



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE : AMELIORATION GÉNÉTIQUE DES PLANTES

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
En MICROBIOLOGIE
Option : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THEME

Les actinomycètes producteurs de molécules
bioactives

Présentée par: M^{lle}. OUARGLI Moufida

Directrice de thèse : Mme. KIRANE-GACEMI Djamilia Professeur, Université d'Annaba

Co- Directrice de thèse : Mme. MANSOURI Roukaya Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : M. CHEKIREB Djamel Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : Mme. AOUN Leila Professeur, Université d'El Tarf

M. AYACHI Ammar Professeur, Université de Batna

M. MECHAI Abdelbasset MCA, Université de Tébessa

« La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre »

ALBERT EINSTEIN (1879-1955)

Remerciements

Ce travail a été effectué au Département de Biochimie à l'Université Badji Mokhtar Annaba.

Remercions tout d'abord Le Bon Dieu Le Tout Compatissant, Le Tout Miséricordieux de m'avoir donné la force pour réaliser ce travail.

L'achèvement de cette thèse de doctorat n'aurait pu voir le jour sans la collaboration de nombreuses personnes qu'il m'est agréable de remercier :

Mes sincères remerciements vont d'abord au **Professeur GACEMI KIRANE DJAMILA**, mon encadreur, qui a dirigé ce travail avec compétence et a veillé à son bon déroulement, en m'apportant des critiques constructives et des conseils pertinents, et ce suite à l'intérêt qu'elle a accordé à mes travaux de recherches, pour sa confiance pour son aide, son encouragement, sa patience ainsi que pour sa bonté et ses conseils.

J'exprime toute ma reconnaissance au **Professeur MANSOURI ROUKAYA**, maître de conférences hospitalo-universitaire pour avoir accepté de co-diriger cette thèse, pour ses conseils et pour ses corrections.

Professeur CHEKIREB DJAMEL, de l'Université Badji Mokhtar, Annaba, de m'avoir fait l'honneur et un immense plaisir de présider le jury de ma soutenance.

Professeur AOUN LEILA, de l'Université Chadli Bendjedid, El Tarf, pour avoir accepté de faire partie du jury et de me faire l'honneur de critiquer ce travail.

Professeur AYACHI AMMAR, de l'Université Mustafa Ben Boulaid, Batna, pour m'avoir fait l'honneur de participer à la commission d'examen et de juger ce travail.

Professeur MECHAI ABDELBASSET, de l'Université Larbi Tébessi, Tebessa, pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au **Professeur DIDIER RAOULT**, directeur de l'unité des Rickettsies de la faculté de médecine, Université de la Méditerranée Marseille pour son bon accueil.

Mes vifs remerciements sont adressés à **Dr. VÉRONIQUE ROUX**, pour son aide, soutien moral et pour ses conseils concernant mes travaux et ses corrections.

Je remercie l'équipe du le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital de la Timone, Marseille, **Pr. RENAUD PIARROUX** et **Dr. STEPHANE RANQUE** et l'équipe de l'Institut de Chimie de Nice (ICN) - CNRS UMR 7272, Équipe Arômes Parfums Synthèse et Modélisation **Pr. XAVIER FERNANDEZ** et **Dr. THOMAS MICHEL** pour leur collaboration.

Un remerciement tout particulier à ma famille, spécialement mes parents pour leur inconditionnel soutien et leur foi en moi pour persévérer et atteindre au-delà.

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Partie 1 : Revue bibliographique

I. Les actinomycètes	7
1.1. Historique	7
1.2. Définition et caractéristiques principales	7
1.3. Écologie des actinomycètes	9
1.4. Taxonomie et identification des actinomycètes	10
II. Les Actinomycètes en biotechnologie.....	11
2.1. La production des insecticides et des molécules antiparasitaires par les actinomycètes.....	11
2.2. La production des bioherbicides par les actinomycètes.....	12
2.3. La production des enzymes par les actinomycètes	17
2.4. Production d'antibiotiques par les actinomycètes	20
2.5. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes	21
5.1. Influence des sources nutritionnelles.....	22
5.2. Influence du taux de croissance.....	22
5.3. Influence des conditions de culture	23
6. La zone humide du lac El Mellah d'El Kala.....	23
III. Étude du genre <i>Cryptococcus</i>	25
III. Morphologie de <i>Cryptococcus</i>	25
1. Morphologie macroscopique et microscopique.....	25
2. Ultrastructure.....	26
IV. Biotope	27
V. Reproduction.....	27
VI. La cryptococcose.....	29
VII. Les facteurs de virulences	30
1. Croissance à 37°C	30
2. Synthèse de mélanine	30
3. La capsule	31
4. Autres facteurs de virulence importants.....	31
VIII. Traitement de la cryptococcose	32
1. L'amphotéricine B (AmB)	32
2. Le 5-fluorocytosine	33
3. Les azolés.....	34
IX. Mécanismes de la résistance aux antifongiques	34

Partie 2 : Matériel et Méthodes

Objectif de travail	37
I. Études des actinomycètes	38
1. Présentation du site	38
2. Origine des actinomycètes	39
3. Étude morphologique	40
3.1. Caractères cultureux	40
3.2. Aspect macroscopique et microscopique.....	40
4. Étude physiologique.....	41
4.1. Production de pigments mélanoides.....	41
4.2. Hydrolyse de l'amidon	41
4.3. Hydrolyse de la gélatine.....	41
4.4. Hydrolyse de la caséine	41
4.5. Dégradation de la cellulose.....	42
4.6. Recherche de l'uréase	42
4.7. Recherche de la production d'indole	42
4.8. Croissance à différentes températures	42
4.9. Croissance à différents pH	42
4.10. Utilisation des composés glucidiques comme seuls source de carbone	43
4.11. Utilisation du citrate comme seul source de carbone	43
4.12. Utilisation d'acide aminé comme seul source d'azote	43
4.13. Sensibilité aux antibiotiques	43
4.14. Tests de sensibilité aux molécules chimiques	44
5. Étude biochimique	44
5.1. L'API 50CH.....	45
5.2. L'API 20 NE	45
5.3. L'API ZYM.....	45
6. Identification moléculaire	45
6.1. Polymérase chain reaction (PCR)	46
6.1.1. Extraction de l'ADN génomique	46
6.1.2. Protocole d'une PCR standard	47
6.2. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	49
6.2.1. Protocole de préparation de gel d'agarose	49
6.2.2. Électrophorèse de produits d'amplification	49
6.3. Séquençage.....	50
6.3.1. Purification.....	50
6.3.2. PCR BigDye.....	50
6.3.3. Purification par Sephadex.....	51
6.3.4. Séquençage.....	51
6.4. Analyse des séquences.....	51
II. Étude de Cryptococcus	52
1. Prélèvement pathologique	52

2.	Prélèvement environnemental.....	52
2.1.	Technique de prélèvement.....	54
2.1.1.	L'air atmosphérique.....	54
2.1.2.	La fiente des pigeons	54
2.1.3.	Les arbres des Eucalyptus	55
2.2.	Traitement des échantillons.....	55
3.	Identification	55
3.1.	Identification macroscopique et microscopique.....	55
3.2.	Identification biochimique	55
3.3.	Identification moléculaire.....	55
3.3.1.	Technique	55
4.	Étude de la sensibilité de <i>Cryptococcus</i> aux antifongiques par la méthode de dilution en milieu liquide à l'aide du kit Sensititre Yeast One	57
3.	Mise en évidence de l'activité antifongique	59
3.1.	Technique de la double couche.....	59
3.2.	Technique des cylindres d'agar	59
3.3.	Optimisation de conditions de production,	61
3.1.	Cinétique de production de métabolite	61
3.2.	Choix de solvant d'extraction	61
4.	Extraction des molécules bioactive	61
5.	Identification partielle des molécules bioactives.....	62
5.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM)	62
5.2.	Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	63
5.3.	Spectre UV-Visible	63

Partie 3 : Résultats et discussion

I.	Étude des actinomycètes	66
1.	Résultat des caractères morphologique.....	66
1.1.	Caractères culturaux	66
1.2.	Caractères macroscopiques et microscopiques	66
1.3.	Discussion	88
2.	Résultat des caractères physiologiques.....	88
2.1.	Production de pigment mélanoidé	88
2.2.	Résultats des tests enzymatiques.....	90
2.3.	Résultats des tests d'utilisation des composés glucidiques comme seuls source de carbone.....	91
2.4.	Résultats des tests d'utilisation des acides aminés comme source d'azote ..	92
2.5.	Croissance a différentes valeurs de températures	93
2.6.	Croissance a différentes valeurs de pH	93
2.7.	Sensibilité aux antibiotiques	94
2.8.	Sensibilité aux molécules chimiques.....	96
3.	Caractères biochimiques.....	96
4.	Discussion.....	99
5.	Identification moléculaire.....	112

II. Étude des <i>Cryptococcus</i>	116
1. Résultats des prélèvements environnementaux	116
2. Identification	116
2.1. Identification morphologique.....	116
2.2. Identification biochimique.....	120
2.3. Identification moléculaire.....	121
2.4. Étude de la sensibilité de <i>Cryptococcus</i> aux antifongiques.....	121
2.5. Discussion	122
III. Mise en évidence de l'activité antifongique	125
1. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	125
1.1. La technique du cylindre d'agar	125
1.2. La technique de double couche.....	125
1.3. Discussion	130
2. Optimisation de condition de production	131
2.1. Cinétique de production.....	131
2.2. Discussion	134
2.3. Choix du solvant et extraction de molécule bioactive.....	136
3. Identification partielle des molécules bioactives.....	137
3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	137
3.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	138
3.3. Spectre UV-visible des fractions.....	139
3.4. Discussion.....	141
Conclusion et perspective	143
Résumé	146
Références bibliographiques	149
Annexe	171

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNr 16S : acide désoxyribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

HPLC : Chromatographie Liquide a Haute Performance

DEDL : Détecteur Evaporatif a Diffusion De Lumière

DAD : Détecteur à barrettes de diodes

G+C: Guanine +cytosine (Coefficient de Chargaff).

GYEA : Glucose Yeast Extract Agar

ISP : l'International *Streptomyces* Project (milieu de culture).

LCR: liquide céphalorachidien

PCR : polymerase chain reaction

RA : retinaculum apertum

Rf : Rapport frontal.

RF : rectus flexibilis

S : spira

TBE :Tris-Borate-EDTA

TM : Tobramycine

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure n°1	coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivant (bleu et vert) et morts (blancs) montrant le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores	8
Figure n°2	aspect macroscopique	25
Figure n°3	aspect microscopique	25
Figure n°4	une représentation idéalisée d'une cellule de <i>C. neoformans</i> . Notez que la mélanine est trouvée dans la paroi cellulaire	26
Figure n°5	reproduction sexuée et fructification monocaryotique chez <i>Cryptococcus neoformans</i>	28
Figure n°6	structure chimique de l'amphotéricine B	32
Figure n°7	mécanisme d'action de l'AmB	33
Figure n°8	mode d'action de la 5-FC	33
Figure n°9	position géographique du lac El Mellah	39
Figure n°10	Principe de la Polymerase chain reaction (PCR) standard	48
Figure n°11	Sites de prélèvement des échantillons : a) Site de prélèvement hors l'agglomération : b) Site de prélèvement dans l'agglomération	53
Figure n°12	prélèvement de l'air atmosphérique par l'appareil SAS AIR SAMPLER Duo 360	54
Figure n°13	la plaque Sensititre Yeast One	58
Figure n°14	technique de double couche	60
Figure n°15	technique cylindre d'agar	60
Figure n°16	la voie métabolique du xylose	102
Figure n°17	résultats de l'électrophorèse des produits de la PCR des souches testées	112
Figure n°18	arbre phylogénétique basé sur les séquences ADN _r montrant les distances entre la souche <i>Streptomyces</i> E96 et les autres souches <i>Streptomyces</i> apparentées. Le nombre de substitution par position de nucléotide est de 0.005	113
Figure n°19	diamètre d'inhibition par technique de cylindre d'agar sur <i>C.neoformans</i> (clinique).	126

Figure n°20	diamètre d'inhibition par technique de cylindre d'agar sur <i>C.diffluens</i> (environnemental).	126
Figure n°21	diamètre d'inhibition par technique de cylindre d'agar sur <i>C.albidus</i> (environnemental).	126
Figure n°22	diamètre d'inhibition par technique de double couche sur <i>C.neoformans</i> (clinique).	127
Figure n°23	diamètre d'inhibition par technique de double couche sur <i>C.diffluens</i> (environnemental).	127
Figure n°24	diamètre d'inhibition par technique de double couche sur <i>C.albidus</i> (environnemental).	127
Figure n°25	cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E6	132
Figure n°26	cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E76g	132
Figure n°27	cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E165	133
Figure n°28	cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E182	133
Figure n°29	cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E96	134
Figure n°30	zone d'inhibition de l'extrait méthanolique	137
Figure n°31	photo de la révélation de la plaque CCM sous UV. (a) : 254nm ; (b) : 366nm.	138
Figure n°32	profils chromatographiques de l'extrait de la souche E96 après détection par absorbance en UV à 2 longueurs d'ondes et au DEDL	139
Figure n°33	spectre UV-visible des fractions F1, F2.	140
Figure n°34	spectre UV-visible des fractions F3, F4.	140

LISTE DES PLANCHES

Planche	Titre	Page
Planche n°1	aspect macroscopique et microscopique de la souche B1	68
Planche n°2	aspect macroscopique et microscopique de la souche B3	69
Planche n°3	aspect macroscopique et microscopique de la souche 20	70
Planche n°4	aspect macroscopique et microscopique de la souche 68	71
Planche n°5	aspect macroscopique et microscopique de la souche 87	72
Planche n°6	aspect macroscopique et microscopique de la souche 96	73
Planche n°7	aspect macroscopique et microscopique de la souche 127	74
Planche n°8	aspect macroscopique et microscopique de la souche 151	75
Planche n°9	aspect macroscopique et microscopique de la souche 159	76
Planche n°10	aspect macroscopique et microscopique de la souche 163	77
Planche n°11	aspect macroscopique et microscopique de la souche 177	78
Planche n°12	aspect macroscopique et microscopique de la souche 65	79
Planche n°13	aspect macroscopique et microscopique de la souche 76b	80
Planche n°14	aspect macroscopique et microscopique de la souche 76g	81
Planche n°15	aspect macroscopique et microscopique de la souche 165	82
Planche n°16	aspect macroscopique et microscopique de la souche 182	83
Planche n°17	aspect macroscopique et microscopique de la souche E6	84
Planche n°18	aspect macroscopique et microscopique de la souche E13	85
Planche n°19	aspect macroscopique et microscopique de la souche E14	86
Planche n°20	aspect macroscopique et microscopique de la souche E100	87
Planche n°21	résultat tests enzymatiques	107
Planche n°22	de croissance à différents pH et température	108
Planche n°23	résultats d'utilisation de composé glucidique	109
Planche n°24	résultats utilisation du citrate	110
Planche n°25	résultats de la sensibilité des actinomycètes aux antibiotiques	111
Planche n°26	aspect morphologique des isolats de <i>Cryptococcus</i>	117
Planche n°27	(suite) aspect morphologique des isolats de <i>Cryptococcus</i>	118
Planche n°28	(suite) aspect morphologique des isolats de <i>Cryptococcus</i>	119
Planche n°29	résultat teste d'activité en double couche	128
Planche n°30	(suite) résultat teste d'activité en double couche	129

LISTE DES TABLEAUX

Figure	Titre	Page
Tableau n°1	exemples de molécules bioactives produites par les actinomycètes et leurs activités	13
Tableau n° 2	les enzymes commercialement pertinentes produites par les actinomycètes	17
Tableau n°3	liste des enzymes industrielles produites par des actinomycètes et de leurs caractéristiques	18
Tableau n°4	exemple d'antibiotique produit par les actinomycètes	21
Tableau n°5	Liste des antibiotiques utilisés pour le profil des actinomycètes	44
Tableau n°6	composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards	47
Tableau n°7	les étapes de la PCR	49
Tableau n°8	programme de l'amplification de la PCR BigDye	50
Tableau n°9	<i>Cryptococcus</i> souche clinique	52
Tableau n°10	liste des amorces utilisées pour l'identification des <i>Cryptococcus</i>	56
Tableau n°11	caractéristiques de régions amplifiées	56
Tableau n°12	antifongiques utilisés et dilutions des plaques Sensititre Yeast One.	58
Tableau n°13	maxima d'absorbance de chromophores élémentaires en spectroscopie UV-Visible.	64
Tableau n°14	maxima d'absorbance des structures polyéniques en spectroscopie UV-Visible.	64
Tableau n°15	la couleur du mycélium aérien des isolats étudiés sur les cinq milieux de culture	67
Tableau n°16	production de pigment mélanoïde et pigment diffusible	89
Tableau n°17	résultats des tests enzymatiques	90
Tableau n°18	utilisation de composé glucidique	91
Tableau n° 19	utilisation des acides aminés	92
Tableau n°20	résultats de croissance des actinomycètes à différentes température	93
Tableau n°21	résultats de croissance des actinomycètes à différents pH	94
Tableau n°22	résultats du test de sensibilité des actinomycètes aux	95

	antibiotiques	
Tableau n°23	résultats de sensibilité aux molécules chimiques	96
Tableau n°24	résultats d'identification biochimique galerie API 50 CH	97
Tableau n°25	résultats d'identification biochimique galerie API 20NE	98
Tableau n°26	résultats d'identification biochimique galerie API ZYM	98
Tableau n°27	comparaison caractères physiologiques de <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. kasugaensis</i> et la E96	114
Tableau n° 28	caractère biochimique des <i>cryptococcus</i>	120
Tableau n°29	résultats antifongigramme des souches environnementales	121
Tableau n°30	résultats antifongigramme des souches cliniques	122
Tableau n°31	résultats test d'activité des souches par la technique cylindre d'agar sur <i>C.neoformans</i> (clinique)	169
Tableau n°32 :	résultats test d'activité des souches par la technique cylindre d'agar sur <i>C.diffluens</i> (environnemental).	169
Tableau n°33	résultats test d'activité des souches par la technique cylindre d'agar sur <i>C.albidus</i> (environnemental).	169
Tableau n°34	résultats test d'activité des souches par la technique de double couche sur <i>C.neoformans</i> (clinique).	170
Tableau n°35	résultats test d'activité des souches par la technique de double couche sur <i>C.diffluens</i> (environnemental).	170
Tableau n°36	résultats test d'activité des souches par la technique de double couche sur <i>C.albidus</i> (environnemental).	171
Tableau n°37	composition de la galerie 50 CH	172
Tableau n°38	composition de la galerie 20 NE	173
Tableau n°39	composition de la galerie ID32C	174
Tableau n°40	liste des antibiotiques utilisés	175

Introduction

Les bactéries de la famille des Actinomycètes sont des Gram-positives formant généralement des hyphes ramifiés et des spores asexuées. La chimie de leur paroi, en particulier celle du peptidoglycane, la séquence de l'ARNr 16S et la forte teneur en G+C de leur ADN (70%) sont également caractéristiques de cette famille, dont de nombreuses espèces jouent un rôle important au niveau de la minéralisation des sols et sont la source principale de métabolite secondaire biologiquement actif (**Ensign et al., 1993 ; Ait Barka E et al., 2016**).

Le métabolisme secondaire est l'ensemble des voies permettant la synthèse de petites molécules, non essentielles mais pouvant procurer un avantage sélectif dans certaines conditions. Le métabolisme secondaire est généralement opposé au métabolisme primaire qui regroupe l'ensemble des voies cataboliques et anaboliques indispensables à la survie et à la reproduction de la cellule. Il existe une grande variété de métabolites secondaires pouvant avoir des structures chimiques diverses et complexes et de très nombreuses activités biologiques (**Drago Haas, 2015**).

Les bactéries de la famille des Actinomycètes retiennent particulièrement notre attention et semblent être d'excellentes candidates productrices de substances aux propriétés intéressantes. Ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol et l'eau où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases et les gélatinases. Il existe une réelle demande au niveau industriel pour des enzymes d'origine microbienne afin d'améliorer certains procédés de fabrication. Les domaines d'application enzymatiques sont très divers: industrie textile (décoloration de jeans), papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier), dépollution (attaque des substances phénoliques), industrie alimentaire (boulangerie). quelques espèces sont capables de dégrader ou de transformer certaines toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et réduire ainsi leur teneur dans les produits alimentaire (**Holzappel et al., 2001 ; Ait Barka E et al., 2016**).

La grande diversité métabolique des actinomycètes leur confère parfois certaines propriétés inhabituelles (**Brown, 1995; Davidson, 1995**). Les actinomycètes ont été exploités commercialement pour la production de produits pharmaceutiques, d'enzymes, d'agents antitumoraux, d'inhibiteurs enzymatiques, d'antibiotiques et d'antifongiques. Ces composés bioactifs ont une grande valeur commerciale et, par conséquent, les actinomycètes sont régulièrement criblés pour la production de nouveaux composés bioactifs (**Neelu N et al., 2013**).

L'importance du grand répertoire d'enzymes provenant d'actinomycètes et de leur potentiel dans le remplacement des catalyseurs chimiques est discutée. La commercialisation réussie de ces enzymes est une étape importante vers la révolution de la «technologie verte». La réduction du coût de la production d'enzymes est démontrée par la production d'endoglucanases de *Streptomyces sp.* Sur des substrats peu coûteux. De telles initiatives de production à faible coût peuvent être étendues à d'autres enzymes et métabolites (**Divya P et al., 2013**)

Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent 50 % de la population totale des actinomycètes du sol et 75 % des molécules à activité antibiotiques et antifongiques sont produites par ce genre (**Larpent et al., 1989**).

L'incidence des infections fongiques invasives a significativement augmenté au cours des vingt dernières années. Ceci est dû en partie au nombre croissant de patients à risque, bénéficiant d'antibiotiques à large spectre et/ou immunodéprimés par les traitements antinéoplasiques, immunodépresseurs (maladies auto-immunes, greffes) et chez lesquels le pronostic de l'infection fongique reste sombre (**Goodwin ML, 2008 ;Kuo F, 2009**).

La thérapeutique antifongique demeure était assez décevante en raison notamment de la toxicité, de l'instabilité et de la faible solubilité des antifongiques commercialisés (**Betina, 1983 ; Bouti K, 1997**). Cependant, le grand nombre de présentations consacrées à de nouveaux agents antifongiques à mode d'action différent suggère que le traitement des infections fongiques connaîtra d'importants changements au cours des prochaines années (**Dismukes, 2000**).

Pour cela et en premier lieu, la biodiversité est exploitée. L'isolement de *Streptomyces* à partir d'écosystèmes inexploités permet éventuellement, la découverte de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé (**Groth et al., 1999 ; Rajan et Kannabiran, 2010**). En plus, l'utilisation de cibles résistantes aux antifongiques comme germes tests peut conduire à la découverte de molécules efficaces qui peuvent être nouvelles (**Rajan et Kannabiran, 2010**).

Les cryptococcoses sont des mycoses cosmopolites affectant principalement les immunodéprimés. Les formes cliniques sont multiples, tous les organes peuvent être envahis mais les formes pulmonaire et cérébro-méningée sont les plus communes causant des neuroméningites mortelles. Leur traitement est difficile, en raison de l'absence d'antifongiques à la fois efficaces et non toxiques. De plus, la résistance de ces levures aux agents antifongiques est un facteur limitant leur éradication. Cette résistance est plus importante dans le cas des biofilms (**Mehiaoui S, 2011**).

Cryptococcus est une levure environnementale qui peut se reproduire de forme sexuée ou asexuée, et ne dépend pas de l'infection des animaux pour la reproduction. On le trouve parfois dans les fientes de moineaux, perdrix, serin, canari, poules, aigles et les pigeons. Les fruits et le lait peuvent également le véhiculer. Malgré l'existence saprophyte, le genre *Cryptococcus* particulièrement l'espèce *C. neoformans* a une remarquable capacité d'infecter et de provoquer la maladie chez une grande variété d'animaux hôtes, y compris les mammifères, les insectes et les oiseaux. La présence d'une capsule polysaccharidique est considérée comme principale facteur de virulence de cette levure, ce qui augmente son invasivité, sa pathogénicité, et lui attribue une résistance à l'environnement et l'hôte. Étant donné que la virulence est un phénotype complexe qui est presque toujours maintenue à la suite de la sélection, l'origine et le maintien de la virulence chez les micro-organismes vivant dans le sol et l'environnement tels que *Cryptococcus* est encore mystérieux. L'existence d'un système génétique et des facteurs de virulence bien définies associées à la disponibilité d'excellents modèles animaux fait de cette levure un système modèle attractif pour l'étude de la sensibilité de cette levure aux antifongiques et comme souche tests pour découvrir de nouvelles molécules (**Casadevall A., 1998; Steenbergen J N., 2003 ; Levitz SM, 2006; Gullo F. P. et al., 2013**).

Les *Cryptococcus* sont sensible à l'amphotéricine B, utilisé en association avec la 5-fluorocytosine. Cependant, la toxicité et le coût élevés de l'amphotéricine B limitent son utilisation. Le fluconazole est de ce fait le traitement de première intention. Les informations sur la résistance des *Cryptococcus* au fluconazole sont controversées, néanmoins, de nombreux échecs thérapeutiques ont été observés, avec des cas de rechute dans une période de moins de 6 mois après l'initiation du traitement (**Sar et al., 2004**).

Les mycoses sont des affections fréquentes dont l'impact pour la santé humaine est loin d'être négligeable. Pour lutter contre ces affections, l'arsenal thérapeutique demeure réduit. Cette situation est d'autant plus préoccupante que la pression de sélection exercée par les antifongiques administrés aux patients ou dispersés dans l'environnement conduit inéluctablement à l'émergence d'isolats résistants (**Guillot J. et Dannaoui E., 2015**). Devant ce constat alarmant et malgré la découverte de ces nombreuses substances antifongiques certaines sont peu efficaces, d'autres sont très chères. En outre, les problèmes de résistances limitent l'utilisation de plusieurs d'entre eux.

Dans le but d'étudier la biodiversité, la taxonomie ainsi que les molécules bioactives naturellement produite par ces actinomycètes, plusieurs recherches sur plusieurs sites : lac Oubeira, lac El Mellah, lac Fetzara, ont été dirigé par Pr. GACEMI KIRANE D. Ce thème

original entre dans le cadre de l'exploitation et la valorisation de la biodiversité actinomycétienne des zones humides d'importance internationale dans la région méditerranéenne.

Les résultats obtenus par les études réalisées par cette équipe sont prometteurs (**Loucif L, 2006 ; Morakchi et al., 2009 ; Morakchi et al., 2011 ; Ayari et al., 2012 ; Alliouch-Kerboua et al., 2015 ; Benouagueni et al., 2016 ; Ayari et al., 2016**) et ont incité à poursuivre les efforts de recherche dans cette thématique afin de sélectionner des espèces douées d'activités biologiques intéressantes pouvant être exploitées en bioindustries

À ce titre, les travaux de recherche de la présente thèse s'inscrivent dans le cadre de l'étude des actinomycètes isolées et conservées des eaux du lac El Mellah (parc national El Kala) producteurs de molécules bioactives.

Dans la présente étude, nous rapportons pour la première fois l'application de l'activité antifongique des actinomycètes sur le genre *Cryptococcus*. Ce genre de levure possède un facteur de virulence et de résistance très important : la capsule. Cela accentue notre travail car jusqu'à 2011 aucun travail de l'activité antifongique des actinomycètes sur les levures encapsulées n'a été publié en Algérie.

La première partie concerne l'étude de la biodiversité, la taxonomie ainsi que les molécules bioactives produites par les isolats d'actinomycète. Cette partie a été réalisée dans le laboratoire d'amélioration génétique des plantes : équipe eau, sol et microorganisme sous la direction du **Pr. Djamil Gacemi Kirane** avec la collaboration de l'Unité des Rickettsies de la faculté de médecine, Université de la Méditerranée (Marseille), sous la direction de **Dr. Véronique Roux**.

La deuxième partie, nous sommes intéressés à l'étude du genre *Cryptococcus*. L'isolement, l'identification ainsi que l'étude de la sensibilité des isolats vis-à-vis des antifongiques ont été effectués en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Ibn Sina, Annaba, Algérie sous la direction du **Pr. Roukaya Mansouri** et le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital de la Timone, Marseille, France sous la direction de **Pr. Renaud Piarroux** et **Dr. Stéphane Ranque**.

La troisième partie concerne la mise en évidence de l'activité antifongique des isolats des actinomycètes, une extraction des molécules antifongiques a été réalisée suite à une optimisation de condition de production. La caractérisation de l'extrait antifongique a été effectuée en collaboration avec l'institut de Chimie de Nice (ICN) - CNRS UMR 7272, Equipe Aromes Parfums Synthèse et Modélisation sous la direction de **Pr. Xavier Fernandez** et **Dr. Thomas Michel**.

Partie bibliographique

III. Les actinomycètes

1. Historique :

Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des Actinomycètes. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1900. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol, avec les travaux de **Kraisky**, de **Cohn**, de **Waksman** et de **Curtis**.

C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de **Waksman**, de **Lieske**, de **Krassilnikov** entre autre. La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de **Selman Waksman** lui est indissolublement lié (**Le minor, 1989**).

2. Définition et caractéristiques principales

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (**Eunice et Prosser, 1983**) constituées d'hyphes c'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983**). Cela explique leur dénomination « Actinomycètes ». Du Grec aktino, mycetes « champignons à rayons » ou champignons rayonnant. (**Gottlieb, 1973**).

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des *Actinomycetales* (**Mariat et Sebald, 1990**). Certains représentants de ces actinomycètes, surtout parmi les aérobies, ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (**Gazenko et al., 1998 ; Hirvonen et al., 1997**) et aussi de leur morphologie, parfois fungoïdes : filaments ramifiés, organes de sporulation etc... (**Becker et al., 1965 ; Reponen et al., 1998**).

Les bactériologistes considéraient les actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes les considéraient comme des champignons, (**Gottlieb, 1973**). Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (**Becker et al., 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981**). Leurs propriétés chimiques, physiologiques immunologiques, les rangent parmi les procaryotes (**Williams et al., 1973**). Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des Bactéries (**Lechevalier et Lechevalier, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990**).

Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont, pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (**Gottlieb, 1973**). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (existence d'espèces anaérobies strictes, sensibilité à des actinophages...) confirment leur classification parmi les bactéries (**Demain et Solomon, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990**). Il s'agit d'un groupe supragénérique, rassemblant des bactéries très diverses dispersées dans la systématique (**Gottlieb, 1973**), où les genres *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium* ont des caractéristiques très rapprochées (**Mariat et Sebald, 1990**).

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive (**Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997**) dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (**Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997**). Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0.5-1.0 μ m de diamètre) (**Enice, 1983**). Leur croissance, avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, est plus lente que celle des autres bactéries (**Ottow et Glathe, 1968 ; Larpent et Sanglier, 1989**). Lorsque les actinomycètes croissent sur un substrat solide comme la gélose, le réseau ramifié d'hyphes formé se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier (**Figure1**) pour former un mycélium végétatif (**Prescott, 2010**).

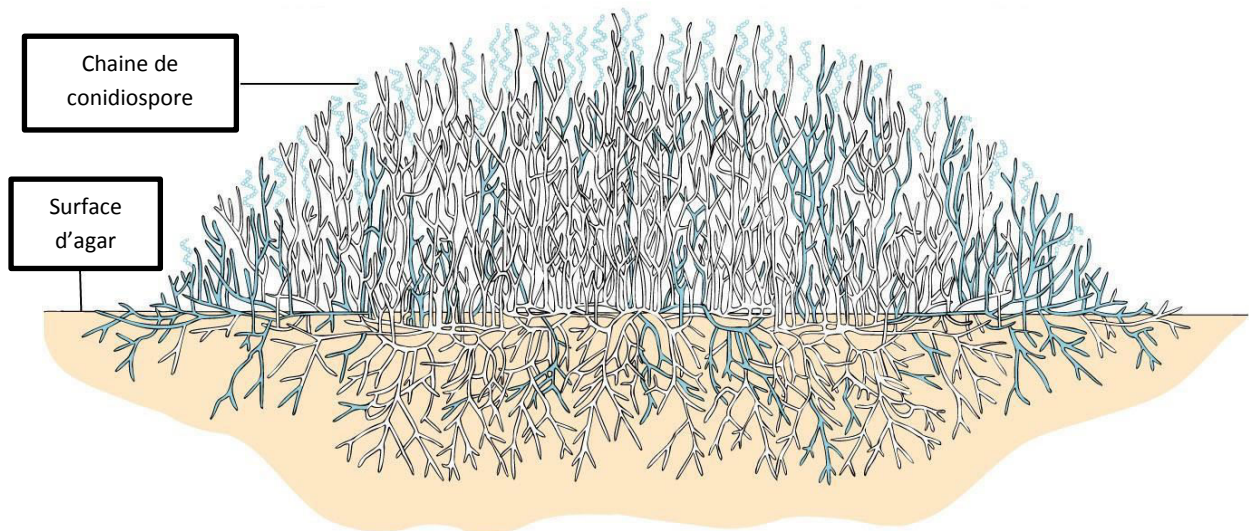


Figure 1 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivants (bleu et vert) et morts (blancs) montrant le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores (**Prescott, 2010**).

En général, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique (**Ensign et al., 1993**). Certaines ont des exigences nutritionnelles tels que les vitamines et certains acides aminés.

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles comme le genre *Thermoactinomyces*, dont la température optimale est comprise entre 50 et 60 °C. En ce qui concerne le pH la plupart des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles leurs croissance est comprise entre pH 5 et 9. Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent a des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides (**Alexander, 1977**). L'intervalle de température de leur croissance est entre 20 et 45°C, la majorité ont un optimum autour de 28 °C, mais les espèces thermophiles peuvent croitre à des températures de 55 à 65 C° (**Rangaswami & al, 2004, Cui et al., 2005**).

3. Écologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques (**Goodfellow & Williams 1983**). Ainsi, ils peuvent être dans les sols, dans les eaux douces ou salines et dans l'air. Toutefois, ils sont particulièrement abondants dans le sol, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques où ils constituent une part importante de la population microbienne (**Loqman, 2009**).

Des études sur l'écologie des actinomycètes ont montrés que ces micro-organismes sont présents dans divers niches écologiques (**Barakate et al., 2002 ; Oskay et al., 2004**), comprenant des prairies (**Hwang et Lee, 2002**), sables de plage (**Suzuki et al., 1994**), cavernes souterraines (**Groth et al., 1999**), rizière (**Hayakawa et al., 1988**), divers vergers (**Hwang et Lee, 2002**) et glace sous-glaciaire de L'Antarctique (**Priscu et al., 1999**).

Les actinomycètes intéressent les hydrobiologistes qui les suspectent d'être les agents responsables des goûts et des odeurs terreuses qui apparaissent parfois dans les eaux de consommation. De nombreux composés volatiles complexes ont été isolés et caractérisés. Les plus fréquemment cités sont la géosmine, la mucidone et la 2-methyl- isobornéol. Ce dernier composé peut donner à l'eau des odeurs, même à basse concentration (0.22 ppm) (**Cross, 1981, Zaitlin et Watson, 2006**).

Au niveau de la rhizosphère, les actinomycètes forment des relations symbiotiques avec les racines des plantes, en contribuant à la promotion de leurs croissances par des effets directs et indirects. Les effets directs comprennent la solubilisation du phosphate, la fixation d'azote, la production de phytohormones, cette association est appelée : association actinorhizienne (**Prescott et al, 2007**), tandis que les effets indirects peuvent être dus au contrôle des agents pathogènes par la production des métabolites secondaires, tel que les antibiotiques comme chez la guêpe européenne *Philanthus triangulum*, la présence de *Streptomyces* permet aux larves de

résister aux infections (**Barreto & al., 2008, Kroiss et al., 2010**), ou par la compétition nutritionnelle vis-à-vis des agents pathogènes, comme par exemple la synthèse des sidérophores, qui sont des chélateurs du fer (**Seipke et al., 2011**).

4. Taxonomie et identification des actinomycètes

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Cette classification des espèces et des genres reste un sujet difficile et controversé car différents critères sont utilisés.

Au début, seuls les critères macro et micro morphologiques correspondant à :

- la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat
- le mycélium aérien,
- la présence de spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes,
- la présence de sporanges

Ces critères permettaient de différencier les genres entre eux (**Waksman et Henrici, 1943**).

Puis il y a eu l'utilisation de la chimiotaxonomie basée sur la composition cellulaire en acides aminés, en sucres, en acides mycoliques, en phospholipides membranaires et en ménaquinones membranaires (**Collins et Jones, 1981**).

La chimiotaxonomie, associée aux critères morphologiques, fut d'un apport essentiel pour distinguer de nombreux genres entre eux, tels par exemple, *Streptomyces* de *Nocardia* (**Becker et al., 1965**).

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

Dans les années 70 de nombreux tests physiologiques, combinés à l'outil informatique, ont été utilisés pour différencier les espèces de chaque genre entre elles.

Ainsi est née la taxonomie numérique avec l'obtention de dendrogrammes qui ont permis d'apporter beaucoup de clarté au niveau de la composition en espèces des genres *Streptomyces* (**Williams et al., 1983**), *Actinomadura* (**Athalye et al., 1985**), *Nocardiopsis* (**Grund et Kroppenstedt, 1990**) et *Actinophanes* (**Goodfellow et al., 1990**).

En 1989 le « Bergey's manual of systématique bacteriology » a consacré tout le volume 4 aux actinomycètes, ainsi ces bactéries sont rattachées au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobacteria contenant l'ordre des Actinomycetales. Les méthodes d'identification classiques ont été abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires.

Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leurs rapidité et efficacité (**Kim et al., 1999, Labeda et Kroppenstedt, 2000**). En effet, l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ARN ribosomique 16S ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes (**Kinoshita et al., 1999**). Malgré que l'hybridation ADN-ADN est une technique utile dans l'identification des espèces du genre *Streptomyces* elle ne devrait pas être employée seule, en raison de l'instabilité du génome de ces dernières, mais en combinaison avec d'autres techniques (**Healy et Lambert, 1991 ; Doering et al., 1992 ; Labeda et Lyon, 1992 ; Kim et al., 1999 ; Bouček et al., 2000**).

IV. Les Actinomycètes en biotechnologie

Les actinomycètes, l'un des groupes les plus divers de bactéries filamenteuses, sont bien reconnus pour leur polyvalence métabolique. Le potentiel bioactif de ces bactéries facilite leur survie même en détresse et des conditions écologiques défavorables. Ce problème spécial est consacré à l'importance d'une multitude de métabolites primaires et secondaires produits par les actinomycètes (**Neelu Nawani et al., 2013**). Leur importance et leur utilisation en biotechnologie relève du fait de leur capacité de synthétiser ces différents métabolites secondaires biologiquement actifs (**Mincer et al., 2002 ; Behal, 2003 ; Overbye et Barrett, 2005 ; Baltz, 2008**). Au-delà de leur capacité à produire des agents antimicrobiens, les actinomycètes sont aussi une grande source de molécules possédant des activités biologiques variées, telles que des agents anti tumoraux, des antiviraux, des immunosuppresseurs, des inhibiteurs d'enzymes ou encore des insecticides (**Boughachiche F et al., 2005 ; Boughachiche F. et al., 2012 ; Aouar L. et al., 2012**) (Tableau N°1).

1. La production des insecticides et des molécules antiparasitaires par les actinomycètes (Ait Barka E. et al., 2016)

Les macrotétrolidés sont des molécules produites par une grande variété de *Streptomyces*. Ces molécules sont actives contre les acariens, les insectes, les coccidies et les helminthes et ils présentent également des effets immunosuppresseurs. Cependant, en ce qui concerne la composition du complexe macrotétrolide, seul *Streptomyces aureus* S-3466, qui produit un mélange de tétranactine (le membre le plus actif du groupe composé) avec la dinactine et la trinactine, a Utilisé à des fins commerciales.

La tétranactine, un antibiotique cyclique produit par *Streptomyces aureus* avec une structure moléculaire liée à la cyclosporine, est utilisé comme émulsion contre les acariens de carmin de fruits et de thé.

Une véritable histoire de succès en termes d'antihelminthétiques est l'ivermectine, qui est un dérivé déshydro de l'ivermectine produite par *Streptomyces avermitilis*. Après son apparition à la fin des années 1970, l'ivermectine était le premier endectocide au monde, qui à l'époque était une classe complètement nouvelle d'agents antiparasitaires, avec une activité forte et large spectre contre les nématodes internes et externes et les arthropodes. Récemment, le prix Nobel de physiologie ou de médecine 2015 a été décerné à Satoshi Omura et William C. Campbell pour leur découverte de l'ivermectine, conjointement avec Youyou Tu pour la découverte du médicament artémisinine anti-malaria.

2. La production des bioherbicides par les actinomycètes

Mildiomicin, un métabolite antifongique isolé des cultures de *Streptoverticillium rimofaciens* Niida, est fortement actif contre plusieurs moisissures poudreuses sur diverses cultures (Harada S. *et al.*, 1978), et inhibe la biosynthèse de protéine fongique (Feduchi E, *et al.*, 1985). Les principaux sites d'action de ces antibiotiques se situent dans des endroits où la synthèse de la chitine se produit dans la paroi cellulaire, une fuite de cations provenant des mitochondries, une biosynthèse de l'inositol ou des sites de synthèse de protéines et d'ADN (Ait Barka E. *et al.*, 2016).

Validamycin A a été commercialisé par Takeda pour le contrôle des agents pathogènes dans le riz et d'autres plantes et comme un outil pour atténuer les maladies dans les semis de légumes. D'autre part, certains métabolites sécrétés sont cytotoxiques et peuvent inclure des structures chimiques comme les macrolides, les α -pyrones, les lactones, les indoles, les terpènes et les quinones (Dharmaraj S. 2010). Par exemple, la résomomyine, un antibiotique lié à la quinone, a une structure unique et présente une activité bactéricide et vasoconstrictive basée sur l'inhibition de l'ARN et de la synthèse des protéines (Barac T. *et al.*, 2004).

Tableau n°1 : exemples de molécules bioactives produites par les actinomycètes et leurs activités (Ait Barka E. et al., 2016).

Type des molécules et l'espèce productrice	Molécule bioactive	Référence
productrices de molécules antibactériennes		
<i>Verrucosipora</i> spp.	Abyssomycin	Bister B et al.2004
<i>Streptomyces anulatus</i>	Actinomycins	Waksman SA et al, 1940
<i>Streptomyces canus</i>	Amphomycin	Heinemann B et al.1953
<i>Micromonospora</i> spp.	Anthracyclin	Grein A et al, 1980
<i>Streptomyces cattley</i>	Antibiotics and fluorometabolites	Barbe V et al, 2011
<i>Streptomyces canus</i>	Aspartocins	Yang HJ et al, 2014
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Avermectin	Burg RW et al ,1979
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol	Omura S et al, 1986
<i>Micromonospora</i> spp.	Clostromicins	Omura S et al, 1986
<i>Streptomyces griseus</i>	Cycloheximide	Kominek LA. 1972
<i>Streptomyces orchidaceus</i>	Cycloserine	Pendela M et al, 2008
<i>Streptomyces roseosporus</i>	Daptomycin	Mchenney MA et al 1998
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erythromycin (Ilotycin)	Mc Guire JM et al, 1952
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamicin	Weinstein MJ et al, 1963
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Hygromycin	Gonzalez A et al , 1978
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycin	Umezawa H et al, 1957
<i>Streptomyces kitasoensis</i>	Leucomycin	Hata T et al, 1953
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomycin	Mason DJ et al, 1964
<i>Marinispora</i> spp.	Marinomycin	Kwon HC et al, 2006
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycins	Dulmage HT. 1951
<i>Micromonospora</i> spp.	Netamicin	Berdy J. 2005.
<i>Streptomyces niveus</i>	Novobiocin	Kominek LA. 1972.
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Oleandomycin	Williams DH et al, 1980
<i>Streptomyces rimosus</i>	Oxytetracycline	Rhodes PM. 1984.
<i>Streptomyces</i> spp.	Pristinamycin	Blanc V et al, 1995
<i>Streptomyces lindensis</i>	Retamycin	Pamboukian CR et al, 2004
<i>Streptomyces mediterranei</i>	Rifamycin	Margalith P et al, 1960
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetin	Williams DH et al, 1980
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Spiramycin	Pinnert-Sindico S. 1954
<i>Streptomyces virginiae</i>	Staphylomycin	Yanagimoto M. 1983.
<i>Streptomyces endus</i>	Stendomycin	Thompson RQ et al, 1963
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigin	Li XB, Qiao B et al, 2006
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	Schatz A et al,1944
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Streptothricin	Waksman SA et al, 1942
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetracycline	Darken MA et al,1960
<i>Micromonospora</i> spp.	Thiocoraline	Romero F et al, 1997
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomycin	Brigham RB et al, 1956

Suite **tableau n°1** : exemples de molécules bioactives produites par les actinomycètes et leurs activités (Ait Barka E. et al., 2016).

<p>productrices de molécules antifongiques</p> <p><i>Streptomyces anulatus</i> <i>Streptomyces nodosus</i> <i>Streptomyces griseochromogenes</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces</i> spp. <i>Streptomyces venezuelae</i> <i>Streptomyces padanus</i> <i>Streptomyces galbus</i> <i>Streptomyces violaceusniger</i> <i>Streptomyces venezuelae</i> <i>Streptomyces kasugaensis</i> <i>Streptomyces</i> spp. <i>Streptomyces natalensis</i> <i>Streptomyces tendae</i> <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> <i>Streptomyces humidus</i> <i>Streptomyces cacaoi</i> <i>Streptomyces canus</i> <i>Streptomyces lavendulae</i> <i>Streptomyces canus</i> <i>Nocardia transvalensis</i> <i>Streptomyces hygrosopicus</i></p>	<p>Actinomycins Amphotericin B Blasticidin Candicidin Carboxamycin Chloramphenicol Fungichromin Galbonolides YCED-9 Guanidylfungin Jadomycin Kasugamycin Kitamycin Natamycin Nikkomycin Oligomycin Phenylacetate Polyoxin B Resistomycin Streptothricin Tetracenomycin Transvalencin Validamycin</p>	<p>Bister B et al.2004 Linke HA et al, 1974 Takeuchi S et al.1958 Acker RF et al, 1954 Hohmann C et al.2009 Matsuoka M et al.1953 Shih HD et al, 2003 Fauth U et al, 1986 Trejo-Estrada S et al ,1998 Doull JL et al,1993 Umezawa H et al,1965 Hayashi Ki et al,1999 Struyk AP et al,1958 Bormann C et al,1985 Smith RM et al,1954 Hwang BK et al,2001 Isono K et al,1965 Zhang YL et al,2013 Waksman SA et al,1942 Zhang YL et al,2013 Hoshino Y et al,2004 Iwasa T et al,1970</p>
<p>productrices des bioherbicides</p> <p><i>Actinomadura</i> spp. <i>Streptomyces hygrosopicus</i> <i>Streptomyces avermitilis</i> <i>Streptomyces prasinus</i> <i>Saccharopolyspora spinosa</i></p>	<p>2,4-Dihydro-4-(-D-ribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one (herbicide) Herbimycin Ivermectin (derivative of avermectin) Prasinons Spinosad (neurotoxic insecticides)</p>	<p>Omura Set al,1979 Omura S et al,2004 Box SJ et al,1973 Waldron C et al,2001</p>

Suite **tableau n°1** : exemples de molécules bioactives produites par les actinomycètes et leurs activités (Ait Barka E. et al., 2016).

