

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB de BLIDA
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention de master en biologie

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire

Thème

Production de bio-conservateurs alimentaires à activité
antifongique par *Streptomyces* sp. B31

Présenté par :

M^{elle} BELALTIA Asma

Soutenue le : 03/07/2013

Devant le jury composé de :

M ^r LARBI DOUKARA K.	MAA	Président	USDB
M ^{me} KADRI F.	MAA	Examinatrice	USDA
M ^{me} Med MAHMOUD F.	MAA	Examinatrice	USDB
M ^{elle} MEKLAT. A	MCB	Promotrice	USDB
M ^r BOURAS. N	MCA	Co-promoteur	ENS Kouba

Promotion 2012-2013

AVANT-PROPOS

*Je remercie Dieu le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche
du savoir et de la science.*

*Un immense merci à Mr le Professeur **Nasserdine SABAOU** pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'Ecole Normale Supérieure d'Alger (LBSM-ENS-Kouba).*

*Je tiens à remercier M^{elle} **Atika MEKLAT**, Maître de conférences B, et Directrice de mémoire, pour m'avoir permis de travailler sur un thème de recherche aussi novateur, riche et passionnant, pour m'avoir dirigé dans ce travail, pour la qualité de son encadrement et ses fructueux conseils, pour son extrême gentillesse, sa disponibilité, son aide et son accueil, toujours aussi agréable, Qu'elle accepte le témoignage de ma profonde gratitude .*

*Je tiens aussi à exprimer ma gratitude et mes vifs remerciements à mon co-promoteur Mr **Nourddine BOURAS** qui a bien voulu nous consacrer un peu son temps pour la réalisation de mon travail. Ses conseils et ses observations m'ont été d'un aide bénéfique. Que Dieu le protège.*

*Un immense merci à Mr le Professeur **Nasserdine SABAOU** pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'Ecole Normale Supérieure d'Alger (LBSM-ENS-Kouba).*

*J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à Mr **LARBI DOUKARA**, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.*

*J'exprime également mes vifs remerciements à Mesdames **KADRI** et **Med MAHMOUD** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*J'aimerais également exprimer mes vifs remerciements à tous les membres du laboratoire de microbiologie de l'ENS de Kouba, en particulier Mr **TOUMATIA**, Mr **RIBA**, Mme **Bouti**, Mme **Zebiri** et Mme **Azoune** et à Mr et Mme **AIT YHIA** du laboratoire de chimie de l'ENS de Kouba.*

DEDICACES

Je dédie le fruit de mes études à :

La mémoire de ma grande mère.

Mes très chers parents qui sont toujours dans mon cœur, qui ont consacré leur vie pour mon éducation et ma réussite, qui m'ont encouragé dans les moments les plus difficiles.

Que Dieu les garde et les protège pour nous.

Mon très cher frère AHMED CHAKIB.

Mes sœurs SANA, Wafa et ALAA, à qui je souhaite beaucoup de succès et de réussite dans leurs études.

Ma grande mère maternelle ZOUHRA qui n'a pas cessé de prier pour moi.

Mes oncles et leurs femmes.

Mes tantes et leurs maris.

A ma cousine FATMA ZOUHRA, son mari, sa belle mère et ces enfants en particulier SADIKA.

Mes cousins et cousines et leurs enfants.

Mes amis : IMENE, RYME, NADIA, TOUHA, NESRINE, KAMEL.

Tous les étudiants et étudiantes de l'option microbiologie et toxicologie alimentaire
2013

Tous ce qui m'aiment et que j'aime.

ASMA

Résumé

La souche *Streptomyces* sp. B31 est une bactérie filamenteuse appartenant à l'ordre des *Streptomyetales*, et au genre *Streptomyces*. Au cours de ce travail et parmi les quatre milieux de culture testés (ISP2, Bennett, SSB et GYEA) déjà utilisés par des membres du laboratoire LBSM de l'KOUBA dans des recherches similaires, le milieu de culture Bennett a été choisi comme le meilleur milieu de culture pour la production des antifongiques par la souche B31 et on a éliminé ISP2 à cause de résultats non appréciables. L'activité antifongique, la nature et le nombre des antifongiques produits par la souche B31 ont été déterminés.

La souche B31 a d'abord fait l'objet d'une étude de ses propriétés antagonistes dans différents milieux de culture (ISP2, Bennett, SSB et GYEA) vis-à-vis de différentes espèces de champignons des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Mucor*. La souche B31 est active contre l'ensemble de ces champignons et sur les quatre milieux de culture testés. Le travail a été poursuivi en évaluant la production des antifongiques par la souche B31 contre les champignons les plus sensibles et sur les trois meilleurs milieux de culture selon les résultats de screening sur milieux solides (Bennett, SSB et GYEA). La cinétique réalisée pendant 8 jours a montré des maxima d'activité au premier jour d'incubation pour le milieu Bennett et au deuxième jour d'incubation pour les milieux GYEA et SSB.

Les trois milieux testés par la cinétique ont été retenus pour la production des antifongiques et des extractions de ces molécules ont été réalisées par différents solvants organiques afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction. L'activité antifongique est mesurée pour chaque extrait. La comparaison des résultats d'antibiogramme indique que le milieu Bennett est meilleur pour la production d'antifongiques par la souche B31 et l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant organique.

L'utilisation de la spectroscopie UV-visible pour la détection d'une structure polyénique, indique que l'activité antifongique produite n'est pas de nature polyénique. La purification par HPLC a montré que la souche B31 produit quatre antifongiques.

Mots clés : *Streptomyces*, champignons mycotoxinogènes, antifongiques, cinétiques, polyène, HPLC.

Summary

The strain B31 is a filamentous bacterium belonging to the order of *Streptomyvetale*, and to the genus *Streptomyces*. During this work, four culture media was studied: ISP2, Bennett, SSB and GYEA. In addition, the antifungal activity, the nature and the number of antifungal compounds produced by the strain B31 was realized.

The goal of this work is to study the antagonistic properties of the strain B31 against different mycotoxigenic fungal species belonging to *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Mucor*.

The obtained results showed that the strain is active against all targeted fungi. Furthermore, the experiment was performed by testing three culture media, and by evaluating the production of the antifungal compounds (measured by the agar well diffusion method) during kinetics in shaken cultures.

In order to select the best culture medium, and the best organic solvent for extraction, the cultures were carried out by using different culture media, and then extracted by different organic solvents. The antifungal activity was measured for each extract. The culture medium Bennett was chosen as the best culture medium for the production of antifungal compounds by the strain *Streptomyces* sp. B31. However, the culture medium ISP2 was removed based on the obtained results. The comparison of the results of antibiography indicated that the Bennett medium is better for the production of the antifungal activity produced by the strain B31, and the ethyl acetate is the best organic solvent.

The use of the UV-visible spectroscopy indicated the non-polyenic nature of the produced antifungal compounds. The purification by HPLC showed that the strain B31 produced four different antifungal compounds.

Key words: *Streptomyces*, antifungal compound, production, kinetics, polyenic, HPLC.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Contamination en moisissures de diverses denrées alimentaires.	6
Tableau 2 : les recommandations selon Comité mixte experts FAO/OMS Additifs alimentaire.	10
Tableau 3 : les composés les plus utilisés contre les moisissures et les types d'aliments dans lesquels ils sont utilisés.	11
Tableau 4 : Propriétés de quelques antibiotiques.	12
Tableau 5 : Maxima d'absorption en UV-visible des polyènes.	15
Tableau 6 : Quelques exemples d'antifongiques sécrétés par les souches du genre <i>Streptomyces</i> .	18
Tableau 7 : liste des champignons cibles.	24
Tableau 8 : Activité antagoniste de la souche B31 de <i>Streptomyces</i> sp. contre champignons sur les milieux solides ISP2, GYEA, SSB et Bennett.	35
Tableau 9 : Couleurs et activité des pics obtenus par HPLC après une injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche B31.	48

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentatif de la méthode des stries croisées.	28
Figure 2 : schémas descriptive des étapes de la cinétique de la production des antifongiques.	29
Figure 3 : schéma descriptive des étapes d'extraction et de mesure des activités antifongique.	31
Figure 4 : Photographies montrant le dépôt des disques imprégnés sur le milieu de culture (photo à gauche) et la lecture du résultat (photo de droite).	32
Figure 5 : Photo illustrant la recherche de l'activité antifongique de la souche B31 de <i>Streptomyces</i> sp. par la méthode des stries croisées sur le milieu SSB.	37
Figure 6 : Mise en évidence de l'activité antifongique en milieu SSB de la souche B31 par la méthode des puits contre <i>Aspergillus carbonarius</i> du jour 0 (J ₀) au jour 5 (J ₅).	39
Figure 7 : Cinétiques de production des activités antifongiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche B31 en milieu liquide SSB.	40
Figure 8 : Mise en évidence de l'activité antifongique en milieu GYEA de la souche B31 par la méthode des puits contre <i>Aspergillus carbonarius</i> du jour 0 (J ₀) au jour 5 (J ₅).	41
Figure 9 : Cinétiques de production des activités antifongiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche B31 en milieu liquide GYEA.	42
Figure 10 : en évidence de l'activité antifongique en milieu Bennett de la souche B31 par la méthode des puits contre <i>Aspergillus carbonarius</i> du jour 0 (J ₀) au jour 5 (J ₅).	43
Figure 11 : Cinétiques de production des activités antifongiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche B31 en milieu liquide Bennett.	44
Figure 12 : Activité des extraits organiques de la souche B31 de <i>Streptomyces</i> sp.	45

Figure 13 : Activités antifongiques des extraits organiques testées par antibiographie.	46
Figure 14 : Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'extrait brut d'acétate d'éthyle et du butanol de la souche B31.	47
Figure 15: Profil d'élution en HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat B31.	48

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction.....	1
CHAPITRE I	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Contaminants alimentaire.....	4
I.1. Contaminants bactériens	4
I.2. Contaminants viraux.....	4
I.3. Contaminants parasitaires.....	4
I.4. Contaminants fongiques	5
II. Les moisissures (champignons).....	5
1. <i>Aspergillus</i>	7
2. <i>Fusarium</i>	7
3. <i>Penicillium</i>	7
III. Les mycotoxines.....	8
1. Types de mycotoxines	8
1.1. Les aflatoxines	8
1.2. Les ochratoxines	8
1.3. Les fumonisines.....	9
1.4. La zéaralénone.....	9
1.5. La patuline.....	9
2. Norme et recommandation.....	10
3. Protection des aliments contre les microorganismes.....	10
3.1. Protection chimique.....	10
3.2. Autres méthodes de conservations des aliments.....	12
IV. Les antifongiques.....	13
1. Structure et classification.....	14
2. Les antifongiques d'origine naturelle.....	14
2.1. Les antifongiques polyéniques.....	14
2.2. Les antifongiques non polyéniques.....	16
3. Les molécules de synthèse chimique.....	16
3.1. Les analogues des nucléosides.....	17
3.2. Les allylamines et les thiocarbamates.....	17
4. Microorganismes producteurs.....	18
V. Les actinomycètes	19
1. Définition	19
2. Le genre <i>Streptomyces</i> , l'actinomycete le plus bénéfique.....	20
2.1. Position Taxonomique.....	20
2.2. Importance des <i>Streptomyces</i> comme producteurs d'antibiotiques et autres composés utiles.....	20

2.3. Exemple d'un antifongique produit par une <i>Actinomycètes</i> et utilisé en industrie alimentaire.....	21
--	----

CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	23
1. La souche B31 de <i>Streptomyces</i> sp	23
2. Les champignons cibles.....	23
3. Milieux de culture utilisés	25
3.1. Milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antifongique de la souche B31	25
3.2. Milieu de culture pour la croissance des champignons.....	26
4. Appareil HPLC.....	26
5. Autres matériels.....	26
II. Méthodes.....	27
1. Mise en évidence de l'activité antifongique de la souche B31 par la technique des stries croisées.....	27
2. Cinétique de production des antifongiques en milieux liquides.....	27
2.1. Pré-cultures	28
2.2. Cultures	29
2.3. Mesure de l'activité antifongique.....	29
2.4. Mesure de la croissance et du pH.....	30
3. Production et extraction des substances antifongiques.....	30
4. Méthode de diffusion des disques de papier	32
5. Analyse par spectroscopie UV-visible.....	32
6. la purification de l'antibiotique par HPLC.....	33

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Détermination de l'activité antifongique de la souche B31 de <i>Streptomyces</i> sp.	35
1. Milieu GYEA	36
2. Milieu SSB.....	36
3. Milieu Bennett.....	37
4. Milieu ISP2.....	38
II. Cinétique de production des antifongiques en milieux complexes.....	38
1. Cinétique dans le milieu SSB.....	38
2. Cinétique dans milieu GYEA.....	41
3. Cinétique dans milieu Bennett.....	43

III. Extraction des antifongiques et antibiographie.....	45
IV. Détection des polyènes dans les extraits bruts.....	47
V. Purification par HPLC des antifongiques de la souche B31.....	47
Discussion	49
Références bibliographiques.....	
Annexe.....	

