de furoncles de deux patients admis et sont soupçonnées d'appartenir au genre *Candida*.

L'identification des levures nosocomiales A et B passe par un plusieurs étapes

a. Examen microscopique (Leyral et Joffin, 1991).

A l'état frais et après une coloration au bleu de méthylène, les lames sont recouvertes de la solution, après 3 min, elles sont lavée avec de l'eau distillée stérile, l'observation se fait à l'immersion (x100).

b. Test de pseudo-filamentation (Leyral et Joffin, 1991).

Sur milieu spécifique RAT (rice tween agar), réaliser un strie (ou deux stries éloignés) de chaque levure sur boîte de Pétri, recouvrir immédiatement le strie par une lamelle préalablement stérilisée, incuber la boîte à 28 °C pendant 24 heures.

L'observation des pseudo-filaments se fait en plaçant la boîte sous l'objectif x40.

c. Identification biochimique des levures A et B (Leyral et Joffin, 1991).

L'étude des caractères biochimiques des levures nosocomiales a été réalisée par le système ID 32C, galerie spécifique pour l'identification des levures, deux plaques ont été réalisées.

A partir d'une colonie pure de chaque levure, réaliser une suspension de 2 Mc Farland, inoculer le C medium fournis avec la galerie par 250 µl de cette suspension.

Après homogénéisation, remplir les cupules de la galerie, recouvrir et incuber à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

La lecture se fait visuellement en comparant au contrôle négatif, en notant chaque trouble qui implique une croissance positive dans la cupule.

1.5. Antifongigramme des souches de *Candida* SC1 et SC2 (Khlif et al., 2010)

Un antifongigramme a été réalisé sur les deux souches de *Candida* isolé de l'Hôpital de la Timone, par la technique « Sensitive yeast one[®] »

C'est un système de diagnostic *in vitro* de la sensibilité des levures non exigeantes à croissance rapide aux antifongiques utilisés, c'est une méthode de micro-dilution colorimétrique, chaque plaque comporte six lignes, chaque ligne représente une série de dilution d'un antifongique donné, l'amphotéricine B (de 0.008 à 16 mg / ml), le fluconazole (de 0.125 à 256 mg / ml), Itraconazole (de 0.008 à 16 mg / ml), le kétoconazole (de 0.008 à 16 mg / ml), la 5-fluorocytosine (de 0.03 à 64 mg / ml) et le voriconazole (de 0.008 à 16 mg / ml) dans les puits individuels, plus un témoin négatifs de croissance (puits bleu), et enfin, un témoin positif de croissance (puits rouge ou pourpre, photo n° 3), le tableau n° 6 donne les seuils critiques de sensibilité des souches de *C. albicans* aux antifongiques utilisés.

a. Technique

Préparer une suspension d'une densité de 0.5 McFarland à partir d'une colonie pure de 24h d'incubation de *C. albicans*.

Transférer 20µl de cette suspension dans 11 ml du bouillon « YeastOne » pour obtenir un inoculum de 1,5 à 8 X 10³ CFU/ ml, inoculer chaque puits avec 100 µl à l'aide d'une micropipette, couvrir les puits et incuber à 35° C pendant 24 heures.

La lecture manuelle se fait en observant la croissance dans les puits qui se manifeste par un changement de couleur (vers le rose, le pourpre ou le rouge selon l'antifongique utilisé).

La concentration minimale inhibitrice CMI représente la plus faible concentration pour laquelle l'agent antifongique inhibe la croissance, autrement dit le premier puits bleu.

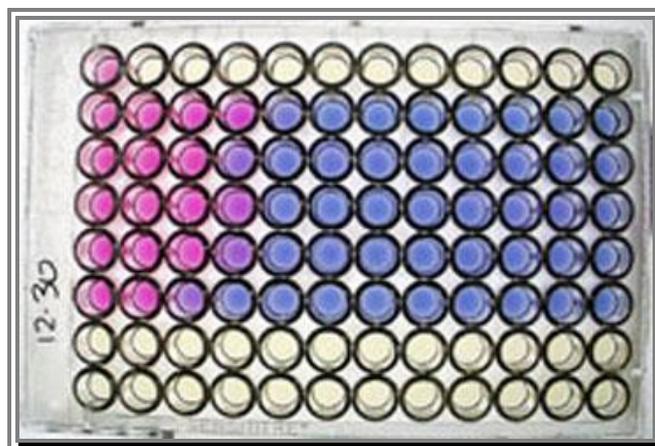


Photo n° 3 : Plaque « Sensitive YeastOne® » montrant les CMI de chaque antifongique (Alexander et Pfaller, 2006).

Tableau n° 6 : seuils critiques de sensibilité des souches de *C. albicans* déterminés par le CLSI (M27-A3) (MCS diagnostic, 2012) (Pfaller et al., 2010 ; Pfaller et al., 2011)

	Sensible ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Intermédiaire/ Dose dépendante ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Résistante ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Anidulafungine (ANY)	≤ 0.25		≥ 1
Micafungine (MIY)	≤ 0.25		≥ 1
Caspofungine (CAY)	≤ 0.25		≥ 1
5-fluoro-cytosine (5-FC)	≤ 4	8 - 16	≥ 32
Voriconazole (VOY)	≤ 1	2	≥ 4
Itraconazole (ITY)	≤ 0.125	0.25 – 0.5	≥ 1
Fluconazole (FLY)	≤ 2	4	≥ 9
Amphotéricine B (AMY)	≤ 1		≥ 4

III. Identification des souches actives

1. Aspect macroscopique des souches actives

L'aspect macroscopique (recto) des souches actives est examiné par observation avec la loupe binoculaire de la boîte de Pétri contenant une culture jeune de la soucheensemencée par touche et présentant une bonne sporulation (Barke et al., 2010).

2. Caractères morphologiques des souches actives

L'étude des caractères morphologiques des actinomycètes filamenteux dépend des milieux de cultures utilisés et qui sont favorable à une bonne sporulation, milieux dits « standards » ISP₁, ISP₂, ISP₃, ISP₄, ISP₅, préconisés par **Shirling and Gottlieb (1966)**. La couleur la forme et les chaine de spores doivent être déterminés sur des cultures matures avec une bonne croissance.

a. Technique

Les milieux doivent être préalablement coulés afin de s'assurer de leur stérilité.

Utiliser un inoculum à partir de souches jeunes ou matures (7 à 10 jours d'incubation), préparer une suspension dense à partir de la quelle tous les milieux seront inoculés d'environ 0,05 ml de cette suspension.

L'observation du mycélium aérien, pigmentation du mycélium de substrat ou la diffusion d'un pigment soluble sera effectué après incubation 7, 14 à 21 jours à 28°C (**Shirling and Gottlieb, 1966**).

3. Aspect au microscope optique

Déterminer les caractéristiques des spores, les chaines de spores (nombre forme et morphologie) par examen direct au grossissement X100, l'observation nécessite des cultures matures, car les cultures trop jeunes ou trop vieilles peuvent altérer la forme de la spore et ou de la chaine de spores.

Noter chaque présence de spores flagellées, de sporanges, formation de conidies ou fragmentation du mycélium (**Williams et al., 1983**).

4. Production des pigments mélanoides (Shirling and Gottlieb, 1966)

La recherche de pigments mélanoides a été réalisé selon la méthode **de Shirling and Gottlieb (1966)** en utilisant deux milieux gélosés ISP6 et ISP7 sur boîte de Pétri.

a. Technique

Préparer un inoculum source à partir de culture mature (7 à 10 jours d'incubation), comme cité pour les caractères morphologiques, inoculer les milieux ISP6 et ISP7 simultanément, après incubation à 28°C, l'observation s'effectue après 2 jours puis après 4 jours d'incubation, noter les cultures qui forment une couleur de pigmentation diffusible verdâtre ou brune à noirâtre doivent être considérées comme positives, au contraire une absence totale de pigments diffusible dans la gélose sont considéré comme résultat négatif.

Les autres milieux organiques contenant de la peptone ou du tryptone incluant le milieu gélosé ISP₁ agar sont observés pour la diffusion des pigments mélanoides, la présence de pigment doit également être notée.

5. Caractères physiologiques

5.1. Croissance à différentes température (Goodfellow, 1971).

La croissance des actinomycètes actives isolées des eaux du lac el Mellah à différentes températures de croissance (5°C, 25°C, 37°C, 45°C) a été réalisé sur boîte de Pétri en utilisant le milieu gélosé ISP₂, pour chaque souche et chaque température la croissance est notée et estimée après 7, 14, et 21 jours d'incubation, les résultats sont regroupés dans un tableau (Goodfellow, 1971).

5.2. Tolérance au chlorure de sodium (Tresner et al., 1968)

La tolérance au chlorure de sodium par les microorganismes généralement et les actinomycètes spécialement a bien été démontrée (Li et al., 2003 ; Saurav et Kannabiran, 2010 ; Thumar et singh, 2007), le milieu gélosé ISP₂ est préparé avec différentes concentrations d'NaCl (0.5 ; 1 ; 1.5 ; 2 ; 2.5 ; 3 ; 3.5 et 4%), les boîtes sont inoculées, incubées à 28°C pendant 7, 14 et 21 jours.

Déterminer par la suite l'halotolérance de chaque souche par rapport à sa croissance, sa sporulation, et sa pigmentation par rapport au témoin négatif (milieu ISP₂ sans NaCl ajouté).

6. Caractères biochimiques

6.1. Hydrolyse de l'amidon (Gordon et al., 1974)

Après ensemencement des actinomycètes en milieu gélose nutritive additionnée d'amidon (10 g dans 100 ml de GN), les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours.

L'hydrolyse de l'amidon est révélée en ajoutant quelques gouttes de lugol, un résultat positif se traduit par une auréole claire autour de la colonie (Sundaramoorthi et al., 2011).

6.2. Hydrolyse de la gélatine (Pickett et al., 1991)

Une méthode simple et rapide pour la détection de l'hydrolyse de la gélatine en utilisant un film photographique usé préconisée par Pickett et al., (1991).

Découper des bandelettes de papier photographique usé de tels sorte qu'il sera transférer dans les conditions de stérilité dans un tube à essaie contenant de l'eau physiologique stérile (environ 5ml), y ajouter un inoculum dense de la souche d'actinomycète à tester.

De même façon préparer un tube à essaie avec de l'eau physiologique stérile, y ajouter la bandelette de papier photographique pour créer un témoin négatif (témoin de comparaison).

Incuber à 28°C pendant 7, 14 et jusqu'à 21 jours, la liquéfaction de la gélatine se traduit par décollement de la couche supérieur du film.

6.3. Hydrolyse de la caséine (Gordon et al., 1974)

Après ensemencement des actinomycètes sur milieu solide à base de caséine, le résultat positif se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie.

6.4. Hydrolyse du tween 80 (Sierra, 1956)

Le tween est utilisé comme substrat pour détecter l'activité lyopolitique, cette dernière se traduit par la présence sur boîte d'un halo opaque autour de la colonie, un milieu basal est préparé (annexe n° 2).

Le milieu basal est stérilisé et gardé en surfusion (50°C), le tween 80 est autoclavé séparément et ajouté aux flacons du milieu basal à raison de 1% (v/v), le milieu est coulé sur boîtes et la souche d'actinomycète est ensemencée par touche, incubée à 28°C pendant 7 jours. Le résultat positif de l'activité lyopolitique se traduit par la présence d'un halo opaque autour de la colonie.

6.5. Utilisation de différentes sources de carbone (Pridham and Gottlieb, 1948)

Cette étude est réalisée sur le milieu ISP₉, un milieu basal minéral à base d'une seule source de carbone, préconisé par Pridham and Gottlieb (1948).

a. Technique

Les différents sucres testés sont les suivants

Pour les oses : D-fructose, D-xylose, D-mannose, L-arabinose, L-rhamnose et le D-galactose.

Pour les diholosides : le sucrose et le D-mélibiose.

Pour les triholosides : le raffinose.

Pour les polyols : le sorbitol et le mannitol.

Le D-glucose est utilisé comme témoin positif et le milieu ISP₉ sans sources de carbone comme témoin négatif de la croissance.

Après préparation du milieu ISP₉, autoclaver le milieu basal.

Préparer des solutions de 10% (poids/volume) de ces sucres avec de l'eau distillée, stériliser la solution par filtration sur une membrane millipore (0,45 µm).

Ajouter la solution stérile au milieu ISP₉ en surfusion (50°C) de façon à obtenir une concentration finale de 1% (poids/volume).

Couler les boîtes de Pétri, ensemencer avec le même inoculum dense de la souche d'actinomycète mature.

Incuber les boîtes à 28°C pendant 7, 14 à 21 jours, la croissance est estimée par rapport à celle obtenue sur ISP₉ sans source de carbone (témoin négatif), et sur ISP₉ + glucose (témoin positif).

6.6. Utilisation de différentes sources d'azote (Williams et al., 1983).

Ce test est réalisé sur milieu basal dont la composition est mentionnée dans l'annexe n° 2.

Les sources d'azotes utilisées (à raison de 0,1 % poids/ vol) sont : Ac L aspartique, Adénine, Guanine, α L alanine, L cystéine, L glutamine, L glycine, Leucine, et enfin le Tryptophane.

Après autoclavage, la source d'azote est ajoutée à raison de 0,1 g par 100 ml de milieu de culture, les boîtes sont coulées,ensemencées à 28°C pendant 7 à 14 jours, la lecture se fait en comparant avec les boîtes contenant le milieu basal sans source d'azote ajoutée (contrôle négatif).

IV. Identification moléculaire de la souche E65

1. Extraction de l'ADN

L'identification de la souche active E65 passe par l'extraction et le séquençage de l'ARN 16S, une première amplification en utilisant deux amorces fD1 (5_-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3_) et RP2 (5_-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3_) (Weisburg and al., 1991).

- De jeunes colonies (3 à 4 jours) sont mélangées avec de la poudre de verre et 500 μ l de tampon G2, après quatre agitations successives pendant 20 sec au « FAST PRET », 200 μ l sont récupérés, y ajouter 10 μ l protéinase K, laisser une nuit à 56°C, 200 μ l sont récupérés et placés dans la machine « EZ1 advanced KL », 100 μ l d'ADN pure sont par la suite récupérés.
- 45 μ l du mixte (amorces, bases nucléotidiques, tampon, Taq polymérase, eau) est ajouté à 5 μ l d'ADN pure de chaque souche et placé dans le thermocycleur dont le programme est 40 fois le suivant : 5 mn à 95°C, 30 sec à 95°C, 30 sec à 62°C, 1 mn 30 sec à 72°C, 7 min à 72°C et enfin refroidie à 4°C.

2. Electrophorèse

Nous obtenons 50 μ l d'ADN appelé produit PCR, après migration sur gel d'agarose, les bandes d'ADN vont être révélées sous UV en ajoutant le bromure d'éthidium. L'ADN est ensuite conservé à 4°C.

3. Purification des bandes d'ADN et séquençage

Le produit PCR sera par la suite purifié avant d'être amplifié une seconde fois avec les amorces mentionnées dans le tableau n° 7.

Tableau n° 7 : amorces utilisées dans l'identification moléculaire de la souche active

357F (5_- CTGCTGCCTCCCGTA -3_)	357R (5_-TACGGGAGGCAGCAG -3_)
536F (5_-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3_)	536R (5_- GTATTACCGCGGCTGCTG -3_)
800F (5_- ATTAGATACCCTGGTAG -3_)	800R (5_- CTACCAGGGTATCTAAT -3_)
1050F (5_- TGTCGTGCTGCTGCTG -3_)	1050R (5_- CACGAGCTGACGACA -3_)
Cud (5_-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3_)	Cud (5_- GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3_)

L'ADN est enfin purifié en ajoutant de la mousse de Sephadex (poudre de Sephadex et de l'eau), centrifugé, et récupéré dans des barrettes recouvert par un tapis, la pureté de l'ADN est vérifiée par électrophorèse.

4. Séquençage et analyse des séquences

Les bandes d'ADN pures sont introduite dans le séquenceur « 3130d genetic analyseur » les séquences brutes sont analysées avec le programme ChromasPro (version 1.5.0) la séquence obtenue est alors comparée pour le degré de similitude avec les espèces bactériennes de références figurantes dans la base de donnée génomique NCBI blast disponible sur le site web ncbi.nlm.nih.gov.

L'alignement des séquences est réalisé avec le logiciel Clustal X2, et enfin l'arbre phylogénétique est construit par la méthode de « neighbor joining » (**Saitou et Nei, 1987**) en utilisant le logiciel Mega 4, la matrice des distance est calculée par le modèle « Kimura 2 parameters ».

V. Etude préliminaire des molécules produite par la souche représentative

1. Extraction de la molécule bioactive

L'extraction de la molécule bioactive est réalisée selon la technique décrite par **Badji et al., (2005)** et celle de **Zitouni et al., (2005)**.

Après avoir testé la production de la souche active E65 sur plusieurs milieux, le milieu ISP1 a été choisi comme meilleur milieu pour l'extraction.

L'étude de l'activité antimicrobienne en milieu liquide nous a permis de déterminer le moment propice pour stopper la culture et permettre l'extraction, ici le quatrième jour représente le maximum de production.

La souche E65 est mise en culture en milieu liquide ISP₁, placé dans un incubateur agitateur à 28°C sous rotation continue de 150 tours/ min pendant quatre jours.

L'extraction de la molécule est effectuée en utilisant quatre solvants de polarité différente : n-hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol, du plus miscible dans l'eau au moins polaire.

Pour cela, le contenu de la culture est centrifugé, chaque 100 ml du filtrat est récupéré, additionné à 100 ml (v/v) de solvant sous agitation pendant deux heures à température ambiante.

La phase organique est récupérée à l'aide d'une ampoule à décanter, puis déshydratée en la faisant passer à travers un filtre contenant du sulfate anhydre en poudre afin d'éliminer les contaminants hydrophiles.

La phase déshydratée est évaporée sous vide à 45°C à l'aide d'un rotavapor, l'extrait dit « brut » est alors dissous dans 2 ml de méthanol (Badji et al., 2005 ; Zitouni et al., 2005).

2. Identification partielle de la molécule bioactive

L'identification dite partielle de la molécule passe par la combinaison de plusieurs techniques à savoir, une chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait brut, une révélation de groupements spéciaux (ex : groupement amine) par des révélateurs chimiques déterminés, une spectroscopie UV-Visible de l'extrait et aussi une spectroscopie infrarouge.

L'identification complète nécessite d'autres techniques de chimie organique plus complexes tels que la chromatographie HPLC, ou encore la spectrométrie de masse.

2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) (Badji et al., 2005 ; Zitouni et al., 2005).

a. Technique

Préparer le mélange de solvants (phase mobile), ici plusieurs combinaisons ont été préparées de la plus polaire à la moins polaire afin de déterminer le meilleur système de migration et de s'assurer de la pureté de l'extrait, les mélanges étant :

- a) Méthanol- acétate d'éthyle (100 :15)
- b) n-butanol- acide acétique- eau (3 :1 :1)
- c) Ethanol- triéthylamine- eau (8 :1 :1)
- d) Ether de pétrole- acétate d'éthyle (7 :3)
- e) Chloroforme- méthanol (8 :2)

Un spot de l'extrait brut est placé délicatement à l'aide d'un capillaire sur la plaque de CCM goutte à goutte (sécher entre les gouttes).

La plaque est directement placée dans la cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturé avec le solvant de migration pour être développé, des exemplaires de plaques ont été effectués et migrés pour chaque mélange de solvant.

La chromatographie est arrêtée lorsque le solvant atteint le seuil de migration (à 1 cm du bord supérieur de la plaque), elle est séchée, puis révélée sous éclairage UV à 254 nm et à 365 nm, et enfin calculer le rapport frontal (Rf) de chaque tache.

2.2. Révélation des chromatogrammes par des révélateurs chimiques

Après avoir choisi le meilleur système de migration, plusieurs plaques similaires ont été développées dans les mêmes conditions afin d'être révélés, ici les taches sont incolores, on utilise alors un révélateur, à chaque type de composés correspond un ou plusieurs révélateurs, il existe une liste appuyée sur des références disponible sur internet (http://www.clubdeccm.com/PDF/Dyeing_Reagents_TLC.pdf)

2.3. CCM deux dimensions (Mendham et al., 2006).

Une Chromatographie bidimensionnelle a été réalisée sur l'échantillon brut, cette technique permet ainsi la séparation de composés de structures très proches, ou de vérifier la présence d'un seul composé, sur une plaque de forme carrée (10x10 cm), le dépôt se fait sur le coin gauche de la plaque, développé avec le meilleur système de la CCM, le système acétate d'éthyle-méthanol (100 :15 v/v), la plaque est ensuite séchée, retournée à 90° (vers la gauche) pour un second développement avec un autre système de solvant : éthanol- tri éthyle amine-eau (8 :1 :1 v/v).

2.4. Spectre UV-Visible de l'extrait brut (Boudjella et al., 2006).

Le spectre UV-Vis de l'extrait brut est donné par un spectrophotomètre UV-VIS double faisceau « 8500 Ltd-China ».

2.5. Spectroscopie infrarouge (Boudjella et al., 2006).

Le spectre infrarouge de l'extrait brut solubilisé dans le chloroforme est donné par un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier « FTIR ».

L'extrait brut solubilisé dans le chloroforme est déposé entre deux pastilles d'NaCl de manière à obtenir un film fin et en évitant les bulles d'air, les pastilles sont introduites dans la zone de mesure, la source infrarouge traverse l'échantillon et un tracé du spectre est donné par l'appareil, l'interprétation repose sur l'identification des groupements fonctionnels contenus dans l'échantillon à analyser.

Résumé

Ainsi, la figure n° 17 nous permet de schématiser et de reprendre les points essentiels et les différentes étapes décrites dans notre étude des souches d'actinomycètes isolées du lac El Mellah (Parc National d'El Kala), du choix de la souche E65 vers l'extraction et l'identification de la molécule antifongique produite par cette souche.

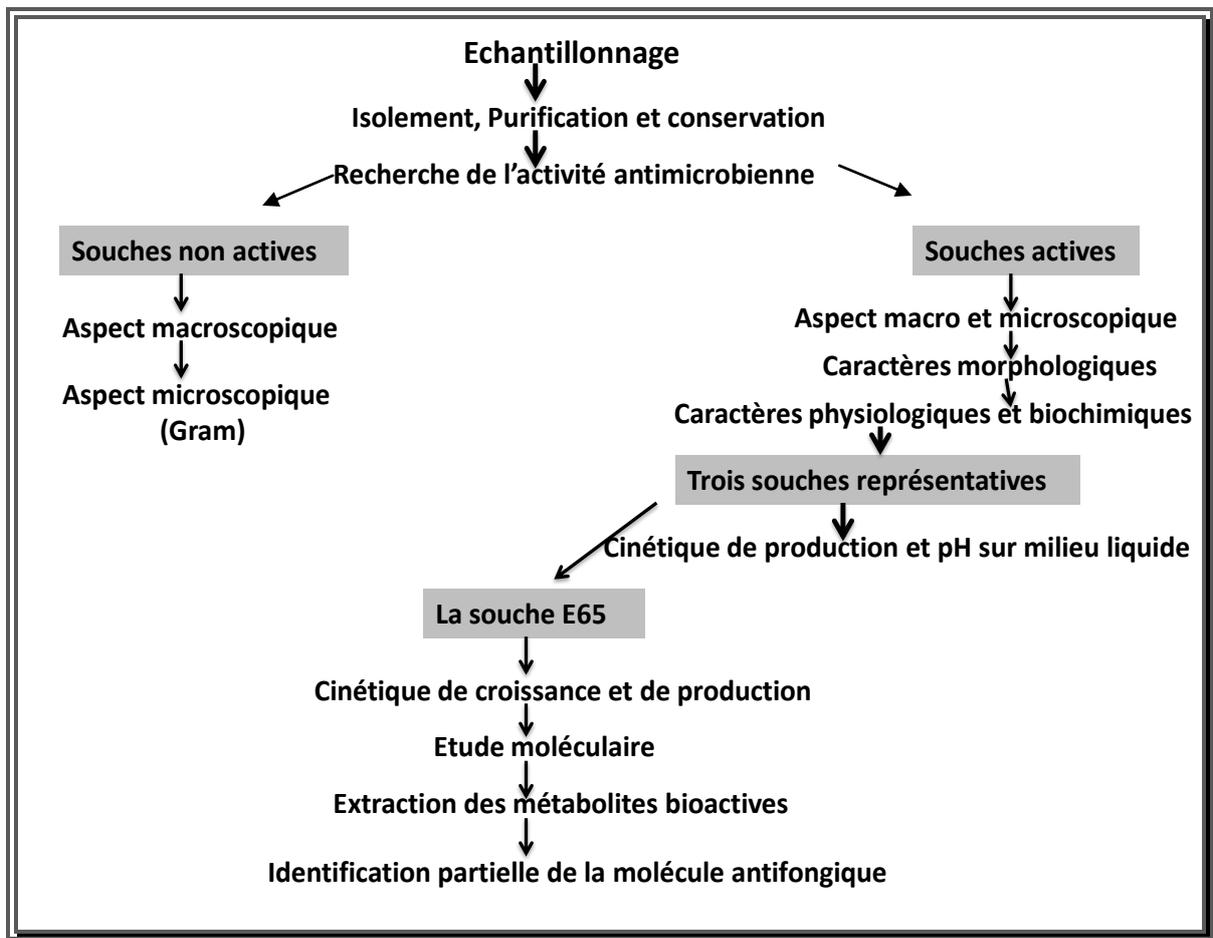


Figure n° 17: Présentation des différentes étapes de l'étude microbiologique des souches d'actinomycètes.

Résultats et discussion

I. Echantillonnage et prélèvement

1. Résultats

Au total six échantillons représentatifs ont été récoltés, la stratégie d'échantillonnage réside dans la diversité des échantillons prélevés, du nord (près du chenal versant) au sud (près du rejet de l'oued El Mellah) dans le but de maximiser le nombre de souches. Les paramètres physicochimiques des échantillons comme la salinité, la conductivité, le pH et l'oxygène dissout sont mesurés, le tableau n° 8 résume les résultats obtenus.

Tableau n° 8 : Paramètres physicochimiques du lac El Mellah

Param. Physicochimiques	Ech. mère						
	EM ₁	EM ₂	EM ₃	EM ₄	EM ₅	EM ₆	
pH	8,01	8,01	7,99	7,98	7,94	8,10	
Salinité (g/l)	20,6	20,7	20,7	20,5	20,8	20,6	
Conductivité (µs/cm)	334	336	336	332	336	334	
Oxygène dissout (mg/l)	5,01	5,53	5,19	4,79	4,13	5,95	
Saturation de l'oxygène (%)	52,5	54,1	51,8	47,7	46,9	63,2	

2. Discussion

L'instabilité et la variabilité des eaux saumâtre a préalablement été rapportée (**Stora, 1976**), ces milieux sont connus pour être des écosystèmes variables et irréguliers sur le plan hydrologique et physicochimique.

Si la diminution de la teneur en oxygène dissout fut observé en allant de l'EM₁ qui se trouve être proche du chenal versant et donc plus oxygénée vers l'EM₅ plus loin du chenal et donc moins oxygéné, par ailleurs, l'élévation de cette teneur pour l'échantillon EM₆ s'explique par sa proximité de l'embouchure de l'oued Bélaroug et l'action hydrodynamique de l'eau (**Drarédja et Kara, 2004**).

2.1. pH

Les actinomycètes représentent un groupe très vaste de microorganismes, le pH optimum de croissance est de 7 à 7.5, elles sont particulièrement sensible aux pH acides (**Davet, 1996**), la majorité des actinomycètes d'origine marine peuvent croître à un pH compris entre 6 et 8, d'autres sont alcalophiles et possèdent un pH optimum de 9, celles-ci peuvent croître à des pH compris allant de 7 à 11 pour les extrémophiles (**Kumar et al., 2011**).

Le pH des échantillons mères indique une eau légèrement alcaline (une moyenne de pH égale à 8) ce qui n'empêche pas la prolifération des actinomycètes dans cet écosystème (**Lechevalier, 1881**).

Grouzis et Le Floch (2003) ont également rapporté qu'un pH alcalin favorise la croissance d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques principalement dans les sites arides.

2.2. Salinité

Le lac El Mellah représente une « lagune vivante », elle subit les apports en sel du milieu marin qui lui confère ses propriétés euryhalines (salinité relativement importante), et des apports en eau douce pour garder ainsi un gradient de salinité relativement faible à celui de la mer (**Faurie et al., 2012**), ainsi, le caractère saumâtre des eaux du lac el Mellah conditionne les organismes vivants qui y règnent, pour les actinomycètes, il peut s'agir d'organismes halotolérants ou halophiles (**Dworkin, 2006**).

2.3. Conductivité

Les eaux du lac sont caractérisées par une minéralisation moyenne, caractéristique des eaux saumâtres et des eaux de mer, la conductivité exprime la charge en sels de l'eau et le degré de sa pureté (**Rodier et al., 2009**).

2.4. L'oxygène dissous et la saturation en oxygène

La disponibilité en oxygène est essentielle pour maintenir sain l'écosystème aquatique, la consommation d'oxygène est liée à une décomposition de la matière organique trop élevée, et les activités humaines tels que le lessivage de fertilisant et les rejets d'eaux usées sont souvent incriminés dans ce phénomène d'eutrophisation des lacs et des étangs d'eaux, un phénomène réversible seulement si les apports indésirables cessent et que le volume d'eau augmente (**Anctill, 2008**).

2.5. Le lac el Mellah

La mesure des paramètres physicochimiques permet l'évaluation des risques et de la vulnérabilité du site d'étude (urbanisation, pollution), en effet le lac el mellah est protégé par la convention Ramsar et ce depuis 2003, ce qui n'empêche pas la dégradation et la mise en danger du site, ceci peut se traduire par une atteinte à la biodiversité et la richesse de la zone humide et avoir un impact sur le rôle écologique et économique d'envergure (**De Groot et al., 2007**).

II. Isolement

1. Résultats

Un protocole d'isolement a été mis en place dans le but d'obtenir un bon criblage, avec l'utilisation de différents milieux, et l'isolement à partir des échantillons mère directement.

Les résultats montrent que les milieux à base d'amidon comme les milieux **Gausse**, **ISP₄** ou bien le milieu **caséine amidon** se sont révélés être les **plus favorables**.

Au bout de 10 jours d'incubation à 28°C, les colonies caractéristiques des actinomycètes commencent à apparaître, l'aspect microscopique est observé, puis elles sont repiquées sur le

même milieu d'isolement, après plus d'un mois d'incubation, **104 souches** ont été isolées (tableau n° 9), le nombre des souches isolées par milieu et par échantillon sont représentées par les figures n° 18 et 19.

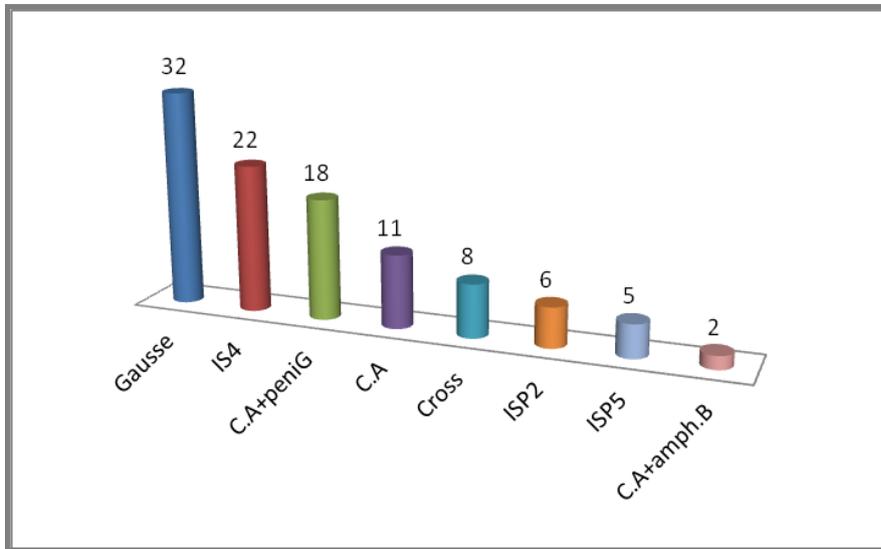


Figure n° 18 : Nombre de souches isolées par milieu de culture.

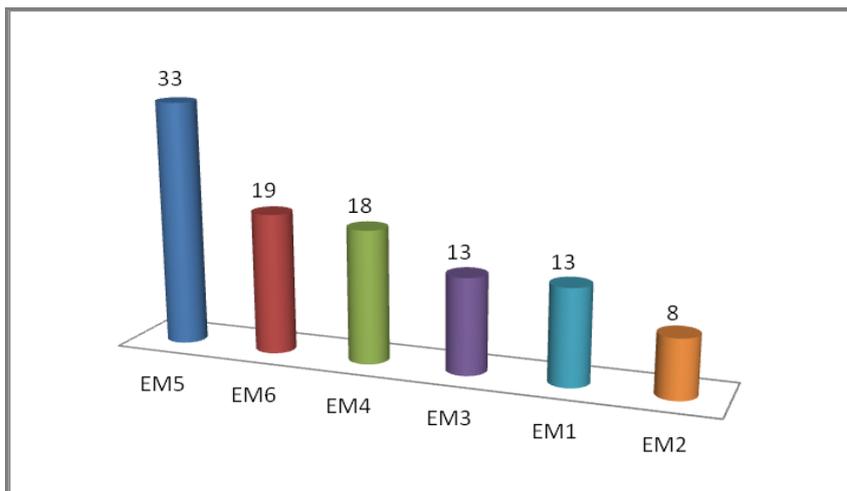


Figure n° 19 : Nombre de souches d'actinomycètes isolées par échantillon mère.