<p>productrices de molécules antiparasitaires <i>Streptomyces avermitilis</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Streptomyces bottropensis</i></p>	<p>Avermectins Prodiginine Trioxacarcin</p>	<p>Burg RW et al,1979 Cerdeno AM et al,2001 Tomita F et al,1981</p>
<p>productrices de molécules antivirales <i>Streptomyces antibioticus</i> <i>Streptomyces hygroscopicus</i> <i>Streptomyces spp.</i></p>	<p>9βD-Arabinofuranosyladénine Hygromycin Panosialins</p>	<p>Gonzalez A et al,1978 Aoyagi T et al,1971</p>
<p>Les productrices de molécules Hypercholesterolemique <i>Streptomyces hygroscopicus</i></p>	<p>Rapamycin</p>	<p>Chen Y et al,1999</p>
<p>productrices de molécules antitumorales <i>Micromonospora spp.</i> <i>Nocardia asteroides</i> <i>Streptomyces spp.</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Actinomadura spp.</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Thermoactinomyces spp.</i> <i>Marinospora spp.</i> <i>Salinispora tropica</i> <i>Streptomyces peucetius</i> <i>Streptomyces peucetius</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Micromonospora spp.</i></p>	<p>Anthraquinones Asterobactine Borrelidine Diazepinomicin IB-00208 LL-E33288 complex Lomaiviticins Lupinacidins Mechercharmynin Marinomycin Salinosporamide Doxorubicin (adriamycin) Daunorubicin (daunomycin) Tetrocarcin Thiocoraline</p>	<p>Igarashi Y et al,2007 Nemoto A et al,2002 Vino S et al,2008 Charan RD et al,2004 Hirsch AM et al,2009 Hirsch AM et al,2009 Igarashi Y et al,2007 Kanoh K et al,2005 Kanoh K et al,2006 Williams DH et al,1980 Hirsch AM et al,2009 Perez Baz J et al,1997</p>

Suite **tableau n°1** : exemples de molécules bioactives produites par les actinomycètes et leurs activités (Ait Barka E. et al., 2016).

productrices de molécules immunostimulatrice <i>Nocardia rubra</i> <i>Streptomyces olivoreticuli</i> <i>Kitasatospora kifunense</i>	Rubratin Bestatin FR-900494	De Reijke TM et al,1997 Blomgren H et al,1980 Iwami M et al ,1987
productrices de molécules immunosuppressives <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>Streptomyces filipinensis</i> <i>Streptomyces filipinensis</i>	Brasilicardin Hygromycin Pentalenolactone	Komaki H et al,1999 Uyeda M et al 2001 Uyeda M et al 2001
Productrices des enzymes thérapeutiques (antitumoraux) <i>Streptomyces spp.</i> <i>Streptomyces olivochromogenes</i>	L-Asparaginase L-Glutaminase	DeJong P. 1972. Balagurunatha R et al,2010

3. La production des enzymes par les actinomycètes

La biocatalyse offre des solutions vertes et propres aux processus chimiques et émerge comme une alternative stimulante et révoltée à la technologie chimique. Les processus chimiques sont maintenant réalisés biologiquement par des biocatalyseurs (enzymes) qui sont des composants intégrants de tout système biologique. De nombreux micro-organismes, en particulier des bactéries et des champignons, sont actuellement utilisés pour la production de diverses enzymes industrielles. Les hydrolases couvrent plus de 75% des enzymes commercialement utilisées et sont souvent très recherchées. Ceux-ci sont cependant utilisés sous une forme brute pour rendre le processus économiquement viable et pour répondre à la demande d'une enzyme à grande échelle. Parmi les hydrolases, les protéases occupent une plate-forme importante, car elles sont largement utilisées dans l'industrie des détergents, suivie de l'industrie de l'amidon, qui est le deuxième utilisateur des industries des enzymes et des textiles, de la cuisson, de l'alimentation et de l'alimentation animale. (P. Monteiro et al., 2010 ; Divya Prakash et al., 2013). Les applications de quelques enzymes commercialisées sont présentées au **tableau 2**.

Tableau n°2 : Les enzymes commercialement pertinentes produites par les actinomycètes (Divya Prakash et al., 2013).

Enzyme	Utilisation	Industrie de l'application
Protease	Détergents Fabrication de fromage Clarification - bière à faible teneur en calories Découper Traitement du caillot de sang	Détergent Aliments Brassage Cuir Médecine
Cellulase	L'élimination des taches Adoucissement du coton Boisson, modification des fibres	Détergent Textile Papier et pâte à papier
Lipase	L'élimination des taches Stabilité de la pâte et du conditionnement Arôme de fromage Diminuer, nettoyer	Détergent Cuisson Laitier Textile
Xylanase	Conditionnement de la pâte Digestibilité Amplification d'agent de blanchiment	Cuisson Alimentation animal Papier et pâte à papier
Pectinase	Clarification Récirage	Boisson Textile
Amylase	Enlèvement des taches Douceur du pain Diminution, amélioration du drainage Production de sirop de glucose et de fructose Enlèvement de l'amidon à partir de tissus	Détergent Cuisson Papier et pâte à papier Industrie de l'amidon Textile

Un large éventail d'enzymes et de leurs produits appliqués dans les industries biotechnologiques et les champs biomédicaux a été rapporté dans différents genres d'actinomycètes. Étant donné qu'il existe une information vitale disponible en raison de l'avènement des données sur le séquençage du génome et des protéines, les actinomycètes ont été employés en permanence dans la production de protéases, de cellulases, de chitinases, d'amylases, de xylanases et autres. Représentant des exemples d'enzymes industriellement importantes provenant d'actinomycètes sont discutés ci-dessous, et leurs propriétés enzymatiques sont enrôlées dans le **tableau 3** (Divya Prakash et al., 2013).

Tableau n°3 : liste des enzymes industrielles produites par des actinomycètes et de leurs caractéristiques (Divya Prakash et al., 2013).

Enzyme	Souche productrice	Marge pH	Marge température
Cellulase	Recombinant <i>Streptomyces</i> sp.	5.0–12.0	40–50°C
	Recombinant <i>Streptomyces</i> sp.	10.0	40°C
	<i>Thermomonospora</i> sp.	7.0–10.0	50°C
	<i>Streptomyces ruber</i>	5.5–7.0	35–40°C
Xylanase	<i>Actinomadura</i> sp.	4.0	70°C
	<i>Streptomyces</i> spp.	8.0–11.0	45–60°C
Amylase	<i>Streptomyces</i> sp.	5.0–7.0	45–50°C
	<i>Streptomyces erumpens</i>	9.0–10.0	40–50°C
	<i>Nocardiopsis</i> sp	8.6	70–80°C
	<i>Thermobifida fusca</i>	5.0–7.0	60°C
	<i>Nocardiopsis</i> sp.	5.0–10.0	35–45°C
Pectinase	<i>Streptomyces lydicus</i>	4.0–7.0	45°C
Protease	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	4.0	50°C
	<i>Nocardiopsis</i> sp.	10.0	40–50°C
	<i>Streptomyces pactum</i>	7.5	40°C
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6.5	65°C
	<i>Streptomyces</i> sp.	4.0–11.0	30–60°C
Chitinase	<i>Nocardiopsis prasina</i>	7.0	50–60°C
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6.0	60°C
	<i>Microbispora</i> sp.	3.0–11.0	30–50°C

Les cellulases produites par les *Streptomyces* sp. ont un pH alcalin optimal et une forte thermostabilité. Ces enzymes ont été utilisées comme complément dans les détergents pour nettoyer, adoucir et restaurer la couleur des tissus. Il a également été testé pour le traitement des textiles, du traitement du papier et de la pâte, et comme additif alimentaire pour animaux (Jones et al., 2004).

Streptomyces spp. sont des producteurs prolifiques d'une autre enzyme commercialement importante, la xylanase. Les xylanases produites par *Streptomyces* sp. sont préférées dans le traitement de la pâte de paille de riz pour améliorer la capacité de blanchiment de la pâte.

Cette préférence est due à l'absence de contamination de la cellulase dans la xylanase et aussi à la réduction de l'utilisation de produits chimiques au cours du blanchiment et de la pâte à papier (Rifaat et al., 2006). De plus, les xylanases des actinomycètes sont stables sur les pâtes kraft et

peuvent être utilisées sous forme brute, ce qui rend le procédé économique. Une forte thermostabilité et une activité spécifique, deux propriétés souhaitables des enzymes à utiliser dans les procédés industriels, sont rapportées dans les xylanases de l'*Actinomadura sp.* FC7 et *Nonomuraea flexuosa* (Zhang et al., 2011). De même, les xylanases fondues des champignons et des actinomycètes ont été utilisées dans les industries du papier et de la pâte, en raison de la stabilité thermique et du pH (Fagerstrom et al., 2008). Dans de nombreuses plantes supérieures et des déchets agricoles, la teneur en xylane est de près de 20 à 40% du poids sec. Le Xylan avec les hémicelluloses est le deuxième biopolymère le plus renouvelable (Priya et al., 2012).

Un autre groupe important d'enzymes sont les amylases qui sont utilisées dans l'industrie du traitement de l'amidon pour la conversion de l'amidon en sirops à haute teneur en fructose (Ammar et al. 2002). Les amylases thermostables sont rapportées par *Nocardioopsis sp.* Qui ont des applications importantes dans les industries de la boulangerie et du papier. De telles amylases sont des catalyseurs lucratifs en nutrition et en soins de santé (Divya Prakash et al., 2013).

L'industrie alimentaire utilise des pectinases en particulier dans la clarification des jus de fruits, le dégraissage des fibres, la fabrication du vin et le retouche des fibres libériennes. Pectinases de *Streptomyces sp.* Sont rapportés (Jacob et al., 2008) L'apparition de gènes dégradants de la pectine chez quelques actinomycètes suggère que leur caractérisation pourrait éventuellement produire des pectinases avec des nouvelles propriétés.

La plupart des protéases produite par *Streptomyces spp.* sont tolérants aux alcalis, et certains sont tolérants au sel. Protéases de *Nocardioopsis spp.* Sont utilisés comme additifs pour détergents, les aliments pour animaux et les brasseries. Les protéases sont aussi utilisées dans l'industrie des textiles, l'épilation de cuirs et peaux dans l'industrie du cuir. Découpe de peau de chèvre par des proteases de *Streptomyces sp.* rend le processus économiquement et écologiquement possible (Divya Prakash et al., 2013).

Les chitinases sont utilisés récemment pour l'extraction d'oligomères de chitine qui sont des produits biomédicaux importants. Les chitinases se produisent dans plusieurs actinomycètes et possèdent des propriétés uniques en termes de thermostabilité et d'activité dans une large gamme de pH qui les rend adaptés aux applications industrielles (Bhattacharya et al., 2007 ; Divya Prakash et al., 2013). L'une de leurs applications les plus ingénieuses est la production d'oligosaccharides de chitine. Les oligosaccharides de chitine (COS) ont des activités anticoagulantes, antimicrobiennes, anticholestéremiques, anticancéreuses, cicatrisantes, antitumorales et antioxydantes qui les rendent brillantes pour les applications biomédicales (Bhattacharya et al., 2007).

D'autres enzymes avec un potentiel industriel très important sont produites par les actinomycètes, la lignine peroxydases et les tyrosinases qui sont efficaces dans le traitement des colorants textiles promettant leur application dans les stations de traitement des déchets. La gélatinase a attiré une attention significative en tant que cibles pour le développement de médicaments; En raison de leur fonction prospective dans la dégradation des tissus conjonctifs liée à une métastase tumorale (**R. Sathya & T. Ushadevi, 2014**).

Pour obtenir des enzymes avec des propriétés ou des fonctionnalités nouvelles, des programmes de dépistage à haut débit (HTS : High Throughput Screening) sont adoptés pour choisir des actinomycètes rares qui sont une source de composés nouveaux. Des exemples de succès incluent des enzymes thérapeutiques comme la thrombinase et la L-asparaginase de *Streptomyces* sp marins. Qui sont utilisés dans le traitement de l'infarctus du myocarde et de la leucémie (**Divya Prakash et al., 2013**).

Ces enzymes possèdent non seulement une promesse biotechnologique, mais peuvent être économiques en raison de leur faible coût de production. Leur production peut être réalisée sur des substrats peu coûteux comme le riz et la paille de blé (**El-Sersy et al., 2010**).

4. Production d'antibiotiques par les actinomycètes

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes (**Marinelli, 2009**). Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structuralement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

Environ 75 % des antibiotiques sont produits par les actinomycètes. Bon nombre de ces agents antibactériens montrent un large éventail des activités. La diversité en structure de ces antibactériens est responsable de leurs activités antimicrobiennes de large spectre et diverse mécanisme d'action. Ils ont montré une forte puissance contre un grand nombre d'organismes Gram-positives et Gram-négatives. Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques, ces antibiotiques peuvent être classés en plusieurs groupes chimiques, (**Tableau n°4**) (**Berdy, 2005**).

Tableau n°4 : exemple d'antibiotique produit par les actinomycètes (**Berdy, 2005**).

Groupes chimiques	Antibiotique
Les aminoglycosides	Streptomycine, Néomycine, Kanamycine, Gentamicine
Les macrolides	Érythromycine
Les ansamycines	Rifamycine
Les bêta-lactames	Thiénamycine
Les peptides	Viomycine, Thiostrepton, Actinomycine, Pristinamycine
Les tétracyclines	Chlortétracycline, Oxytétracycline
Les nucléosides	Puromycine
Les polyènes	Nystatine, Candidine, Amphotéricine B
Les polyéthers	Monensine

Plus de 60 substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie (**Madigan et Martinko, 2007**). Aussi, nous notons que la vancomycinristocetine est un type complexe de glycopeptide produit, presque en exclusivité, par plusieurs espèces d'actinomycètes rares (**Berdy, 2005**). L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (**Bentley et al., 2002 ; Ikeda et al., 2003**).

5. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes

Les métabolites secondaires, dont les antibiotiques, sont aussi appelés idiolites car ils sont synthétisés pendant l'idiophase, phase de non croissance succédant à la trophophase ou phase de croissance. Cette définition n'est pas entièrement satisfaisante. En effet, il est possible d'obtenir

un couplage de la production de certains métabolites secondaires et de la croissance contrôlée du microorganisme en faisant varier la composition du milieu. La biosynthèse des métabolites secondaires est fortement affectée par les conditions environnementales et nutritionnelles dans lesquelles le microorganisme se développe.

5.1. Influence des sources nutritionnelles

La nature et la concentration de certaines composantes du milieu de culture ont un effet remarquable sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs, entre autres chez les actinomycètes. Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote affectent fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (Strub, 2008).

La production spécifique de métabolites secondaires s'expérimente souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (Lebrihi *et al.*, 1988, Lounès *et al.*, 1995a), les oligosaccharides (fructose, galactose, lactose) (Basak et Majumdar, 1973) ou les huiles (méthyloléate, huile de soja) (Park *et al.*, 1994), que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol.

Dans les milieux de culture, la source d'azote utilisée est généralement l'ammonium ou des composés organiques comme les acides aminés ; le nitrate est aussi employé. Beaucoup d'antibiotiques possèdent un atome d'azote dans leur structure. La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production (Lebrihi *et al.*, 1992).

La synthèse de métabolites secondaires a une tolérance plus faible à la gamme de concentration en oligoéléments que la croissance. Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles. Il est à noter que plusieurs autres additifs comme le sulfate, le chlorure, l'acétate et l'arginine peuvent influencer la production de plusieurs métabolites secondaires. C'est le cas des deux biomolécules, l'antibiotique IM-111-81 et de l'azalomycine B, dont la production par la souche *S. hygrosopicus* est stimulée par la présence de ces additifs (Gesheva *et al.*, 2005).

5.2. Influence du taux de croissance

La production de métabolites secondaires est la plupart du temps associée à une absence de croissance ou à une croissance faible. En culture batch sur milieu riche, les concentrations en antibiotiques les plus élevées sont atteintes en phase stationnaire quand l'essentiel de la croissance est terminé (Martin et Demain, 1980). Le fait qu'un taux de croissance élevé soit souvent corrélé à une faible production de métabolites secondaires laisse à penser qu'un faible

taux de croissance pourrait initier le métabolisme secondaire. Par ailleurs, dans quelques cas, comme la synthèse d'érythromycine par *S. erythraeus* (Trilli et al., 1987) ou de la chlortétracycline par *S. aureofaciens* (Sikyta et al., 1961), la production d'antibiotique en chemostat augmente avec le taux de croissance.

5.3. Influence des conditions de culture

Les facteurs physico-chimiques comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation affectent la biosynthèse des métabolites secondaires.

Concernant l'effet de la température, Doull et al., (1993) ont montré qu'un choc thermique d'une heure induit la production de jadomycine B chez *S. venezualae*. La souche marine *Streptomyces BT-408* possède une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 40°C avec un optimum à 30°C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide SBR-22 est beaucoup plus étroite et varie entre 25 et 33°C (Sujatha et al., 2005).

L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires (Pfefferle et al., 2000).

6. La zone humide du lac El Mellah d'El Kala.

La région d'El Kala a la particularité d'abriter le complexe de zones humides le plus important du Maghreb. Très intéressant par ses dimensions et par la diversité des conditions de profondeur et de salinité, il favorise une richesse biologique particulièrement importante. Les principales zones humides de la région est le lac El Mellah avec 860 ha (Benyacoub et al., 2000a). Le Lac Mellah est considéré comme l'unique lagune du pays et est classé en 5ème position par rapport aux 14 lagunes Nord-Africaines (Baba- Ahmed, 2008).

Le lac Mellah est une ancienne vallée fluviale qui s'est transformée en lagune après avoir été envahie par l'eau marine. C'est l'unique lagune qui existe en Algérie. Son fonctionnement dépend des flux hydriques continentaux, les intrusions d'eau marines au gré du rythme des marées et l'apport local de précipitations (Retima, 1999). On remarque au nord du lac un cordon dunaire qui est creusé par un chenal de 900m de long qui le relie à la mer et permet ainsi des échanges entre les deux milieux. Ces échanges confèrent au lac un taux de salinité proche de celui de la mer (29 - 35‰). Cette lagune est une zone humide où s'interpénètrent et se juxtaposent plusieurs écosystèmes. Cette diversité écologique est largement déterminée par le jeu des influences de l'eau douce d'origine pluviale et de l'eau saumâtre en divers points du site. Il sert d'habitat à de nombreuses espèces animales et végétales, dont certaines endémiques ou rares ; d'où son intérêt pour la conservation de la nature (Benyacoub et al., 2000b ; Kherifi W, Kherici-Bousnoubra H , 2012).

La zone humide du lac El Mellah fait l'objet de plusieurs recherches et études scientifiques pour valoriser et établir une exploitation appropriée de ce site. La présente étude vise à déterminer la richesse du lac en microorganisme producteurs naturels de molécules bioactives.

X. Étude du genre *Cryptococcus*.

1. Morphologie de *Cryptococcus*

1.1. Morphologie macroscopique et microscopique

Sur milieux solides la plupart des espèces ont une apparence visqueuse, des pigments caroténoïdes peuvent être produits (**Figure n°2**). Les cellules des espèces de *Cryptococcus* sont sphéroïdes, ovoïdes, allongés, ou amiboïde polymorphes (**Figure n°3**). Les cellules de la plupart des souches sont couvertes par une mince couche de glycoprotéines matériel capsulaire qui a une consistance de la gélatine et que, parmi d'autres fonctions, sert pour aider à extraire les éléments nutritifs du sol (**Refai M. et al, 2014**).

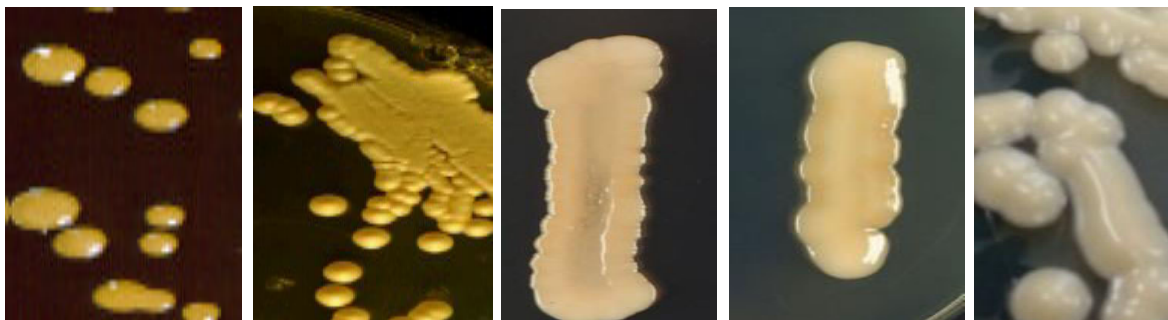


Figure n°2: Aspect macroscopique (**Refai M. et al, 2014**).

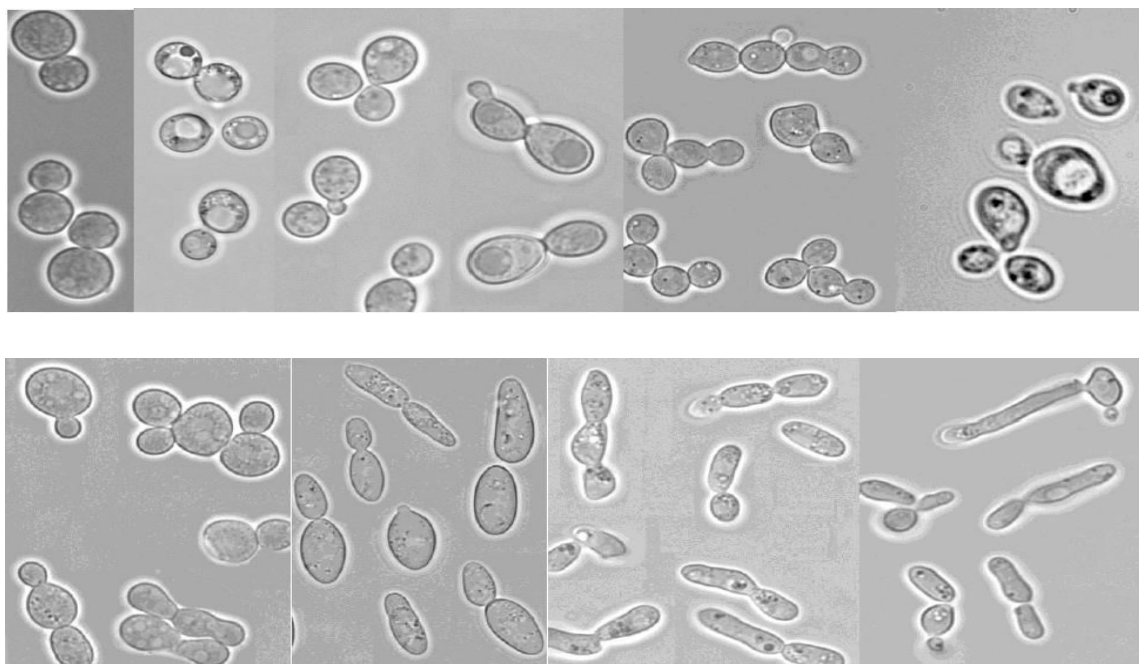


Figure n°3 : Aspect microscopique (**Refai M. et al, 2014**).

1.2.Ultrastructure

La microscopie électronique de la cellule de *Cryptococcus* révèle la présence d'une capsule, d'une paroi cellulaire, d'une membrane plasmique et d'un noyau, ainsi que d'autres organites intracytoplasmiques. La capsule, parfois plus épaisse que les cellules, est constituée de microfibrilles ou de points enroulés et entrelacés. Le type point apparaît avec ou sans rayonnements de type cils à la périphérie. Une zone claire sépare souvent la capsule de la paroi cellulaire. La paroi semble être composée de plusieurs couches parallèles de gaines membranaires minces contenant une zone intérieure dense et une zone extérieure plus claire. La membrane plasmique est similaire à celle trouvée chez d'autres levures. Le noyau montre une membrane claire et a généralement une matière de chromatine désintégrée, au lieu d'un nucléole défini. Les mitochondries sont consistantes en taille et en forme. On observe des granules lipidiques avec du glycogène en transition, un grand nombre de vacuoles, des ribosomes bien conservés (**Figure n°4**) (**Refai M. et al, 2014**).

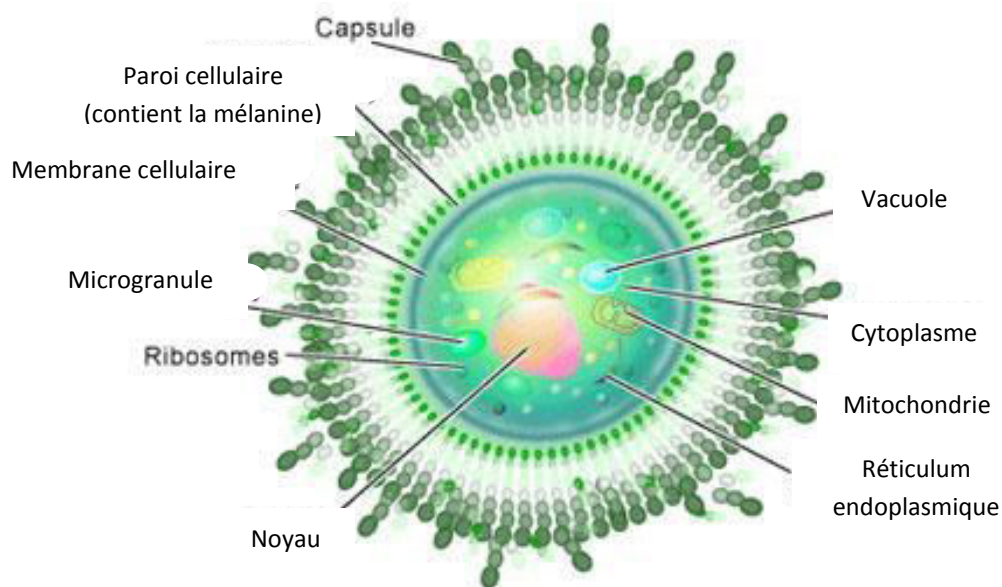


Figure n°4: une représentation idéalisée d'une cellule de *C. neoformans*. Notez que la mélanine est trouvée dans la paroi cellulaire (**Simmersecko, 2006**).

2. Biotope

Le genre *Cryptococcus* vit à l'état libre en saprophyte dans la nature et dans le sol enrichi en matières organiques. Il est retrouvé fréquemment dans les fientes de pigeons très riches en acide urique, xanthine, guanine et créatinine nécessaires à son développement et à la genèse des formes sexuées. (Pal M. et Meprotra BS., 1984 ; Swinne D *et al.*, 1999 ; Girard PM, 1998) .

En Afrique, il a été retrouvé dans de la poussière domestique récoltée des maisons des patients atteints de cryptococcose associée au SIDA (Swinne D *et al.*, 1999).

Il est très résistant dans le milieu extérieur : plus de 16 mois dans le sable et 2 ans dans la terre humide et ombragée avec un pH de 6,8 à 7,2. Son développement s'arrête à partir de 40°C. C'est pourquoi il ne peut pas se multiplier dans le tractus digestif du pigeon (Gari-Toussain M *et al.*, 1998) mais il survit dans le jabot où la température est nettement plus basse.

3. Reproduction

Cryptococcus sp. se présente généralement sous forme de levures, autant dans l'environnement que chez un sujet infecté, qui se reproduisent par bourgeonnement (Idnurm A. *et al.* 2005; Lin, 2009). Il peut aussi exceptionnellement prendre la forme de pseudo-hyphes, forme intermédiaire de la levure et l'hyphe, qui serait un mécanisme de survie dans les amibes (Lin, 2009).

Cryptococcus présente une forme de croissance filamentaire multicellulaire à la suite d'une reproduction sexuée ou d'une fructification monocyttaire. La filamentation, où des cellules contiguës sont séparées par des cloisons pour former des hyphes ou des pseudo-hyphes, confère un piégeage plus important des nutriments et la capacité de produire des spores.

Les formes hyphes ne sont pas retrouvées dans les infections humaines, peut-être parce que la production d'hyphes est fortement antigénique, ce qui stimule la clairance de l'hôte (Watkins *et al.*, 2017).

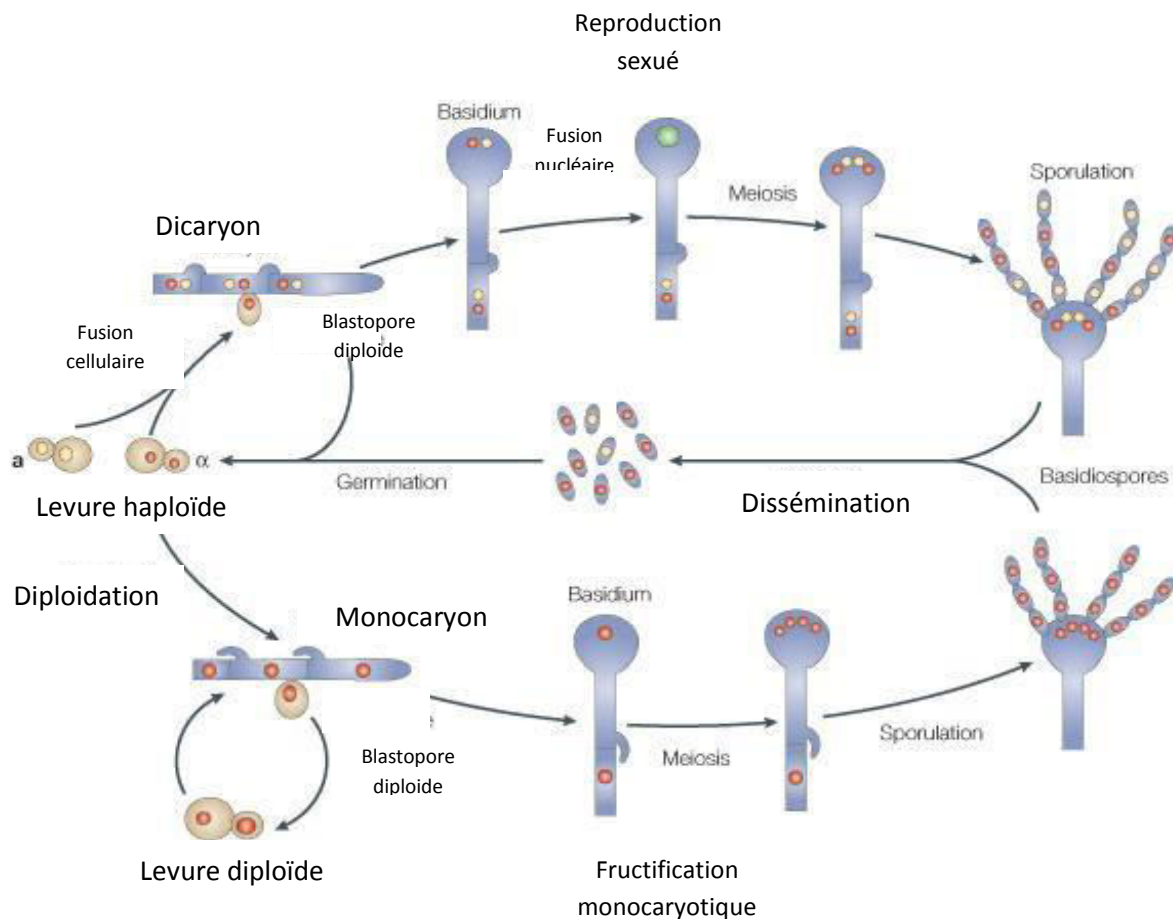


Figure n°5: reproduction sexuée et fructification monocaryotique chez *Cryptococcus neoformans* (Idnurm A. et al. 2005).

(Haut) En conditions limitantes, les levures de type a et α sécrètent des phéromones et il y a fusion. Il y a filamentation après la formation du dicaryon. Au stade de la baside, les noyaux fusionnent et il y a méiose, suivie par la production d'une chaîne de basidiospores. (Bas) Lors de la fructification monocaryotique, les cellules d'un même type (a ou α) deviennent diploïdes par endoduplication ou fusion nucléaire, suivie d'une fusion de deux cellules. Il y a formation d'un hyphe (connections rudimentaires), développement d'une baside, méiose, et formation de basidiospores haploïdes. (Idnurm A. et al. 2005).

Lors de la reproduction sexuée, déclenchée lorsque les conditions de croissance sont pauvres, une cellule du type « a » fusionne avec une cellule « α » (Figure n°5). Il y a formation d'un dicaryon et d'un hyphe. Suite à la fusion des noyaux, il y a formation d'une baside sur laquelle des basidiospores sont produites par bourgeonnement (Lin and Heitman, 2006).

4. La cryptococcose :

La cryptococcose est une maladie chronique et aiguë à subaiguë pulmonaire, maladie systémique ou méningitique, initiée par l'inhalation de basidiospores et/ou les cellules de levure desséchées de *Cryptococcus neoformans*. Les infections pulmonaires primaires n'ont pas de symptômes et de diagnostic sont généralement subcliniques. Sur la diffusion, le champignon montre généralement une prédilection pour le système nerveux central, cependant la peau, les os et autres organes viscéraux peuvent aussi s'impliquer.

Bien que *C. neoformans* et *C. gattii* sont considérés comme les deux principales espèces pathogènes, *C. albidus*, *C. laurentii* et d'autres espèces ont parfois aussi été impliqué dans l'infection humaine (Refai M *et al.*, 2014). Ces levures peuvent coloniser un individu pendant des mois ou des années et en général ne progresse jamais à l'état d'infection (Kronstad, Attarian *et al.* 2011).

L'âge semble être un facteur déterminant dans l'apparition de la cryptococcose (Galanis and Macdougall 2010). Les enfants en santé sont très peu affectés et l'incidence chez les enfants sidéens est seulement d'environ 1% (Subramanian and Mathai 2005; Severo, Xavier *et al.* 2009; Pfaller and Diekema 2010). Chez les patients non-sidéens atteints de la cryptococcose, la moyenne d'âge est ≥ 45 ans (Pfaller and Diekema 2010).

Le sexe est aussi un facteur, puisque les hommes semblent être en moyenne 3 fois plus affectés que les femmes par la cryptococcose (Chen, Sorrell *et al.* 2000; Leal, Faganello *et al.* 2008; Li and Mody 2010).

Pathogénicité :

L'agent responsable de l'infection initiale serait la spore ou la levure déshydratée (Botts and Hull 2010). Les deux sont très petites, environ 1-5 μ m, et peuvent facilement se loger dans les alvéoles pulmonaires. Par contre, puisque la levure déshydratée n'est pas très résistante, la spore serait un meilleur candidat pour survivre à l'entrée initiale dans le poumon (Botts, Giles *et al.* 2009). Les spores de *Cryptococcus* sont caractérisées par une couche très épaisse, morphologiquement différente de la surface de la levure mature et qui la protège contre le stress de l'environnement (Botts, Giles *et al.* 2009). Il est intéressant de noter que les spores de *C. neoformans* et *C. gattii* ne sont pas identiques. En effet, la spore de *C. neoformans* a une forme plutôt arrondie et une surface rugueuse parsemée de pics tandis que celle de *C. gattii* est beaucoup plus allongée et a une surface lisse. Puisque les spores sont rapidement éliminées par les macrophages alvéolaires, elles doivent activer leur germination le plus rapidement possible

(Giles, Dagenais *et al.* 2009). Elles semblent d'ailleurs auto-suffisantes en ce qui concerne les éléments nécessaires pour leur germination (Velagapudi, Hsueh *et al.* 2009).

Après avoir été phagocyté par les macrophages alvéolaires via l'interaction de $\beta(1,3)$ -glucane de la spore et Dectine-1 et CD11b de l'hôte, *Cryptococcus* doit survivre dans ces derniers (Giles, Dagenais *et al.* 2009). Dans l'environnement, les amibes sont capables de phagocyter *Cryptococcus*, et selon les chercheurs, les tactiques d'évasion que *Cryptococcus* a dû, au cours de l'évolution, développer pour survivre dans les amibes sont aussi utilisées dans les macrophages (Greub and Raoult 2004). La levure *Cryptococcus* est capable de survivre et de bourgeonner dans l'environnement acide induit par les compartiments de lysosomes des macrophages (Levitz, Nong *et al.* 1999). Il faut aussi noter la formation de vésicules remplies de polysaccharides et une perméabilité de la membrane des phagosomes dans le cytoplasme des macrophages ayant phagocyté les levures. Ces vésicules, sécrétées par *Cryptococcus* renferment des polysaccharides nécessaires à la formation de la capsule. La levure produit aussi des vésicules qui contiennent des éléments nécessaires à sa virulence et à sa survie, soit les enzymes laccase, phospholipase B et uréase et les exporte dans le cytoplasme des macrophages (Rodrigues, Nakayasu *et al.* 2008).

5. Les facteurs de virulences :

Cryptococcus possède trois facteurs de virulence principaux : une capacité de croissance à 37°C, la synthèse de mélanine et la formation d'une capsule.

5.1. Croissance à 37°C

C. neoformans et *C. gattii* sont les seuls *Tremellalles* capables de pousser de façon optimale à une température au-dessus de 30°C (Perfect, 2006). Ceci leur confère donc un avantage au niveau de l'établissement d'une infection, puisque la température corporelle de l'homme est de 37°C. Plus de 20 gènes ont été démontrés comme nécessaires à la croissance à 37°C et probablement beaucoup d'autres n'ont pas encore été découverts (Perfect, 2006).

5.2. Synthèse de mélanine

La mélanine est une substance brun foncé à noir qui se loge dans la membrane cellulaire et protège contre la phagocytose par les amibes, les enzymes hydrolytiques de microbes et les rayons UV dans l'environnement. De plus, elle protège aussi *C. neoformans* et *C. gattii* contre les températures extrêmes, le stress oxydatif et les métaux lourds (Frasers, Salazar *et al.* 2007).

5.3. La capsule

La capsule est le facteur de virulence le plus important chez *C. neoformans* et *C. gattii*. Elle procure une barrière physique en empêchant la phagocytose, inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, réduit la production d'anticorps, empêche la reconnaissance par le complément et réduit la migration des leucocytes (**Lupo, Chang et al. 2008; Cordero, Frases et al. 2011**).

Dans le cerveau, la capsule inhibe grandement la réponse en cytokines et chimiokines induite par les cellules microgliales (**Goldman, Song et al. 2001**). La structure et l'épaisseur de la capsule varient selon le lieu de la levure chez l'hôte, par exemple la capsule est plus mince dans le cerveau et plus épaisse dans les poumons (**Charlier, Chretien et al. 2005**).

Puisque les souches de *Cryptococcus* varient dans la composition de leur capsule, il est important de noter que c'est cette caractéristique qui confère à certaines souches une meilleure survie chez l'hôte, puisque des chercheurs ont constaté que lorsqu'ils infectent un hôte avec plusieurs souches, dans chaque organe infecté, il y a sélection des souches les mieux adaptées à cet organe (**Garcia-Hermoso, Dromer et al. 2004**).

Les souches qui possèdent une capsule plus mince, par exemple *C. gattii* R265, la principale souche responsable de l'éclosion de cryptococcose en Colombie-Britannique, induisent une plus forte réponse inflammatoire dans les poumons, une plus grande production de NO par les macrophages et ainsi la présence de grosses lésions granulomateuses dans les poumons (**Fonseca, Nohara et al. 2010; Gupta and Fries 2010**). Il est donc important de noter que dans les mêmes conditions environnementales, les isolats cliniques agissent différemment (**Alanio, Desnos-Ollivier et al. 2011**). La souche joue donc aussi un rôle dans la pathogénèse.

5.4. Autres facteurs de virulence importants

La sécrétion d'enzymes extracellulaires (laccase, phospholipase et uréase) est aussi un facteur de virulence important chez *C. neoformans* et *C. gattii*. Seules ces deux espèces de *Cryptococcus* produisent la laccase (**Chan and Tay, 2010**). La laccase est retrouvée dans le cytoplasme, la membrane cellulaire et la capsule. Elle contribue à la virulence par la synthèse de mélanine en utilisant des composés phénoliques et des flavonoïdes des plantes dans l'environnement (**Fowler et al., 2011**).

La phospholipase B (PLB) qui joue un rôle dans la biogénèse et le remodelage de la membrane de la levure peut se lier au DPPC (di-palmitoyl-phosphatidylcholine) et au PG (phosphatidylglycérol) des cellules épithéliales du poumon et hydrolyser les phospholipides à la

surface de celles-ci, augmentant ainsi la pénétration des levures et la dissémination (**Djordjevic, 2010**).

L'urease est un facteur important de virulence de *Cryptococcus*, surtout dans l'infection système nerveux central (**Cox et al., 2000**). La transmigration vers le cerveau est uréasedépendante. L'urease entraîne la sequestration de *Cryptococcus* dans les micro-capillaires à la barrière hémato encéphalique, facilitant donc l'invasion du cerveau (**Shi et al., 2010**).

Les superoxydes dismutases convertissent les radicaux libres, toxiques pour *Cryptococcus*, en peroxyde d'hydrogène et oxygène moins toxiques pour la levure (**Cox et al., 2000**).

L'inositol est un précurseur des phosphatidylinositols, un élément essentiel pour maintenir l'intégrité de la membrane de *Cryptococcus*. Le système nerveux central est riche en inositol et c'est probablement à cet endroit que *Cryptococcus* se l'approprie, expliquant en partie le neurotropisme de cette levure (**Reynolds, 2009**).

6. Traitement De La Cryptococcose

Le traitement idéal des différentes formes cliniques de la cryptococcose n'est pas encore établi. Plusieurs antifongiques sont utilisables :

6.1. L'amphotéricine B (AmB)

L'amphotéricine B agit sur la membrane cytoplasmique du champignon (**Figure n°6**). En médecine humaine, l'amphotéricine B est le seule polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes. Elle possède une forte affinité pour l'ergostérol, principal constituant de la membrane, avec lequel elle va former un anneau de 8 molécules d'AmB reliées de manière hydrophobe aux stérols de la membrane fongique (**Figure n°7**) (**Palacios et al., 2011**). Ce complexe forme un port au travers duquel les ions monovalents vont s'échapper. L'altération de la perméabilité de la paroi conduit à la mort du champignon : l'AmB est fongicide (**Sanglard et Bille, 2003**).

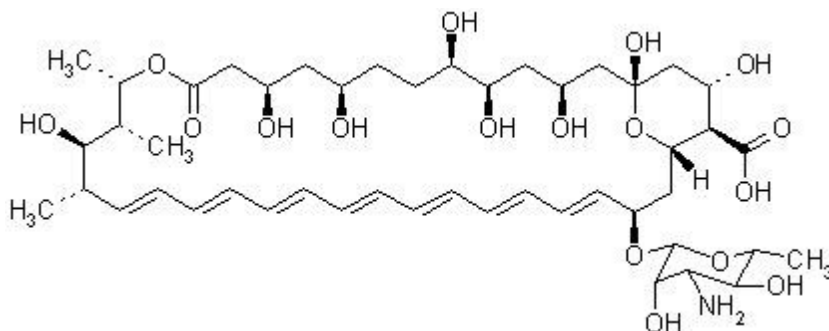


Figure n°6 : structure chimique de l'Amphotéricine B (**Palacios et al. 2011**).

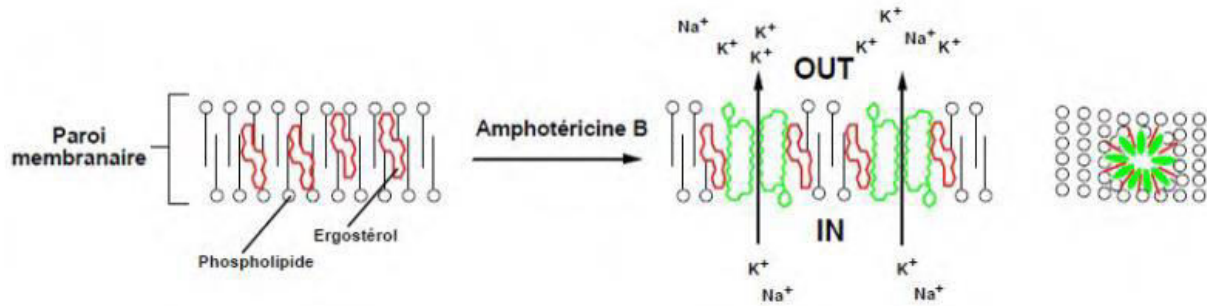


Figure n°7: mécanisme d'action de l'Amphotéricine B (Palacios et al. 2011).

6.2. Le 5-fluorocytosine

La 5-FC est une pyrimidine fluorée découverte à la fin des années 1950, qui va perturber la synthèse des acides nucléiques du champignon. Elle pénètre dans la cellule par une perméase (cytosine-perméase), elle est désaminée puis subit 3 phosphorylations pour aboutir à la 5-fluorouridine qui peut s'intégrer à l'acide ribonucléique (ARN) du champignon, et rentrer en compétition avec l'uracile endogène. Cette incorporation altère ou bloque la traduction de l'ARN (**Figure n°8**). Une autre voie de métabolisation donne de la 5-fluorodeoxyuridine, sous forme de monophosphate, qui inhibe l'enzyme thymidilate-synthétase (enzyme cruciale dans la synthèse de thymidine) qui intervient dans la biosynthèse de l'ADN. Ces actions combinées conduisent à l'arrêt de la croissance du champignon et à sa mort (Sanglard et Biller, 2003).

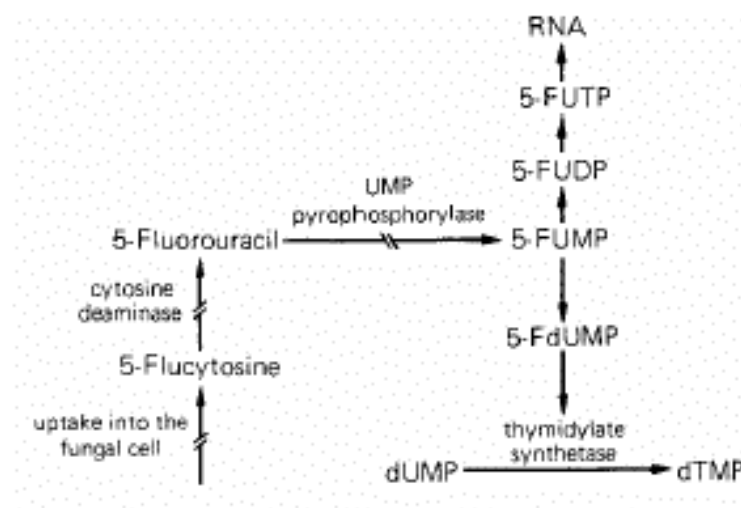


Figure n°8: mode d'action de la 5-FC (Dannoui, 2007).

La 5-FC présente peu d'effets secondaires, car elle est sélective pour les cellules fongiques, en effet, il n'existe pas de cytosine-désaminase dans les cellules de mammifères. La 5-FC est active le plus souvent sur *Candida* spp. (sauf *C. krusei*) et *C. neoformans*, avec des

CMI basses de l'ordre de 0,5 à 4 µg/mL. Par contre, elle est inefficace sur la plupart des champignons filamenteux. Les effets secondaires sont de type digestif, hépatique (cytolyse), hématologique (anémie, thrombopénie, leucopénie, aplasie, agranulocytose) (**Chabaud A, 2012**).

6.3. Les azolés :

Les azolés, les imidazolés et les triazolés, sont caractérisés par la présence d'un noyau azolé, c'est-à-dire d'un cycle pentavalent comportant deux (imidazolés) ou trois (triazolés) atomes d'azote. Les différents radicaux et chaînes latérales qui peuvent venir s'y greffer influencent la pharmacocinétique, voire le spectre d'activité des molécules de cette famille (**Carbon et al., 1994**).

Leur mécanisme d'action consiste en une inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique. Les azolés inhibent le cytochrome P450 nommé Erg11p, produit du gène ERG11, qui intervient dans la déméthylation du lanostérol en position 14 α . Cela a pour conséquence un blocage de la synthèse d'ergostérol et une accumulation de stérols méthylés en 14 α (lanostérols, éburicol, obtusifolione, etc) qui provoqueront un ralentissement de croissance des cellules fongiques, d'où un effet seulement fongistatique. L'efficacité des azolés s'explique par leur plus grande affinité pour la 14 α -déméthylase fongique que pour celle de l'homme. Les azolés interviennent aussi au niveau du métabolisme oxydatif et peroxydatif, ils déclenchent l'accumulation de peroxyde d'oxygène qui aboutit à l'asphyxie de la cellule fongique (**Chabasse et al., 1999**).

7. Mécanismes de la résistance aux antifongiques (Guillot J et Dannaoui E, 2015).

En mycologie médicale, on distingue deux types de résistance :

- La résistance intrinsèque, naturellement présente chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre.
- La résistance acquise, induite par un processus de sélection génétique sous l'effet de l'application répétée d'un antifongique.

La résistance intrinsèque peut être due à une absence de concentration de l'antifongique dans la cellule ou à une faible affinité de l'antifongique pour sa cible. Ce processus est bien connu pour la levure *Candida krusei*, naturellement résistante au fluconazole.

L'emploi fréquent de cet antifongique en médecine humaine, en prophylaxie ou en traitement curatif lors des candidoses a eu pour conséquence le remplacement progressif de

l'espèce endogène sensible, *Candida albicans*, par d'autres espèces du genre *Candida* (dont *C. krusei*, *C. glabrata* ou *C. parapsilosis*) (**Guinea, 2014**).

La résistance naturelle de la moisissure *Aspergillus terreus* à l'amphotéricine B est également décrite. Plus récemment, la moindre sensibilité du dermatophyte géophile *Microsporum gypseum* vis-à-vis de la griséofulvine a été rapportée (**Nardoni et al. 2013**). La résistance acquise est un processus dynamique qui peut potentiellement être observé chez n'importe quelle espèce fongique et vis-à-vis de n'importe quelle molécule antifongique.

Les mécanismes moléculaires qui rendent compte de ce mode de résistance incluent :

- (i) la modification de la cible de l'antifongique (liée à une ou plusieurs mutations du gène codant pour la cible) ;
- (ii) la surexpression de la cible de l'antifongique (par exemple liée à une modification du promoteur du gène) et
- (iii) la surexpression de pompes membranaires d'efflux (qui réduisent rapidement la concentration d'antifongiques dans la cellule fongique) (**Cuenca-Estrella, 2014**).

La résistance à la flucytosine apparaît rapidement lorsque la molécule est utilisée seule et est liée à un déficit combiné de sa pénétration (altération d'une purine-cytosine perméase) ou de son métabolisme (altération de la cytosine désaminase ou UMP pyrophosphorylase) dans les cellules fongiques (**Dannaoui et al. 2012**).