Nos aliments proviennent de notre environnement immédiat, mais aussi, de plus en plus, de pays divers. Cependant il arrive que ces aliments soient contaminés en cours de production, de transformation, de transport, et de manipulation par des substances potentiellement dangereuse pour la santé. Notre environnement est contaminé par des agents chimiques, physiques, et biologiques qui risquent de porté atteinte à notre santé. Les aliments constituent probablement la partie de l'environnement humain la plus complexe au point de vue chimique et la plus susceptible d'être contaminés par des substances d'origine naturelle ou par des produits organique ou inorganique d'origine tant environnementale qu'industrielle (**Panisset *et al.*, 2003**).

Divers contaminants peuvent donc être capté par la chaîne alimentaire et ainsi être transférés à l'être humain par voie digestive. De se fait plusieurs modalités expliquent la transmission des maladies par l'aliment : bactérienne, virale, parasitaire et fongique.

Les moisissures produisent un nombre important de substances. Certaines sont bénéfiques dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, etc. et d'autres sont nuisibles, provoquant la détérioration des denrées alimentaires par la production de mycotoxines par exemple.

Bien que le consommateur ne réalise pas vraiment que ces métabolites toxiques présentent un véritable danger et posent un problème de sécurité alimentaire, au moins un quart de la récolte mondiale se trouve contaminée (Mannon et Johnson, 1985; Moll et Moll, 1995). Les cinq principaux genres de champignons filamenteux qui sécrètent des mycotoxines dans les produits agro-alimentaires sont les *Aspergilli*, les *Penicillia*, les *Fusaria*, les *Claviceps* et les *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994). Mais en réalité, d'autres genres produisent des mycotoxines dans d'autres domaines que l'agro-alimentaire (Weidenbörner, 2001). Pour lutter contre ces champignons on fait appel à des antifongiques de nature chimique ou naturelle. Ces derniers sont produits par diverse micro organismes.

Les actinomycètes sont particulièrement très intéressants par leur très grande capacité à produire des métabolites secondaires avec des structures chimiques diversifiées (Valan Arasu *et al.*, 2008).

Différentes substances d'intérêt pharmaceutique sont produites par ces microorganismes: antibactériennes, antifongiques, antivirales, vitamines, enzymes, immunostimulantes, antihistaminiques, vasodilatatrices, etc. Ils ont aussi une grande importance dans différents autres domaines (biotechnologie industrielle, industrie agro-alimentaire, etc.). Les actinomycètes sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques antibactériens et antifongiques, avec près de 70% des molécules actives commercialisées (Solanki *et al.*, 2008). Le genre *Streptomyces* est le plus important et est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques, soit 80% des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes (Demain, 2006).

Les limites et les effets secondaires de la lutte chimique contre les agents pathogènes ont poussé différentes équipes à rechercher des stratégies plus efficaces et plus respectueuses de l'environnement. Ainsi, les méthodes de lutte biologique utilisant des agents antagonistes naturels sont considérées comme une voie alternative à l'utilisation des fongicides chimiques (Fravel, 1988).

C'est dans ce contexte que, lors d'un programme de criblage pour de nouvelles molécules bioactives à partir d'actinomycètes isolés de sol sahariens, une souche d'actinomycète désignée B31 a été isolée à partir d'un échantillon de sol de Djelfa. La souche, identifiée au genre *Streptomyces*, a montré une activité antifongique intéressante.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antifongique de la souche B31, et la nature de ces antifongiques pour ouvrir la porte sur des nouvelles molécules qui peuvent être utilisées comme des additifs alimentaire.

Le mémoire comprend trois parties : la première est relative aux données bibliographiques sur les moisissures, les mycotoxines, les antifongiques et les *Streptomyces* comme producteurs d'antibiotiques. La seconde, décrit le matériel et les méthodes utilisés. La troisième partie porte sur les résultats et la discussion.

Dans ce chapitre, nous présentons les données bibliographiques sur les éléments essentiels abordés dans ce travail, à savoir : les champignons et les mycotoxines, les antifongiques et les *Streptomyces* comme producteurs d'antifongiques.

Plusieurs modalités expliquent la transmission des maladies bactérienne, virale, parasitaire ou fongique par les aliments.

I. Contaminants alimentaires

Les dangers considérés dans ce rapport concernent les bactéries pathogènes pour l'homme susceptibles d'être transmises aux consommateurs par des denrées animales ou végétales contaminées. Il s'agit d'agents de gastro-entérites (*Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* entéropathogènes, sérotypes pathogènes de *Clostridium perfringens*), de bactéries pouvant être à l'origine de septicémies ou de méningites (*Listeria monocytogenes*). D'autres ne sont dangereuses que par les toxines qu'elles produisent dans les aliments (*Clostridium botulinum* et *Staphylococcus aureus*).

L'ingestion de fruits et légumes représente une cause mineure de transmission de maladies bactériennes. Toutefois, des fruits et légumes ont été à l'origine d'épidémies à *Listeria monocytogenes*, à *Salmonella* sp. et à *Escherichia coli* O157:H7 en Amérique du Nord (AFSSA, 2003).

Contrairement aux bactéries, les virus ne peuvent pas se répliquer dans les denrées alimentaires. En conséquence, le nombre de virus n'augmente pas durant le procédé de transformation, le transport ou le stockage. L'aliment peut servir d'un vecteur de virus uniquement dans le cas où ce virus est viable, la charge virale est suffisante et son élimination n'est pas assurée par le procédé de transformation durant toutes les étapes de la chaîne alimentaire. L'hépatite A (VHA), les calicivirus humains, et les rotavirus de groupe A sont parmi les virus entériques d'origine alimentaire les plus importants (Koopmans and Duizer, 2002).

L'aliment peut être un vecteur de parasites, les parasitoses d'origine alimentaire sont fréquentes et constituent un problème de santé publique lié aux conditions d'hygiène. Parmi les parasites transmis par les aliments nous citons: *Giardia intestinalis*, *Sarcocystis hominis*, *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium* spp.. (Ortega, 2006).

L'aliment peut aussi véhiculer les moisissures et leurs toxines. La prolifération des moisissures se fait surtout dans les aliments riches en glucides et entraîne des biodégradations qui se manifestent par:

- Prise en masse et fermentation de l'aliment -pourriture
- Toxicité de l'aliment susceptible de former des mycotoxines tels que les aflatoxine

(Kellal ,1992).

II. Les moisissures (champignons)

Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquitaires, constituées par des filaments ramifiés, les hyphes, dont l'ensemble est connu sous le nom de mycélium. Les moisissures sont caractérisées par:

- La nature chimique de leur paroi cellulaire riche en chitine;
- La reproduction par spores sexuées ou asexuées;
- La présence de glycogène, comme source de réserve;
- L'absence de la chlorophylle.

Le règne des champignons renfermerait 65000 à 100 000 espèces différentes et les moisissures constituent 20 000 espèces. La plupart des moisissures sont des saprophytes, mais certaines peuvent être phyto-gènes pour les végétaux et les animaux (Riba, 2008).

Dans le tableau ci-dessous (tableau1) quelques contamination en moisissures de diverses denrées alimentaires d'après l'AFSSA (2006).

Tableau 1. Contamination en moisissures de diverses denrées alimentaires (AFSSA, 2006).

Denrées	Espèces toxiques contaminants
Blé, Farine, pain, maïs et chips	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. citréoviride</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. pubertum</i> et <i>Fusarium moniliforme</i>
Arachide et noix	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>A.ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. cyclopium</i> et <i>P. expansum</i> .
Tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao et houblon	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Penicillium Viridicatum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. patulum</i> et <i>P. commune</i>
Viandes, porc salé et fromage	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> et <i>P. cyclopium</i> .
Poivre noir et rouge et pâtes	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> et <i>A. ochraceus</i> .
Fèves, orge, maïs, sorgho et soja	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Alternaria</i> et <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. islandicum</i> et <i>P. urticae</i> .
Pâtisserie réfrigérée ou congelée.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. citreoviride</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. puberulum</i> , <i>P. Roquefort</i> et <i>P. urticae</i> .
Denrée alimentaire (stockage domestique).	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>
Pomme et produits dérivés de pomme	<i>Penicillium expansum</i>

1. *Aspergillus*

Les *Aspergilli*, sont très répandus dans la nature et tout particulièrement dans le sol où ils contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (Scheidegger et Payne, 2003). Ils sont par ailleurs utilisés dans plusieurs domaines (agriculture, biotechnologie et santé) en exerçant des rôles bénéfiques comme la production de métabolites utiles (enzymes, protéines et acides).

En revanche, les *Aspergillus* sont capables de provoquer des dégâts importants, notamment ceux liés aux contaminations des denrées alimentaires (Pitt *et al.*, 2000). Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (Scheidegger et Payne, 2003). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines, les ochratoxines et la patuline, ont une incidence économique et sanitaire.

2. *Fusarium*

Ce genre inclue des champignons appartenant à la classe des *Deutéromycètes* qui comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (Nelson *et al.*, 1983).

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications alimentaire (Roquebert, 1998).

3. *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). *Penicillia* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphasés, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour

habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales. La majorité des espèces de *Penicillium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications (Botton *et al.*, 1990).

III. Les mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du grec "*mycos*" qui signifie champignons et du latin "*toxicum*" qui signifie poison. Il désigne des métabolites secondaires de faible poids moléculaires toxiques, sécrétés par des moisissures. Elles sont produites par 5 genres de champignons: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994)

1. Types de mycotoxines

Les mycotoxines les plus couramment rencontrées et faisant l'objet d'une surveillance régulière, sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, la zéaralénone et la patuline.

1.1. Les aflatoxines

Les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement proches (un assemblage d'une coumarine et de 3 furannes). Les plus courantes sont l'Aflatoxine B1 (AFB1), l'Aflatoxine B2 (AFB2), l'aflatoxine M1 (AFM1), l'Aflatoxine G1 (AFG1) et l'aflatoxine G2 (AFG2). Le cycle lactone de l'AFB1 semble être responsable en majorité de sa toxicité (Lee *et al.*, 1981). Principalement, trois espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2; *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) et *A. nomius*, une souche rare, proche de *A. flavus*, est capable de produire des aflatoxines B1 et B2 (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

1.2. Les ochratoxines

Les ochratoxines constituent une famille de toxines contenant une iso-coumarine parfois chlorée couplée par une liaison amide à une molécule de L-phénylalanine. Parmi les 3 ochratoxines existantes : l'Ochratoxine A (OTA), l'Ochratoxine B (OTB) et l'Ochratoxine C (OTC), l'OTA est

la plus fréquemment rencontrée (Lee *et al.*, 1981). D'une manière générale, trois espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser l'ochratoxine A, *A. westerdijkiae* (anciennement appelé *A. ochraceus*), *A. carbonarius* et *A. niger* (Siddique *et al.*, 2012).

1.3. Les fumonisines

Elles possèdent une structure linéaire de vingt atomes de carbone portant des groupements méthyles, hydroxyles et deux substituants de plus grandes tailles (acide tricarbalique). Elles ont également une fonction amine primaire qui leur confère une réactivité intéressante et une solubilité en milieu aqueux (Chotia, 1999)

Les fumonisines sont un groupe de mycotoxines caractérisées à la fin des années 80 est produites par *Fusarium verticilloides*, une moisissure présente dans le monde entier et fréquemment retrouvée sur le maïs. Plusieurs souches de *F. verticilloides* isolées d'autres substrats comme le sorgho (Ayalew *et al.* 2006) et l'avoine (Sugita-Konishi *et al.* 2006) produisent des quantités importantes de fumonisines.

1.4. La zéaralénone

La zéaralénone a été identifiée comme une lactone de l'acide résorcylique. La zéaralénone (ZEA) ou toxine F-2 est produite par les espèces appartenant au genre *Fusarium*, en particulier *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. culmorum*. Elle peut être également être synthétisée par *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoïdes* et *F. laterium*. La production de cette mycotoxine est favorisée lorsque les températures sont situées entre 10 et 15°C (Tabuc, 2007).

1.5. La patuline

La patuline est une mycotoxine qui suscite de nos jours un intérêt en raison de son caractère contaminant naturel des produits dérivés de la filière de la pomme. Cette mycotoxine est synthétisée dans certaines conditions par quelques espèces d'*Aspergillus* (comme *A. clavatus*, etc.) et de *Penicillium* (comme *P. patulum*, *P. expansum* et *P. glandicola*) (AFSSA, 2006).

2. Norme et recommandation

Les normes nationales concernant le taux des mycotoxines présent dans les aliments sont conformes aux normes international et européenne.

Tableau 2 : les recommandations selon Comité mixte experts FAO/OMS Additifs alimentaire (JECFA, 2002).