Les résultats obtenus montrent que les milieux contenant de **l'amidon** comme source de carbone ont donné un nombre plus important de souches comme le milieu Gausse avec 32 souches, le milieu ISP4 avec 22 souches, et 18 pour le milieu caséine amidon additionnée de la pénicilline G. La figure n° 18 montre que l'échantillon mère n° 5 a donné le nombre le plus élevée de souches isolées ce qui correspond à environ 31%.

Tableau n° 9 : différentes souches isolées par milieu de culture.

Blanche										
G.EP	G.ED	ISP4 (EL)	ISP4 (EP)	ISP4 (ED)	ISP5 (EL)	ISP2 (ED)	Cross (EP)	CA (EP+ Pénig)	CA (ED+ Pénig)	CA (ED+ AmphB)
E6, E8, E18, E21, E23, E66, E177	E76b, E77	E25	E148, E150	E113p	E83, E107	E87p	E104b	E142, E157	E160, E166	E185

Grise											
G.EL	G.EP	G.ED	ISP4 (EL)	ISP4 (ED)	ISP5 (EL)	ISP2 (EL)	Cross (EP)	CA (EP)	CA (ED)	CA (EP+ Pénig)	CA (ED+ Pénig)
E65, E67	E5, E7, E13, E16, E20, E22, E96	E42, E76g	E27, E28, E32, E34, E38, E136, E138, E149, E151	E88, E113, E114	E82, E97	E37, E47, E49, E130	E104g, E146	E124, E127	E121, E123	E129, E165	E144, E155, E169, E175, E182

Bleu			
G.ED	Cross (ED)	ISP5 (EL)	CA (ED)
E68	E98	E108	121b

Beige				
G.EP	CA (EL)	CA (ED)	ISP4 (EL)	ISP2 (EL)
E14, E15	E59	E 122	E137	E87

Noire			
G.EP	ISP4 (EL)	ISP4 (EP)	CA (ED)
E10	E138	E152	E116, E123

Rose				
G.EL	Cross (ED)	ISP2 (EL)	CA (ED)	CA (ED+ péni G)
E60	E100	E132	E118	E174

Marron		
G.ED	CA (ED)	CA (EP+ Péni G)
E69, E78	E119	E128, E163

Orange		
Cross (EP)	CA (ED+ Péni G)	CA (ED+ Amph B)
E145	E137	E148

Autres couleurs		
Verte	Jaune	Rouge
ISP4 (EL)	G.EL	ISP4 (EL)
E25v	E61, E74	E86

ED, eau distillée. EP, eau physiologique. EL, eau du lac. G, gausse. CA, caséine amidon. PéniG pénicilline G. AmphB, amphotéricine B.

2. Discussion

L'utilisation des prétraitements tels que le traitement thermique ou les dilutions décimales des échantillons mères dans le but de réduire le nombre de contaminants est une technique souvent utilisée dans l'isolement des échantillons de terre et d'eau douces (**Prabhu et al., 2011 ; Valanarasu et al., 2010**), malgré le fait que cela pourrait affecter le nombre d'actinomyètes isolés, ici, le caractère saumâtre de l'eau du lac pourrait constituer en lui même un inhibiteur pour certains microorganismes (**Fauvel et Battista, 1969**).

Par ailleurs, l'utilisation d'antibiotiques dans les milieux de cultures n'est pas toujours recommandée (**Kim, 2013**), certains auteurs préconisent leurs utilisations afin d'isoler un genre bien précis, (**Badji et al., 2005 ; Kitouni et al., 2005 ; Thakur et al., 2007**), **Okudoh et Wallis**, (2007) ont également signalé que cela affectait le nombre de souches isolées, **Zhang** (2011) recommandent au lieu de cela l'utilisation de milieux spécifiques tels que le milieu Gausse pour l'isolement de souches d'actinomyètes

Même s'ils sont plus connus pour leurs utilisations dans l'étude morphologiques des actinomyètes, les milieux ISP peuvent également être utilisés dans l'isolement, tel que le milieu ISP₁ (**Rajan et Kannabiran, 2014 ; Suthindhiran et Kannabiran, 2009**), ISP₂ (**Da Silva et al., 2011 ; Yuan et al., 2008**), ISP₃ (**Saintpierre-Bonaccio et al., 2004**), et la gélose ISP₅ (**Kavitha et al., 2010a ; Kavitha et al., 2010b**) pour leurs sources de carbonnes

différentes du glucose, ce dernier est surtout connu pour favoriser la culture des autres bactéries à croissance rapide.

Les milieux à base d'**amidon** ont donné de meilleurs résultats au cours de l'isolement car cette source de carbone est plus favorable à la culture des actinomycètes qui sont caractérisés par une croissance plus lente allant de quelques jours à quelques semaines (**Huck et al., 1991 ; Mellouli et al., 2003 ; Rahmansyah et al., 2012 ; Suthindhiran et Kannabiran, 2009**).

Williams et Davis, (1965) rapportent que la combinaison amidon (ou le glycérol), caséine, et le nitrate dans un milieu de culture serait la plus sélective pour l'isolement des actinomycètes.

Okami et al., (1982) ainsi que **Hong et al., (2009)** préconisent l'utilisation de l'eau du lac (eau salée) pour l'isolement de certains microorganismes, expliquant que la pression hydrostatique et les paramètres physicochimiques y sont ainsi préservés.

La couleur des chaînes de spores chez les actinomycètes (mycélium aérien) est très diversifiée, les 7 séries de couleurs proposées par **Pridham (1965)** réunit le blanc, le gris, le rouge, le jaune, le vert, le bleu, et le violet, ainsi, la terminologie de ces couleurs est attribuée selon la charte des couleurs du système **ISCC-NBS (Kelly et Judds, 1955)**, variables du marron clair au beige ou encore l'orange vif et même le noir, chez les streptomycètes, c'est le blanc et le gris qui reviennent le plus souvent (**Mabrouk et Saleh, 2014 ; Thakur, 2007 ; Tresner et Backus, 1963 ; Vanajakumar et al., 1995**).

Certaines souches d'actinomycètes produisent des pigments diffusibles sur boîte, de différentes couleurs, jaune (**Selvameenal et al., 2009**), rose (**Amsaveni et al., 2015**), les pigments mélanoïdes apparaissent le plus souvent par une couleur marron (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Williams et al., 1983**).

III. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

1. Résultats

Après purification, les souches ont été numérotées par ordre d'isolement, repiqués sur le même milieu, la conservation est effectuée sur gélose ISP₂ pour l'ensemble des souches isolées. La recherche de l'activité antimicrobienne est réalisée sur gélose ISP₂ par la technique des stries croisées, si la souche ne montre pas d'activité antimicrobienne vis-à-vis des organismes cliniques testés, ses caractéristiques morphologiques sont notés, à savoir, l'aspect des colonies sur boîte (couleur taille et forme) ainsi que l'aspect microscopique, et la souche sera conservée et fera l'objet d'études antérieures.

Planche n° 1: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées

Blanche



CONFIDENTIEL



Aspect recto de la souche E23 sur milieu Gausse

Aspect recto de la souche E107 sur milieu Gausse

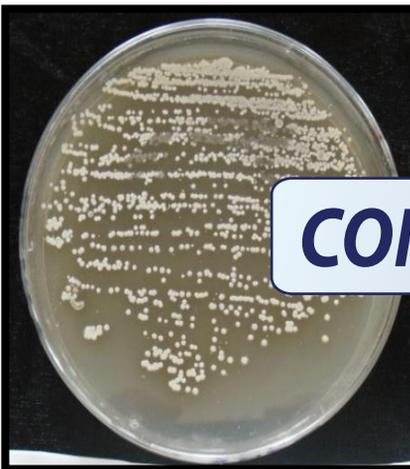


CONFIDENTIEL

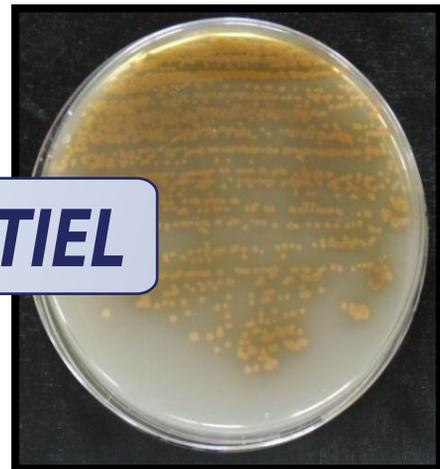


Aspect recto de la souche E104b sur milieu ISP2

Aspect recto de la souche E82 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL



Aspect recto de la souche E184 sur milieu ISP4

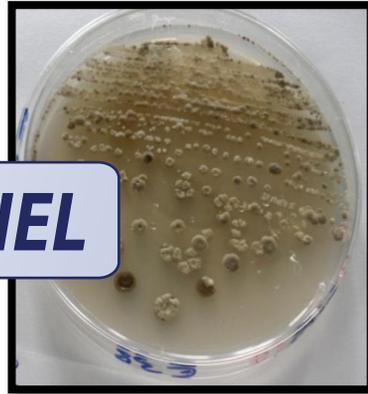
Aspect verso de la souche E184 sur milieu ISP4 montrant la pigmentation

Planche n° 2: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées

Grise



CONFIDENTIEL



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse

Aspect recto de la souche E38g sur milieu Gausse

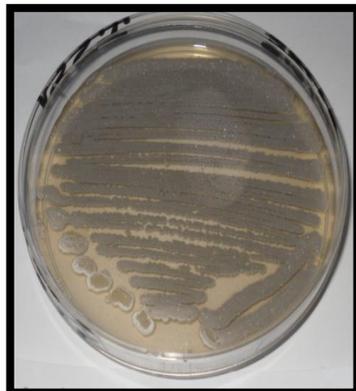


CONFIDENTIEL



Aspect recto de la souche E163 sur milieu ISP2

Aspect recto de la souche E130 sur milieu ISP2



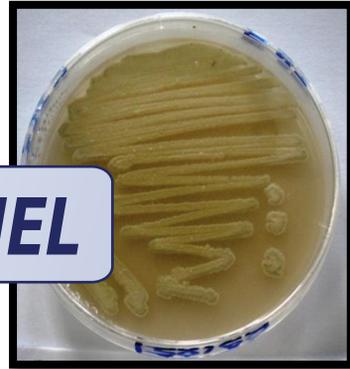
Aspect recto de la souche E88 sur milieu ISP2

Planche n° 3: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées

verte



CONFIDENTIEL



Aspect recto de la souche E15 sur milieu Gause

Aspect recto de la souche E25 sur milieu ISP4

Rose



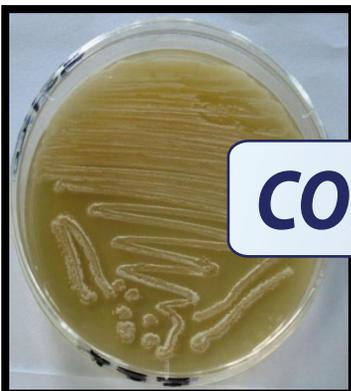
CONFIDENTIEL



Aspect recto de la souche E60 sur milieu Gause

Aspect recto de la souche E118 sur milieu caséine amidon

jaune



CONFIDENTIEL



Aspect recto de la souche E61 sur milieu Gause

Aspect recto de la souche E74 sur milieu ISP2

Planche n° 4: Aspect sur boîte des souches d'actinomycètes isolées



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse



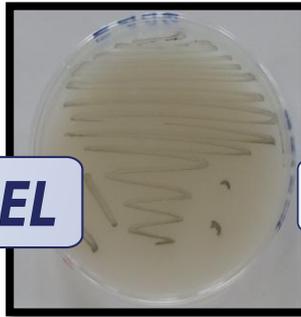
Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse

CONFIDENTIEL

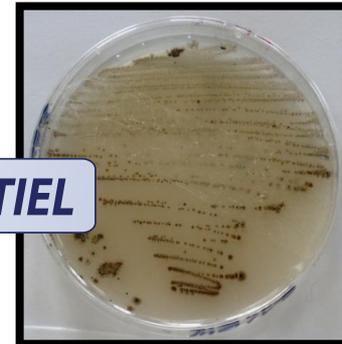
Bleu



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

Noire



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse



Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse

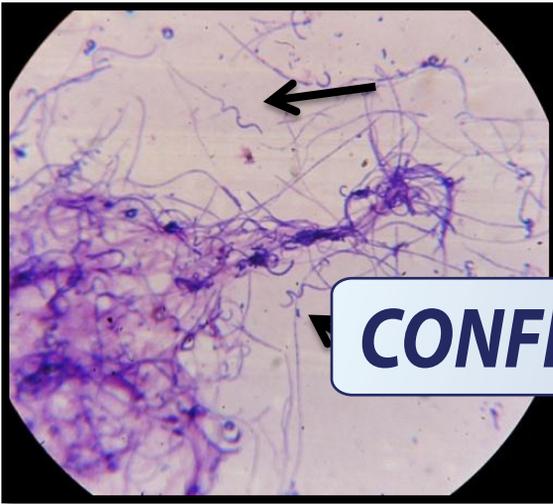


Aspect recto de la souche E16 sur milieu Gausse

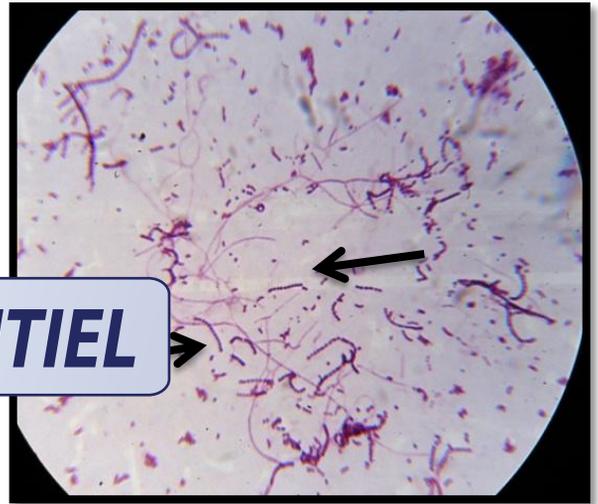
CONFIDENTIEL

Marron

Planche n° 5: Photos Gram réalisés sur les souches E23, E16, E59 et E60

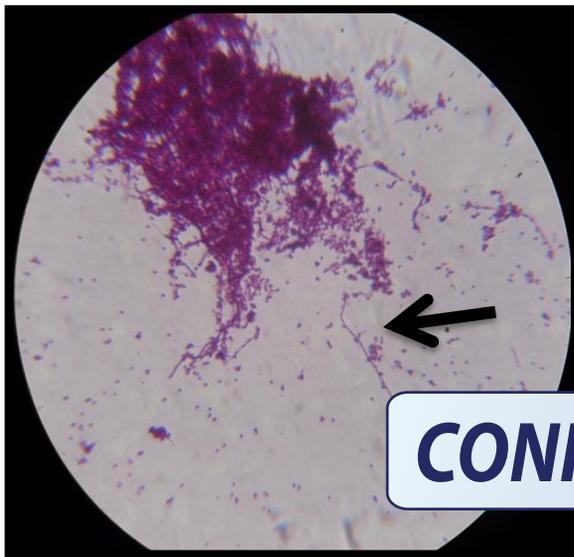


CONFIDENTIEL

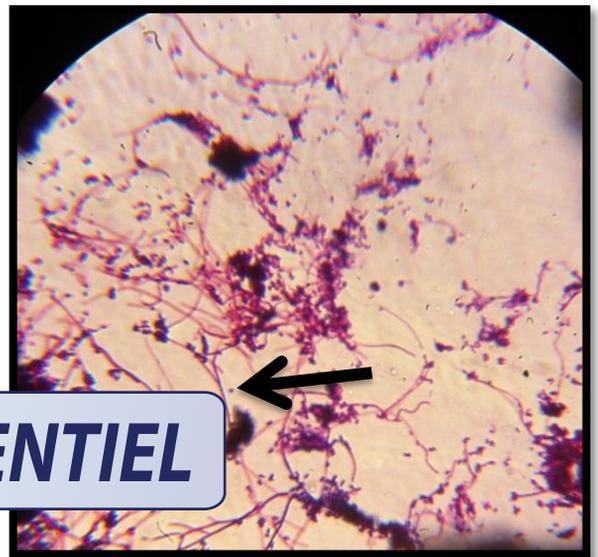


Aspect microscopique (Gram) de la souche E23 sur milieu Gause

Aspect microscopique (Gram) de la souche E16 sur milieu Gause

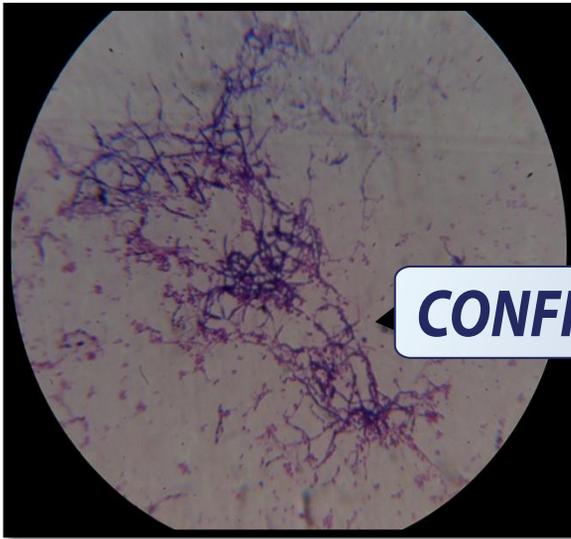


CONFIDENTIEL

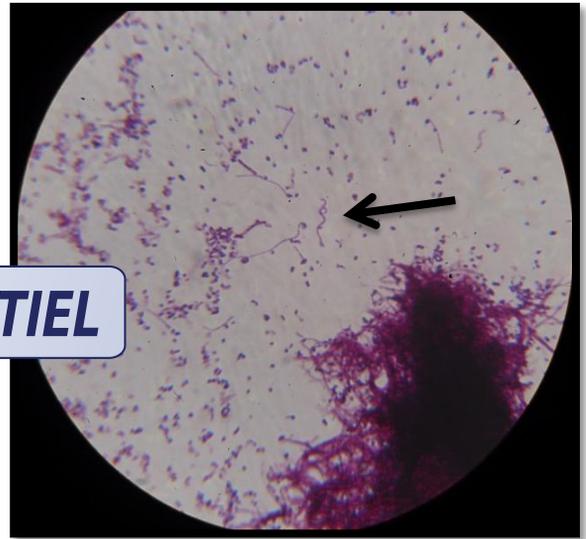


Aspect microscopique (Gram) de la souche E59 sur milieu caséine amidon

Aspect microscopique (Gram) de la souche E60 sur milieu Gause

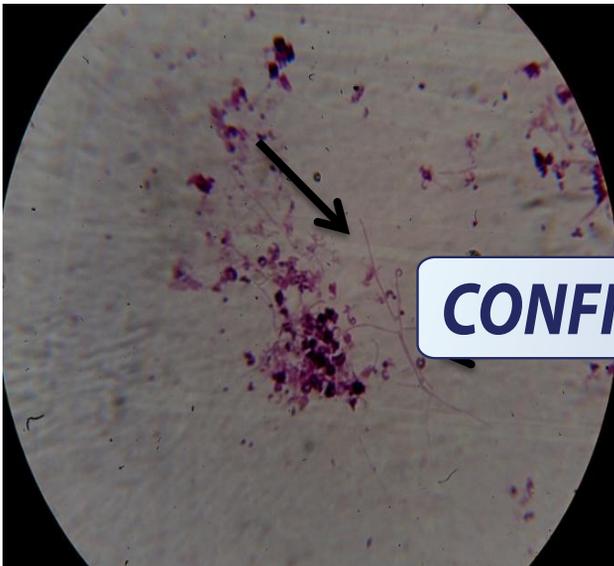


CONFIDENTIEL

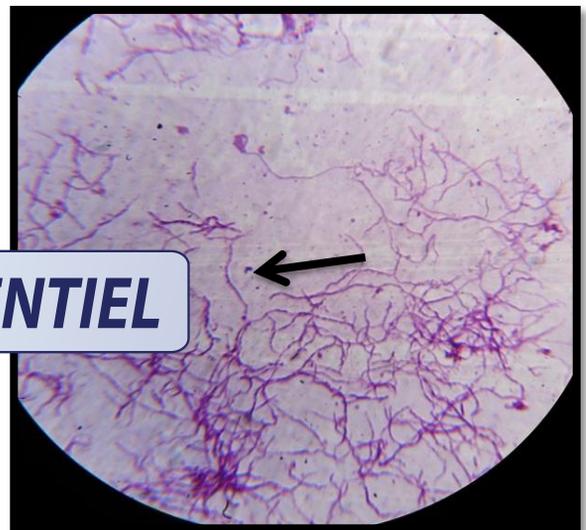


Aspect microscopique (Gram) de la souche E74 sur milieu Gausse

Aspect microscopique (Gram) de la souche E78 sur milieu Gausse

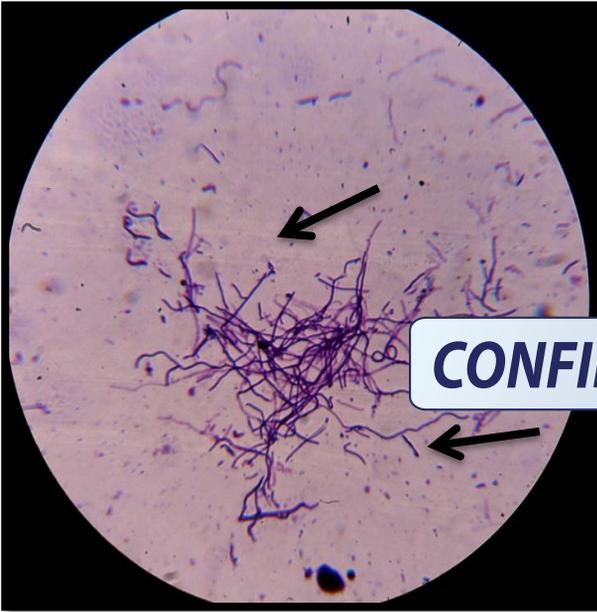


CONFIDENTIEL

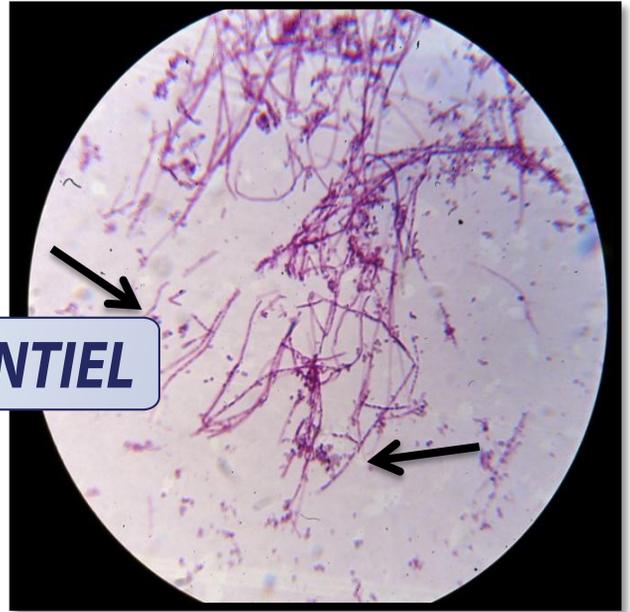


Aspect microscopique (Gram) de la souche E82 sur milieu caséine amidon

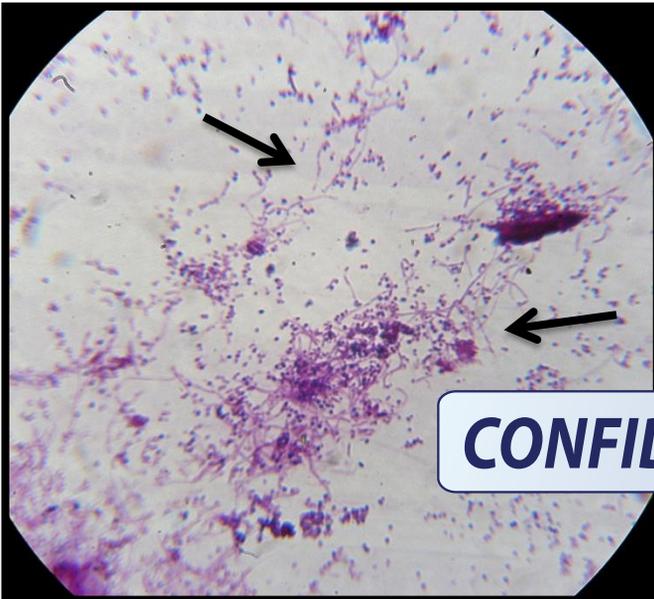
Aspect microscopique (Gram) de la souche E107 sur milieu Gausse



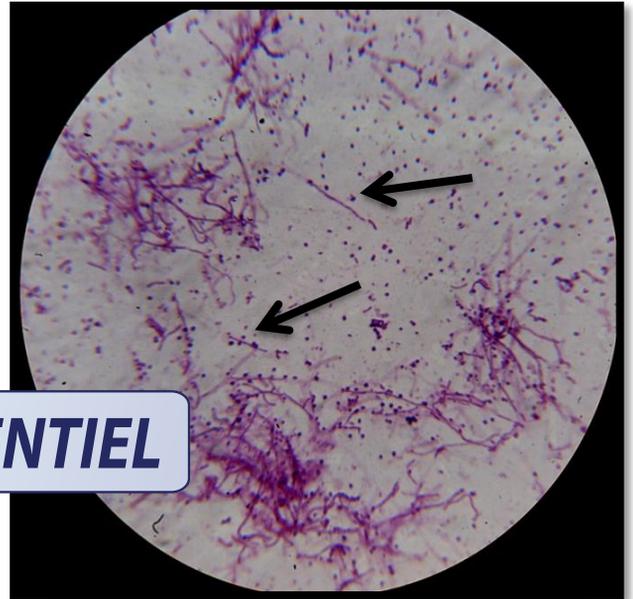
Aspect microscopique (Gram) de la souche E130 sur milieu ISP2



Aspect microscopique (Gram) de la souche E143 sur milieu caséine amidon



Aspect microscopique (Gram) de la souche E121 sur milieu caséine amidon



Aspect microscopique (Gram) de la souche E113 sur milieu caséine amidon

Le screening de l'activité antimicrobienne par la technique des stries croisés à donné 20 souches. Au total, 20 souches ont montré une activité sur les souches bactériennes et *Candida* testées, cependant, seulement 9 souches d'entre elles présentaient une activité significative sur les trois souches *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans* (sensibles).

L'activité antifongique contre *C.albicans* sur milieu solide ISP₂ est donnée par la technique des stries croisées selon **Duraipandiyar et al., (2010)** et celle de la double couche selon **Bastide et al., (1986)**, les résultats sont représentés dans le tableau n° 10, 11 et 12, les figures 19 et 20 représentent les histogrammes des diamètre d'inhibition ; les résultats de l'antifongogramme réalisé sur les souches de *C. albicans* ATCC sont résumés dans le tableau n° 13.

Tableau n° 10 : diamètre des zones d'inhibition pour la technique des stries croisés sur *S. aureus*, *C. albicans* et *E. coli*, les valeurs sont exprimées en mm.

Isolat	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i> (B)	<i>E. coli</i>
6	32	22	R
13	20	23	R
14	30	35	R
23	R	20	R
34	R	15	R
65	45	45	R
76b	45	45	R
76g	45	45	R
87p	45	45	R
96g	30	18	R
100	26	R	R
108	R	32	R
123	18	R	R
127	15	R	R
129	21	R	R
151	17	R	R
163	R	12	R
165	40	45	R
177	40	40	R
181	45	45	R

R : résistante

Tableau n° 11: Test d'activité des souches par la technique de stries croisées et la double couche sur *Candida albicans* IPA 549.

Isolat	Stries croisés (mm)	double couche (mm)
6	20	22
13	22	30
14	35	37
65	45	47
76b	45	30
76g	45	23
87p	45	90
165	45	55
182	45	27

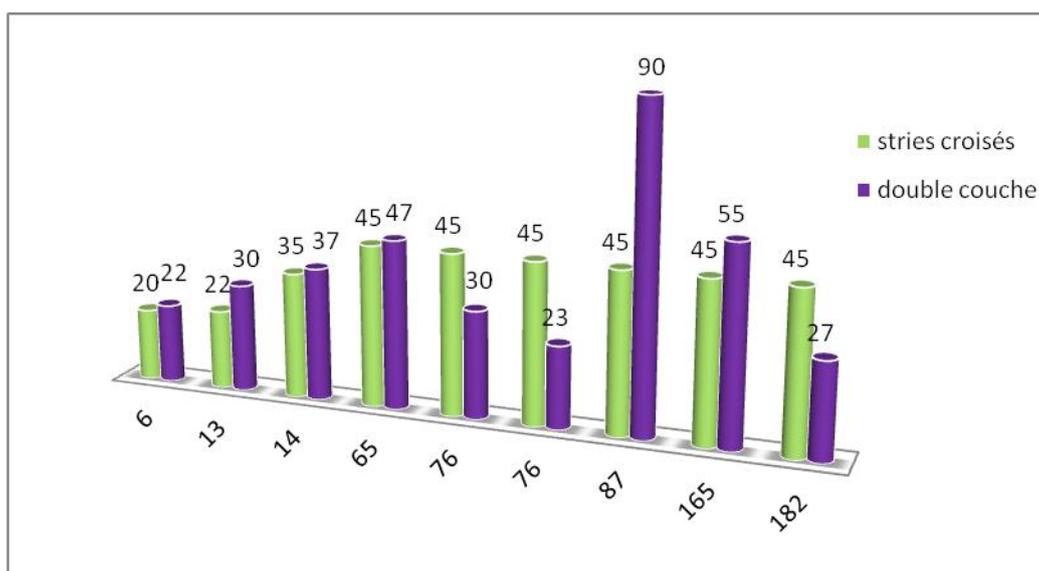


Figure n° 20 : diamètres d'inhibition par la technique des stries croisés et de la double couche sur *C. albicans* IPA 549.

Tableau n° 12 : test d'activité sur les souches *Candida* nosocomiales et ATCC.

	<i>C. albicans</i> (1)	<i>C. albicans</i> (2)	(3)	(4)
E6	33	33	33	27
13	16	11	10	14
14	8	6	7	R
65	35	30	31	30
76b	30	19	19	20
76g	30	19	18	30
87p	90	90	90	90
165	33	33	33	33
182	27	20	24	21

Les valeurs sont exprimées en mm.

(R) : résistance de la souche test.

(1) : *Candida albicans* souche sensible

(2) : *Candida albicans* souche résistante au 5-fluoro-cytosine.

(3) : *Candida parapsilosis* ATCC 22019

(4) : *Candida krusei* ATCC 6258

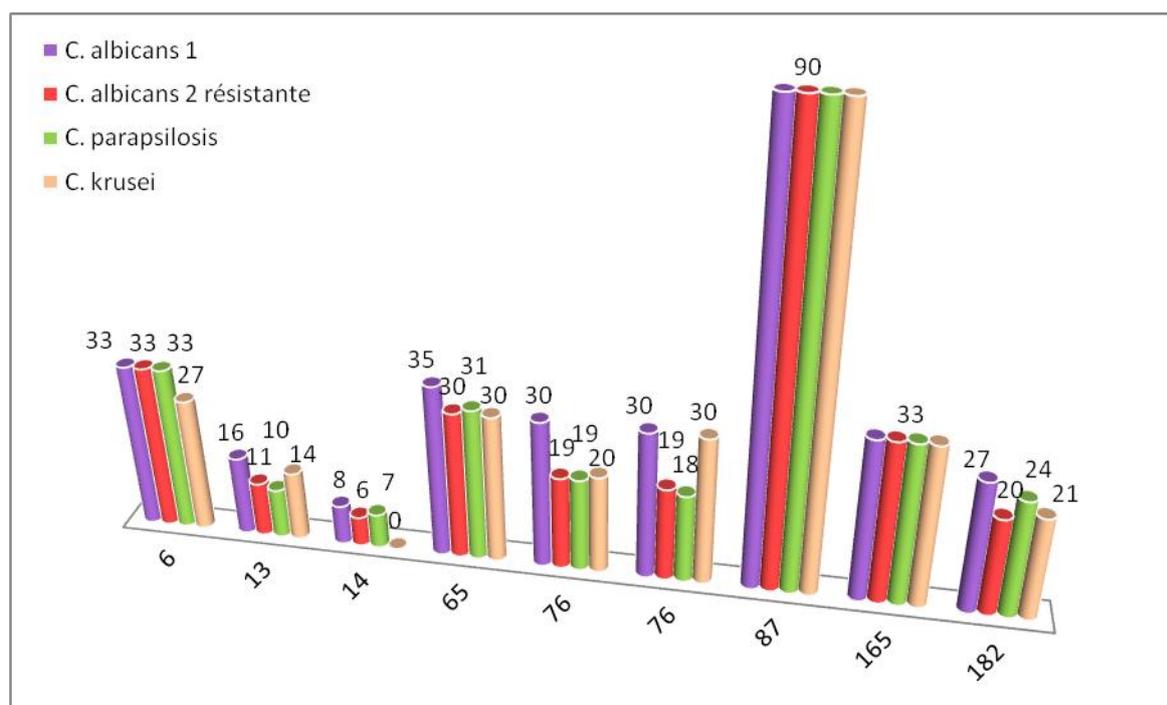


Figure n° 21 : diamètre des zones d'inhibition sur les souches de *Candida* nosocomiales et ATCC.