La résistance vis-à-vis des azolés apparaît fréquemment lorsque la cible (14- α -déméthylase) est modifiée. Cette enzyme intervient dans la synthèse de l'ergostérol membranaire et est codée par le gène Cyp51 (encore appelé ERG11).

Matériel et Méthodes

Objectif de travail

Ce projet de thèse débuté en Janvier 2012, reposait sur quatre parties :

La première partie: l'identification des isolats d'actinomycètes isolées des eaux du lac El Melleh d'El Kala. Plusieurs tests morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été réalisés. L'identification moléculaire par amplification de l'ADNr16S a été utilisée. Les actinomycètes sont régulièrement criblés pour la production de nouveaux composés bioactifs grâce à leur grande diversité métabolique. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la recherche de molécules biologiquement actives produites par nos isolats: enzymes et antifongique. Ces composés bioactifs ont une grande valeur commerciale, biologique et thérapeutique et peuvent être exploités en domaine industriel, médical et environnemental.

La deuxième partie de ce travail s'est orientée sur l'étude du *Cryptococcus*, une souche fongique prédominante dans la morbidité et la mortalité chez les hôtes immunodéprimés avec une prévalence de leur résistance aux traitements thérapeutiques actuels. Une collection d'isolats de cette levure a été obtenue à partir de plusieurs types d'échantillons, ensuite un ensemble de tests d'identification avec une étude de leur profil de sensibilité aux antifongiques commercialisés a été réalisé.

La troisième partie de cette étude, s'est reposée sur la recherche de l'activité antifongique des actinomycètes vis-à-vis les isolats de *Cryptococcus*. Les isolats d'actinomycètes les plus performants sur la levure feront l'objet d'une optimisation des conditions de production des métabolites antifongiques.

Dans la quatrième partie, une étude préliminaire des antifongiques produits et extraits par le choix de meilleures conditions de productions a été réalisée. Ainsi, et pour caractériser ces molécules, une séparation des substances bioactives par chromatographie sur couche mince, l'étude spectrale de l'extrait antifongique par spectrophotométrie UV-Visible et HPLC a été effectuée.

I. Étude des actinomycètes

1. Présentation du site

Le Parc National d'El Kala, est l'un des plus grands parcs nationaux d'Algérie. Il a été créé par décret le 23 juillet 1983 et depuis 1990, il est classé Réserve de la Biosphère dans le réseau des réserves du programme MAB (Man And Biosphère) de l'UNESCO. Ce territoire est caractérisé par l'existence de cinq grands types d'habitats de haute valeur écologique. L'habitat forestier, l'habitat rupicole, l'habitat dunaire, l'habitat littoral et les zones humides (les Lacs El Mellah, Oubeira, Tonga et des Oiseaux sont classés sites Ramsar). Caractérisé par une importante mosaïque d'écosystèmes, le PNEK abrite une richesse faunistique et floristique diversifiée qui lui confère une grande importance dans le bassin méditerranéen (**Benyacoub et al., 2000 ; Kherifi et Kherici, 2012**).

Situé à 36° 53'N et 08° 20' E (**figure n°9**), Le lac Mellah est une ancienne vallée fluviale qui s'est transformée en lagune après avoir été envahie par l'eau marine. C'est l'unique lagune qui existe en Algérie. Le double échange du lac Mellah avec son bassin versant de 81,45 Km² de surface et avec la mer grâce à un chenal de 1,50 m de profondeur au contact du lac et 0,50 m à l'embouchure et long d'environ 1 Km, lui confère une grande biodiversité. Ces échanges permettent de maintenir un volume d'eau moyen du Mellah de 24 millions de m³ étalés sur une surface de 8,76 Km² avec des profondeurs maximales de 5,20m et une alimentation pluviale annuelle de 800 mm. Tous les 21 mois, le lac Mellah renouvèle ses eaux avec des taux mensuels d'environ 1,13 millions de m³. Les fluctuations saisonnières de la température, entre 14 et 29.7°C, sont aussi dues à la variabilité de la salinité allant de 29 à 37 ‰, tout en restant étroitement liée aux phénomènes des marées qui affectent le lac, montrant ainsi l'importance des échanges hydrologiques, biologique et thermiques entre ce dernier et la mer (**Retima, 1999 ; Benyacoub et al., 2000 ; Baba- Ahmed, 2008**).



Figure n°9 : position géographique du lac El Mellah (Loucif Nabil et *al.*, 2009)

2. Origine des actinomycètes :

L'importance des actinomycètes dans le domaine biotechnologique a attiré l'intérêt de plusieurs chercheurs et a été le sujet de multiples études.

Dans le but d'étudier la biodiversité, la taxonomie ainsi que les molécules bioactives naturellement produite par ces actinomycètes, plusieurs recherches sur plusieurs sites : lac Oubeira, lac El Mellah, lac Fetzara, ont été dirigé par Pr. GACEMI KIRANE D. Ce thème original entre dans le cadre de l'exploitation et la valorisation de la biodiversité actinomycétique des zones humides d'importance internationale dans la région méditerranéenne.

Les résultats obtenus par les études réalisés par cette équipe sont prometteurs citant : les résultats obtenus par Loucif L en 2006 et 2015, Cheraiti N en 2007, Morakchi H en 2011 et Ayari A en 2012 sur le lac Oubeira, ainsi que les résultats obtenus par Alliouch-Kerboua C en 2015 et Benouagueni S en 2016 sur le lac El Mellah; et ont incité à poursuivre les efforts de recherche dans cette thématique afin de sélectionner des espèces doués d'activités biologiques intéressantes pouvant être exploités en bioindustries.

Pendant la réalisation de ces études, une souche-thèque a été formée, les isolats d'actinomycètes ont été, purifiés et conservés sur des milieux gélosés.

À partir de cette souche-thèque, 20 isolats d'actinomycètes m'ont été confiés. Ces derniers sont soumis à un ensemble d'études de différents caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaire dans le but de leur identification.

3. Étude morphologique :

3.1. Caractères cultureux :

Les caractéristiques culturelles et morphologiques sont déterminées selon la méthode préconisée par Shirling et Gottlieb (1966) lors de « *l'International Streptomyces Project* ». Les milieux utilisés sont les suivants : ISP1 (Tryptone-extrait de levure agar), ISP2 (Extrait de levure-extrait de malt-agar), ISP3 (Farine d'avoine-agar), ISP4 (sels inorganique-amidon-agar) et l'ISP5 (Glycérol-asparagine-agar), la composition de chaque milieu est la suivante :

ISP1 : extrait de levure 3 g, tryptone 5 g, agar 20 g, H₂O qsp 1l.

ISP2 : extrait de levure 4 g, extrait de malte 10 g, dextrose 4 g, agar 20 g, H₂O qsp 1l.

ISP3 : farine d'avoine agar (gruau d'avoine 20 g, agar 18 g), ajouter 1ml d'une solution saline, agar 20 g, H₂O qsp 1l

ISP4 : amidon soluble 10 g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄ 1g, NaCl 1g, (NH₄)₂SO₄ 2g, CaCO₃ 2g, ajouter 1 ml de solution saline, agar 20 g, H₂O qsp 1l.

ISP5 : glycérol 10 g, L-asparagine 1g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄ 0,5 g, ajouter 1 ml de solution saline, agar 20 g, H₂O qsp 1l.

Solution saline : FeSO₄. H₂O (1g /l), MnCl₂.4H₂O (1g /l) et ZnSO₄.7H₂O (1g/l)

L'évaluation de la croissance et du développement du mycélium aérien sur chaque milieu est observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C.

La couleur du mycélium aérien et du substrat est déterminée par l'utilisation de la charte de couleur « ISCC-NBS » de Kelly et Judd (1955).

3.2. Aspect macroscopique et microscopique

L'observation macroscopique du mycélium aérien des colonies a été réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire.

L'observation de la morphologie des chaînes de spores a été réalisée à l'aide d'un microscope optique (G X 100).

4. Étude physiologique

L'identification des espèces appartenant aux genres d'actinomycètes, nécessite en plus des caractères morphologiques, des caractères physiologiques et biochimiques. Les isolats ont subi 56 testes habituellement utilisés dans la systématique des actinomycètes.

4.1. Production de pigments mélanoides :

D'après **Shiling et Gottlieb (1966)**, les milieux **ISP6** (peptone 15g, protéose peptone 5g, citrate de fer ammoniacal 0,5g, thiosulfate de sodium 0,08g, extrait de levure 1g/l, K_2HPO_4 1g agar 20g, H_2O qsp 1l) et **ISP7** (glycérol 20g, L-asparagine 1g, K_2HPO_4 0,5 g, NaCl 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g, agar 20g, H_2O qsp 1l) sont utilisés pour la mise en évidence des pigments mélanoides et diffusibles. L'observation de la couleur brune caractéristique de ces pigments se fait au 7^{ème} et 14^{ème} jusqu'aux 21 jours à 28°C, en comparaison avec les milieux témoins non ensemencés, incubés dans les mêmes conditions.

4.2. Hydrolyse de l'amidon :

L'hydrolyse de l'amidon est réalisée selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**, sur le milieu nutritif gélosé, l'amidon soluble est ajouté à 1%, après 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte par une solution de lugol, l'hydrolyse se manifeste par la formation d'un halo blanc autour des colonies (absence de coloration autour des colonies).

4.3. Hydrolyse de la gélatine :

Selon la méthode de **Waksman (1961)**, une suspension de l'isolat est réalisée en eau physiologique (environ 5ml), une bandelette de film photographique stérile est ajoutée à la suspension. Après incubation à 28°C pendant 7 jours, l'éclaircissement du film photographique est marqué positif. Un tube d'eau physiologique contenant une bandelette de film photographique non ensemencé servira de témoin négatif.

4.4. Hydrolyse de la caséine :

Selon **Gordon (1974)**, 10g de caséine dissout dans 100ml d'eau distillée, puis stérilisés à l'autoclave. 100ml d'eau distillée contenant 3,6g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles.

Après incubation à 28°C pendant 7 jours, une caséinase positive se manifeste par l'apparition d'une auréole claire autour des colonies.

4.5. Dégradation de la cellulose :

Dans un tube à essai contenant 9ml de milieu ISP9 liquide (sans source de carbone) : $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 2.64 g, KH_2PO_4 5.38 g, K_2HPO_4 5.65 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, Solution saline 1 ml, agar 20 g, H_2O psq 1L). On ajoute une bandelette de papier wattman N° 1 stérile (comme unique source de carbone). Les milieux sont ensemencés avec l'isolat test et un tube non ensemencé servira de témoin (**Boulahrouf *et al.* 1986**).

Après 21 jours d'incubation à 28°C, une réaction positive se manifeste par la décomposition de la bandelette du papier.

4.6. Recherche de l'uréase :

La recherche de l'uréase est effectuée en mettant 4 gouttes du milieu Urée-indole (couleur jaune) dans 4,5 ml d'eau physiologique puis les ensemencées par l'isolat d'actinomycète (**Lanyi B., 1987 ; Kitouni, 2007**). Après une incubation à 28°C pendant 24h, une uréase positive se manifeste par le virage de la couleur du milieu vers le rouge.

4.7. Recherche de la production d'indole :

Les isolats sont ensemencés dans 4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu Urée-indole. La lecture est effectuée après 24h d'incubation à 28°C. 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées à 1 ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface (**Lanyi B., 1987 ; Kitouni, 2007**).

4.8. Croissance à différentes températures :

Le test de croissance à différentes températures a été réalisé sur le milieu ISP2, la croissance des isolats est observée après 7 jours d'incubation, les températures testés sont les suivantes : 10°C, 29°C, 37°C, 45°C.

4.9. Croissance à différentes valeurs de pH :

Le test de croissance à différents pH a été réalisé sur le milieu ISP2, la croissance des isolats est observée après 7 jours d'incubation à 28°C, les pH testés sont les suivants : 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

4.10. Utilisation des composés glucidiques comme seul source de carbone :

Cette étude est réalisée sur le milieu de base ISP9 selon la technique de **Pridham et Gottlieb (1948)**. Les différentes sources de carbone testées sont les suivantes : galactose, raffinose, L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, D-mannitol, D-xylose, saccharose, sorbitol, D-melibiose, mannose.

Les glucides stérilisés par filtration sur une membrane Millipore (0,45µm), sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1%. Après incubation à 28°C pendant 21 jours, la lecture est réalisée en comparant la croissance des actinomycètes en présence des glucides avec un témoin positif et un témoin négatif.

- le glucose est utilisé comme témoin positif.
- le milieu SP9 sans source de carbone comme témoin négatif.

4.11. Utilisation du citrate comme seul source de carbone :

Ce test est réalisé en ensemençant le milieu citrate de Simmons. Après une incubation à 28°C pendant 7 jours, une lecture quotidienne a été effectuée dont le résultat positif se manifeste par un virage du vert en bleu **Kitouni (2007)**.

4.12. Utilisation d'acide aminé comme seul source d'azote :

Cette étude est réalisée sur le milieu de base ISP9 selon la technique de **Williams et al (1983)**. Les différentes sources d'azotes testées sont les suivantes : Valine, Asparagine, Proline, Arginine, Serine.

Les acides aminés stérilisés par filtration sur une membrane Millipore (0,45µm), sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1%. Après incubation à 28°C pendant 21 jours, la lecture est réalisée en comparant la croissance des actinomycètes en présence des acides aminés ou en leur absence (témoin négatif).

4.13. Sensibilités aux antibiotiques :

Les isolats ont été testés pour leur profil vis-à-vis des antibiotiques, en utilisant la technique des disques recommandée par **Goodfellow et Orchard (1974)**. Les antibiotiques utilisés sont présenté au **tableau n° 5**.

Tableau n°5 : Liste des antibiotiques utilisés pour le profil des actinomycètes

Famille	Classe	Génération	Antibiotique	Abreviation	Concentration
β-lactamine	Pénicilline	Pénicilline du groupe A	Ampicilline	AMP	25µg
			Amoxicilline	AMC	30µg
	Carbapénèmes		Imipénème	IPM	10µg
	Céphalosporines	1 ^{ère} génération	Céfazoline	CZ	30µg
			Cefalexine	CN	30µg
3 ^{ème} génération			Cefotaxime	CTX	30µg
	Cefixime	CFM	10µg		
Aminosides			Kanamycine	K	30µg
			Tobramycine	TM	10µg
Lincosamides			Clindamycine	CL	2µg
Macrolides			Érythromycine	E	15µg
			Spiramycine	SP	100µg
Synergistines			Pristinamycine	PR	15µg
Cyclines			Doxycycline	D	30µg
Quinolones	Fluoroquinolone		Pefloxacin	PEF	5µg
			Acide Nalidixique	NA	30µg
	Quinolone 1 ^{ère} génération		Acide Pipémidique	PI	20 µg
Oxyquinoleines			Nitroxoline	NTX	30µg

4.14. Tests de sensibilité aux molécules chimiques :

L'évaluation de la sensibilité des isolats actinomycétales vis-à-vis de certains composés a été réalisée selon la technique détaillée par **Goodfellow (1971)**. En utilisant le milieu YEA et après incubation à 28°C pendant 21 jours, la lecture est réalisée en comparant la croissance des actinomycètes en présence des molécules chimiques ou en leur absence. Les tests choisis sont :

- Le phénol a 0,1%.
- Le sodium azide a 0.001%.

5. Étude biochimique :

L'étude des caractères biochimiques a été mise en évidence par différents API Systèmes :

5.1. L'API 50CH :

La galerie API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes.

Les tests de fermentation ont été inoculés avec API 50 CHL Medium qui réhydrate les substrats (polypeptone 10 g, extrait de levure 5 g, tween 80 1 ml, phosphate dipotassique 2 g, acétate de sodium 5 g, citrate diammonique 2 g, sulfate de magnésium 0,20 g, sulfate de manganèse 0,05 g, bromocrésol pourpre 0,17 g, eau déminéralisée 1000 ml).

Après une incubation à 28°C pendant 24h, 48h et 72h, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans les tubes, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

5.2. L'API 20 NE

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux (sulfate d'ammonium 2g, agar 1.5g, solution de vitamines 10.5ml, solution d'oligoéléments 10ml, phosphate monosodique 6.24g, chlorure de potassium 1.5g eau déminéralisée qsp 1L). Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

5.3.L'API ZYM

La galerie API ZYM est une microméthode semi-quantitative, se compose de 20 cupules spécialement adaptées à l'étude des réactions enzymatiques. Le fond de la galerie est constitué d'une trame de fibres non-tissés où sont répartis les substrats synthétiques.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, qui réhydrate les substrats. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés révélés par l'addition des réactifs.

6. Identification moléculaire :

Les approches moléculaires sont souvent utilisées pour l'identification des micro-organismes pour leurs rapidités et efficacités. Parmi les méthodologies employées, la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) standard est largement pratiquée (**figure N°10**). La caractérisation phylogénique des isolats a été réalisée par des techniques adaptées et optimisées au niveau de l'unité des Rickettsies de la faculté de médecine à l'université de la Méditerranée (Marseille-France).

Le travail a été effectué dans la période de Décembre 2012 au Janvier 2013 et orienté par **Dr Roux Véronique**.

6.1. Polymérase chain reaction (PCR) (Renvoisé A., 2012) :

Le principe de la Polymérase Chain Réaction (PCR), consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible. Les réactions d'amplification des gènes codant pour l'ARN 16S sont réalisées avec des amorces spécifiques, dans un thermocycleur de type Applied Biosystems.

6.1.1. Extraction de l'ADN génomique:

L'ADN génomique a été extrait par un système entièrement automatisé à l'aide du kit Qiagen et l'appareil de l'extraction EZ1 Advanced XL selon les conditions spécifiques par les fournisseurs :

- pipeter 500 µl de Buffer G2 (tampon de digestion : 800 mM GU-HCl 30 mM Tris-HCl pH 8.0 30 mM EDTA pH 8.0 5% Tween-20 5% Triton-X100) et le mettre dans un tube à Eppendorf contenant la poudre de verre puis ajouter des colonies jeunes.

- agiter 4 fois au Fastprept (appareil d'agitation et d'homogénéisation) pendant 20 secondes afin d'assurer une lyse efficace. Il est essentiel que l'échantillon et le buffer G2 soient bien mélangés.

- après agitation récupérer 200µl du mélange (avec quelques cellules) et le mettre dans un autre tube à Eppendorf.

- ajouter 10 µl de protéinase K et incuber une nuit à 56°C.

- récupérer 200µl du mélange et le mettre dans un nouveau tube Eppendorf.

- dans l'appareil EZ1 Advanced XL, placer les cartouches de réactifs dans leurs supports, après mettre respectivement :

- 1^{er} rang : un tube à Eppendorf vide pour récupérer l'ADN pure.
- 2^{ème} rang : les Tips
- 3^{ème} rang : laisser vide
- 4^{ème} rang : l'échantillon

- Avant de lancer l'appareil de l'extraction, il faut vérifier la carte EZ1 Advanced XL de l'ADN bactérien, cette carte est préprogrammée avec des protocoles pour la purification de l'ADN.

L'EZ1 Advanced XL est un système d'extraction d'acide nucléique entièrement automatisé fournis par QIAGEN. Les acides nucléiques sont isolés à partir de lysats en une seule étape par la liaison à la surface de la silice des particules magnétiques, en présence d'un sel chaotrope. Les particules sont ensuite séparées à partir des lysats à une force magnétique. Après lavage, l'ADN ou l'ARN pur est élué (**Centre for Genomic Sciences, 2014**).

- Après extraction, 100µl d'ADN pure est recueillie et conservé à -20°C.

6.1.2. Protocole d'une PCR standard :

L'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S a été réalisée en utilisant la paire d'amorce universelle fd1 et rP2 selon **Weisburg *et al.* (1991)**.

- **fd1** : (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')

- **rP2** : (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3')

Dans une plaque de Thermocycleur Applied Biosystems, déposer 50µl de mélange réactionnel comme décrit dans le **tableau n°6**, dans chaque puits, introduire par la suite dans le thermocycleur.

Tableau n°6: composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards

Mix PCR standard pour une réaction	Quantité (µl)
Primer fd1	1
Primer rP2	1
dNTP	5
Tampon	5
Taq polymérase (FastTart)	0.25
Eau	32.75
ADN à amplifier	5
Volume total	50

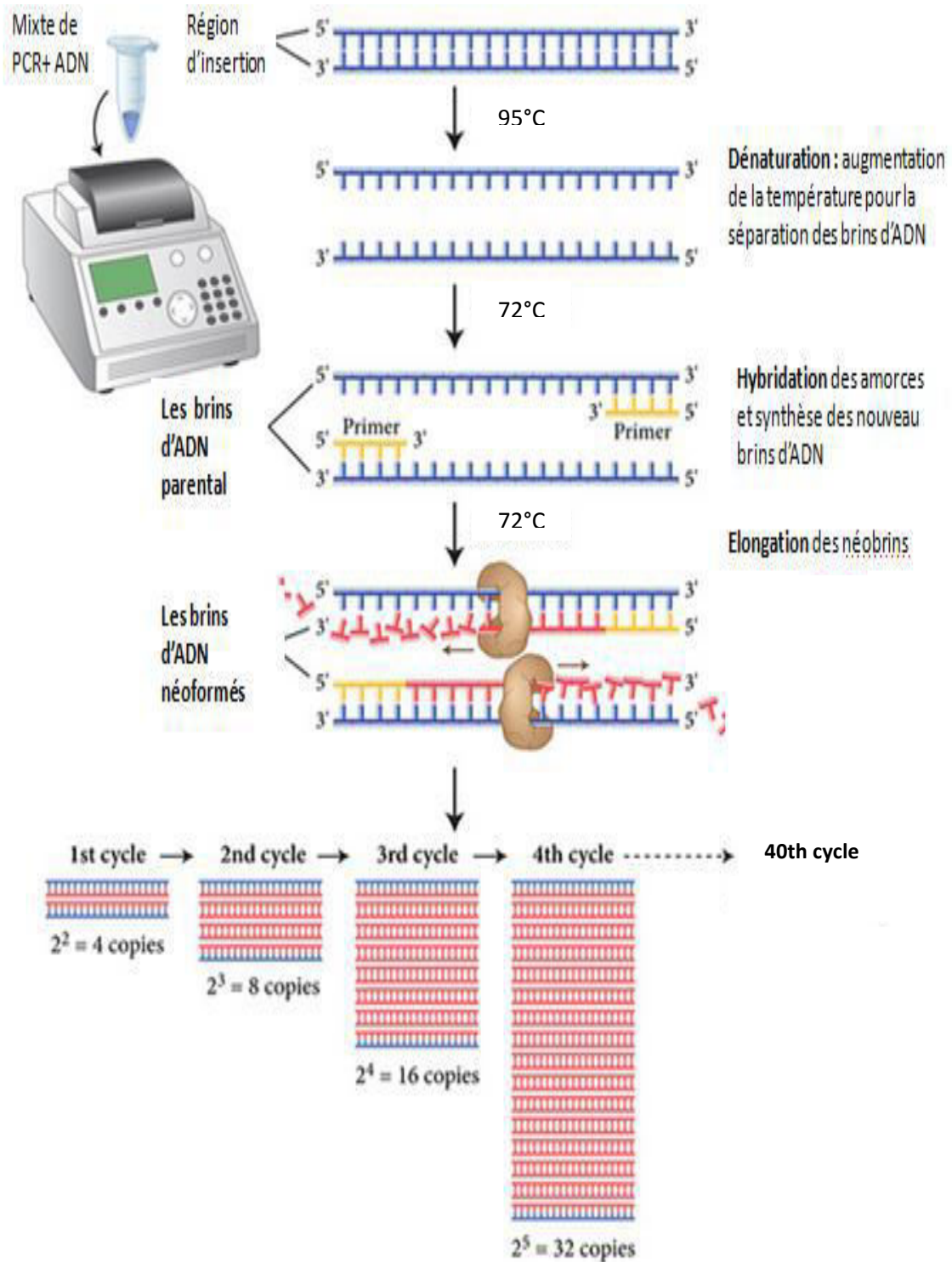


Figure N° 10 : Principe de la Polymerase chain reaction (PCR) standard (Mridha, 2015).

Les étapes de la PCR sont détaillées dans le **tableau n°7**.

Tableau n°7 : les étapes de la PCR.

Étape		Température	Temps
Dénaturation		94°C	5min
Amplification (40 cycle)	Dénaturation	95°C	30s
	Hybridation	52°C	30s
	Élongation	72°C	30s
Élongation finale		72°C	7min

6.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

La vérification de la qualité de l'extraction a été réalisée par le dépôt des produits de PCR sur un gel d'agarose à 1.5% contenant du tampon TBE à 0.5% dans une cuve à électrophorèse. La migration s'est fait pendant 20 min sous un voltage de 135V.

6.2.1. Protocole de préparation de gel d'agarose

- mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400 ml du Tampon TBE 0.5 X dans un flacon en verre stérile
- faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent puis laisser refroidir
- ajouter la solution de bromure d'éthidium BET (10µl de BET pour 50ml de gel liquide), mélanger bien, couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes
- laisser refroidir jusqu'à la solidification de gel

6.2.2. Électrophorèse de produits d'amplification

- retirer les peignes après polymérisation du gel et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 0.5X (le gel doit être totalement émergé) puis déposer 5µl du DNA marqueur de poids moléculaire [Bench Top pGEM DNA Markers] dans le premier puits
- mélanger 7 µl du produit amplifié (ADN) avec 2 µl Bleu de charge (bleu de bromophénol) et prélever 7µl du mélange et le déposer dans les puits
- déposer un témoin négatif dans le dernier puits, fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (environ 20 min). Une fois la migration finie, placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de poids moléculaire.

6.3. Séquençage :

Le séquençage a été réalisé en utilisant le Kit BigDyeTerminator v1.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3130 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur.

6.3.1. Purification

La purification de l'ADN se fait par ultrafiltration sur membrane « NucleoFast 96 PCR ». Une plaque de 96 puits dans laquelle 50 µl d'ADN et 50 µl d'eau distillé sont mélangé, ce volume est transféré dans un système d'aspiration (millipore) à 15 bar pendant 10mn. Ainsi les impuretés sont filtrées et l'ADN reste sur la membrane. Le détachement de l'ADN à partir de la membrane se réalise par l'ajout de 50 µl d'eau pure et agitation pendant 10mn à 500 tours/min.

Le produit est purifié et prêt pour la PCR BigDye.

6.3.2. PCR BigDye

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquençer par la suite. La réaction se déroule dans un volume final de 20 µl, contenant 6 µl du mixte BDV1, 4µl d'ADN et 10µl d'eau distillé.

La préparation du mixte BDV1 est réalisée comme suit : 100 µl d'amorce, 200 µl de colorant rose, 300µl de tampon BDV1.

L'ADN 16S est amplifié par l'utilisation de huit amorces d'oligonucleotides permettant le séquençage de toute sa longueur (approximativement 1500pb), ces amorces sont :

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' TGTCGTCAGCTCGTG 3') **1050R** : (5' CACGAGCTGACGACA 3')

Huit tubes de PCR pour chaque isolat sont préparés, la PCR est réalisée dans un thermo-cycler Applied Biosystems selon le programme porté dans le **tableau n°8**.

Tableau n°8 : programme de l'amplification de la PCR BigDye

Température	96C°	96C°	50C°	60C°	4C°
Temps	1min	10s	5s	3min	∞

6.3.3. Purification par Sephadex

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex G 50 de la marque sigma,

- mettre la poudre de Sephadex dans les puits de la plaque auxquels ajouter 300µl d'eau ultra pure et laisser reposer 2 heures
- après avoir mis la plaque à filtre au-dessous d'une plaque contenant des puits, centrifuger à 2600 rpm pendant 6min pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté
- déposer 20 µl de l'ADN délicatement au centre des puits de la plaque à filtre du gel Sephadex
- placer sur une deuxième plaque à puits, centrifuger à 2600 trs/mn pendant 6 mn. Ainsi, l'ADN passe à travers le gel et récupérer dans les cupules de la plaque de microtitrage de 96 puits du séquenceur,
- Recouvrir les filtrats contenant l'ADN purifié par un tapis de protection,

Le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

6.3.4. Séquençage

Sur le séquenceur Automate ABI 3130 (Applied Biosystems), remplir les fiches pour séquençage sur le logiciel. Mettre la plaque pour le séquençage sur le support et la déposer dans le séquenceur. Lancer le séquençage.

6.4. Analyse des séquences

Les séquences des fragments obtenus par les huit amorces utilisées, ont été analysées et corrigées par le logiciel ChromasPro(version 1.5.0).

Les séquences de l'ADNr 16S des isolats d'actinomycètes sont comparées avec les séquences de l'ADNr 16S des bactéries disponibles sur la base de données « GenBank » par l'utilisation du programme de comparaison des multi séquences de nucléotides « BLAST », disponible sur le site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, qui est un outil de recherche de régions de ressemblances entre séquences. Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de l'isolat à identifier avec les espèces les plus proches (Altschul *et al.*, 1990). Ensuite déterminer leur affiliation phylogénétique. Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega5 selon la méthode du «Neighbor-joining » (Tamura *et al.*, 2011).

II. Isolement et Étude de *Cryptococcus*

1. Prélèvement pathologique :

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Ibn Sina, Annaba, Algérie et le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital de la Timone, Marseille, France. Les informations des isolats sont mentionnées dans le **tableau n°9**.

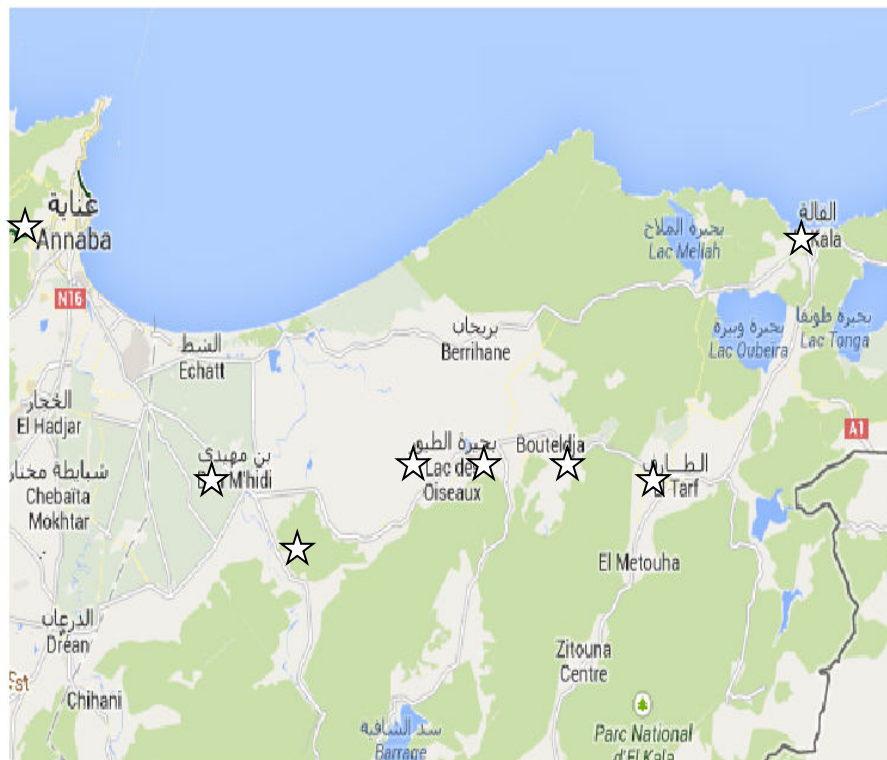
Tableau n°9: *Cryptococcus* isolat clinique.

isolats	origine	sexe	âge	date de prélèvement
CN104	sang	homme	46	2003
CN721	sang	homme	19	2007
CN954	LCR	homme	22	2003

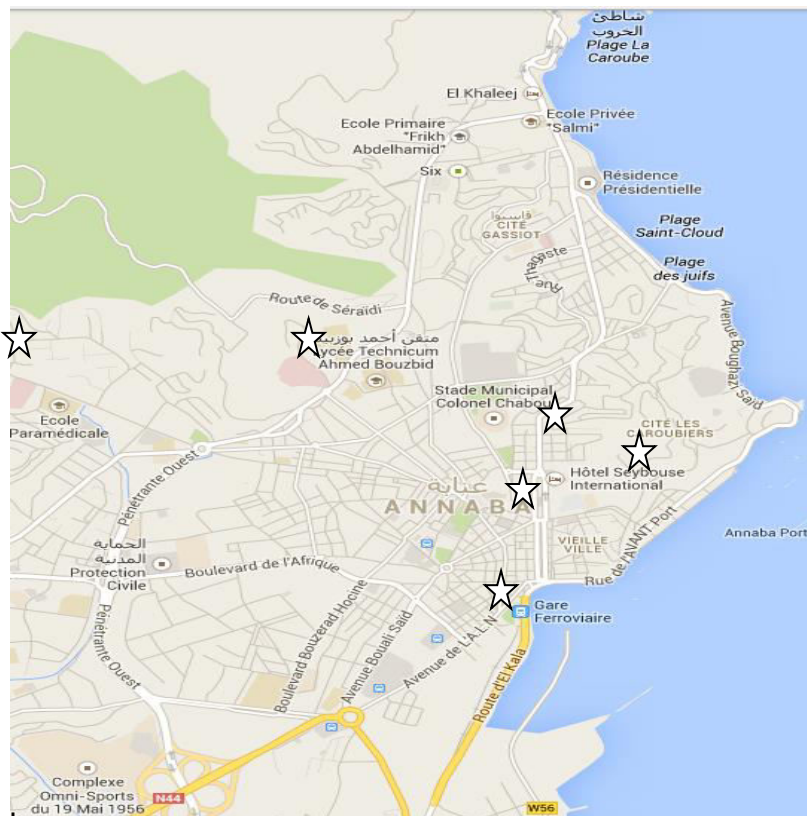
2. Prélèvement environnemental :

Les prélèvements environnementaux ont été effectués entre le mois de Mai et le mois d'Octobre 2012. **La figure n°11** montre les différentes zones de prélèvement : hôpitaux (intérieur et extérieur), polycliniques et lieux de regroupement public.

Le prélèvement a été réalisé à partir de plusieurs types d'échantillon, les fientes des pigeons, de l'air atmosphérique au tour des fientes et à partir de matériaux vivants recueillies sur les arbres d'eucalyptus. Le traitement des échantillons a été effectué selon la technique détaillé par **(Borani et al, 2006)**.



a)



b)

Figure n°11 : sites de prélèvement des échantillons : a) Site de prélèvement hors l'agglomération (Hors Annaba) : b) Site de prélèvement dans l'agglomération (Annaba).

2.1. Technique de prélèvement :

2.1.1. L'air atmosphérique :

Le prélèvement de l'air atmosphérique a été réalisé à l'aide de l'appareil SAS AIR SAMPLER Duo 360 (Bioscience International, Rockville, USA). La figure n°12 présente l'échantillonneur microbiologique portable de l'air possédant dans un seul corps deux têtes d'échantillonnage. L'échantillonnage simultané sur deux têtes nous permet d'utiliser deux milieux différents pour le même cycle d'échantillonnage réduisant considérablement le temps de surveillance.

Dans notre étude, deux milieux ont été utilisés : Sabouraud et Sabouraud+ Chloramphénicol. Le dispositif a été placé dans les sites de prélèvements des fientes et programmé pour aspirer 180l d'air par minute pendant 2 min. Les boîtes de Pétris sont ensuite transférées immédiatement au laboratoire et incubées à 30°C pendant 8 jours avec observation quotidienne (**Borani et al, 2006**).



Figure n°12: prélèvement de l'air atmosphérique par l'appareil SAS AIR SAMPLER Duo 360.

2.1.2. Fiente des pigeons :

Selon **Soares et al (2005)**, prélever délicatement les fientes à l'aide d'une spatule stérile, les mettre dans des tubes stériles, puis transférer les échantillons immédiatement au laboratoire.

2.1.3. Les arbres des Eucalyptus :

Le prélèvement à partir des arbres d'Eucalyptus a été réalisé selon la technique détaillé par Yehia A. *et al*, (2000).

- prélever à partir de chaque arbre séparément les fleurs, les fruits, les feuilles, l'écorce, le bois, les débris et le sol.
- mettre les échantillons dans des tubes stériles
- transférer les échantillons immédiatement au laboratoire

2.2. Traitement des échantillons :

Les échantillons de fiente de pigeon et d'Eucalyptus ont été mis en suspension dans l'eau physiologique stérile à un rapport de 1: 5. Après une agitation au vortex pendant 5 min, les tubes ont été laissé sédimenter pendant 20mn. 0.5ml du surnageant ont été inocuées sur le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA) additionné de (0,1 g/l) de chloramphénicol.

Les boites sont incubées à 30°C pendant 8 jours et examinées quotidiennement.

3. Identification:

L'identification est réalisée selon les tests macroscopiques, microscopiques, biochimiques et moléculaires.

3.1. Identification macroscopique et microscopique :

Selon l'aspect macroscopique des isolats :

- Une coloration à l'encre de chine a été réalisée aux colonies présentant l'aspect de la levure *Cryptococcus* : lisse, humide, luisante avec une couleur crème à brune.

3.2. Identification biochimique :

L'étude des caractères biochimique des levures suspectées a été réalisée par le system ID32C, un système standardisé pour l'identification des levures, qui utilise 32 essais d'assimilation de sucre miniaturisés.

Après incubation à 30°C pendant 24 à 48h, la lecture se fait visuellement en comparant au contrôle négatif, une réaction positive se traduit par la présence de trouble dans la cupule.

3.3. Identification moléculaire :

3.3.1. Technique :

L'ADN Fongique a été extrait en utilisant le kit de tissus EZ1 ADN avec l'appareil de l'extraction EZ1 advanced XL. Les colonies ont été incubées dans 200 µl de tampon G2 et 10µl de protéinase K à 56 °C jusqu'à ce que la lyse totale. L'ADN a été ensuite purifié comme décrit par le fabricant et élué dans 100 µl de tampon.

Les primers D1 et D2 ont été utilisés pour amplifier la région variable D1-D2 de 26 S et les amorces ITS3 (Farwerd) et ITS4 (reverse) ont été utilisés pour amplifier l'espaceur interne transcrit 2 (ITS2) du gène de l'ARN ribosomique, comme décrit dans **Cassagne et al.(2013)**.

Les **tableaux n°10 et n°11** présente les caractéristiques et les séquences de l'extrémité 5' du domaine 26 S ADNr D1/D2 et la région 5.8 S-ITS de l'ARNr (ITS) qui sont les régions les plus fréquemment séquencés pour l'identification de levure (**Libkind et Sampaio, 2009**).

Le séquençage a été réalisé en utilisant l'automate ABI 3130 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur.

Les séquences obtenues ont été comparés contre les séquences nucléotidiques déposées dans GenBank en utilisant le programme BLAST via le serveur NCBI et la Société internationale de Mycologie humaine et animale (ISHAM) –ITS reference DNA barcoding database.

Tableau n°10: liste des amorces utilisées pour l'identification des *Cryptococcus*.

Primer	Séquences
D1	5' AAC TTA AGC ATA TCA ATA AGC GGA GGA 3'
D2	5' GGT GCC TGT TTC AAG ACG G 3'
ITS3	5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3'
ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

Tableau n°11 : caractéristiques de régions amplifiées.

Région	Caractère région	Reference
Domaine D1/D2	-hautement conservée -base de données plus complète -fournit une identification précise	Cassagne et al. (2013)
ITS2	-plus variable - base de données moins complètes -utile pour l'analyse des espèces étroitement liées	White et al. (1990)

4. Étude de la sensibilité de *Cryptococcus* aux antifongiques par la méthode de dilution en milieu liquide à l'aide du kit Sensititre Yeast One

Le système de sensibilité Sensititre est un produit de diagnostic in vitro destiné à tester la sensibilité des levures non-exigeantes dont *Candida* et *Cryptococcus* à divers antifongiques, les fourchettes de dilution de ces antifongiques sont mentionnées dans le **tableau n°12**. La **figure N°13** représente cette méthode de microdilution en milieu liquide qui fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). (**Espinel-Ingroff et al., 2004 ; Linares et al., 2004 ; Pfaller et al., 2012**).

Tecnique :

Prélèver plusieurs colonies bien isolées dans une culture pure de 48 à 72 heures de l'isolat de *Cryptococcus*, et elles sont émulsifiées dans de l'eau physiologique stérile. La suspension est agitée au Vortex pendant 15 secondes, en veillant à ce que la suspension soit uniforme. Ajuster la densité selon une norme 1 McFarland à l'aide du turbidimètre.

Ensuite, transférer 20µl de la suspension dans 11 ml de milieu liquide d'inoculum Yeast One, pour obtenir un inoculum de $1,5$ à 8×10^3 cellules/ml. Le milieu liquide est versé dans une cuve d'ensemencement stérile et 100µl sont inoculés dans chaque cupule de la plaque à l'aide d'une micropipette multicanaux. Couvrir toutes les cupules avec la fermeture adhésive et les plaques sont Incubées à 30°C pendant 72 heures (**Pfaller M.A. et al, 2012**).

Les souches *Candida krusei* ATCC® 6258 et *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 sont utilisées comme souche de contrôle qualité.

Lecture

Les plaques sont lues visuellement sous l'éclairage normal, à l'aide d'un miroir de lecture présentant le dessous des cupules. La croissance des levures dans les solutions antifongiques est mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu (négatif) au rouge (positif). Certaines levures peuvent ne pas faire virer complètement l'indicateur au rouge, mais entraînent une prise de teinte pourprée notamment pour les azolés.

La CMI représente concentration minimal d'un antifongique qui inhibe substantiellement la croissance de l'organisme, comme le détecte le changement de couleur. Le degré de changement de couleur dans les cupules contenant l'antifongique est comparé à la couleur des cupules de contrôle de croissance positive.

- L'organisme est résistant à la plus haute concentration de l'antifongique quand la croissance est observée dans les cupules.
- Pour l'amphotéricine B à 24 heures, les points de virage se définissent en général facilement et la CMI est lue comme la plus faible concentration en antifongique empêchant tout changement de couleur discernable (premier puits bleu).

- La flucytosine et les azolés, tels que le fluconazole, l'itraconazole, le kétoconazole, le voriconazole et le posaconazole peuvent donner des points de virage en général moins tranchants en raison de la croissance diffuse. La CMI est lue comme la première cupule montrant un virage moins intense comparé à la cupule de contrôle à croissance positive.

Tableau n°12 : antifongiques utilisés et dilutions des plaques Sensititre Yeast One.

Position	Antifongique	Abréviation	Fourchette de dilution (µg/ml)
A1	Control de croissance	+ cont	
A2-A12	Posaconazole	PZ	0,008-8
B1-B12	Amphotéricine B	AB	0,008-16
C1-C12	Fluconazole	FZ	0,125-256
D1-D12	Itraconazole	IZ	0,008-16
E1-E12	Kétoconazole	KZ	0,008-16
F1-F12	Flucytosine	FC	0,03-64
G1-G12	Voriconazole	VOR	0,008-16
H1-H12	Caspofungine	CAS	0,008-16



YeastOne®												
POS	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	
AB 0.008	AB 0.015	AB 0.03	AB 0.06	AB 0.12	AB 0.25	AB 0.5	AB 1	AB 2	AB 4	AB 8	AB 16	
FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256	
IZ 0.008	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	
KZ 0.008	KZ 0.015	KZ 0.03	KZ 0.06	KZ 0.12	KZ 0.25	KZ 0.5	KZ 1	KZ 2	KZ 4	KZ 8	KZ 16	
FC 0.03	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	
VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	VOR 16	
CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	CAS 16	

Figure n°13 : la plaque Sensititre Yeast One (Prasanna S. et al., 2016).

III. Mise en évidence de l'activité antifongique

L'activité antifongique des isolats d'actinomycètes est évaluée à l'aide de deux testes qui permettent de dissocier les températures et les temps d'incubation des isolats productrices de ceux des isolats utilisées pour la mise en évidence d'une activité éventuelle.

1. Technique de la double couche : (Bastide *et al*, 1986)

La méthode de double couche consiste à ensemercer ponctuellement (en touche de 10 mm de diamètre) l'isolat d'actinomycète, au centre d'une boîte de Pétri (diamètre 90 mm) contenant un milieu gélosé. Quatre milieux ont été utilisés : ISP2, ISP1, Bennett et GYEA.

Bennett : glucose (10g/l), extrait de levure (2g/l), extrait de viande (1g/l), peptone (2g/l), agar (20g/l).

GYEA : glucose (10g/l), extrait de levure (10g/l), agar (20g/l).

Après 7 jours d'incubation à 28°C, les cultures sont recouvertes par 8ml de milieu Sabouraud semi-solide (contenant 7g/l d'agar), préalablement ensemençé avec l'une des isolats testes (1ml d'inoculum : 9ml de milieu). Après solidification de la deuxième couche, les boîtes sont réincubées à 30°C pendant 24 à 48h. Lecture : la distance entre le bord d'une colonie et la limite de la zone où l'isolat test n'est plus inhibé est mesurée en mm (**figure n°14**).

2. Technique des cylindres d'agar : (Bastide *et al*, 1986)

Dans cette méthode les isolats d'actinomycètes sont ensemençés en stries serrées à la surface de quatre milieux différents : ISP2, ISP1, Bennett et GYEA. Après incubation à 28°C pendant 7 jours, on prélève à l'aide d'un emporte-pièce (embout) pour chaque isolat étudiée et sur les quatre milieux utilisés, des cylindres d'agar de 6mm de diamètre. Ces cylindres sont déposés à la surface d'un milieu Sabouraud préalablement ensemençé par l'isolat cible. Les boîtes portant les cylindres sont placées à 4°C pendant 2h afin de permettre la prédiffusion des substances a activité antifongique. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 24 à 48h d'incubation à 30°C (**figure n°15**).

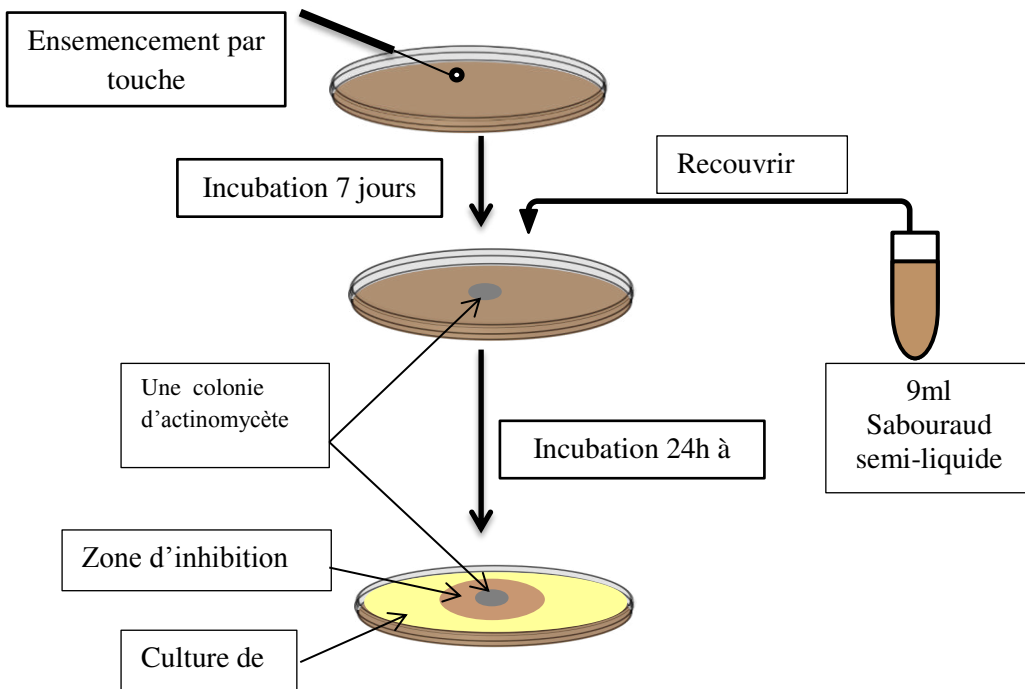


Figure N° 14: Technique de double couche.