Mycotoxine considér	Recommandation JECFA
Aflatoxine B₁	Contamination aussi basse que raisonnablement possible (ALARA)
Aflatoxine M₁	Contamination aussi basse que raisonnablement possible (ALARA)
Ochratoxine A	PTWI = 100 ng/kg poids corporel
Fumonisines	PMTDI = 2 µg/kg poids corporel pour FB ₁ , FB ₂ ou FB ₃ seules ou en mélange
Zéaralénone	PMTDI = 0,5 µg/kg poids corporel
Patuline	PMTDI = 0,4 µg/kg de poids corporel

PTWI: prise tolérable temporaire de semaine

PMTDI : prise quotidienne tolérable maximale temporaire

3. Protection des aliments contre les microorganismes

La protection des aliments contre les contaminations par les microorganismes est assurée par différentes méthodes.

3.1. Protection chimique

L'utilisation de produits chimiques pour empêcher ou retarder la détérioration des aliments découle en partie du fait que ces composés sont utilisés avec succès dans le traitement des maladies des humains, des animaux et des plantes. À l'exception de certains antibiotiques, aucun des conservateurs alimentaires maintenant utilisé trouver une réelle utilité en tant que composés chimio thérapeutiques pour les hommes et les animaux. Bien qu'un grand nombre de produits chimiques ont été décrites qui montrent un potentiel comme agents de conservation, seul un nombre

relativement faible sont autorisés dans les produits alimentaires, dues en grande partie à des règles strictes de sécurité de la « *Food and Drug Administration* » (*FDA*). Dans le tableau 3 sont listés les composés les plus utilisés contre les moisissures et les types d'aliments dans lesquels ils sont utilisés d'après *Generally Recognized As Safe (GRAS)* (= généralement considéré comme non dangereux).

Tableau 3 : les composés les plus utilisés contre les moisissures et les types d'aliments dans lesquels ils sont utilisés

Conservateurs	Aliments
Acide propionique / propionates	Les gâteaux, certains fromages
L'acide sorbique/sorbates	Fromages à pâte dure, figues, sirops, dressages des salades, gelées, gâteaux.
Acide benzoïque/ benzoates	Margarine, conserves au vinaigre, cidre de pomme, boissons non alcoolisées, ketchup de tomate, salade
Parabens	Produit de boulangerie, boissons non alcoolisées, conserves au vinaigre, dressages de salade
Éthylène/ d'oxydes de propylène	Epices, noix
Di acétate de sodium	Pain
Acide caprylique	Enveloppes de fromage
Ethyle formate	Fruits secs, noix

En général, l'utilisation de conservateurs chimiques dans les aliments n'est pas populaire parmi de nombreux consommateurs, l'idée d'antibiotiques employant est encore moins populaire. Certains risques peuvent être anticipés à partir de l'utilisation d'un additif alimentaire, mais les risques ne doivent pas l'emporter sur les avantages globaux. En général les avantages à tirer de l'utilisation d'antibiotiques dans les aliments ne dépassent pas les risques, dont certains sont connus et dont certains sont présumés. Quelques considérations relatives à l'utilisation d'antibiotiques comme conservation des denrées alimentaires ont été notées dont les principaux sont résumés comme suit:

1. L'agent antibiotique doit tuer, et non entraver, la flore et devrait idéalement se décomposer en inoffensive produits ou être détruites à la cuisson de produits nécessitant une cuisson.
2. L'antibiotique ne doit pas être inactivé par les composants alimentaires ou des produits du métabolisme microbien.
3. L'antibiotique ne devrait pas stimuler rapidement l'apparition de souches résistantes.
4. L'antibiotique ne doit pas être utilisé dans les aliments si utilisé en thérapeutique ou en tant qu'additif pour l'alimentation animale.

Tableau 4 : Propriétés de quelques antibiotiques (Jay, 1983)

Propriété	Tétracyclines	Subtilin	Tylosine	Nisine	Natamycine
Employé couramment en nourritures	non	non	non	oui	oui
Première utilisation alimentaire	1950	1950	1961	1951	1956
nature chimique	tétracycline	Polypeptide	macrolide	polypeptide	Polyène
Utilisé comme adjonction de la chaleur	non	oui	oui	oui	non
Stabilité à la chaleur	sensible	stable	stable	stable	stable
Spectre microbien	G+, G-	G+	G+	G+	mycètes
Utilisé comme médicalement	oui	non	oui	non	oui
Utilisé en alimentations	oui	non	oui	non	non

3.2. Autres méthodes de conservations des aliments

Parmi les méthodes utilisées pour la protection des aliments contre le développement des microorganismes nous trouvons:

- Le conditionnement sous atmosphère modifiée (MAP) est utilisé pour modifier l'environnement gazeux sur et autour des aliments à fins de prolonger la durée d'utilisation. Le dioxyde de carbone (CO₂) est parmi les gazes les plus utilisés autant que conservateur alimentaire.

- Le traitement par radiation qui peut être définie comme l'émission et la propagation de l'énergie dans l'espace. Les radiations sont d'intérêt primaire dans la conservation des aliments sont des

rayonnements ionisants, définis comme les radiations qui ont des longueurs d'onde de 2000 Å ou moins, par exemple, les particules alpha, les rayons bêta, les rayons gamma et les rayons X.

- L'utilisation de basses températures de conservation des aliments est basée sur le fait que le développement de micro-organismes peut être ralenti à des températures au-dessus de la température de congélation. La raison en est que toutes les réactions métaboliques des micro-organismes sont catalysées par une enzyme, et que la vitesse des réactions catalysées par des enzymes est dépendante de la température. Avec une élévation de la température, il y a une augmentation de la vitesse des réactions et par conséquent une détérioration plus rapide des aliments.

- L'utilisation des températures élevées pour la conservation des aliments est basée sur leurs effets destructeurs sur les micro-organismes. En ce qui concerne la conservation des aliments, il ya deux catégories de température d'usage courant: la pasteurisation et la stérilisation :

- La conservation des aliments par le séchage est basée sur le fait que les micro-organismes et les enzymes ont besoin d'eau, afin d'être actifs. Dans la conservation des aliments par cette méthode, on cherche à abaisser le taux d'humidité à un point où les activités de détérioration et d'intoxication alimentaire par les microorganismes sont inhibées.

IV. Les antifongiques

Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons. Ils ont une large application dans la médecine humaine et vétérinaire et dans l'agriculture (Vandamme, 1985). Actuellement, l'emploi du terme antifongique s'est élargi pour inclure à côté des produits naturels élaborés au cours du métabolisme secondaire de certains microorganismes, des composés synthétiques et semi-synthétiques.

Pour lutter contre les atteintes fongiques, divers antifongiques sont utilisés.

1. Structure et classification

Les antibiotiques antifongiques présentent une large diversité structurale (Gupte *et al.*, 2002): lactones macrocycliques (nystatine), analogues des nucléosides (azoles et dérivés), diterpènes tétracycliques (sordarines), oligopeptides cycliques (pneumocandines), β -aminoacides (cispentacine), oligosaccharides (fusacandines), quinones (pradimycines), etc.

Les antibiotiques antifongiques peuvent être classés selon leur mode d'action, leur site d'action ou leur origine.

Dans la classification basée sur l'origine, nous distinguons deux grands groupes: les molécules naturelles élaborées par divers microorganismes et celles obtenues par synthèse chimique.

2. Les antifongiques d'origine naturelle

D'après Berdy *et al.* (1987), près de 40% des antibiotiques synthétisés par l'ensemble des microorganismes sont actifs contre les champignons. Plus de la moitié de ces antifongiques sont actifs également contre les bactéries. Selon la nature des molécules qu'ils renferment, nous distinguons deux groupes: les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques de structure non polyénique pouvant être souvent antibactériens également.

2.1. Les antifongiques polyéniques

La plupart des molécules polyéniques sont produites par des souches de *Streptomyces* (Watve *et al.* 2001). Leur structure est caractérisée par la présence d'un grand cycle lactone (comprenant 12 à 37 atomes de carbone) possédant une partie hydrophile (6 à 14 fonctions hydroxyles), un aminosucre qui est généralement la mycosamine et une partie apolaire rigide constituée de doubles liaisons conjuguées (André et Leroy, 2004). Selon le nombre des liaisons doubles, nous avons les triènes (3 doubles liaisons), les tétraènes (4), les pentaènes (5), hexaènes (6) et les heptaènes (7) (Brautaset *et al.* 2000). Chaque polyène possède trois maxima d'absorption caractéristiques en lumière UV-visible, entre 260 et 405 nm (Martin, 1979; Dinya et Sztaricskai, 1986) (Tableau5).

Dans les programmes de recherche de nouvelles molécules antifongiques, un balayage de spectre en UV-visible d'un extrait actif permet de déterminer la présence ou non d'une structure polyénique.

Leur spectre d'action sur les champignons est très large. Ils inhibent la croissance d'un nombre considérable de champignons levures, saprophytes ou pathogènes (Drouhet, 1978).

Tableau 5. Maxima d'absorption en UV-visible des polyènes (Martin, 1979).

Types de Polyènes	Longueur d'onde (nm)			Exemples
	Premier pic	Deuxième pic	Troisième pic	
Triènes	283	272	262 ± 2	Triénine
Tétraènes	318	304	291 ± 2	Nystatine
Pentaènes	350	331	317	Eurocidines
Méthylpentaènes	357	340	323	Filipine
Carbonylpentaènes	364	Bande d'absorption étendue		Mycoticine
Hexaènes	380	358	340 ± 2	Candihexine
Carbonylhexaènes	385	Bande d'absorption étendue		Dermostatine
Heptaènes	405	382	361 ± 2	Amphotéricine B

L'amphotéricine B et la nystatine sont actuellement les plus utilisées. L'amphotéricine B sécrétée par *Streptomyces nodosus*, est une molécule de référence qui représente le premier antifongique d'administration intraveineuse et qui possède un effet fongicide le plus efficace (Baginski *et al.*, 2005).

Malgré leur efficacité, les antifongiques polyéniques trouvent des limitations d'applications en thérapeutique, en raison des problèmes liés à leur toxicité vis-à-vis des cellules hôtes, à leur instabilité et à leur faible solubilité (Gupte *et al.* 2002; Drouhet et Dupont, 1987). Ces effets indésirables des polyènes sur les cellules eucaryotes des mammifères peuvent s'expliquer par l'interaction de ces agents avec le cholestérol (Yilma *et al.*, 2007). En effet, le cholestérol humain a une structure très proche de celle de l'ergostérol fongique, cible préférentielle des polyènes, d'où la toxicité de ce type de molécules antifongiques. Ces dernières provoquent généralement une toxicité surtout rénale (Knopik-Skrocka *et al.*, 2003).

Actuellement, l'attention est de plus en plus orientée vers la recherche de molécules antifongiques non polyéniques ayant comme sites d'action des cibles autres que l'ergostérol.

2.2. Les antifongiques non polyéniques

Ces molécules, possèdent des structures chimiques très variées, peuvent appartenir à plusieurs familles d'antibiotiques (Berdy *et al.*, 1987). Nous en citerons quelques exemples: glucides (validamycine, kasugamycine), quinones (nanaomycines), polypeptides (cyclosporine A), hétérocycles azotés (tunicamycine, blasticidine S et polyoxines), polyéthers (nigéricine, nonensine), composés alicycliques (cycloheximide) et composés aromatiques (griséofulvine). Leur spectre UV-visible est très variable, mais en aucun cas ils ne présentent les trois pics caractéristiques des polyènes (Aghighi *et al.* 2004).

Les pradimicines-bénanomicines sont des quinones naphtacènes à activité fongicide dirigée contre plusieurs champignons, même les isolats résistants à d'autres agents antifongiques. (Andriole, 1998; 2000).

Les sordarines ont une activité *in vitro* contre *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *C. neoformans*, *P. carinii* et quelques champignons filamenteux (Andriole, 1999; 2000).

De nombreuses molécules antifongiques non polyéniques ont trouvé une application dans le domaine agricole. On peut citer parmi elles, l'antimycine A, l'auréofungine, la blasticidine S, le cycloheximide, l'ézomycine, la kasugamycine, la mildiomycine, les polyoxines B et D, la gramicidine, la phytoactine, la validamycine, etc. (Bauer, 1966; Misato, 1982; Deacon, 1984).

3. Les molécules de synthèse chimique

Parmi les nombreuses préparations utilisables dans le traitement des mycoses superficielles ou profondes, plusieurs molécules de synthèse sont actuellement employées en thérapie humaine et vétérinaire pour leur activité et leur moindre toxicité.

Nous distinguons ainsi :

3.1. Les analogues des nucléosides

Cette classe d'antifongiques englobe la flucytosine et les divers azoles tels que le clotrimazole, le ketoconazole, le fluconazole et l'itraconazole. Leur spectre d'action

très large concerne pratiquement tous les champignons. L'activité antifongique et l'efficacité clinique des azoles varient avec chaque composé (Andriole, 2000).

3.2. Les allylamines et les thiocarbamates

Ce sont des agents fongicides synthétiques qui inhibent la squalène époxidase, une enzyme qui convertit le squalène en lanostérol (Groll *et al.*, 1998; Andriole, 2000). Il existe deux allylamines antifongiques, la naftifine et la terbinafine et un seul thiocarbamate, la talnaftate (Kobayashi et Medoff, 1977). Leur activité contre les dermatophytes, les levures et les moisissures rend leur intérêt non négligeable.