Tableau n° 13: Antifongigrammes (CMI en µg/ ml) des souches nosocomiales *C. albicans*

	<i>C.albicans</i> (1)	<i>C.albicans</i> (2)
Anidulafungine (ANY)	0,03	0,03
Micafungine (MIY)	< 0,008	< 0,008
Caspofungine (CAY)	0,06	0,12
5-fluoro-cytosine (5-FC)	< 0,06	64*
Voriconazole (VOY)	< 0,008	< 0,008
Itraconazole (ITY)	0,03	0,06
Fluconazole (FLY)	0,5	0,5
Amphotéricine B (AMY)	0,12	0,25

* La souche *C.albicans* (2) présente un fort profil de résistance au 5-fluoro-cytosine

2. Identification des levures nosocomiales A et B

2.1. Examen microscopique

Les lames montrent pour des cellules plus grandes comparées à celles des bactéries.

Les cellules sont de formes allongées pour la souche A, et ovoïdes pour la souche B, les aspects microscopiques sont représentés dans les photos de la planche n° 11.

2.2. Résultats du test de pseudo-filamentation

Les résultats qui figurent dans la planche n° 11 nous ont permis de noter la présence de pseudo-filaments pour les deux souches ce qui oriente vers le genre *Candida*, ainsi que la présence de chlamydospores pour la souche B caractéristiques de l'espèce *C. albicans*.

Planche n°8: tests d'activité pour la souche E6, E13 et E14

Stries croisés

Double couche

E6



CONFIDENTIEL

E13



CONFIDENTIEL

E14



CONFIDENTIEL

Planche n°9: tests d'activité pour la souche E65, 76b et 76g

Stries croisés

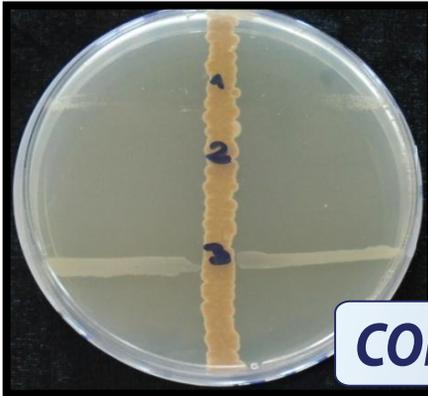
Double couche

E65



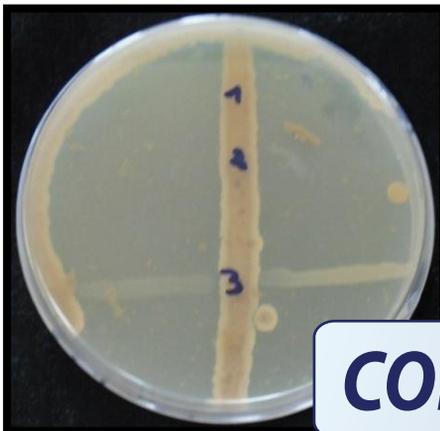
CONFIDENTIEL

E76b



CONFIDENTIEL

E76g



CONFIDENTIEL

Planche n°10: tests d'activité pour la souche E87p, 165 et 182

Stries croisés

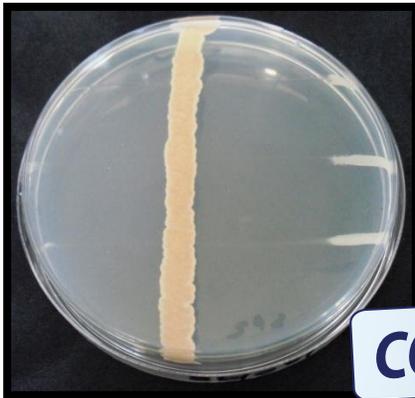
Double couche

E87p



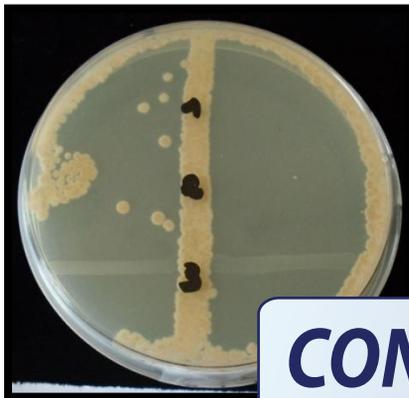
CONFIDENTIEL

E165



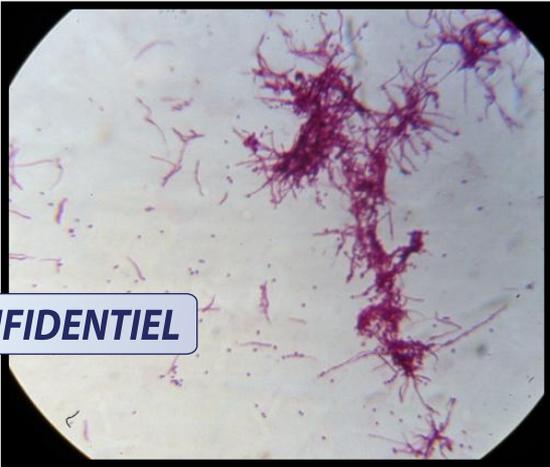
CONFIDENTIEL

E182



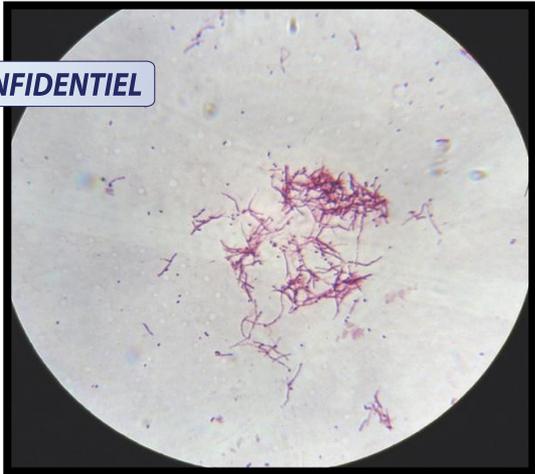
CONFIDENTIEL

Planche n° 11 : Gram réalisés sur les souches E6, E13 et E14



CONFIDENTIEL

Aspect microscopique (Gram) de la souche E6 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect microscopique (Gram) de la souche E13 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

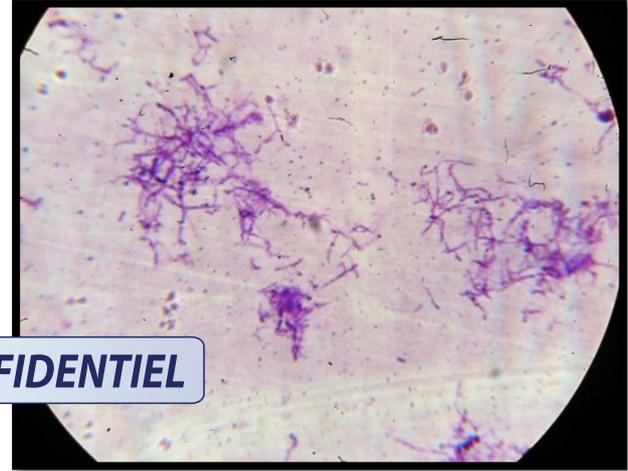
Aspect microscopique (Gram) de la souche E14 sur milieu ISP2

Planche n° 12: Gram réalisés sur les souches E65, E76b et E76g



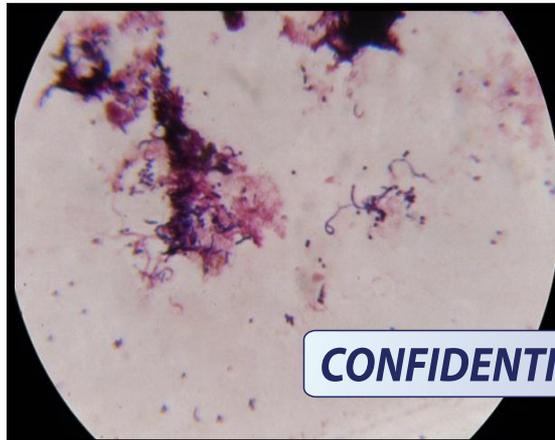
CONFIDENTIEL

Aspect microscopique (Gram) de la souche E65 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

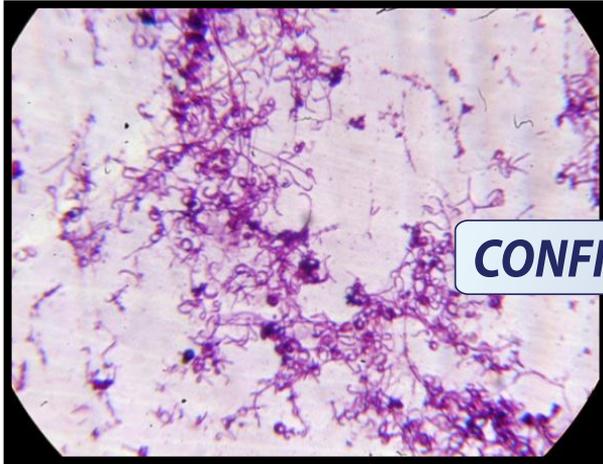
Aspect microscopique (Gram) de la souche E76b sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect microscopique (Gram) de la souche E76g sur milieu ISP2

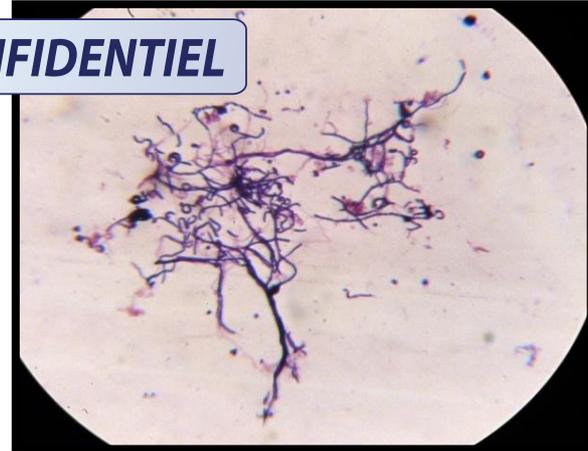
Planche n° 13: Gram réalisés sur les souches E87p, E165 et E182



CONFIDENTIEL

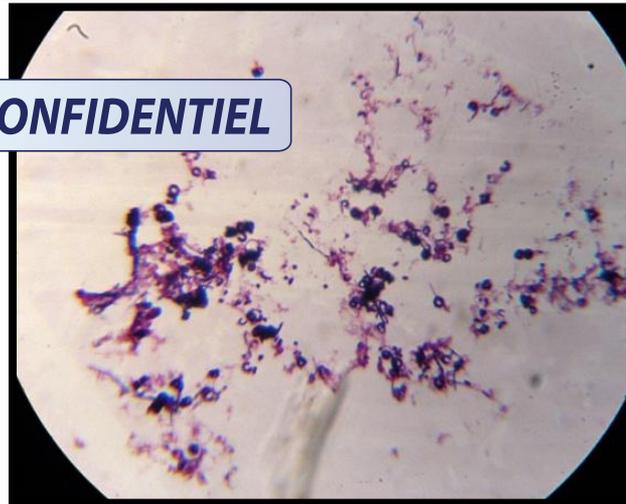
Aspect microscopique (Gram) de la souche E87p sur milieu ISP2

CONFIDENTIEL



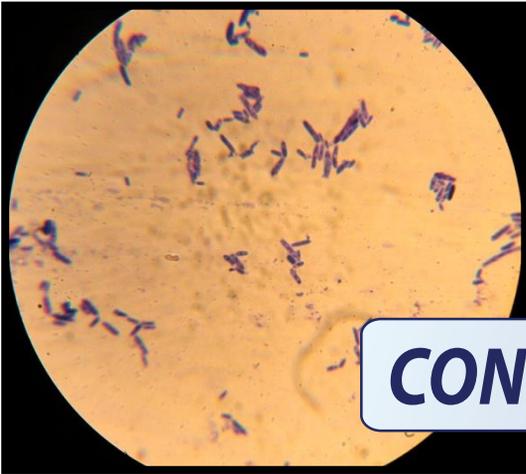
Aspect microscopique (Gram) de la souche E165 sur milieu ISP2

CONFIDENTIEL



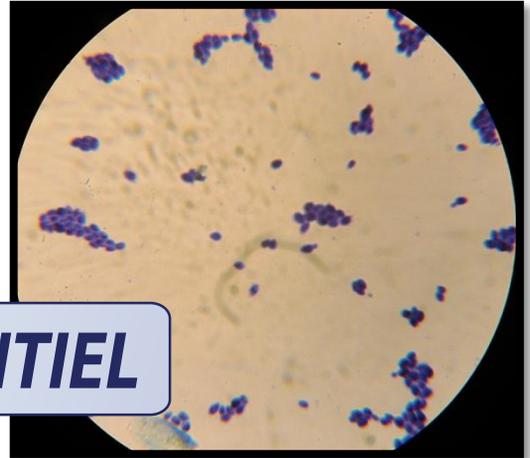
Aspect microscopique (Gram) de la souche E182 sur milieu ISP2

Planche n° 14: résultats de l'identification des levures A et B

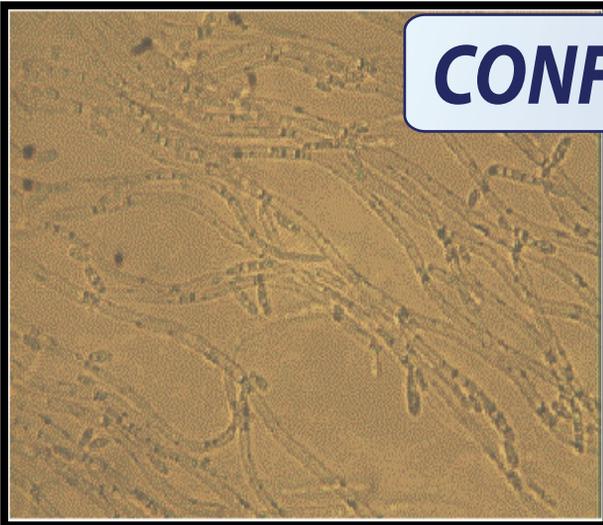


CONFIDENTIEL

Aspect microscopique après coloration au bleu de méthylène de la levure A

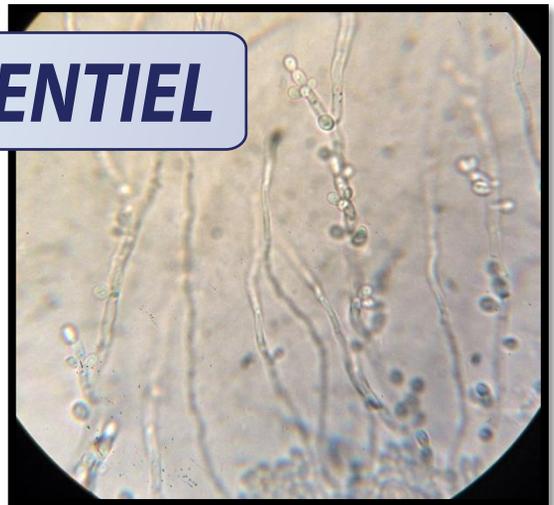


Aspect microscopique après coloration au bleu de méthylène de la levure B



CONFIDENTIEL

Test de pseudo-filamentation de la levure A



Test de pseudo-filamentation de la levure B

2.3. Résultats de la galerie ID 32C

Les résultats des galeries ID 32C sont représentés dans le tableau n°14 et la photo n° 4.

Tableau n° 14 : résultats de la galerie ID 32C des levures nosocomiales A et B

	GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	INO
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

	SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN
A	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

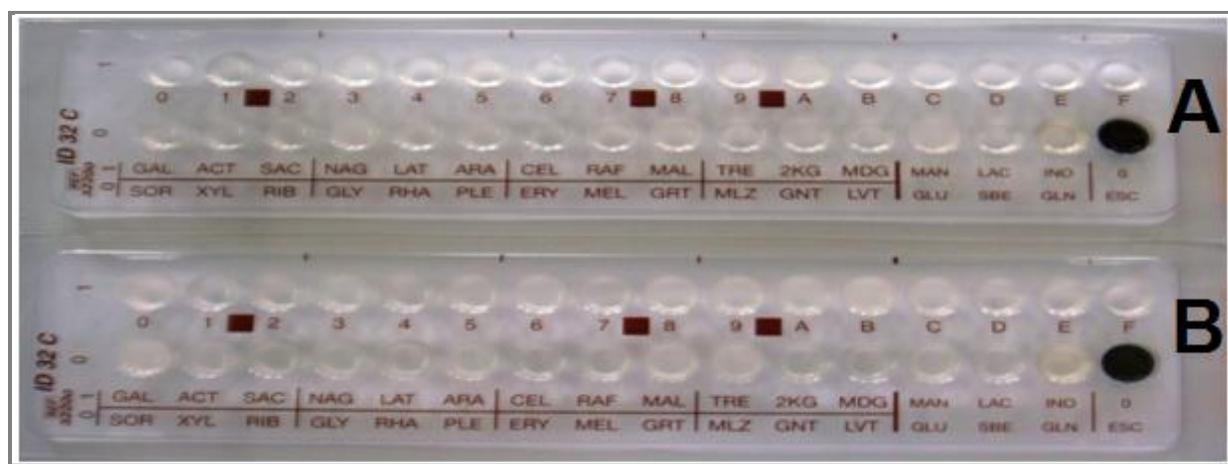


Photo n° 4 : résultats des galeries ID 32C des levures nosocomiales A et B.

Tous ces résultats obtenus (Coloration au bleu de méthylène, test pseudo-filamentation et ID32C) permettent d'attribuer la souche A à l'espèce *Candida guilliermondii* et la souche B à l'espèce *C. albicans*.

3. Discussion

Les résultats mentionnent tout d'abord l'absence d'activité des souches d'actinomycètes sur *E. coli*, en effet, les bactéries Gram négatives possèdent une structure membranaire externe unique, une mince couche de peptidoglycane et un espace périplasmique entre la paroi et la membrane cellulaire, et la sensibilité réduite et/ou la résistance aux antibiotiques des souches bactériennes Gram négatives est attribué aux lipo-polysaccharides qui bloquent certains antibiotiques et protège la membrane interne sensible et la paroi (Cwala et al., 2011 ; Marinelli et Tomasz, 2010 ; Valan Arasu et al., 2012).

La technique des stries croisées a donnée des diamètres d'inhibitions plus importants par rapport à celle de la double couche, cette technique est souvent employée comme premier screening de l'activité antimicrobienne (**Baskaran et al., 2011 ; Okudoh et Wallis, 2007 ; Parthasarathi et al., 2010 ; Ravikumar et al., 2010 ; Valan Arasu et al., 2012**), c'est une technique simple qui permet de tester l'activité d'une souche d'actinomyète sur plusieurs microorganismes et sur la même boîte de Pétri, cependant, l'ensemencement des souches tests qui se fait par strie sur le milieu ISP₂ qui n'est pas sélectif à tous les microorganismes diminue la reproductibilité des résultats (**Walstad et al., 1974**) ; Par ailleurs, la technique de la double couche est mieux adaptée pour les levures et moisissures (**Gandhimathi et al., 2008 ; Ouhdouch et al., 2001 ; Spadari et al., 2013 ; Zheng et al., 2000**), elle permet une meilleure diffusion des champignons ensemencés en masse dans la gélose molle, des résultats plus fiables, et une meilleure reproductibilité des résultats puisque la densité de l'inoculum est préalablement connue et ainsi une meilleure comparaison entre les résultats est possible (**Bastide et al., 1986 ; Savioli et al., 2006 ; Walstad et al., 1974**), cependant l'étude de l'activité antifongique ou antibactérienne doit passer par la mesure de la concentration minimale inhibitrice pour pouvoir déterminer le réel potentiel antimicrobien de la molécule pure une fois extraite (**Gan-Jun et al., 2012 ; Kumar et Kannabiran, 2010 ; Valanarasu et al., 2010**).

Les résultats de l'antifongigramme des souches de *C. albicans* nosocomiales de l'Hôpital de la Timone par la technique « Sensitive yeast one[®] » a permis de démontrer la forte résistance au 5-fluorocytosine (64 µg/ ml) de la souche *C. albicans* (2) (autrement dit tous les puits ont donné une couleur pourpre), l'apparition des espèces émergentes des souches nosocomiales de *Candida* résistantes au 5-fluorocytosine à depuis longtemps été rapportée (**Barchiesi et al., 2000 ; Cuenca-Estrella et al., 2001**), et les mécanismes moléculaires impliqués dans ce type de résistance sont également connus (**Cowen et al., 2014 ; Péman et al., 2009**), aussi il semble exister une relation entre ce type de résistance et la sensibilité réduite aux azolés pour les isolats cliniques de *C. albicans* (**Noël et al., 2003**).

Les diamètres des zones d'inhibition sur les souches de *Candida* nosocomiales et ATCC montrent que seules les souches E13 et E14 ont donné de faibles résultats, par ailleurs, les autres souches actives ont montré une bonne activité vis-à-vis des souches nosocomiales y compris celle résistante à la 5-fluorocytosine, et contrairement à ce qui est communément rapportée par les auteurs (**Ahmed et al., 2013 ; Chaudhary et al., 2013 ; Gautam et Garg, 2014**), les diamètres des zones d'inhibition ne montrent pas une diminution significative de l'activité contre la souche résistante par rapport à celle sensible.

Nos résultats démontrent que même s'il existe, au niveau nucléaire, des gènes responsables de la résistance au 5-fluorocytosine (au niveau des gènes FCY1, FCY2 et FUR1) (**Espinell-Ingroff, 2008 ; Pemán et al., 2009**), ceci ne semble vraisemblablement pas affecter l'activité des souches d'actinomyètes isolées sur la levure résistante, les résultats obtenus sont nettement meilleurs que ceux obtenus pour les actinomyètes isolées d'écosystèmes salés tels que l'écosystème Mangrove rapportée par **Das et al., (2014)**, ou encore de celles isolées de sédiments marins des côtes indiennes rapportée par **Vimal et al., (2009)**, mais aussi de souches d'actinomyètes isolées d'échantillons d'eau marine des côtes vietnamiennes

rapportée par **Pham, et al.**, (2014), tout en prenant en considération la différence entre les techniques utilisés afin d'obtenir ces résultats.

Les infections invasives à *Candida* généralement et *C. albicans* spécifiquement pose un réel problème thérapeutique surtout que l'immunodépression est très souvent associée au problème, depuis ces deux dernières décennies, on observe, d'une part, l'augmentation de l'incidence des mycoses dues à *Candida* chez les immunodéprimés et les patients en services de réanimation, et d'autre part, le profil de résistance de cet agent non seulement aux antifongiques couramment utilisés comme le fluconazole (azolés) ou l'Amphotéricine B (polyènes) mais aussi contre les nouvelles classes d'antifongiques créant ainsi un véritable problème thérapeutique (**Dannaoui et al., 2012 ; Fournier et al., 2011**). L'isolement de souches d'actinomycètes ayant une activité significative sur la levure résistante laisse apparaître l'écosystème du lac el Mellah comme un réservoir naturel renfermant des espèces qui méritent d'être étudiées.

IV. Choix de souches représentatives

En biotechnologie, la production d'antibiotiques est l'un des secteurs les plus importants, elle repose sur l'utilisation industrielle des souches naturellement productrices de molécules bioactives développées par la recherche fondamentale, ce secteur industriel repose sur deux facteurs principaux, la nature des métabolites produites (efficacité du traitement) et le rendement de production (taux de production) (Genilloud, 2014 ; Tiwari et Gupta, 2012).

Si le screening de l'activité antimicrobienne sur milieu solide se fait après 7 jours d'incubation pour les souches d'actinomycètes, il est également important d'étudier cette activité en milieu liquide et de déterminer le jour optimal de production des métabolites secondaires, pour se faire les souches E65, E87p et E76g ont été choisies comme souches représentatives pour cette étude.

1. Etude de l'activité en milieu liquide des souches représentatives

1.1. Résultats

Les cinétiques de production et des pH des milieux liquides ISP₁, ISP₂ et GYEA ont été suivis pendant 14 jours pour les souches représentatives, les résultats sont représentés dans les figures n° 22, 23, 24, 25, 26 et 27.

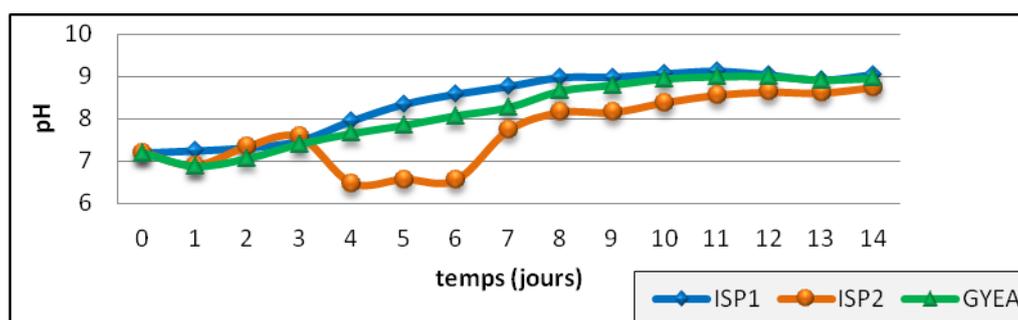


Figure n° 22 : variation du pH des milieux de la souche 87p.

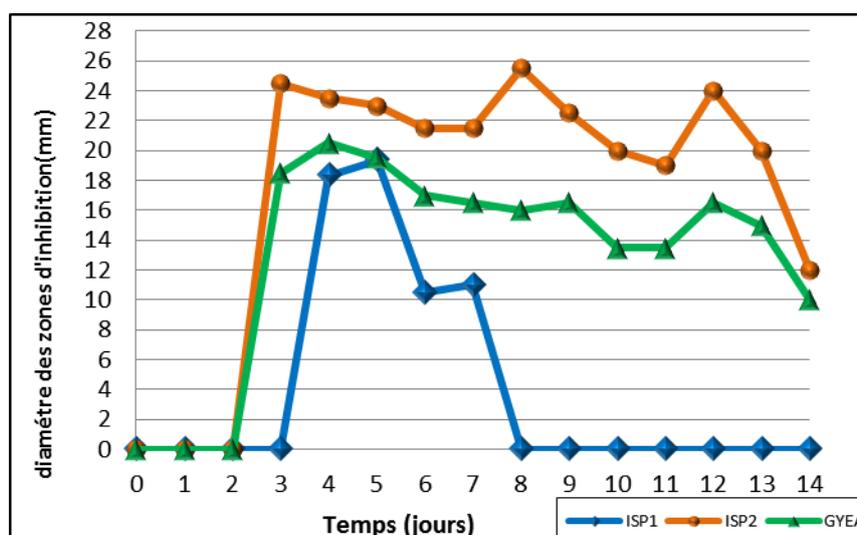


Figure n° 23 : Cinétique de production des métabolites secondaires de la souche E87p.

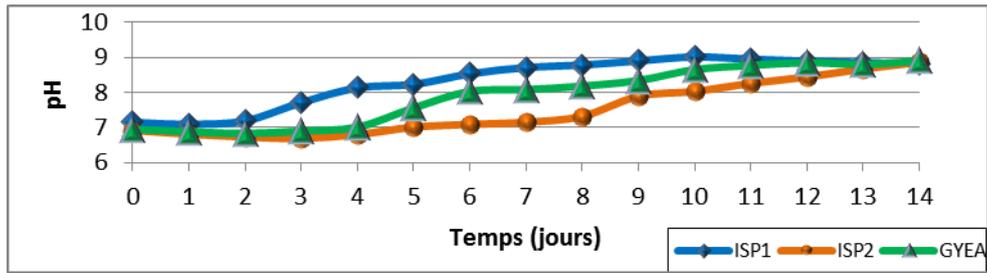


Figure n° 24 : variation du pH des milieux de la souche E76g.

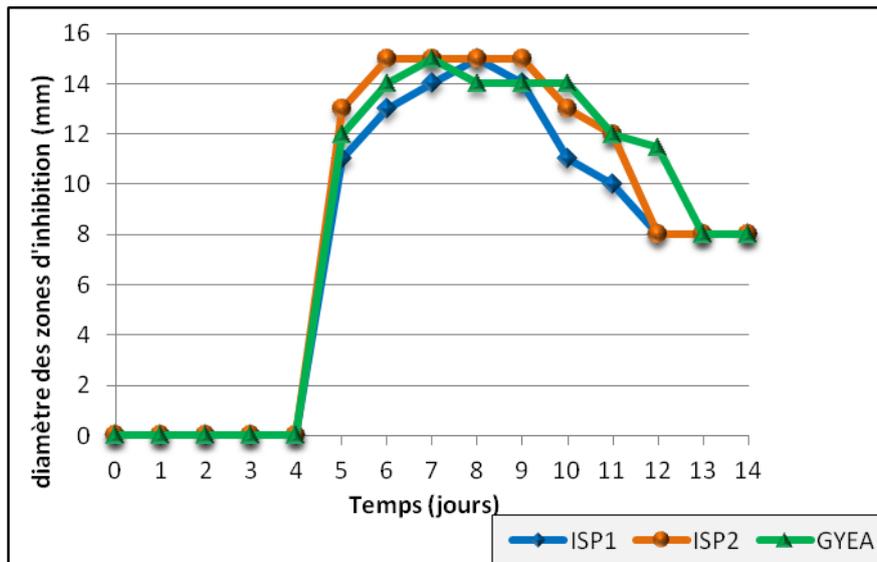


Figure n° 25 : cinétique de production des métabolites secondaire de la souche E76g.

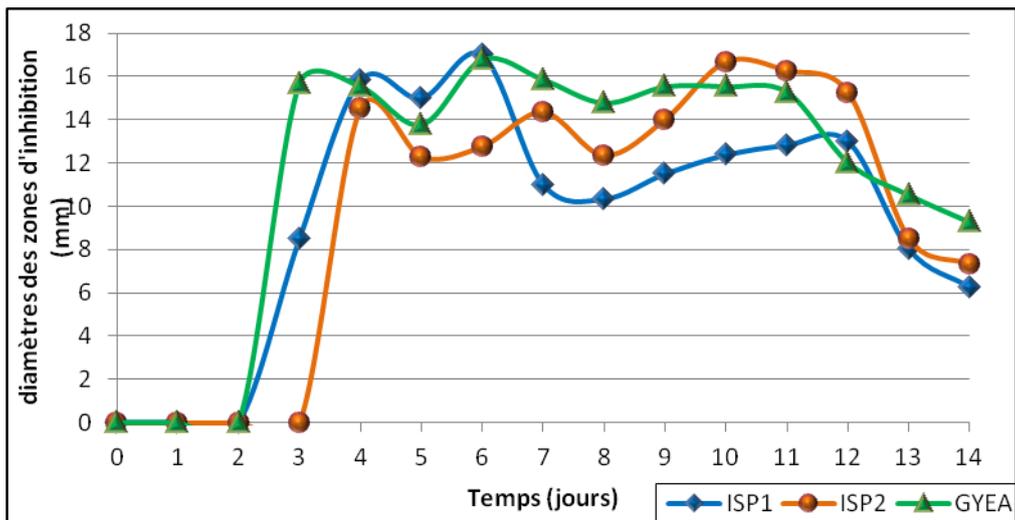


Figure n° 26 : cinétique de production des métabolites secondaire de la souche E65.