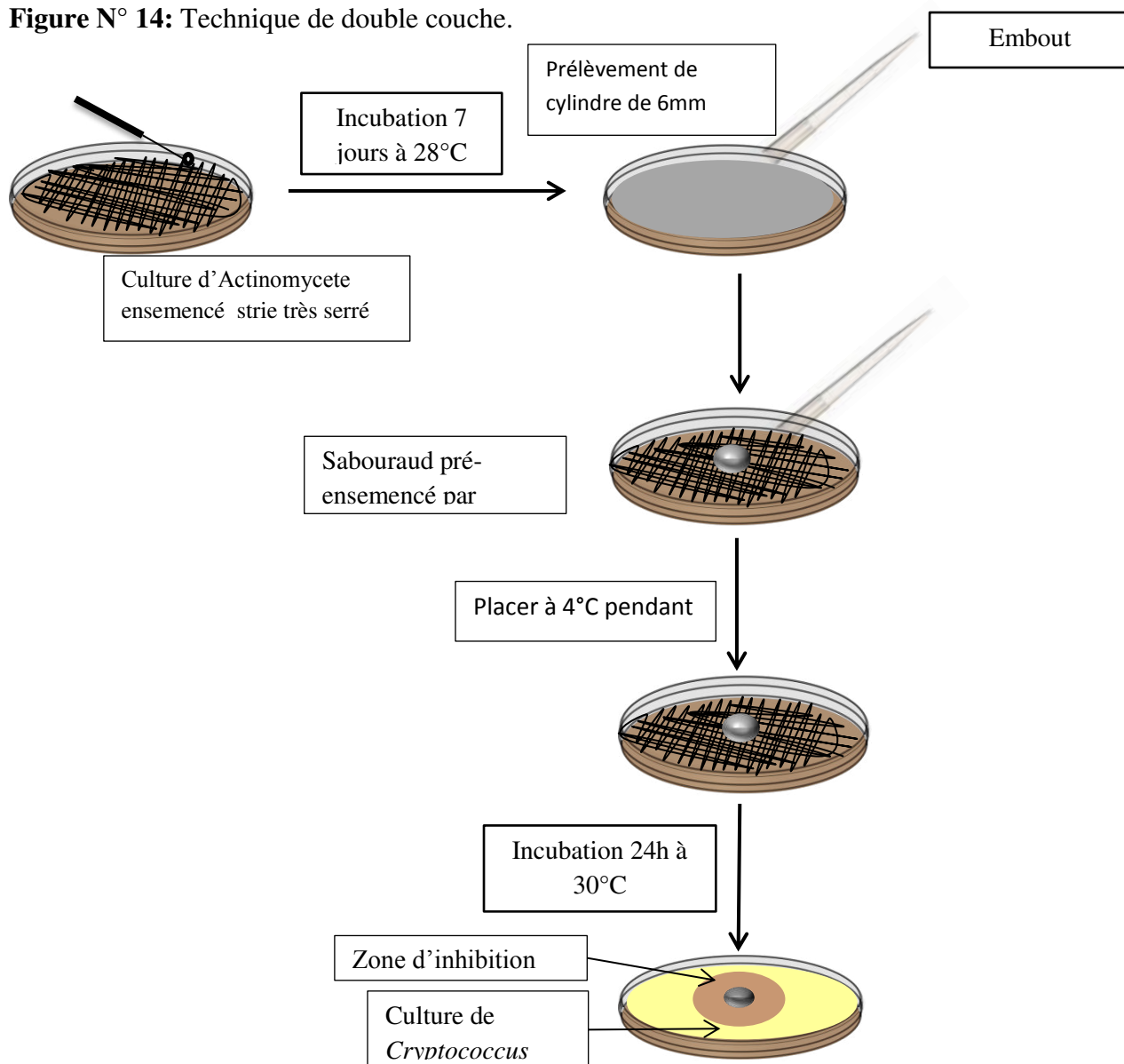


Figure n°15 : technique cylindre d'agar.

3. Optimisation de conditions de production

La composition du milieu de culture gouverne la capacité et la quantité de métabolites secondaires produit par le micro-organisme en question. Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone ainsi que les additifs chimiques et le temps d'incubation influencent énormément la capacité de production de molécules bioactives chez les *Streptomyces* (Mellouli *et al.*, 2004 ; Fourati ben Fguira 2005 ; Ben Ameer Mehdi *et al.*, 2006).

3.1. Cinétique de production de métabolite :

Dans le but d'optimiser la croissance des isolats et la production de métabolites à activité antifongique, nous avons testé différents milieux de culture avant de réaliser l'extraction des métabolites bioactifs. Pour cela les isolats ont été cultivés sur quatre milieux différents (ISP1, ISP2, Bennett et GYEA). L'activité antifongique de chaque isolat a été testée quotidiennement pendant 14 jours pour chaque milieu en utilisant la technique de cylindre d'agar. (Badji *et al.*, 2005 ; Boudjella *et al.*, 2006).

3.2. Choix de solvant d'extraction : (Badji *et al.*, 2005)

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction, l'isolat représentative E96 est ensemencée en stries très serrées à la surface du meilleur milieu de production d'antifongique, coulé dans des boîtes de Pétri. Après d'incubation à 28°C, le milieu contenu dans une seule boîte est découpé en petits cubes lesquels sont placés dans un Erlenmeyer stérile contenant 40ml d'un solvant organique.

Quatre solvants de polarité différente sont utilisés : n-hexane, dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol, du plus miscible dans l'eau au moins polaire.

L'extraction est effectuée sous agitation pendant deux heures à température ambiante. L'extrait organique obtenu est filtré puis évaporé sous vide à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est ensuite repris dans 5ml de méthanol et l'activité antifongique est évaluée en utilisant des disques de papiers de 6mm de diamètre. Les disques imbibés par l'extrait méthanolique sont déposés à la surface du milieu Sabouraud préensemencé avec le *Cryptococcus*. Les boîtes sont ensuite mises à 4°C pendant deux heures puis incubées à 30°C. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré après 24 à 48h.

4. Extraction des molécules bioactive : (Badji *et al.*, 2005 ; Zitouni *et al.*, 2005)

Après avoir testé la production de l'isolat E96 sur plusieurs milieux, le milieu ISP2 a été choisi comme meilleur pour l'extraction.

L'étude de la cinétique de production nous a permis de déterminer le moment propice pour stopper la culture et permettre l'extraction, dans notre étude, le premier jour représente le maximum de production.

Après avoir testé l'extraction en utilisant plusieurs solvants de polarité différente, le N-hexane représente le meilleur solvant pour l'extraction.

Le N-hexane est utilisé pour extraire les cultures contenues dans cinq boîtes de Pétri (100 ml de milieu au total) et poussant sur le milieu ISP2 après incubation pendant 24h (1 jour) à 28°C. L'extrait organique est séché au rotavapor puis solubilisé dans 5 ml de méthanol. Les activités sont alors mesurées par la méthode des disques tel que décrit précédemment, en mettant 100 µl de l'extrait par disque. Les lectures sont effectuées après 24 à 48h d'incubation à 30°C en mesurant la zone d'inhibition.

5. Identification partielle des molécules bioactives :

Dans le but d'identifier la structure chimique des molécules extraites, un ensemble de technique a été réalisé :

5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM):

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est relativement facile sur la plaque. Dans le cas contraire, nous devons rendre les tâches visibles par révélation par radiation UV ou chimique. Après révélation le rapport frontal de chaque métabolite est calculé. Le Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant donnée sur un système support phase stationnaire donnée (Smaoui, 2010).

Dans notre étude, 50µl de l'extrait méthanolique a été déposé sur une plaque de gel de silice sur feuille d'aluminium. La plaque est directement placée dans la cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le solvant de migration pour être développé, quatre systèmes solvants de polarité différente ont été utilisés pour déterminer le meilleur solvant de migration. Des plaques ont été effectuées et migrés pour chaque mélange de solvant.

Les systèmes solvant utilisé sont :

- a) N-butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1 v/v)
- b) Acétate d'éthyle -méthanol (100 :15 v/v)
- c) Ethanol-eau-chloroform (40:40:20 v/v)
- d) Hexane- acétate d'éthyle (70 :30 v/v)

Enfin le chromatogramme est séché, les taches sont repérées sous une lampe UV à deux longueurs d'onde 254 et 366 nm et le rapport frontal de chaque métabolite est calculé (**Badji et al., 2005 ; Zitouni et al., 2005 ; Augustine, 2010**).

5.2. chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Dans la technique chromatographique mise en jeu, chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation. L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes par la phase solide. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée (**Jihani, 2013**). D'une manière générale l'HPLC demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en oeuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection. Parmi les différents systèmes de détection pouvant être couplés avec l'HPLC, les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultraviolet-visible (UV-vis), fluorescence, diffusion de lumière (DEDL), électrochimie, spectrométrie de masse (MS, Mass Spectrometry) et résonance magnétique nucléaire (RMN) (**Thomas Michel, 2011**). Dans notre cas nous avons utilisé une colonne C18 et comme éluant: Gradient Eau-Acétonitrile et une détection par DAD + DEDL.

5.3. Spectre UV-Visible :

L'absorbance UV-visible est une méthode très largement utilisée pour l'analyse des composés chimiques, cette technique est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. La région de l'UV s'étend de 10 nm à 400 nm mais les spectromètres UV usuels ne permettent le tracé des spectres que pour les longueurs d'onde comprises entre 200 nm et 400 nm (proche UV). Dans les régions UV et visible, les longueurs d'ondes correspondent à des différences d'énergie $DE = E_2 - E_1$ ($DE = hc/\lambda$ avec λ , longueur d'onde de la radiation) qui affectent le domaine des transitions électroniques : passage d'une orbitale d'énergie E_1 à une orbitale d'énergie E_2 plus élevée. Le retour de l'état excité à l'état fondamental se fait par restitution sous forme de lumière de l'énergie absorbée. Le principe de dosage par spectrophotométrie UV-visible consiste à chercher l'absorbance à chaque valeur de

la longueur d'onde. La variation de la longueur d'onde sur une plage adéquate permet d'obtenir un spectre d'absorption (**Smaoui, 2010**).

L'absorbance d'un photon dans le domaine UV-Visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à des petits groupes d'atomes appelés chromophores. Il existe un certain nombre de chromophores « élémentaire » (**Tableau n°13**) qui absorbe l'UV à des longueurs d'ondes variées (**Janin, 1985**).

Tableau n°13: Maxima d'absorbance de chromophores élémentaires en spectroscopie UV-Visible.

Chromophores élémentaires	Max d'absorbance (nm)
>C=O (cétone)	290
-CH=O (aldéhyde)	279
-COOH (acide)	208
-COCl (chlorure d'acide)	220
-CONH ₂ (amine)	220
-COOR (ester)	211
-NO ₂ (nitro)	214
-N=N- (azométhane)	338

La présence dans une même molécule de plusieurs de ces chromophores peut se traduire soit par une simple additivité si ces chromophores sont indépendants, soit par des effets bathochromes (déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde en UV ou vers le visible) et hyperchromes (augmentation du coefficient d'absorption moléculaire) lorsque ces chromophores sont conjugués. C'est le cas des systèmes polyéniques (**tableau n°14**) ou aromatiques (**Lindenfleiser et al., 1964**).

Tableau n°14: Maxima d'absorbance des structures polyéniques en spectroscopie UV-Visible.

Structure polyénique	Maximum d'absorbance (nm)
Tétraènes	290-291
	303-306
	318-320
Pentaènes	318-324
	333-338
	346-358
Hexaènes	339-341
	356-358
	377-380
Heptaènes	358-365
	376-380
	399-405

L'absorbance UV-Visible est réalisée en balayant différentes longueurs d'ondes et ceci en faisant appel à une HPLC couplée à un spectrophotomètre UV-Visible.

Résultats et discussion

I. Études des actinomycètes

1. Caractères morphologiques

1.1. Caractères culturels

Les caractères morphologiques sont importantes en taxonomie microbienne, elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives vu que les critères morphologiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables (Smaoui, 2010).

Pour les vingt (20) isolats étudiés, cinq milieux de cultures ont été utilisés : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5. Ces différents milieux sont utilisés pour les bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* selon les recommandations de Shirling et Gottlieb, 1966.

Après ensemencement sur les différents milieux de cultures gélosés, les colonies des isolats étudiées apparaissent au bout de deux jours d'incubation à 28°C et se développent sans diffusion dans aucun des milieux gélosés utilisés à l'exception de l'isolat E96 qui donne des colonies après 24h d'incubation et se diffuse abondamment sur tous les milieux utilisés.

La couleur du mycélium aérien des isolats étudiés sur les cinq milieux de cultures sont rassemblés dans le **tableau n°15** la terminologie de ces couleurs est attribuée selon la charte de couleurs du système ISCC-NBS (Kelly et Judds, 1955).

L'aspect des colonies et le mycélium aérien de chaque isolat sont pris en photo et les résultats sont résumés dans les planches de 1 à la planche 20.

1.2. Caractères macroscopiques et microscopiques :

L'observation des colonies sous microscope binoculaire, nous a permis de confirmer l'aspect filamenteux des isolats, des gouttes d'exsudat ont été observées pour les isolats E68, E76b, E76g, E165, E182 (voir planche 4, 13, 14, 15 et 16 respectivement).

Les photos de la coloration réalisée montrent des filaments épais pour certains isolats et plus fins pour d'autre, en fonction des types des chaînes de spores, on a pu classer nos isolats en :

Chaînes de spores type RF : E96, E159, E100, E65, E182, E13, B1, E14, E20, E68, E87, E177, B3.

Chaînes de spores type RA : E165, E6, E76b.

Chaînes de spores type S : E76g, E163, E151, E127.

Tableau n°15 : La couleur du mycélium aérien des isolats étudiés sur les cinq milieux de culture

	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5
B1	brun jaunâtre	gris olivâtre	gris jaunâtre	brun jaunâtre	brun jaunâtre
B3	gris foncé	gris foncé	gris foncé	gris foncé	gris clair
E13	brun jaunâtre moyen	brun jaunâtre moyen	jaune pâle	brun jaunâtre moyen	jaune orangé pâle
E14	brun jaunâtre	brun jaunâtre	jaune pâle	brun jaunâtre	brun jaunâtre
E20	gris moyen	gris foncé	gris foncé	gris moyen	gris clair
E65	brun jaunâtre	blanc	gris clair	blanc bleuté	blanc
E68	blanc	bleu clair	bleu clair	gris clair	gris clair
E76b	blanc	blanc	blanc	gris	blanc
E76g	jaune orangé moyen	brun jaunâtre clair grisâtre	blanc	brun jaunâtre grisâtre	blanc
E87'	gris clair	blanc	gris clair	gris clair	blanc grisâtre
E96	gris olivâtre	gris olivâtre	gris jaunâtre	gris olivâtre	gris jaunâtre
E100	rose jaunâtre	rose jaunâtre	jaune orangé	blanc	blanc
E127	gris foncé	gris foncé	gris clair	gris foncé	blanc grisâtre
E151	gris foncé	gris foncé	gris jaunâtre	gris foncé	brun jaunâtre
E159	blanc jaunâtre	gris jaunâtre	gris olivâtre	jaune pâle	jaune orangé
E163	gris brunâtre	gris brunâtre	gris brunâtre	gris brunâtre	gris jaunâtre
E165	blanc jaunâtre	blanc	gris olivâtre	gris jaunâtre	blanc
E177	gris foncé	gris foncé	gris jaunâtre	gris foncé	brun jaunâtre
E182	gris bleuté	blanc	gris olivâtre	gris bleuté	blanc

D'après le tableau n°15 plusieurs isolats ont gardé la même couleur du mycélium aérien malgré le changement de milieu de culture, on déduit les groupes suivant :

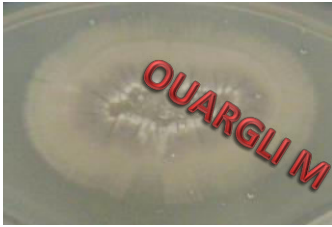
Groupe 1 : B1, B3, E20, E68, E87', E96, E127, E151, E159, E163, E177 : ces isolats ont gardé la couleur grise malgré le changement de la composition du milieu de culture.

Groupe 2 : E65, E76b, E76g, E100, E165, E182 : ces isolats ont gardé la couleur blanche malgré le changement de la composition du milieu de culture.

Groupe 3 : E13, E14 : ces isolats ont gardé la couleur brune malgré le changement de la composition du milieu de culture.

Groupe 1

Planche 1 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche B1



Aspect colonie de la souche B1 sur le milieu ISP1



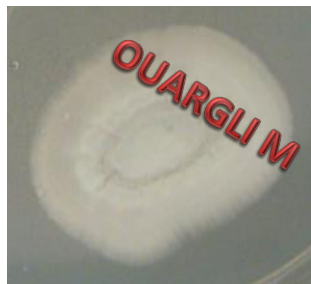
Aspect colonie de la souche B1 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche B1 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche B1 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche B1 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche B1 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche B1 sur le milieu ISP7



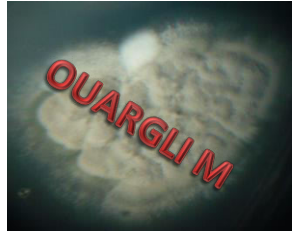
Aspect microscopique de la souche B1 Gx100

Groupe 1

Planche 2 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche B3



Aspect colonie de la souche B3 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche B3 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche B3 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche B3 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche B3 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche B3 sur le milieu ISP6



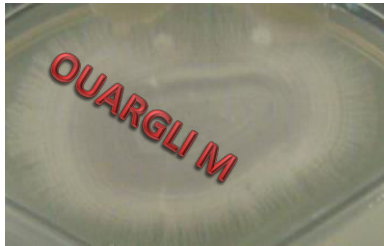
Aspect colonie de la souche B3 sur le milieu ISP7



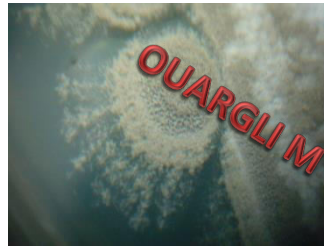
Aspect microscopique de la souche B3
G×100

Groupe 1

Planche 3 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 20



Aspect colonie de la souche 20 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 20 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 20 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 20 sur le milieu ISP4



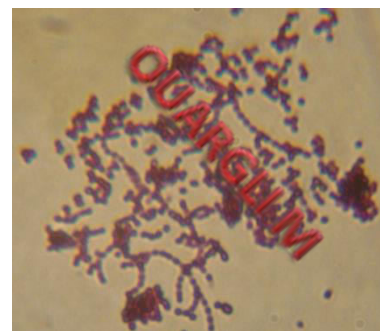
Aspect colonie de la souche 20 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 20 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 20 sur le milieu ISP7



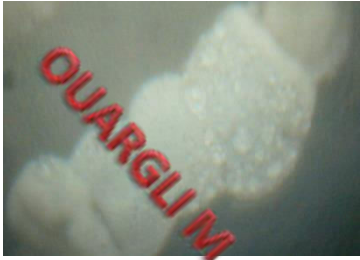
Aspect microscopique de la souche 20

Groupe 1

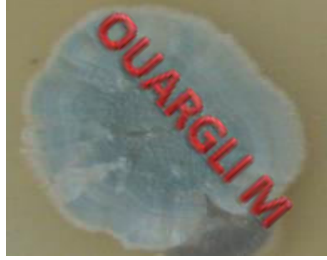
Planche 4 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 68



Aspect colonie de la souche 68 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 68 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 68 sur le milieu ISP3



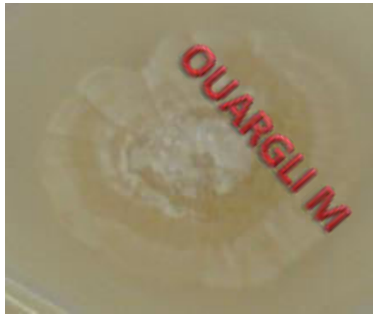
Aspect colonie de la souche 68 sur le milieu ISP4



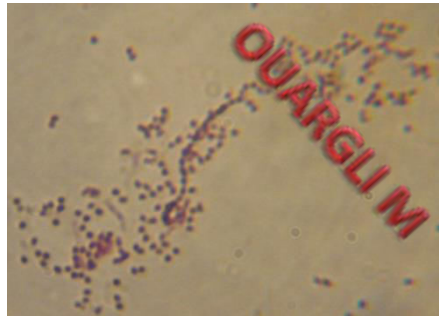
Aspect colonie de la souche 68 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 68 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 68 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 68

Groupe 1

Planche 5 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 87'



Aspect colonie de la souche 87 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 87 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 87 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 87 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche 87 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 87 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 87 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 87

Groupe 1

Planche 6 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 96



Aspect colonie de la souche 96 sur le milieu ISP1



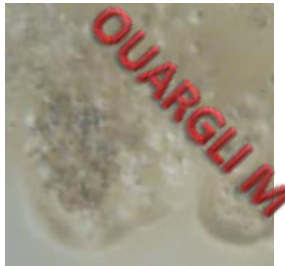
Aspect colonie de la souche 96 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 96 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 96 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche 96 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 96 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 96 sur le milieu ISP7



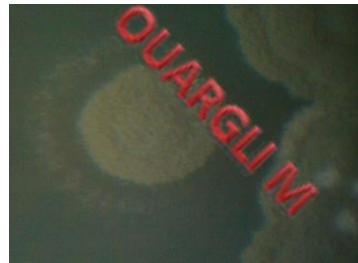
Aspect microscopique de la souche 96

Groupe 1

Planche 7 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 127



Aspect colonie de la souche 127 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 127 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 127 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 127 sur le milieu ISP4



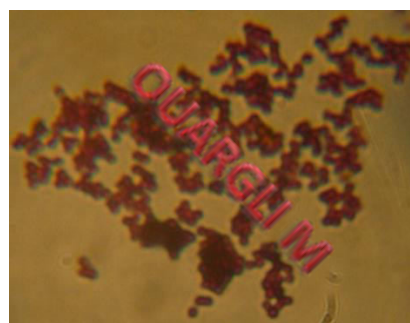
Aspect colonie de la souche 127 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 127 sur le milieu ISP6



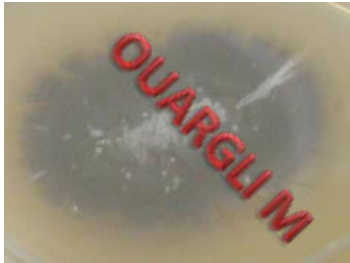
Aspect colonie de la souche 127 sur le milieu ISP7



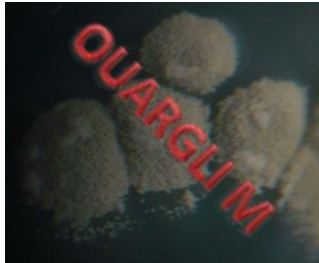
Aspect microscopique de la souche 127

Groupe 1

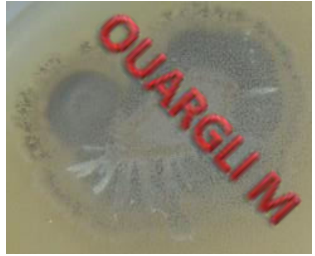
Planche 8 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 151



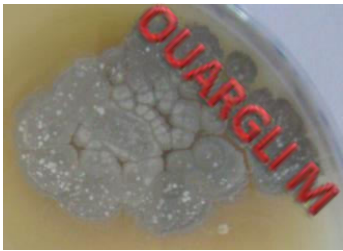
Aspect colonie de la souche 151 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 151 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 151 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 151 sur le milieu ISP4



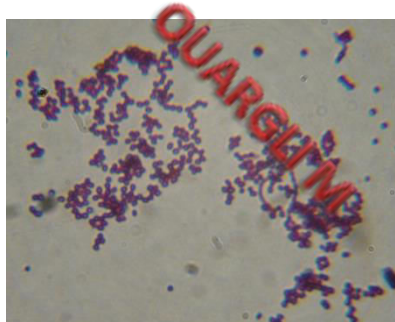
Aspect colonie de la souche 151 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 151 sur le milieu ISP6



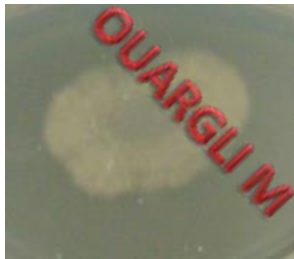
Aspect colonie de la souche 151 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 151

Groupe 1

Planche 9: Aspect macroscopique et microscopique de la souche 159



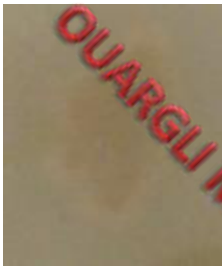
Aspect colonie de la souche 159 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 159 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 159 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 159 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche 159 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 159 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 159 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 159

Groupe 1

Planche 10 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 163



Aspect colonie de la souche 163 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 163 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 163 sur le milieu ISP3



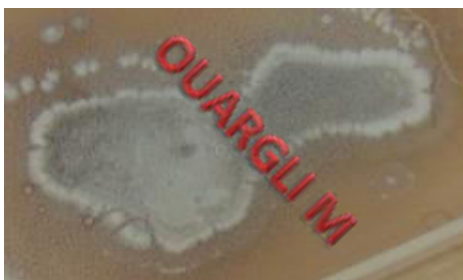
Aspect colonie de la souche 163 sur le milieu ISP4



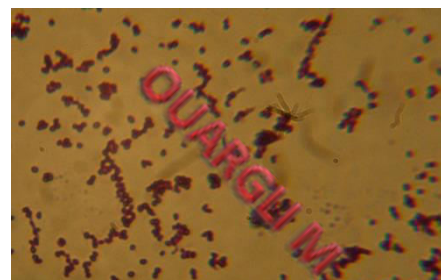
Aspect colonie de la souche 163 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 163 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 163 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 163

Groupe 1

Planche 11 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 177



Aspect colonie de la souche 177 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 177 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 177 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 177 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche 177 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 177 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 177 sur le milieu ISP7



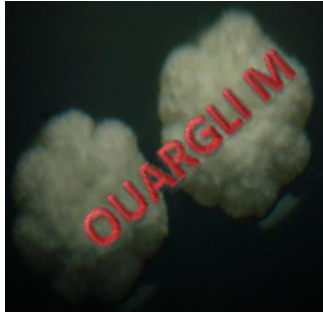
Aspect microscopique de la souche 177

Groupe 2

Planche 12 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 65



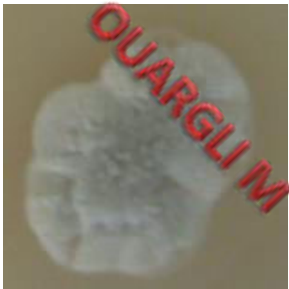
Aspect colonie de la souche 65 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 65 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 65 sur le milieu ISP3



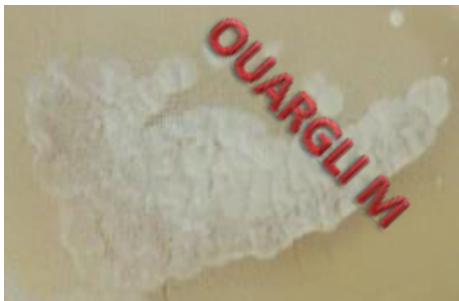
Aspect colonie de la souche 65 sur le milieu ISP4



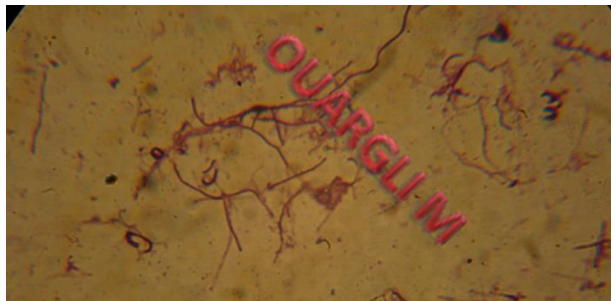
Aspect colonie de la souche 65 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 65 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 65 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 65

Groupe 2

Planche 13 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 76b



Aspect colonie de la souche 76b sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 76b sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 76b sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 76b sur le milieu ISP4



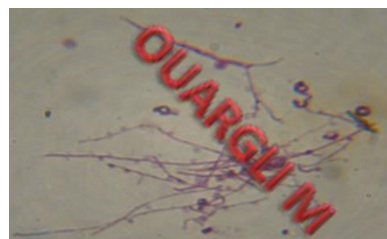
Aspect colonie de la souche 76b sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 76b sur le milieu ISP6



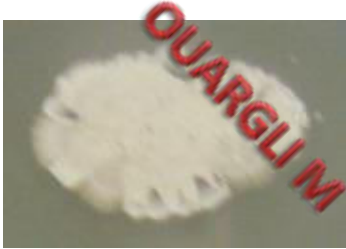
Aspect colonie de la souche 76b sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 76b

Groupe 2

Planche 14 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche E76g



Aspect colonie de la souche
76g sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche
76g sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche
76g sur le milieu ISP5



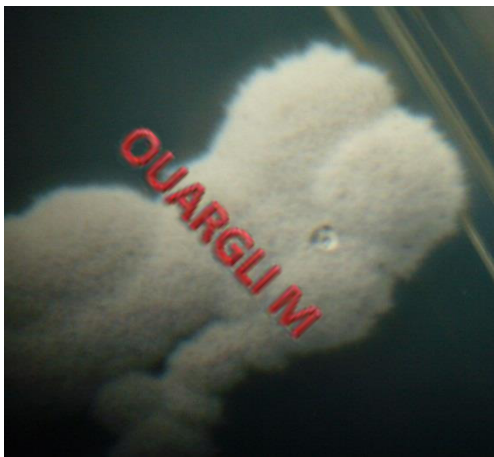
Aspect colonie de la souche
76g sur le milieu ISP7



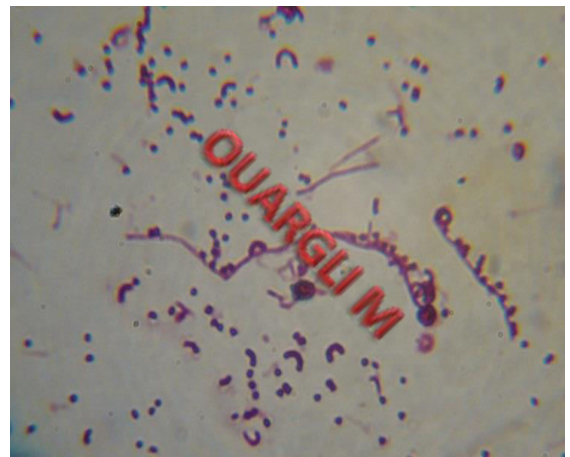
Aspect colonie de la souche
76g sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche
76g sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche
76g sur le milieu ISP2



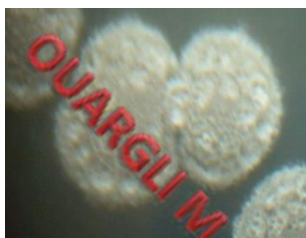
Aspect microscopique de la
souche 76g

Groupe 2

Planche 15 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 165



Aspect colonie de la souche 165 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 165 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 165 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 165 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche 165 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 165 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 165 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 165

Groupe 2

Planche 16 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 182



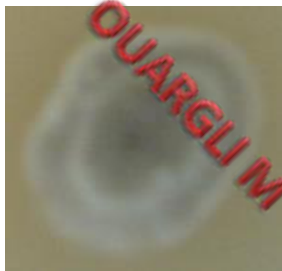
Aspect colonie de la souche 182 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 182 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 182 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 182 sur le milieu ISP4



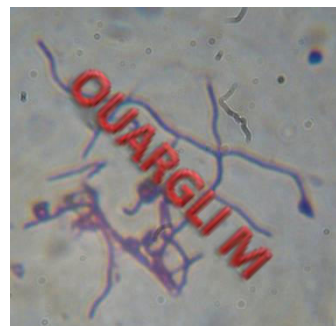
Aspect colonie de la souche 182 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 182 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 182 sur le milieu ISP7



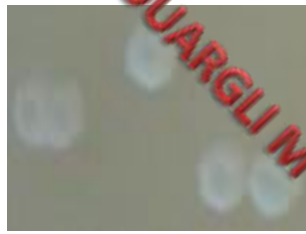
Aspect microscopique de la souche 182

Groupe 2

Planche 17 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche E6



Aspect colonie de la souche E6 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche E6 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche E6 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche E6 sur le milieu ISP4



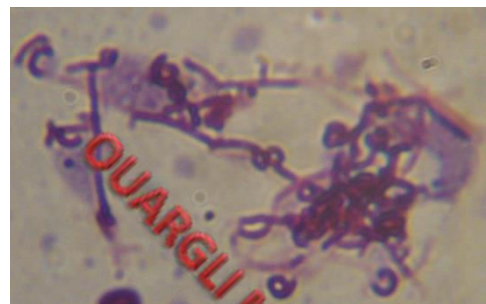
Aspect colonie de la souche E6 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche E6 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche E6 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche E6

Groupe 3

Planche 18 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 13



Aspect colonie de la souche 13 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 13 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 13 sur le milieu ISP3



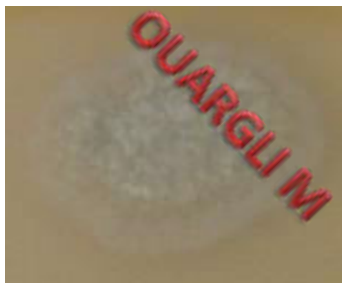
Aspect colonie de la souche 13 sur le milieu ISP4



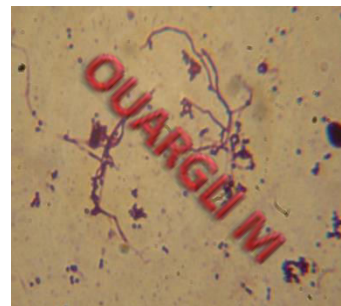
Aspect colonie de la souche 13 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 13 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 13 sur le milieu ISP7



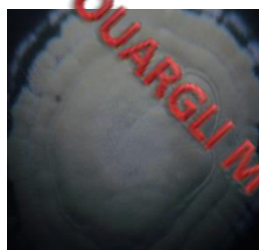
Aspect microscopique de la souche 13

Groupe 3

Planche 19 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche 14



Aspect colonie de la souche 14 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 14 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 14 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 14 sur le milieu ISP4



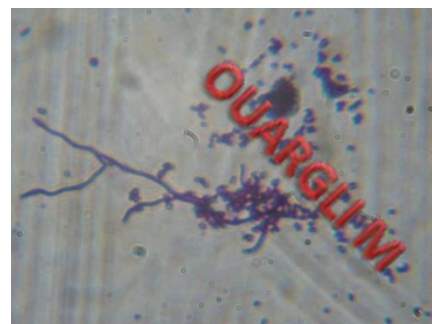
Aspect colonie de la souche 14 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 14 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 14 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 14

Groupe 3

Planche 20: Aspect macroscopique et microscopique de la souche 100



Aspect colonie de la souche 100 sur le milieu ISP1



Aspect colonie de la souche 100 sur le milieu ISP2



Aspect colonie de la souche 100 sur le milieu ISP3



Aspect colonie de la souche 100 sur le milieu ISP4



Aspect colonie de la souche 100 sur le milieu ISP5



Aspect colonie de la souche 100 sur le milieu ISP6



Aspect colonie de la souche 100 sur le milieu ISP7



Aspect microscopique de la souche 100

1.3. Discussion :

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des isolats actinomycétales est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes.

Selon **Shirling et Gottlieb (1966)** l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *micromonospora*, *microbispora*...) peuvent être identifiées avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (**Williams et al., 1993**).

Il est important de signaler l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude de la morphologie puisque l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation complète) (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Sur tous les milieux ISP la croissance des isolats actinomycétales débute par la formation d'un mycélium pâteux et ramifié, c'est le mycélium de substrat.

Il est intéressant de noter que tous les isolats ont présenté une bonne croissance sur les différents milieux étudiés avec une variation des tailles des colonies et la couleur du mycélium aérien.

Balota et al. (1995) ont extrait des exsudats de colonies de bactéries, après centrifugation de la culture en milieu liquide, L'extrait d'exsudat bactérienne a diminué la croissance du mycélium des champignons *mycorhiziens Gigaspora gigantea*. Ceci explique que l'exsudat des isolats actinomycétales peut avoir des activités antimicrobiennes.

2. Caractères physiologiques :

L'étude des différents caractères physiologique de chaque isolat, nous fournis des éléments essentiels pour la classification de cette dernière au niveau de l'espèce. Plusieurs tests physiologiques ont été effectués pour les 20 isolats étudiés.

2.1. Production de pigment mélanoïde :

Les résultats de la production du pigment mélanoïde sont mentionnés dans le **tableau n°16**. Les planches n° 18 et 19 représentent les pigments mélanoïdes produits par les isolats E13 et E14 et les planches 1, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15 et 16 montrent les pigments diffusibles produits par les isolats B1, E87', E159, E163, E65, E76b, E76g, E165, E182 respectivement.

Tableau n°16: production de pigment mélanoidé et pigment diffusible.

	Pigment mélanoidé			Pigment diffusible		
	ISP6			ISP7		
	J2	J7	J14	J2	J7	J14
B1	-	-	-	-	brun clair grisâtre	-
B3	-	-	-	-	-	-
E6	-	-	-	-	-	-
E13	brun jaunatre moyen	brun grisatre	brun moyen	jaune orange foncé	jaune orange foncé	brun moyen
E14	brun jaunâtre moyen	brun rougeâtre grisâtre	brun jaunâtre moyen	-	jaune orangé foncé	brun jaunâtre moyen
E20	-	-	-	-	-	-
E65	-	-	-	-	-	brun jaunâtre clair
E68	-	-	-	-	-	-
E76b	-	-	-	-	-	brun jaunâtre clair
E76g	-	-	-	-	brun jaunâtre clair	brun jaunâtre clair
E87'	-	-	-	-	-	brun jaunâtre clair
E96	-	-	-	-	-	brun jaunâtre clair
E100	-	-	-	-	-	-
E127	-	-	-	-	-	-
E151	-	-	-	-	-	-
E159	-	-	-	-	brun jaunâtre grisâtre	brun jaunâtre moyen
E163	-	-	-	-	brun jaunâtre moyen	brun profond
E165	-	-	-	-	brun jaunâtre moyen	brun jaunâtre clair
E177	-	-	-	-	-	-
E182	-	-	-	-	brun rougeâtre moyen	brun jaunâtre moyen

(-) absence de pigment

2.2. Résultats des tests enzymatiques :

Dans l'environnement, les *Streptomyces* sécrètent des enzymes dégradant les polymères insolubles et consomment les produits issus de la réaction de ces enzymes.

L'étude des activités enzymatiques des isolats montrent qu'ils produisent des enzymes capables de dégrader l'amidon, la gélatine et la caséine. Des enzymes possédant un grand intérêt dans le domaine écologique et industriel (**voir tableau n°17**).

Tableau n°17 : tests enzymatiques.

Tests Isolats	Amylase	Gélatinase	Caseinase
B1	+	+/-	-
B3	+	+/-	+
E6	+	+	+
E13	+	++	+
E14	-	++	+
E20	+	++	+
E65	+	++	+
E68	+	+	-
E76b	-	+	+
E76g	+	++	+
E87	+	++	+
E96	+	++	-
E100	+	++	-
E127	+	+	+
E151	+	+	+
E159	-	+	-
E163	+	+	-
E165	-	+	+
E177	+	+	+
E182	-	+	+

(-) : absence de production

(+) : production

(++) : production rapide (48h d'incubation)

2.3. Tests d'utilisation des composés glucidiques comme seuls source de carbone.

La croissance des isolats en présence de différentes sources de carbone a démontré leur capacité à utiliser la plupart des glucides testés, le **tableau n°18** montre les résultats des différents tests d'utilisation de composé glucidique comme seul source de carbone.

Tableau n°18: utilisation de composé glucidique.

Tests Isolats	Glucose	Galactose	Raffinose	Saccharose	L-arabinose	D-fructose	D-mannitol	D-xylose	Sorbitol	D-mellibiose	Mannose	L-rhamnose	Citrate	Cellulose
B1	++	++	+/-	-	+	++	++	+	-	+	++	+	+	+
B3	++	++	-	-	++	++	++	+	+/-	++	++	+	+	+
E6	++	++	++	+	+	++	++	+	+/-	++	++	+	+	+
E13	++	++	-	+	+	+	++	+	+/-	+/-	+	+	-	+
E14	++	++	-	-	-	++	++	++	+/-	-	++	-	+	-
E20	++	++	-	++	+	+	++	++	+/-	+/-	++	+	-	+
E65	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	++	+	-	+
E68	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+
E76b	++	++	++	+/-	+	++	++	+	+/-	+/-	++	+	-	+
E76g	++	++	+	+/-	+	++	++	+	+/-	++	+	+	+	+
E87	++	++	+	++	+	++	++	+	+/-	++	++	+	+	+
E96	++	++	-	-	-	++	++	+/-	++	+/-	++	-	+	-
E100	++	++	+	+/-	-	++	++	+	-	+/-	+	+	-	+
E127	++	+	-	++	++	++	++	+	+/-	+/-	++	+	-	+
E151	++	++	-	+	+	++	++	+	+/-	+/-	++	+	-	+
E159	++	++	+	-	+	+	++	+	+/-	+/-	++	+	-	-
E163	++	-	-	-	-	++	++	-	-	+/-	-	+	-	+
E165	++	++	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	-	+
E177	++	++	-	++	++	++	++	+	+/-	+/-	++	+	-	+
E182	++	++	+	+	+	++	++	+/-	+/-	+/-	++	+	+/-	+

(-) pas de croissance

(+/-) croissance faible

(+) croissance

(++) bonne croissance

2.4. Tests d'utilisation des acides aminés comme source d'azote.

Les résultats des différents tests d'utilisation d'acide aminé sont présentés dans le **tableau n°19**

Tableau n°19: utilisation des acides aminés.

Test Isolat	Valine	Asparagine	Proline	Arginine	Serine
B1	+	-	+	+	-
B3	+	+/-	+	+/-	-
E6	+	+/-	+/-	+/-	-
E13	-	+	+	+	-
E14	+	+	+	+	+/-
E20	+	+	+	+/-	-
E65	+	+	+	+	+/-
E68	+	+	+	-	-
E76b	+	+	+	+	-
E76g	+	+	+	-	+/-
E87	+	+	+	+/-	-
E96	+	+	+	+	-
E100	+	+	+	-	-
E127	+/-	+	+	+	-
E151	+	+	+	+	-
E159	+/-	-	+	-	-
E163	+/-	+	+	+/-	-
E165	+	+	+	+	-
E177	+	+	+	+/-	-
E182	-	+	+	-	-

(-) pas de croissance

(+/-) croissance faible

(+) bonne croissance

2.5. Croissance à différentes valeurs de températures :

Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau n° 20**, toutes les isolats d'actinomycètes ont donné une bonne croissance dans l'intervalle 29-43°C à l'exception de l'isolat E96 qui donne une croissance faible à 43°C ce qui confirme son caractère mésophile. Seuls les isolats E14 et E96 ont pu croître à 10°C.

Tableau n° 20 : croissance des actinomycètes à différentes températures

T Isolat	10°C	29°C	37°C	45°C
E6	-	+	+	+
E14	+	+	+	+
E65	-	+	+	+
E76g	-	+	+	+
E87	-	+	+	+
E96	+	+	+	+/-
E165	-	+	+	+
E182	-	+	+	+

(-) pas de croissance

(+/-) croissance faible

(+) bonne croissance

2.6. Croissance à différentes valeurs de pH :

Selon les résultats détaillés dans le **tableau n° 21**, nous remarquons que tous les isolats actinomycètes testés ont donné une bonne croissance dans l'intervalle de pH de 5-10.

À l'exception de l'isolat E96 qui a donné une croissance faible à pH 4 au bout du 7ème jour, les isolats E65, E76g, E87, E165, E182 ont donné une croissance faible à pH 4 au bout du 14ème jour avec une absence de croissance pour les isolats E6 et E14 au ce pH bas.

Tableau n°21 : croissance des actinomycètes à différents pH :

pH isolat	4	5	6	7	8	9	10
E6	-	+	+	+	+	+	+
E14	-	+	+	+	+	+	+
E65	-/+	+	+	+	+	+	+
E76g	-/+	+	+	+	+	+	+
E87	-/+	+	+	+	+	+	+
E96	-/+	+	+	+	+	+	+
E165	-/+	+	+	+	+	+	+
E182	-/+	+	+	+	+	+	+

(-) pas de croissance

(+/-) croissance faible

(+) croissance

2.7. Sensibilité aux antibiotiques :

Les résultats de la sensibilité des isolats d'actinomycètes aux antibiotiques sont donnés dans le **tableau n°22**. La plupart des isolats sont résistants à la majorité des β - lactamines, aux macrolides et aux fluoroquinolones.

Tableau n°22: test de profil des actinomycètes aux antibiotiques.

Famille	β-lactamine							Aminosides		Lincos- amides	Macrolides		Syner- gistines	Cycli- nes	Quinolones			Oxyqui- noles
	AMP	AMC	IPM	CZ	CN	CTX	CFM	K	TM	CL	E	SP	PR	D	PEF	NA	PI	NTX
B1	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R	S
B3	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S
E13	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S
E14	R	R	I	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S
E20	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S
E65	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	I	R	S	R	R	R	S
E68	S	S	S	R	S	R	R	S	S	I	S	I	R	S	R	R	R	S
E76g	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R	S
E87	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
E96	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S
E100	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
E127	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S
E151	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
E159	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	I	S	R	R	R	S
E163	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S
E165	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	I	R	I	S	R	R	R	S
E177	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S
E182	S	S	S	S	S	R	R	S	R	I	R	R	R	S	R	R	R	S

2.8. Sensibilité aux molécules chimiques

Les résultats obtenues montrent que tous les isolats actinomycètes sont sensibles au sodium azide à 0.001%, seuls les isolats B1, B3, E13, E14, E20, E100, E127, E151, E159, E163, E177 peuvent croître en présence de phénol à 0.1% (voir tableau n° 23).

Tableau n° 23 : sensibilité aux molécules chimiques

Isolat	B1	B3	E6	E13	E14	E20	E65	E68	E76b	E76g	E87	E96	E100	E127	E151	E159	E163	E165	E177	E182
Phénol 0.1%	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-

(-) pas de croissance

(+) croissance

3. Caractères biochimiques :

Le résultat des caractères biochimiques représenté par les API systèmes sont montrés dans les tableaux n°24, 25 et 26. Le pourcentage des résultats a été marqué après 24h et 48h d'incubation en fonction du pourcentage du virage des couleurs et donc le pourcentage d'utilisation des substrats par les isolats.

Tableau N°24 : test biochimique galerie API 50 CH

Bande	Tube	Test	E14	E65	E182	E6	E96	E165	E87'	E76g
0 - 9	0	Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	GLY	100	25	50	50	90	50	25	25
	2	ERY	0	25	50	25	75	25	25	25
	3	DARA	0	50	75	75	75	100	75	25
	4	LARA	25	25	50	75	75	90	75	50
	5	RIB	75	75	75	100	100	100	100	75
	6	DXYL	25	25	75	50	90	100	100	50
	7	LXYL	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	ADO	0	0	0	25	75	25	25	0
9	MDX	0	0	0	0	0	0	0	0	
10 - 19	10	GAL	100	0	25	50	75	25	0	0
	11	GLU	100	25	50	100	100	100	75	25
	12	FRU	100	25	25	100	90	90	75	25
	13	MNE	50	25	25	25	75	25	25	25
	14	SBE	0	0	0	0	75	0	0	0
	15	RHA	0	0	0	25	0	25	25	0
	16	DUL	25	0	0	0	0	0	0	0
	17	INO	0	25	25	25	100	25	25	25
	18	MAN	25	25	25	25	75	25	25	25
19	SOR	0	0	0	0	50	0	0	0	
20 - 29	20	MDM	0	0	25	25	25	0	0	25
	21	MDG	0	25	0	25	0	0	0	0
	22	NAG	100	75	90	90	50	100	100	75
	23	AMY	0	25	0	100	100	0	0	0
	24	ARB	100	0	0	75	50	50	75	0
	25	ESC	100	25	100	100	100	100	100	25
	26	SAL	100	25	50	75	90	100	100	0
	27	CEL	100	100	100	100	100	100	100	75
	28	MAL	100	0	25	0	75	0	0	0
29	LAC	100	25	100	75	25	100	100	0	
30 - 39	30	MEL	0	50	25	50	0	25	25	25
	31	SAC	100	25	0	100	0	25	25	0
	32	TRE	75	25	25	100	100	100	100	25
	33	INU	0	0	0	100	0	0	0	0
	34	MLZ	0	0	0	0	0	0	0	0
	35	RAF	25	0	25	100	0	25	25	25
	36	AMD	100	0	50	0	100	0	50	50
	37	GLYG	100	25	50	25	0	0	50	50
	38	XLT	0	0	0	0	25	0	0	0
39	GEN	75	0	25	0	25	0	0	0	
40 - 49	40	TUR	0	0	0	25	25	0	0	0
	41	LYX	0	0	0	25	25	100	100	0
	42	TAG	0	0	0	25	25	0	0	0
	43	DFUC	0	0	25	25	25	0	0	0
	44	LFUC	0	100	50	100	50	100	100	100
	45	DARL	0	0	25	50	100	25	75	50
	46	LARL	0	0	0	25	25	0	0	0
	47	GNT	25	25	0	25	25	25	25	25
	48	2KG	0	0	0	25	0	0	0	0
49	5KG	0	25	0	0	0	0	0	0	

Tableau N°25: test biochimique galerie API 20NE

	Test	E14	E65	E182	E6	E96	E165	E87'	E76g
*	NO ₃	50	25	100	100	0	75	75	100
*	TRP	0	0	0	0	0	0	0	0
•	GLU	0	0	0	0	0	0	0	0
❖	ADH	100	100	100	0	100	25	100	0
❖	URE	100	100	100	0	100	100	100	0
❖	ESC	100	100	100	100	100	100	100	100
❖	GEL	100	100	100	0	100	100	100	100
❖	PNPG	100	100	100	50	25	100	100	100
Assimilation	GLU	100	100	100	100	100	100	100	100
	ARA	0	100	100	100	25	100	100	100
	MNE	100	100	75	50	75	75	75	25
	MAN	100	100	100	100	100	100	100	100
	NAG	100	100	100	100	100	100	100	100
	MAL	100	90	100	100	25	75	50	100
	GNT	100	50	75	100	100	100	75	100
	CAP	0	25	0	0	0	0	0	0
	ADI	0	25	25	0	50	75	25	0
	MLT	100	25	100	0	75	75	75	100
	CIT	0	25	0	25	75	75	75	75
PAC	0	25	0	0	75	25	25	0	

• : fermentation

❖ : hydrolyse

* : réduction

Tableau N°26 : test biochimique galerie API ZYM

Tube	Test	E14	E65	E182	E6	E96	E165	E87'	E76g
1	Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Phosphatase alcaline	100	100	0	100	50	100	100	75
3	Estérase	100	100	100	75	75	75	75	25
4	Estérase Lipase	100	100	100	50	50	50	75	25
5	Lipase	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Leucine arylamidase	100	100	100	100	100	100	100	100
7	Valine arylamidase	100	75	75	25	25	25	0	25
8	Cystine arylamidase	100	75	75	0	25	25	25	0
9	Trypsine	50	25	0	0	0	25	0	0
10	D-chymotrypsine	100	100	100	0	100	100	100	100
11	Phosphatase acide	100	100	100	50	50	50	25	0
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	100	100	50	100	50	50	50	25
13	D-galactosidase	0	0	0	0	0	0	0	0
14	β-galactosidase	0	0	50	0	25	25	50	25
15	β-glucuronidase	0	0	0	0	0	0	0	0
16	D-glucosidase	0	0	100	0	0	0	100	0
17	β-glucosidase	75	0	25	100	25	100	100	0
18	N-acétyl-β-glucosaminidase	75	100	100	100	50	100	100	100
19	D-mannosidase	0	0	25	0	25	0	25	100
20	D-fucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0

4. Discussion :

Le genre *Streptomyces* est le plus grand genre de l'ordre des *Actinomycetales* dans la classe des *Actinobacteria* (Hain *et al.*, 1997).