3.3. Les peptides cationiques :

Il existe des peptides cationiques naturels (cécropines, dermaseptines, etc.) et des peptides cationiques synthétiques (Groll et al. 1998; Andriole, 1999). La dolastatine 10, antifongique synthétique a une activité fongicide puissante contre *C. neoformans* (Andriole, 1999).

4. Microorganismes producteurs

Les antibiotiques antifongiques sont produits généralement par les champignons et les bactéries. Parmi les champignons producteurs, on trouve *Penicillium griseofulvum* et *P. patulum* (griséofulvine), *Sordaria araneosa*, *Graphium putredinis*, *Penicillium minioluteum* (sordarines et leurs analogues), *Aureobasidium pullulans* (auréobasidine A), *Coryneum modonium* (corynécandine), *Phialophora cyclaminis* (classe papulacandine), *Fusarium sambucinum* (fusacandine), *Fusarium* sp. K432, (Fusarieline A), *Arthrinium phaeospermum* (arthrichitine), *Zalerion arboricola* (pneumocandine) et *Trichoderma viride* (tricholine) (Zhang et Demain, 2005).

Parmi les bactéries non mycéliennes, on trouve *Bacillus cereus* (cispentacine, azoxybacilline) et *Pseudomonas* sp. (pyochéline), *Haliangium luteum*, myxobactérie marine (haliangicine), *Sorangium cellulosum*, une *Myxococcale* (soraphen) (Boudjella, 2007).

Parmi les actinomycètes producteurs, nous citerons principalement les genres *Streptomyces* (plusieurs souches et espèces, tableau 4), *Streptoverticillium* (HA-94, un pentaène),

Streptosporangium sp. SCC1786 (pradimicines, et sinéfungines), *Micromonospora* sp. (rustmicine ou galbonolide) et *Actinomadura* (pradimicines et bénanomicines) (Solanki *et al.*, 2008).

Solecka *et al.* (2012) rapportent que parmi les 14000 composés d'origine microbienne et présentant une activité antimicrobienne, 34 % possèdent une activité antifongique, dont 21 % à activité antilevurienne, 11 % contre les champignons phytopathogènes et 24 % contre les autres champignons. Parmi les microorganismes producteurs, les souches du genre *Streptomyces* constituent la source la plus riche. (Ruiz *et al.* 2010; Bérdy, 2005; Watve *et al.*, 2001). Dans le tableau 4 sont présentés quelques exemples d'antifongiques sécrétés par les souches du genre *Streptomyces*.

Tableau 6 : Quelques exemples d'antifongiques sécrétés par les souches du genre *Streptomyces*.

Antifongique	Souche productrice	Références
Amphotéricine B	<i>S. nodosus</i>	Trejo et Bennett, 1963.
Aureofungine	<i>S. cinnamoneus</i>	Martin et McDaniel, 1977.
sPolyoxines	<i>S. cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Kimura et Bugg, 2003.
Nikkomycines	<i>S. tendae</i> <i>S. ansochromogenes</i>	Kimura et Bugg, 2003. Liao <i>et al.</i> , 2009.
Oligomycines	<i>S. diastaticus</i> <i>S. diastatochromogenes</i> <i>S. libani</i> <i>S. avermitilis</i>	Yang <i>et al.</i> , 2010.
Rapamycine (sirolimus)	<i>S. hygroscopicus</i>	Sehgal <i>et al.</i> , 1975. Park <i>et al.</i> , 2010.
Validamycines (A à F)	<i>S. hygroscopicus</i>	Iwasa <i>et al.</i> , 1971.
Filipine	<i>S. avermitilis</i>	Nett <i>et al.</i> , 2009.
Candicidine	<i>S. griseus</i>	Liu <i>et al.</i> , 1975.
Levorine	<i>S. levoris</i>	Abou-Zeid et Abou-El-Atta, 1971.
Hamycine	<i>S. primprina</i>	Martin, 1977.
Pimaricine (aeromycine B)	<i>S. tumemomacerans</i> var. <i>griseoarenicolor</i> et <i>S. natalensis</i> <i>S. gilveosporus</i>	Martin, 1977.
Trichomycine	<i>S. hachijoensis</i> <i>S. abikoensis</i>	Martin, 1977.

A côté de ces molécules citées dans le tableau, de très nombreux polyènes sont produits par différentes espèces de *Streptomyces* (Martin et McDaniel, 1977).

V. Les actinomycètes

1. Définition

Selon Stackebrandt E. and Schaal K.P. (1995) le terme actinomycète provient du nom générique *Actinomyces*, décrit pour l'agent causal de l'actinomycose, *A. bovis*, par Corda (1839). Il signifie «champignons rayonnants» « ray-fungus » en grec. Les premières études de ces microorganismes ont montré une confusion dans leur classification entre champignons et bactéries. Les actinomycètes ont été souvent considérés comme un groupe de microorganismes intermédiaires entre les vrais champignons et les bactéries (Waksman, 1940). Cependant, la découverte de leur structure cellulaire fine (procaryote) et de la composition chimique de leur paroi, à partir de 1950, a permis par la suite de les classer définitivement parmi les bactéries où ils constituent aujourd'hui l'Ordre des *Actinomycetales* (Wellington et Ul-Hassan, 2009). Les différentes éditions du Manuel de Bergey ont apporté des définitions actualisées des actinomycètes avec des données fournies par des travaux récents par rapport à l'époque de chaque édition. Dans l'édition de 2012 de ce manuel, l'Ordre des *Actinomycetales* est défini comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un taux élevé en guanine + cytosine (supérieur à 55%) et qui forme un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (séquençage de l'ADN ribosomique 16S, hybridation ADN-ADN). Cet Ordre est passé d'une seule famille (*Actinomycetaceae*) décrite en 1916 avec 7 genres (Buchanan, 1917) à 48 familles contenant 291 genres en 2009 (Zhi *et al.*, 2009).

2. Le genre *Streptomyces*, l'actinomycete le plus bénéfique

2.1. Position Taxonomique

Le genre *Streptomyces* (du grec *Streptos* : courbé, tordu et *Myces* : moisissure) appartient à la classe des *Actinobacteria*, à l'ordre des *Streptomyetales* et à la famille des *Streptomycetaceae* (Bergey, 2012). Ce genre regroupe environ 630 espèces décrites (Euzéby, 2013). Ce genre est caractérisé morphologiquement par des mycelia aérien et de substrat très ramifiés. Le mycélium de substrat (0,5-2.0 µm de diamètre) se fragmente rarement. Le mycélium aérien forme des chaînes de trois à plusieurs spores à la maturité. Chimiotaxonomiquement, les *Streptomyces* possèdent le chimiotype IC (présence de LL DAP et glycine et absence de sucres taxonomiquement importants), des phospholipides de type PII (présence de phosphatidyléthanolamine comme phospholipide caractéristique), absence d'acides mycoliques et un taux de « Guanine + Cytosine » compris entre 66% et 78% (Bergey, 2004).

2.2. Importance des *Streptomyces* comme producteurs d'antibiotiques et autres composés utiles

Le genre *Streptomyces* est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes (Maskey et al. 2003, Gunnarson *et al.*, 2004). Il est notamment producteur de la majorité des molécules antibiotiques utilisées en thérapie humaine et vétérinaire, en agriculture et en industrie agroalimentaire. En biotechnologie, ce genre intervient dans la production de 70% des antibiotiques produits par les actinomycètes (Solecka et al. 2012, Perry *et al.*, 2004).

Les *Streptomyces* produisent également de nombreux métabolites secondaires possédant des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien. En effet, ils sont capables de synthétiser des molécules à propriétés diverses (antifongiques, antibactériens, insecticides, herbicides, antiparasites, acaricides, antiviraux, anti tumoraux, antimitotiques, anti allergéniques, enzymes, vitamines, etc.) et intéressantes dans les domaines pharmaceutique, médical, vétérinaire, agronomique et industriel (Solecka et al. 2012) et de ce fait, présentent un fort intérêt pour les industriels.

2.3. Exemple d'un antifongique produit par une *Actinomycètes* et utilisé en industrie alimentaire

La natamycine (pimaricine) est un composé antifongique non polyénique important commercialement, produit par des actinobactéries appartenant à *Streptomyces chatanoogensis* et *Streptomyces natalensis*.

Cet antibiotique est principalement un agent antifongique fort, empêchant la croissance des levures et des moisissures (Pedersen 1992) et empêche la production de l'aflatoxine par les champignons filamenteux (Rusul et Marth 1988). En raison de sa basse toxicité à la cellule mammifère comparée à d'autres composés antifongiques (Levinskas *et al.*, 1966), la natamycine est utilisée dans le traitement de maladies fongiques telles que Broncho-pulmonaire, aspergillose (Currie *et al.*, 1990) et kératites mycosique (Gupta *et al.*, 1999). Cet antifongique est également utilisé pour le traitement externe des aliments dans le but d'augmenter leurs temps de conservation. Ainsi, l'utilisation de la natamycine comme conservateur de fromage, saucisse, fruits et boissons, est autorisée dans plusieurs industries alimentaires (Kiermeier 1973, Davidson et Doan 1993). La natamycine parmi les quelques antibiotiques qui sont encore recommandés par FDA comme additif et classifié comme un composé *GRAS*.

I. Détermination de l'activité antifongique de la souche *Streptomyces* sp. (B31)

L'activité antifongique de la souche B31 est déterminée par la méthode des stries croisées. Celle-ci est une technique simple et pratique, largement utilisée dans les programmes de criblage pour des souches microbiennes productrices d'activités antibiotiques. Elle constitue une étape préliminaire et indispensable, où les isolats en culture pure sont examinés pour une éventuelle propriété antagoniste (Williston *et al.*, 1947).

Le spectre d'activité antifongique de la souche *Streptomyces* sp. B31 contre 20 champignons (voir matériel et méthode), sur différents milieux de culture solides: Bennett, GYEA, SSB et ISP2, est donné dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

Tableau 8 : Activité antagoniste de la souche *Streptomyces* sp. B31 contre des champignons sur les milieux de culture solides ISP2, GYEA, SSB et Bennett.

<i>Milieux de culture</i>	<i>Zone d'inhibition en (mm)</i>			
	GYEA	SSB	Bennett	ISP2
<i>Champignons cible</i>				
<i>Aspergillus ochraceus</i> (R2Cm)	4	7	8	0
<i>Aspergillus ochraceus</i> (R2C)	40	10	9	5
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (R25)	5	10	7	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (S2O)	6	8	6	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (AFB)	C ⁻	10	8	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (AFP)	C ⁻	7	6	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (d1)	25	24	C ⁻	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (Af37)	10	10	8	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (Af-T2)	C ⁻	8	6	5
<i>Aspergillus ochraceus</i> (Ao19)	7	4	6	3
<i>Aspergillus ochraceus</i> (Ao26)	4	6	15	4
<i>Aspergillus carbonarius</i> (Ac)	13	40	40	15
<i>Aspergillus ochraceus</i> (Ao)	6	7	7	5
<i>Aspergillus flavus</i> (Af)	16	19	16	6
<i>Aspergillus niger</i> (An)	10	C ⁻	12	7
<i>Aspergillus parasiticus</i> (Ap)	8	7	6	6
<i>Penicillium glabrum</i> (Pg)	11	C ⁻	10	5
<i>Penicillium expansum</i> (Pe)	C ⁻	C ⁻	30	3
<i>Fusarium culmorum</i> (Fc)	40	15	10	10
<i>Mucor ramaniannus</i> (Mr)	40	42	17	23

C⁻ = absence de croissance

Note: Les distances d'inhibition sont mesurées entre la bordure de l'actinomycète et celle du germe-cible inhibé (méthodes des stries croisées).

Les activités antagonistes de la souche B31 s'étendent sur tous les champignons testés. Cependant, leur intensité varie selon les champignons cibles et aussi, selon les milieux de culture utilisés.

1. Milieu GYEA

Nous avons obtenu une très forte inhibition des souches d'*Aspergillus ochraceus* (R₂C), de *Fusarium culmorum* et de *Mucor ramaniannus* avec des zones d'inhibition de l'ordre de 40mm. Une forte activité antifongique a été remarquée contre la souche d₁d'*Aspergillus* section *Flavi* et des activités moyennes à faibles ont été notées contre le reste des champignons testés sauf *Aspergillus* section *Flavi* T₂; (AFB) et (AFP) et *Penicillium exponsum* qui n'ont pas pu croître sur le milieu GYEA.

2. Milieu SSB

Ce milieu a donné de meilleurs résultats contre *M. ramannianus* et *A. carbonarius* (42 et 40 mm respectivement) et à un degré moindre contre la souche d₁ et *F. culmorum*. L'activité antifongique contre les autres germes cibles est moyenne à faible à l'exception d'*Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* et *P. glabrum* qui n'ont pas pu se développer sur le milieu SSB.