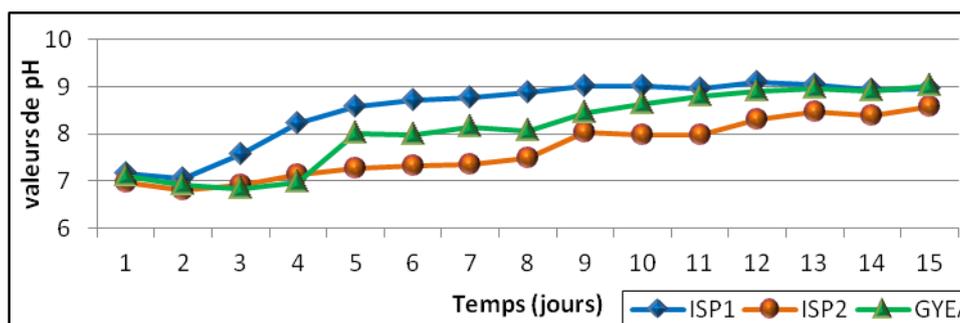


Figure n° 27 : variation des pH des milieux de la souche E65.

1.2. Discussion

Les cinétiques de productions des souches représentatives montrent des débuts de productions dès le 3^{ème} jour d'incubation pour la E87p sur milieu ISP₂, le 3^{ème} jour également pour la souche E65 sur milieu GYEA, et enfin le 5^{ème} jour pour la E76g sur les trois milieux testés,

La cinétique de production de la souche E87p et la souche E65 est assez perturbée, il y'a d'abord croissance suivie de très près par une production (acidification du pH du milieu) (Aouiche et al., 2012), ensuite une diminution et encore une élévation de la production, ce phénomène est expliqué par une accumulation de composés de stockages, ces nutriments sont accumulés en deux temps, initialement durant la phase rapide de croissance, ensuite, après le début de sporulation, ce qui explique ce type de production des molécules secondaires appelée production biphasique, il a été démontré que les bactéries accumulaient les composés de stockage lorsqu'il y'a un excès de carbone et une limitation du nitrogène dans le milieu (Dawes et al., 1992) ; les streptomycètes sont capables d'accumulés des composés tels que le glycogène et d'avoir de type de fermentation (Plaskitt et Chater, 1995), la sporulation et la production d'antibiotiques sont souvent intimement liés (Manteca et al., 2008 ; Neumann et al., 1996) et il existe des éléments autorégulateurs tels que les nucléotides phosphorylés et les butyrolactones qui sont impliqués comme leurs nom l'indique dans la régulation de la production d'antibiotiques (Bibb, 2005 ; Ohnishi et al., 2002 ; Takkano, 2006).

Le milieu ISP₂ a donné une meilleure production des métabolites secondaires pour la souche E87p et la souche E76g, des résultats similaires ont été rapportées pour la souche *Actinoadura* sp. AC104 isolée par Badji et al., (2006), en revanche, pour la souche E65, ce sont les milieux GYEA et ISP₁ qui se sont avérés plus favorable, c'est le cas de la souche *Actinoadura* sp. AC170 isolée par Badji et al., (2005) une meilleure production a été observée pour ces deux milieux.

La variation des sources de carbone et d'azote influencent directement le taux de production des métabolites secondaires et la différenciation morphologique en milieu liquide (formation de pellettes) mais ne sont pas forcément identiques pour les deux, les sources de carbones agissent comme précurseurs ou répresseurs de la production (Ripa et al., 2009), l'optimisation de la source nutritionnelle varie entre les molécules d'antibiotiques produites par les actinomycètes (Jonsbu et al., 2002 ; Sanchez et al., 2010).

En comparant les cinétiques obtenues lors de notre étude, la souche E76g est marquée par une production faible (13 mm) et tardive (5^{ème} jour) par rapport à celle des deux autres ; pour la souche E87p, il est intéressant de noter le diamètre d'inhibition important (24 mm obtenu sur le milieu ISP2 dès le 3^{ème} jour d'incubation), cependant, le taux de production est assez perturbé (début de production suivie d'un déclin puis d'une relancée de production) ce qui rend ce type de production indésirable en bioréacteurs (**Naritomi et al., 2002, Zhao et al., 2010**) ; tandis que la production de la souche E65 débute au 3^{ème} et 4^{ème} jour pour le milieu GYEA et ISP₁ (avec 16 mm) respectivement et se maintient relativement stable en comparant avec celle de la souche E87p, elle offre vraisemblablement un meilleur rendement.

La diminution de la production en milieu liquide observée pour la souche E65 et E76g par rapport à celle en milieu solide s'explique par la faible concentration de ces métabolites dans le milieu liquide, d'autres auteurs rapportent également la diminution de la productivité lors du processus de fermentations (**Salamoni et al., 2010, Anibou et al., 2008 ; Spadari et al., 2013, Thakur et al., (2007)**) ont signalés que parmi les 65 isolats qui ont montré une activité antibactérienne en milieu solide, 15 d'entre elles n'ont rien donné en milieu liquide.

La production des métabolites secondaires chez les streptomycètes coïncide ou précède légèrement le développement du mycélium aérien, en milieu liquide, elle correspond généralement avec la phase stationnaire de croissance (**Bibb, 2005**), cette production diffère qualitativement et quantitativement selon les souches et les espèces de microorganismes utilisés ainsi que leurs conditions nutritionnelles et de culture (**Demain, 2000 ; Wang et al., 2010**), la biotechnologie industrielle vise à employer diverses stratégies qui visent à augmenter la qualité des produits en assurant les bénéfices mais également en réduisant le plus possible les coûts des procédés employés, aussi, l'avancement dans le temps de la culture (au niveau des fermenteurs) conduit souvent à l'apparition d'un stress métabolique, et de ce fait, un rendement de production est toujours souhaitable dans les délais les plus courts (**Wang et al., 2001 ; Zou, 2008**) ; les travaux de **Katzer, (2001)** et **Masurekar, (2008)** ont permis de répertorier les divers problèmes rencontrés lors de cultures microbiennes menées à différentes échelles d'expérimentation.

V. Caractéristiques des souches actives

1. Observation au microscope optique

Les photos des Gram réalisés (planches 8, 9, 10, 11, et 12) montrent l'absence de formes spécifiques des actinomycètes (spores ou flagelles) elles montrent la présence de filaments, pour les souches E6, 13 et 14 les filaments sont fins droits, portant des chaînes de spores droites de type réctiflexible et flexueuse pour la E14, la souche E65, 76g, 87p, 165, 182 présentent des filaments un peu plus épais, ramifiés, non fragmentés, qui portent des chaînes de spores cylindriques (S) portant jusqu'à 40 spores.

La souche E76b présente des filaments droits, fins, ramifiés de type RF, les spores sont peu nombreuses, la chaîne de spores est droite et monoverticillée.

2. Caractères morphologiques des souches actives

Tableau n° 15 : résultats des caractères morphologiques des souches actives.

souche	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5
6	Jaune pale	Blanc jaunâtre	Blanc	Blanc jaunâtre	Blanc
13	Vert jaune grisâtre	Vert jaune grisâtre	Vert jaune clair	Jaune verdâtre grisâtre	Jaune verdâtre clair
14	Vert jaune pale	Vert jaune moyen	Vert jaune clair	Vert jaune grisâtre	Blanc jaunâtre
65	Blanc	Blanc grisâtre	Gris clair bleuté	Gris clair	Blanc
76b	Blanc jaunâtre	Blanc jaunâtre	Blanc	Gris clair bleuté	Blanc
76g	Blanc	Blanc	Blanc bleuté	Gris moyen	blanc
87p	Blanc bleuté	Blanc	Gris clair bleuté	Gris clair	Blanc bleuté
165	Jaune pale	Blanc	Gris jaunâtre	Gris clair bleuté	Blanc
182	Blanc	Blanc bleuté	Bleu pale	Gris bleuté	Blanc bleuté

3. Production des pigments mélanoides

Tableau n° 16 : production des pigments mélanoides sur milieu ISP6, ISP7

souche	ISP6			ISP7		
	2j	4j	7j	2j	4j	7j
6	-	-	-	-	-	-
13	Brun foncé	Brun foncé	Brun foncé	Gris clair brunâtre	Brun sombre grisâtre	Brun foncé
14	Brun foncé	Brun foncé	Brun foncé	-	Vert jaune clair	Vert jaune moyen
65	-	-	-	-	Jaune orangé clair	Jaune orangé franc
76b	-	-	-	-	-	-
76g	-	-	-	-	-	-
87p	-	-	-	-	-	-
165	-	-	-	-	-	-
182	-	-	-	-	-	-

(-) : absence de pigmentation.

4. Discussion

Après ensemencement sur les milieux gélosés, les souches apparaissent après deux jours d'incubation et se développent, au bout de 7 jours, le mycélium aérien est alors pris en photos, les résultats sont résumés dans les planches n° 1, 2, 3, et 4.

La terminologie de ces couleurs est attribuée selon la charte des couleurs du système **ISCC-NBS** proposée par **Kelly et Judds, (1955)**.

Sur gélose ISP₂, le mycélium aérien des souches E6, 65, 76g, 87p, 165 et 182 est initialement blanc puis devient gris, celui des souches E13 et E14 est vert jaunâtre, toutes ces souches se développent bien sur la gélose ISP₂, la taille des colonies est variable, les souches E76b, 87p 165, 182 ont de petites colonies (comparée aux autres), la surface est poudreuse, seules les souches E13 et 14 présentent des pigments diffusibles sur ISP₂, la souche E65 présente un pigment mélanoïdes de couleur jaune orangé uniquement sur ISP₇ (tableau n° 15 et 16), les photos des caractères morphologiques sont résumés dans le tableau n° 15.

La production de pigments mélanoïdes sur les milieux ISP₆ (citrate d'ammonium ferrique) et ISP₇ (L-tyrosine) s'explique par la production de polymères suite au processus de la fermentation oxydative, la biosynthèse de tyrosine en L-DOPA (3, 4-dihydroxy phényl-L-alanine) qui est par la suite oxydé en Indol-5,6-quinone puis en DOPA-mélanine qui donne cette couleur foncé appelé pigment mélanoïde, la variation de sources de carbone et d'azotes (tel que le citrate d'ammonium ferrique présent dans le milieu ISP₆) influence la production de ces pigments et le changement de la couleur (**Dastager et al., 2006 ; Hobbs et al., 1990 ; Petinate et al., 1999**).

Il est intéressant de noter la production de pigments de couleur jaune/orangé vif de la souche E65 sur les milieux ISP₆ et ISP₇, qui est différente de la couleur brune, marron foncé attribuée aux pigments mélanoïdes (**Dastager et al., 2006**) serait plutôt attribuée à la molécule antimicrobienne produite par la souche (**Sevcikova et Kormanec, 2004**) ; **Rana et Salam, (2014)** ont également rapporté la production d'un pigment orange possédant une bonne activité antimicrobienne.

5. Caractères physiologiques

5.1. Croissance a différentes températures

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n° 17, les souches ont donné une bonne croissance dans l'intervalle 25- 37°C ce qui confirme le caractère mésophiles de ces souches avec cependant une croissance observée pour la souche E13 et E14 à 5°C, et de la souche E65 et E165 à 45°C.

Tableau n° 17: croissance des souches a différentes températures après 7j d'incubation.

souche	5°C	25°C	28°C	37°C	45°C
6	-	+	++	+	-
13	++	++	++	++	-
14	++	++	++	++	-
65	-	++	++	++	+
76b	+	++	++	++	-
76g	+	++	++	++	-

87p	+	++	++	++	-
165	-	++	++	++	+
182	-	++	++	++	-

(-) Pas de croissance

(+) faible croissance

(++) bonne croissance

5.2. Croissance et tolérance au chlorure de sodium

L'halotolérance des souches aux concentrations d'NaCl est donné par le tableau n° 18 et les photos dans les planches n° 16, 17, 18 et 19, la souche E6, 76g, 87p, 165 ont bien toléré une concentration de 40 g/l d' NaCl, les autres souches ont donné une faible croissance avec absence de pigmentation pour les souches E13 et 14.

Tableau n° 18: halotolérance des souches actives

	5 g/l		10 g/l		15 g/l		20 g/l		25 g/l		30 g/l		35 g/l		40 g/l	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
65	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+	+	-
76b	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
76g	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+
87p	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+
165	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++	+
182	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+	+	+	+	-

	5 g/l			10 g/l			15 g/l			20 g/l			25 g/l			30 g/l			35 g/l			40 g/l		
	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P
13	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
14	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	+	++	+	-	+	+	-	+	+	-

C : croissance ; S : sporulation ; P : pigmentation

6. Caractères biochimiques

Les résultats des tests enzymatiques, d'assimilation des sources de carbone et d'azote sont mentionnés dans les tableaux n° 19, 20 et 21.

Tableau n° 19 : les tests enzymatiques des souches actives.

Test souche	Gélatinase	Protéase	Caséinase	Estérase	Amylase
6	L	-	+	-	+
13	R	+	+	+	+
14	L	+	+	+	+
65	R	+	+	-	+
76b	R	+	+	+	+
76g	R	+	+	+	+
87p	R	+	+	+	+
165	L	+	-	+	+
182	-	+	+	+	+

(-) absence de production

R : rapide (48 h d'incubation)

L : lente (plus de 7 jours d'incubation)

Tableau n° 20 : test d'assimilation des différentes sources de carbone

Sucre souche	glucose	saccharose	D-xylose	D-mannitol	D-fructose	L-arabinose	L-rhamnose	raffinose	galactose	D-mélibiose	mannose	sorbitol
6	+	+	+	+	++	+/-	+/-	++	+	++	+	-
13	+	++	+	++	+	+/-	+	-	++	-	+	-
14	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	++	-
65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
76b	+	-	+/-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
76g	+	-	+/-	+	++	+	+	+/-	+	+/-	+	-
87'	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	-
165	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
182	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+/-	+	-

(-) pas de croissance

(+/-) croissance faible

(+) croissance

(++) bonne croissance

Tableau n° 21 : test d'assimilation des différentes sources d'azotes

source d'azote souche	Adénine	Guanine	AcL aspartique	α L alanine	L cystéine	L glutamine	L glycine	Leucine	Tryptophane
6	+/-	+	-	+	-	+	-	+	-
13	+	+	-	+	-	+	+	+	+/-
14	+	+	-	+	-	++	+	+	+
65	+	+	-	+	-	+	+	+	+/-
76b	+	-	-	+/-	-	+	-	-	-
76g	+	+	-	+	-	++	-	+	+
87p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
165	-	-	-	+/-	-	+/-	-	+	-
182	+	+	-	+	-	++	-	+	-

(-) pas de croissance

(+/-) croissance faible

(+) croissance

(++) bonne croissance

7. Discussion

La communauté microbienne est ubiquitaire, elle se trouve dans différentes conditions environnementales, y compris les conditions extrêmes de température, de pression et de salinité, afin de survivre dans ces conditions, les microorganismes sont capables de mettre au point des fonctions adaptatives.

L'environnement saumâtre du lac El Mellah ainsi que les autres paramètres physicochimiques qui le caractérise (tableau n° 8) sont des facteurs environnementaux qui limitent sa biodiversité microbienne (**Jose et Jebakumar, 2014**), chez les actinomycètes isolés de divers écosystèmes salins aquatiques, le caractère halotolérant ou halophile à été systématiquement mentionné (**Guan et al., 2011; Phillips et al., 2012 ; Swan et al., 2010**), les auteurs rapportent également que ce type de microorganismes métaboliquement actifs représentent une source précieuse de nouveaux produits d'intérêt industriel (**Hamedi et al., 2013**).

Les résultats représentés dans le tableau n° 18 mettent le point sur la résistance des souches E87p, E76g et E165 à une concentration en NaCl de 40 g/l (4%), cette adaptation physiologique pourrait s'accompagner d'une adaptation métabolique de la nature des molécules produites par ces souches, plus récemment, **Tian et al., (2014)** ont rapporté l'isolement d'un alcaloïde antimicrobien partir de *Nocardiosis terrae*, une nouvelle souche halophile d'actinomycètes, en concluant que l'environnement salin ou hyper-salin méritent

une attention particulière puisqu'il ouvre une nouvelle voie pour la découverte de molécules naturelle d'intérêt industriel (**Jose et Jebakumar, 2014**).

Les photos des tests enzymatiques sont présentées par la planches n° 23, nous pouvons observer que les toutes les souches dégradent la gélatine excepté la E182, elles possèdent toutes une amylase, une caséinase excepté la souche E165, une protéase excepté la E6, en revanche, seule la souche E13 possède une activité lypolitique.

Les souches E6 et E65 ont été les seules à utiliser tous les sucres comme seules sources de carbone, avec une faible dégradation du sorbitol observée (tableau n° 20), pour les tests d'utilisation des acides aminés, les résultats sont mentionnés dans le tableau n° 21.

La biotechnologie est un champ multidisciplinaire qui a connu un développement important ces dernières années, pas seulement dans la production d'antibiotiques, mais aussi, dans d'autres domaines tout aussi important pour les industriels tels que l'utilisation d'enzymes spécifiques issues de microorganismes manipulés génétiquement, nous citerons la bioremédiation (épuration biologique), l'ensemble des enzymes cités dans notre étude pourraient être avantageuses dans ce type de procédés, les estérases jouent un rôle majeur dans la dégradation des polluants industriels, voir, les déchets de céréales, matières plastiques et autres produits chimiques toxiques (**Xin et Hui-Ying, 2013**), elles sont également employées dans l'industrie laitière, la production de vin, de jus de fruits, et d'alcool (**Choi et Lee, 2001 ; Panda et Gowrishankar, 2005**), les protéases (incluant les gélatinases) sont aujourd'hui très importante notamment dans l'industrie alimentaire et la fabrication des nouveaux détergents (**Najafi et al., 2005 ; Thumar et Singh, 2007**), les α amylases ont une large application en industrie alimentaire et dans la fabrication de papiers, de textiles, de détergents et dans l'industrie pharmaceutique (**Aiyer, 2005 ; De Souza et Magalhães, 2010**).

Outre l'étude phylogénétique qui se base sur le séquençage de l'ARNr 16S, la comparaison des caractères physiologiques qui s'intéressent à la capacité des isolats à hydrolyser les différentes sources de carbone et d'azote, la croissance en présence de différentes températures et d'NaCl, ainsi que la production de différentes enzymes permettent de conforter l'appartenance de deux souches à la même espèce ou encore de prouver la différenciation métabolique qu'elles peuvent acquérir (**Huang et al., 2008 ; Kumar et Goodfellow, 2008 ; Xu et al., 2005 ; Zhu et al., 2007**).

Planche n° 15 : Aspect sous loupe binoculaire des souches actives



CONFIDENTIEL

Aspect colonie de la souche E6 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect colonie de la souche E13 sur milieu ISP2

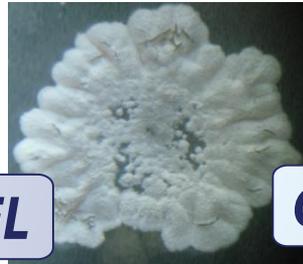


Aspect colonie de la souche E14 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect colonie de la souche E65 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect colonie de la souche E76b sur milieu ISP2

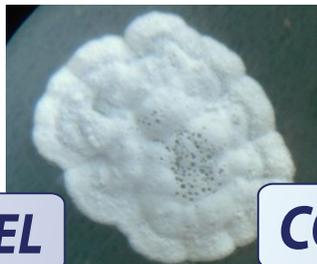


Aspect colonie de la souche E76g sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect colonie de la souche E87p sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect colonie de la souche E165 sur milieu ISP2



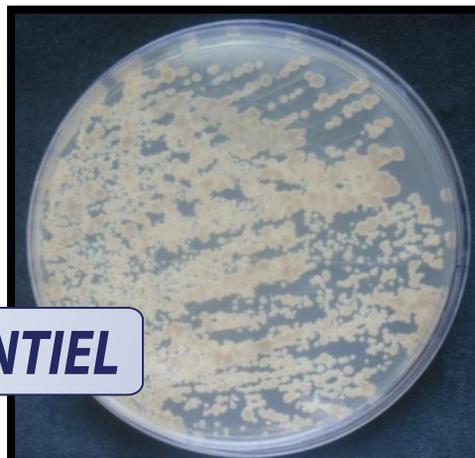
Aspect colonie de la souche E182 sur milieu ISP2

Planche n° 16: aspect sur boîte de la E6, E13 et E14



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E6 sur milieu ISP2

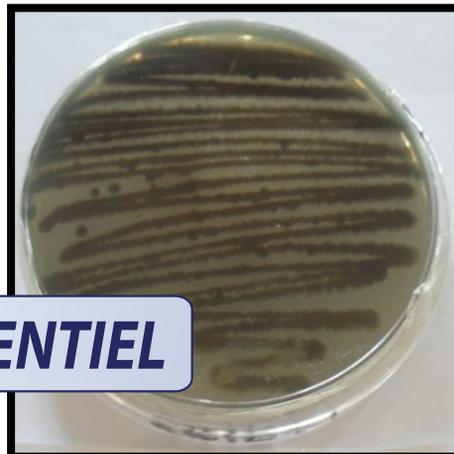


Aspect verso de la souche E6 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E13 sur milieu ISP2

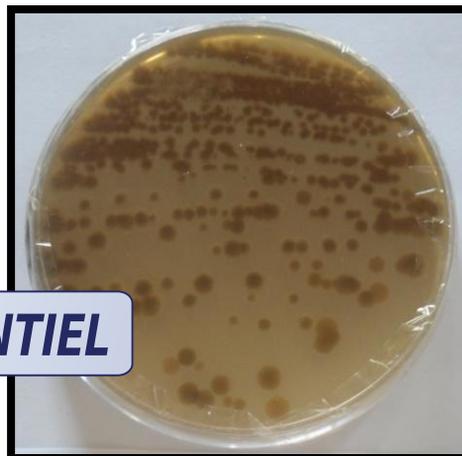


Aspect verso de la souche E13 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E14 sur milieu ISP2



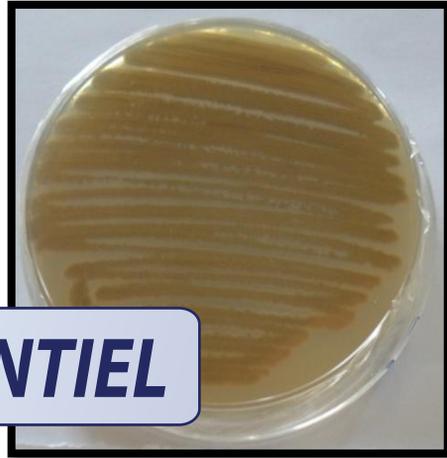
Aspect verso de la souche E14 sur milieu ISP2

Planche n° 17: aspect sur boîte de la E65, E76b et E76g



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E65 sur milieu ISP2

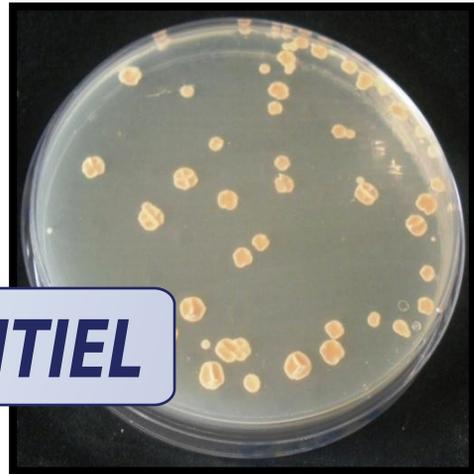


Aspect verso de la souche E65 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E76b sur milieu ISP2

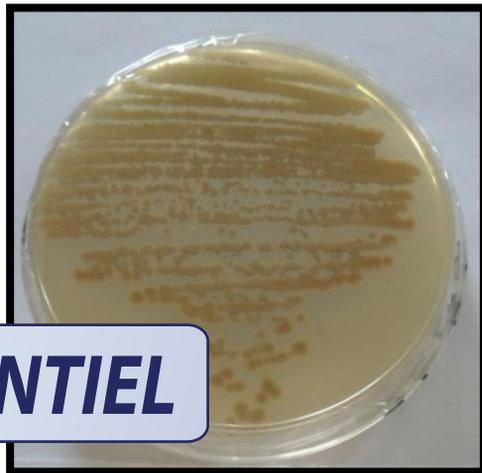


Aspect verso de la souche E76b sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E76g sur milieu ISP2



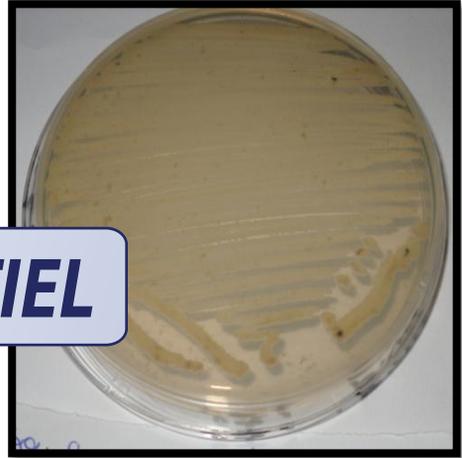
Aspect recto de la souche E76g sur milieu ISP2

Planche n° 18: aspect sur boîte de la E87p, E165 et E182



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E87p sur milieu ISP2

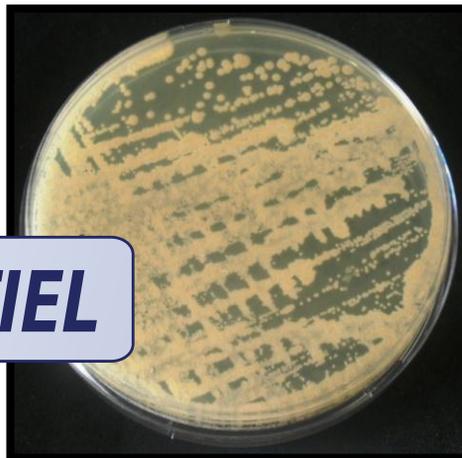


Aspect recto de la souche E87p sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E165 sur milieu ISP2

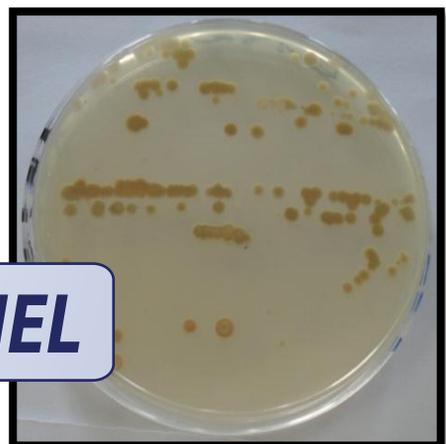


Aspect recto de la souche E165 sur milieu ISP2



CONFIDENTIEL

Aspect recto de la souche E182 sur milieu ISP2



Aspect recto de la souche E182 sur milieu ISP2

Planche n°19 : Halotolérance des souches E6 et E13

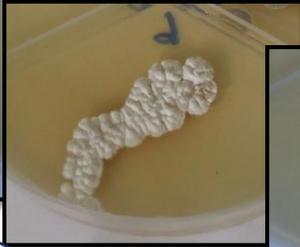
5 g/l

10 g/l

Souche E6



15 g/l



20 g/l



25 g/l



CONFIDENTIEL



40 g/l



5 g/l

Souche E13



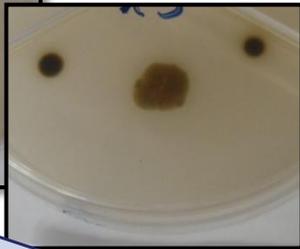
10 g/l



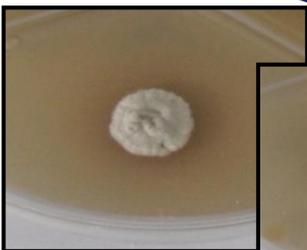
15 g/l



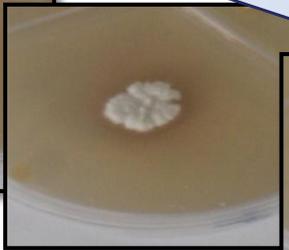
20 g/l



25 g/l



CONFIDENTIEL

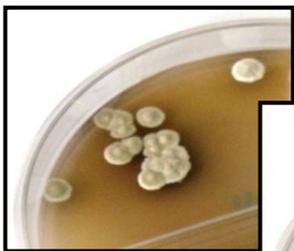


40 g/l



Planche n° 20: Halotolérance des souches E14 et E65

5 g/l



10 g/l



Souche E14

15 g/l



20 g/l



25 g/l



30 g/l



CONFIDENTIEL

35 g/l



40 g/l



CONFIDENTIEL

5 g/l



Souche E65

10 g/l



15 g/l



20 g/l



25 g/l



30 g/l



35 g/l



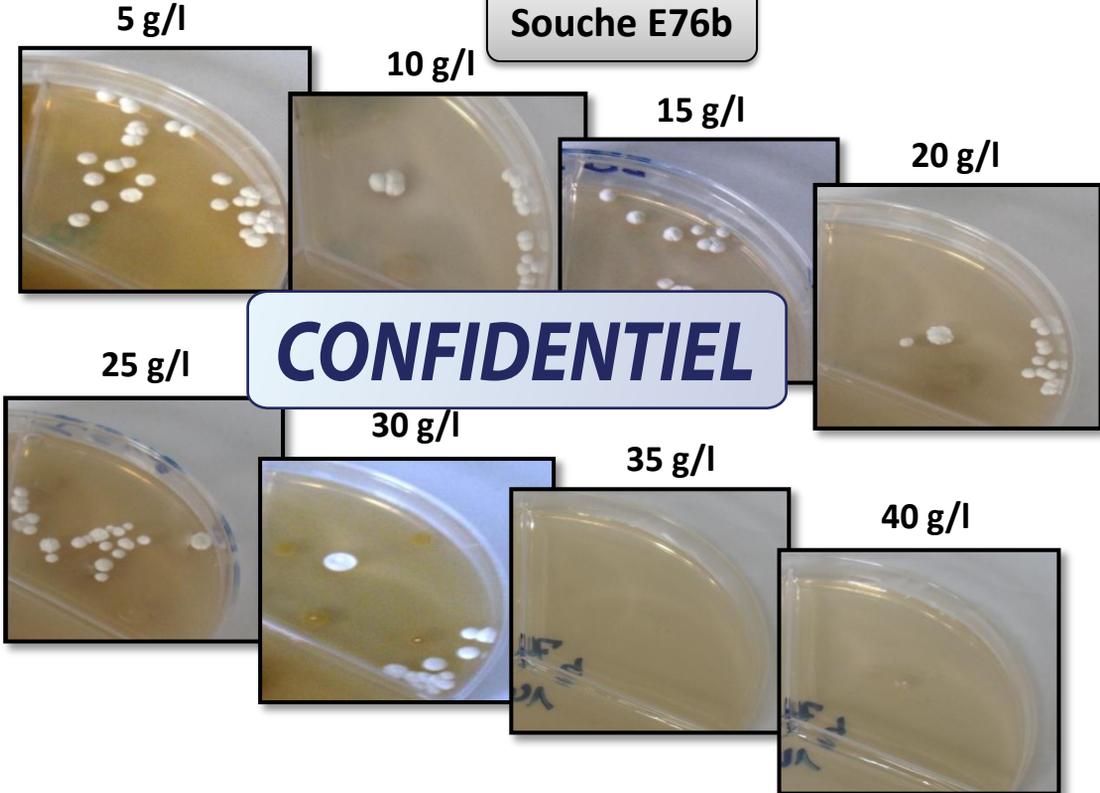
40 g/l



CONFIDENTIEL

Planche n° 21: Halotolérance des souches E76b et E76g

Souche E76b



Souche E76g

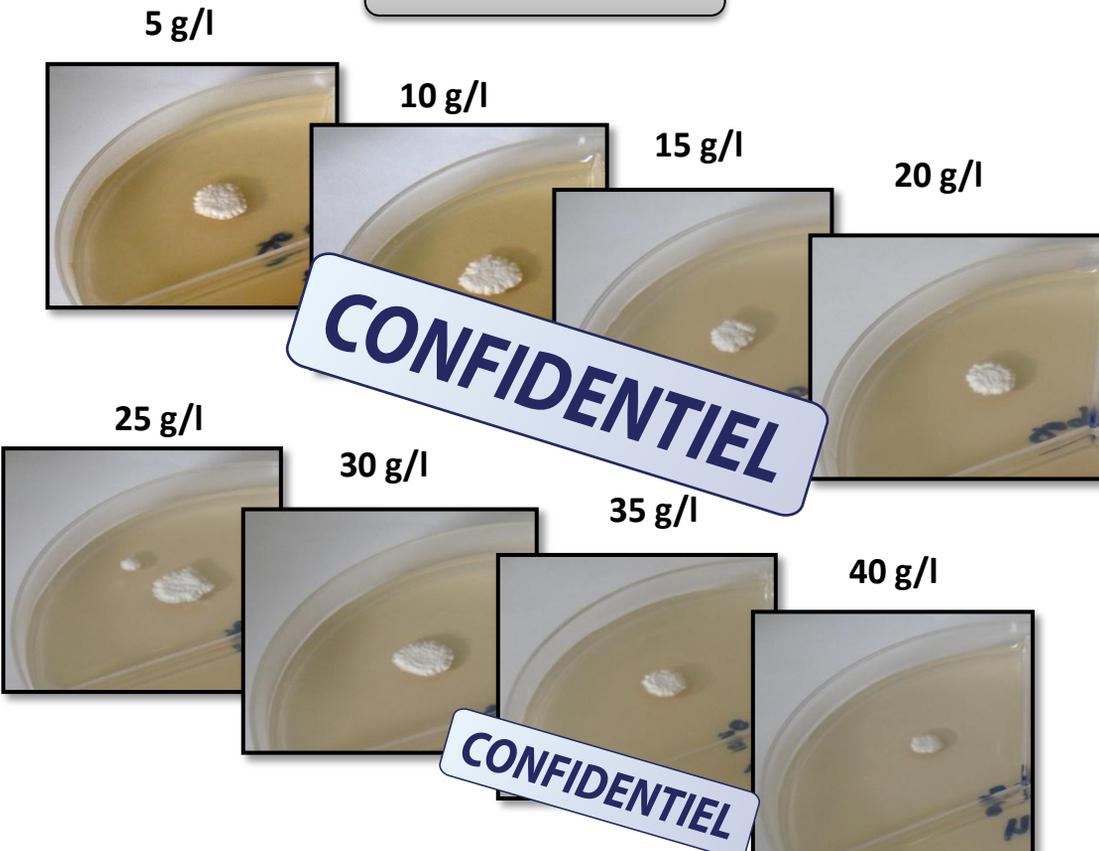
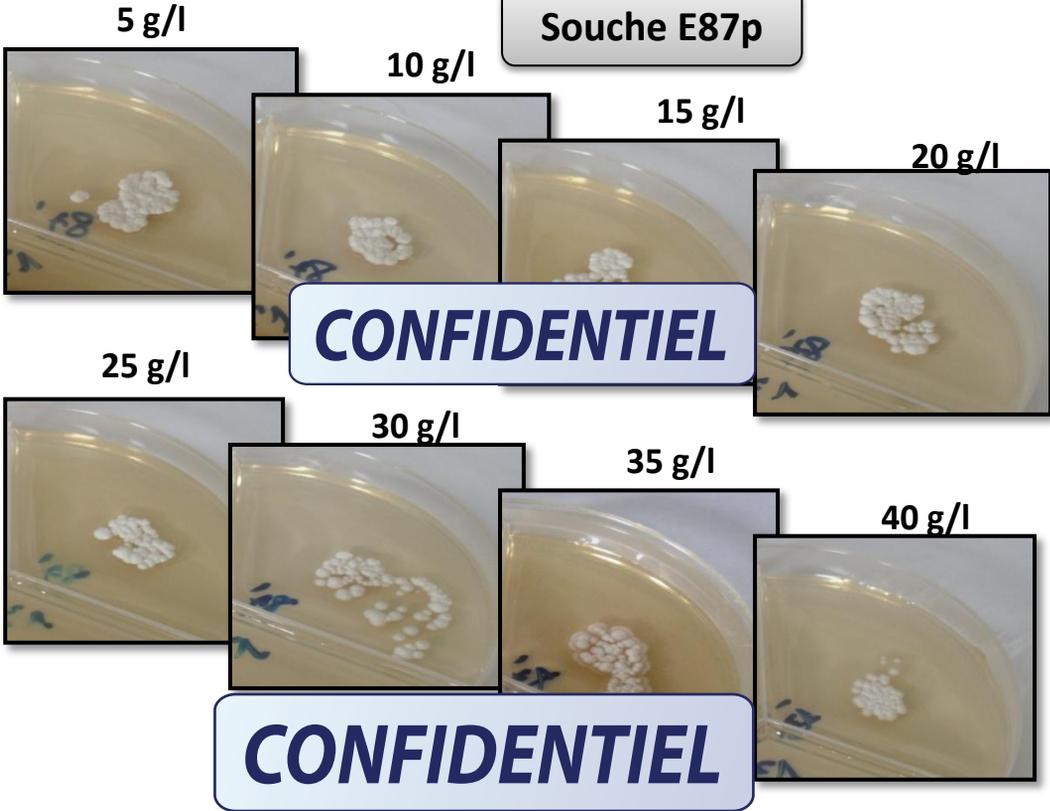