En 1965, H. A. et M. P. Lechevalier proposèrent que la classification des Actinomycètes soit fondée sur des caractères morphologiques et physiologiques. Ce principe est d'une grande utilité, permettant de grouper les Actinomycètes en genres faciles à caractériser. La détermination des espèces fut basée sur des critères physiologiques et moléculaires. (Lechevalier, 2017).

Les résultats des tests physiologiques montrent que tous les isolats se sont révélés métaboliquement actives.

La sécrétion d'un pigment brun noir qui est la mélanine appelé aussi pigment mélanoïde, est une caractéristique très importante pour les actinomycètes, Shirling et Gottlieb (1972) l'on considérés comme une clé pour la classification des *Streptomyces*. Selon Margalith (1992) la biosynthèse de la mélanine se fait avec la tyrosine comme substrat, la tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénylalanine) et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation le produit final est l'acide 5,6-dihydroxyindol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur noir. La variation de source de carbone et d'azotes (tel que le citrate d'ammonium ferrique présent dans le milieu ISP6 et le L-tyrosine présent dans le milieu ISP7) influence la production de ces pigments et le changement de la couleur (Dastager *et al.*, 2006).

D'autre part, il est possible que certains pigments de couleur foncée masquent les autres pigments de couleurs plus claires qui sont produits simultanément, Omura *et al.* (2004) ont rapporté que le génome de *Streptomyces overmitilis* code pour 25 métabolites secondaires (mélanine, caroténoïdes, siderophores).

Il est intéressant de noter que les isolats E65, E76g, E87', E96, E165 et E182 présentent des pigments diffusible de couleur brune jaunâtre et seuls les isolats E13 et E14 présentent un pigment mélanoïde (voir tableau n° 16), un certains nombres d'auteur rapporte que les actinomycètes produisent des métabolites bioactifs pigmentés. Ces derniers sont souvent des antibiotiques (Dharmaraj *et al.*, 2009).

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des Actinomycètes (Lechevalier, 2017).

Les actinomycètes offrent les synthétiseurs les plus prometteurs de nombreux métabolites industriels et commercialement significatifs, ainsi l'importance d'un grand répertoire d'enzymes provenant d'actinomycètes et de leur potentiel dans le remplacement des catalyseurs chimiques est discutée (Neelu Nawani *et al.*, 2013).

Étant donné qu'il existe des informations vitales en raison de l'avènement des données sur le séquençage du génome et des protéines, les actinomycètes ont été utilisés en permanence dans la production de protéases, de cellulases, de caseinase, d'amylases, de gélatinases et autres autres enzymes d'importance industrielle prouvée (**Divya Prakash et al., 2013**).

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes la planche n°21 montre que 75% des isolats produisent l'amylase.

Les amylases ont une application potentielle dans un grand nombre de processus industriels tels que l'alimentation, la fermentation, le textile, le papier, les détergents et les industries pharmaceutiques. Cependant, avec les progrès de la biotechnologie, l'application d'amylase s'est développée dans de nombreux domaines tels que la chimie clinique, médicale et analytique. De nombreux actinomycètes ont également été signalés pour la production d'amylases (**Paula, 2010 ; Divya Prakash et al., 2013**).

Les protéases représentent une **classe unique d'enzymes**, car elles sont d'une importance physiologique et commerciale immense. Ces enzymes dégradantes catalysent l'hydrolyse totale des protéines (**Haider M. Hamza. 2006**).

La gélatérase est un type de protéase de groupe diversifiée, une métallocénapdase extracellulaire ou une métalloprotéinase capable d'hydrolyser la gélatine et d'autres composés tels que la phéromone, le collagène et le fibrinogène. Les gélatérases sont des métalloprotéases importantes et ces enzymes sont largement utilisées non seulement dans les industries chimiques et médicales, mais aussi dans les aliments et la science biologique de base. La gélatinase produite par un microorganisme hydrolyse la gélatine en ses sous-composés (polypeptides, peptides et acides aminés) qui peuvent traverser la membrane cellulaire et être utilisés par l'organisme (**Makinen et al., 1994 ; Balan et al., 2012**).

Chez l'homme, la gélatinase est une métalloprotéinase matricielle (MMP 2 et 9) impliquée dans la rupture de la matrice extracellulaire dans des processus physiologiques normaux, tels que le développement embryonnaire, la reproduction et le remodelage tissulaire, ainsi que dans les processus pathologiques tels que l'arthrite et les métastases (**Balan et al., 2012**).

Dans notre étude, nos isolats d'actinomycètes montrent un métabolisme protéique important car tous les isolats hydrolysent la gélatine avec un degré de différence important.

L'importance biotechnologique des gélatinases ne se résume uniquement pas dans les domaines industriel ou commercial, mais aussi en médecine et en pharmacologie. De nos jours, la gélatinase a reçu une attention considérable en tant que cibles pour le développement de médicaments en raison de leur rôle potentiel dans la dégradation des tissus conjonctifs associés aux métastases tumorales (**Balan et al., 2012**).

En plus l'amylase et la gélatinase, les isolats ont aussi la capacité de dégrader la caséine, 70% des isolats possèdent **une caseinase**. Cette enzyme qui a une grande importance en domaine médical. En **1965**, **Reginster** a testé l'inactivation du virus de l'influenza par une caséinase extraite d'un filtrat de culture de *Streptomyces ulbus*, après incubation pendant 1 heure à 37°C, l'activité infectieuse et l'activité hémagglutinante du virus ont considérablement diminué.

Pour les tests d'utilisation de sucre comme seul source de carbone, les résultats mentionnés dans le tableau n°18 ainsi que la planche n°23 montrent que 100 % des isolats utilisent le glucose et le fructose, 95% utilisent le galactose, le D-xylose, le mannose et le L-rhamnose, 75% utilisent le saccharose, le D-melibiose, le cellulose, le L-arabinose, 50% utilisent le raffinose et 25% utilisent le sorbitol et le citrate.

Beaucoup d'études ont été réalisées sur les actinomycètes isolés à partir des zones humides, les résultats d'assimilation et d'utilisation des sucres comme seul source de carbone demeurent très proches. **Morakchi en 2011** a trouvé que 100% des actinomycètes isolés à partir du lac Oubeira utilisent le Glucose, fructose, ribose et le xylose. Selon les recherches effectuées par **Benouegueni en 2014** sur les actinomycètes isolés à partir du lac El Mellah, 100% des actinomycètes utilisent le Glucose, fructose, mannose, galactose, mannitol et le xylose.

La lignocellulose est une ressource intéressante de sucre fermentable non alimentaire pour la production de l'éthanol carburant. Il se compose de 30 à 40% de cellulose et de 15 à 25% d'hémicellulose et il s'agit de la biomasse la plus abondante au monde. L'hydrolyse complète de la cellulose et de l'hémicellulose conduit respectivement au glucose et au xylose, que plusieurs microorganismes peuvent fermenter en éthanol (**Lorliam et al. 2013**)

Le xylose (C₅H₁₀O₅) est un **monosaccharide majeur** dans les hydrolysats hémicellulosiques des plantes qui peuvent représenter jusqu'à 30% des sucres totaux dans certaines biomasses végétales, comme celle des feuilles et résidus agricoles. Par conséquent, le xylose isomérase joue indirectement un rôle important dans la fermentation à l'éthanol d'hydrolysats de biomasse végétale (**Chanitnun,, 2012**).

Le xylose isomérase catalyse l'isomérisation réversible du xylose en xylulose. Le xylitol (C₅H₁₂O₅) est un polyol qui a un groupe hydroxyle attaché à chaque atome de carbone dans sa chaîne et qui possède un fort pouvoir sucrant, présentant 40% moins de calories que le saccharose. Il a été découvert en 1891 par le chimiste Emil Fischer (allemand, 1852-1919) et son équipe (**Albuquerque et al. 2014**).

. La littérature comprend plusieurs études sur l'utilisation du xylitol en remplacement du saccharose dans certains aliments destinés à la réduction calorique. L'utilisation du xylitol dans l'industrie pharmaceutique est maintenant répandue, principalement en raison de ses propriétés anticariogènes avérées, qui peuvent réduire la carie dentaire jusqu'à 100%. Plusieurs études ont

montré l'efficacité de ce sucre-alcool vis-à-vis de la formation de biofilms buccaux, notamment lors de la confrontation à la bactérie *Streptococcus mutans*. En dehors de *S. mutans*, d'autres études ont montré l'efficacité de l'emploi du xylitol contre d'autres microorganismes nuisibles à la santé buccale tels que *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. En plus de lutter contre la carie dentaire, le xylitol est reconnu pour contribuer à la calcification des dents, qui, dans la plupart des cas, est causée par le vieillissement. Il a également été rapporté qu'il est efficace dans le traitement de plusieurs maladies, par exemple: le diabète, l'anémie, l'otite moyenne aiguë et l'ostéoporose (Albuquerque et al. 2014).

Le xylose isomérase une enzyme importante utilisée dans la production industrielle en dehors de l'industrie alimentaire, cette enzyme a récemment gagné plus d'intérêt en raison de ses applications potentielles dans l'industrie des biocarburants. De plus, la production d'éthanol-carburant à partir d'hydrolysats hémicellulosiques par *Saccharomyces cerevisiae* présente un grand intérêt économique en tant qu'alternative aux combustibles fossiles (Chanitnun,, 2012). Pour augmenter le rendement de production d'éthanol à partir de lignocellulose, le xylose libéré doit être fermentés en éthanol. Pour utiliser et métaboliser le d-xylose, il doit être converti en xylulose. Le xylulose est ensuite phosphorylé en xylulose 5-phosphate par la xylulokinase (XK), ce dernier étant métabolisé par la voie pentose-phosphate. Chez les bactéries, le D-xylose est converti directement en D-xylulose par la xylose isomérase (XI). (figure n°16) (Albuquerque et al.2014).

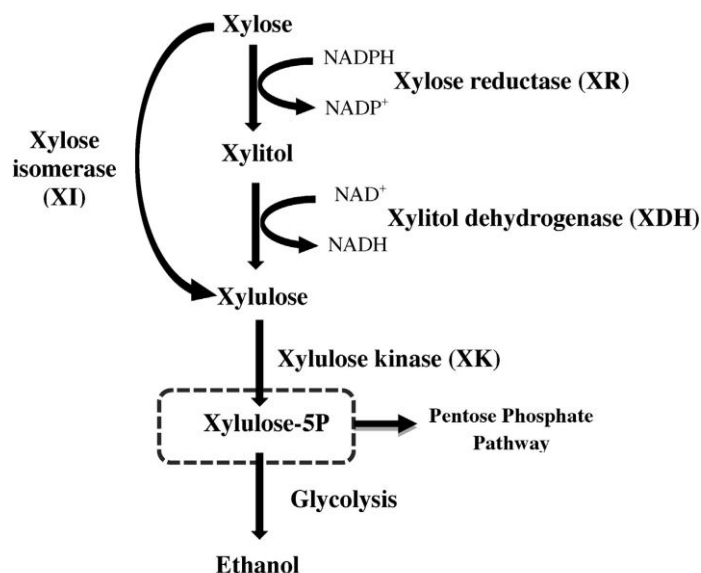


Figure n°16 : la voie métabolique du xylose (Albuquerque et al.2014)

Les résultats représentés dans le tableau n°20 montrent que tous les isolats testés peuvent croître dans un intervalle de température de 29°C à 45°C. Cependant, seuls les isolats E14 et E96 sont capables de croître à 10°C répondant ainsi aux conditions de la zone humide.

Tous les isolats testés ont donné une bonne croissance dans l'intervalle de pH de 5 à 9 avec une croissance faible au pH 4 alors que, les isolats E6 et E14 n'ont pas pu pousser à ce pH acide.

Dans notre étude, tous les isolats testés sont sensibles au sodium azide à 0.001%, tandis que 55% sont résistants au phénol à 0.1%. Ces isolats peuvent être utilisés pour la dégradation des composants résiduels de pesticides qui sont libérés dans le sol et de réduire la pollution du sol dans une certaine mesure (**Koli et Kulkarni, 2012**).

Un criblage a été réalisé pour estimer qualitativement la production de quelques enzymes lytiques et les enzymes qui solubilisent le phosphate par les actinomycètes isolés.

La plupart des isolats ont des activités, Phosphatase alcaline, Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsine, D-chymotrypsine (protéase), Phosphatase acide, Naphtol phosphohydrolase, Alpha-glucosidase (maltase), Beta-glucosidase (cellulase) et N-acetyl-bêta-glucosaminidase (chitinase), Betagalactosidase (lactase), Alpha-mannosidase. Par contre, les activités enzymatiques : Beta-glucuronidase (hyaluronidase), D-fucosidase et alpha-galactosidase ont été absentes chez tous les isolats.

En effet, ces enzymes servent une grande variété de fonctions à l'intérieur des organismes vivants. Ils sont indispensables à la transduction du signal et à la régulation cellulaire, souvent via des kinases et des phosphatases. Une fonction importante des enzymes est dans le système digestif des animaux. Les enzymes telles que les amylases et les protéases décomposent les grosses molécules (amidon ou protéines) en molécules plus simples, de sorte qu'elles peuvent être facilement absorbées par les intestins. La lactase, un membre de la famille des β -galactosidases, est une glycoside hydrolase impliquée dans l'hydrolyse du lactose disaccharide en ses constituants du glucose et du galactose. La lactase est essentielle pour l'hydrolyse digestive du lactose dans le lait. La carence de l'enzyme provoque une intolérance au lactose.

L'enzyme β -galactosidase est industriellement importante car elle peut être utilisée pour éviter la cristallisation du lactose dans les produits laitiers sucrés, condensés et congelés tels que les crèmes glacées et le lait condensé et résoudre les problèmes associés à l'utilisation et à l'élimination du lactosérum.

Il est également utilisé pour éviter l'intolérance au lactose chez les personnes présentant une carence en lactase. Plusieurs chercheurs ont tenté de trouver des producteurs de lactase puissants originaires de leur voisinage (**Murugan, 2013**).

Sur le plan pratique en Bactériologie, cette enzyme est recherchée dans les galeries d'identification bactériennes : en l'absence de dégradation du lactose, on s'interroge sur la

présence de cette enzyme, et sur la présence d'une perméase. Les milieux traditionnels ignorent ces biotypes β -galactosidase-positifs mais perméase-négatifs. Les chercheurs ont donc proposé que la présence d'une **β -galactosidase** chez certaines bactéries comme **les coliformes** soit utilisée comme critère de leur classification. L'utilisation d'un substrat synthétique chromogène, insensible aux variations dans la perméabilité au lactose, permet de mettre en évidence cette enzyme par une réaction colorée (**Bassaneze et al., 2008**).

On parle alors d'un milieu Chromogène dont le principe est d'utiliser des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement clivée par une enzyme caractéristique d'une espèce bactérienne. Le substrat clivé acquiert des propriétés chromogènes et précipite en colorant la colonie sans diffuser dans la gélose. La plupart des milieux chromogènes utilisent un jeu de différents substrats permettant une très bonne différenciation des colonies et une identification présomptive de ou des espèces bactériennes présentes dans un échantillon comme l'urine par exemple.

Aujourd'hui les milieux chromogènes bien que **plus onéreux**, ont largement supplanté les milieux non chromogènes en raison de plusieurs avantages. Ces milieux permettent une discrimination plus fine des colonies et donc une meilleure sensibilité de détection des échantillons polymicrobiens.

Ils permettent un rendu d'identification plus rapide au clinicien ainsi qu'une économie substantielle en réactif et en temps technique (**Beaumont C., 2006**).

Les chitinases, un groupe majeur d'hydrolases produites par des agents utilisés en lutte biologique, sont impliquées dans la lyse de la paroi de champignons pathogènes. La production des enzymes chitinases par les *Streptomyces* est importante comme critère de sélection pour l'activité antifongique. Cependant, il a été rapporté que la production des chitinases seules est insuffisante pour la lyse des cellules des hyphes chez plusieurs champignons (**Xue et al., 2013; Lin et al., 2014**).

Différentes protéases extracellulaires synthétisées par des agents de lutte biologique, ont la capacité de dégrader la paroi des champignons phytopathogènes. Ceci nous laisse suggérer qu'il existerait une relation entre l'inhibition de la croissance des champignons pathogènes et la synthèse des protéases par *Streptomyces* sp. Le rôle de ces enzymes dans la protection des plantes contre les champignons phytopathogènes a été déjà démontré par plusieurs auteurs dans le cas d'autres agents de lutte biologique, comme les actinomycètes (**Gopalakrishnan et al., 2014**), les *Streptomyces* (**Singh et Chhatpar, 2011; Xue et al., 2013**), les *Bacillus* (**Yuttavanichakul et al., 2012; Masciarelli et al., 2014**) et *Bradyrhizobium japonicum* E109 (**Masciarelli et al., 2014**), les *Pseudomonas* spp. (**Hammami et al., 2013**). La production des

protéases par les actinomycètes pourrait jouer aussi un autre rôle important qui est la fertilisation des sols, car elles peuvent hydrolyser les protéines et l'urée (**Gopalakrishnan et al., 2011**).

Nos résultats montrent que nos isolats possèdent des phosphatases, des protéases, des lipases et des osidases, rejoignent ceux trouvés par **Morakchi (2011)**, **Ayari (2016)** et **Benouagueni (2015)** qui ont isolées des *Streptomyces* à partir du lac Oubeira et El Mellah respectivement. À partir de ces résultats, nos isolats apparaissent comme productrices des enzymes importantes dans la lutte biologique et le développement biotechnologique.

Les phosphatases sont des enzymes importantes pour l'utilisation des phosphates organiques par les actinomycètes. Chez *E. coli* et d'autres bactéries à Gram négatif, AP est une enzyme périplasmique codée par *phoA*. Chez *Streptomyces*, l'AP est une enzyme extracellulaire qui est sécrétée en très grandes quantités dans des conditions de famine au phosphate (**Moura et al. 2001**)

Nos résultats corrobore avec ceux trouvés par **Franco-Correa et al., (2010)**, qui ont montré que les *Streptomyces* solubilisent le phosphate (phosphatase acide et alcaline). Les bactéries qui solubilisent le phosphate peuvent augmenter l'absorption de phosphore par les plantes et augmenter le rendement des cultures.

Les estérases et **les lipases** sont des esters carboxyliques hydrolases (EC 3.1.1). Les carboxylestérases (EC 3.1.1.1) hydrolysent les esters hydrosolubles ou émulsifiés avec des chaînes d'acides gras relativement courtes, tandis que les lipases (triacylglycérol acyl hydrolases, EC 3.1.1.3) agissent préférentiellement sur les substrats émulsifiés avec des acides gras à longue chaîne.

Il n'est pas surprenant que l'activité lipolytique ubiquiste puisse être trouvée parmi les streptomycètes. Ces enzymes ont été utilisés dans une grande variété d'applications dans les domaines de la pharmacie, de la chimie fine, de la santé générale, de l'alimentation, des cosmétiques, de l'environnement et de l'énergie. Les lipases sont des sérine hydrolases définies comme des triacylglycérol acylhydrolases (E.C. 3.1.1.3). Les lipases sont impliquées non seulement dans l'hydrolyse des esters d'acides aliphatiques à longue chaîne, mais également dans les réactions d'estérification / transestérification. Les lipases catalysent également une grande variété de réactions de synthèse telles que la thio-estérification et l'amidation. Les estérases sont également des enzymes très utiles pour le même type de biotransformation (**Robic A., 2017**).

Les auteurs réalisent que la technique semi-quantitative API ZYM utilisée dans cette étude permet de mesurer uniquement l'activité enzymatique potentielle des souches bactériennes qui n'est jamais identique à l'activité bactérienne dans les milieux naturels. Dans des conditions de laboratoire, il n'est pas possible de générer et de surveiller les changements à court terme qui se produisent habituellement in situ (**Mudryk, 2006**).

Plusieurs définitions sont accordées au terme de multirésistance, le plus communément utilisé pour les bactéries c'est la non sensibilité à des antibiotiques appartenant au minimum à trois classes différentes (**Magiorakos et al., 2012**). Dans ce travail, tous les isolats d'actinomycètes de cette étude sont multirésistants. Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques présentés dans le tableau n°22 montrent que la plupart des isolats sont résistants à la majorité des fluoroquinolones (100%), β - lactamines (57%) et aux macrolides (47%). Cette résistance est due au fait que les *Streptomyces* sont des producteurs de ces classes d'antibiotiques (**Kieser et al., 2000; Madigan et Martinko, 2007, Zerizer, 2014**).

Cependant, il est remarquable que 100% des isolats sont résistants aux Céfixime, Céfotaxime, Pefloxacin, l'acide nalidixique et l'acide pipémidique. Par contre, tous les isolats sont sensibles aux Céfalexine et Nitroxoline.

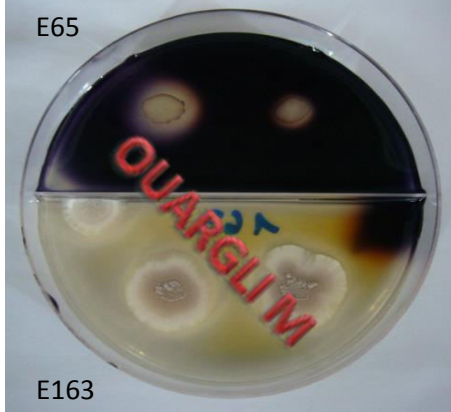
Les bactéries peuvent avoir une résistance naturelle, comme elles peuvent développer une résistance à beaucoup de classes d'antibiotiques, notamment dans les milieux défavorables à leur croissance. Cette résistance est obtenue soit par le transfert des éléments de résistance d'une bactérie à l'autre (**Forsberg et al., 2012**), ou bien par des mutations au niveau des gènes codants pour des réactions métaboliques. Ces mutations surviennent au niveau des gènes qui codent pour les protéines cibles de l'antibiotique ou bien de gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans l'activation de l'antibiotique (**Meyssonier, 2012**). Ces mutations engendrent beaucoup de changements dans le métabolisme bactérien. Selon des études réalisées par **Derewacz et al. (2013)**, 311 nouveaux caractères ont été observés chez des mutants résistants aux antibiotiques du genre *Nocardiosis*. Ces mutants ont présentés des changements dans leur métabolisme primaire et potentiel riche et émergent de métabolites secondaires. Récemment, des recherches ont décrit la corrélation apparente entre l'acquisition de la résistance aux antibiotiques et la productivité du métabolisme secondaire chez des actinomycètes producteurs d'antibiotiques. L'acquisition de la résistance chez ces souches résulte en une augmentation des niveaux de la production de composés bioactifs. Ces études ont suggéré que la sélection de souches sur le critère de résistance aux antibiotiques peut être une stratégie pour découvrir de nouveaux métabolites secondaires (**Derewacz et al., 2013**).

Il est important de signaler que l'utilisation de plusieurs antibiotiques appartenant à plusieurs classes thérapeutique avec différent mode d'action, augmente la chance de criblage et de sélection d'isolat producteur de nouvelle molécules bioactives.

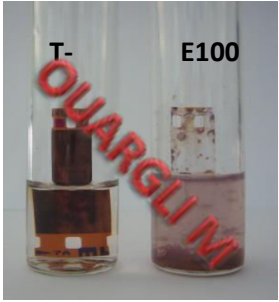
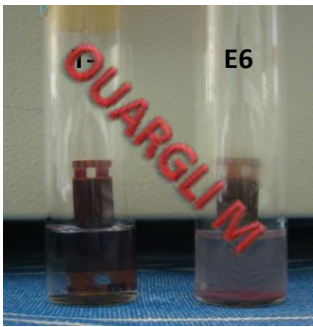
Dans notre étude, le but de l'utilisation des inhibiteurs de la synthèse des enveloppes bactériennes (Béta-lactamine), des inhibiteurs de la synthèse des protéines (macrolides, aminosides, cyclines) ainsi que les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (quinolones) été la recherche des isolats multirésistants.

Planche 21 : résultats tests enzymatique

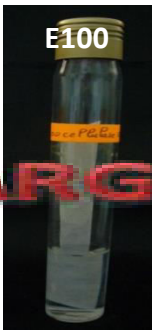
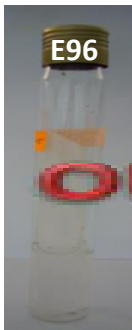
Hydrolyse de l'amidon



Hydrolyse de la gélatine



Dégradation de la cellulose



Dégradation de l'urée

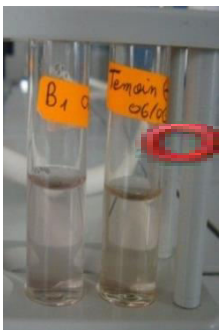


Planche 22 : résultats de croissance à différents pH et température

Croissance à différents pH



ph8

Ph10

L'isolat E96

ph4

ph6



Croissance à différentes température

45°C

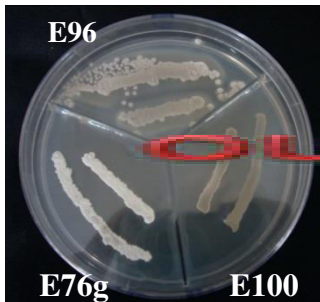
37°C

10°C



Planche 23 : résultats d'utilisation de composé glucidique

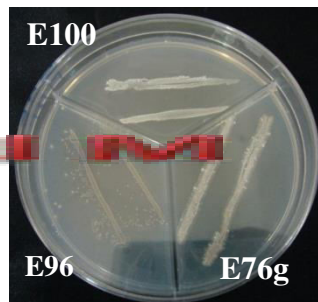
Glucose



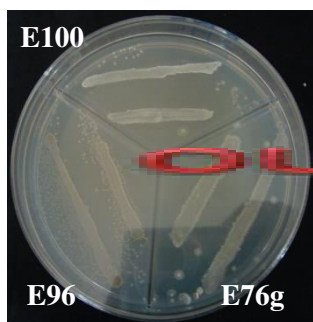
Galactose



Raffinose



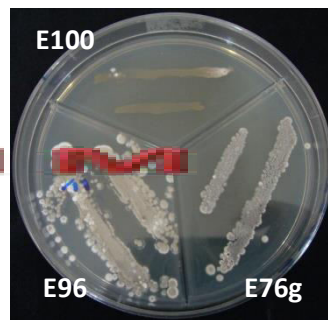
Saccharose



L-arabinose



D-fructose



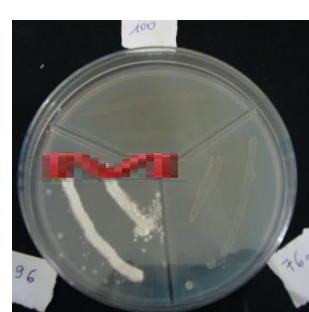
D-mannitol



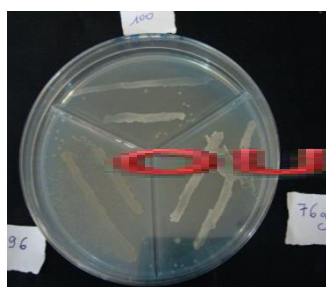
D-xylose



Sorbitol



D-melibiose



Mannose



L-rhamnose



Planche 24 : résultats utilisation du citrate

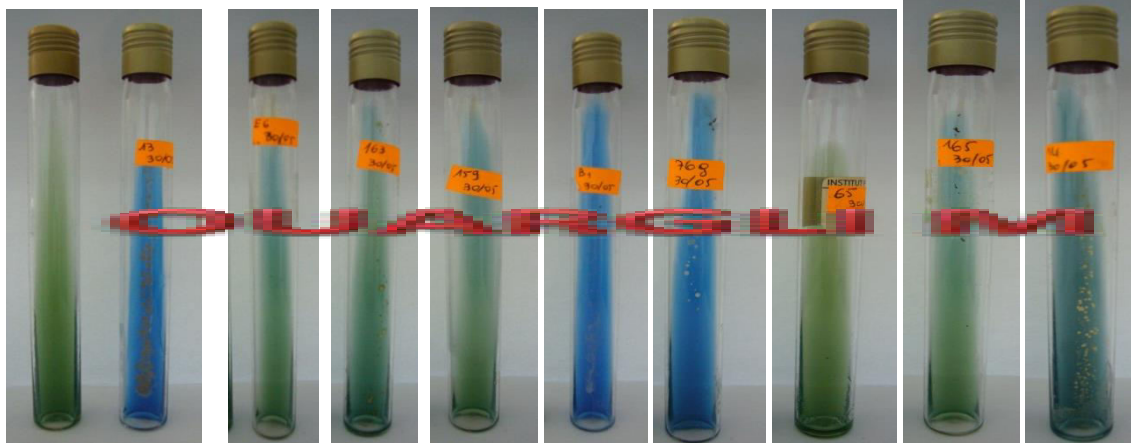
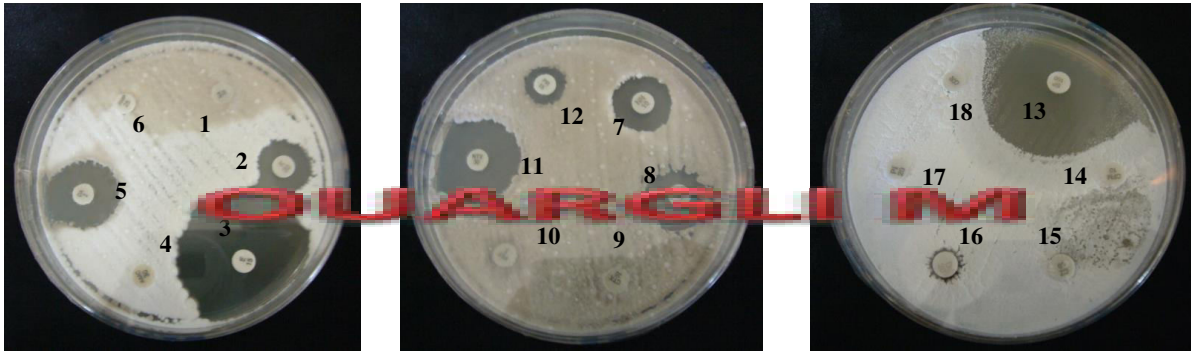
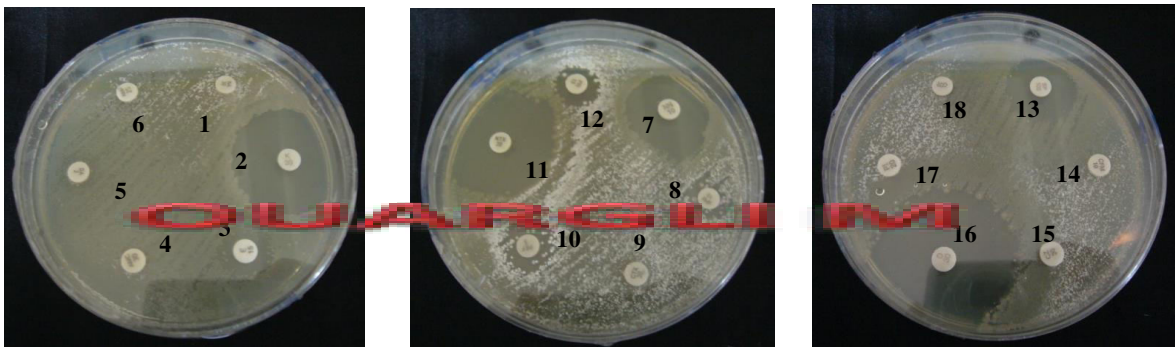


Planche 25 : résultats de la sensibilité des actinomycètes aux antibiotiques

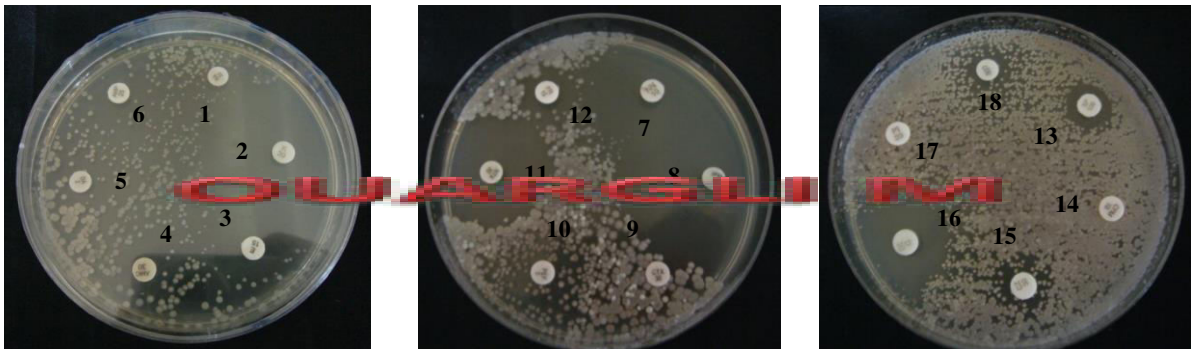
E96



E151



E87'



1 : acide nalidixique (NA)
 2 : kanamycine (K)
 3 : érythromycine (E)
 4 : amoxicilline (AMC)
 5 : tobramycine (TM)
 6 : ampicilline (AMP)

7 : cefalexine (CN)
 8 : imipénème (IPM)
 9 : cefotaxime (CTX)
 10 : péfloxacine (PEF)
 11 : nitroxoline (NTX)
 12 : pristanamycine (PR)

13 : spiramycine (SP)
 14 : cefixime (CFM)
 15 : céfazoline (CZ)
 16 : doxycycline (D)
 17 : acide pipémidique (PI)
 18 : clindamycine (CL)

5. Identification moléculaire :

Tous les isolats étudiés ont fait l'objet de l'extraction et le séquençage de leurs 16S rDNA afin de déterminer leurs emplacements phylogénétique. L'électrophorèse des produits de la PCR des gènes de l'ARNr 16S des isolats testés, le gel d'agarose-TBE est photographié sur table UV, les bandes d'ADN ont migré dans la région 1500 paires de bases (**Figure n°17**).

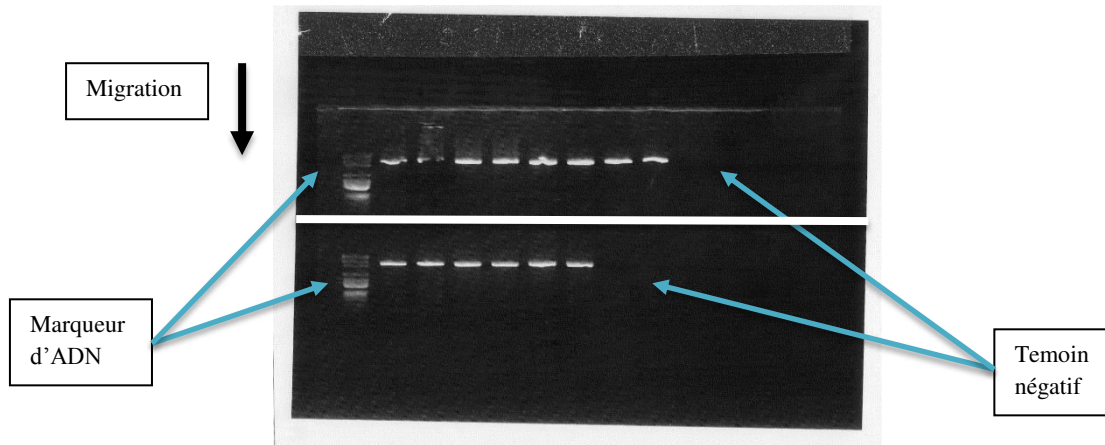


Figure n°17: Résultats de l'électrophorèse des produits de la PCR des isolats testés.

Après séquençage en utilisant 8 amorces (357F, 357R, 536F, 536R, 800F, 800R, 1050F, 1050R), les séquences obtenus ont été analysées et assemblées par le logiciel ChromasPro version 1.5.

La comparaison de séquences obtenues avec celles disponibles au niveau de la base de données génomique GenBank, nous a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique de ces isolats. Suite à ces résultats un arbre phylogénétique est réalisé par la méthode de « neighbor joining » (**Saitou and Nei, 1987**) à l'aide du logiciel Mega 4, l'arbre phylogénétique de l'isolat E96 présenté dans la **figure n°18**.

Afin d'évaluer la diversité des isolats, une PCR a été réalisée sur les vingt isolats en utilisant des amorces spécifiques d'actinomycètes qui permettent l'amplification d'un fragment de 1500 (**Renvoisé A, 2012**). Les séquences obtenues sont comparées avec celles disponibles dans les bases de données GenBank en utilisant le programme BLAST à travers le Centre National de l'Information pour la Biotechnologie (NCBI). Les résultats obtenus ont montré que la plupart des isolats sont assignés au genre *Streptomyces*, toutefois l'identification au niveau de l'espèce n'était pas possible du fait que le même pourcentage d'homologie (99 à 100 %) a été obtenu, pour chaque isolat, avec plusieurs espèces de *Streptomyces*. Par contre l'isolat E100 a montré un pourcentage d'homologie de 97% avec *Nonomuraea rubescens strain XMU207* dont le numéro d'accèsion GenBank **HM368621.1**

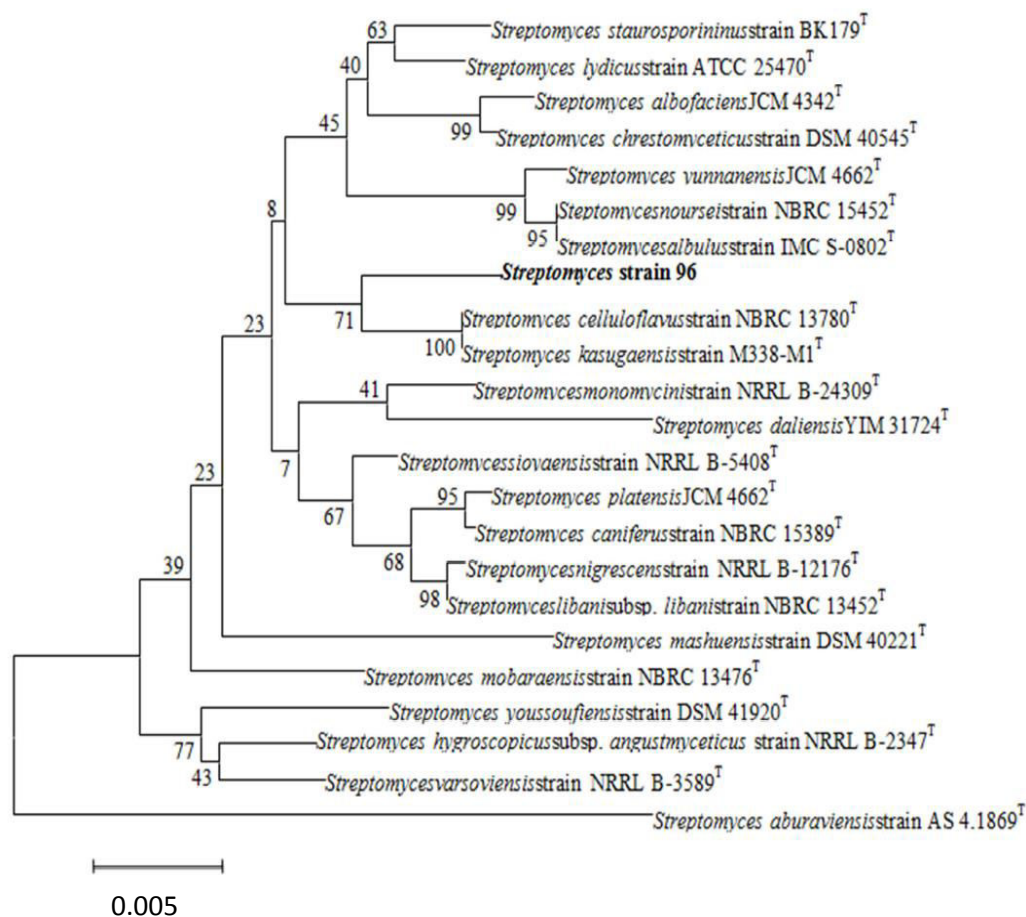


Figure n°18 : arbre phylogénétique basé sur les séquences ADNr montrant les distances entre l'isolat *Streptomyces* E96 et les autres souches *Streptomyces* apparentées. Le nombre de substitution par position de nucléotide est de 0.005.

Les *Streptomyces* sont connues pour être génétiquement très instables avec des taux de mutation particulièrement élevés pour certains caractéristiques et qui persistent d'ailleurs en absence de pression sélectives apparentes (**Chen et al., 2002**). Ces mutations sont dues principalement à des délétions chromosomiques accompagnées d'amplification d'ADN (**leblond et al., 1994**).

Il en ressort que l'isolat *Streptomyces* E96 partage un pourcentage d'identité égale à 98,8% avec les espèces *Streptomyces celluloflavus* et *S. kasugaensis* dont les numéros d'accession GenBank sont NR_041150.1 et NR_024724.1 respectivement.

L'alignement des séquences est réalisé par le programme CLUSTALX, à partir de cet alignement et afin de déterminer la position taxonomique de cet isolat, un arbre phylogénétique a été construit (**Figure n°18**) avec la méthode de neighbour-joining à l'aide du logiciel Mega 4 (**Saitou and Nei, 1987**).

L'isolat E96 occupe la même ligne phylogénétique que deux souches très proche *Streptomyces celluloflavus* et *S. kasugaensis* avec un pourcentage de bootstrap élevé (71%). En effet, plus le pourcentage de bootstrap de deux souches est élevé plus la probabilité qu'elles appartiennent à la même espèce est élevé.

Selon la nouvelle classification de **Labeda et al. (2012)**, les souches de *Streptomyces* dont le pourcentage de bootstrap est inférieur à 60% sont classées dans des groupes différents.

Selon **Masa H et al. (1995)**, génétiquement une seule base fait la différence entre *S. celluloflavus* et *S. kasugaensis*. Toutefois, les données physiologiques montrent une grande diversité métabolique entre ces deux espèces (**tableau n°27**).

Tableau n°27: comparaison caractères physiologiques de *S. celluloflavus*, *S. kasugaensis* et la E96.

	<i>S. kasugaensis</i>	<i>S. celluloflavus</i>	E96
L-arabinose	-	+	-
D-Xylose	-	+	-
Glucose	+	ND	+
D-Fructose	+	ND	+
Rhamnose	-	+	+/-
Sucrose	-	+	ND
Raffinose	+	ND	-
Inositol	+	ND	
D-mannitol	-	ND	+
Lactose	-	+	ND
Liquéfaction de la gélatine	+	ND	+
Dégradation de l'amidon	-	+	+
Pigment mélanoïde	-	ND	-

+ : positif, - : négatif : ND : non déterminé

La combinaison de techniques moléculaires avec les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques montrent clairement que l'isolat E96 possède des caractères différents des souches *S. celluloflavus* et *S. kasugaensis* qui sont les plus proches.

L'isolat E96 ne ressemble donc à aucune espèce citée, ce qui nous laisse dire qu'il s'agit probablement **d'une nouvelle espèce**. Cependant, pour confirmer notre hypothèse il faut faire appel à une autre technique, utilisée dans de nombreuses études sur les *Streptomyces* et qui

permet d'estimer le degré de parenté entre deux souches. C'est l'hybridation ADN-ADN, Pour **Stackebrandt et Goebel (1994)**, lorsqu'il existe moins de 97% de similarité entre les séquences des ARNr 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes.

Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 97, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN. C'est une méthode qui a montré dans certains cas une bonne corrélation avec l'identification basée sur la morphologie et la physiologie.

II. Étude des *Cryptococcus* :

1. Prélèvements environnementaux :

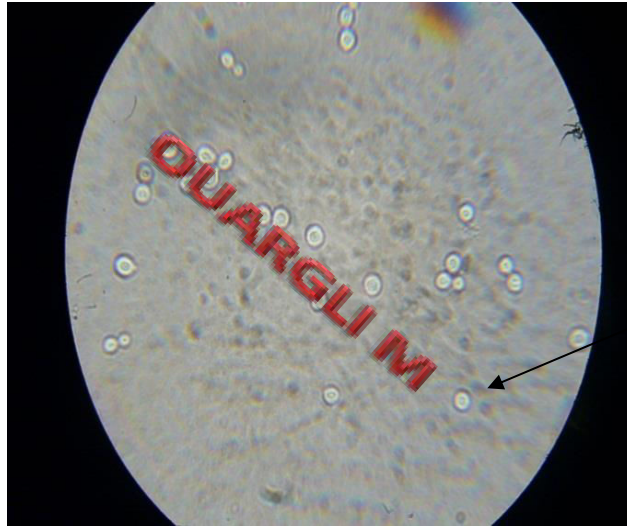
Un total de 117 échantillons a été recueilli, 91 échantillons à partir des fientes des pigeons, 16 à partir de l'air atmosphérique au tour des fientes et 10 à partir de matériaux vivants recueillies sur les arbres d'eucalyptus.

Après traitement des échantillons et incubation à 30°C pendant 8jours. Les résultats de l'analyse mycologique primaire présentée dans les planches n°26, 27 et 28, nous ont révélé la présence du genre *Cryptococcus* dans 12.5% des cultures de fiente de pigeon et 5.5% des cultures de l'air atmosphérique.