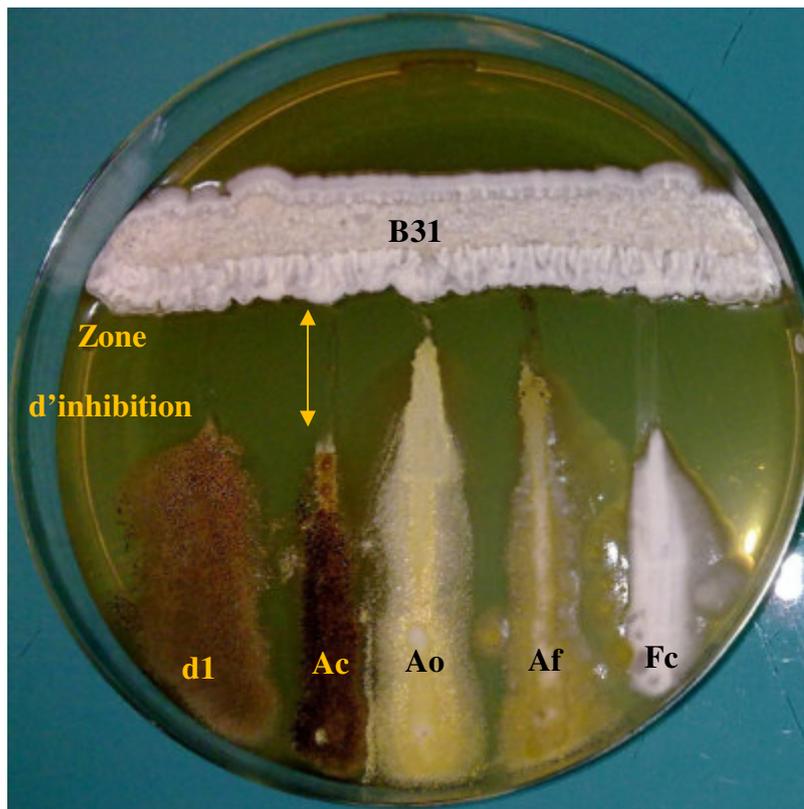


Figure 5 : Photo illustrant la recherche de l'activité antifongique de la souche *Streptomyces* sp. B31 par la méthode des stries croisées sur le milieu SSB.

Note. d1: *Aspergillus* section *Flavi* ; Ac: *A. carbonarius* ; Ao : *A. ochraceus* ; Af : *A. flavus* ; Fc: *F. culmorum*

3. Milieu Bennett

L'activité antifongique de la souche B31 est importante contre *Aspergillus carbonarius* et *Penicillium expansum* (40 et 30 mm respectivement) mais à un degré moindre contre la souche Ao26 d'*Aspergillus ochraceus* (15 mm) et *M. ramanianus* (17 mm). Les zones d'inhibitions sont moyennes à faibles pour le reste des germes cibles sauf la souche d1 qui n'a pas pu se développer sur le milieu Bennett.

4. Milieu ISP2

Le milieu ISP2 n'a pas donné de résultats intéressants. Nous avons observé une absence de l'activité antifongique contre les souches R2C, R25, S2O, AFB et AFP d'*Aspergillus* section *Flavi*. Néanmoins, ce milieu a permis d'obtenir une forte activité antifongique contre *M. ramaniannus* (23 mm), moyenne contre *A. carbonarius* (15 mm) et *F. culmorum* (10 mm) et faible contre le reste des germes tests.

II. Cinétique de production des antifongiques en milieux complexes

Dans le but de déterminer les conditions optimales de production des antifongiques, la souche B31 a été cultivée dans les trois milieux liquides complexes SSB, GYEA et Bennett qui ont montré de meilleurs résultats sur milieux solides. L'activité antifongique a été suivie quotidiennement contre *Mucor ramaniannus* (utilisé fréquemment comme germe cible modèle dans le laboratoire de LBSM), *A. ochraceus*R2C, *A. carbonarius*(Ac), *A. flavus*(Af) et *F. culmorum*(Fc). Le choix de ces germes tests est basé sur les résultats de screening de l'activité antifongique sur milieux solides (les germes les plus sensibles).

1. Cinétique dans le milieu SSB

Les cinétiques de croissance, de pH et de production d'antifongiques de la souche B31 en milieu liquide SSB sont illustrées par les Figure 6 et 7.

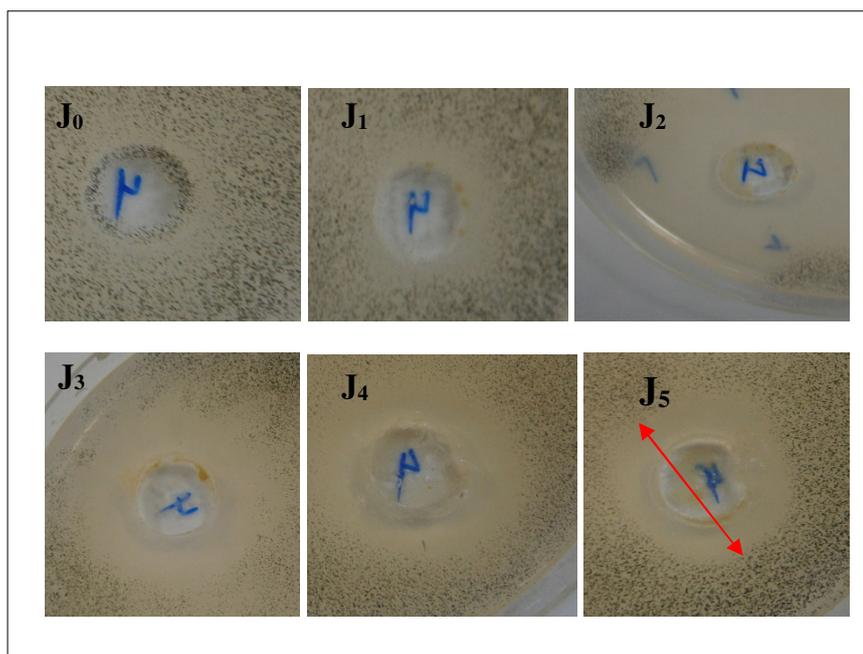


Figure 6 : Mise en évidence de l'activité antifongique en milieu SSB de la souche B31 par la méthode des puits contre *Aspergillus carbonarius* du jour0 (J₀) au jour 5 (J₅). ↔ = diamètre d'inhibition

La courbe de croissance de la souche B31 dans le milieu SSB débute par une phase de latence d'une durée de 24 h (J₀ à J₁), suivie d'une phase exponentielle entre le J₁ et le J₂, suivie d'une phase stationnaire entre J₂ et J₃ puis une deuxième phase exponentielle entre le J₃ et J₄ (phénomène de diauxie) et enfin une phase de déclin qui dure de 4^{ème} au 8^{ème} jour d'incubation.

La courbe du pH dans le milieu SSB montre de légères variations durant la cinétique. Durant les quatre premiers jours, le pH reste relativement stable (7,34 à 7,56) puis il s'alcalinise progressivement jusqu'au 8^{ème} jour où il atteint une valeur de 8,49.

L'activité antifongique est très forte contre les germes cibles testés, elle débute à partir du premier jour d'incubation contre Mr, R2C et Fc et à partir de deuxième jour contre Ac et Af. Elle atteint une valeur maximale le 2^{ème} jour de production contre les cinq germes tests utilisés. Un deuxième pic de production est obtenu contre Ac et R2C le 4^{ème} jour, contre Fc le 5^{ème} jour et contre Mr le 6^{ème} jour. Un troisième pic est obtenu contre Ac le 7^{ème} jour.

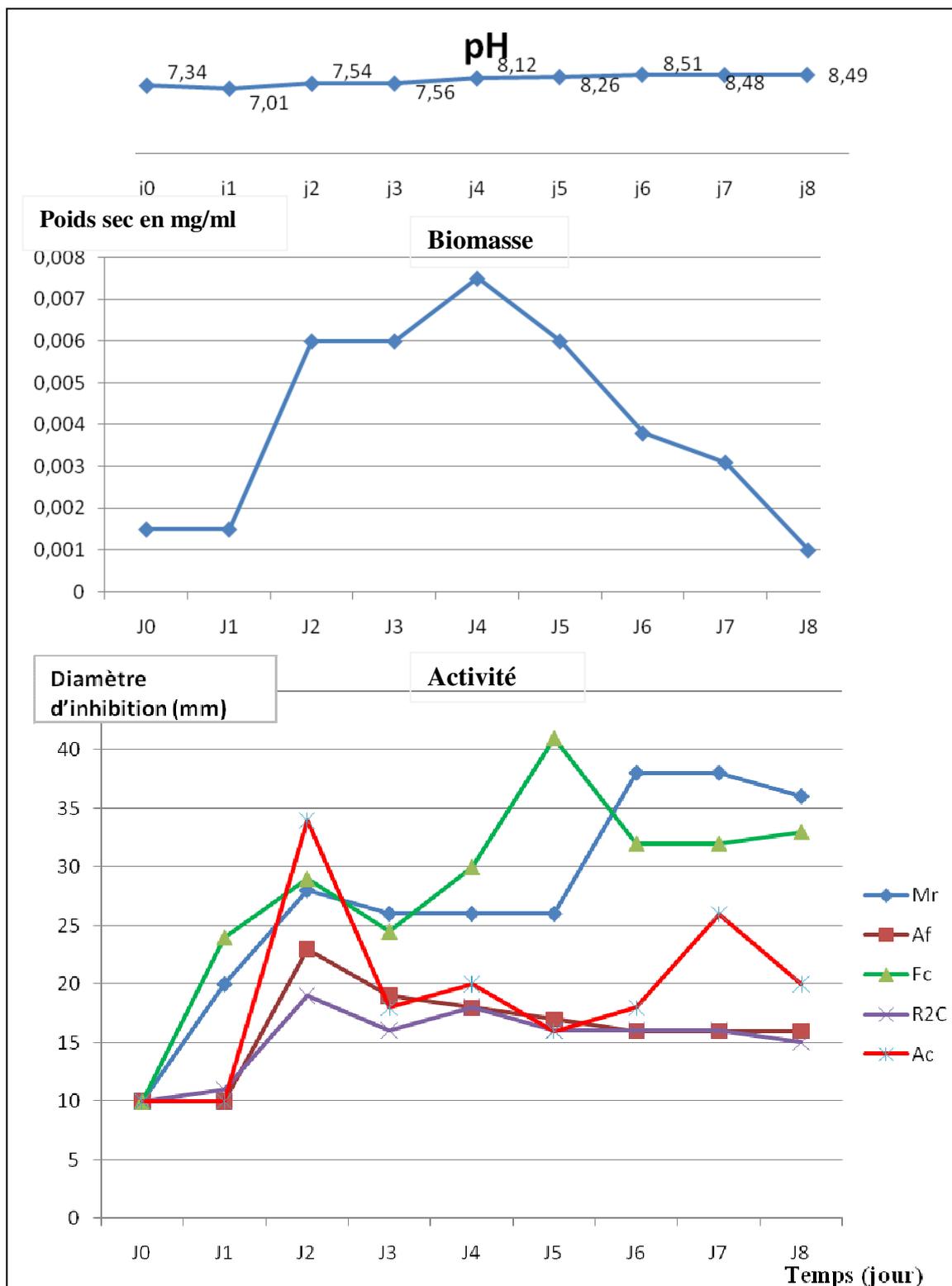


Figure 7 : Cinétiques de production des activités antifongiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche B31 en milieu liquide SSB.

Note: la mesure des diamètres d'inhibition (en mm) est effectuée par la méthode des puits (y compris le diamètre du puits = 10 mm); Mr = *Mucor ramannianus*, Af= *A. flavus*, Fc= *F. culmorum*, R2C= *A. ochraceus* et Ac= *A. carbonarius*.

2. Cinétique dans milieu GYEA

Les cinétiques de croissance, de pH et de production d'antifongiques de la souche B31 en milieu liquide GYEA sont illustrées par les Figure 8 et 9.

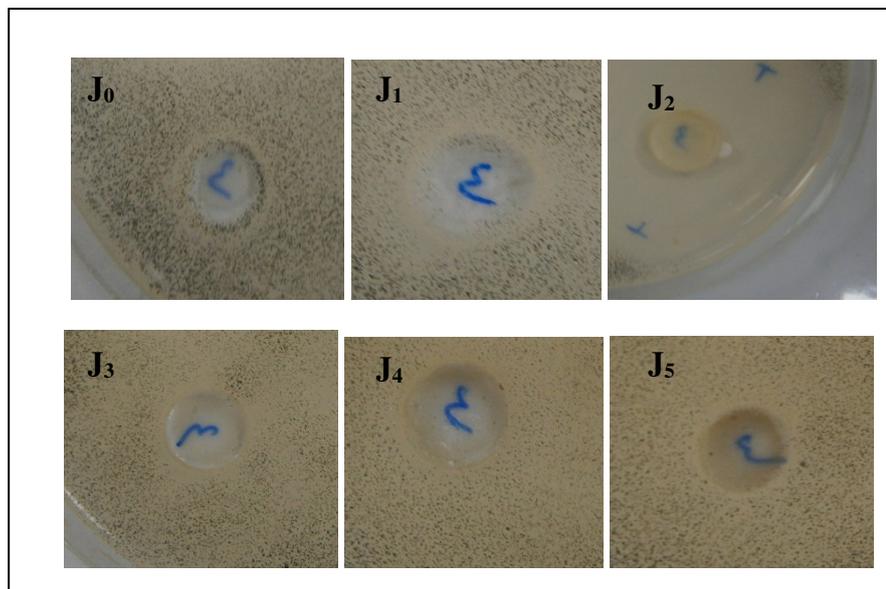


Figure 8 : Mise en évidence de l'activité antifongique en milieu GYEA de la souche B31 par la méthode des puits contre *Aspergillus carbonarius* du jour 0 (J₀) au jour 5 (J₅).