Planche n° 22 : Halotolérance des souches E87p et E165

Souche E87p



Souche E165

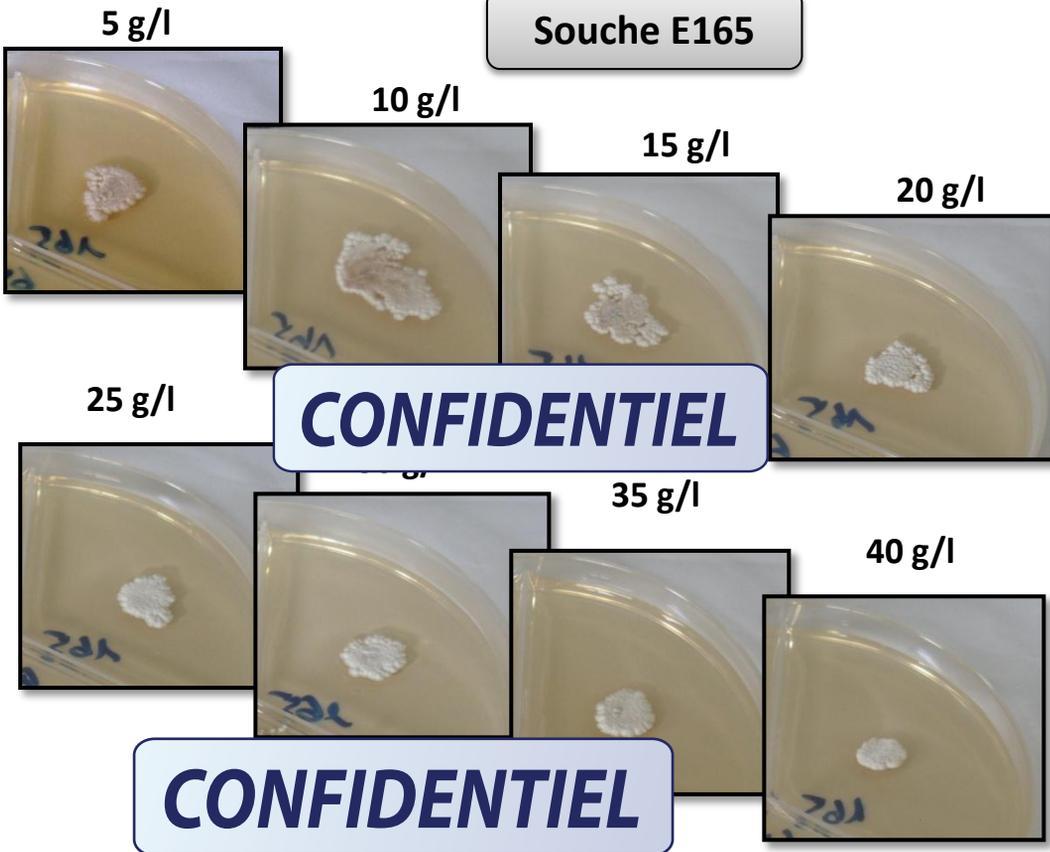


Planche n° 23: caractères morphologiques de la souche E6, E13 et E14

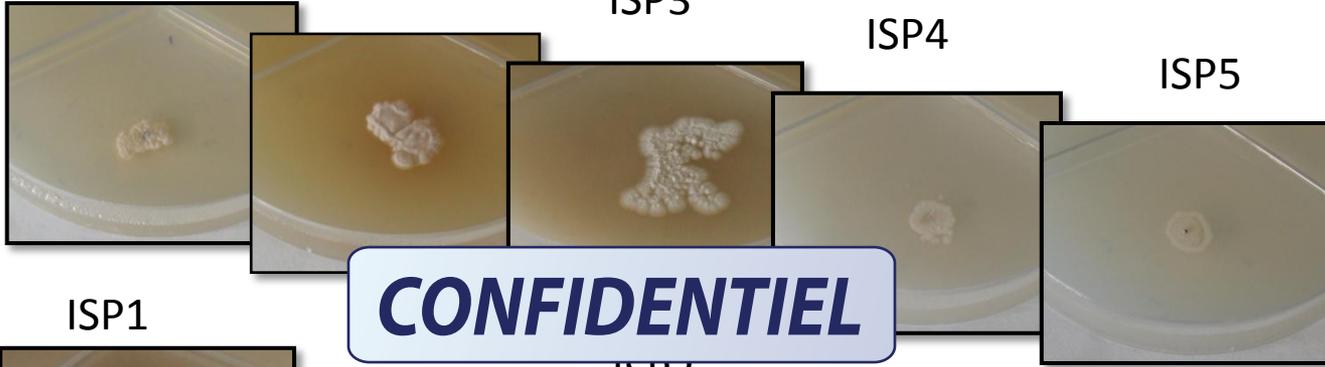
ISP1

ISP2

ISP3

ISP4

ISP5



Souche E6

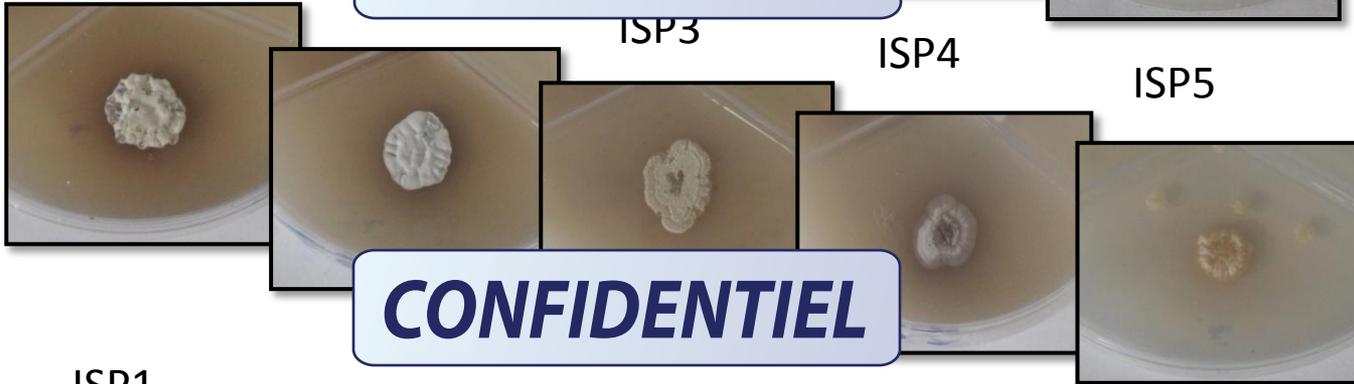
CONFIDENTIEL

ISP1

ISP3

ISP4

ISP5



Souche E13

CONFIDENTIEL

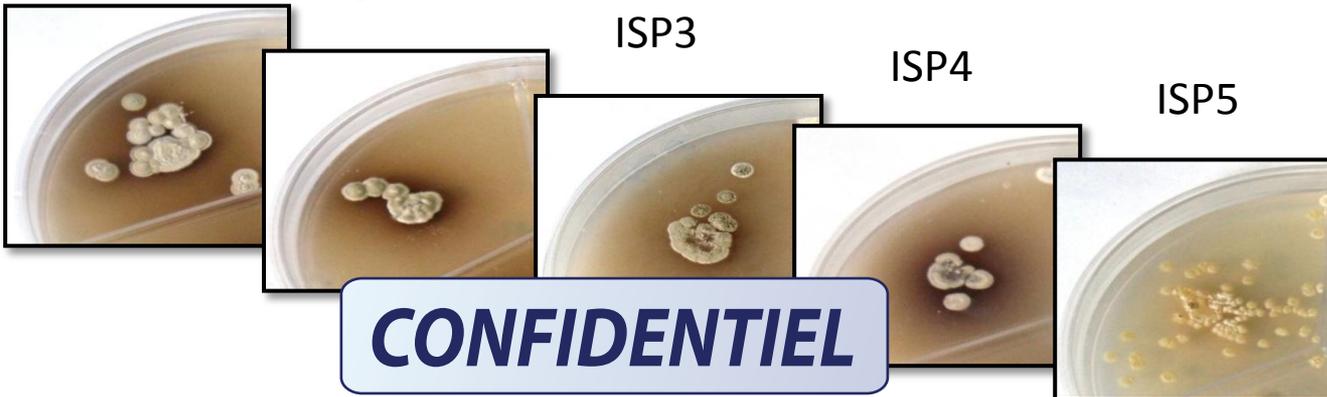
ISP1

ISP2

ISP3

ISP4

ISP5



Souche E14

CONFIDENTIEL

Planche n° 24: caractères morphologiques de la souche E65, E76b et E76g

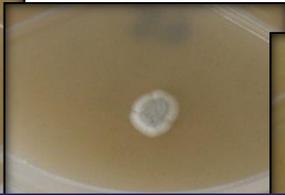
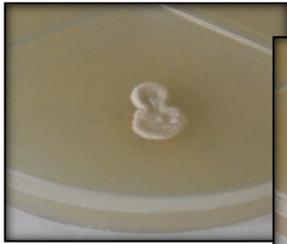
ISP1

ISP2

ISP3

ISP4

ISP5



E65

CONFIDENTIEL

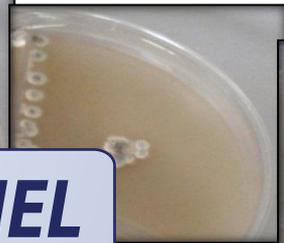
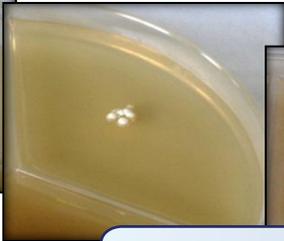
ISP1

ISP2

ISP3

ISP4

ISP5



E76b

CONFIDENTIEL

ISP1

ISP2

ISP3

ISP4

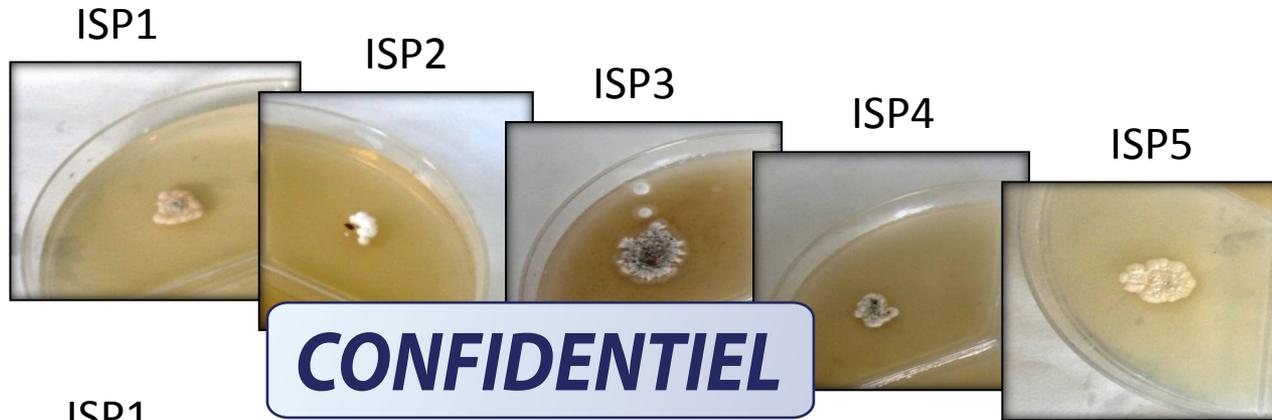
ISP5



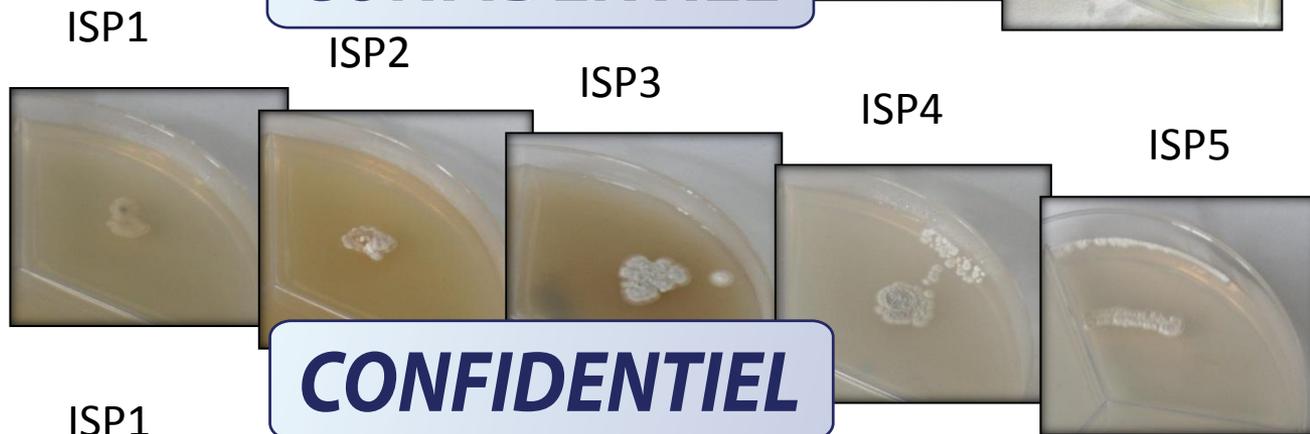
E76g

CONFIDENTIEL

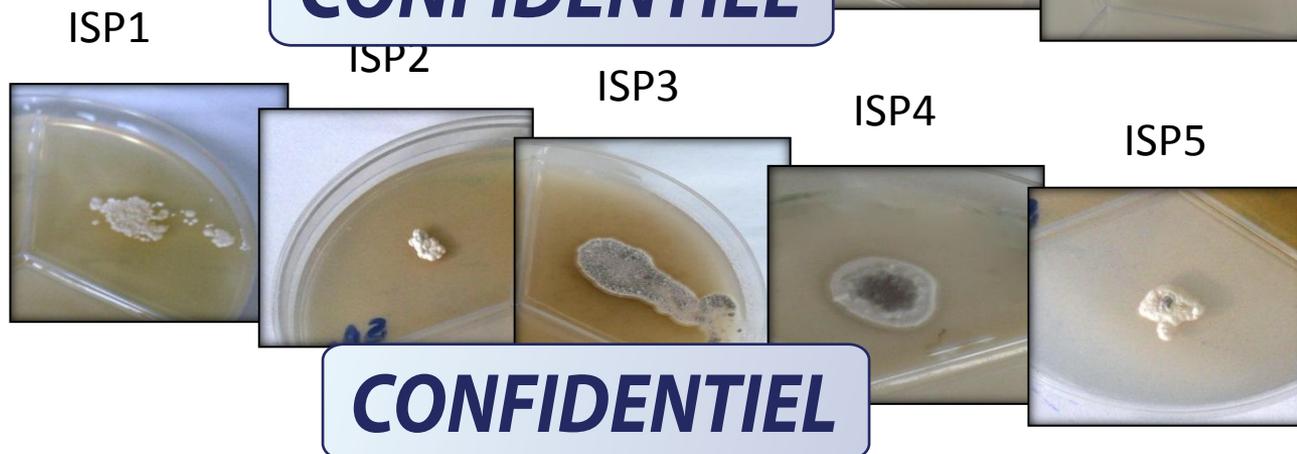
Planche n° 25 : caractères morphologiques de la souche E87p, E165 et E182



Souche E87p



Souche E165



Souche E182

Planche n° 26: Tests enzymatiques des souches E6, E13, E14 et E65

gélatinase

estérase

caséinase

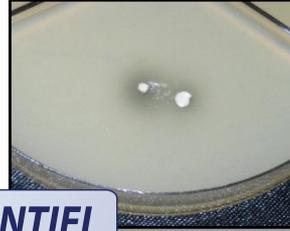
protéase

amylase

E6



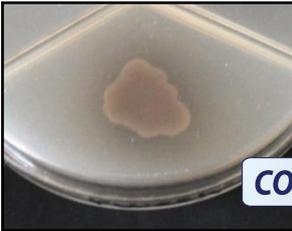
CONFIDENTIEL



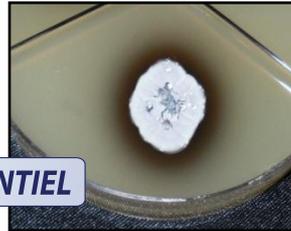
CONFIDENTIEL



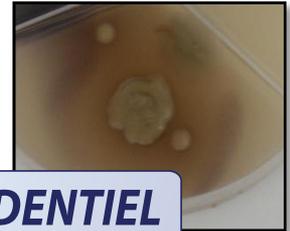
E13



CONFIDENTIEL



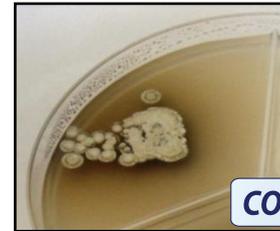
CONFIDENTIEL



E14



CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL



E65



CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL

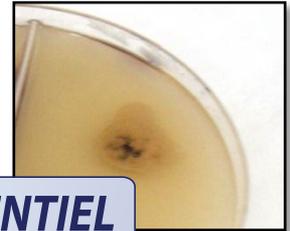


Planche n° 27: Tests enzymatiques des souches E76b, E76g, E87p, E165 et E182

gélatinase

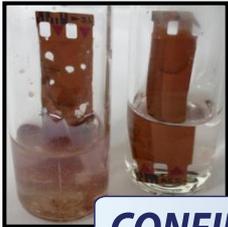
estérase

caséinase

protéase

amylase

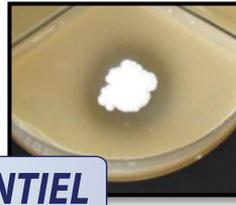
E76g



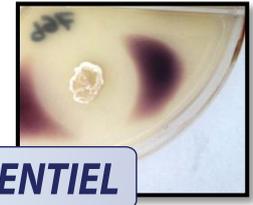
CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL



E76g



CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL



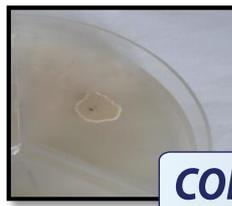
CONFIDENTIEL



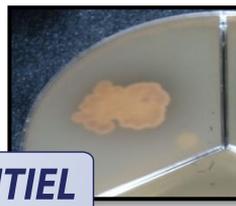
E87p



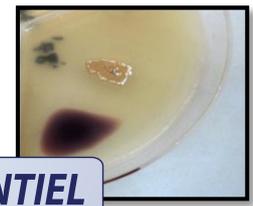
CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL



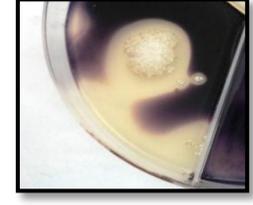
CONFIDENTIEL



E165



CONFIDENTIEL



E182



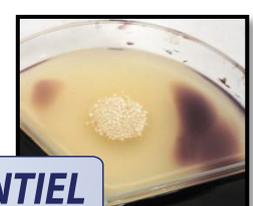
CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL



CONFIDENTIEL

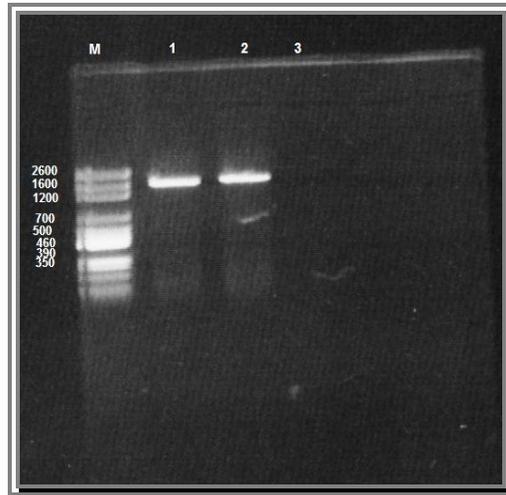


VI. Identification moléculaire de la souche E65

1. L'extraction de l'ADN, séquençage et analyse des séquences

1.1. Résultats

La souche E65 a fait l'objet de l'extraction de son ADNr 16S, le produit PCR obtenu (1492 nucléotides) est migré sur gel d'agarose et révélé sous UV (photo n° 5).



M : 1kb d'ADN marqueur (Promega). 1 : ADN pure \approx 1500 paires de bases. 2 : ADN dilué au 1/10^{ème} \approx 1500 paires de bases. 3: témoin négatif (eau).

Photo n° 5 : PCR du gène ADNr amplifié de la souche E65 (1492 nucléotides).

Les bandes d'ADN pures sont séquencées, la séquence brute est analysée par le logiciel ChromasPro la séquence finale est donnée ci-dessous (Figure n° 28).

```
TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGG
GATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCG
GATATGACACGCTCCCGCATGGGATGTGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGGCCTATCAGCTTGTGGTG
GGGTGATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCC
TTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTGTTCGCGTCGGAT
GTGAAAGCCCGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTTCGATACGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTGGGCGACATTCCACG
TCGTCCGCGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACAT
CCAGAGATGGGTGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTTCGGGGTGTGAGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCA
ACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAA
TGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAA
GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACG
AAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGTGGCCCAACCTTGTGGGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGT
CGTAACAAGGTAGCCGTA
```

Figure n° 28 : Séquence finale de la souche E65 après analyse par le logiciel ChromasPro.

La séquence obtenue est alors comparée pour le degré de similitude avec les espèces bactériennes de références figurantes dans la base de donnée génomique NCBI blast (**ncbi.nlm.nih.gov**), il en ressort que la souche E65 présente 100% de similitude avec la souche *Streptomyces hygroscopicus* N41-24-1 dont le numéro d'accèsion Genbank est EF371443.1.

1.2. Discussion

Le groupe des *Streptomyces hygroscopicus* est un vaste groupe reconnu pour être de grands producteurs de molécules antimicrobiennes, **Rong et Huang, (2012)** en rapportent 58 espèces, ainsi, suite l'expansion rapide des membres de ce groupe, plusieurs recherches ont été réalisées dans le seul but de le circonscrire et déterminer la distance phylogénétique entre ses espèces. Les travaux de **Labeda et Lyons, (1991)** et plus tard avec les travaux de **Goodfellow et al., (2007)** qui ont tenté d'apporter des corrections dans la classification du groupe *S. hygroscopicus* et celui de *Streptomyces violaceusniger*, en mettant le point sur les techniques d'hybridation ADN-ADN, les caractères morphologiques et physiologiques, ou encore l'analyse de la séquence multilocus (MLSA), **Rong et Huang, (2012)** a démontré que cette dernière s'est avérée être une méthode moléculaire puissante pour démêler les différentes espèces de ce groupe.

Une fois l'appartenance de la souche E65 au genre *Streptomyces*, sa position phylogénétique au sein du groupe de *S. hygroscopicus* est établie en comparant à nouveau sa séquence ADNr 16S avec celles du groupe de *S. hygroscopicus* résumées par **Rong et Huang, (2012)**.

Aussi, dans le but de déterminer la **position phylogénétique** de la souche E65, un nouveau **BLAST** (analyse des similitudes) réalisé en comparant son ADNr 16S avec celui des souches *Streptomyces* de références disponibles sur Genbank et celles du groupe *S. hygroscopicus* résumées par **Rong et Huang, (2012)**.

Il en ressort que la souche E65 présente une similitude de 99 % avec *Streptomyces yatensis* souche type **NBRC 101000** (numéro d'accèsion Genbank **AB249962**), l'alignement des séquences est réalisé avec le logiciel Clustal X2, et enfin l'arbre phylogénétique est construit par la méthode de « neighbor joining » (**Saitou and Nei, 1987**) à l'aide du logiciel **Mega 4**, les résultats sont résumés dans la figure n° 29.

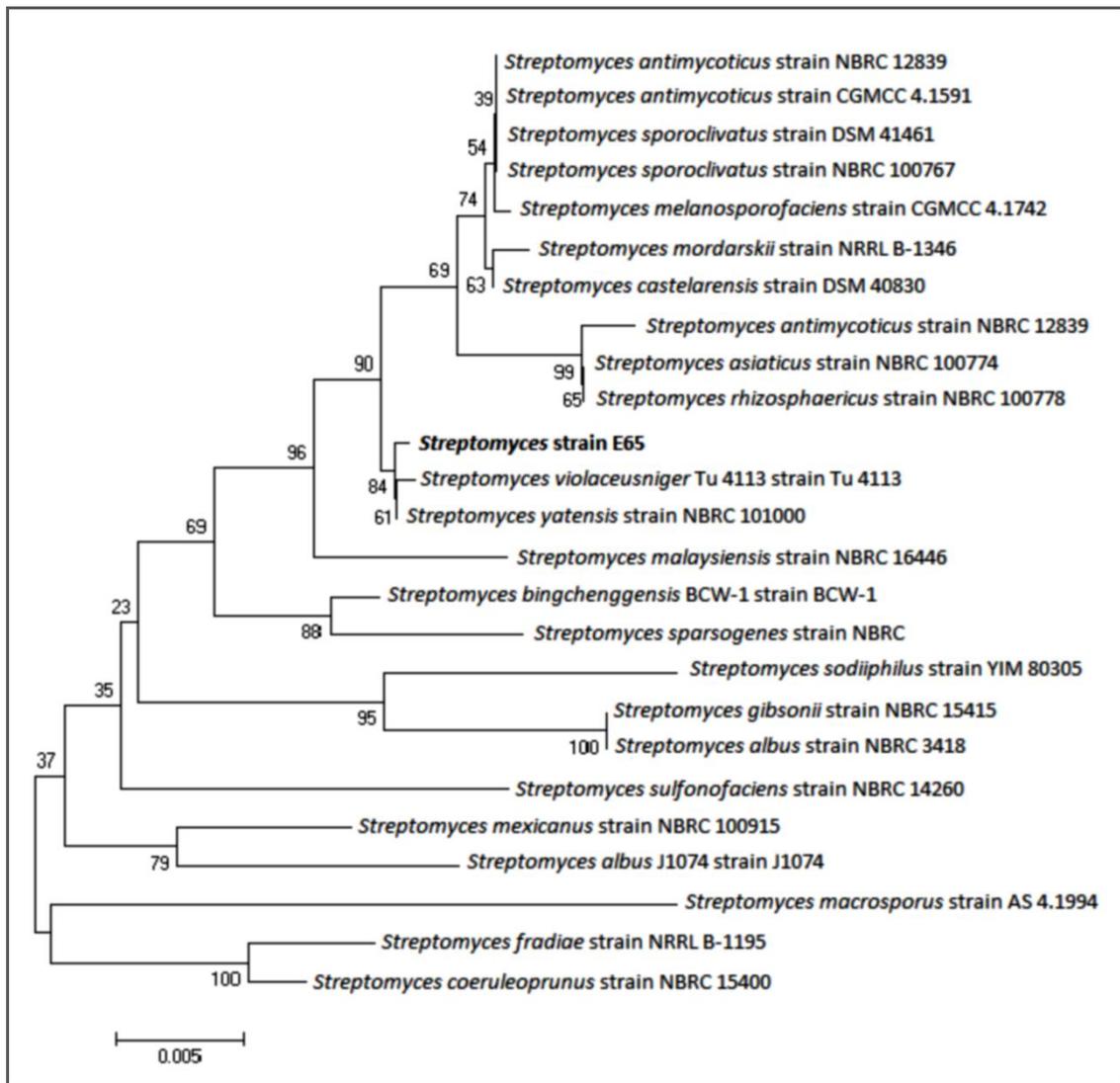


Figure n° 29 : Arbre phylogénétique basés sur les séquences ADNr montrant les distances entre la souche *Streptomyces* E65 et les autres souches *Streptomyces* apparentées, la matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura 2parameter, les valeurs au niveau des nœuds présentent les pourcentages de 500 bootstrap. 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

Tableau n° 22 : récapitulatif des tests réalisés sur la souche E65

Caractère	Résultat
Caractères morphologiques	
ISP 1	Blanc jaunâtre
ISP 2	Gris clair
ISP 3	Gris bleuté
ISP 4	Gris clair
ISP 5	Blanc
pigment diffusible	-
Pigments mélanoides	
ISP 6	-
ISP 7 deux jours	-
Quatre jours	Jaune orangé clair
Caractères biochimiques	
Gram	+
Catalase	+
Urée	+
Indole	+
Resistance au phénol 0,1%(w/v)	-
Amylase	+
Protéase	+
Caséinase	+
Tween 80	-
Gélatinase	+
Températures de croissance	
5°C	-
25°C	+
28°C	++
37°C	+
45°C	+/-
Tolérance au concentration d'NaCl	< 4%
Sources de carbones utilisés (1% w/v)	
Sucrose	+
D-mannitol	++
D-fructose	++
L-arabinose	+

L-rhamnose	++
Raffinose	+
Galactose	++
D-mélibiose	-
Mannose	+
Sorbitol	+
D-xylose	++
D-glucose	++
citrate de Simmons	-
Sources d'azotes utilisées (1% w/v)	
Acide aspartique	-
Adénine	+
Alanine	++
Guanine	++
Cystéine	-
Glutamine	++
Glycine	+
Leucine	++
Tryptophane	++

(rien)(+/-) faible croissance

(+) croissance

(++) bonne croissance

Les espèces du groupes *S. hygrosopicus* représente l'un des plus puissant groupe avec près de 60 souches recensées, connus pour être de grands producteurs de molécules antimicrobiennes et bien d'autres métabolites d'intérêt industriel, avec près de 650 substances bioactives connues, l'accumulation dans la littérature de souches apparentées à ce groupe, rend aujourd'hui d'autant plus difficile la tâche taxonomique qui vise à établir un lien phylogénétique entre ces espèces, la souche E65 monte en tout évidence, une appartenance à ce groupe, avec 99 % de similitude pour la souche type *Streptomyces yatensis* isolée pour la première fois par **Saintpierre et al.**, en 2003, les similarités notée pour la souche E65 ainsi que *S. yatensis* dont la seule référence disponible sur la banque de donnée Genbank et sur le site DSMZ (www.dsmz.de) est celle de **Saintpierre et al.**, (2003), les deux souches affichent un mycélium aérien ramifié de couleur gris clair, des chaînes de spores (Gram) en spirales et un mycélium de substrat jaune grisâtre sur ISP₃, aucune production de pigments mélanoides n'est observée pour les deux souches (autre que le milieu ISP₆ et ISP₇), pour les caractères physiologiques et biochimiques, elles ont été capable de dégrader l'urée, la caséine, le raffinose, et le xylose, par ailleurs, la souche E65 a également été capable de dégrader l'arabinose, le saccharose et l'adénine, tandis que *S. yatensis* ne le fait.