2. Identification

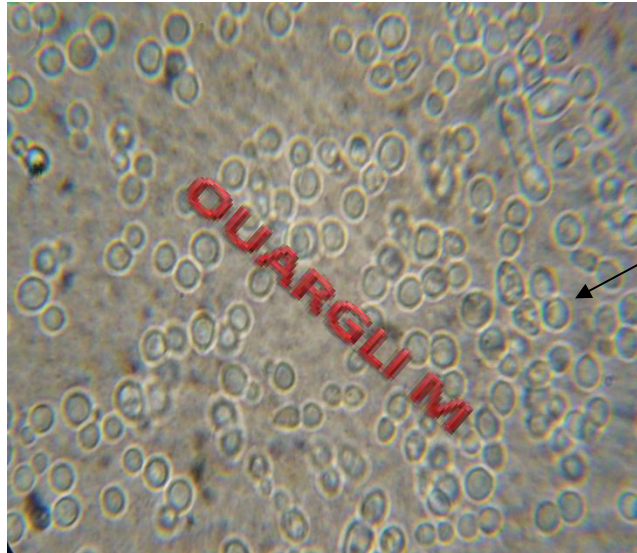
2.1. Identification morphologique

L'identification morphologique est basée sur une coloration à l'encre de chine dilué au 5^{ème} puis une observation au microscope optique au grossissement X40, cette observation nous a permis de voir la présence d'un tout petit halo blanc au tour des colonies, la capsule



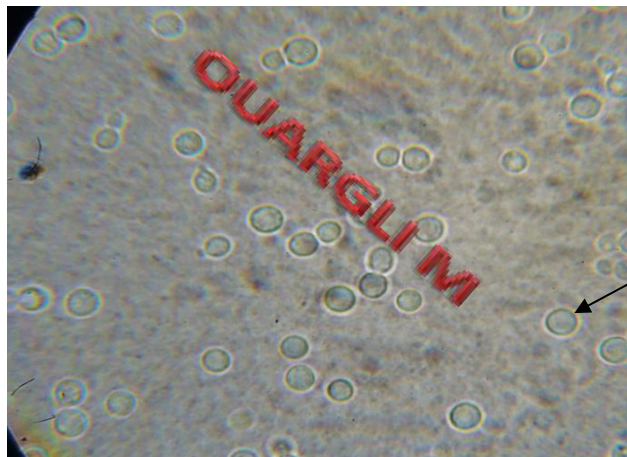
Levure
capsulé

L'aspect microscopique de la souche AF2



Levure
capsulé

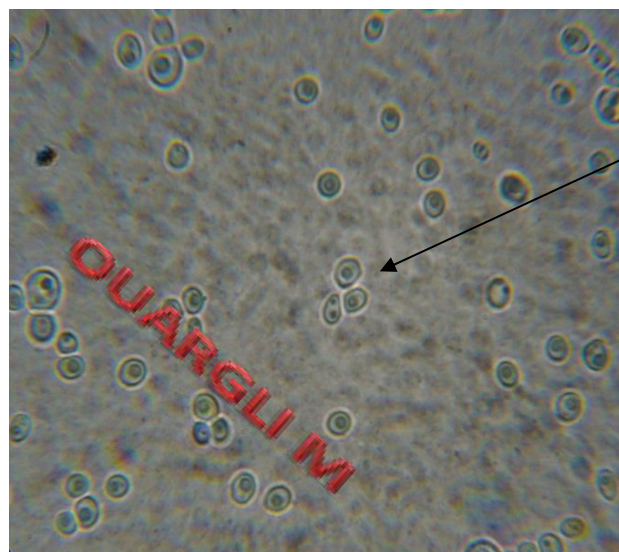
L'aspect microscopique de la souche AF10



Levure
capsulé

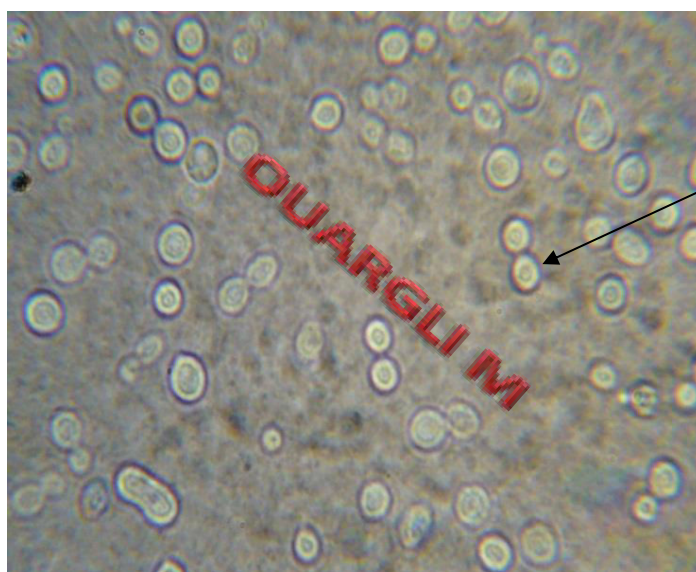
L'aspect microscopique de la souche F1

Planche n°27 : (suite) aspect morphologique des isolats de *Cryptococcus*



Levure
capsulé

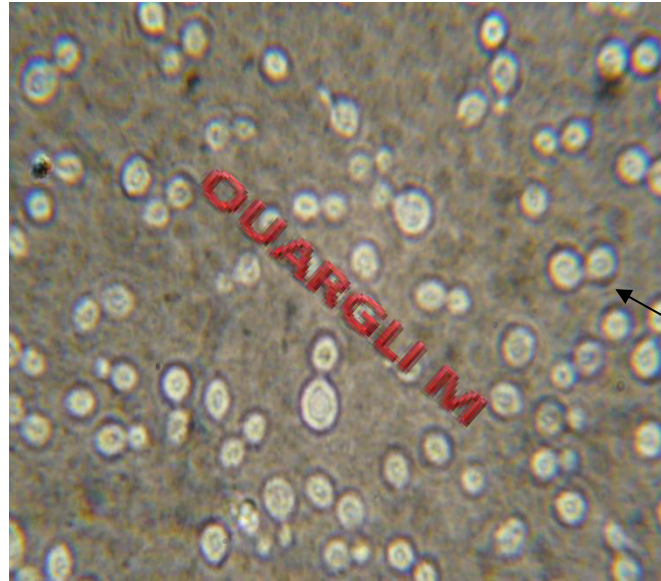
L'aspect microscopique de la souche F2



Levure
capsulé

L'aspect microscopique de la souche F6.5

Planche n°28 : aspect morphologique des isolats de *Cryptococcus*



Levure
capsulé

L'aspect microscopique de la souche F8



Levure
capsulé

L'aspect microscopique de la souche F9

2.2. Identification biochimique

Les résultats de l'identification biochimique présentés dans le tableau n°24 montrent que les isolats suspectés appartiennent au genre *Cryptococcus*. Toutefois une différence au niveau de certain caractère a été observé (voir **tableau 28**).

Tableau N° 28 : caractère biochimique API 32C des *Cryptococcus*.

	CN104	CN721	CN954	AF2	AF10	F1	F2	F6.5	F8	F9
GAL	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ACT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CEL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
RAF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2KG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MDG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIB	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
PLE	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ERY	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GRT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GNT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LVT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2.3. Identification moléculaire :

Les séquences obtenues ont été comparés contre les séquences nucléotidiques déposées dans GenBank en utilisant le programme BLAST via le serveur NCBI et la Société internationale de Mycologie humaine et animale (ISHAM) –ITS reference DNA barcoding database.

La comparaison des séquences des isolats cliniques a donnée 100% de similarité avec la souche *Filobasidiella neoformans UWFP-360* dont le numéro d’accession est : AF335937.1

La comparaison des séquences de l’isolat F9 : a donnée 100% de similarité avec la souche *Cryptococcus diffluens* dont le numéro d’accession est AM117836.1

La comparaison des séquences des isolats AF2, AF10, F1, F2, F8 et F6.5: a donnée 99% de similarité avec la souche *Cryptococcus albidus KDLYL12-1* dont le numéro d’accession est : JX174413.1

2.4. Étude de la sensibilité de *Cryptococcus* aux antifongiques :

Les agents antifongiques utilisés sont les suivants : Amphotericin B, 5-Flucytosine, Anidulafungin, Caspofungin, Micafungin, Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, Voriconazole. L’utilisation de la méthode rapide « SensititreYeast One » nous a donné des résultats qualitatifs et quantitatifs (CMI) de la sensibilité des souches cliniques et environnementales (voir tableau n°29 et n°30).

Tableau n°29 : résultats antifongigramme des isolats environnementaux.

Agent antifongique	Dilution mg/l	CMI AF2	CMI AF10	CMI F1	CMI F8	CMI F9
ANI	0.015 – 8	>8	>8	>8	>8	>8
MICA	0.008 – 8	>8	>8	>8	>8	>8
CASPO	0.008 – 8	>8	>8	>8	>8	>8
5-FLUORO	0.06 – 64	8	4	>64	>64	>64
POSA	0.008 – 8	0.5	0.25	1	0.25	0.25
VORI	0.008 – 8	0.25	0.12	0.5	0.12	0.12
ITRA	0.015 – 16	0.12	0.12	0.5	0.5	0.06
FLU	0.12 – 256	16	8	64	16	32
AMPB	0.12 – 8	<0.12	<0.12	0.25	0.25	<0.12

Tableau n°30 : résultats antifongogramme des isolats cliniques

Agent antifongique	Dilution mg/l	CMI 104	CMI 954	CMI 721
ANI	0.015 – 8	>8	>8	>8
MICA	0.008 – 8	>8	>8	>8
CASPO	0.008 – 8	>8	>8	>8
5-FLUORO	0.06 – 64	2	2	2
POSA	0.008 – 8	0.06	0.06	0.25
VORI	0.008 – 8	0.03	0.03	0.25
ITRA	0.015 – 16	0.06	0.06	0.12
FLU	0.12 – 256	8	4	8
AMPB	0.12 – 8	0.12	0.12	0.12

2.5. Discussion :

La cryptococcose est une mycose cosmopolite humaine et animale évoluant sur un mode subaigu ou chronique. Cette mycose est due à une levure capsulée appartenant au genre *Cryptococcus*. *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gatii* représentent la cause la plus commune de la cryptococcose en raison de leur nature intrinsèque pathogène. Au cours des dernières années, la cryptococcose est devenue un problème mondial public important de la santé qui afflige non seulement les individus immunodéprimés, mais les sujets immunocompétents sont également en danger (**Orazio Romeo, 2012**).

D'autres espèces du genre *Cryptococcus*, cependant, ont été rapportées à partir de cas cliniques ainsi. *Cryptococcus albidus* et *C. laurentii* ont été isolés à partir des poumons, du liquide céphalorachidien et des échantillons de sang. *Cryptococcus flavescens*, *C. nodaensis* et *C. laurentii* ont été isolés à partir du liquide céphalo-rachidien. *Cryptococcus adeliensis* a été rapporté être impliqué dans la méningite, et a été isolé à partir d'une biopsie pulmonaire d'un adulte de sexe masculin souffrant d'une maladie pulmonaire progressive et de la cavité buccale d'un garçon de 8ans infecté par le VIH (**Boekhout et al, 2003; Rimek et al, 2004; Tintelnot et al, 2005 ; Serda Kantarcioğlu et al, 2007**).

La littérature scientifique sur cryptococcose a eu une contribution importante dans la direction et explique les faits liés à l'agent de cette maladie. L'habitat des levures du genre *Cryptococcus* est l'environnement. Les sources environnementales sont très variées et sont liés à des substrats organiques, tels que les fientes d'oiseaux, le matériel végétal en décomposition, dans le sol et dans les arbres d'eucalyptus (**Montenegro H et al, 2000 ; Filiú**

WFOF *et al*, 2002 ; Baroni FA *et al*, 2006 ; Reginaldo S. *et al*, 2009). Les pigeons (*Columbia livia*) ont un rôle important dans la diffusion de ces levures pathogènes, puisque ces oiseaux ont tendance à se concentrer dans les centres urbains à la recherche de nourriture, des abris et des terrains de reproduction (Kwon-Chung and Bennett, 1992 ; Reginaldo S. *et al*, 2009).

Dans notre étude, trois sources environnementales ont été étudié : les fientes de pigeons, l'air atmosphérique et les arbres des Eucalyptus.

En calculant le taux de *Cryptococcus* isolée selon le nombre de prélèvement pour les trois types d'échantillons, nous remarquons que le taux de contaminations dans les fientes des pigeons avec 12.5% est plus élevé que celui dans l'air atmosphérique avec 5.5%. D'après les mêmes résultats, nous constatons que le type d'échantillon le moins concerné par les contaminations selon notre études est les arbres d'Eucalyptus.

La raison de la fréquence élevée de ces isolats dans les fientes est censée être en raison de la capacité de ce champignon à assimiler l'urée, l'acide urique, la xanthine et de créatinine composés qui sont abondants dans les fientes des pigeons (Lattman ML, 1968 ; YA Mahmoud, 2000).

L'identification biochimique des isolats cliniques et environnementaux a montré que ces isolats appartiennent au genre *Cryptococcus*, la présence de différence de certain caractère biochimique entre les isolats cliniques et environnementaux signifie qu'elles appartiennent à des espèces différentes. En comparant nos résultats avec celles réalisé par Refai *et al* en 2014, nous déduisons que les isolats cliniques appartiennent à l'espèce *Cryptococcus neoformans*. Tous les isolats environnementaux appartiennent à l'espèce *Cryptococcus albidus*, à part l'isolat F9 qui se caractérise par sa capacité à assimiler le Méthyl- α D-Glucopiranoside (MDG) et donc il appartient à l'espèce *Cryptococcus diffluens*.

L'identification moléculaire et suite à la comparaison des séquences obtenues contre les séquences nucléotidiques déposées dans GenBank en utilisant le programme BLAST a confirmé les résultats obtenu par l'identification biochimique.

Selon les résultats obtenus par le système « SensititreYeast One » tous les isolats environnementaux ont données une CMI élevée (>8) pour les trois agents antifongiques appartenant à la classe des échinocandines : l'anidulafungine, micafungine et la caspofungine. Toutefois, les isolats des fientes sont résistants à la 5-fluorocytosine et les isolats de l'air atmosphérique ont donné une susceptibilité intermédiaire. Les agents antifongiques appartenant à la classe des azolés, tous les isolats sont résistants au fluconazole, sensible au posaconazole et ont donné une susceptibilité intermédiaire à l'itraconazole et à voriconazole. En revanche, tous les isolats sont sensibles à l'amphotericine B.

En comparant ces CMI avec celles obtenus pour les isolats cliniques de *Cryptococcus neoformans*, nous remarquons qu'il n'y a pas de différence. La même résistance a été remarqué pour les isolats de *Cryptococcus albidus* et *Cryptococcus diffluens* environnementaux et les isolats de *Cryptococcus neoformans* cliniques par rapport aux échinocandines (ANI, MICA et CASPO) et la 5-Fluorocytosine. Tous les isolats cliniques sont aussi sensibles à l'amphotéricine B, voriconazole, l'itraconazole et la posaconazole et un seul isolat sensible au fluconazole.

De nombreuses études se réfèrent à la sensibilité in vitro aux antifongiques des isolats cliniques de *C. neoformans*, cependant, les données sont rares concernant les isolats environnementaux. En **1996**, **Franzot et Hamda** n'ont trouvé aucune différence entre les susceptibilités des isolats cliniques et environnementaux à l'amphotéricine B, 5-flucytosine, kétoconazole, fluconazole et itraconazole. **Pfaller** et ces collaborateurs en 1999 ont étudié l'activité in vitro de 566 isolats cliniques de *C. neoformans* en provenance d'Afrique et aux USA, dans cette vaste étude, 90% des isolats ont été inhibés par le fluconazole tandis que trois isolats (0,5%), tous les isolats des Etats-Unis, ont montré une résistance à cet antifongique. En **2005**, **Yolanda Lopez et al.** ont fait une étude sur 22 isolats environnementaux de *Cryptococcus neoformans*, tous ces isolats étaient sensibles à l'amphotéricine B et résistants au fluconazole, ce qui confirme les résultats obtenu par notre étude.

Les résultats de ce travail peuvent contribuer à une meilleure compréhension de l'écologie des *Cryptococcus* dans l'Est de l'Algérie et remarque la possibilité de contracter une infection de cryptococcose avec des souches préalablement résistantes. Cette résistance témoigne la difficulté thérapeutique rencontré dans les traitements antifongique ce qui pose un problème socioéconomique majeur en santé publique.

III. Mise en évidence de l'activité antifongique

1. Mise en évidence de l'activité antifongique :

Le screening de l'activité antifongique a été réalisé en utilisant la technique du cylindre d'agar et la double couche. Parmi les 20 isolats étudiés, 8 ont donné des zones d'inhibition par rapport aux trois isolats de *Cryptococcus* : *C. neoformans* (clinique) *C. albidus* (environnemental) et *C. diffluens* (environnemental).

1.1. La technique du cylindre d'agar :

Les figures n°19, n°20 et n°21, représentent les histogrammes des diamètres d'inhibition de l'activité antifongique obtenue par la technique du cylindre d'agar en utilisant 4 milieux différents : ISP2, ISP1, Bennet, GYEA sur *C.neoformans*, *C.diffluens* et *C.albidus* respectivement.

1.1.Technique de double couche :

Les figures n°22, 23 et 24 représentent les histogrammes des diamètres d'inhibition de l'activité antifongique obtenue par la technique de double couche en utilisant 4 milieux différents : ISP2, ISP1, Bennet, GYEA sur *C.neoformans*, *C.diffluens* et *C.albidus* respectivement.

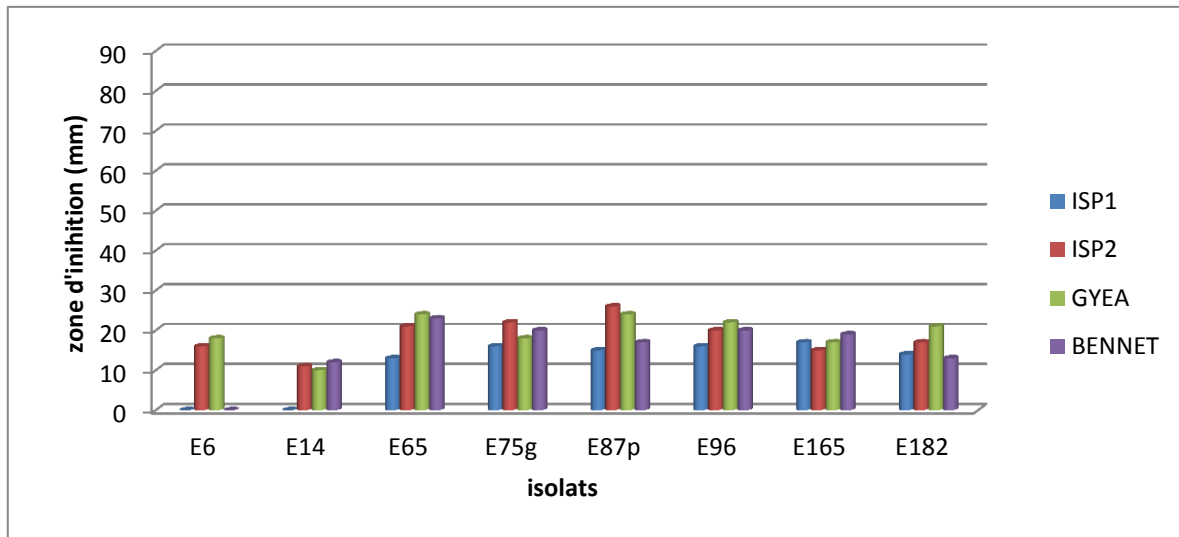


Figure n°19 : diamètre d'inhibition par technique de cylindre d'agar sur *C.neoformans* (clinique).

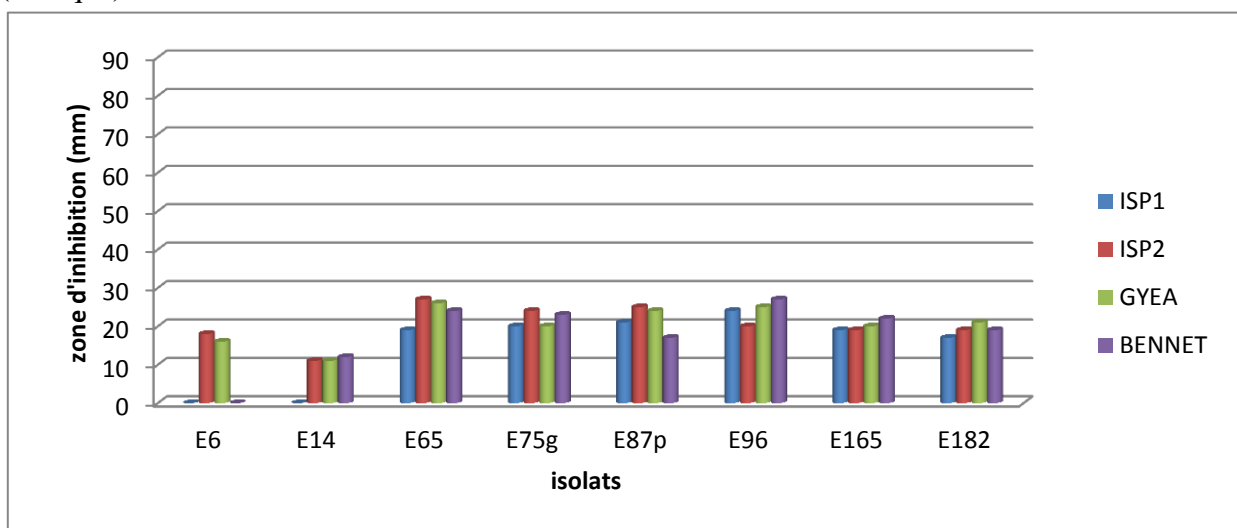


Figure n°20 : diamètre d'inhibition par technique de cylindre d'agar sur *C.diffluens* (environnemental).

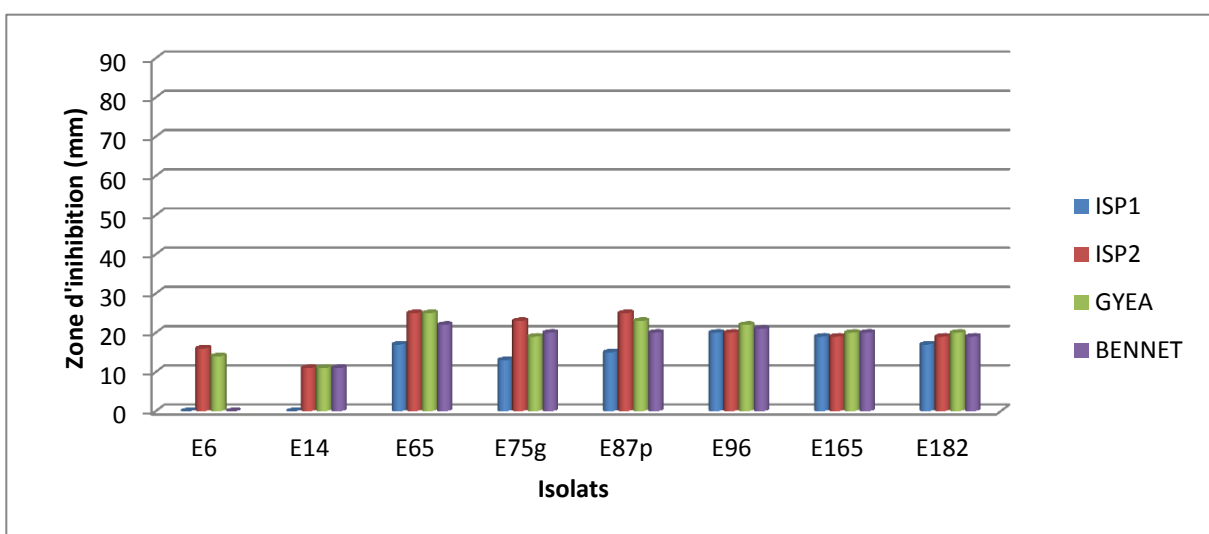


Figure n°21 : diamètre d'inhibition par technique de cylindre d'agar sur *C.albidus* (environnemental)

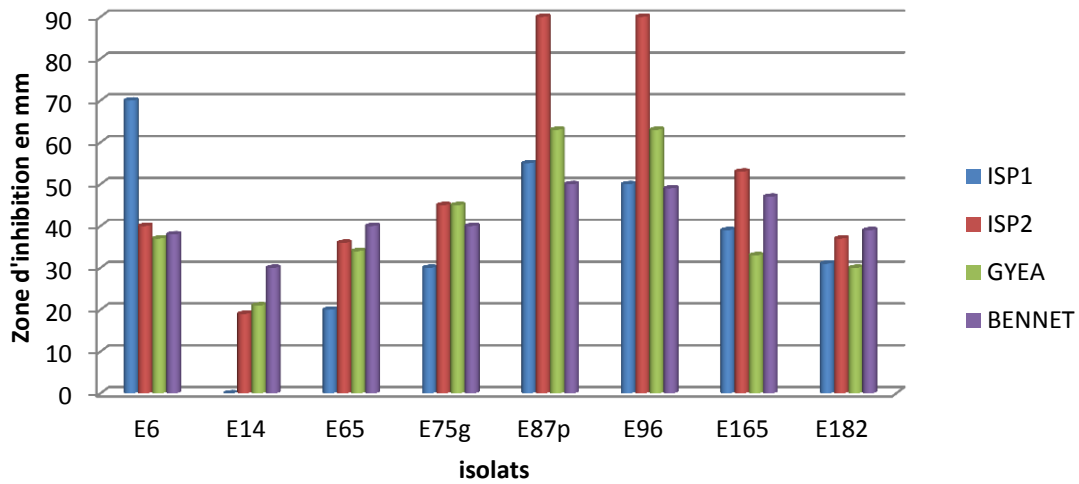


Figure n°22: diamètre d'inhibition par technique de double couche sur *C. neoformans* (clinique).

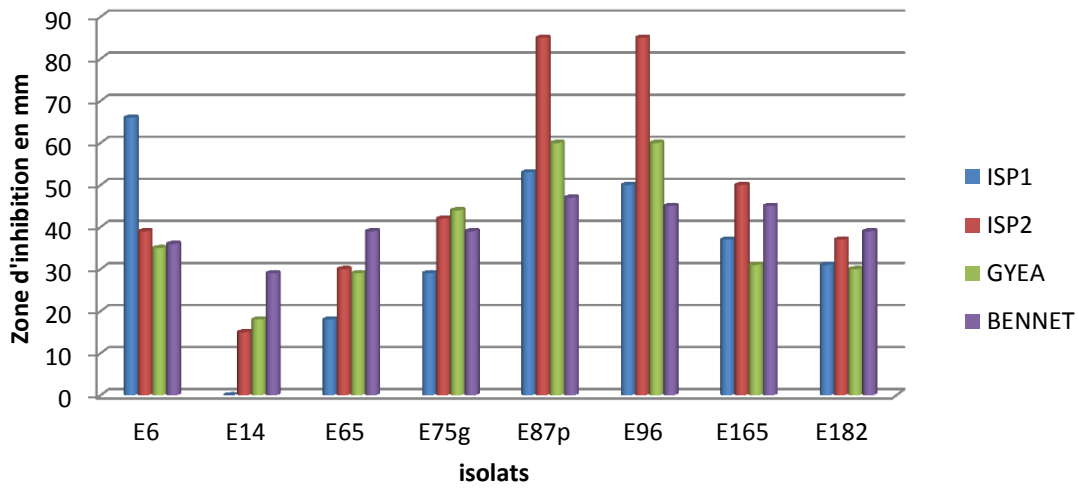


Figure n°23: diamètre d'inhibition par technique de double couche sur *C. diffluens* (environnemental).

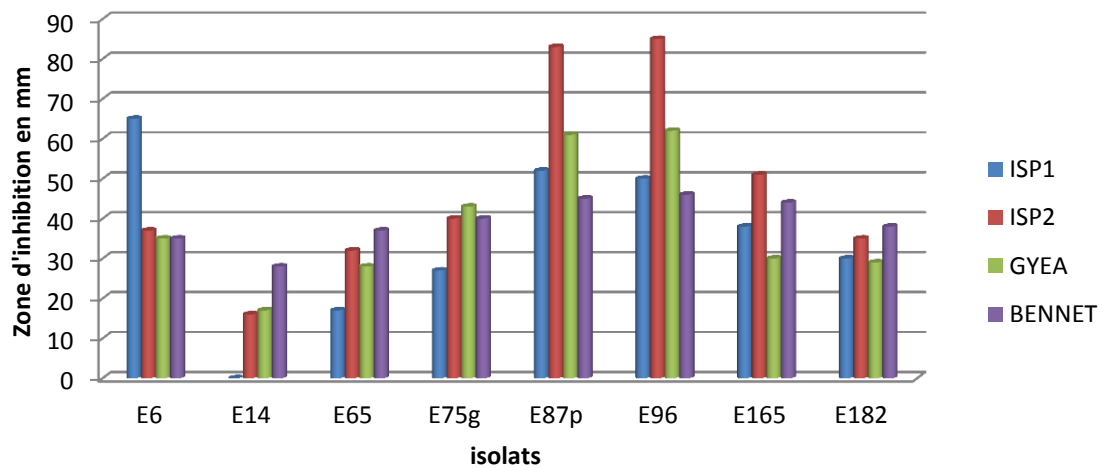


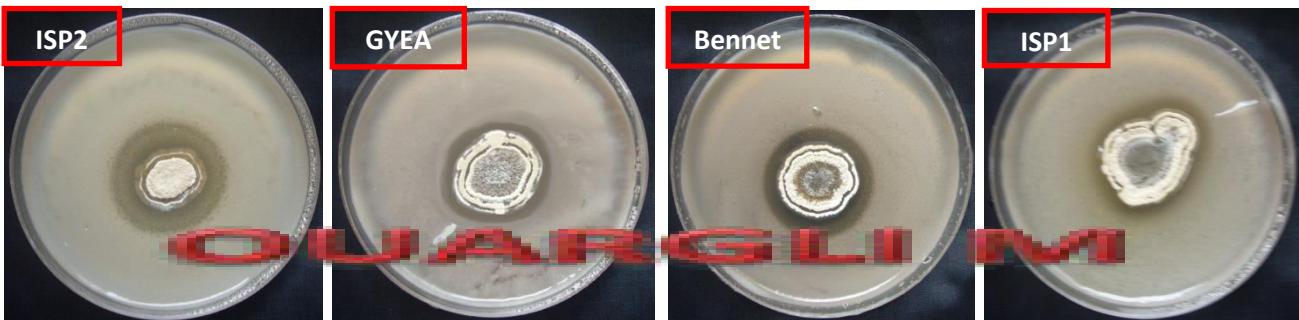
Figure n°24: diamètre d'inhibition par technique de double couche sur *C. albidus* (environnemental).

Planche n° 29 : résultat teste d'activité en double couche

E6



E14



E65



E76g

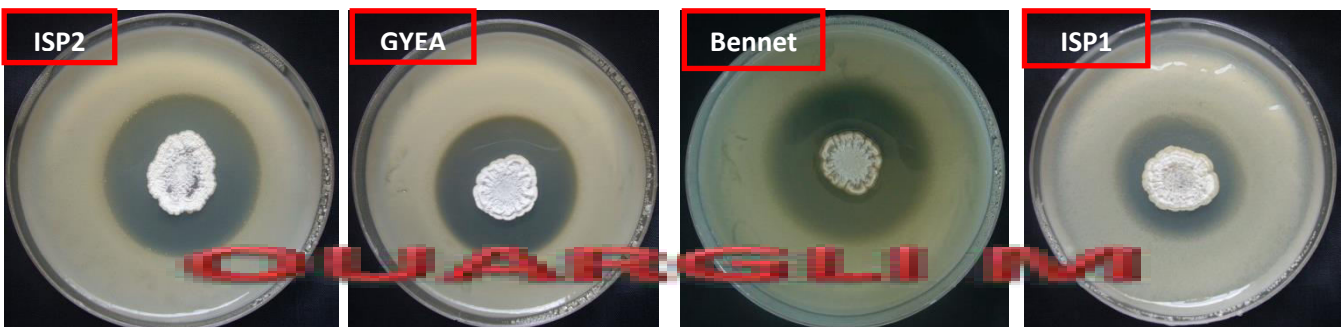
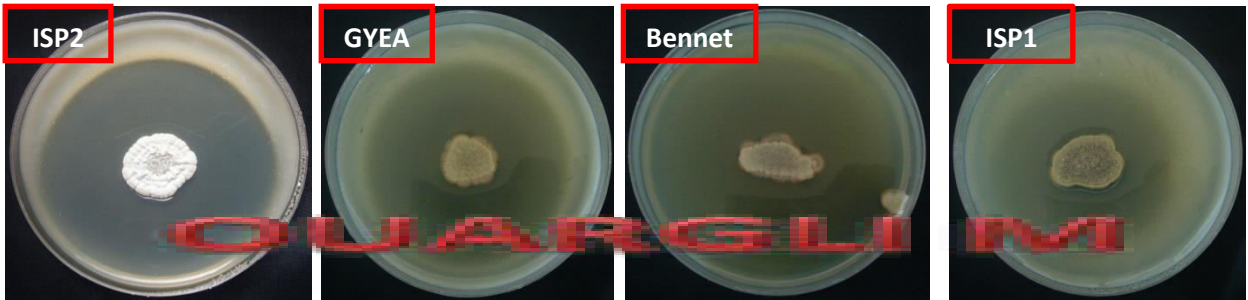
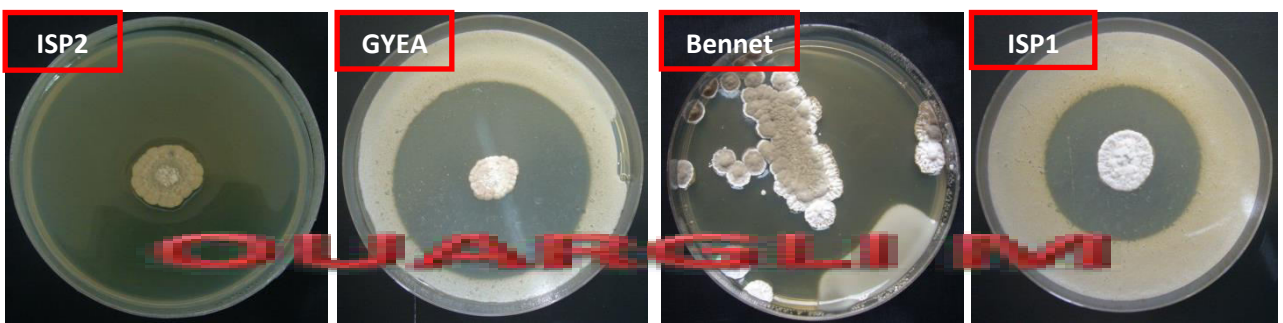


Planche n° 30: (suite) résultat teste d'activité en double

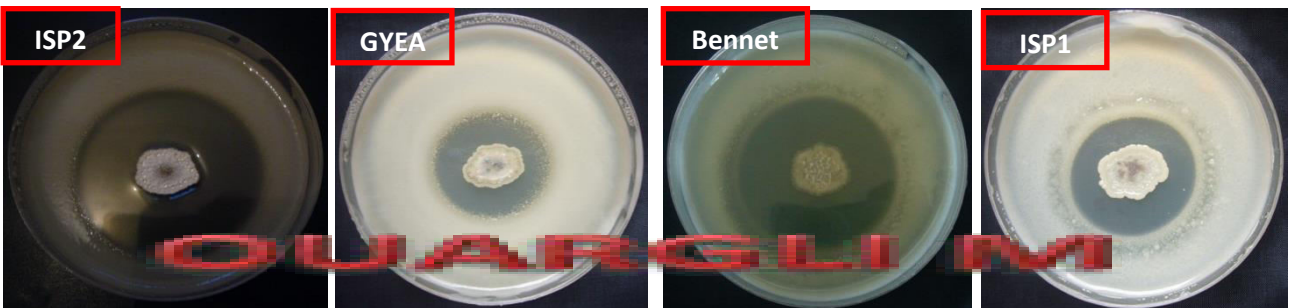
E87'



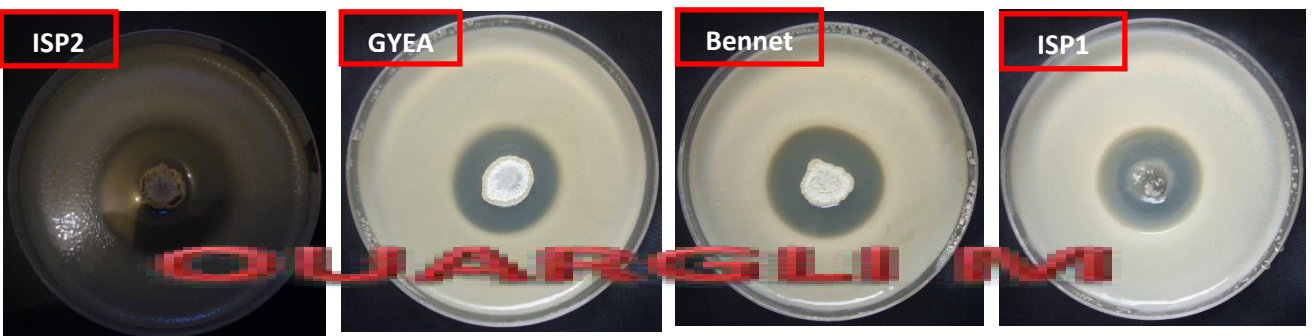
E96



E165



E182



1.2. Discussion :

L'activité antifongique a été mise en évidence par deux méthodes de diffusion en milieu solide : la double couche et le cylindre d'agar. En effet, une forte concentration de molécules bioactives libérées diffuse plus rapidement que la croissance de la souche-test ce qui conduit à une zone d'inhibition importante (**Koch, 1999**).

L'utilisation de deux techniques nous a permis de détecter et de confirmer l'effet inhibiteur des isolats actifs. Parmi les 20 isolats étudiés, huit isolats d'actinomycètes (soit 40%) sont actifs sur les isolats tests. Les zones d'inhibitions obtenues par la technique de double couche étaient plus importantes que celles obtenues par la technique de cylindre d'agar pour la totalité des isolats actifs, par ailleurs, la technique de double couche est mieux adaptée pour l'étude des activités antifongiques (**ouhdouch et al., 2001 ; Gandhimathi et al., 2008 ; spadari et al. 2013**), elle permet une diffusion des microorganismes en masse dans la gélose (milieu Sabouraud en gélose molle), des résultats plus fiables, et une meilleure reproductibilité des résultats car la densité de l'inoculum est préalablement connue (**Bastide et al. 1989; Savioli et al., 2006**).

Les conditions optimales pour la production d'un métabolite ne sont pas nécessairement les mêmes que pour la croissance maximale. De plus, un microorganisme est capable de produire différents métabolites secondaires à différents niveaux, en fonction des paramètres physico-chimiques et de la composition du milieu de culture (sources de carbone, d'azote et de phosphate (**Hodgson, 2000**)).

Il est maintenant bien établi que la composition du milieu de culture peut affecter la production d'antibiotiques par les actinomycètes (**Egorov, 1964 ; Kuster et Williams, 1964 ; Tesic et lukic, 1966 ; Waksman, 1967 ; Singh et al., 2009**). Pour cela, quatre milieux de culture ont été utilisés : ISP1, ISP2, GYEA et le milieu Bennett. Dans l'ensemble des milieux testés, les milieux ISP2 et GYEA ont donné les meilleures zones d'inhibitions, une production moindre a été donnée par le milieu Bennett et faible par l'ISP1 pour tous les isolats actifs. L'isolat E6 a donné 18mm et 16mm pour les milieux GYEA et ISP2 respectivement, le même isolat ne semble pas actif pour les milieux ISP1 et Bennett. Cette variation montre l'importance de la composition du milieu de culture sur la production d'antifongiques. Ces résultats convergent parfaitement avec ceux de **Dick et al., 1994, Haque et al., 1995, Theobald et al., 2000**. C'est pour ces raisons, il est impératif de tester l'activité antibiotique des isolats sur plusieurs milieux avant de se prononcer.

Les diamètres d'inhibitions sur les isolats testes montrent que seul l'isolat E14 a donné de faible résultats pour les quatre milieux utilisé. Par ailleurs, les autres isolats actifs ont montré une bonne activité vis-à-vis les isolats testes : *Cryptococcus neoformans* (clinique), *Cryptococcus albidus* et *Cryptococcus diffluens* (environnemental) y compris ceux résistant à la 5-fluorocytosine, l'anidulafongine, la caspofongine et la micafongine.

Nos résultats démontrent que pour le même isolat actif et sur le même milieu le diamètre des zones d'inhibition est le même pour les trois isolats teste étudiés, ces résultats sont compatible avec les résultats de notre étude précédente de la susceptibilité des isolats cliniques et environnementaux vis-à-vis les antifongique commercialisé.

2. Optimisation de condition de production

Aujourd'hui parmi les axes d'investigation les plus actifs, la recherche de souches produisant des antibiotiques en quantité importante à partir de matière première peu coûteuse s'accompagnant de conditions de production plus économiques, occupe une place importante en biotechnologie.

Pour être mené à bien, ce travail de sélection nécessite une bonne connaissance de cette production antifongique. Une étude du jour optimal de production de métabolite secondaire a été réalisée pour les isolats actifs en utilisant quatre milieux différents.

2.1. Cinétique de production :

Les cinétiques de production ont été suivies pendant 14 jours sur quatre milieux ISP1, ISP2, GYEA et Bennet pour les isolats actifs. Les résultats sont représentés dans les figures : 25, 26, 27, 28 et 29.

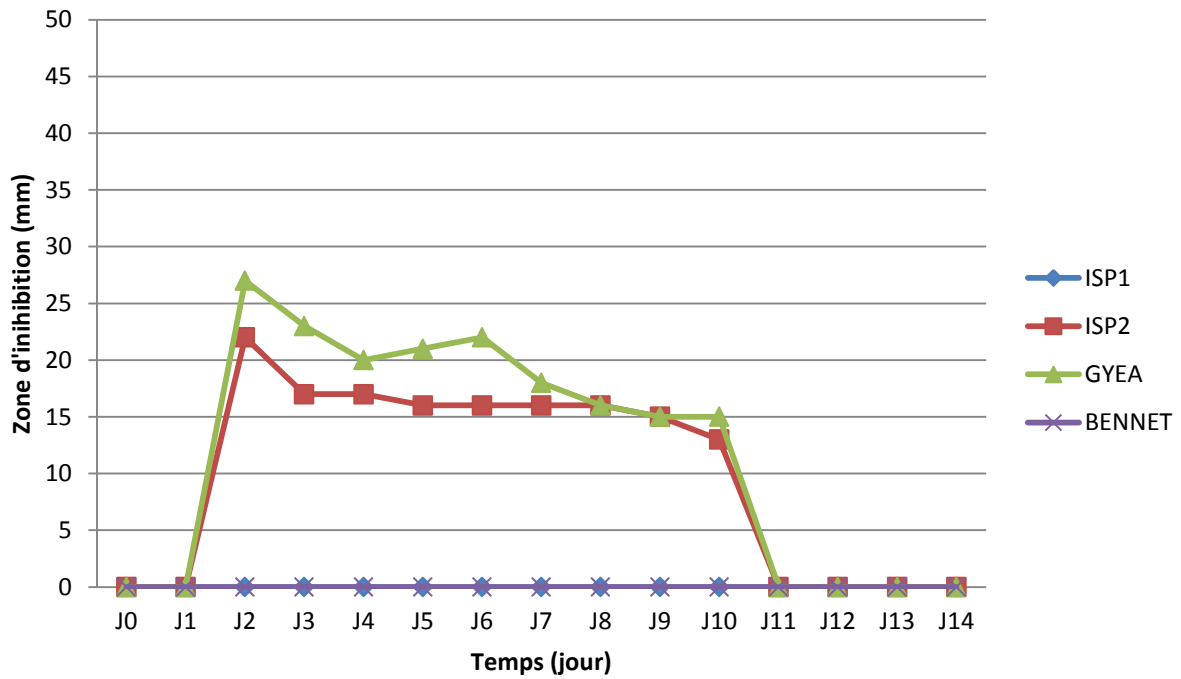


Figure n°25 : cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E6

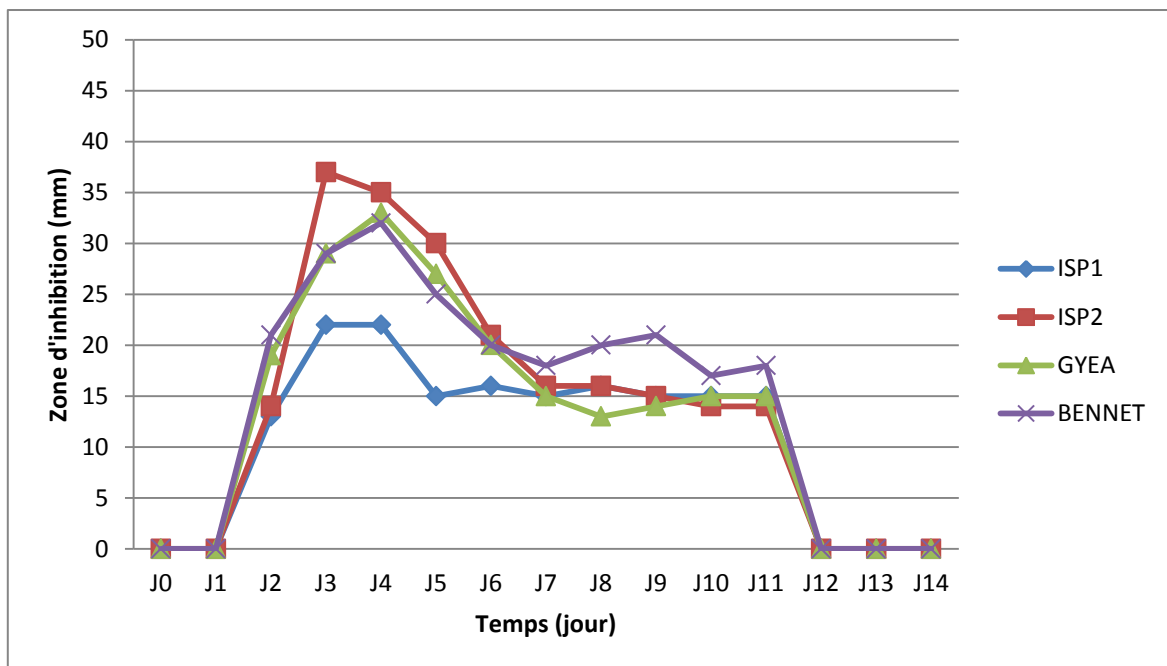


Figure n°26 : cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E76g

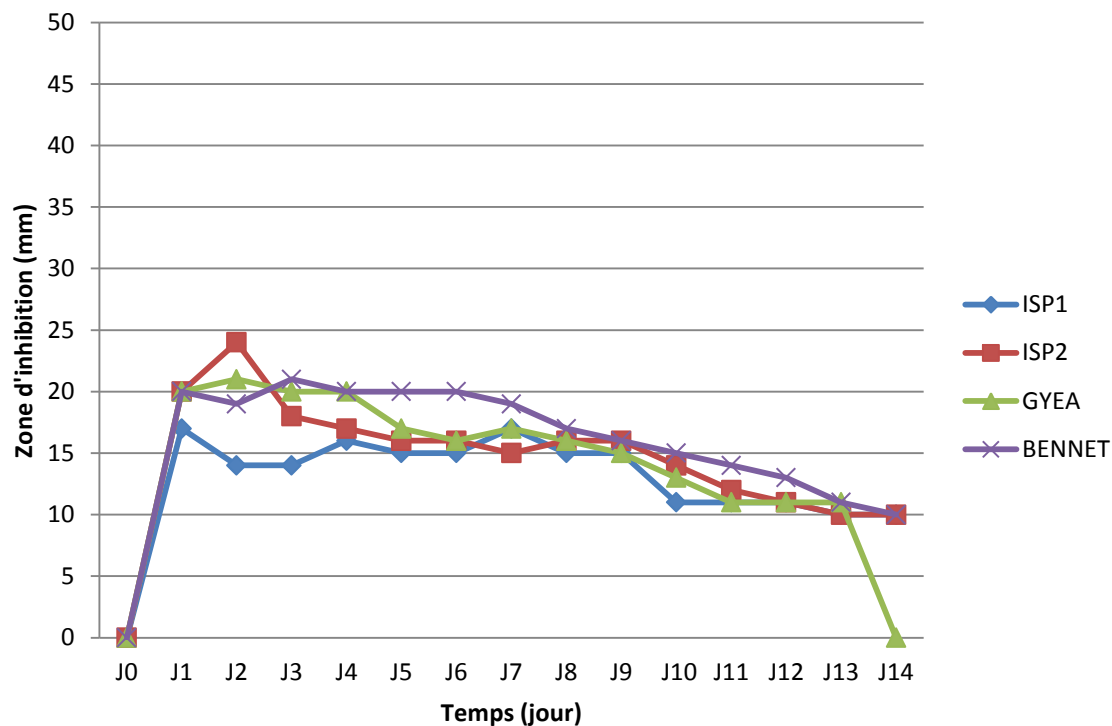


Figure n°27 : cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E165

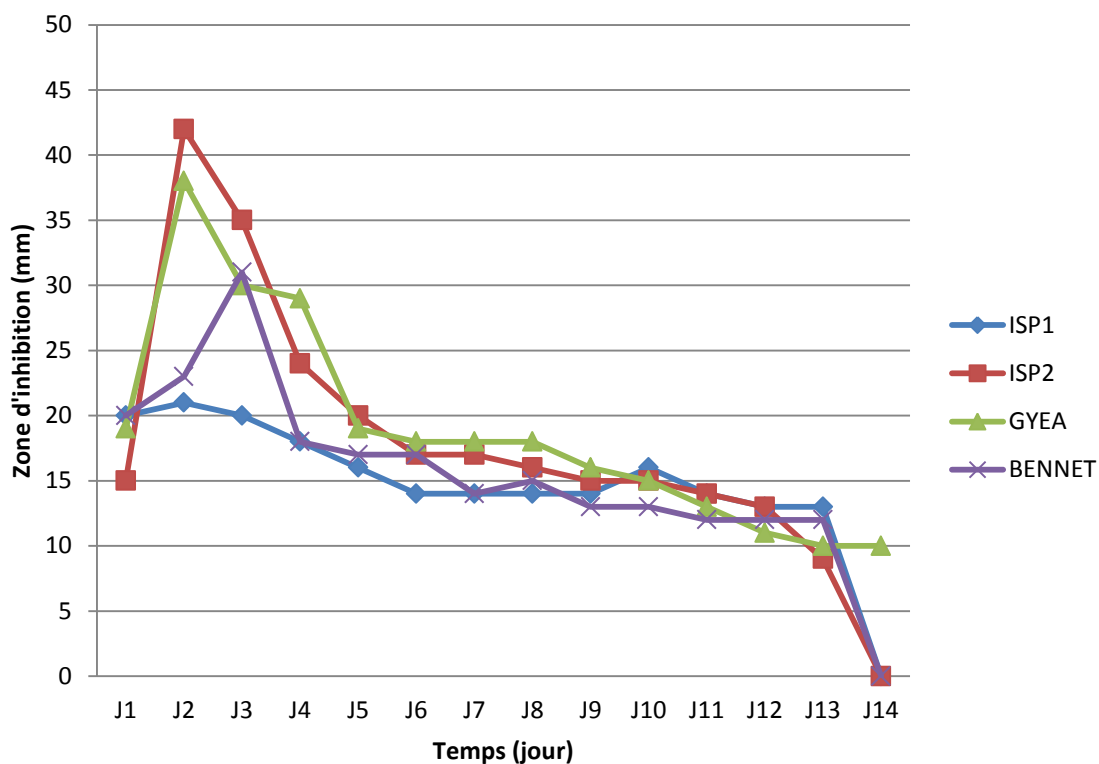


Figure n°28 : cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E182

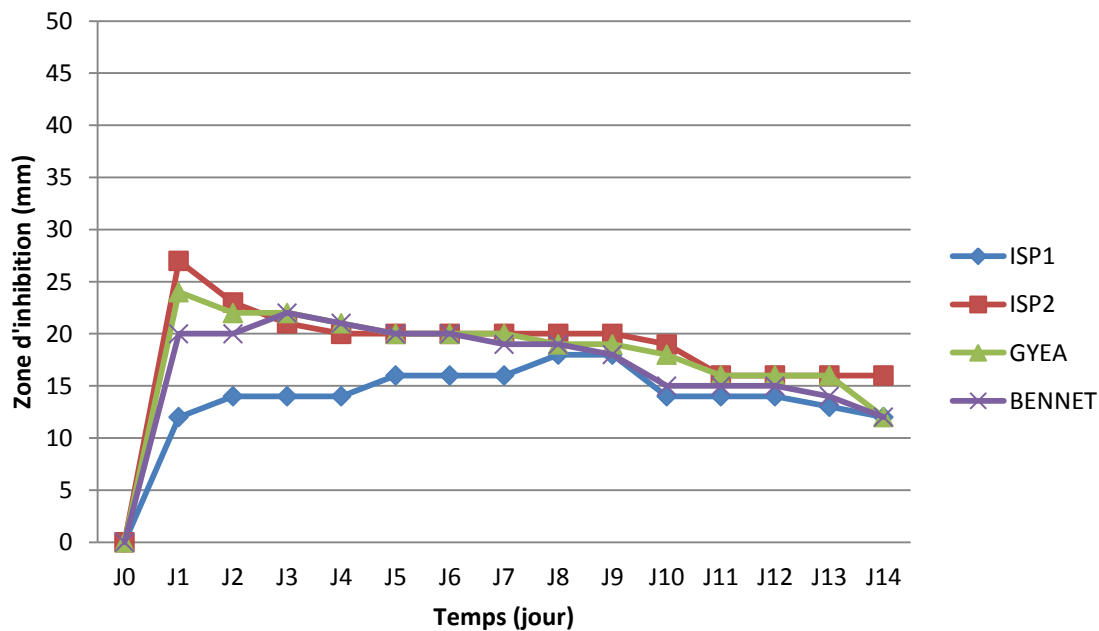


Figure n°29: cinétique de production des métabolites secondaire de l'isolat E96

2.2. Discussion

La production des antibiotiques est influencée par un ensemble de facteurs nutritionnels et environnementaux qui permettent de mettre en évidence certains traits majeurs, avec de nombreuses exceptions (Iwai et Omura, 1982).