La croissance de la souche B31 dans le milieu GYEA commence par une phase de latence (J₀ à J₁) suivie d'une première phase exponentielle (J₁ à J₂) puis d'une phase stationnaire (J₂ à J₃), ensuite par une phase de déclin (J₃ à J₄). Une deuxième phase exponentielle est obtenue entre J₄ et J₆ suivi d'une phase de déclin (J₆ à J₈) (croissance cryptique).

Le pH s'acidifié au début de la cinétique (J₀ à J₁) puis s'alcalinise progressivement à partir de J₂ jusqu'à l'arrêt de la fermentation (J₈) où il atteint sa valeur maximale (9,28).

L'activité antifongique est détectée dans le milieu GYEA le J₀ contre Fc, Mr et R2C et le 1^{er} jour contre Af et Ac. Cette activité atteint le maximum le 2^{ème} jour de cinétique contre tous les germes cibles (premier pic). Cette activité diminue fortement (contre FC) ou disparaît complètement (contre

Af, Ac, R2C et Mr) du 3^{ème} jour jusqu'au 5^{ème} jour. Un deuxième pic plus important que le premier est obtenu contre FC, le 6^{ème} jour d'incubation.

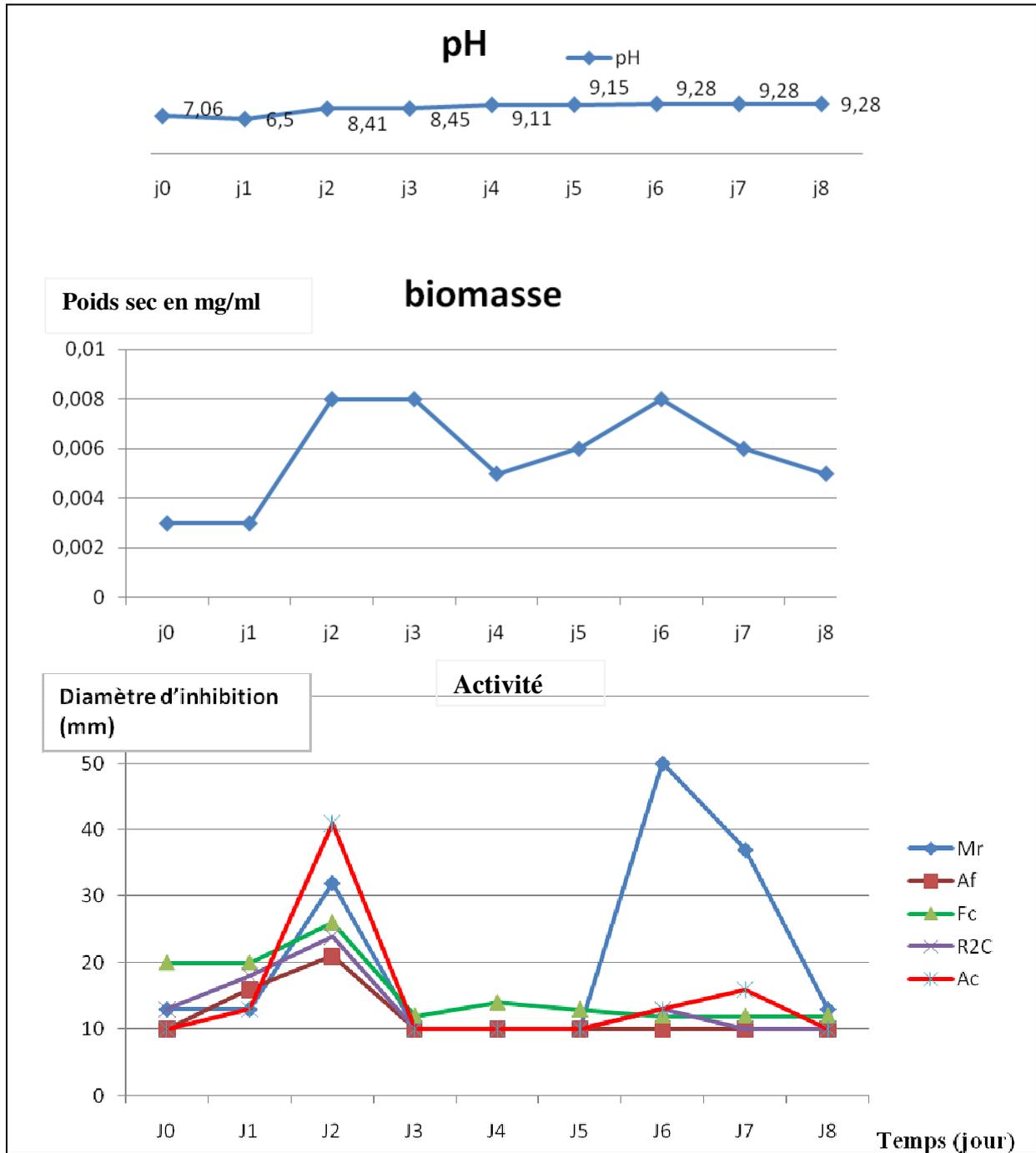


Figure 9 : Cinétiques de production des activités antifongiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche B31 en milieu liquide GYEA.

Note: la mesure des diamètres d'inhibition (en mm) est effectuée par la méthode des puits (y compris le diamètre du puits = 10 mm); Mr = *Mucor ramannianus*, AF= *A. flavus*, FC= *F. culmorum*, R₂C= *A. ochraceus* et AC= *A. carbonarius*.

3. Cinétique dans le milieu Bennett

Les cinétiques de croissance, de pH et de production d'antifongiques de la souche B31 en milieu liquide Bennett sont illustrées par les Figure 10 et 11.

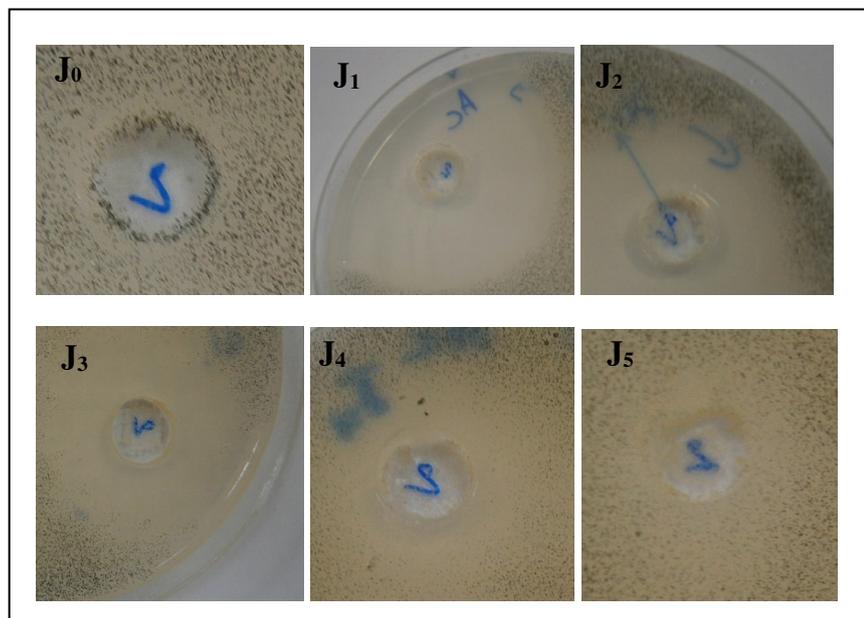


Figure 10 : Mise en évidence de l'activité antifongique en milieu Bennett de la souche B31 par la méthode des puits contre *Aspergillus carbonarius* du jour 0 (J₀) au jour 5 (J₅)

Dans le milieu Bennett, la souche B31 présente une courbe de croissance caractérisée par une phase de latence pendant le premier jour de fermentation suivie d'une phase exponentielle brève de 24h (J₁ à J₂), puis d'une phase de déclin entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour d'incubation. La croissance s'est stabilisée entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour pour reprendre une deuxième phase exponentielle entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour (croissance cryptique). Une deuxième phase de déclin est obtenue à la fin de la fermentation (entre J₇ et J₈).

Le pH de la culture dans le milieu Bennett se varie de la même façon que le milieu GYEA il atteint la valeur de 8,61 le jour de l'arrêt de la fermentation.

La production des antifongiques commence dès le début de l'incubation (J₀) contre Fc et R2C, et à partir de J₁ contre Ac, Mr et Af. L'activité antifongique atteint son maximum après 24 heures

d'incubation contre tous les germes testés. Un deuxième pic d'activité est obtenu le 3^{ème} jour d'incubation contre Mr et le 5^{ème} jour contre Fc.

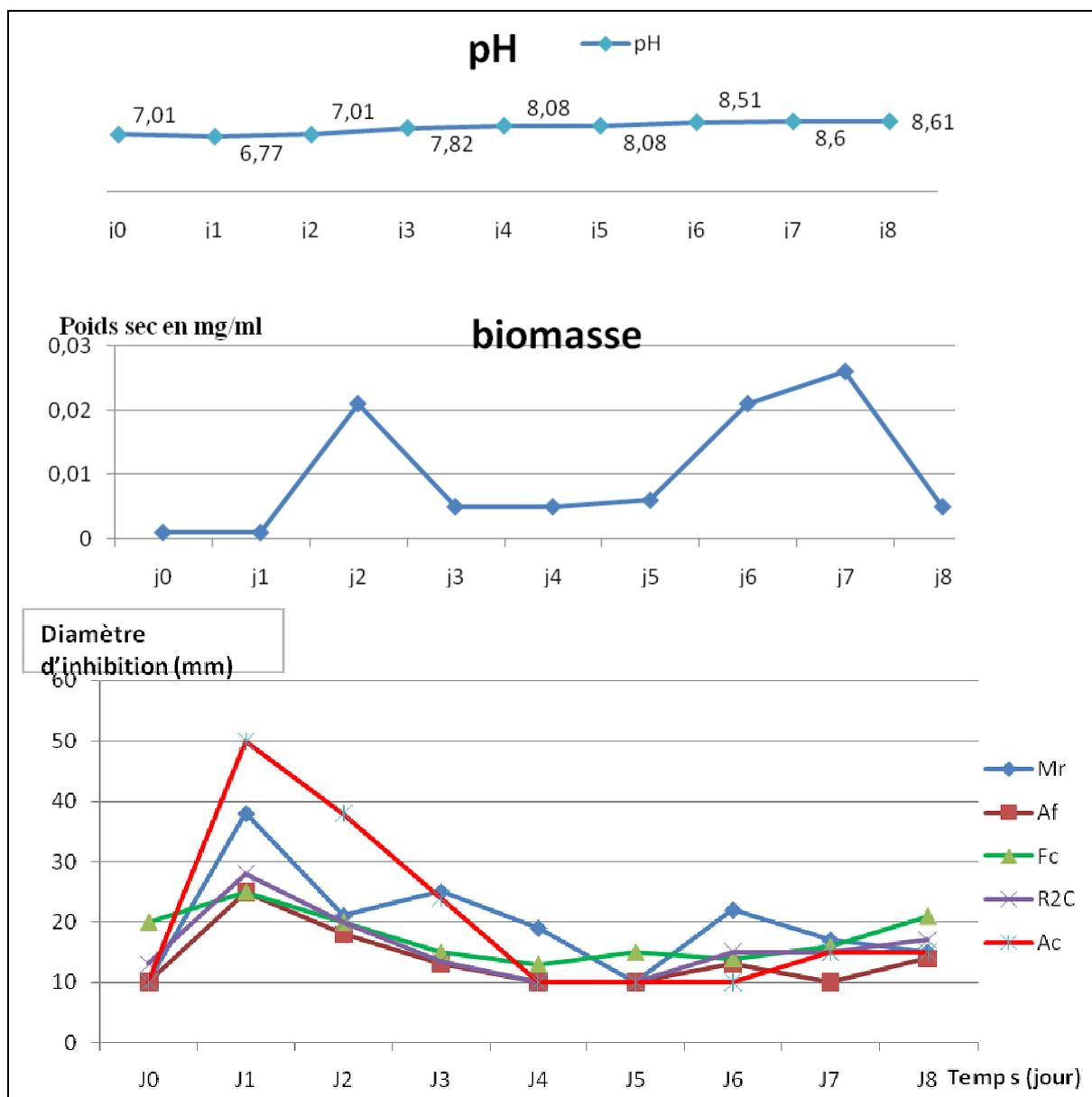


Figure 11 : Cinétiques de production des activités antifongiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche B31 en milieu liquide Bennett.