VII. Etude préliminaire des molécules produites par la souche E65

1. Cinétique de croissance de la souche E65

Afin de pouvoir obtenir un bon résultat lors de l'extraction des molécules secondaires de la souche E65, une cinétique de croissance est réalisée avec la cinétique de production afin de mieux comprendre le comportement de la souche en milieu liquide (figure n° 30).

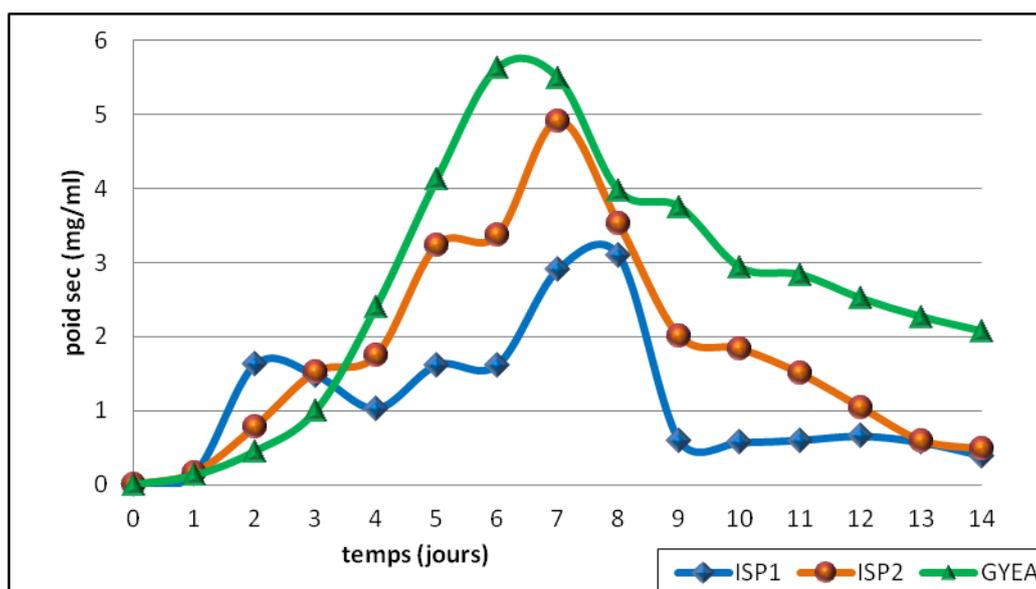


Figure n° 30 : cinétique de croissance de la souche E65 sur les milieux ISP1, ISP2 et GYEA.

La cinétique montre un début de croissance qui augmente du 1^{er} jour d'incubation pour atteindre un maximum au 6^{ème}, 7^{ème}, et 8^{ème} jour pour les milieux GYEA, ISP₂, et ISP₁ respectivement, la courbe de croissance est intimement lié à celle de la production, elle montre une phase latence, exponentielle, stationnaire et de déclin. La phase de latence et stationnaire n'étant pas vraiment démontrée par rapport à la composition et l'adaptation au milieu de culture, la production est alors arrêté au bout de 4 jours d'incubation, qui correspond à un taux de production relativement satisfaisant et afin d'éviter la phase de déclin qui se produit lors de la limitation en nutriments et qui est souvent accompagné d'un relargage de métabolites indésirables dans cette étude (Naritomi et al., 2002, Zhao et al., 2010).

2. Extraction de la molécule bioactive

L'extraction des métabolites secondaires de la souche E65 se base sur les résultats obtenue de la cinétique de production en milieu liquide, sur les trois milieux, le milieu ISP₁ a été choisi comme meilleur milieu pour l'extraction, pour ses bons résultats d'activité et sa composition (tryptone 5g, extrait de levure 3g).

Aussi, le suivi de la culture en milieu liquide nous a permis de stopper la culture au moment propice, l'arrêt de la culture se fait après 4 jours d'incubation qui correspond à la phase

exponentielle de croissance, l'extraction a été réalisée par quatre solvants de polarités différentes (du moins polaire au plus polaire), le résultat montre que seul le **dichlorométhane** a pu extraire les métabolites bioactives de la phase organique.

En effet après évaporation sous vide à 45°C, un résidu jaune verdâtre commence à se former dans la fiole à décanter, le résidu est de texture huileuse gélatineuse, d'une odeur puissante et caractéristique, il est considéré comme « **extrait brut** », ce dernier est alors dissout dans 2 ml de méthanol.

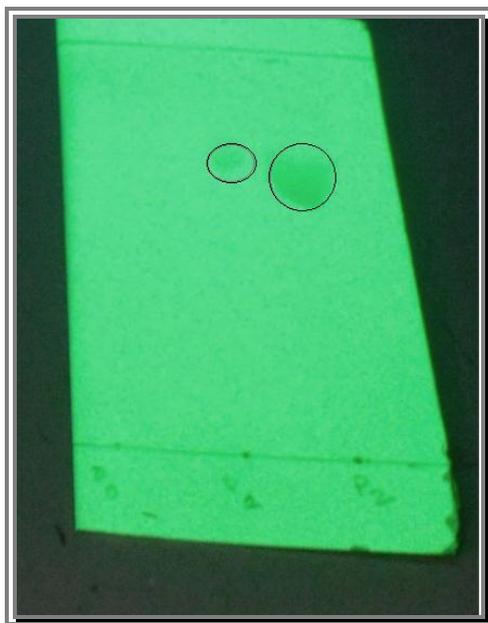
3. Identification partielle de la molécule bioactive

L'identification partielle de la molécule bioactive passe par une chromatographie sur couche mince CCM, une révélation de groupements spéciaux (ex : groupement amine, alcool ou encore cétone) par des révélateurs chimiques déterminés, une spectroscopie UV-Visible de l'extrait et aussi une spectroscopie infrarouge.

4. Chromatographie sur couche mince CCM et spectroscopie UV-Visible

4.1. Résultats

Afin de trouver le meilleur système de migration et de s'assurer de la pureté de l'extrait brut, les plaques de CCM identiques ont été migrés avec différents systèmes, les rapports frontaux sont calculés, ici le meilleur système de solvants est l'acétate d'éthyle-méthanol (100 :15 v/v), il mets en évidence une seule tache avec un rapport frontal égale à 0,72, la révélation sous éclairage UV à 254 nm est présentée par la photo n° 6, le spectre UV-Visible de l'extrait brut solubilisé dans le méthanol est donné par la figure n° 31, deux pics d'absorbance y sont montrés, le premier à 189 nm et le second à 286 nm.



P2 est plus dense que P1.

Photo n° 6 : photo de la révélation de la plaque CCM sous UV (254 nm) des spots de l'extrait brut.

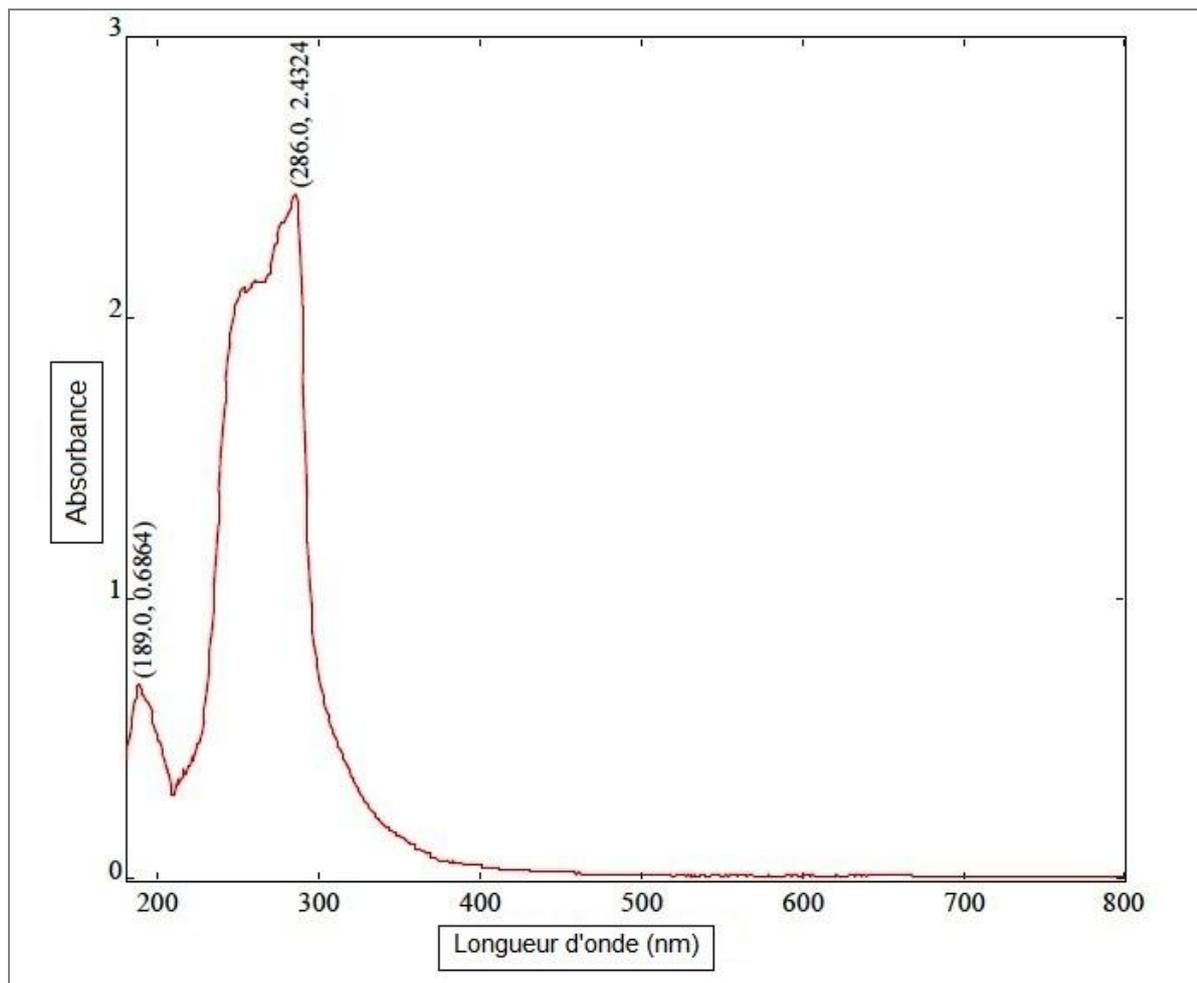


Figure n° 31 : Spectre UV-Visible de l'extrait brut de la souche E65.

4.2. Discussion

Le spectre UV-Visible de l'extrait brut a été réalisé dans le but de mettre en évidence la présence d'antimicrobiens de nature polyénique par la présence de doubles liaisons conjuguées dans la structure chimique de la molécule.

Les maximums d'absorbance pour les polyènes sont (en nanomètre) :

Pour les triènes à : 240, 248, 257 et 268 nm ;

Pour les tétraènes à : 267, 278, 290 et 304 nm ;

Pour les pentaènes à : 279, 290, 304, 317 et 334 nm ;

Pour les hexaènes à : 300, 313, 328, 344 et 364 nm ;

Pour les heptaènes à : 316, 332, 350, 368 et 390 nm ;

Pour les octaènes à : 332, 349, 367, 386 et 410 nm ;

La moyenne des longueurs d'ondes est : 267, 278, 290, 303, 315, 331, 347, 366, 338 et 410 nm.

Après comparaison, nous pouvons en conclure que le spectre UV-Visible de l'extrait brut ne montre pas de pics d'absorption des polyènes, autrement dit la molécule produite par la souche E65 est de nature **non polyénique**.

En effet, les antifongiques de natures polyénique présentent de nombreux inconvénients en thérapie de par leurs toxicités et donc de leurs utilisation limitée, mais aussi, l'incidence de la résistance aux antifongiques des champignons en font une classe d'antifongiques de moins en moins désirés et de moins en moins efficaces (**Lemriss et al., 2003**).

5. Révélation des chromatogrammes par des révélateurs chimiques

La révélation des groupements spécifiques se fait par le développement de plaques CCM similaires (avec le même solvant et dans les mêmes conditions).

Les révélateurs utilisés et le résultat obtenus sont mentionnés dans le tableau n° 23.

Tableau n° 23 : Résultats de la révélation des groupements spécifiques de l'extrait brut

Révélateur chimique	Groupement révélé	Résultat positif	Résultat obtenue
Nitro-4-aniline	Phénol	Jaune orangé brun à froid	Négatif
Ninhydrine	Amine, acide aminé, osamine	Tache couleur rose, violette	Négatif
Formaldehyde-H₂SO₄	Aromatique polycyclique	Tache de diverses couleurs	Négatif
FeCl₃	1. Phénol 2. Acide	1. tache bleue verte 2. Tache rouge	Positif, tache rougeâtre
Vanillin-H₂SO₄	Alcool supérieur, stéroïde, huile étherée	Couleurs violette, rose, grisâtre	Positif
KMnO₄	glucide	Tache colorée	Positif

Ces résultats réfèrent à la présence dans la composition structurale de groupement acide, glucidique et d'un composé aromatique qui peut être un alcool supérieur, un stérol ou stéroïde ou bien une huile étherée.

6. CCM deux dimensions

La CCM bidimensionnelle a été établie pour séparer les composés de structures très proches qui sont difficile à séparer par les CCM classiques.

Sur une plaque carrée 10x10 cm, le premier développement se fait avec un solvant (A) qui n'est autre que le meilleur solvant de la CCM classique à savoir le système acétate d'éthyle-méthanol (100 :15 v/v).

Après évaporation, le second développement sur la même plaque se fait avec un second système de solvant : éthanol- tri éthyle amine- eau (8 :1 :1 v/v).

Après évaporation, le résultat est observé sous UV (254 nm), il a révélée la présence d'une seule tache, ceci témoigne de la pureté de l'extrait brut (**Mendham et al., 2006**).

Après obtention de la molécule active à l'état pur et pour élucider sa structure chimique, il est nécessaire d'appliquer plusieurs techniques spectroscopiques tels que la spectroscopie infrarouge, cette dernière fournit des renseignements sur la composition des différents groupements chimiques fonctionnels qui composent la molécule à élucider

7. Spectroscopie infrarouge

7.1. Résultats

Le spectre infrarouge de l'extrait brut soluble dans le chloroforme est donné par la figure n° 32.

En effet le méthanol donne un large pic d'absorption dans la région O-H qui rend impossible la lecture du spectre de l'extrait brut.

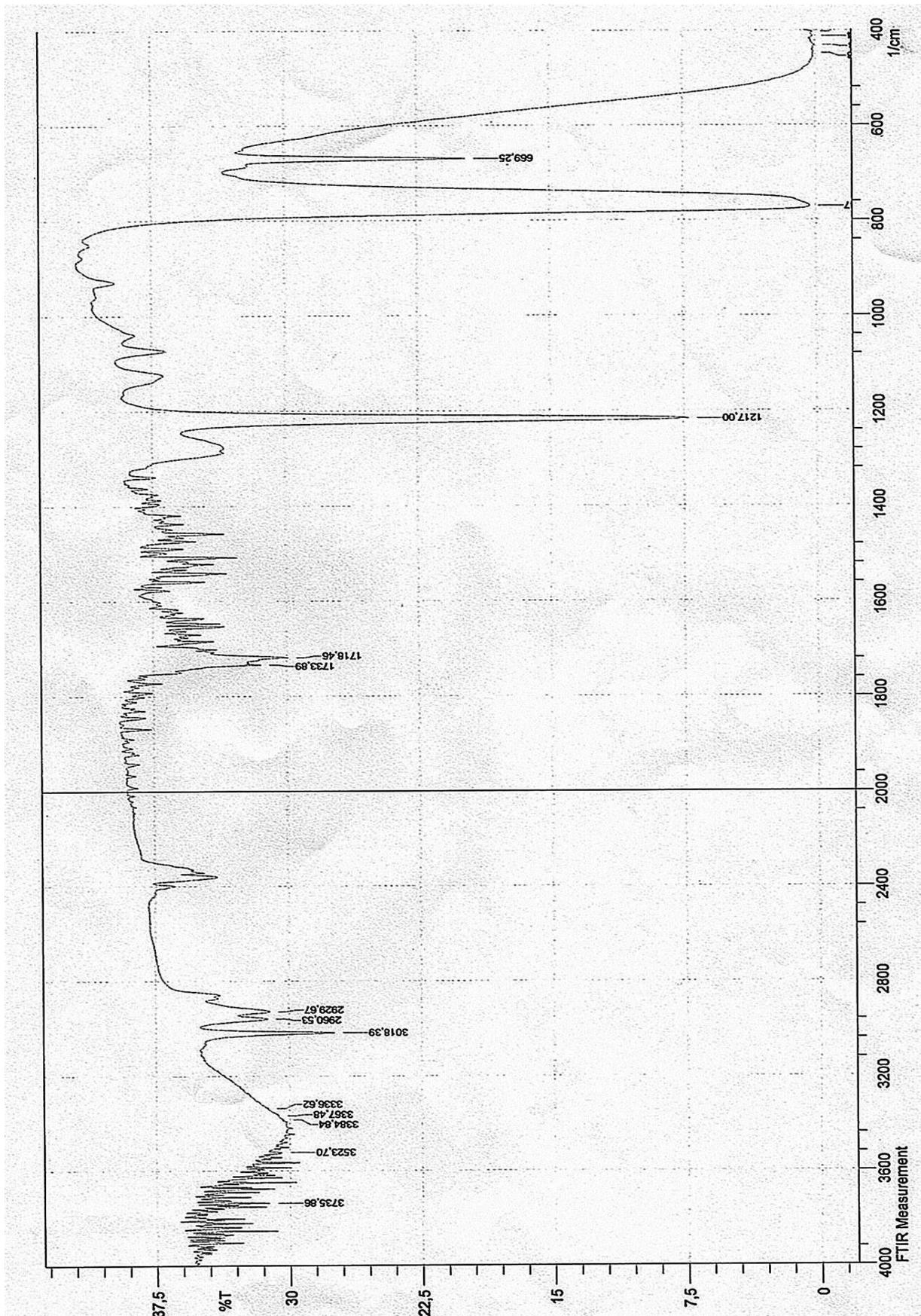


Figure n° 32: FTIR spectre infrarouge de l'extrait antifongique brut dans le chloroforme.

7.2. Discussion

Le spectre FTIR de l'extrait montre les pics d'absorption suivants :

La bande $3735,86\text{ cm}^{-1}$: d'intensité variable et moyenne O-H libre elle correspond à une fonction alcool ou phénol.

La bande $3523,70\text{ cm}^{-1}$: O-H libre correspond également à une fonction alcool ou phénol.

La bande $3384,84\text{ cm}^{-1}$: O-H libre correspond également à une fonction alcool ou phénol.

La bande $3367,48\text{ cm}^{-1}$: O-H libre correspond également à une fonction alcool ou phénol.

La bande $3336,62\text{ cm}^{-1}$: d'intensité moyenne peut correspondre à une fonction amine secondaire N-H, ou bien d'une fonction O-H mais la bande devait être d'une intensité forte.

La bande $3018,39\text{ cm}^{-1}$: d'intensité moyenne, peut correspondre soit :

à une liaison HC=CH ou C=CH

à une liaison =CH₂ (alcène).

La bande $2960,53\text{ cm}^{-1}$: d'intensité moyenne, C-H caractéristique des alcanes.

La bande $2929,67\text{ cm}^{-1}$: d'intensité moyenne, C-H caractéristique des alcanes.

La bande $1733,89\text{ cm}^{-1}$: d'intensité moyenne, C=O caractéristique des aldéhydes aliphatiques.

La bande $1718,46\text{ cm}^{-1}$: d'intensité moyenne, C=O caractéristique des aldéhydes aliphatiques.

Et enfin la bande $1217,00\text{ cm}^{-1}$: d'intensité forte qui correspond à une fonction C-O, phénol ou éther.

Le spectre UV-Vis de la molécule antifongique produite par la E65 démontre l'absence de molécules polyénique, autrement dit elle n'appartient à l'ancienne classe d'antifongiques polyéniques dont la toxicité et la mauvaise solubilité a été souvent démontrée (**Martin, 2008 ; Ripert, 2013**).

Le spectre montre une bande C-O qui réfère à un phénol ou éther, deux bandes C=O probablement aldéhyde, deux autres C-H qui semblent être des alcanes, une bande C-H qui peut s'agir d'un groupement alcène, une bande qui peut être N-H ou O-H, et enfin les 4 autres bandes O-H (**Mesplède, 2003**).

Le spectre UV-Vis et FTIR de l'extrait antifongique de la souche E65 dont l'appartenance au groupe des *Streptomyces hygroscopicus* a déjà été démontrée, est comparé par rapports aux spectres UV-Vis et FTIR des antifongiques connus pour être produits par ce groupe réunis par **Solanki et al., (2008)**.

Il est très intéressant de noter que le spectre UV-Vis et FTIR de l'extrait antifongique ne correspond à aucun de ceux recensés par **Solanki et al., (2008)** comme étant produits par le genre *Streptomyces*, et aussi, par les molécules antimicrobiennes produites par *Streptomyces* sp. d'origine marine donnée par **Zotchev, (2012)** ; **Manivasagan et al., (2013)** ; et **Xu et al., (2014)**.

Et si parmi les antifongiques commercialisés, nous retrouvons les échinocandines qui sont des antifongiques d'origine semi-synthétique, que les azolés sont des molécules de synthèse chimique, que la sordarine est produite par une moisissure (*Sordaria araneosa*), et que le spectre IR de la nikkomycine ne correspond pas avec celui de la molécule extraite, tous ces éléments suggèrent fortement l'appartenance de la molécule extraite à une nouvelle classe de molécules antifongiques qui sont actives sur la levure *C. albicans* malgré la présence de résistance au niveau nucléaire de la levure, tout ces éléments appuient fortement l'hypothèse de la présence d'une nouvelle cible d'action sur la cellule fongique de la molécule extraite qui mérite une attention particulière, et l'application de techniques supplémentaires afin d'élucider sa composition chimique et l'élucidation structurale de la molécule (tel que la géométrie dans l'espace ou encore sa polarité).

Conclusion et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objectif essentiel de notre travail était la mise en évidence de la présence d'actinomycètes productrices de molécules antifongiques dans la zone humide du lac El Mellah (Parc national d'El kala), cette étendue d'eau saumâtre communicante avec la mer par un chenal versant, est également alimentée en eau douce par trois ruisseaux, ce qui confère à cet écosystème son caractère original et unique, il s'est avéré que les actinomycètes isolés à partir d'écosystèmes peu ou non exploités représentent une source de nouvelles molécules antimicrobiennes (**Lakshmipathy et Kannabiran, 2009 ; Jose et Jebakumar, 2014 ; Rajan et Kannabiran, 2014**).

Plusieurs points ont été abordés dans cette étude à savoir:

Tout d'abord, l'isolement et la purification de ces bactéries à partir des échantillons d'eau du lac a été réalisé par un protocole spécifique visant à récupérer un maximum de souches, variant les milieux d'isolement et en utilisant l'eau du lac afin de garder les mêmes paramètres physicochimiques et la pression hydrostatique, sans passer par des prétraitements qui réduisent le nombre ou la variété (espèces) des souches isolées.

Ensuite, le screening des souches ayant une activité antimicrobienne, au total, 104 souches ont été isolées, dont une vingtaine présentaient une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et antifongique sur *Candida albicans* soit environ 20% des isolats (souches actives) ; dont 9 souches qui présentaient une activité antifongique importante sur :

Candida guilliermondii levure nosocomiale A (isolée d'un furoncle d'un patient mâle) Hôpital Ibn Sina (Annaba),

Candida albicans nosocomiale B (isolée d'un furoncle d'un patient mâle) Hôpital Ibn Sina (Annaba),

Candida albicans SC1 nosocomiale sensible (isolée d'un crachat d'un patient mâle de 60 ans avec une maladie pulmonaire chronique) Hôpital la Timone, Marseille, France,

Candida albicans SC2 nosocomiale résistante au 5-fluoro-cytosine (isolée d'une aspiration bronchique d'une patiente de 73ans avec une détresse respiratoire) Hôpital la Timone, Marseille, France,

Candida parapsilosis ATCC 22019,

Et enfin *Candida krusei* ATCC 6258.

La caractérisation des souches d'actinomycètes actives sur les organismes testés passe par l'étude des caractères morphologiques (aspect microscopique et aspect des souches sur les milieux ISP) ainsi que l'étude des caractères physiologiques et biochimiques.

Après cela, trois souches d'actinomycètes représentatives (la E65, la E76g, et la E87p) les plus performantes ont été sélectionnées pour l'étude de leurs activité antifongique en milieu liquide (cinétique de production des molécules antifongiques).

Puis encore, l'identification moléculaire de la souche performante E65, et la réalisation d'un arbre phylogénétique qui met en évidence la distance phylogénétique de la souche avec les autres souches du genre *Streptomyces* apparentés, les résultats ont montré que la E65 présentait 99% de similitude avec *Streptomyces yatensis* souche type **NBRC 101000** (numéro d'accèsion Genbank **AB249962**), ces résultats nous ont permis d'assigner notre souche à cette espèce.

Et enfin, l'extraction par des solvants organiques des molécules bioactives produites par la souche E65 montrent que le dichlorométhane était l'unique solvant à pouvoir extraire ces molécules ; la chromatographie par couche mince et la CCM bidimensionnelle de l'extrait actif révèle la présence d'un seul spot ce qui suggère fortement la pureté de notre extrait; l'étude spectrale par spectroscopie UV-Visible indique que la molécule produite est de nature **non-polyénique**, la comparaison de son spectre Infrarouge avec tous ceux connus comme étant produits par le genre *Streptomyces* suggère fortement la présence d'une **nouvelle molécule**.

Pour résumer, les actinomycètes isolées des eaux du lac El Mellah ont montré une bonne activité antifongique sur les souches *C. albicans* nosocomiales, ainsi, la zone humide du Parc National d'El Kala protégée par la convention Ramsar semble être une bonne source d'actinomycètes producteurs et que les chances d'y trouver de nouvelles molécules sont sérieuses en prenant en compte les résultats obtenus.

En perspectives nous pouvons proposer :

Pour les souches isolées, de compléter les différentes analyses moléculaires afin d'étudier la diversité phylogénétique des actinomycètes au sein de l'écosystème étudié, notamment par la PCR et l'analyse des séquences obtenus par BLAST, par des techniques d'hybridation ADN-ADN, et même l'analyse des séquences multilocus (MLSA) qui s'avère être un outil très efficace pour démêler les espèces génétiquement très proches.

Pour les souches de *Candida* nosocomiales obtenus du CHU Ibn Sina (Annaba), de vérifier l'identification des souches par les techniques moléculaires (PCR et séquençage ou la technique Maldi-Tof).

Pour la souche E65, la comparaison du degré d'hybridation ADN avec ceux des souches du groupe des « *Streptomyces hygrosopicus* clade », aussi l'analyse des séquences multilocus en

plus des paramètres morphologiques, physiologique, et chimiques déjà étudiés afin de confirmer son identification.

Et enfin pour le composé bioactif extrait,

Il serait intéressant de pouvoir, d'une part, compléter l'identification de la molécule produite, à savoir, par la technique spectroscopique RMN, une technique très sensible qui nécessite au préalable la purification de la molécule par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui donne les différentes fractions, mais aussi, l'obtention de la molécule sous sa forme solide (poudreuse) par cristallisation.

D'un autre point, Il est rare que le rendement des souches productrices d'antibiotiques soit suffisamment haut pour qu'il soit immédiatement industrialisé, par conséquent, il est important pour les microbiologistes industriels d'isoler des souches de « haut-rendement », cette étape peut nécessiter une mutagenèse des « souches sauvages » pour obtenir des mutants qui possèdent une surproduction, en industrie le rendement est tout aussi important que la nature des molécules produites (**Tamehiro et al., 2003 ; Madigan et al., 2012**), Pour se faire il serait intéressant de pouvoir étudier le rendement de production de la souche E65 après mutation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahmed L, Jensen P.R, Freel K.C, Brown R, Jones A.L, Kim B.Y, Goodfellow M. *Salinispora pacifica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013; 103(5):1069-78. doi: 10.1007/s10482-013-9886-4.
- Aiyer P. V, Modi H. A. Isolation and screening of alkaline amylase producing bacteria *Bacillus licheniformis* SPT – 27, *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 2005; 7(4): 895 – 897.
- Alangaden G. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin N Am*. 2011; 25 : 201–225. doi:10.1016/j.idc.2010.11.003
- Alexander B.D, Pfaller M.A. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43: S15–27.
- Allahverdiyev A.M, Bagirova M, Abamor E.S, Ates S.C, Koc R.C, Miraloglu M, Elcicek S, Yaman S, Unal G. The use of platensimycin and platencinto fight antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance*. 2013 ; 6 : 99–114.
- Allison D.G, Gilbert P, Lappin-Scott H.M, Wilson M. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University. 2000. ISBN-0521-79302-5.
- Ambroise-Thomas P, Frottier J. Dictionnaire des maladies infectieuses : Infections bactériennes, virales, parasitaires et fongiques. CILF Edition. 2005. ISBN-10: 2853192997.
- Amsaveni R, Sureshkumar M, Vivekanandhan G, Bhuvaneshwari V, Kalaiselvi M. Screening and isolation of pigment producing Actinomycetes from soil samples. *International Journal of Biosciences and Nanosciences*. 2015; 2 (2): 24-28.
- Anctill F. L'eau et ses enjeux. De Boek Edition. ISBN : 978-2-8041-5694-7.
- Anibou M, Zyadi A, Chait A, Benharref A, Ouhdouch Y. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008; 24: 2019– 2025.
- Anzai K, Nakashima T, Kuwahara N, Suzuki R, Ohfuku Y, Takeshita S, Ando K. Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore area of Nagasaki Prefecture, Japan: diversity and biological activity. *J Biosci Bioeng*. 2008; 106(2): 215-217. doi: 10.1263/jbb.106.215.
- Aouiche A, Sabaou N, Meklat A, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A. Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *J Mycol Med*. 2012 ; 22: 42-51.
- Asero R, Bottazzi G. Clinical features of patients showing *Candida* hypersensitivity: an observational study. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2004; 14(4): 309-311.

- Ashley Dodds A, Drew R, Johnson M, Danna R, Dabrowski D, Walker V, Prasad M, Alexander B, Papadopoulos G, Perfect J. Cost of Invasive Fungal Infections in the Era of New Diagnostics and Expanded Treatment Options. *Pharmacotherapy*. 2012; 32(10): 890–901.
- Ayari A, Morakchi H, Gacemi Kirane D. Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from lake Oubeira sediments in north-east of Algeria. *African Journal of biotechnology*. 2012; 11(2): 305-311.
- Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J Mycol Med*. 2005; 15(4): 211-219.
- Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can J Microbiol*. 2006; 52: 373–382.
- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas L.O. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*. 2005 ; 10 (1): E27-39.
- Balashov, S., S. Park, and D. S. Perlin. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006 ; 50: 2058-2063.
- Baoxin Z, Xiangjing W, Wensheng X. Optimization of fermentation medium for enhanced production of milbemycin by a mutant of *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1 using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*. 2011 ; 10(37) : 7225-7235.
- Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Falconi Di Francesco L, Caselli F, Giannini D, Giacometti A, Gavaudan S, Scalise G. Experimental Induction of Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 ; 44(6): 1578–1584.
- Barke J, Seipke R.F, Grünschow S, Heavens D, Drou N, Bibb M.J, Goss R.J.M, Yu D.W, Hutchings M.I. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology*. 2010 ; 8: 109. doi:10.1186/1741-7007-8-109
- Basilio A, Justice M, Harris G, Bills G, Collado J, de la Cruz M, Diez M.T, Hernandez P, Liberator P, Nielsen Kahn J, Pelaez F, Platas G, Schmatz D, Shastry M, Tormo JR, Andersen GR, Vicente F. The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*. *Bioorg Med Chem*. 2006 ; 14(2):560-566.
- Baskaran R, Vijayakumar R, Mohan P.M. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2011 ; 7(1) : 26-32.
- Bastide A., De Méo M., Andriantsao M., Laget M., Duménil G. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyénique. *MIRCEN journal*, 2 : 453-466.
- Batard E, Montassier E, Ballereau F, Potel G. De la consommation d'antibiotiques aux résistances bactériennes : l'exemple de la résistance d'*Escherichia coli* aux quinolones. *Médecine thérapeutique*. 2011; 17(4): 294-301.