En effet, il est très difficile de dégager des règles de production unique, car il existe une grande diversité de souche productrice avec plusieurs voies de biosynthèse.

Dans la plupart des cas, il est difficile de savoir ce qui détermine l'initiation du métabolisme secondaire à savoir le taux de croissance faible ou bien la limitation nutritionnelle qui y est la plupart du temps associée (Trilli et al., 1987).

La cinétique de production des isolats actifs montre des débuts de production dès le 1^{er} jour (après 24h d'incubation) pour les isolats E96, E165, E87p, E182. Plusieurs antibiotiques synthétisés par des souches de *Streptomyces* apparaissent au premier jour de culture selon les travaux de Martin et Demain (1980), Lohr et al. (1989) et Seo et al. (2010), Boughachich F (2012). La synthèse des molécules antibactériennes par les souches actinomycétales se fait très rapidement probablement parce que les cellules possèdent les enzymes et/ou les précurseurs nécessaires pour leur synthèse ou les produisent rapidement (en moins de 24 heures) Boughachich F(2012).

Le cinétique de production des isolats E96 et E182 est classique, elle se divise en deux phases : une production rapide et importante dès 24h d'incubation, une diminution puis une stabilisation de production jusqu'aux 14^{ème} jour. Pour les isolats E6, E165 et E76g, la cinétique présente des courbes de croissance biphasique (Diauxie, croissance double) sur les milieux GYEA, Bennet et ISP1 respectivement. Cette croissance **biphasique** ou **diauxie** ou **croissance double**, est présentée par des bactéries poussant sur un milieu de culture contenant plusieurs sources de carbones (**Meunier et Choder, 1999**).

Le milieu ISP2 semble favorise l'activité antifongique, car pour les isolats 96, 182, 165, et 76g, la meilleure production de métabolite secondaire été sur ce milieu. Seul l'isolat E6 qui a donné une meilleure production sur le milieu GYEA.

Ces variations de résultats du test d'activité antimicrobienne s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature de ces dernières dépend de la composition, la nature et la concentration des composants du milieu de culture (**Jihani S, 2013**).

La production des métabolites secondaires sont clairement devenu un secteur important de la biotechnologie. Elles intègrent ainsi les champs de recherche des sciences fondamentales et suscitent de nombreuses questions d'intérêt considérable aux scientifiques.

Outre l'intérêt fondamental que suscite la compréhension du métabolisme des actinomycètes producteurs d'antibiotiques, les exigences de la concurrence industrielle et le besoin accru en antibiotiques, particulièrement en antifongiques, sont tels que le travail d'optimisation de la production utilisant plusieurs techniques n'est pas prêt de s'achever. Ce secteur industriel repose sur deux facteurs principaux, la nature des molécules bioactives produites (nouvelle molécules plus efficaces) et le rendement de production (taux et temps de production) (**Tiwari et Gupta, 2012 ; Genilloud, 2014**).

Des études récentes ont décrit la corrélation apparente entre l'acquisition de la résistance aux antibiotiques et la productivité du métabolisme secondaire chez des actinomycètes producteurs d'antibiotiques. L'acquisition de la résistance chez ces souches résulte en une augmentation des niveaux de la production de composés bioactifs. Ces études ont suggéré que la sélection de souches sur le critère de résistance aux antibiotiques peut être une stratégie pour découvrir de nouveaux métabolites secondaires (**Derewacz et al., 2013 ; Zerizer H, 2014**).

Les actinomycètes producteurs d'antibiotiques doivent posséder des mécanismes de résistance pour éviter leur propre destruction. Parmi les quels: la modification de la cible,

l'inactivation ou la séquestration de l'antibiotique, les mécanismes d'épanchement. Les gènes codants pour ces mécanismes sont régulés au même moment de la production. De ce fait, les méthodes les plus réussies pour rechercher de nouvelles substances antibiotiques intéressantes est de viser les souches ayant une résistance aux antibiotiques (**Takahashi et al., 1996 ; Marcone et al., 2010**).

En comparant les besoins de la biotechnologie industrielle et les résultats obtenus de nos isolats bioactifs, l'isolat E96 été choisie comme isolat représentatif :

- Résistance à dix antibiotiques testés appartenant à trois classes différentes (pénicilline, quinolone, céphalosporine).
- Taux de production important à un temps réduit : diamètre de zone d'inhibition de 27mm dès le 1^{er} jour d'incubation (moins de 24h).

2.3. Choix du solvant et extraction de molécule bioactive :

L'extraction des métabolites secondaire de l'isolat E96 été réalisé selon les résultats obtenus par la cinétique et les conditions optimales de production. Le milieu ISP2 été choisi comme meilleurs milieu de production et la culture été stoppée après 24h d'incubation.

L'extraction a été réalisée dans un milieu liquide et un milieu solide (gélósé) en utilisant quatre solvants de polarité différente : n-hexane, dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol, du plus miscible dans l'eau au moins polaire.

Il faut noter que l'activité antifongique de l'isolat E96 a été trouvée dans les extraits obtenus par le solvant n-hexane à partir des cultures solides uniquement, le test d'activité sur milieu liquide a donné des résultats négatifs. Par ailleurs, il est reconnu que la production d'antibiotiques par les actinomycètes est plus efficace en milieu solide qu'en milieu liquide et de nombreuses souches sont incapables de produire des antibiotiques en culture liquide (**Shomura et al, 1979; Iwai et Omura, 1982**). Cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces* fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin, 1999 ; Stocks et Thomas, 2001 ; Jihani S, 2013**), cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide. Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus dans le test de mise en évidence et qui ne sont retrouvés qu'après extraction à partir de milieux solides. D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* comme **Bussari et al. (2008) et Badji et al., (2005)**.

Après évaporation sous vide à 45°C, le résidu sec été repris dans 5ml de méthanol. L'activité de l'extrait méthanolique été mesuré par la technique des disques en utilisant deux concentration : 50µl et 100µ. Les disques contenant 100µl ont donnée des zones d'inhibitions de 20mm de diamètre (**Figure n°30**), les disques contenant 50µl n'ont pas donné de résultats.

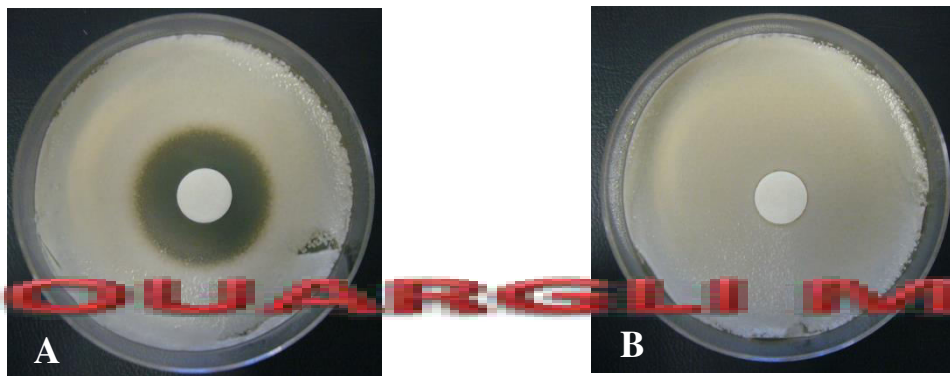


Figure n°30 : zone d'inhibition de l'extrait méthanolique (A) : disque contenant l'extrait méthanolique (B) : disque contenant le méthanol seul.

3. Identification partielle des molécules bioactives :

L'identification partielle a été réalisée en utilisant une chromatographie sur couche mince (CCM) et une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et une étude de l'absorbance à l'UV visible.

3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Pour obtenir le meilleur système de migration, les plaques de CCM identiques ont été migrées avec différents systèmes :

- N-butanol-acide acétique –eau distillé (3 :1 :1 v/v) ;
- Acétate d'éthyle-méthanol (100 :15 v/v) ;
- éthanol-eau distillé-chloroforme (40 :40 :20 v/v) ;
- Hexane-acétate d'éthyle (70 :30 v/v).

Après migration, la révélation été réalisé sous UV par deux longueurs d'onde : 254nm et 366nm (**Figure n°31**). Seul le système N-butanol-acide acétique –eau distillé qui a donné un résultat, six taches dont le rapport frontal de chacune est le suivant :

- R_f1 : 0.57
- R_f2 : 0.66
- R_f3 : 0.70
- R_f4 : 0.78
- R_f5 : 0.81 : couleur jaune
- R_f6 : 0.89 : couleur dense

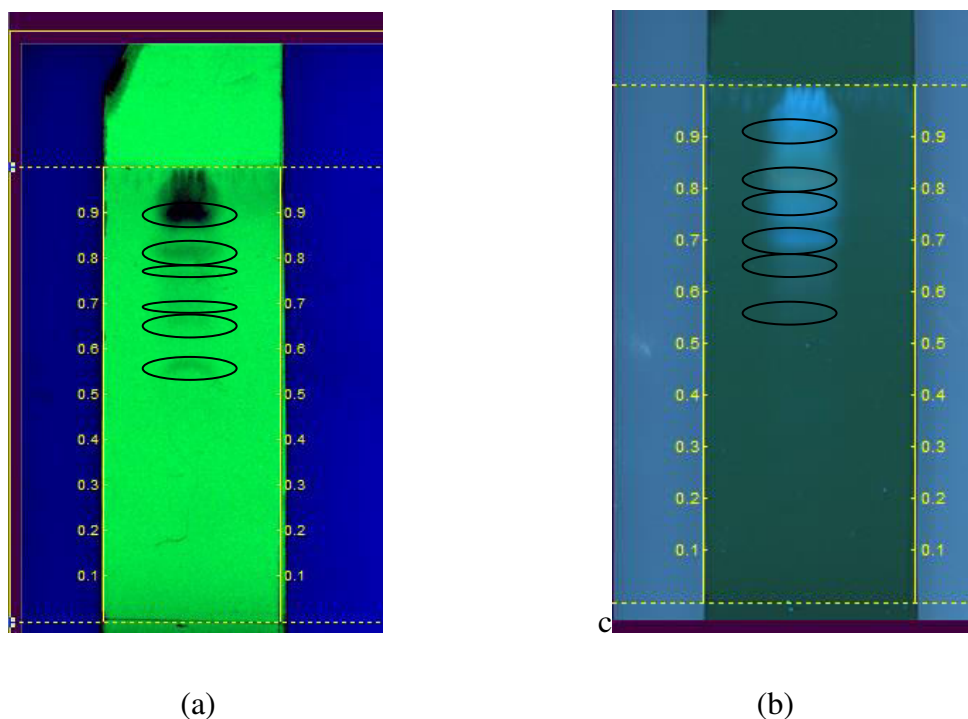


Figure n°31 : photo de la révélation de la plaque CCM sous UV. (a) : 254nm ; (b) : 366nm.

3.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Considérant les résultats de la séparation par chromatographie couche mince, l'extrait de l'isolat E96 a été séparé par HPLC utilisant une colonne C18 et détecté par UV aux deux longueurs d'ondes 254nm et 280nm puis par un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL).

Les résultats primaires de l'HPLC montrent 4-5 pics majoritaires et un ensemble non négligeable de pics minoritaires (**Figure n°32**). Selon l'absorbance des molécules présentes dans l'extrait complexe, on a obtenu trois profils chromatographiques :

- Profile 1, La longueur d'onde 254nm : le premier pic obtenu à 24.8mn, le deuxième à 26.4 mn le troisième à 28.7mn et le quatrième a 41mn.
- Profile 2 : la longueur d'onde 280nm : le premier pic obtenu à 26.4mn, le deuxième à 28.7mn le troisième à 41.1mn et le quatrième à 54mn.
- Profile 3 : DEDL : le premier pic obtenu à 1.9 mn, le deuxième à 28.7mn, le troisième à 47.5mn et le quatrième à 54mn avec un épaulement à la 26.4mn.

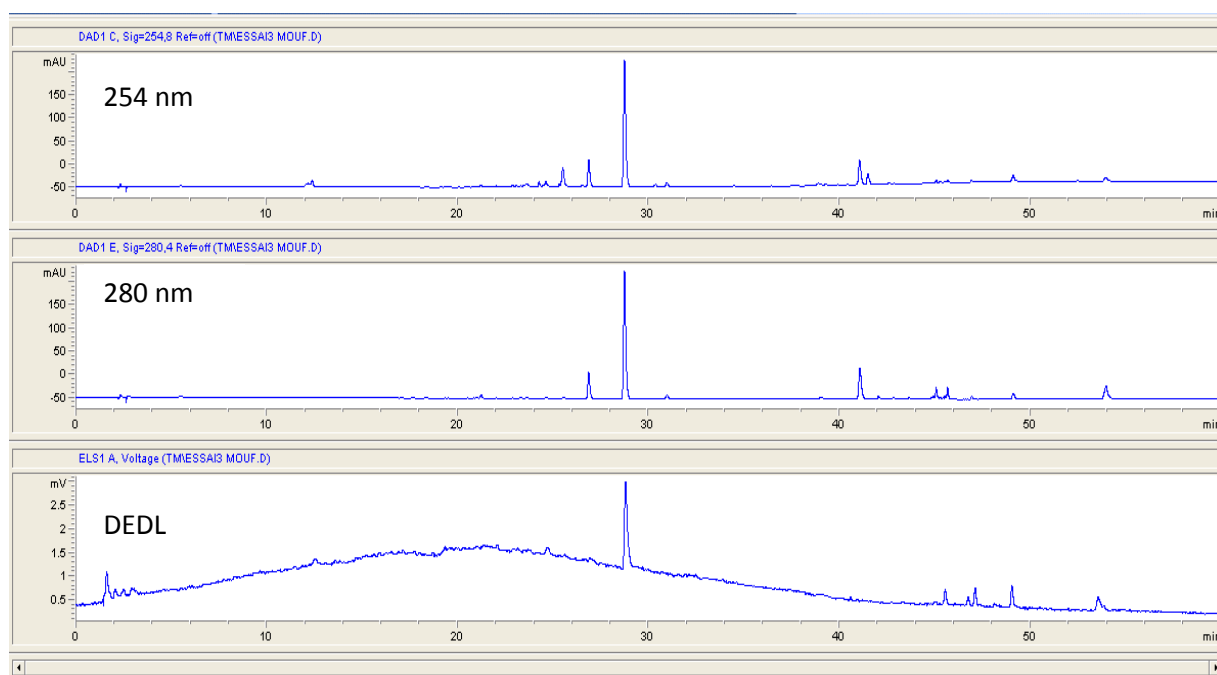


Figure n°32: profils chromatographiques de l'extrait de l'isolat E96 après détection par absorbance en UV à 2 longueurs d'ondes et au DEDL

La présence d'une multitude de molécules absorbant aux deux longueurs d'onde UV et au DEDL est observée dans notre extrait. En comparant cette absorbance, on remarque qu'il y a un pic majoritaire **F2** qui apparaît à la 28.7mn d'éluion dans les trois profils chromatographiques obtenus et 3 pics minoritaire **F1**, **F3** et **F4** ayant respectivement le temps d'éluion suivant : 26.4 mn, 41.1mn et 54mn.

3.3. Spectre UV-visible des fractions :

Le spectre UV-visible des fractions **F1**, **F2** est présenté dans la **figure n°33**, le spectre des fractions **F3**, **F4** est présenté dans la **figure n°34**.

Fraction F1 : le spectre montre deux pics dont le maximum d'absorbance est à 230nm, le deuxième est à 265nm avec un épaulement à 285nm.

Fraction F2 : le spectre montre deux pics dont le maximum d'absorbance est à 230nm, le deuxième est à 270nm avec un épaulement à 285nm.

Fraction F3 : le spectre montre deux pics dont le maximum d'absorbance est à 230nm, le deuxième est à 279nm.

Fraction F4 : le spectre montre un seul pic avec 288 nm d'absorbance.

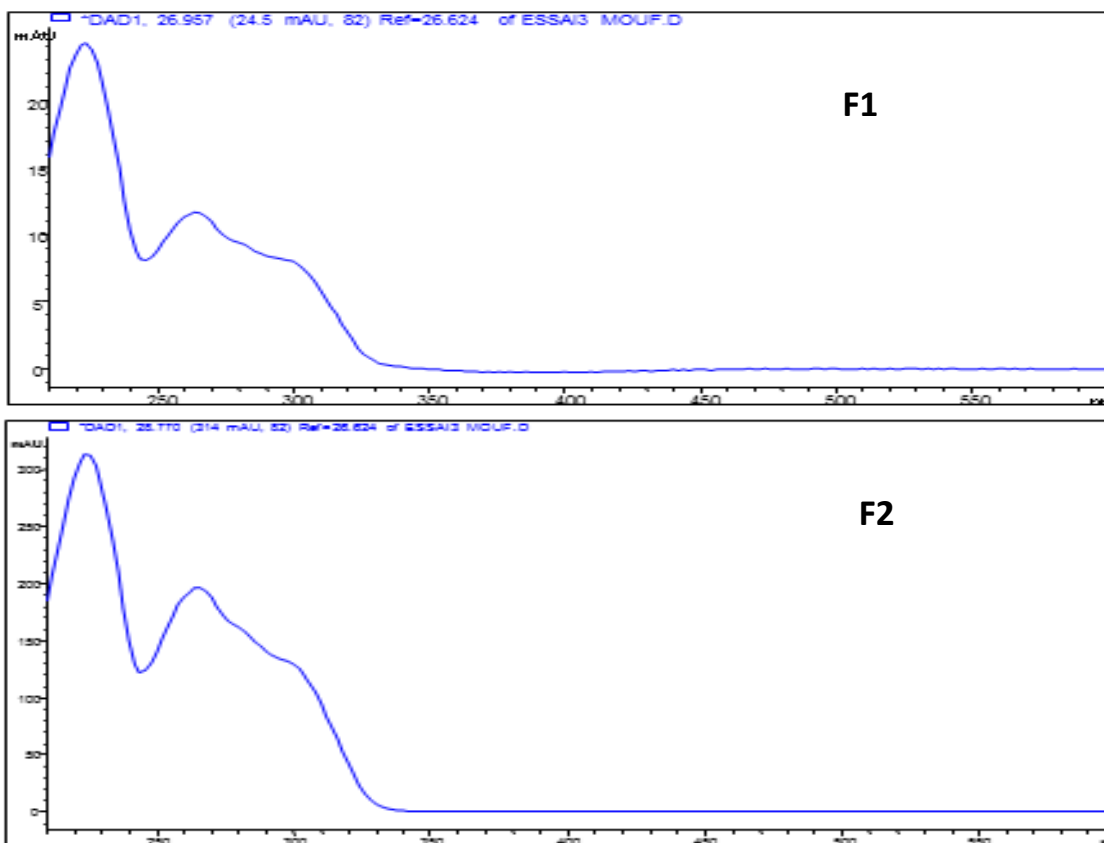


Figure n°33 : spectre UV-visible des fractions F1, F2.

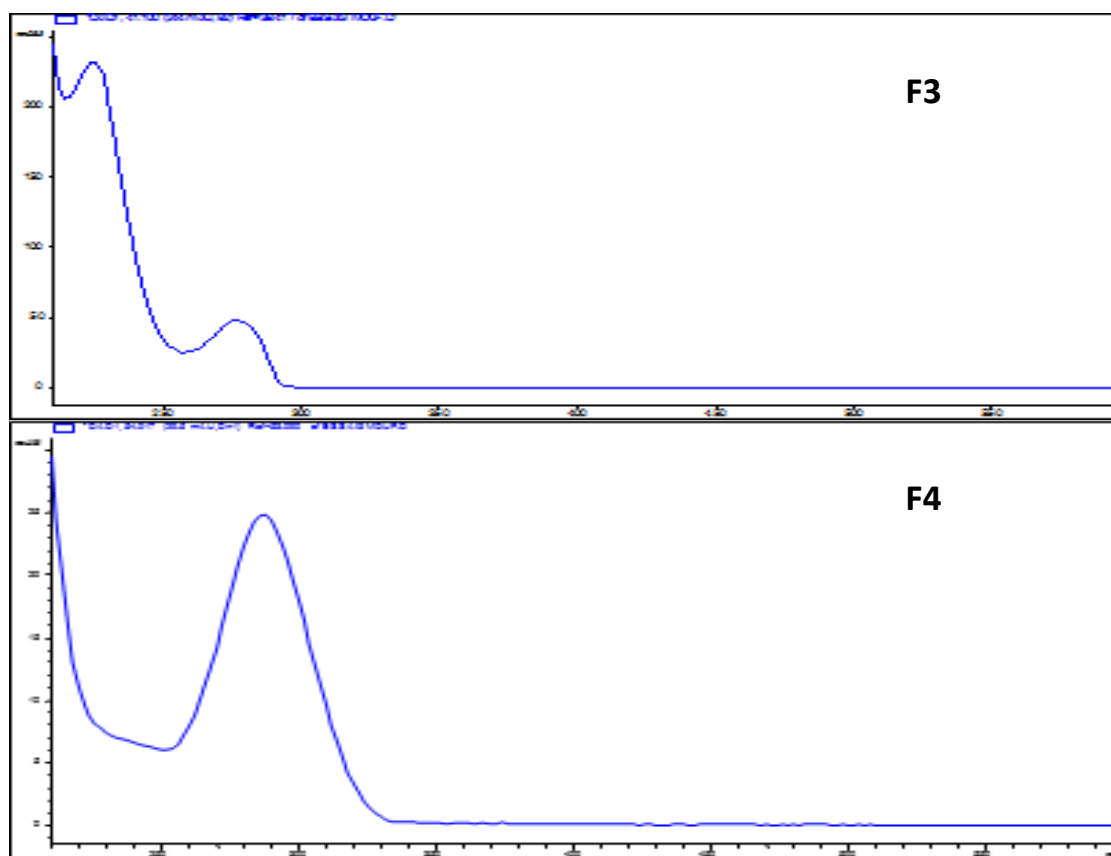


Figure n°34 : spectre UV-visible des fractions F3, F4.

3.4. Discussion :

Le fractionnement en chromatographie sur couche mince de l'extrait bioactive de l'isolat E96 a permis de mettre en évidence les différents fractions composant ce métabolite. D'après les résultats obtenus, l'extrait méthanolique de l'isolat E96 est composé de plusieurs molécules. Ces molécules présentent un caractère polaire puisqu'elles migrent dans le système butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1) à des rapports entre 0.57 et 0.89 (**Boughechich, 2012**).

Pour mieux identifier les composés de notre extrait, une séparation par HPLC en utilisant deux détecteur DAD et DEDL été réalisé. Le détecteur de diode (DAD) effectue une mesure simultanée de l'absorption en fonction du temps d'analyse et sur une plage de longueur d'onde choisie. Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) nécessite une nébulisation de l'éluant, Évaporation de la phase mobile puis une détection Le ELSD est un détecteur universel compatible avec tous les solvants volatils (**Kazakevich Y. Lobruto R, 2007**).

Les résultats de la séparation par HPLC, confirme la présence de plusieurs molécule dans notre extrait (un complexe de 6 molécules). Pour les trois chromatogrammes obtenus un pic majoritaire avec des pics minoritaires sont obtenus. L'activité peut-être due à la molécule majoritaire, à une minoritaire ou bien à un mélange de molécules. Dans ce cas on parle d'action synergique.

Les spectres UV-Visible des fractions F1, F2, F3, F4 ont été réalisé dans le but de mettre en évidence la présence des chromophores indépendants ou conjugués dans la structure chimique de ces fractions, autrement dit si ces molécules sont de structure polyénique ou non polyénique.

Après comparaison, nous observons que les 4 fractions ont un max d'absorbance compris entre 230 nm et 290 nm ce qui suggère la présence d'au moins un noyau aromatique ou de groupements conjugués. Le spectre UV-visible de la fraction F3 révèle un pic d'absorption de 279 nm ce qui suggère la présence de chromophores ou de système conjuguée tel que **les aldéhydes (-CH=O)**. Le spectre d'absorbance UV-visible de la fraction F4 donnant un pic à 290 nm suggère la présence d'un noyau aromatique probablement cyclique contenant 4 double liaisons : **tétraènes**.

Sachant qu'une fraction de l'extrait méthanolique de l'isolat E96 est coloré (donne une couleur jaune), la présence de dérivés benzoïques dans leur structure peut être rapproché à des composées telles que les benzoquinones. En effet, ces composés aromatiques fortement conjuguées absorbent la lumière UV entre 242 et 290 nm (**Kalsi, 2004**).

La longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) augmente au fur et à mesure que le nombre de doubles liaisons augmente. Quand ce nombre devient plus grand que 5, l'accroissement de λ_{\max} devient moins rapide. Plusieurs travaux ont montré que les molécules antibiotiques synthétisées par des *Streptomyces* possèdent un maximum d'absorption en UV à des longueurs d'onde situés entre 215 et 270 nm (Ilic *et al.*, 2005 ; Saisivam *et al.*, 2008 ; Atta, 2009).

Conclusion et perspective

Les séquences génomiques d'importantes espèces d'Actinomycète signalées à ce jour indiquent que jusqu'à 90% du potentiel chimique de ces organismes reste inconnu et que les mécanismes biosynthétiques codés par beaucoup de ces loci génétiques peuvent être activés dans des conditions de laboratoire (**Wu et al., 2012**). Les modèles prédictifs de **Watve et al. (2001)** ont suggéré que plus de 150 000 métabolites bioactifs des membres du genre *Streptomyces* seuls dans cet ordre sont toujours en attente d'être découverts (**Baltz RH., 2005 ; Baltz RH. 2006**). Les techniques moléculaires telles que la biosynthèse combinatoire peuvent conduire à la découverte de médicaments qui ne peuvent être trouvés naturellement et de composants biosynthétiques qui peuvent être échangés et modifiés pour produire des produits bioactifs à propriétés uniques (**Ait Barka E et al., 2016**).

Le marché des enzymes industrielles est l'un des secteurs générant des revenus les plus rapides au monde. Seulement 20 enzymes sont actuellement utilisées au niveau industriel, ce qui indique la nécessité de poursuivre les recherches et le développement d'enzymes à faible coût et leur production. L'application d'enzymes dans diverses industries biotechnologiques indique une tendance positive qui doit être satisfaite de la découverte de nouvelles enzymes et métabolites. Étant donné que très peu d'enzymes ont été potentiellement utilisées au niveau industriel; il existe une vaste marge de manœuvre pour le développement d'enzymes robustes et peu coûteuses. Les actinomycètes sont un réservoir d'enzymes et de métabolites importants en raison de leur répertoire génétique polyvalent. Cependant, un bon nombre des genres rares d'actinomycètes n'ont été ni explorés ni manipulés pour leur potentiel biotechnologique et industriel. Des études sur des environnements écologiques uniques pourraient produire des molécules qui pourraient devenir des futurs précurseurs de la technologie verte (**Prakash et al., 2013**).

Les résultats obtenus dans la présente étude et leur interprétation écologique et biotechnologique peuvent cependant constituer une source importante de nouvelles informations sur l'activité potentielle des enzymes des *Streptomyces* dans les lagunes et donc dans le processus de transformation de la matière organique dans ces écosystèmes ainsi que les modalités d'exploitation de ces processus.

Outre l'intérêt fondamental que suscite la compréhension du métabolisme des actinomycètes producteurs d'antibiotiques, les exigences de la concurrence industrielle et le besoin accru en antibiotiques, particulièrement en antifongiques, sont tels que le travail d'optimisation de la production utilisant plusieurs techniques n'est pas prêt de s'achever. De ce fait, et étant donné que les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs d'antibiotiques (**Zitouni et al., 2005**).

L'objectif principal de notre travail a porté sur la recherche de molécule bioactives produites par des isolats d'actinomycètes ainsi que la mise en évidence de l'activité antifongique de ces isolats vis-à-vis des isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*.

Les principaux antifongiques disponibles pour la thérapie de la cryptococcose sont limités à l'amphotéricine B, à la 5-fluorocytosine et au fluconazole. Cependant, les effets secondaires associés à l'amphotéricine B et à la fluorocytosine limitent leur utilisation. Azoles, d'autre part, offrent une option plus sûre et plus efficace. Pourtant, une des préoccupations majeures de l'utilisation de l'azolé a été l'apparition éventuelle d'une résistance clinique (**Gutch et al., 2015**).

Plusieurs points ont été abordés dans cette étude à savoir :

Tout d'abord, Les isolats d'actinomycètes récupérés de la souche sous la direction du Pr. Gacemi Kirane D. et isolées à partir du lac El Mellah d'El Kala. Ces isolats soumis à un ensemble de tests à savoir morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaire dans le but de leur identification. Les résultats obtenus ont montré que les isolats possèdent des propriétés métaboliques très intéressantes : 100% des isolats possèdent une gélatinase, 75% produisent l'amylase, 70% dégrade la caséine et 55% résistent au phénol. Cela suggère que ces isolats peuvent offrir des synthétiseurs prometteurs de métabolites à intérêt industriel, commercial et médical.

L'étude réalisée sur les *Cryptococcus* en présence d'isolat clinique et environnemental en suivant un protocole bien établi : une identification morphologique, biochimique, moléculaire et un antifongigramme. Les résultats ont aboutis que les isolats cliniques appartiennent à l'espèce *Cryptococcus neoformans* et les isolats environnementaux appartiennent a deux espèces : *Cryptococcus albidus* et *Cryptococcus diffluens*. Aucune différence significative de susceptibilité aux antifongiques n'a été observée entre les isolats cliniques et environnementaux, ce qui suggère que la propension génétique à la résistance antifongique peut exister dans les populations environnementales. Nos résultats confirme des études rapporté par plusieurs d'autre chercheurs (**Franzot et Hamda, 1996 ; Pfaller et al., 1999 ; Springer et al., 2014**).

Parmi les actinomycètes isolés, 8 isolats ont présentés une activité vis-à-vis les isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*.

L'isolat E96 a été choisi comme isolat performant, l'optimisation des conditions de production de substance antifongique ont été organisé. Le choix du milieu s'est porté sur l'ISP2 dès le 1^{er} jour et le n-hexane comme solvant de production. L'extraction a été réalisée.

Une identification partielle de l'extrait brut a été réalisée en utilisant une chromatographie sur couche mince (CCM) et une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et une étude de l'absorbance à l'UV visible.

Enfin, nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi car plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- Préciser l'identification des isolats d'actinomycètes par des tests chimio-taxonomiques et des analyses phylogénétiques basées sur d'autres marqueurs moléculaires.
- Détermination du spectre d'action de la substance produite sur d'autres bactéries et en particulier sur des bactéries multi-résistantes.
- Étude structurale et identification complète des molécules bioactives produites par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques notamment les spectres RMN et la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS).
- Évaluation de la cytotoxicité des molécules purifiées et éventuellement sur des lignées cellulaires cancéreuses.
- La réalisation d'un modèle d'infection par des cellules aérosolisées en utilisant les isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* et comparer la réponse *in vivo* vis-à-vis les antifongiques commercialisés et la substance bioactive.

Résumé

Ce travail est une approche pionnière mettant en évidence et analysant les actinomycètes producteurs de molécules bioactives isolées au niveau des eaux du lac El Mellah (Parc National El Kala) et mettant en évidence de l'activité antifongique de ces isolats vis-à-vis des isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*. La caractérisation a montré que les isolats possèdent des propriétés métaboliques très intéressantes, 100% des isolats possèdent une gélatinase, 75% produisent l'amylase, 70% dégrade la caséine et 55% résistent au phénol. Cela suggère que ces isolats peuvent offrir des synthétiseurs prometteurs de métabolites à intérêt industriel, commercial et médical. Parmi les vingt isolats étudiés, huit ont donné une activité antifongique vis-à-vis d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* résistants aux antifongiques commercialisés. L'isolat E96 a été choisie comme isolat représentatif et l'extraction a été réalisée Après avoir choisir l'ISP2, le 1^{er} jour et le n-hexane comme meilleur milieu, temps et solvant de production. L'identification partielle de l'extrait brut réalisée en utilisant les techniques chromatographiques (CCM, HPLC) a montré que notre extrait est composé d'un complexe de 6 molécules. L'application des techniques spectrophotométries a permis de détecter la présence de dérivés benzénique dans leur structure chimique qui les rapproche aux antibiotiques de type aromatiques.

Mots clés : Actinomycètes, molécules bioactives, *Cryptococcus*, environnement.

Abstract

This work is an approach pioneer highlighting and analyzing the producing actinomycètes of bioactive molecules isolated at the level of waters of the lake El Mellah (National park El Kala) and highlighting of the antifungal activity of these isolates towards the clinical and environmental *Cryptococcus*. The characterization showed that isolates possess very interesting metabolic properties, 100 % of isolates possess a gélatinase, 75 % produce the amylase, 70 % degrades the casein and 55 % resist the phenol. It suggests that these isolates can offer promising synthesizers of métabolites to industrial, commercial and medical interest. Among twenty studied origins, eight gave an antifungal activity towards clinical and environmental origins of resistant *Cryptococcus* to the marketed antifungals. The isolate E96 was chosen as representative origin and the extraction was realized having to choose the ISP2, the 1st day and the n-hexane as better environment, time and solvent of production. The partial identification of the raw extract realized by using techniques chromatographiques (CCM, HPLC) showed that our extract consists of a complex of 6 molecules. The application of techniques spectrophotométries allowed to detect the presence of by-products benzénique in their chemical structure which moves closer them to aromatic antibiotics of type.

Keyword: Actinomyete, bioactive molecules, *Cryptococcus*, environnement.

هذا العمل هو نهج الرائد إبراز وتحليل سلالة الاكتينومييسات المعزولة من مياه بحيرة الملاح (الحديقة الوطنية القالة) و المنتجة للجزئيات النشطة بيولوجيا وتسلط الضوء على نشاط مضاد للفطريات ضد سلالة *Cryptococcus* البيئية و العيادية. من المثير جدا أظهر التوصيف أن الاكتينومييسات خصائص استقلابية.

100% تنتج جيلاتيناز ، 75% تنتج الأميليز ، 70% من الكازين المتحلل و 55% من الفينول المقاوم. هذا يشير إلى أن هذه الاكتينومييسات تقدم توليفة واعدة من المستقلبات ذات الأهمية الصناعية والتجارية والطبية من بين 20 سلالة دراسة ، أعطت ثمانية نشاط مضاد ضد السلالات العيادية والبيئية. تم اختيار أنها السلالة E96 التمثيلية و ISP2 واليوم 1 و n-hexane كأفضل وسط ووقت ومذيب للإنتاج.

أظهر التحليل الجزئي للمستخلص الخام باستخدام تقنيات أن خلاصنا (HPLC ، TLC) الكروماتوغرافي يتكون من مركب مكون من 6 جزئيات. وقد اكتشف تطبيق تقنيات الطيف الضوئي وجود مشتقات البنزين في تركيبها الكيميائي مما يجعلها أقرب إلى المضادات الحيوية العطرية.

الكلمات الرئيسية سلالة الاكتينومييسات. *Cryptococcus*. الجزئيات النشطة بيولوجيا. البيئة.

Référence bibliographique

- Acker RF, Lechevalier H. 1954. Some nutritional requirements of *Streptomyces griseus* 3570 for growth and candidin production. *Appl Microbiol* 2:152–157.
- Ait Barka Essaid, Parul Vatsa, Lisa Sanchez, Nathalie Gaveau-Vaillant, Cedric Jacquard, Hans-Peter Klenk, Christophe Clément, Yder Ouhdouch, Gilles P. van Wezel. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol R.* 1:80.
- Alanio, A., M. Desnos-Ollivier, et al. (2011). "Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-Macrophage Interactions Reveal that Fungal Background Influences Outcome during Cryptococcal Meningoencephalitis in Humans." *M Bio*: 2(4).
- Albuquerque Tiago Lima de, Ivanildo José da Silva Jr., Gorete Ribeiro de Macedo, Maria Valderez Ponte Roch (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review: process biochemistry 49(11).
- Alexander M. (1977). *Introduction to Soil Microbiology*. Wiley, New York. 480.
- Alliouch-Kerboua Chérifa, Gacemi Kirane Djamila, La Scola Bernard. (2015). Activité antimicrobienne d'une Actinomycetale isolée d'une lagune en Algérie. *Ann Biol Clin-Paris*.73, 2.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Aouar, L.; Lerat, S.; Ouffroukh, A.; Boulahrouf, A. and Beaulieu, C. (2012): Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can J Plant Pathol.* 34(2):165-176.
- Aoyagi T, Yagisawa M, Kumagai M, Hamada M, Okami Y. 1971. An enzyme inhibitor, panosialin, produced by *Streptomyces*. I. Biological activity, isolation and characterization of panosialin. *J Antibiot* 24:860 – 869.
- Athalye M.; Goodfellow M.; Lacey J.; White R. P., (1985). Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 35 (1), 86-98.
- Atta H. M. (2009) An Antifungal Agent Produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus*, AZ-SH514. *World Appl Sci J.* 6 (11): 1495-1505.
- Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP. (2005). Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indien J. Med. Res.* 121: 164-170.
- Ayari Adel, Houda Morakchi, Djamila Kirane-Gacemi. (2016). Actinomycete, *Streptomyces* sp. AA13 isolated from sediments of Lake Oubeira (Algeria) against *Candida albicans*. *Afr J Microbiol Res.* 10(6), pp. 156-171, 14.
- Ayari Adel, Houda Morakchi, Djamila Kirane-Gacemi. (2016). Actinomycete, *Streptomyces* sp. AA13 isolated from sediments of Lake Oubeira (Algeria) against *Candida albicans*. *Afr J Microbiol Res.* 10(6), pp. 156-171, 14.
- Ayari Adel, Morakchi Houda And Gacemi-Kirane Djamila (2012) Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *Afr J Biotechnol.* 10(7).
- Baba-Ahmed R. (2008). Identification des sources d'effluents domestiques et voies de contamination d'une zone humide : cas du lac Mellah, Juin.

- Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. (2005) Activité antifongique d'une souche d'Actinomadura d'origine Saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J Mycol Med.* 15: 211-219.
- Balagurunatha R, Radhakrishnon M, Somasumdarom ST. 2010. L-Glutaminase producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semiquantitative assay and characterization of potential strain. *Aust J Basic Appl Sci* 4:698–705.
- Balan Shanmugasundaram Senthil, Rajendiran Nethaji, Sudalayandi Sankar, Singaram Jayalakshmi. (2012). Production of gelatinase enzyme from *Bacillus spp* isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. *Asian Pac J Trop Med.* S1811-S1816.
- Baltz RH. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News* 55:186–196.
- Baltz RH. (2006). Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:507–513. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-005-0077-9>.
- Baltz RH. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8: 1-7.
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, van der Lelie D. (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol* 22:583–588. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt960>.
- Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K., Beaulieu, C., (2002). Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J Microb Biot*, 18: 49–54.
- Barbe V, Bouzon M, Mangenot S, Badet B, Poulain J, Segurens B, Vallenet D, Marliere P, Weissenbach J. 2011. Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. *J Bacteriol* 193:5055–5056. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.05583-11>.
- Baroni, F.A.; Paula, C.R.; Silva, E.G.; Viani, F.C.; Rivera, I.N.G.; Oliveira, M.T.B. & Gambale, W. (2006)- *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 48(2):71-75,
- Barreto et al., (2008). Spread pattern of the first dengue epidemic in the city of Salvador, Brazil. *BMC Public Health.* 8:15. 10.1186/1471-2458-8-51.
- Basak K, Majumdar SK. (1973). Utilization of carbon and nitrogen source by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 6-10.
- Bassaneze V, Miyakawa AA, Krieger JE (2008) A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures, *Anal. Biochem.*, vol. 372, no 2,, p. 198–203 (PMID 17920029, DOI 10.1016/j.ab.2007.08.016)
- Bastide A., De Méo M., Andriantsao M., Laget M., Duménil G. (1989). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyénique. *Mircen journal*, 2. 453-466.
- Beaumont Catherine (2006). Intérêt des milieux chromogènes en microbiologie et évaluation d'une nouvelle gélose de détection des salmonelles. Université Paris Descartes.
- Becker B., L. M. (1965). Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13, :236-243.
- Behal V. (2003). Alternative sources of biologically active substances. *Folia Microbiol.*48: 563-571.

- Ben Ameer MR, Sioud S, Fourati Ben Fguira L, Bejar S, Mellouli L. (2006). Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Process Biochem.* 41: 1506-1513.
- Benouagueni S, Gacemi Kirane D. (2016). Molecular identification and characterization of active actinomycete strain isolated from El Mellah Lake of El Kala. *JOCPR.* 8(4):579-584.
- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.I., Thomson N.R., James K.d., Harris D.E. *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417(6885):141-7.
- Benyacoub S, Chabi Y., (2000a) – Diagnose écologique de l'avifaune du Parc National d'El-Kala. Composition , Statut et Répartition. Synthèse n° : 7 juin 2000. *Rev Sci Techno. Univ. Annaba.* 98 p.
- Benyacoub S., Boukhroufa M., Et Brahmia Z., (2000b). Caractéristiques écologiques et valeur patrimoniale du marais du Mellah. Rapport réalisé à la demande de Monsieur le Wali d'El-Tarf. 16 p.
- Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58:1–26.
- Betina, V. (1983). The chemistry and biology of antibiotics. *Elsevier Scientific Pub. Co*(190).
- Bhattacharya, A. Nagpure, and R. K. Gupta, (2007). Bacterial chitinases: properties and potential. *Crc Cr Rev Biotechn*, vol. 27, no. 1, pp. 21–28.
- Bister B, Bischoff D, Strobele M, Riedlinger J, Reicke A, Wolter F, BullAT, Zahner H, Fiedler HP, Sussmuth RD. (2004). Abyssomicin C: a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosipora* strain as an inhibitor of the *p*-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:2574–2576. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200353160>.
- Blanc V, Lagneaux D, Didier P, Gil P, Lacroix P, Crouzet J. (1995). Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin IIB to pristinamycin IIA (PIIA): PIIA synthase and NADH:riboflavin 5= phosphate oxidoreductase. *J Bacteriol* 177:5206–5214.
- Blomgren H, Strender LE, Edsmyr F. (1980). Bestatin treatment and the peripheral lymphocyte population in cancer patients. *Recent Res Cancer* 75:133–138. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-81491-4_21
- Boekhout T, Gueho E. (2003). Basidiomycetous yeasts. In: Howard Dexter H., editor. *Pathogenic Fungi in Humans and Animals.* 2. New York: Marcel Dekker; pp. 535–564.
- Bormann C, Huhn W, Zahner H, Rathmann R, Hahn H, Konig WA. (1985). Metabolic products of microorganisms. 228. New nikkomycins produced by mutants of *Streptomyces tendae*. *J Antibiot* 38:9–16.
- Botts MR and Hull CM, (2010). Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. *Curr Opin Microbiol*, 13(4): 437-442.
- Botts MR, Giles SS *et al.*, (2009). Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. *Eukaryot Cell*, 8(4): 595- 605.
- Bouchek-Mechiche K, Gardan L, Normand P, Jouan B. (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 91-99.

- Boudemagh, A. (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives, Université Mentouri Constantine :1-200.
- Boudjella H, Bouti K, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg10 isolated from a Saharian soil. *Microbiol. Res.* 161: 288-298.
- Boughachiche F, Reghiooua S, Zerizer H, Boulahrouf A. (2012). Activité antibactérienne d'espèces rares de *Streptomyces* contre des isolats cliniques multirésistants. *Ann Biol Clin-Paris* ; 70(2) : 169-74.
- Boughachiche F., Reghiooua S., Oulmi L., Zerizer H., Boudemagh A., Kitouni M. Et Boulahrouf A. (2005). Isolement d'Actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhia de Ain Mlila. *Sciences et Technologie.* 23 : 5-10.
- Bouti, K. (1997). les genres rares *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora* et *Streptosporangium* (ACTINOMYCETALS) dans les sols sahariens; taxonomie numérique et étude de quelques uns de leurs antibiotiques, Ecole normale supérieure de Kouba (Alger). P149.
- Brown, G. G. (1995). How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant Soil*, 170, 209-231.
- Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Ch* 15:361–367. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.15.3.361>.
- Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S. (2008) Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:49-58.
- Carbon C, Régnier B, Saimot G, Vildé JL, Yeni P, (1994). Médicaments anti-infectieux, Flammarion médecine-sciences, Paris : 503 p.
- Casadevall A., P. J. (1998). *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Cassagne C., Cella AL , Suchon P., Normand AC , Ranque S & Piarroux R. (2013). Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Medical Mycology*, **51**, 371–377.
- Cerdeno AM, Bibb MJ, Challis GL. (2001). Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem Biol* 8:817– 829. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00054-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00054-0).
- Chabasse D, Guigen C., Contet-Audonneau N., (1999). *Mycologie médicale*. Masson.Paris. 324p.
- Chabaud, A. (2012). Etude sur le bon usage et le suivi thérapeutique pharmacologique du voriconazole dans deux établissements de santé de Rouen, U F R de médecine et de pharmacie de Rouen.
- Chan MY and Tay ST, (2010). Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus spp.* *Myc*, 53(1): 26-31.