Note: la mesure des diamètres d'inhibition (en mm) est effectuée par la méthode des puits (y compris le diamètre du puits = 10 mm); Mr = *Mucor ramannianus*, Af= *A. flavus*, Fc= *F. culmorum*, R₂C= *A. ochraceus* et Ac= *A. carbonarius*.

III. Extraction des antifongiques et antibiographie

Une culture de la souche B31 (200ml à 30 °C et 250 rpm) a été réalisée pendant une durée correspondante au jour optimal de production des antifongiques dans chacun des milieux de culture testés. L'arrêt de la fermentation est effectué après 24h pour la culture dans le milieu Bennet et après 48 h pour la culture dans les milieux GYEA et SSB (au premier pic qui correspond à une activité antifongique à large spectre et une durée minimale d'incubation). Les filtrats de cultures sont récupérés à la fin de la durée d'incubation optimale puis sont utilisés pour l'extraction des antifongiques sécrétés dans les milieux de culture par la souche B31. L'extraction a été réalisée par trois solvants organiques de polarités différentes (dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) à raison de 60 ml de filtrat de culture par solvant (volume/volume).

Les extraits organiques obtenus ont été concentrés à sec, puis récupérés dans un minimum de méthanol pour tester leur activité antifongique par la méthode des disques de papier (10 µg par disque) contre *A. carbonarius* qui est le germe le plus sensible aux antifongiques produits par la souche B31.

Les résultats de l'antibiographie montre que l'acétate d'éthyle est le solvant qui a donné de meilleurs résultats pour les milieux SSB et Bennett suivie du *n*-butanol, puis de dichlorométhane. Cependant, aucun des solvants testés n'a permis d'extraire les antifongiques de la souche B31 à partir du milieu GYEA (Figures 12 et 13).

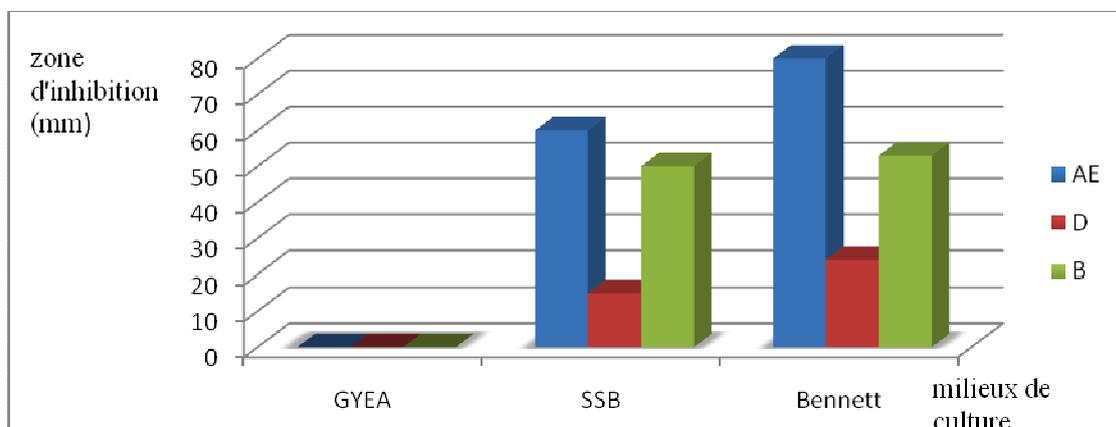
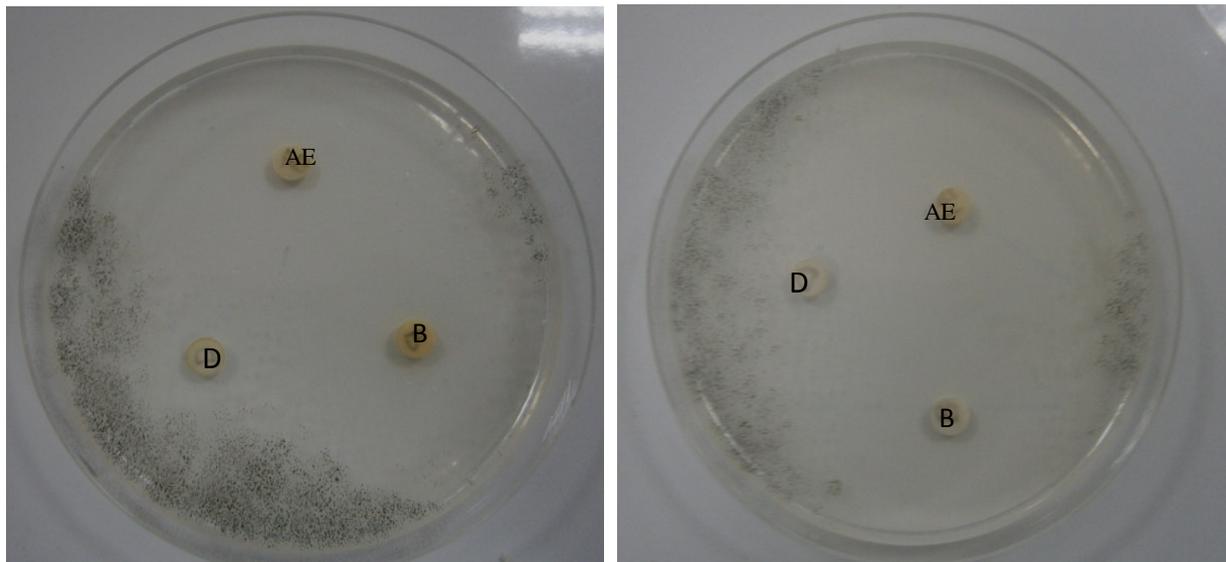


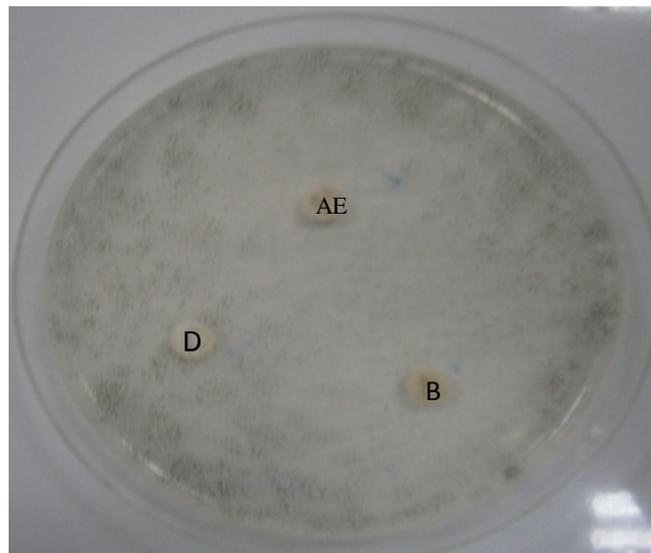
Figure 12 : Activité des extraits organiques de la souche *Streptomyces*sp.B31

Note : **B:** *n*-butanol; **AE:** acétate d'éthyle; **D:** dichlorométhane



Extraits bruts du milieu Bennett

Extraits bruts du milieu SSB



Extraits bruts du milieu GYEA

Figure 13 : Activités antifongiques des extraits organiques testées par antibiographie.

Note : **B:** *n*-butanol; **AE:** acétate d'éthyle; **D:** dichlorométhane

IV. Détection des polyènes dans les extraits bruts

Les extraits les plus actifs (à l'acétate d'éthyle et au butanol) ont été analysés par spectroscopie UV-visible afin de détecter la présence éventuelle des polyènes. Les spectres obtenus (Figure 14) sont exempts des pics d'absorption caractéristiques des polyènes, ce qui indique que les activités antifongiques produites par la souche B31 ne sont pas de nature polyénique (Figure 14).

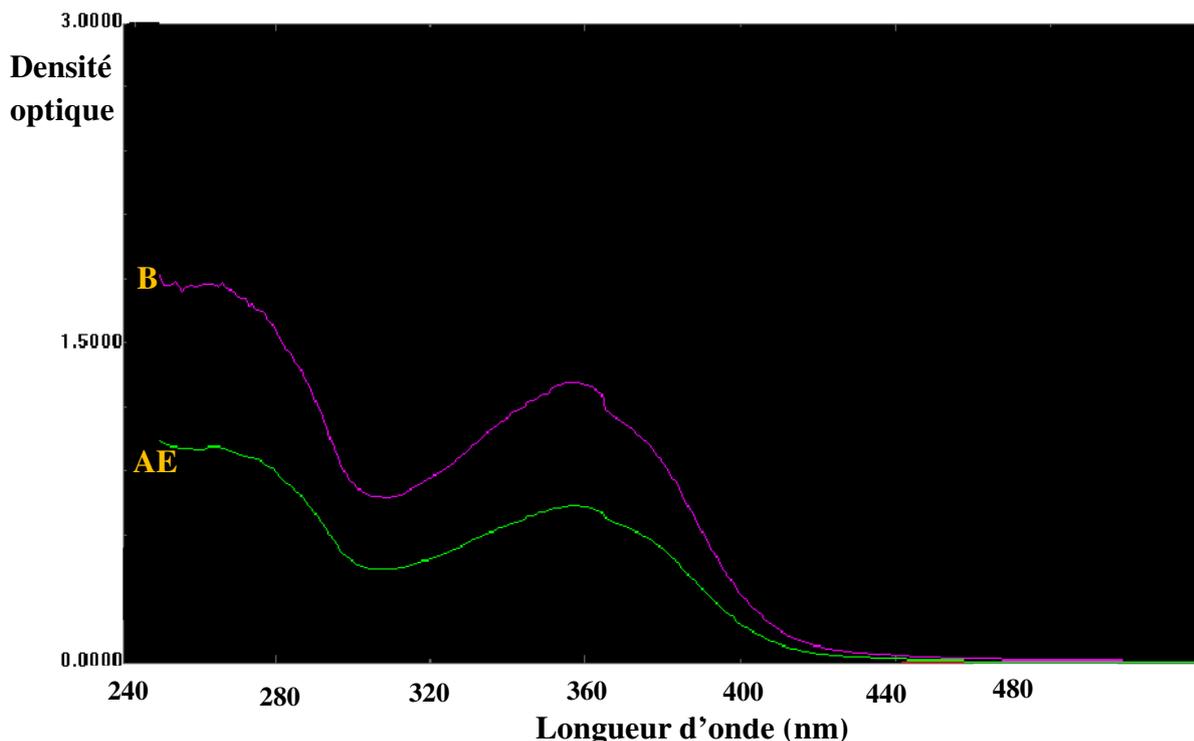


Figure 14 : Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'extrait brut d'acétate d'éthyle et du *n*-butanol de la souche B31.

V. Purification par HPLC des antifongiques de la souche B31

L'extrait à l'acétate d'éthyle provenant du filtrat de culture de milieu Bennett a été concentré au rotavapor puis repris dans du méthanol avant qu'il soit injecté dans l'HPLC. Cette extrait est fractionné en 10 pics majoritaires (Figure 10 et Tableau 8) dans les conditions de l'HPLC que nous avons utilisé (220 nm, débit de 1 ml/min, gradient de phase mobile de 40 à 100 méthanol-eau pendant 45 min).

Les fractions correspondant à chacun des pics recueillies séparément, évaporées, reprises dans 100 µl de méthanol et testées entièrement par antibiographie (disque en papier de 6 mm de diamètre)

contre *Aspergillus carbonarius*. Les fractions 2, 3, 6 et 7 présentent des activités variables Les fraction 1 et 10 sont inactives (Figure 15, Tableau 9).