- Becker B., Lechevalier M. P., Lechevalier H. A. Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, 1965; 13(2): 236- 243.
- Ben-Ami R, Lewis R.E, Kontoyiannis D.P. Immunopharmacology of Modern Antifungals. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 47:226–35. doi: 10.1086/589290.
- Bendjama A, Morakchi K, Meradi H, Boukari A, Chouchane T, Belaabed B.E, Djabri L. Caracterisation des materiaux biologiques issus d'un écosystème naturel « PNEK » situé au nord-est de l'Algérie. *J Soc Alger Chim*, 2011 ; 21(1) : 45-58.
- Benhamou D, Carrié A.S, Lecomte F. *Staphylococcus aureus* : place et impact dans la prise en charge des pneumopathies nosocomiales. *Revue des Maladies Respiratoires*. 2005 ; 22(4) : 595-603.
- Berceanu A, Leprêtre S, Ojeda-Urbe M, de Berranger E, Corda E.I, Caillot D, Raffoux E, Ribaud P, Thiebaut A, Milpied N, Michallet M, Cordonnier C, Herbrecht R. Prophylaxie antibactérienne et antifongique chez les patients à haut risque en hématologie Enquête de pratique et forum. *Hématologie*. 2011; 17 (4) : 3-15.
- Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. A Personal View. *J Antibiot*. 2005; 58(1): 1–26.
- Berrebi W. Diagnostics et thérapeutique: Guide pratique du symptôme à la prescription. Estem Edition 5ème édition. 2009. ISBN-10: 2843714850
- Bibb M. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. 2005 ; 8 : 208–215.
- Biémont E. Spectroscopie moléculaire : Structures moléculaires et analyse spectrale. De boeck Edition. 2008. ISBN-10: 2804150658.
- Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, Che D. Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010 : incidence, létalité et tendances Bulletin épidémiologique hebdomadaire. 2013. n° 12-13 pp 109-114.
- Boucherit-Atmani Z, Seddiki SM, Boucherit K, Sari-Belkharoubi L, Kunkel D. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *J Mycol Med*. 2011; 21(3):182-187. doi: 10.1016/j.mycmed.2011.07.006.
- Boudemagh A, Kitouni M, Boughachiche F, Hamdiken H, Oulmi L, Reghioua S, Zerizer H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*. 2005; 15(1): 39-44. Doi : 10.1016/j.mycmed.2004.12.004
- Boudjella H, Bouti K, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res*. 2006; 161(4): 288-298.
- Boumezbeur A, Bouteldji A. Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR). 2005. Ministère de l'agriculture et du développement rural direction générale des forêts.
<https://rsis.ramsar.org/RISapp/files/RISrep/DZ1424RIS.pdf>
- Braña A.F, Méndez C, Díaz L.A, Manzanal M.B, Hardisson C. Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol*. 1986 ; 132(5) : 1319-1326.

- Brand A, Gow N.A. Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2009; 12:350-7
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.007>.
- Bredholdt H, Galatenko O.A, Engelhardt K, Fjaervik E, Terekhova L.P, Zotchev S.B. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol.* 2007; 9(11): 2756-2764.
- Bretagne S. Antifongiques en réanimation : tests disponibles et état des lieux. *Réanimation.* 2007 ; 16 : 232–239.
- Brissaud O, Guichoux J, Feghali H, Lamireau D, Demarquez J.L, Naud J, Nolent P. Prise en charge des infections fongiques en réanimation pédiatrique, *Épidémiologie, le point* en 2011. *Réanimation.* 2011 ; 20 :S477-S479.
- Brissaud O, Guichoux J, Harambat J, Tandonnet O, Zaoutis T. Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care.* 2012; 2(1):6. doi: 10.1186/2110-5820-2-6.
- Cai Y, Xue Q, Chen Z, Zhang R. Classification and Salt-tolerance of Actinomycetes in the Qinghai Lake Water and Lakeside Saline Soil. *Journal of Sustainable Development.* 2009 ; 2(1) : 107-110.
doi: 10.5539/jsd.v2n1p107
- Calderone R.A, Fonzi W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001 ; 9(7): 327-35.
- Cannon R.D, Lamping E, Holmes A.R, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, Monk B.C. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology.* 2007; 153(10): 3211-3217.
- Cao Y.Y, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(2):584-589.
- Carle S. Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel.* 2003. 36 : 25-41.
- Chabasse D, Contet-Audonnet N, Bouchara J.P, Basile A.M. Moisissures, dermatophytes, levures : Du prélèvement au diagnostic. Edition Biomérieux. 2008. ISBN-10: 291716204X.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D & Martinez JP. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:130-180.
- Chaibdraa A., Bentakouk M.C. Etude Bacteriologique Sur 30 Mois Dans Un Service De Brulés. *Annals of Burns and Fire Disasters.* 2008 ; 21(1): 7-12.
- Chandenier J, Desoubeaux G. La transition épidémiologique des mycoses en Afrique subsaharienne : de la surface vers la profondeur. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2015 ; 108: 41-45.
- Chaudhary H.S, Yadav J, Shrivastava A.R, Singh S, Singh A.K, Gopalan N. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of advanced Pharmaceutical Technology and research.* 2013 ; 4 (2) : 118-123.

- Cho, J.Y.; Kwon, H.C.; Williams, P.G.; Kauffman, C.A.; Jensen, P.R.; Fenical, W. Actinofuranones A and B, polyketides from a marine-derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (actinomycetales). *J Nat Prod.* 2006 ; 69 : 425-428.
- Cochat P, Aigrain Y. Les malformations de l'appareil urinaire. Doin Edition. 2002. ISBN-2704011109.
- Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux M.E, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D. Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* Isolates. *Eukaryotic Cell*, 2007 ; 6(10): 1889–1904. doi:10.1128/EC.00151-07.
- Cournoyer B., Blaha D., Cloning, characterization and phylogenetic analysis of the sigA σ 70 factor gene sequence from the actinomycete *Frankia*. *Developments in Plant and Soil Sciences.* 2003 ; 100 : 97-106.
- Cowen L.E, Sanglard D, Howard S.J, Rogers P.D, Perlin D.S. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; (in Press). doi: 10.1101/cshperspect.a019752.
- Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra T.M, Mellado E, Rodríguez-Tudela J.L. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20(4):276-279.
- Cuesta A.I, Jewtuchowicz V, Brusca M.I, Natri M.L, Rosa A.C. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam.* 2010 ; 23: 20-26.
- Cwala Z, Igbinosa E. O, Okoh A. I. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2011 ; 5(2) : 118-124.
- Da Silva N.M.V, Pereira T.M, Filho S.A, Matsuura T. Taxonomic characterization and antimicrobial activity of actinomycetes associated with foliose lichens from the Amazonian Ecosystems. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 2011 ; 5(5): 910-918.
- Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Grenouillet F, Cassaing S, Baixench M.T, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O. *Candida* spp. with Acquired Echinocandin Resistance, France, 2004–2010. *Emerg Infect Dis.* 2012 ; 18(1): 86–90.
- Das A, Bhattacharya S, Mohammed Hassan A.Y. Rajan S.S. In vitro Antimicrobial Activity and Characterization of Mangrove Isolates of Streptomyces Effective against Bacteria and Fungi of Nosocomial Origin. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2014; 57(3): 349-356.
- Das S, Lyla P.S, Ajmal Khan S. Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology.* 2008 ; 26(2) : 166-177.
- DasSarma S, Arora P. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences.* 2001. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. p1-9. doi: 10.1002/9780470015902.a0000394.
- Dastager S, Li W.J, Dayanand A, Tang S.K, Tian X.P, Zhi X.Y, Xu L.H, Jiang C.L Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *Afr. J. Biotechnol.* 2006; 5: 1131-1134.

- Datry A, Bart-Delabesse E. La caspofungine : du mécanisme d'action aux applications thérapeutiques. La Revue de Médecine Interne. 2006; 27(1) :32–39.
- Davet P. Vie microbienne du sol et production végétale. Inra Edition. 1996, ISBN 2-7380-0648-5.
- Dawes, E.A. Storage polymers in prokaryotes. In Prokaryotic structure and function. Edited by S. Mohan, C. Dow, and J.A. Cole. Cambridge University Press, Cambridge. 1992. pp. 81–122.
- De Groot R, Stuip M, Finlayson M, Davidson N. Evaluation des zones humides : Orientations sur l'estimation des avantages issus des services écosystémiques des zones humides. 2007. Rapport technique Ramsar n° 3.
- De Jager D, Sheldona M.S, Edwards W. Modelling growth kinetics of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in a pressurised membrane gradostat reactor (MGR). Enzyme and Microbial Technology. 2009 ; 45: 449-456.
- De Souza Paula Monteiro; Pérola de Oliveira e Magalhães. Application of microbial α -amylase in industry – a review. Brazilian Journal of Microbiology. 2010 ; 41: 850-861. ISSN 1517-8382.
- De Vos P, Garrity G.M, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey F.A, Schleifer K.H, Whitman W.B. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition. Volume Three The Firmicutes. 2009. ISBN: 978-0-387-95041-9.
- Delarras C. Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Tec et Toc Lavoisier. 2014. ISBN : 978-2-7430-1565-7.
- Demain A.L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. Biotechnol Adv. 2000 ; 18(6): 499-514.
- Denis F, Ploy M.C, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. Elsevier Masson Edition. 2007. ISBN-978-2-294-01172-6.
- Denyer S.P, Hodges N.A, Gorman S.P. Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology. 7ème Edition Blackwell Science. 2004. ISBN 0-632-06467-6.
- Dhiman N, Hall L, Wohlfiel S.L, Buckwalter S.P, Wengenack N.L. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. J Clin Microbiol. 2011; 49(4):1614-1616. doi: 10.1128/JCM.02381-10.
- Diamond R.D. Atlas of Infectious Disease: Fungal Infections. Current Medicine Group 1st Edition. 2000. ISBN-10: 1573401366.
- Dietz A, Mathews J. Classification of *Streptomyces* Spore Surfaces into Five Groups. Appl Microbiol. 1971; 21(3): 527–533.
- Douglas L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; 11(1): 30-6.
- Drarédja B, Kara M.H. Caractères physico-chimiques de la lagune Mellah (Algérie Nord-Est). Rapp. Comm. Int. Mer Médit. 2004 ; 37- 93.
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K.H. The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes Hardcover Springer third Edition. 2006. ISBN-10: 0387334890.

- Eggimann P, Que Y.A, Revely J.P, Pagani J.L. Preventing invasive *Candida* infections. Where could we do better? J Hosp Infect. 2015; 89(4): 302-308. doi: 10.1016/j.jhin.2014.11.006.
- Ellis D. Amphotericin B: Spectrum and resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2002; 49(1): 7-10.
- Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. Rev Iberoam Micol. 2008 ; 25: 101-106.
- Euzéby J. Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. 2008. Tec et Toc Lavoisier édition. ISBN-13: 978-2743010447.
- Fabre R, Mérens A, Lefebvre F, Epifanoff G, Cerutti F, Pupin H, Tardif D, Cavallo J.D, Ternois I. Sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires communautaires. Médecine et Maladies Infectieuses. 2010 ; 40(10) : 555–559.
- Faurie C, Christiane F, Médori P, Dévaux J, Hemptinne J.L. Ecologie: Approche scientifique et pratique. Tec et Toc Lavoisier 6ème édition. 2012. ISBN : 978-2-7430-1310-3.
- Fauvel Y, Battista J. Observations on the effect of pollutions in brackish waters in the Sète channel, Rhône. Science et Pêche, 1969 ; 179 : 1-10.
- Feng C, Ling H, Du D, Zhang J, Niu G, Tan H. Novel nikkomycin analogues generated by mutasynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. Microb Cell Fact. 2014; 13(59): 1-10. doi: 10.1186/1475-2859-13-59.
- Fournier P, Schwebel C, Maubon D, Vesin A, Lebeau B, Foroni L, Hamidfar-Roy R, Cornet M, Timsit JF, Pelloux H. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. 2011. J Antimicrob Chemother. 66(12):2880-2886. doi: 10.1093/jac/dkr394.
- Fournier P, Schwebel C, Maubon D, Vesin A, Lebeau B, Foroni L, Hamidfar-Roy R, Cornet M, Timsit J.F, Pelloux H. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(12):2880-2886. doi: 10.1093/jac/dkr394.
- Freifeld A.G, Bow E.J, Sepkowitz K.A, Boeckh M.J, Ito J.I, Mullen C.A, Raad I.I, Rolston K.V, Young J.H, Wingard J.R. Clinical Practice Guideline for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases 2011; 52(4): e56–e93.
- Galewski T. Vers Un Observatoire des zones humides Méditerranéennes, évolution de la biodiversité de 1970 à nos jours. 2008. La Tour du Valat.
http://www.tourduvalat.org/sites/default/files/vers_un_observatoire_des_zones_humides_mediterraneennes.pdf
- Gandhimathi R, Arunkumar M, Selvin J, Thangavelu T, Sivaramakrishnan S, Kiran G.S, Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. J de Mycologie Médicale. 2008 ; 18 (1) : 16–22.
- Garrity G.M, De Vos P, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey F.A, Schleifer K.H, Whitman W.B. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. 2004. Springer Dordrecht Heidelberg London New York Ed. ISBN 978-0-387-95041-9.

- Gaudy C, Buxeraud J. Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Elsevier Masson. 2005. ISBN-2842996372.
- Gautam R.K. Garg A.P. Antiungal resistance and herbal sensitivity of oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in a rural community in western Uttar Pradesh, India. African Journal of Microbiology Research. 2014; 8(16): 1676-1683.
- Genilloud, O. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. Antonie Van Leeuwenhoek. 2014; 106: 173–188.
- Gil C., Pomés R., Nombela C. Isolation and characterization of *Candida albicans* morphological mutants derepressed for the formation of filamentous hypha-type structures. 1990. Journal of Bacteriology, 1990; 172 (5): 2384-2391.
- Girard P.M, Katlama C, Pialoux G. VIH. Doin édition. 2007. ISBN : 978-2-7040-1231-2.
- Goodfellow M. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. Microbiology 1971; 69: 33-80.
- Goodfellow M., Kumar Y., Labeda D.P., Sembiring L. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for streptomycetes with rugose ornamented spores. Antonie van Leeuwenhoek. 2007; 92: 173–199.
- Goodfellow M., Stach J.E.M., Brown R., Bonda A.N.V., Jones A.L., Mexson J., Fiedler H-P., Zucchi T.D., Bull A.T. *Verrucosipora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces Abyssomicins. Antonie van Leeuwenhoek. 2012 ; 101: 185–193.
- Gordon R, Barnett D.A, Handerhan J.E, Pang CH-N. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardian strain. Int J Syst Bacteriol. 1974 ; 24: 54-63.
- Gottlieb, D. General considerations and implications of the actinomycetes. In Actinomycetales : Characteristics and Practical Importance. 1973. Edited by G. Sykes & F. A. Skinner. New York: Academic Press. pp 1–10.
- Granier F. : Antifongiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. Antibiotiques, 2003 ; 5 : 39–48.
- Grenouillet F, Hénon T, Kaiser J.D, Limat S, Millon L, Leroy J. Usage, impact écologique et économique des antifongiques systémiques en milieu hospitalier en France. Bulletin épidémiologique hebdomadaire. 2013. n° 12-13 pp117-120.
- Grillot R. Mycoses invasives en France : épidémiologie, enjeux diagnostiques et thérapeutiques. Bulletin épidémiologique hebdomadaire. 2013. n° 12-13 pp 107-128. ISSN 0245-7466.
- Grillot R. Mycoses invasives en France : épidémiologie, enjeux diagnostiques et thérapeutiques. 2013. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, N°12-13. p : 107-128.
- Grouzis M, Le Floc'h E. Un arbre au désert: *Acacia raddiana*. 2003. ISBN 2-7099-1522-7.

Guan T.W, Wu N, Xia Z.F, Ruan J.S, Zhang X.P. *Saccharopolyspora lacisalsi* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Extremophiles*. 2011; 15: 373–378. doi:10.1007/s00792-011-0369-0.

Gulve R. M, Deshmukh A.M. Enzymatic activity of Actinomycetes isolated from marine sediments. *Recent Research in Science and Technology* 2011 ; 3(5): 80-83.

Gupta N, Haque A, Mukhopadhyay G, Narayan R.P, Prasad R. Interactions between bacteria and *Candida* in the burn wound. *Burns*. 2005 ; 31 : 375-378.

Gurielidze M, Pataraya D, Cholokava N, Nutsbidze N. Extremophilic Actinomycetes, Distributed in Various Types of Soils of Georgia and their Protease Activity. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*. 2010; 4(3): 81-85.

Hamedi J, Mohammadipanah F, Ventosa A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles*. (2013); 17: 1–13. doi:10.1007/s00792-012-0493-5.

Hanadate T, Tomishima M, Shiraishi N, Tanabe D, Morikawa H, Barrett D, Matsumoto S, Ohtomo K, Maki K. FR290581, a novel sordarin derivative: synthesis and antifungal activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19(5):1465-1468. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.01.051.

Harriott M.M, Lilly E.A, Rodriguez T.E, Fidel P.L Jr, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology*. 2010; 156 (12): 3635-3644. doi: 10.1099/mic.0.039354-0.

Harriott M.M, Noverr M.C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 : 3914-3922.

Hennequin C, Gauzit R, Wolff M, Cordonnier C. Recommandations de stratégies thérapeutiques pour le traitement des candidoses et aspergilloses invasives chez l'adulte. *Antibiotiques*. 2010 ; 12 : 165-170.

Hidron A.I, Edwards J.R, Patel J, Horan T.C, Sievert D.M, Pollock D.A, Fridkin S.K. National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29(11): 996-1011. doi: 10.1086/591861.

Hobbs G, Frazer C.M, Gardner D.C.J, Flett F. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *J. Gen. Microbiol*. 1990; 136: 2291–2296.

Homerova D, Benada O, Kofronova O, Rezuchova B, Kormanec J. Disruption of a glycogen branching enzyme gene, *glgB*, specifically affects the sporulation-associated phase of glycogen accumulation in *Streptomyces aureofaciens*. *Microbiology*. 1996 ; 124 : 1201–1208.

Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XS, Goodfellow M, Ruan JS. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs*. 2009; 7(1):24-44. doi: 10.3390/md7010024. Erratum in: *Mar Drugs*. 2009; 7(4):495-496.

- Hopwood D.A. *Streptomyces* in Nature and Medicine, The Antibiotic Makers. Oxford University Press Edition. 2007. ISBN: 978-0-19-515066-7.
- Huang H, Lv J, Hu Y, Fang Z, Zhang K, Bao S. *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008 ; 58(1): 17-20. doi: 10.1099/ijs.0.64484-0.
- Huck T.A, Porter N, Bushell M.E. Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. *J Gen Microbiol*. 1991; 137(10): 2321-2329.
- Hulin A, Deguillaume A.M, Bretagne S, Bézie Y. Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives. *J Pharm Clin*. 2005; 24(3): 125-38.
- Hwang B.K, Lim S.W, Kim B.S, Lee J.Y, Moon S.S. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(8): 3739-3745.
- Janniger C.K, Schwartz R.A, Szepietowski J.C, Reich A. Intertrigo and Common Secondary Skin Infections. *American Family Physician*. 2005; 72(5): 833-838.
- Jeffrey, L. S. H. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*. 2008 ; 7(20) : 3697-3702.
- Joffin J.N, Leyral G. *Microbiologie technique*. Bordeaux, Centre régional de documentation pédagogique. 1991. ISBN : 2-86617-269-8.
- Joffin J-N., Leyral G. *Microbiologie technique Tome 1: Dictionnaire des techniques*. Canopé - CRDP de Bordeaux 4ème édition. 2006. ISBN-978-2-86617-515-3.
- Joffin J-N., Leyral G. *Microbiologie technique. Tome 2, Documents techniques*. Broché, Bordeaux 2ème édition. 2001. ISBN 2-86617-334-1.
- Jones T, Federspiel N.A, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee B.B, Newport G, Thorstenson Y.R, Agabian N, Magee PT, Davis RW & Scherer S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101 : 7329-7334.
- Jonsbu E, McIntyre M, Nielsen J. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J Biotechnol*. 2002; 95(2): 133-44.
- Jose P.A, Jebakumar S.R.D. Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes. *Frontiers in Microbiology*. 2014 ; 5 :1-3. doi: 10.3389/fmicb.2014.00242.
- Kahn J.N, Garcia-Effron G, Hsu M.J, Park S, Marr K.A, Perlin D.S. Acquired echinocandin resistance in *Candida Krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(5): 1876-1878.
- Kalra MG, Higgins KE, Kinney BS. Intertrigo and secondary skin infections. *Am Fam Physician*. 2014; 89(7):569-573.

- Kanafani Z.A, Perfect J.R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46 :120–128.
- Kang MJ, Strap J.L, Crawford D.L. Isolation and characterization of potent antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against *Candida albicans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010; 37(1):35-41. doi: 10.1007/s10295-009-0641-9.
- Katzer W, Blackburn M, Charman K, Martin S, Penn J, Wrigley S. Scale-up of filamentous organisms from tubes and shake-flasks into stirred vessels. *Biochem Eng J*. 2001; 7(2): 127-134.
- Kavitha A (a), Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y. Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL_333. *Res Microbiol*. 2010; 161(5): 335-345. doi: 10.1016/j.resmic.2010.03.011.
- Kavitha A (b), Vijayalakshmi M, Sudhakar P, Narasimha G. Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. *African Journal of Microbiology Research*. 2010 ; 4 (1) : 27-32.
- Kelly K.L, Judd D. B. The ISCCNBS method of designating colors and a dictionary of color names. Circular 553, U.S. Department of Commerce, 1955. Washington, D.C.
- Kelly S.L, Lamb D.C, Kelly D.E, Manning N.J, Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Einsele H. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta 5,6-desaturation. *FEBS Lett*. 1997; 400(1): 80-82.
- Keulen G.v, Jonkers H.M., Claessen D, Dijkhuizen L, Wösten H.A.B. Differentiation and Anaerobiosis in Standing Liquid Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Journal Of Bacteriology*. 2003 ; 185(4): 1455–1458.
- Kherifi W, Kherici-Bousnoubra H. Evolution Saisonnière De La Qualité Microbiologique Des Eaux Du Lac Mellah (Nord-Est Algérien). *Larhyss Journal*. 2012 ; 11: 109-118. ISSN 1112-3680.
- Khelif M, Bogreau H, Michel-Nguyen A, Ayadi A, Ranque S. Trailing or paradoxical growth of *Candida albicans* when exposed to caspofungin is not associated with microsatellite genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3): 1365-1368. doi: 10.1128/AAC.00530-09.
- Kim M, Kwon T.H, Jung S.M, Cho S.H, Jin S.Y, Park N.H, Kim C.G, Kim J.S. Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from the Internal Organs of Edible Snow Crabs. *PLOS Journal*. 2013; 8(8):e70887. doi: 10.1371/journal.pone.0070887.
- Kim M.K, Park H.S, Kim C.H, Park H.M, Choi W. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast*. 2002; 19(4): 341-349.
- Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioua S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale* 2005 ; 15 : 45–51.
- Klingspor L, Tortorano A.M, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegraki A, Kibbler C, Meis J.F, Sabino R, Ruhnke M, Arikan-Akdagli S, Salonen J. Dóczy I. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive

care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006–2008). In Press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2014.08.011>

Kumar L, Awasthi G, Singh B. Extremophiles : a novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology*. 2011 ; 10 : 121-135. doi: 10.3923/biotech.2011.121.135.

Kumar S., Kannabiran K. Antifungal activity of *Streptomyces* VITSVK5 spp. against drug resistant *Aspergillus* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients. *Journal de Mycologie Médicale*. 2010 ; 20 : 101-107.

Kumar Y., Goodfellow M. Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp. nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008 ; 58: 1369–1378.

Kumar Y., Goodfellow M. Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010; 60: 769–775.

Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J, Soll DR. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*. 1999; 67(12): 6652-62.

Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vannanneyt M., Swings J., Kim S.-B., Liu Z., Chun J., Tamura T., Oguchi A., Kikuchi T., Kikuchi H., Nishii T., Tsuji K., Yamaguchi Y., Tase A., Takahashi M., Sakane T., Suzuki K. I., Hatano K. Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012 ; 101:73–104.

Labeda D.P., Lyons A.J. The *Streptomyces violaceusniger* cluster is heterogeneous in DNA relatedness among strains: emendation of the descriptions of *S. violaceusniger* and *Streptomyces hygrosopicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991; 41(3): 398-401.

Langford M, Atkin A.L, Nickerson K.W. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans*. *Future Microbiol*. 2009 ; 4(10) : 1353-1362.

Larpen-Gourgaud M., Larpen J-P. Mémento technique de microbiologie. Paris, Tec & Doc-Lavoisier, 1997. 3ème édition. ISBN- 2-7430-0163-1.

Lavigne J.P, Sotto A. Les candiduries. *Prog Urol*, 2005 ; 15 : 213-216.

Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2000 ; 78: 399–405.

Le Borgne S, Paniagua D, Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008; 15: 74–92. doi: 10.1159/000121323.

Le Loir Y, Gantier M. *Staphylococcus aureus*. Lavoisier Tec et Toc édition. 2009. ISBN-2743019093.

- Lechevalier M.P. Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Schaal and Pulverer (Eds.) . Zbl. Bakt. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-New-York. , 1981, 11: pp 159-166.
- Leclerc H., Meyer A., Deiana J. Cours de microbiologie générale : nouveau programme. Doin éditeur, Paris. 1994. ISBN : 2-7040-0745-4.
- Lee S.D, Jeong H.S. *Actinomadura hallensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Mt. Halla in Korea. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56(1):259-264.
- Lemriss S, Laurent F, Couble A, Casoli E, Lancelin J.M, Saintpierre-Bonaccio D. Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Can J Microbiol, 2003; 49: 669–674.
- Letscher-Bru V. Antifongogramme et concentration minimale inhibitrice. EMC - Biologie médicale 2011 ; 6 : 1-7. doi : 10.1016/S2211-9698(11)56775-5.
- LI R. K, RINALDI M. G. In Vitro Antifungal activity of Nikkomycin Z in combination with Fluconazole or Itraconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999 ; 43(6) : 1401–1405.
- Li W.J, Xu P, Zhang L.P, Tang S.K, Cui X.L, Mao P.H, Xu L.H, Schumann P, Stackebrandt E, Jiang C.L. *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui et al. 2001. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(5):1421-1425.
- Liu Y. Scott G. Filler. *Candida albicans* Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. 2011. Eukaryot Cell. 2011 Feb; 10(2): 168–173. doi: 10.1128/EC.00279-10.
- Locci R, Actinomycetes as plant pathogens. European Journal of Plant Pathology. 1994; 100: (3-4) 179-200.
- Locci R. Actinomycete spores. Encyclopedia of Life Sciences. 2005; doi: 10.1038/npg.els.0004237. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0004237/abstract>
- Lockhart S.R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. Clinical Microbiology. 2014 ; 36(17): 131–136.
- Loukkas A, Atlas des parcs nationaux algériens. Ministère de l’agriculture et du développement rural. Diwan Edition, 2006; 28-36. <http://argeliamanece.files.wordpress.com/2012/05/atlas-des-parcs-nationaux.pdf>
- Lucy Xie J, Polvi E.J, Shekhar-Guturja T, Cowen L.E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. Future Microbiol. 2014 ; 9(4) : 523–542.
- Mabrouk M.I, Saleh N.M. Molecular Identification and Characterization of Antimicrobial Active Actinomycetes Strains from Some Egyptian Soils. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2014, 14 (10): 954-963.
- Madigan M.T., Martinko J.M, Stahl D, Clark D.P. Brock biology of microorganisms. 13th Edition Hardcover. 2012. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. Brock biology of microorganisms. 13th Edition Hardcover. 2011. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.
- Makni F, Sellami A, Trabelsi H, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Ayadi A. Évolution de la flore des levures isolées au CHU de Sfax, Tunisie. Journal de Mycologie Médicale. 2010 ; 20 : 42-47.

- Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S.K. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol Res.* 2013; 168(6): 311-32. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.002
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yague P, Sanchez J. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged culture of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008 ; 74: 3877-3886.
- Marhuenda-Egea F.C, Bonete M.J. Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13: 385–389.
- Marinelli F, Tomasz A. Antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology.* 2010 ; 13: 547–550.
- Martin C. Urgences et infections: Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques, antiviraux, antiseptiques. 2008. Wolters Kluwer, France, Arnette Ed. ISBN-978-2-7184-1181-1.
- Massou S, Ahid S, Azendour H, Bensghir M, Mounir K, Iken M, Lmimouni B.E, Balkhi H, Drissi Kamili N, Haimeur C. Les candidoses systémiques en réanimation médicale : analyse des facteurs de risque et intérêt de l'index de colonisation. *Pathologie Biologie.* 2013 ; 61 :108-112.
- Mastouri M, Nour M, Ben Nejma M, Bouallegue O, Hammami M, Khedher M. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. *Pathologie Biologie.* 2006 ; 54(1) :33–36.
- Masurekar P.S. Nutritional and engineering aspects of microbial process development. *Progress in Drug Research.* 2008; 65: 291-328. ISBN: 978-3-7643-8098-4.
- Mayer F.L, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013; 4(2) : 119-128. doi: 10.4161/viru.22913.
- Mellouli L, Ben Ameer-Mehdi R, Sioud S, Salem M, Bejar S. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology.* 2003 ; 154 : 345–352.
- Mellouli L, Karray-Rebai I, Sioud S, Ben Ameer-Mehdi R, Naili B, Bejar S. Efficient Transformation Procedure of a Newly Isolated *Streptomyces* sp. TN58 Strain Producing Antibacterial Activities. *Curr Microbiol.* 2004 ; 49(6): 400-406.
- Mendham J, Denney R C, Barnes J D, Thomas M. Analyse chimique quantitative de Vogel. De Boeck Edition; 2006. p. 772-778. ISBN 2-8041-4799-1.
- Mesplède J. Chimie PCSI. Bréal édition. 2003. ISBN 2749502330.
- Mesplède J., Saluzzo C. 100 manipulations de chimie: organique et inorganique. Bréal Ed. 2004. ISBN 2-7495-0352-3.
- Meyer A., Deiana J., Bernard A. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Doin Ed. France. 2004. ISBN 2-7040-1170-2.
- Michel M.C, Pharm B. Infection nosocomiale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline chez un patient adulte hospitalisé : quel antibiotique choisir. *Pharmactuel.* 2013; 46(1) : 23-33.

- Miller M.G, Johnson A.D. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*. 2002; 110(3): 293-302.
- Moinier A. Pathologie médicale et pratique infirmière. Lamarre Edition. 2008. ISBN-978-2-7573-0076-3.
- Molano, J, Bowers, B, Cabib E. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *The Journal of cell biology*. 1980; 85 : 199-212.
- Morakchi H, Ayari A, Taok M, Kirane D. Cochet N. Characterization of *Streptomyces* strain SLO-105 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African Journal of Biotechnology*. 2009 ; 8 (22) : 6332-6336.
- Mouly S., Sellier P. Monitoring thérapeutique des anti-infectieux : des exigences réglementaires au bon usage du médicament. 2004. Springer-Verlag Paris. p98-92. ISBN-2-287-40684-0.
- Najafi M.F, D. Deobagkars, D. Deobagkar, 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Elect. J. Biotechnol.*, 8: 197-203.
- Nakagawa, Y., Ohno, N. and Murai, T., Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis*. 2003 ; 187: 710-713
- Naritomi T, Kouda T, Yano H, Yoshinaga F, Shigematsu T, Morimura S, Kida K. Influence of broth exchange ratio on bacterial cellulose production by repeated-batch culture. *Process Biochem*. 2002 ; 38: 41–47.
- Neumann T, Piepersberg W, Distler J. Decision phase regulation of streptomycin production in *Streptomyces griseus*. *Microbiology*. 1996; 142: 1953–1963.
- Nishimura S, Nagata N, Shimbo T, Asayama N, Akiyama J, Ohmagari N, Yazaki H, Oka S, Uemura N. Factors Associated with Esophageal Candidiasis and Its Endoscopic Severity in the Era of Antiretroviral Therapy. *PLoS One*. 2013; 8(3) :1-6. doi: 10.1371/journal.pone.0058217.
- Noël T, François F, Paumard P, Chastin C, Brèthes D, Villard J. Flucytosine-fluconazole cross-resistance in purine-cytosine permease-deficient *Candida lusitanae* clinical isolates: indirect evidence of a fluconazole uptake transporter. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(4): 1275-1284. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(6):2062.
- Noël T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. *J Mycol Med*. 2012; 22(2):173-178. doi: 10.1016/j.mycmed.2012.04.004.
- Ohnishi Y, Seo J.W, Horinouchi S. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002; 216(1): 1-7.
- Okami Y. Potential use of marine microorganisms for antibiotics and enzyme production. *Pure Appl Chem*. 1982; 54(10): 1951-1962.
- Okudoh V.I, Wallis F.M. Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in KwaZulu-Natal, South Africa. *South African journal of science*. 2007 ; 103(5-6) : 216-222.

- Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 2001 ; 37 : 69–74.
- Pacheco A, Cuevas M, Carbelo B, Máiz L, Pavón M.J, Pérez I, Quirce S. Eosinophilic lung disease associated with *Candida albicans* allergy. *Eur Respir J.* 1998; 12: 502–504. doi: 10.1183/09031936.98.12020502
- Page C.P, Curtis M.J, Sutter M.C, Walker M.J, Hoffman B.B. *Pharmacologie intégrée*. De Boeck Edition. 1999. ISBN-10: 2744500151
- Panda T, Gowrishankar B.S. Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 67(2): 160-169.
- Pappas P.G, Kauffman C.A, Andes D, Benjamin D.K Jr, Calandra T.F, Edwards J.E Jr, Filler S.G, Fisher J.F, Kullberg B.J, Ostrosky-Zeichner L, Reboli A.C, Rex J.H, Walsh T.J, Sobel J.D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.* 2009 ; 48: 503–35.
- Park S, Kelly R, Kahn J.N, Robles J, Hsu M.J, Register E, Li W, Vyas V, Fan H, Abruzzo G, Flattery A, Gill C, Chrebet G, Parent S.A, Kurtz M, Teppler H, Douglas C.M, Perlin D.S. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 ; 49: 3264-3273.
- Parthasarathi S, Sathya S, Bupesh G, Durai Samy R, Ram Mohan M, Selva Kumar G, Manikandan M, Kim C.J, Balakrishnan K. Isolation and Characterization of Antimicrobial Compound from Marine *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49. *World Journal of Fish and Marine Sciences.* 2012; 4 (3): 268-277.
- Pate J.C, Jones D.B, Wilhelmus K.R. Prevalence and spectrum of bacterial co-infection during fungal keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2006 ; 90: 289-292.
- Patrick Vandeputte P, Pineau L, Larcher G, Noel T, Brèthes D, Chabasse D, Bouchara J.P. *Mycopathologia.* 2010 ; 171(1) : 11-21.
- Paugam A. Antifongigramme: techniques et interprétation. *BioTribune Magazine.* 2005 ; 16(1) : 25-27. Doi : 10.1007/BF03013614
- Pebert F. *Maladies infectieuses : Toutes les pathologies des programmes officiels études médicales ou paramédicales.* Heures de France Edition. 2003. ISBN-10: 2853852474
- Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7(4): 453-460. doi: 10.1586/eri.09.18.
- Perlin D.S. Resistance to echinocandins class antifungal drugs. *Drug Res updates.* 2007; 10: 121-130.
- Peters B.M, Noverr M.C. *Candida albicans-Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infect Immun.* 2013 ; 81 : 2178-2189.
- Petinate S.D.G, Branquinha M.H, Coelho R.R.R, Vermelho A.B, Giovanni-De-Simone S. Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of *Streptomyces cyaneus* isolated from Brazilian cerrado soil. *J. Appl. Microbiol.* (1999) ; 87: 557-563.

- Pfaller M.A, Andes D, Arendpur M.C, Diekema D.J, Espinel-Ingroff Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*. 2010 ; 13: 180-195.
- Pfaller M.A, Andes D, Arendpur M.C, Diekema D.J, Espinel-Ingroff. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. Revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011. 70(3) :330-343. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.002.
- Pfaller M.A, Diekema D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1):133-163. doi:10.1128/CMR.00029-06
- Pfaller M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The Am J of Medecine*. 2012 ; 125(1) :S3-S13. Doi : 10.1016/j.amjmed.2011.11.001
- Pham H.T, Nguyen N.P, Phi T.Q, Dang P.T, Le H.G. The Antibacterial and Anticancer Activity of Marine Actinomycete Strain HP411 Isolated in the Northern Coast of Vietnam. *Int J Med Health Biomed and Pharm Engineering*. 2014; 8(12): 793- 797.
- Phillips K, Zaidan F, Elizondo O.R, Lowe K.L. Phenotypic characterization and 16S rDNA identification of culturable non-obligate halophilic bacterial communities from a hyper- saline lake, La Sal del Rey, in extreme South Texas (USA). *Aquat. Biosyst*. 2012; 8(5) : 1-11. doi:10.1186/2046- 9063-8-5.
- Pickett M.J., Greenwood J.R. Harvey S.M. Tests for detecting degradation of gelatin: comparison of five methods. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10): 2322-2325.
- Pihet M, Marot A. Diagnostic biologique des candidoses. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2013; N°450 : 47-61. doi : RFL-03-2013-43-450-1773-035X-101019-201207573.
- Plaskitt K.A, and Chater K.F. Influences of developmental genes on localised glycogen deposition in colonies of a mycelia prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3 (2): A possible interface between metabolism and morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1995. 347: 105–121.
- Pourriat J.L., Martin C. Principe de réanimation chirurgicale. 2ème édition Arnette, France. 2005. ISBN 2-7184-1074-4.
- Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.A. Microbiologie. De Boeck Edition 2ème édition. 2003. ISBN-10: 2804142566.
- Prescott L.M, Sherwood L.M, Woolverton C.J. Microbiologie. De Boeck Edition. 2010. ISBN-978-2-8041-6012-8.
- Pridham T.G. Color and Streptomyces, report of an international workshop on determination of color of Streptomyces. *Applied Microbiology* 1965 ; 13(1) : 43-61.
- Pridham T.G., Gottlieb D. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *J Bacteriol*. 1948 ; 56(1): 107–114.

- Quatresooz P, Arrese J.E, Piérard G.E. Synopsis des dermatomycoses invasives chez l'immunodéprimé. Revue Médicale de Liège. 2003. 58(11) : 690-694. ISSN: 0370-629X.
- Rabek J.F. Polymer photodegradation : mechanisms and experimental methods Chapman et Hall. 1995. ISBN-0-412-58480-8.
- Rahmansyah M, Agustiyani D, Julistiono H, Dewi T.K. Growth and adaptation of four *Streptomyces* isolates in the media containing propoxur. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 2012; 7(9): 773-781. ISSN 1990-6145.
- Rajan B.M, Kannabiran K. Extraction and identification of antibacterial secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. VITBRK2. Int J Mol Cell Med. 2014 ; 3(3): 130-137.
- Ramage G (a), Saville S.P, Wickes BL, Lopez-Ribot J.L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Applied and environmental microbiology. 2002 ; 68: 5459-5463.
- Ramage G (b), VandeWalle K, Lopez-Ribot J.L, Wickes B.L. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. FEMS microbiology letters. 2002; 214: 95-100.
- Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. Crit Rev Microbiol. 2009 ; 35(4):340-55. doi: 10.3109/10408410903241436.
- Rana S, Salam M.D. Antimicrobial Potential of Actinomycetes Isolated from Soil Samples of Punjab, India. Journal of Microbiology and experimentation. 2014; 1(2): 10-16.
- Ravikumar S, Krishnakumar S, Inbaneson S.J, Gnanadesigan M. Antagonistic activity of marine actinomycetes from Arabian Sea coast. Archives of Applied Science Research, 2010 ; 2 (6): 273-280.
- Rieu P, Eloy O, Bertout S, Mallié M, Bain P, Blanc V. Sensibilité comparée par CLSI, EUCAST, E-test et ATB[®] Fungus 2 des souches de *Candida* sp. isolées au cours d'une enquête épidémiologique sur les candidémies dans des hôpitaux non universitaires. Journal de Mycologie Médicale. 2009; 19(2): 94-103.
- Rifaat H.M. The biodiversity of Actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. Journal of Mediterranean Ecology. 2003 ; 4(3-4): 5-7.
- Ripa F.A, Nikkon F, Zaman S, Khondkar P. Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. Mycobiology. 2009; 37(3): 211–214.
- Ripert C. Mycologie médicale. 2013. Tec et Toc Lavoisier édition. ISBN-13: 978-2743014889.
- Rodier J. L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Technique et Ingénierie, Dunod Edition, 9ème édition. 2009. ISBN-13-9782100072460.
- Rodier J., Legube B., Merlet N., Brunet R. L'analyse de l'eau. Collection: Technique et Ingénierie, Dunod 9ème édition. 2009. ISBN 978-2100072460.
- Roig E, Malo J.L, Montplaisir S. Anti-*Candida albicans* IgE and IgG subclasses in sera of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). Allergy. 1997; 52: 394-403.

Rojas J.L, Martín J, Tormo J.R, Vicente F, Brunati M, Ciciliato I, Losi D, Van Trappen S, Mergaert J, Swings J, Marinelli F, Genilloud O. Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Mar Genomics*. 2009; 2(1): 33-41. doi: 10.1016/j.margen.2009.03.005.

Rong X, Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012 ; 35 : 7– 18.

Ruiz-Herrera J. Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly. 2012. ISBN-9781439848371.

Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R., Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6:14-29.

Saintpierre D, Amir H, Pineau R, Sembiring L, Goodfellow M. *Streptomyces yatensis* sp. nov., a novel bioactive streptomycete isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2003 ; 83: 21–26.

Saintpierre-Bonaccio D, Amir H, Pineau R, Lemriss S, Goodfellow M. *Streptomyces ferralitis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54(6): 2061-2065.

Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4(4): 406-425.

Salamoni S, Mann M, Campos F, Franco A, Germani J.C, Van Der Sand S. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010; 26: 1847-1856.

Sánchez S, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Avalos M, Guzmán-Trampe S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Ruiz B. Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot (Tokyo)*. 2010 ; 63(8): 442-459. doi: 10.1038/ja.2010.78.

Sandovsky-Losica H, Shwartzman R, Lahat Y, Segal E. Antifungal activity against *Candida albicans* of nikkomycin Z in combination with caspofungin, voriconazole or amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; letters. 635-537. doi:10.1093/jac/dkn216.

Sanglard D, Odds F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(2): 73-85.

Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 ; 49(2):668-679.

Saurav K, Kannabiran K. Diversity and Optimization of process parameters for the growth of *Streptomyces VITSVK9* spp. isolated from Bay of Bengal, India. *J of Natural and Environmental Science*. 2010; 1(2): 56-65.

Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the Neglected Diseases Initiative. *Trends Parasitol*. 2006; 22(5):203-208.

Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B.I, Flandrois J.P. Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Edition. 1999. ISBN-10: 2804115925

Schlecht L.M, Peters B.M, Krom B.P, Freiberg J.A, Hänsch G.M, Filler S.G, Jabra-Rizk M.A, Shirtliff ME. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. Microbiology. 2015; 161(1): 168-181. doi: 10.1099/mic.0.083485-0.

Seddiki S.M.L, Boucherit K, Boucherit Z. Contamination des cathéters vasculaires et des sondes urinaires par des levures de *Candida albicans* prélevées des patients : formation des biofilms et résistance à l'amphotéricine B. Association africaine de microbiologie et d'hygiène alimentaire. MHA (Sousse) A. 2010 ; 22(63) : 40-45. ISSN : 0330-8030.

Seghir A, Boucherit-Otmani Z, Belkherroubi-Sari L, Boucherit K. Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen : épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. Journal de Mycologie Médicale. Article in Press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.08.005>

Selvameenal L, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. Indian J Pharm Sci. 2009 ; 71(5): 499-504. doi: 10.4103/0250-474X.58174.

Seneviratne C.J, Jin L, Samaranayake L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral diseases 2008; 14 : 582-590.

Sevcikova B, Kormanec J. 2004. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3 (2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. Arch. Microbiol. 181: 384-389.

Shapiro R.S, Zaas A.K, Betancourt-Quiroz M, Perfect J.R, Cowen L.E. The Hsp90 co-chaperone Sgt1 governs *Candida albicans* morphogenesis and drug resistance. PLoS One. 2012 ;7(9):e44734. doi: 10.1371/journal.pone.0044734.

Shawn R. Lockhart. Current Epidemiology of *Candida* Infection. Clin Microbiol. 2014; 36(17) : 131-136.

Sheikh N, Jahagirdar V, Kothadia S, Nagoba B, Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. Eur J Gen Med. 2013; 10(4): 254-258.

Shirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol. 1966; 16: 313-340.

Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek. 1957; 23(1): 15-22.

Sigee D. Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in aquatic Environment. Wiley Edition. 2005. ISBN: 978-0-471-48529-2.

Singh M.P, Petersen P.J, Weiss W.J, Janso J.E, Luckman S.W, Lenoy E.B, Bradford P.A, Testa R.T, Greenstein M. Mannopeptimycins, new cyclic glycopeptide antibiotics produced by *Streptomyces hygroscopicus* LL-AC98: antibacterial and mechanistic activities. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(1): 62-9.

- Singh N, Agrawal V, Pemmaraju S.C, Panwar R, Pruthi V. impact of infectious *Candida albicans* biofilm on biomaterials. Indian J of Biotech. 2011; 10: 417-422.
- Solanki R. Khanna M. Lal R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. Indian J Microbiol 2008; 48: 410-431.
- Soll DR. Why does *Candida albicans* switch? FEMS Yeast Res 2009; 9:973-89; PMID:19744246; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00562.x>
- Spadari C, Antunes T, Teixeira R, Minotto E, Fuentefria A.M, Van Der Sand S. Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance. Brazilian Journal of Biosciences. 2013 ; 11(4) : 439-443.
- Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. Biomed Res Int. 2013; 2013:1-13. doi: 10.1155/2013/204237.
- Srikantha T, Soll D.R. A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. Gene. 1993; 131(1): 53-60.
- Stackebrandt E, Rainey F.A, Ward-Rainey N.L. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria classis* nov. International journal of Systematic Bacteriology, 1997; 47(2): 479-491.
- Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*- an enigmatic developmental programme. Mycoses. 2007; 50(1): 1-12.
- Stora G., Evolution des peuplements benthiques d'un étang marin soumis à un effluent d'eaux douces. Bull. Ecol, 1976 ; 7 (3) : 275-282.
- Suthindhiran K, Kannabiran K. Diversity and exploration of bioactive marine actinomycetes in the Bay of Bengal of the Puducherry coast of India. Indian J Microbiol. 2010; 50(1): 76-82.
- Suthindhiran K, Kannabiran K. Hemolytic activity of *Streptomyces* VITSDK1 spp. isolated from marine sediments in Southern India. Journal de mycologie médicale. 2009 ; 19(2): 77–86.
- Swan B.K, Ehrhardt C.J, Reifel K.M, Moreno L.I, Valentine D.L. Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. Appl.Environ.Microbiol. 2010; 76: 757–768. doi: 10.1128/AEM.02409-09.
- Takano E. Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(3): 287-94.
- Takano E. γ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. Current Opinion in Microbiology. 2006 ; 9: 287–294.
- Talarmin J.P, Boutoille D, Tattevin P, Dargère S, Weinbreck P, Ansart S, Chennebault J.M, Hutin P, Léautez-Nainville S, Gay-Andrieu F, Raffi F, le Gericco. Épidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. Médecine et maladies infectieuses. 2009 ; 39 : 877–885.

- Tamehiro N, Hosaka T, Xu J, Hu H, Otake N, Ochi K. Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(11): 6412-6417.
- Tawara Y, Honma K, Naito Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. Bull Tokyo Dent Coll. 1996; 37: 119-128.
- Thakur D, Bora T.C, Bordoloi G.N, Mazumdar S. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. Journal de Mycologie Médicale. 2009 ; 19 : 161—167.
- Thakur D, Yadav A, Gogoi B.K, Bora T.C. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. Journal de Mycologie Médicale. 2007 ; 17 : 242-249.
- Thumar J.T, Singh S.P. Secretion of an alkaline protease from a salt- tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. Brazilian Journal of Microbiology. 2007 ; 38: 766-772.
- Thumar J.T, Singh S.P. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. Brazilian Journal of Microbiology. 2007; 38(4): 766–772.
- Tian S, Yang Y, Liu K, Xiong Z, Xu L, Zhao L. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardopsis terrae* YIM 90022. Nat Prod Res. 2014; 28(5): 344-346. doi: 10.1080/14786419.2013.858341.
- Timsit J.F, Cheval C, Gachot B, Bruneel F, Wolff M, Carlet J, Regnier B. Usefulness of a strategy based on bronchoscopy with direct examination of bronchoalveolar lavage fluid in the initial antibiotic therapy of suspected ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Med. 2001; 27: 640-647.
- Tiquia S.M, Davis D, Hadid H, Kasparian S, Ismail M, Ahly S, Shim J, Singh S, Murray K.S. Halophilic and Halotolerant Bacteria from River Waters and Shallow Groundwater Along the Rouge River of Southeastern Michigan. Environmental Technology. 2007; 28(3): 297-307.
- Tiwari K., Gupta R. K. Rare actinomycetes: A potential storehouse for novel antibiotics. Crit. Rev. Biotechnol. 2012; 32 : 108–132 doi : 10.3109/07388551.2011.562482.
- Tobudic S, Kratzer C, Presterl E. Azole-resistant *Candida* spp. – emerging pathogens. Mycoses. 2012 ; 55(1) : 24–32.
- Trek Diagnostic systems. SENSITITRE® YEASTONE® à utiliser pour le diagnostic in vitro. P34-42.
http://www.mcstdiagnostics.com/site/upload/file/pdf/yo_8_yo10_v1.4_e.pdf
- Tresner H.D, Backus E.J. System of color wheels for streptomycete taxonomy. Appl Microbiol. 1963; 11:335-338.
- Tresner H.D, Davies M.C, Backus E.J. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. J Bacteriol. 1961; 81: 70-80.
- Tresner H.D., Danga F. Hydrogen sulfide production by *Streptomyces* as a criterion for species differentiation. J Bacteriol. 1958; 76(3): 239–244.

- Tresner H.D., Hayes J.A., Backus EJ. Differential tolerance of streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic aid. *Appl Microbiol.* 1968; 16(8): 1134-1136.
- Valan Arasu M, Asha K.R.T, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, Agastian P. Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments: Bay of Bengal India. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2(10): 803–810.
- Valan Arasu M, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil. *Journal de Mycologie Médicale.* 2009 ; 19: 22—28.
- Valanarasu M, Kannan P, Ezhilvendan S, Ganesan G, Ignacimuthu S, Agastian P. Activité antifongique et insecticide de produits extracellulaires de *Streptomyces* sp. ERI-04 isolé du Ghats Occidental du Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale.* 2010; 20: 290-297.
- Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, Abele-Horn M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis.* 2008; 7: 123-127.
- Van Wezel G.P, Krabben P, Traag B.A, Keijser B.J, Kerste R, Vijgenboom E, Heijnen J.J, Kraal B. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(8): 5283-5288. Erratum in: *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(10): 6863.
- Vanajakumar, Selvakumar N, Natarajan R. Antagonistic properties of actinomycetes isolated from mollusks of the porto Novo region, south india; in bioactive compounds from marine organisms, edited by M Thompson et al (Oxford And IBH publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi) 1995 ; 267-274.
- Varalakshmi T, Sekhar K.M, Bramhanandha Charyulu P.B. Taxonomic Studies and Phylogenetic Characterization of Potential and Pigmented Antibiotic Producing Actinomycetes Isolated From Rhizosphere Soils. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2014 ; 4(6) : 512-519. ISSN - 0975-1491.
- Vaubourdolle M. *Infectiologie. Le Moniteur Internat* Edition 3ème édition. 2007. ISBN-978-2-915585-40-7.
- Vazquez J.A. Management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients with HIV infection. *HIV Ther.* 2010 ; 4(3) : 1–19. ISSN 1758-4310.
- Vengadesh prabhu K, Sundaramoorthi C, Saurabh G, Karthick K, Tamilselvi N. Production and characterization of antibiotics from soil-isolated actinomycetes. *International Research Journal of Pharmacy.* 2011; 4: 114-118.
- Viguié-Vallanet C. Les mycoses génitales Vulvo-vaginal candidiasis. *Correspondances en pelvi-périnéologie.* 2005 ; 5(1) : 20-27.
- Vimal V, Rajan B.M, Kannabiran K. Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardiosis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian J of Med Sciences.* 2009; 1(2): 57-63.

Walstad, D.L., Reistz, R.C. and Sparling, P.F. Growth inhibition among strains of *Neisseria gonorrhoeae* due to production of inhibitory free fatty acids and lysophosphatidyl ethanol amine: absence of bacteriocins. *Infect Immun.* 1974; 10: 481–488.

Wang J, Soisson SM, Young K, Shoop W, Kodali S, Galgoci A, Painter R, Parthasarathy G, Tang YS, Cummings R, Ha S, Dorso K, Motyl M, Jayasuriya H, Ondeyka J, Herath K, Zhang C, Hernandez L, Allocco J, Basilio A, Tormo JR, Genilloud O, Vicente F, Pelaez F, Colwell L, Lee SH, Michael B, Felcetto T, Gill C, Silver LL, Hermes JD, Bartizal K, Barrett J, Schmatz D, Becker JW, Cully D, Singh SB. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature.* 2006 ; 441(7091):358-361. doi:10.1038/nature04784

Wang X, Huang L, Kang Z, Buchenauer H, Gao X. Optimization of the Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015T. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2010 : 141876. doi:10.1155/2010/141876

Wang Z.X, Zhuge J, Fang H, Prior B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv.* 2001; 19(3): 201-223.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173(2): 697-703.

Willey J.M, Sherwood L, Woolverton C.J. Prescott's Principles of Microbiology. McGraw-Hill Higher Education. 2008. ISBN-9780073375236.

Williams S.T, Davis F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of Actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol.* 1965; 38: 251-261.

Williams S.T, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E.M.H, Sneath P.H.A, Sackins M. J. Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Journal of General Microbiology*, 1983; 129: 1743-1813.

Wisplinghoff, H, Bischoff T, Tallent S.M, Seifert H, Wenzel R.P, Edmond M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004 ; 39: 309-317.

Wu X.C, Chen W.F, Qian CD, Li O, Li P, Wen Y.P. Isolation and identification of newly isolated antagonistic *Streptomyces* sp. strain AP19-2 producing chromomycins. *J Microbiol.* 2007; 45(6): 499-504.

www.ramsar.org

Xin L, Hui-Ying Y. Purification and characterization of an extracellular esterase with organic solvent tolerance from a halotolerant isolate, *Salimicrobium* sp. LY19. *BMC Biotechnol.* 2013; 13: 108. doi: 10.1186/1472-6750-13-108.

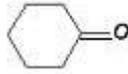
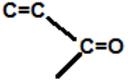
Xiong L, Li J, Kong F. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. *Lett Appl Microbiol.* 2004; 38(1): 32-7.

Xu D.B, Ye W.W, Han Y, Deng Z.X, Hong K. Natural Products from Mangrove Actinomycetes. *Mar. Drugs* 2014; 12(5): 2590-2613. doi:10.3390/md12052590.

- Xu P, Li W.J, Tang S.K, Gao H.Y, Xu L.H, Jiang C.L. *Streptomyces daliensis* sp. nov. from soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006; 89(1): 71-78.
- Xu Z, Xia J, Feng X, Li S, Xu H, Bo F, Sun Z. Genome sequence of *Streptomyces albulus* PD-1, a productive strain for epsilon-poly-L-lysine and poly-L-diaminopropionic acid. *Genome Announc*. 2014; 2: e00297–14.
- Yuan G.J, Li P.B, Yang H, Wu X.Y, Tu G.Q, Wei S.J. Chemical screening of sixty-one actinomycete strains and anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* assays of target strains. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2012; 10(2): 155–160.
- Yuan L.J, Zhang Y.Q, Guan Y, Wei Y.Z, Li Q.P, Yu L.Y, Li W.J, Zhang Y.Q. *Saccharopolyspora antimicrobica* sp. nov., an actinomycete from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58(5): 1180-1185. doi: 10.1099/ijs.0.65532-0.
- Yuan L.J, Zhang Y.Q, Guan Y, Wei Y.Z, Li Q.P, Yu L.Y, Li W.J, Zhang Y.Q. Metabolites from Marine *Streptomyces* sp. VITBRK2. *Int J Mol Cell Med*. 2014; 3(3): 130-137.
- Zaoutis T.E, Argon J, Chu J, Berlin J.A, Walsh T.J, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: 1232–1239.
- Zhang J. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Modern Applied Science*. 2011 ; 5(2): 124-127.
- Zhao K, Penttinen P, Guan T, Xiao J, Chen Q, Xu J, Lindström K, Zhang L, Zhang X, Strobel G.A. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Curr Microbiol*. 2011; 62(1):182-90. doi: 10.1007/s00284-010-9685-3.
- Zheng Z, Zeng W, Huang Y, Yang Z, Li J, Cai H, Su W. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 ; 188(1): 87-91.
- Zhu H-H., Guo J., Yao Q., Yang S-Z., Deng M-R., Phuong L.T.B., Hanh V.T., Ryan M.J. *Streptomyces vietnamensis* sp. nov., a streptomycete with violet–blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; 57 : 1770–1774.
- Zilberberg M.D, Shorr A.F, Kollef M.H. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 ; 29: 978-80.
- Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. *Nocardiosis and Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*. 2005 ; 156 : 984–993.
- Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J Biotechnol*. 2012; 158(4): 168-175. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.002.
- Zou X, Hang H.F, Chua J, Zhuang Y.P, Zhang S.L. Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372 m³ scale. *Bioresource Technology*. 2009; 100 (3) : 1406–1412.

Annexes

Annexe n°1 : absorption caractérisant certains groupes fonctionnels (Mesplède, 2003)

Groupe fonctionnel	Domaine de nombre d'onde en cm^{-1}	intensité	Groupe fonctionnel	Domaine de nombre d'onde en cm^{-1}	intensité
Alcanes			Aldéhydes		
C—H	2850 – 2962	i, m	C=O	1720 – 1740	i
—CH(CH ₃) ₂	1380 – 1385	i	C—H	2695 – 2700	m
	et 1365 - 1370	i		et 2700 – 2800	
Alcènes			Cétones		
C—H	3010 – 3095	m	C=O	1650 - 1730	i
C=C	1630 – 1670	f		1719	i
C—H:				1746	i
R ₂ C=CH ₂	985 – 1000	i		1670 - 1700	i
	et 905 – 920	i			
Esters			Acides		
C—O	1230 – 1260	m	C—O	1075 – 1190	m
C=O	1735 – 1750	i	C=O	1740 – 1800	i
			O—H	≈ 3000	large, i

Divers			Alcools- phénols		
C—Br	500 – 600		O-H libre	3590 – 3650	
C—Cl	600 – 800		O—H lié	3300 – 3550	
			C—O (Ire)	1000 – 1075	
			(IIre)	1075 – 1150	
			(IIIre)	1100 – 1200	
			(phénol)	1180 - 1260	
Amines			Ethers		
N—H	3300 - 3500		C—O	1250 - 1060	

i : intense

f : faible

m : moyenne

L-tyrosine							0,5 g								
Citrate d'ammonium ferrique						0,5 g									
Thiosulfate de sodium						0,08 g									
KH ₂ PO ₄								2,38 g			0,5 g				
KNO ₃											1g				
(NH ₄) ₂ SO ₄				2 g				2,64 g							
CaCl ₂ H ₂ O														0,1 g	
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O								5,65 g							
NaCl				1 g			0,5 g		2 g		0,5 g		0,5 g	5 g	
Solution Standard A			1 ml	1 ml	1 ml		1 ml								
Solution Standard B								1 ml							
Pomme de terre (tranches)										150 g					
Carottes (tranches)										30 g					
Extrait de riz déshydraté															2,5 g
Tween 80															10 ml
pH	7,2	7,3	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,0	7,2	6,5	7,2	7,2	7,4	7,4	6,6
agar	20 g	20 g	18 g	20 g	20 g	15 g	20 g	15 g	18 g	20 g	30 g	20 g	12 g	20 g	10 g

Annexes n° 3: composition de la solution standard A (Shirling et Gottlieb, 1966)

FeSO ₄ ,7H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ ,4H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0.1 g
Eau distillée	1000 ml

Annexes n° 4: composition de la solution standard B (Shirling et Gottlieb, 1966)

CuSO ₄ ,5H ₂ O	0.64 g
FeSO ₄ ,7H ₂ O	0.11 g
MnCl ₂ ,4H ₂ O	0.79 g
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0.15 g
Eau distillée	1000 ml

« A partir du moment où il est né jusqu'à ce qu'il meurt, l'homme est soumis à l'activité des microbes, certains attaquent son corps, ses récoltes, ses animaux domestiques, ainsi que toutes les formes de vie sauvages, d'autres détruisent ses vêtements, ses habitations, et assaillir pratiquement tout ce que l'homme civilisé est venu à dépendre dans sa vie quotidienne, ce sont les microbes nuisibles, comprenant les saprophytes et les parasites.

En revanche, beaucoup de microbes, notamment ceux qui habitent la terre sous nos pieds et les rivières, les lacs et les mers autour de nous, rendent possible la poursuite des formes de vie supérieures en retournant les éléments nutritifs indispensables à la circulation et à travers d'autres procédés innombrables ; ... beaucoup de microbes sont utilisés dans une variété de procédés industriels essentiels, ce sont les microbes bénéfiques.

Ces dernières années, nous avons appris à domestiquer les nouveaux types de microbes, notamment celles qui produisent des substances chimiques, appelées les antibiotiques, qui ont la capacité de détruire les microbes pathogènes sans blesser l'hôte. »

Selman A. Waksman Décembre, 1952. Discours Prix Nobel de physiologie ou médecine

« Certains experts disent que nous allons revenir à l'ère pré-antibiotique. Non, ce sera une ère post-antibiotique. En termes de nouveaux antibiotiques, le chemin semble s'arrêter, une ère post-antibiotique signifie en effet la fin de la médecine moderne que nous connaissons, les choses communes comme une angine streptococcique ou encore le genou écorché d'un enfant pourraient tuer à nouveau. »

Margaret Chan (directrice générale de l'Organisation mondiale de la santé)

Résumé

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la recherche de molécules bioactives à partir d'actinomycètes isolées au niveau des eaux du lac El Mellah (Parc National d'El Kala). Le screening de l'activité antimicrobienne des souches isolées effectuée avec la technique des stries croisée a donné 20 souches possédant une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* nosocomiales et *Candida albicans* nosocomiales du CHU Ibn Sina (Annaba, Algérie) et l'Hôpital de la Timone (Marseille, France). La caractérisation des souches actives sur les organismes testés a été effectuée en étudiant les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Parmi cela, trois souches performantes ont été choisies comme souches représentatives pour l'étude de leurs activités antifongiques en milieu liquide (cinétique de production). L'identification moléculaire de la souche E65, et la réalisation d'un arbre phylogénétique qui met en évidence la distance phylogénétique de la souche avec les autres souches du genre *Streptomyces* apparentés, les résultats ont montré l'appartenance de cette souche à l'espèce *Streptomyces yatensis* souche type NBRC 101000 (numéro d'accèsion Genbank AB249962). Et enfin, l'extraction des molécules bioactives produites par la souche E65 par le dichlorométhane, les techniques chromatographiques (CCM, chromatographie bidimensionnelle) et spectroscopiques (spectroscopie UV-Visible et spectroscopie Infrarouge) indiquent que la molécule produite est de nature non-polyénique, la comparaison de son spectre infrarouge avec les antifongiques actuellement commercialisés et avec ceux qui sont connus pour être produits par le genre *Streptomyces* suggère fortement l'appartenance à une nouvelle molécule.

Mots clés : Actinomycètes, lac El Mellah, Parc National d'El Kala, activité antifongique.

Abstract

In this study, we were interested looking for bioactive molecules produced by actinomycetes isolated from water samples of the Mellah Lake (National Parc of El Kala). The screening of the antimicrobial activity of the isolates performed with the cross-streak technique gave 20 strains that showed activity against nosocomial *Staphylococcus aureus* and nosocomial *Candida albicans* from The Hospital "la Timone" (Marseille, France) and from The Hospital "Ibn Sina" (Annaba, Algeria). The characterization of the active strains was made by studying morphological, physiological and biochemical characters. Among that, three high-performance stains were chosen as representative strains for the study of the time course of their antifungal activities against nosocomial *Candida albicans* on three liquid medium. The molecular identification of the E65 strain was made by extraction and sequencing of his rDNA 16S and the phylogenetic tree showed that was related to *Streptomyces yatensis* type strain NBRC 101000 (accession Genbank AB249962). Finally, the extraction of the bioactive molecule produced by the E65 strain given with dichloromethane, the chromatographic and spectral methods indicated a non polyenic structure, the comparison with antifungals known to be produced by all *Streptomyces* strains strongly suggest the presence of a new metabolite.

Key words: Actinomycetes, Mellah lake, National Park of El Kala, antifungal activity.