- Chanitnun Kankiya, Pinphanichakarn Pairoh (2012). Glucose(Xylose) isomerase production by *Streptomyces sp. CH7* grown on agricultural residues. *Brazilian Journal of Microbiology*: 1084-1093.
- Charan RD, Schlingmann G, Janso J, Bernan V, Feng X, Carter GT. (2004). Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora sp.* *J Nat Prod* 67:1431–1433. <http://dx.doi.org/10.1021 /np040042r>.
- Charlier, C., F. Chretien, *et al.* (2005). "Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier." *Am J Pathol* 166(2): 421-432.
- Chen CW., Huang CH., Lee HH., et al., (2002). Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet.* 18:522-529.
- Chen Y, Krol J, Sterkin V, Fan W, Yan X, Huang W, Cino J, Julien C. (1999). New process control strategy used in as rapamycin fermentation. *Process Biochem* 34:383–389. [http://dx.doi.org/10.1016 /S0032-9592\(98\)00108-3](http://dx.doi.org/10.1016 /S0032-9592(98)00108-3).
- Chen, S., T. Sorrell, et al. (2000). "Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group." *Clin Infect Dis* 31(2): 499-508.
- Chen, S., T. Sorrell, et al. (2000). "Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group." *Clin Infect Dis* 31(2): 499-508.
- Chun J, B. K. (1997). A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis gen. Nov.*, comb Nov. *Int. J. Syst. Bact*, 47, 127-131.
- Collins M. D.; Jones D., (1981). Distribution of isoprenoid quinine structural type in bacteria and their taxonomic amplification. *Microbiol. Rev.*, 45, 316-354.
- Cordero RJ, Frases S *et al.*, (2011). Evidence for branching in cryptococcal capsular polysaccharides and consequences on its biological activity. *Mol Microbiol*, 79(4): 1101-1117.
- Cox GM, Mukherjee J *et al.*, (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*, 68(2): 443-448.
- Cross T.(1981). - Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* , 50, 397-423.
- Cuenca-Estrella M. (2014). Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clin Microbiol Infec.*20 (Suppl 6).54-9.
- Cui Q., Wang L., Huang Y., Liu Z. and M. Goodfellow.(2005). *Nocardia jiangxiensis sp. nov.* and *Nocardia miyunensis sp. nov.*, isolated from acidic soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1921–1925
- Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, GarciaHermoso D, Grenouillet F, Cassaing S, Baixench MT *et al.* (2012). *Candida spp.* with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010. *Emerg Infect Dis.*18:86-90.
- Dannaoui Eric (2007). Principaux antifongiques systémiques Mécanismes d'action et de résistance, spectre, indications. Centre National de Référence de la Mycologie et des Antifongiques, Institut Pasteur, Paris.38p.
- Davidson, B. (1995). New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Curr Opin Biotech*, 6, 284-291 .
- De Reijke TM, de Boer EC, Schamhart DH, Kurth KH. (1997). Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell wall skeleton preparation

- (Rubratin) for superficial bladder cancer immunotherapy: a phase I/II study. *Urol Res* 25:117–120. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01037926>.
- Dejong P. (1972). L-Asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Appl Microbiol* 23:1163–1164.
- Demain, A. L. (1985). *Biology of industrial micro-organisms*. California.: The Benjamin cummings publishing company.
- Derewacz D.K., Goodwin C.R., McNees C.R., McLean J. A. and Bachmann B.O. (2013). Antimicrobial drug resistance affects broad changes in metabolomic phenotype in addition to secondary metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 110 (6): 2336–2341.
- Dharmaraj S. (2010). Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol* 26:2123–2139. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0415-6>.
- Dismukes, W. E. (2000). Introduction to antifungal drugs. *Clin. Infect. Dis*, 30, 653-7.
- Djordjevic JT, (2010). Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol*, 1: 125.
- Doering-Saad C, Kämpfer P, Manulis S, Kritzman G, Schneider J, Zakrzewska-Czerwinska J, Schrempf H, Barash I. (1992). Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3932-3940.
- Doull JL, Ayer SW, Singh AK, Thibault P. (1993). Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J Antibiot* 46:869–871. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.46.869>.
- Drago Haas. (2015). Métabolisme secondaire de *Streptomyces ambofaciens* : exploration génomique et étude du groupe de gènes dirigeant la synthèse du sphydrofurane. *Biochimie, Biologie Moléculaire*. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112052.
- Dulmage HT. (1951). The production of neomycin by *Streptomyces fradiae* 3535. Rutgers University, New Brunswick, NJ.
- El-Sersy, H. Abd-Elnaby, G. M. Abou-Elela, H. A. H. Ibrahim, and N. M. K. El-Toukhy, (2010). “Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*,” *Afr J Biotechnol*, vol. 9, no. 38, pp. 6355–6364,
- Ensign J.C., Normand P., Burden J. P. and Yallop C.A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Res. morakchi Microbiol.* 144: 657-660.
- Ensign, J. C. (1978). Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu. Rev. Microbiol*, 32, 185-219.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, et al. (2004). Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne Colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and other yeasts and yeast like organisms. *J Clin Microbiol*;37:591–5.
- Eunice, Prosser . (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of genetic microbiology*, 129, 2029-2036.
- Fagerstrom, T. Lahtinen, R. Lantto et al., (2008) “Production and secretion of actinomycete xylanases in a filamentous *Trichoderma fungus*,” EP 0876494 B1.
- Fauth U, Zahner H, Muhlenfeld A, Achenbach H. (1986). Galbonolides A and B: two non-glycosidic antifungal macrolides. *J Antibiot* 39:1760–1764. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.39.1760>.
- Feduchi E, Cosin M, Carrasco L. (1985). Mildiomycin: a nucleoside antibiotic that inhibits protein synthesis. *J Antibiot* 38:415–419. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.38.415>.

- Filiu W.F.O., Wanke B., Agüena S.M., Vilela V.O., Macedo R.C.L., Lazera M.S. (2002), Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil *Rev Soc Bras Med Trop*, 35.pp. 591–595.
- Fonseca, F. L., L. L. Nohara, et al. (2010). "Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter." *Infect Immun* 78(9): 3861-3870.
- Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O.A., Dantas G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337:1107–1111.
- Fourati Ben Fguira L, Fotso S, Ben Ameer Mehdi R, Mellouli L, Laatsch H. (2005). Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities from a Newly Isolated *Streptomyces sp. US80 strain*. *Res Microbiol*. 156: 341-347.
- Fowler Z L, Baron CM *et al.*, (2011). Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. *Yeast*, 28(3): 181-188.
- Frases S, Salazar A *et al.*, (2007). *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 73(2): 615-621.
- Galanis, E. and L. Macdougall (2010). "Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007." *Emerg Infect Dis* 16(2): 251-257.
- Gandhimathi R., Arunkumar M., Selvin J., et al., (2008). Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *J de Mycologie Médicale*.18(1).16-22.
- Garcia-Hermoso, D., F. Dromer, *et al.* (2004). "*Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution in vitro and during murine infection." *Infect Immun* 72(6): 3359-3365.
- Gari-Toussain M, Mondain-Miton V. (1998) *Cryptococcose*. In *Encycl Med Chirur : Maladies infectieuses*.
- Gazenko S. V., R. T. (1998). Analysis of airborne Actinomycetes spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environm. Microbiol.*, 64(11), 4410-4415.
- Genilloud O., (2014). The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*.106.173-188.
- Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R. (2005). Effects of nutrients on the production of AK- 111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res*. 160: 243-248.
- Giles SS, Dagenais TR *et al.*, (2009). Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77(8): 3491-3500.
- Goldman D, Song X *et al.*, (2001). *Cryptococcus neoformans* induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta in human microglia: role of specific antibody and soluble capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 69(3): 1808-1815. 118.
- Gonzalez A, Jimenez A, Vazquez D, Davies J, Schindler D. (1978). Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 521:459–469.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol*. 37:189 –216.
- Goodfellow M. et Orchard Valerie A. (1974). Antibiotic Sensitivity of Some Nocardioform Bacteria and its Value as a Criterion for Taxonomy. *J Gen Microbiol*, 83, 375-387.
- Goodfellow M.; Stalon L. J.; Simpson K. E.; Minnikin D. E., (1990). Numerical and chemical classification of Actinoplanes and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 19-36.

- Goodfellow M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J Gen Microbiol*, 69, 33-80.
- Goodwin ML, Drew RH. Antifungal serum concentration monitoring: an update. *J of Antimicrob Chemother*; 61:17-25.
- Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, Kudapa B, Katta K, Varshney RK. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiol Res.*;169:40–48.
- Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang CHN, (1974), *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the *nocardin* strain. *Int. J. Syst. Bacteriol* 24: 54-63.
- Gordon, R. E. & Smith, M. M. (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J. Bact.* 66, 41.
- Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance*. (E. b. Skinner, Éd.) London, New York.: Academic Press.
- Grein A, Merli S, Spalla C. (1980). New anthracycline glycosides from *Micromonospora*. I. Description of the producing strain. *J Antibiot* 33: 1462–1467.
- Greub G and Raoult D, (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, 17(2): 413-433.
- Groth C, et al. (1999) A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 4:1933-8.
- Grund E.; Kroppenstedt R. M., (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiosis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 5-11.
- Guillot J., Dannaoui E., (2015). La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. *Bull. Acad. Vét. France* .168(4). DOI : 10.4267/2042/58379.
- Guinea J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology Infection*.20 (Suppl 6).5-10.
- Gullo, F. P. (2013). Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32, 1377–1391.
- Gupta, G. and B. C. Fries (2010). "Variability of phenotypic traits in *Cryptococcus* varieties and species and the resulting implications for pathogenesis." *Future Microbiol* 5(5): 775-787.
- Gutch Ruchi Sethi, S. (2015). Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. *Braz J Microbiol*, 46, 4, 1125-1133.
- Haider M. Hamza. (2006). Partial Purification of Gelatinase Enzyme from Local Isolate of *Brevibacillus laterosporus*. *National Journal of Chemistry*, Volume 23, 437-442.
- Hain T., Ward-Rainey N., et al., (1997). Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47. 202-206.
- Hammami I., Ben Hsouna A., Hamdi N., Gdoura R., and Triki M.A., (2013) Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia, *C. R. Biol.*, 336: 557–564.
- Harada S, Kishi T. (1978). Isolation and characterization of mildiomycin, a new nucleoside antibiotic. *J Antibiot* 31:519–524. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.31.519>.

- Hata T, Koga F, Kanamori H. (1953). Studies on leucomycin. II. Bacteriological properties of *Streptomyces kitasatoensis*. J Antibiot 6:109–112.
- Hayashi Ki, Nozaki H. (1999). Kitamycins, new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* sp. J Antibiot 52:325–328. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.52.325>.
- Healy FG, Lambert DH. (1991). Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 479-482.
- Heinemann B, Kaplan MA, Muir RD, Hooper IR. (1953). Amphomycin, a new antibiotic. Antibiot Chemother 3:1239–1242.
- Hirsch AM, Valdés M. (2009). *Micromonospora*: an important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. Soil Biol Biochem 42:536–542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.023>.
- Hirvonen M.R., N. A. (1997). Streptomyces spores from moldy houses induce nitricoxide, TNF α and IL-6 secretion from RAW264.7 macrophage cell line without causing subsequent cell death. Environ. Toxicol. Pharmacol., 3, 57-63.
- Hodgson DA. (1992). Differentiation in actinomycete. In: Mohan S, Dow C. et Cole JA. Prokaryotic structure and function. Society of General Microbiology Symposium 47. Cambridge University. Press Edition. 407-440.
- Hohmann C, Schneider K, Bruntner C, Irran E, Nicholson G, Bull AT, Jones AL, Brown R, Stach JE, Goodfellow M, Beil W, Kramer M, Imhoff JF, Sussmuth RD, Fiedler HP. (2009). Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. J Antibiot 62:99–104. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2008.24>.
- Holzappel W.H., H. P. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr, 73, 365–373.
- Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y. and Moon S.S. (2001). Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3730-3745
- Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y. and Moon S.S. (2002). Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3730-3745
- Idnurm, A., Y. S. Bahn, et al. (2005). "Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*." Nat Rev Microbiol 3(10): 753-764.
- Igarashi Y, Trujillo ME, Martinez-Molina E, Yanase S, Miyanaga S, Obata T, Sakurai H, Saiki I, Fujita T, Furumai T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupine* sp. nov. Bioorg Med Chem Lett 17:3702–3705. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.04.039>.
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. et Omura S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nature Biotechnology. 21(5): 526- 531.
- Ilic S.B., Konstantinovic S.S. et Todorovic Z.B. (2005) UV /VIS analysis and antimicrobial activity of Streptomyces isolates. Medecine and Biology. 12(1): 44-46.
- Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y, Suzuki S. (1965). Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. Agric Biol Chem (Tokyo) 29:848–854. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1965.10858475>.
- Iwai Y, Awaya J, Kesado T, Yamada H, Omura S, Hat T. (1982). Selective fermentation of cerulenin by *Cephalosporin caeruleus*. J. Ferment. Technol. 51: 575-578.

- Jacob, C. Asha Poorna, and P. Prema, (2008). "Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*," *Bioresource Technol*, vol. 99, no. 14, pp. 6697–6701,
- Janin J., (1985). *Méthode biophysiques pour l'étude des biomolécules*. Ed.Harmann, Paris.
- Jihani, S. (2013). Isolement et identification moléculaire de souches d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes à partir de biotopes marocains et caractérisation partielle des principes actifs. L'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès.
- Kanoh K, Matsuo Y, Adachi K, Imagawa H, Nishizawa M, Shizuri Y. (2005). Mechercharmocins A and B, cytotoxic substances from marinederived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J Antibiot* 58:289–292. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2005.36>.
- Kazakevich Y. Lobrutto R., (2007). Stationary phases, in *HPLC for pharmaceutical Scientists*, In: Kazakevich Y, Lobrutto R, editors. Hoboken, NJ:John Wiley.p124.
- Kelly KL., Judd DB., (1955). The ISCC-NBS method of designated colors and a dictionary of color names. Circular 553, U.S. Department of commerce.Washington, D.C.
- Kherifi W. et Kherici-Bousnoubra H.. (2012). Evolution saisonniere de la qualite microbiologique des eaux du lac mellah (nord-est algerien). *Larhyss Journal*, 11, 109-118.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. et Hopwood D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK : 613.
- Kim B., Sahin N., Minnikin D.E., Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M. and Goodfellow M., (1999). Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalkalitolerans* sp. nov. *Int. J. syst. Bacteriol.* 49:7-17.
- Kinoshita, N., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M. and Hamada, M. (1999). - *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomie studies. *Actinomycetologica*, 13, 20-31.
- Kitouni M., (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Université Mentouri-constantine. Thèse de doctorat. Pp1-205.
- Koch A. (1999) Diffusion through agar blocks of finite dimensions: A theoretical analysis of three systems of practical significance in microbiology. *Microbiolgy*.145: 643-654.
- Koli A. B. and S. W. Kulkarni.(2012). Tolerance of Actinomycetes to Inhibitory Substances Isolated from Calangut beach, Goa. *World Journal of Applied Environmental Chemistry*. 1, 2: 53-56.
- Komaki H, Nemoto A, Tanaka Y, Takagi H, Yazawa K, Mikami Y, Shigemori H, Kobayashi J, Ando A, Nagata Y. (1999). Brasilicardin A, a new terpenoid antibiotic from pathogenic *Nocardia brasiliensis*: fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* 52:13–19. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.52.13>.
- Kominek LA. (1972). Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1:123–134. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.1.2.123>.
- Kroiss J, Kaltenpoth M, Schneider B, Schwinger MG, Hertweck C, Maddula RK, Strohm E, Svatos A. (2010). Symbiotic *Streptomyces* provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nat Chem Biol*;6(4):261-3. doi: 10.1038/nchembio.331.

- Kronstad, J. W., R. Attarian, et al. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 9(3): 193-203.
- Kuo F., Ensom MHH. Role of therapeutic drug monitoring of voriconazole in the treatment of invasive fungal infection. *Can J Hosp Pharm*; 62(6):469-482.
- Kuster E, Williams ST. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature* 202: 928-929.
- Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. (2006). Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*." *J Am Chem Soc* 128:1622–1632.
- Kwon-Chung K.J., Bennett J.E.. (1992). *Medical mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Kwon-Chung, K. J. and A. Varma (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 6(4): 574-587.
- Labeda D. P.; Kroppenstedt R. M., (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for Actinozynnzmataceae fam. Nov. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* 50, 331-336.
- Labeda DP, Lyons AJ. (1992). DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 532-535.
- Lanyi, B. (1987). Page 24 in *Methods in Microbiology*, edited by R. R. Colwell and R. Grigorova, Academic Press Inc., New York. Vol. 19.
- Larpent, J. P., & Sanglier, J. J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Paris: Masson
- Lattman ML, Walter JF. (1968). Cryptococcosis: Current status. *Am J Med.*45: 922–932.
- Le Minor Léon, Véron Michel. (1989). *Bactériologie médicale*. Sciences Flammarion ;2 : 2257124189, 9782257124180. P1107.
- Leal, A. L., J. Faganello, et al. (2008). "Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil." *Mycopathologia* 166(2): 71-75.
- Leblond P and Decaris B., (1994). Nex insight into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Let.*123.225-232.
- Lebrihi A, Lamasaf D, Lefebvre G, Germain P. (1992). Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 382-387.
- Lebrihi A, Lefebvre G, Germain P. (1988). Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 44-51.
- Lechevalier et Lechevalier. (1981). Introduction to the order *Actinomycetales*. In: *The prokaryotes*, Vol. Vol. 2. H. S. (Starr M. P., Éd. Berlin: Springer-Verlag.
- Lechevalier Hubert A. « ACTINOMYCÈTES », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 3 septembre 2017. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/actinomycetes/>.
- Levitz SM, B. T. (2006). *Cryptococcus*: the once-sleeping giant is fully awake. *FEMS Yeast Res*, 6(4), 461-2.
- Levitz SM, Nong SH, et al., (1999). *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun*, 67(2): 885-890.
- Li, S. S. and C. H. Mody (2010). *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc* 7(3): 186-196.
- Libkind D1, Sampaio JP, van Broock M. (2009). Cystobasidiomycetes yeasts from Patagonia (Argentina): description of *Rhodotorula meli* sp. nov. from glacial meltwater. *Int J Syst Evol Microbiol.*(Pt 9):2251-6. doi: 10.1099/ijs.0.018499-0.

- Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* 9(4): 401-416.
- Lin, X. and J. Heitman (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60: 69-105.
- Linke HA, Mechlinski W, Schaffner CP. (1974). Production of amphotericin B-14C by *Streptomyces nodosus* fermentation, and preparation of the amphotericin B-14C methyl-ester. *J Antibiot* 27:155–160. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.27.155>.
- Lohr D., Buschulte T. et Gilles E.D. (1989) Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32:274-279.
- Loqman. S. (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine: Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie. Pp: 253.
- Lorliam, W., Akaracharanya, A., Suzuki, M., Ohkuma, M., & Tanasupawat, S. (2013). Diversity and Fermentation Products of Xylose-Utilizing Yeasts Isolated from Buffalo Feces in Thailand. *Microbes Environ*, 28(3), 354–360. <http://doi.org/10.1264/jsme2.ME13023>.
- LOUCIF L (2006), recherche des souches d'actinomycete productrices des molecules antibacterienne 'cas des eaux du lac Oubeira El Kala'. Université Badji Mokhtar Annaba.
- Loucif Nabil, Meddour Abderrafik, Samraoui Boudjema (2009). Biodiversité des Parasites chez *Anguilla Anguilla* Linnaeus, 1758 Dans Le Parc National D'El Kala – Algérie. *EJSR*. 1450-216X Vol.25 No, pp.300-309.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. (1995a). Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.* 31: 304-311.
- Lupo P, Chang YC *et al.*, (2008). The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infect Immun*, 76(4): 1581-1589.
- Madigan M. T et Martinko J.M. (2007) Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11e edition : 331-423, 686-718.
- Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T. and Monnet D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 268–281.
- Makinen P, Makinen KK. (1994). *The Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4.24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 200: 981-985.
- Marcone G.L., Beltrametti F., Binda E., Carrano L., Foulston L., Hesketh A., Bibb M. and Marinelli F.(2010). Methods for the genetic manipulation of *Nonomuraea* sp. ATCC 39727. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37(10): 1097–1103.
- Margalith P, Beretta G. (1960). Rifomycin. XI. Taxonomic study on *Streptomyces mediterranei* nov. sp. *Mycopathol Mycol Applic* 13:321–330.
- Margalith P. Z. (1992). Pigment microbiology. Shapman & Hall. London. 5-114.
- Mariat F., e. S. (1990). Actinomycètes. Dans L. M. M, *Bactériologie Médicale*. éd. 2ème édition, pp. s. 935-949. Paris: Flammarion.

- Marinelli F. (2009) Antibiotics and *Streptomyces*: the future and antibiotic discovery. *Microbiology today*. 2: 20-23.
- Martin JF, Demain AL. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev*. 44: 230-251.
- Masciarelli O., Llanes A., and Luna V., (2014) A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation, *Microbiol. Res.*, 169: 609–615.
- Mason DJ, Lewis C. (1964). Biological activity of the lincomycin-related antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 10:7–12.
- Matsuoka M, Yagishita K, Umezawa H. (1953). Studies on the intermediate metabolism of chloramphenicol production. II. On the carbohydrate metabolism of *Streptomyces venezuelae*. *Jpn J Med Sci Biol* 6:161– 169.
- Mc Guire JM, Bunch RL, Anderson RC, Boaz HE, Flynn EH, Powell HM, Smith JW. (1952). Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiot Chemother (Northfield)* 2:281–283.
- Mchenney MA, Hosted TJ, Dehoff BS, Rosteck PR, Jr, Baltz RH. (1998). Molecular cloning and physical mapping of the daptomycin gene cluster from *Streptomyces roseosporus*. *J Bacteriol* 180:143–151.
- Mehiaoui, S. (2011). Etude de quelques facteurs de pathogénicité liés aux infections fongiques hospitalières à *Cryptococcus neoformans* (production de biofilms et résistance). Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, Laboratoire :Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique. P100.
- Mellouli L, Karray-Rebai I, Sioud S, Ben Ameer-Mehdi R, Naili B, Bejar S. (2004). Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology*. 49: 400-406.
- Meyssonnier V. (2012). Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. Université pierre et marie curie, France, p.24.
- Michel Thomas, (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Université D'Orléans. Thèse de doctorat. pp1-289.
- Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. (2002). Wide spread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol*. 68: 5005-11.
- Montenegro H., Paula C.R. (2000). Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med Mycol*, 38. pp. 385–390.
- Morakchi H (2011). Isolement et identification des souches d'Actinomycètes productrices de molécules bioactives au niveau du lac Oubeira : étude morphologique, physiologique, moléculaire et spectre d'activité. Université Badji Mokhtar. Annaba.
- Morakchi H, Ayari A, Taok M, Kirane D, Cochet N (2009). Characterization of *Streptomyces* strain *SLO-105* isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *Afr. J. Biotechnol*. 8: 6332-6336.
- Moura Rute S., Martín Juan F. Martín Alicia and Liras Paloma (2001). Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiology*, 147, 1525–1533.
- Mridha, Subham. (2015). Study of various inflammatory genes BY PCR-RFLP and evaluation of related proteins & study of different diagnostic methodologies for mtb and its drug resistance. 10.13140/RG.2.1.1212.4241.
- Mudryk Z. J. , Podgórska B. (2006). Enzymatic Activity of Bacterial Strains Isolated.

- Murugan Thiraviam (2013). Isolation, screening and characterization of β -Galactosidase enzyme producing microorganisms from four different samples. *Global R J Pharm Sci.* 2(1): 12-14.
- Nardoni S, Mugnaini L, Papini R, Fiaschi M, Mancianti F. (2013). Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporium gypseum*: a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseofulvin. *Journal de Mycologie Médicale.* 23:164-7.
- Neelu Nawani, Bertrand Aigle, Abul Mandal, Manish Bodas, Sofiane Ghorbel, and Divya Prakash. (2013). Actinomycetes: Role in Biotechnology and Medicine. *BioMed Research International.* ID 687190, 1.
- Nemoto A, Hoshino Y, Yazawa K, Ando A, Mikami Y, Komaki H, Tanaka Y, Grafe U. 2002. Asterobactin, a new siderophore group antibiotic from *Nocardia asteroides*. *J Antibiot* 55:593–597. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.55.593>.
- Olson E. et Rattzkin B. (1999) Pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 10: 525-527.
- Omura S, Crump A. (2004). The life and times of ivermectin: a success story. *Nat Rev Microbiol* 2:984–989. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1048>.
- Omura S, Imamura N, Oiwa R, Kuga H, Iwata R, Masuma R, Iwai Y.(1986). Clostomicins. New antibiotics produced by *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* subsp. nov. I. Production, isolation, and physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* 39:1407–1412.
- Omura S, Iwai Y, Takahashi Y, Sadakane N, Nakagawa A, Oiwa H, Hasegawa Y, Ikai T. (1979). Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiot* 32:255–261. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.32.255>.
- Omura S, Tazaki K, Tanaka Y, Sakakibawa H, Aizawa M, Lukacs G. (1983). Valine is a precursor of n-butyrate unit in the biosynthesis of macrolide aglycone. *J. Antibiot.* 36: 614-616.
- Omura S., (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.
- Orazio Romeo, Fabio Scordino, Valeria Chillemi, Giuseppe Criseo. (2012). *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* Species Complex in Southern Italy: An Overview on the Environmental Diffusion of Serotypes, Genotypes and Mating-Types. *Mycopathologia.* DOI 10.1007/s11046-012-9547-6.
- Oskay M, Tamer AU, Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of turkey. *Afr J Biotechnol.* 3: 441-446.
- Ottow J.C.G. and Glathe H., (1968). Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 16: 170–171.
- Ouhdouch Y., Brakate M., Finance C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur.J.Soil Biol.* 37:69-74.
- Overbye KM, Barrett JF. (2005). Antibiotics: where did we go wrong?. *Drug Discovery Today.* 10: 45-52.
- P. Monteiro de souza and P. de Oliveira, (2010). Application of microbial α -amylase in industry: a review, *Braz J Microbiol*, vol. 41.
- PAL M, MEPROTRA B S. (1984). Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegetables. *Mycosen;* 28: 200-5.

- Palacios D.S., Dailey I., Siebert D.M., Wilcock B.C., et al., (2011) synthesis enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *PNAS*.108(17).6733-3783.
- Pamboukian CR, Facciotti MC. (2004). Production of antitumoral retamycin during fed-batch fermentations of *Streptomyces olindensis*. *Appl Biochem Biotechnol* 112:111–122. <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:112:2:111>.
- Park YS, Momose I, Tsunoda K, Okabe M. (1994). Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 773-779.
- Paula Monteiro de Souza; Pérola de Oliveira e Magalhães. (2010). Application of microbial - amylase in industry – a review. *Braz J Microbiol.* 41: 850-861.
- Pendela M, Dragovic S, Bockx L, Hoogmartens J, Van Schepdael A, Adams E. (2008). Development of a liquid chromatographic method for the determination of related substances and assay of D-cycloserine. *J Pharm Biomed Anal* 47:807–811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2008.03.012>.
- Perfect JR, (2006). *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res*, 6:463-468.
- Pfaller M.A., Chaturvedic V., Diekema D.J., Ghannoum M.A., Holliday N.M., Killian S.B., Knappe C.C., Messera S.A., Miskoue A., Ramani R. (2012). Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida spp.*, using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Micr Infec Dis.*73.365–368.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2010). "Epidemiology of invasive mycoses in North America." *Crit Rev Microbiol* 36(1): 1-53.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2010). "Epidemiology of invasive mycoses in North America." *Crit Rev Microbiol* 36(1): 1-53.
- Pfefferle C, Theobald U, Gürtler H, Fiedler HP. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotechnol.* 80: 135-142.
- Pinnert-Sindico S. (1954). Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques: *Streptomyces ambofaciens* n. sp. *Ann Inst Pasteur* 87:702–707.
- Prakash Divya, Neelu Nawani, Mansi Prakash, Manish Bodas, Abul Mandal, Madhukar Khetmalas, and Balasaheb Kapadnis. (2013). Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume, ID 264020, 8. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/264020>.
- Prasanna S., Partha Roy, Raghu Sriram, Naveen Grover, Priyanka Pandi and Mayuri A Kulkarni. (2016). Comparison of E-test and Colorimetric Micro Broth Dilution Method for Antifungal Susceptibility Testing of Candida Isolates. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci:* 5(5): 194-204.
- Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (2007) *Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles* : 805-825.
- Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. (2010). *Microbiologie. De Boeck* : Bruxelles. 2eme edition Pp 589.
- Pridham TG, Gottlieb D. (1948). The utilization of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* 56: 107-114.
- Priscu J.C., Adams E.E., Lyons W.B., Voytek M.A., Mogk D.W., Brown R.L., McKay C.P., Takacs C.D., Welch K.A., Wolf C.F., Kirshtein J.D., Avci R., (1999). *Geomicrobiology*

- of subglacial ice above Lake Vostok. *Antarctica Sci.*, 286: 2141–2144. prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.
- Priya, T. Stalin, and K. Selvam, (2012). Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygrosopicus*) in the production of ecofriendly alternative energy from waste, *Afr J Biotechnol*, vol. 11, no. 78, pp. 14320–14325,
- R. Sathya, T. Ushadevi. (2014). Industrially important enzymes producing *Streptomyces* species from mangrove sediments. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 6, Issue 10, 233-237.
- Rajan, B.M. and K. Kannabiran, (2010). Antimicrobial activity of *Streptomyces VITBRK1 app*. Isolated from the Bay of Bengal coast of Tamil Nadu India. *Pharmacologyonline*, 1: 124-132.
- Rangaswami. G. Bagyaraj. D. J. Bagyaraj D.G. (2004). *Agricultural Microbiology*. PHI : New Delhi. Pp : 440.
- Refai Mohamed, El-Hariri Mahmoud and Alarousy Randa. (2014). Monograph on *Cryptococcus* and Cryptococcosis: In man, animals and birds, a guide for postgraduate students in developing countries. Department of Microbiology, National Research Center, Dokki, Giza. 182p.
- Reginaldo S. Pedroso, , Joseane C. Ferreira, Regina C. Candido, (2009). The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbio Res.*164(2),221–227.
- Reginster Monique. (1965). Inactivation of Influenza Virus by Caseinase C from *Streptomyces ulbus* G Culture-fiftrate. *J. gen. Microbiol.* Printed in Great Britain, 40, 157-189.
- Renvoisé A., (2012). Applicabilité de la PCR « universelle » 16S comme outil d’identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie. Université d’Aix-Marseille. pp1-109.
- Reponen T.A., G. S. (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol*, 64, 3807-3812.
- Retima A., (1999) – Incidences des échanges hydrologiques, chimiques, biochimiques et phytoplanktoniques sur la fertilité de la lagune Mellah et du littoral voisin (El-Kala, Algérie) selon le régime de marée dix ans après l’aménagement du chenal de communication. Univ. Annaba. 85 p.
- Reynolds TB, (2009). Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. *Microbiol*, 155(5): 1386-1396.
- Rhodes PM. 1984. The production of oxytetracycline in chemostat culture. *Biotechnol Bioeng* 26:382–385. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260260415>.
- Rifaat, Z. A. Nagieb, and Y. M. Ahmed, (2006) “Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp,” *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 4, no. 1, pp. 151–160,.
- Rimek D. (2004). First report of a case of meningitis caused by *Cryptococcus adeliensis* in a patient with acute myeloid leukemia. *J Clin Microbiol.* ;42:481–483.
- Robic A, Ullmann C, Auffray P, Persillon C, Martin J. (2017). Enzymes for industrial applications. *OCL* 24(4): D404.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES *et al.*, (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell*, 7(1): 58-67.

- Saisivam S., Bhikshapathi D.V., Krishnaveni J. et Kishan V. (2008) Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*-An Indian soil isolate. *Indian J Biotechnol.* 7: 349-355.
- Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sanglard D. Bille J., (2003). Résistance aux antifongiques, implications en clinique. *Annales de l'institut Pasteur/Actualités : les mycoses.* ISSN0924-4204.
- Sanglier J.J., e. T. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, 12(13).
- Sar B, M. D. (2004). Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: Antimicrob Agents Chemother, 54, 563-565.
- Savioli L., Smith H., Thompson A. (2006). Giardia and Cryptosporidium join the neglected Diseases initiative. *Trends parasitol.* 22(5). 203-208.
- Seipke RF, Barke J, Brearley C, Hill L, Yu DW, Goss RJM, et al. (2011) A Single *Streptomyces* Symbiont Makes Multiple Antifungals to Support the Fungus Farming Ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS ONE* 6(8): e22028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022028>
- Seo G., Kim J. et Choi D. (2010) Antibiotic Production from *Streptomyces fradiae* SF-12 using Wasted Crude Vegetable Oil as an Energy Source. *J Adv Engin Technol.* 3(3): 251-254.
- Serda Kantarcioğlu A., Teun Boekhout, G. Sybren De Hoog, Bart Theelen, Ayhan Yücel, Tuba R. Ekmekci, Bettina C. Fries, Reiko Ikeda, Adem Koslu, And Kemal Altas. (2007). Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and *in vitro* antifungal susceptibilities. *Med Mycol.* 45(2): 173–181 doi:10.1080/13693780601045166.
- Severo, C. B., M. O. Xavier, et al. (2009). "Cryptococcosis in children." *Paediatr Respir Rev* 10(4): 166-171.
- Shi M, Li SS et al., (2010). Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest*, 120(5): 1683-1693.
- Shih HD, Liu YC, Hsu FL, Mulabagal V, Dodda R, Huang JW. (2003). Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *J Agric Food Chem* 51:95–99. <http://dx.doi.org/10.1021/jf025879b>.
- Shirling E.B. et Gottlieb D., (1966). Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 16(3): 313-340.
- Shirling E.B., Gottlieb D. (1972), Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. V. Additional descriptions *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22 pp. 265–394.
- Shomura T, Yoshida J, Amano S, Kojima M, Inouye S, Niida T. (1979). Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J. Antibiot.* 5: 427-435.
- Sikyta B, Slezak J, Herold M. (1961). Growth of *Streptomyces aureofaciens* in continuous culture. *Appl. Microbiol.* 9: 233-238.
- Simmersecko. (2006). A Peach Of A Pathogen: *Cryptococcus Neoformans*.SCQ.
- Singh, A.K. and Chhatpar, H.S. (2011) Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. *J Basic Microbiol* 51, 424–432.
- Smaoui S., (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Institut National Polytechnique de Toulouse. pp1-251.
- Smith RM, Peterson WH, McCoy E. (1954). Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot Chemother (Northfield)* 4:962–970.

- Soares Mcb, Paula Cr., Dias A.L.T., Caseiro Mm., & Sop Costa. (2005). Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* In the city of Santos, sp, Brazil. *47(1):31-36*.
- Spadari C., Antunes T., Teixeira R., Minotto E., et al., (2013). Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance. *Brizilian J of Biosc 11(4)*. 439-443.
- Springer Deborah J., Billmyre R. Blake, Filler Elan Voelz E., Kerstin, Pursall Rhiannon, Mieczkowski Piotr A., Larsen Robert A., Dietrich Fred S., May Robin, Scott G C., Filler, Heitman Joseph. (2014). *Cryptococcus gattii* VGIII Isolates Causing Infections in HIV/AIDS Patients in Southern California: Identification of the Local Environmental Source as Arboreal. *PLOS Pathogens*. 10 (8).e1004285.
- Springer DJ, Saini D, Byrnes EJ, Heitman J, Frothingham R (2013) Development of an Aerosol Model of *Cryptococcus* Reveals Humidity as an Important Factor Affecting the Viability of *Cryptococcus* during Aerosolization. *PLoS ONE* 8(7): e69804. doi:10.1371/journal.pone.0069804.
- Stackebrandt E, Goebel BM. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Steenbergen, J. N. (2003). *Cryptococcus neoformans* Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host *Dictyostelium discoideum*. *71(9)*, 4862-4872.
- Strub C. (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Université de Toulouse INP-ENSAT. France. 174p.
- Struyk AP, Hoette I, Drost G, Waisvisz JM, van Eek T, Hoogerheide JC. 1958. Pimaricin, a new antifungal antibiotic, p 878–885. *In* Welch H,
- Subramanian, S. and D. Mathai (2005). "Clinical manifestations and management of cryptococcal infection." *J Postgrad Med* 51 Suppl 1: S21-26.
- Sujatha P, Bapi-Raju KV, Ramana T. (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160: 119-126.
- Swinne D, Deppner M, Laroche R, Floch J J, Kadende P.(1999). Short communication: isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). *AIDS*; 3: 389-90.
- Takahashi Y., Matsumoto A., Seino A., Iwai Y. and Omura S. (1996). Rare actinomycetes isolated from desert soils. *Actinomycetologia*, 10(2): 91–97.
- Takeuchi S, Hirayama K, Ueda K, Sakai H, Yonehara H. 1958. Blastidicin S, a new antibiotic. *J Antibiot* 11:1–5.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei, M, Kumar S. (2011). MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731–2739.
- Theobald U., Pfefferle C, Gürtler H, Fiedler HP. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*. 80: 135-142.
- Thompson RQ, Hughes MS. (1963). Stendomycin: a new antifungal antibiotic. *J Antibiot* 16:187–194.
- Tintelnot K, Lostert H. (2005). Isolation of *Cryptococcus adeliensis* from clinical samples and the environment in Germany. *J Clin Microbiol*;43:1007.

- Tiwari K., Gupta R., (2010). Rare actinomycetes: A potential storehouse for novel antibiotics. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32:108-132.
- Tomita F, Tamaoki T, Morimoto M, Fujimoto K. (1981). Trioxacarcins, novel antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation and biological activities. *J Antibiot* 34:1519–1524.
- Trejo-Estrada S, Paszczynski A, Crawford D. 1998. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusnuger* YCED-9. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21:81–90. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900549>.
- Trilli A, Crossley MV, Kontakou M. (1987). Relation between growth rate and erythromycin production in *Streptomyces erythraeus*. *Biotechnol. Lett.* 9: 765-770.
- Umezawa H, Okami Y, Hashimoto T, Suhara Y, Hamada M, Takeuchi T. (1965). An antibiotic, kasugamycin. *J Antibiot* 18:101–103.
- Umezawa H, Ueda M, Maeda K, Yagishita K, Kondo S, Okami Y, Utahara R, Osato Y, Nitta K, Takeuchi T. (1957). Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J Antibiot* 10:181–188.
- Uyeda M, Mizukami M, Yokomizo K, Suzuki K. (2001). Pentalenolactone I and hygromycin A, immunosuppressants produced by *Streptomyces filipinensis* and *Streptomyces hygroscopicus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:1252–1254. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.65.1252>.
- Velagapudi RY, Hsueh P *et al.*, (2009). Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77(10): 4345-4355.
- Vino S, Lokesh KR. (2008). Borrelidin: a promising anticancer agent from *Streptomyces* species. *Adv Biotech* 6:22–26.
- Waksman S.A., henrici A.T., (1943). The nomenclature and classification of the actinomycete. *J. Bacteriol.* 46: 337-341.
- Waksman SA, Woodruff HB. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 45:609.
- Waksman SA. (1961). The actinomycetes Classification identification and description of genera and species, 2. Baltimore, USA:Williams and Wilkins Company.pp 1-363.
- Waldron C, Matsushima P, Rosteck PR, Jr, Broughton MC, Turner J, Madduri K, Crawford KP, Merlo DJ, Baltz RH. (2001). Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chem Biol* 8:487–499. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\) 00029-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(01) 00029-1).
- Watkins, Jason S. King, Simon A. Johnston. (2017). Nutritional Requirements and Their Importance for Virulence of Pathogenic *Cryptococcus* Species. *Microorganisms*, 5, 65.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD.(2001). How many antibiotics are produced by the genus. *Arch Microbiol* 176:386–390. <http://dx.doi.org/10.1007/s002030100345>.
- Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, Wagman GH, Rosselet JP, Marquez JA, Coniglio CT, Charney W, Herzog HL, Black J. (1963). Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. *J Med Chem* 6:463–464. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00340a034>.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
- White TJ., Bruns T., Lee S., and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic press, Inc. 315-322.
- Williams S.T., L. S. (1993). Ecology of actinomycetes. In *The biology of actinomycetes* (pp. 481-528.). Academic press.

- Williams, T. (1973). The fine structure of the *Actinomycetales*. In *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*. E. b. Skinner, Éd. London and New York: Academic Press.
- Wu MC, Law B, Wilkinson B, Micklefield J. (2012). Bioengineering natural product biosynthetic pathways for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* 23:931–940. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.008>.
- Xue, L., Xue, Q., Chen, Q., Lin, C., Shen, G. and Zhao, J. (2013) Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of Verticillium wilt of cotton. *Crop Prot* 43, 231–240.
- Yanagimoto M. (1983). Novel actions of inducer in staphylomycin production by *Streptomyces virginiae*. *J Ferment Technol* 61:443–448.
- Yang HJ, Huang XZ, Zhang ZL, Wang CX, Zhou J, Huang K, Zhou JM, Zheng W. (2014). Two novel amphomycin analogues from *Streptomyces canus* strain FIM-0916. *Nat Prod Res* 28:861–867. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.886210>.
- Yehia A.-G. Mahmoud. (2000). First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gatti* from the Gharbia Governorate, Egypt. *Mycopathologia* 148: 83–86.
- Yolanda Morera-Lopez¹, Josep Maria Torres-Rodríguez, Teresa Jimenez-Cabello, Teresa Baro-Tomas, Concepci n Alia-Aponte & Marcia S. Lazera. (2005). DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia*. 160: 9–14. DOI: 10.1007/s11046-005-6332-9.
- Yuttavanichakul W., Lawongsa P., Wongkaew S., Teaumroong N., Boonkerd N., Nomura N., and Tittabutr P., (2012) Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger*, *Biological Control*, 63: 87–97.
- Zaitlin B. and Watson S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Research*, 40. 1741 - 1753
- Zerizer H, Oulmi L, Boughachiche F, Reghioua S, Boudemagh A, Kitouni M, Boulahrouf A. (2006) Identification d'une actinomycète, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides de la région de Biskra. *Sciences & Technologie*. 24 : 17-22.
- Zhang YL, Li S, Jiang DH, Kong LC, Zhang PH, Xu JD. (2013). Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02. *J Agric Food Chem* 61:1521–1524. <http://dx.doi.org/10.1021/jf305210u>.
- Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. (2005). *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res in Microb*. 156: 984-993.

Annexe :

Tableau n°31 : résultats test d'activité des isolats par la technique cylindre d'agar sur *C.neoformans* (clinique)

milieu isolat	ISP1 (mm)	ISP2 (mm)	GYEA (mm)	BENNET (mm)
E6	-	16	18	-
E14	-	11	10	12
E65	13	21	24	23
E75g	16	22	18	20
E87p	15	26	24	17
E96	16	20	22	20
E165	17	15	17	19
E182	14	17	21	13

Tableau n°32 : résultats test d'activité des isolats par la technique cylindre d'agar sur *C.diffluens* (environnemental).

milieu isolat	ISP1 (mm)	ISP2 (mm)	GYEA (mm)	BENNET (mm)
E6	-	18	16	-
E14	-	11	11	12
E65	19	27	26	24
E75g	20	24	20	23
E87p	21	25	24	17
E96	24	20	25	27
E165	19	19	20	22
E182	17	19	21	19

Tableau n°33 : résultats test d'activité des isolats par la technique cylindre d'agar sur *C.albidus* (environnemental).

milieu isolat	ISP1 (mm)	ISP2 (mm)	GYEA (mm)	BENNET (mm)
E6	-	16	14	-
E14	-	11	11	11
E65	17	25	25	22
E75g	13	23	19	20
E87p	15	25	23	20
E96	20	20	22	21
E165	19	19	20	20
E182	17	19	20	19

Tableau n°34 : résultats test d'activité des isolats par la technique de double couche sur *C.neoformans* (clinique).

milieu isolat	ISP1 (mm)	ISP2 (mm)	GYEA (mm)	BENNET (mm)
E6	70	40	37	38
E14	-	19	21	30
E65	20	36	34	40
E75g	30	45	45	40
E87p	55	90	63	50
E96	50	90	63	49
E165	39	53	33	47
E182	31	37	30	39

Tableau n°35 : résultats test d'activité des isolats par la technique de double couche sur *C.diffluens* (environnemental).

milieu isolat	ISP1 (mm)	ISP2 (mm)	GYEA (mm)	BENNET (mm)
E6	66	39	35	36
E14	-	15	18	29
E65	18	30	29	39
E75g	29	42	44	39
E87p	53	85	60	47
E96	50	85	60	45
E165	37	50	31	45
E182	31	37	30	39

Tableau n°36 : résultats test d'activité des isolats par la technique de double couche sur *C.albidus* (environnemental).

milieu isolat	ISP1 (mm)	ISP2 (mm)	GYEA (mm)	BENNET (mm)
E6	65	37	35	35
E14	-	16	17	28
E65	17	32	28	37
E75g	27	40	43	40
E87p	52	83	61	45
E96	50	85	62	46
E165	38	51	30	44
E182	30	35	29	38

Tableau n°37 : composition de la galerie 50 CH

Bande	Tube	Test	Composants actifs
0 - 9	0	Témoin	-
	1	GLY	glycérol
	2	ERY	Erythritol
	3	DARA	D-arabinose
	4	LARA	L-arabinose
	5	RIB	D-ribose
	6	DXYL	D-xylose
	7	LXYL	L-xylose
	8	ADO	D-adonitol
9	MDX	Méthyl-βD-xylopyranoside	
10 - 19	10	GAL	D-galactose
	11	GLU	D-glucose
	12	FRU	D-fructose
	13	MNE	D-mannose
	14	SBE	L-sorbitol
	15	RHA	L-rhamnose
	16	DUL	Dulcitol
	17	INO	Inositol
	18	MAN	D-mannose
19	SOR	D-sorbitol	
20 - 29	20	MDM	Methyl-αD-mannopyranoside
	21	MDG	Methyl-αD-glucopyranoside
	22	NAG	N-acétylglucosamine
	23	AMY	Amygdaline
	24	ARB	Arbutine
	25	ESC	Esculine citrate de fer
	26	SAL	Salicine
	27	CEL	D-cellobiose
	28	MAL	D-maltose
29	LAC	D-lactose	
30 - 39	30	MEL	D-melibiose
	31	SAC	D-saccharose
	32	TRE	D-trehalose
	33	INU	Inuline
	34	MLZ	D-mélézitose
	35	RAF	D-raffinose
	36	AMD	Amidon
	37	GLYG	Glycogène
	38	XLT	Xylitol
39	GEN	Gentiobiose	
40 - 49	40	TUR	D-turanose
	41	LYX	D-lyxose
	42	TAG	D-tagatose
	43	DFUC	D-fucose
	44	LFUC	L-fucose
	45	DARL	D-arabitol
	46	LARL	L-arabitol
	47	GNT	Potassium gluconate
	48	2KG	Potassium 2-cétogluconate
49	5KG	Potassium 5-cétogluconate	

Tableau n°38 : composition de la galerie 20 NE

Test	Composants actifs
NO ₃	potassium nitrate
TRP	L-tryptophane
GLU	D-glucose
ADH	L-arginine
URE	urée
ESC	esculine citrate de fer
GEL	gélatine
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside
GLU	D-glucose
ARA	L-arabinose
MNE	D-mannose
MAN	D-mannitol
NAG	N-acétyl-glucosamine
MAL	D-maltose
GNT	potassium gluconate
CAP	acide caprique
ADI	acide adipique
MLT	acide malique
CIT	trisodium citrate
PAC	acide phénylacétique

Tableau n°39 : composition de la galerie ID32C

Test	Composants actifs
GAL	D-galactose
ACT	cycloheximide (actidione)
SAC	D-saccharose
NAG	N-acetyl-glucosamine
LAT	acide lactique
ARA	L-arabinose
CEL	D-cellibiose
RAF	D-raffinose
MAL	D-maltose
TRE	D-trehalose
2KG	Potassium 2-cétogluconate
MDG	Methyl- α D-glucopyranoside
MAN	D-mannose
LAC	D-lactose
INO	inositol
SOR	D-sorbitol
XYL	D-xylose
RIB	D-ribose
GLY	glycérol
RHA	L-rhamnose
PLE	palatinose
ERY	erythritol
MEL	D-mellibiose
GRT	sodium glucuronate
MLZ	D-mélézitose
GNT	potassium gluconate
LVT	acide lévulinique
GLU	D-glucose
SBE	L-sorbose
GLN	glucosamine
ESC	esculine citrate de fer

Tableau n°40 : liste des antibiotiques utilisés

Antibiotique	Abrevi-ation
Ampicilline	AMP
Amoxicilline	AMC
Imipénème	IPM
Céfazoline	CZ
Cefalexine	CN
Cefotaxime	CTX
Cefixime	CFM
Kanamycine	K
Tobramycine	TM
Clindamycine	CL
Érythromycine	E
Spiramycine	SP
Pristinamycine	PR
Doxycycline	D
Pefloxacin	PEF
Acide Nalidixique	NA
Acide Pipémidique	PI
Nitroxoline	NTX

« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite. Un plein effort est une pleine victoire »

MOHANDAS KARAMCHAND GANDHI (1869-1948)