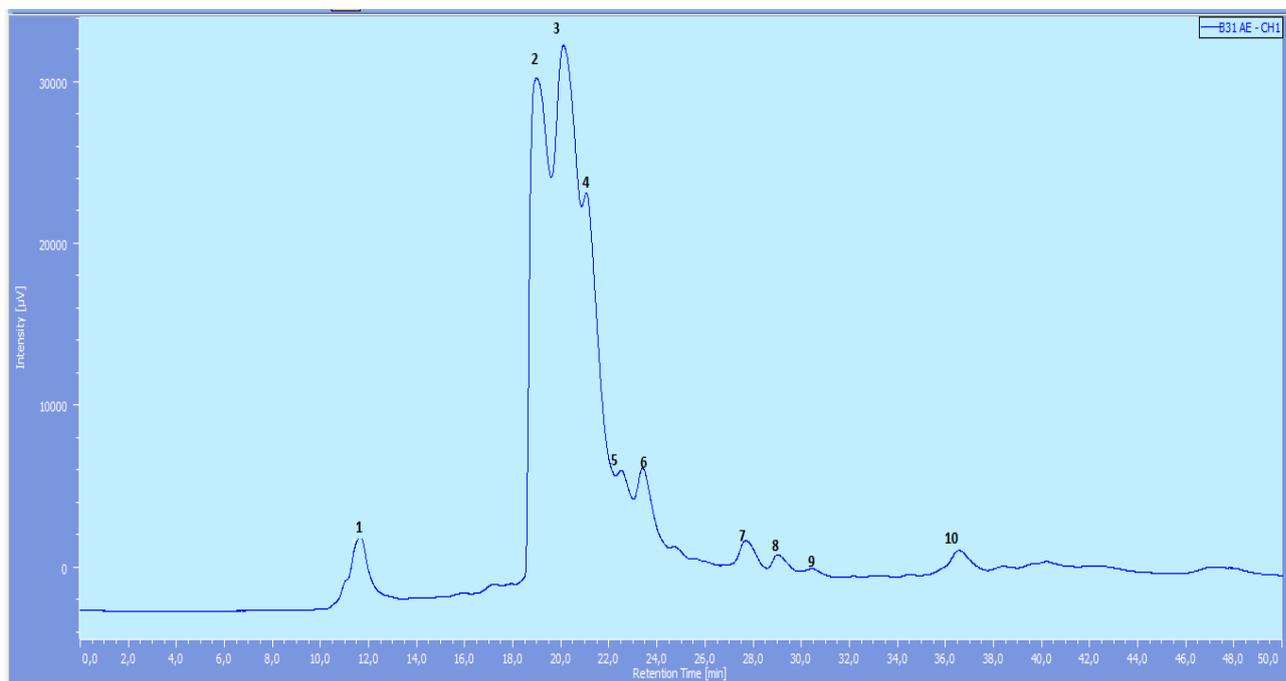


Figure 15 : Profil d'élution en HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat B31

Tableau 9 : Couleurs et activité des pics obtenus par HPLC après une injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche B31

Pics	Couleur après addition de 100 µl de méthanol	Temps de rétention	% H2O / MeOH	Zone d'inhibition (mm)
1	Non coloré	11	42 - 58	00
2	Jaune clair	18,5	29,2 - 70,8	60
3	Brun jaunâtre	19,52	26,2- 73,8	10
4	Jaune clair	21,2	24,2 - 75,8	00
5	Jaune pâle	21,5	21,8 - 78,2	00
6	Jaune pâle	23,5	20,6 - 79,4	20
7	Non coloré	27,5	13,3 - 86,7	32
8	Non coloré	28,7	11 - 89	00
9	Non coloré	30,5	8,6 - 91,4	00
10	Non coloré	36	0,0 - 100	00

Discussion

Le pouvoir antifongique de la souche *Streptomyces* sp. B31 a été évalué contre 20 champignons tests, dont 19 sont producteurs de mycotoxines (champignons mycotoxinogènes), sur 4 milieux de culture complexes en utilisant la méthode des stries croisées. Cette souche a montré des activités variables selon le germe cible et selon le milieu de culture utilisé. Les distances d'inhibition obtenues sont le résultat d'un antagonisme exercé par les molécules à activité antifongique produites par la souche *Streptomyces* sp. B31 et ayant diffusé dans le milieu de culture. Ce phénomène est communément appelé: antibiose (Baker et Cook, 1974).

Plusieurs travaux rapportent le potentiel antagoniste des souches d'actinomycètes nouvellement isolées (Belghit, 2010; Toumatia, 2010; Khebizi, 2010; Smaoui, 2010; Boudjella, 2007; Kitouni, 2007; Badji, 2006; Belkacem, 2012). L'analyse comparative de leurs résultats nous permet de considérer nos résultats comme très appréciables.

Il est connu que la composition du milieu de culture peut avoir un impact important sur la production de métabolites secondaires chez les microorganismes. Cette production de métabolites dépend principalement de la nature des sources de carbone et d'azote dans le milieu de culture, ainsi que la disponibilité de différents précurseurs. En général, la variation des paramètres de cultures offre des possibilités de modifications des voies de biosynthèse et la disponibilité en précurseurs, aboutissant ainsi à la production des nouvelles molécules (Waites *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2002). Dans ce contexte plusieurs travaux ont confirmé ces résultats (Badji, 2006; Boudjella, 2007; Driche 2010; Toumatia, 2010; Lamari, 2006). Les milieux de culture Bennett, SSB et GYEA ont montrés de bons résultats dans les travaux menés par Toumatia (2010), Belkacem (2012) et Meklat (2004) alors que contrairement aux résultats des travaux menés par Toumatia (2010), Lamari (2006) et Driche (2010) le milieu ISP2 n'as pas montré des résultats remarquables, ce que nous a poussé à l'éliminé de nos prochains tests de cinétique sur milieu agité.

La souche B31 est active contre tous les champignons tests utilisés et cela montre que cette souche produit des antifongiques à spectre large. La différence dans la sensibilité des germes tests aux antifongiques de la souche B31 montre que cette souche produit probablement plusieurs complexes d'antifongiques. Le nombre de champignons sensibles aux antifongiques produits par la souche *Streptomyces* sp. B31 varie entre 12 sur le milieu ISP2 et 19 sur le milieu Bennett. Les résultats obtenus sont surtout d'ordre qualitatif puisqu'ils donnent une idée sur l'activité antagoniste de la souche. Ils permettent cependant, d'orienter la suite du travail notamment lors du passage à la production en milieu liquide (Velho-Pereira et Kamat, 2011; Larpent et Sanglier, 1989). En effet, à partir de ces résultats, nous retenons cinq souches de champignons comme germes cibles pour la suite du travail: *Mucor ramannianus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus ochraceus* R2C et *Aspergillus carbonarius* les plus sensibles à l'activité antifongique de la souche B31.

Les cinétiques de croissance et de production des antifongiques ont été menées en conditions liquides en agitation sur trois milieux complexes: Bennett, SSB et GYEA qui ont déjà été utilisés pour ce genre d'étude dans le laboratoire LBSM et sont connus pour être favorables à la production d'antibiotiques (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007; Toumatia, 2010; Meklat, 2004; Belkacem, 2012). La souche *Streptomyces* sp. B31 présente des courbes de croissance différente d'un milieu à un autre. Elle présente sur le milieu SSB une courbe de croissance "classique" avec les différentes phases bien différenciées avec absence d'une phase de déclin à la fin du cycle et le début d'une autre phase exponentielle (phénomène de diauxie), dû à la consommation précoce des acides aminés de l'extrait de levure ajouté au milieu et que le glucose ne soit consommé en tant que source de carbone qu'au cours de la seconde phase exponentielle, ce phénomène est généralement observé dans les milieux comportant deux sources de carbone osidique, le glucose et le lactose ou galactose ou xylose (Monod, 1942; Prescott *et al.*, 2002; Euzéby, 2010). Sur le milieu GYEA la courbe de croissance ne comprend pas de phase stationnaire entre la première et la deuxième phase exponentielle, ce deuxième pic de croissance est appelé communément croissance cryptique, celle-ci a été déjà

signalée chez plusieurs microorganismes, notamment les entérobactéries (Prescott *et al.*, 2002) ou encore chez des *Streptomyces* (Toumatia, 2010; Driche, 2010). Cette croissance cryptique s'explique par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin. En milieu Bennett on rencontre aussi une croissance cryptique représentée dans la courbe de croissance.

Le pH évolue, dans tous les milieux de culture utilisés, de la même manière et avec une vitesse constante pour atteindre des valeurs basiques. Cette évolution serait due à la dégradation de sources azotées organiques tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure, qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier induit la basification du milieu. De telles constatations ont été énoncées par Strub (2008) pour expliquer l'augmentation du pH par l'apparition des ions d'ammonium dans la culture de *Saccharothrix algeriensis* lors de la croissance et de la synthèse des antibiotiques dithiolopyrrolones.

Le début de la croissance bactérienne est accompagné par l'initiation de la production des antibiotiques. En général, la production des métabolites secondaires par les microorganismes a lieu durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinomycètes cette production peut avoir lieu même en phase exponentielle (Zitouni, 2005; Bajdi, 2006). En effet, la production des antifongiques par la souche *Streptomyces* sp. B31 a lieu durant les phases stationnaire et exponentielle dans chaque milieu de culture.

Les courbes de suivi des activités antifongique présentent deux à trois maxima. Ceci atteste donc de la production de plusieurs antifongiques ou complexes d'antifongiques qui seraient soit des dérivés proches, comme c'est souvent le cas, soit des groupes d'antifongiques différents. Dans le cas de la souche B31, un décalage dans les temps de productions maximales et dans le nombre de maxima est observé lors du suivi de l'activité antifongique contre les cinq germes cibles. Ceci suggère la production de plusieurs antibiotiques à spectres d'activité différents. Les mêmes constatations sont valables pour les trois milieux de culture. L'activité antifongique est mieux dans le milieu Bennett, ce

dernier à montré des résultats appréciables dans les recherches effectuées par plusieurs chercheurs (Toumatia, 2010; Belkacem, 2012; Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007; Driche, 2010).

D'après les résultats des tests d'activité des extraits organiques par antibiographie, un choix du meilleur solvant d'extraction de l'activité antifongique s'impose pour la souche B31. Ce choix repose sur deux paramètres:

- Le solvant doit extraire une bonne activité antifongique.
- Si possible, éviter les solvants très puissants, tel que le *n*-butanol qui extrait beaucoup d'impuretés causant ainsi des problèmes lors de la purification par HPLC comme l'ont d'ailleurs constaté plusieurs chercheurs (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Boudjella, 2007).

Les trois solvants d'extraction: *n*-butanol; acétate d'éthyle et le dichlorométhane ont très souvent été utilisés (Berdyet *al.*, 1987; Brycroft, 1988). Parmi ces solvants l'acétate d'éthyle a permis l'obtention de meilleurs résultats dans les milieux SSB et Bennett, quant au milieu GYEA aucune activité n'a été extraite par les trois solvants. Ceci est probablement dû à la nature hydrophile des antifongiques sécrétés dans le milieu GYEA.

La détection d'une structure polyénique dans les extraits organiques bruts, semi-purs ou purs, ou même directement dans les filtrats de culture, est facile grâce à la spectroscopie d'absorption en UV-visible. Celle-ci est une méthode physique très sensible et très pratique qui permet de détecter rapidement ce genre de molécules. Les polyènes (voir synthèse bibliographique) possèdent trois bandes d'absorption caractéristiques dues à la présence de plusieurs liaisons conjuguées (de 3 à 7) à des localisations précises entre 260 et 410 nm (Dinya et Sztaricskai, 1986). Le spectre d'absorption des extraits à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol produits par la souche B31 dans le milieu Bennett ne présente pas les 3 bandes d'absorption, ce qui indique que l'activité antifongique produite par cette souche n'est pas de nature polyénique. Ce résultat est intéressant, car les polyènes sont écartés des programmes de recherche pour de nouvelles molécules antifongiques en raison de leur toxicité élevée

envers les cellules animales (Yoshida *et al.*, 1990). Ce résultat encourage donc la poursuite du travail sur la caractérisation de ces molécules antifongiques, qui peuvent être utilisés dans plusieurs domaines telle que l'agriculture et aussi dans les industries alimentaires comme un bio-conservateur à l'exemple de la natamycine (voir revue bibliographique) parmi les quelques antibiotiques qui sont encore recommandés par FDA comme additif et classifiés comme un composé GRAS (Kiermeier 1973, Davidson et Doan 1993).

Plusieurs espèces d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant à des genres différents sont capables de sécréter de nombreux antibiotiques: une quinzaine ou plus chez *Saccharothrix* sp. SA103 (Zitouni, 2005) et *Saccharothrix algeriensis* SA233 (Lamari, 2006), plus d'une trentaine chez *Nonomuraea* sp. (Badji, 2006), au minimum quatre chez *Streptomyces* sp. AA1 (Toumatia, 2010) et trois chez *Streptomyces* sp. GB1 (Driche, 2010). En effet, les résultats de l'analyse HPLC de l'extrait brut du filtrat de culture de la souche B31 à l'acétate d'éthyle ont révélé la présence de quatre antifongiques différents ce qui confirme les résultats obtenus dans les cinétiques de production testés par la méthode des puits.

I. Matériel

1. La souche *Streptomyces* sp. B31

Nous avons utilisé la souche de *Streptomyces* B31 isolée par Melouh et Aïcha (2009) à partir d'un sol provenant de la région de Djelfa. Cette souche est caractérisée par une bonne croissance sur plusieurs milieux de culture à savoir: ISP2, ISP3, ISP4, SSB, GYEA et Bennett. Cette souche a une morphologie typique des *Streptomyces* de type S (spirale), elle possède un mycélium de substrat non fragmenté et un mycélium aérien contenant des chaînes spirales (6 à 8 tours) de 10 à 50 spores.

La souche B31 est capable d'utiliser le glucose, le fructose, le galactose, le mannitol, le raffinose, le rhamnose, la salicine, le saccharose, le xylose et l'amidon comme seule source de carbone mais elle n'utilise pas l'arabinose et l'inositole. Cette souche utilise l'histidine, la proline et la phénylalanine comme source d'azote et de carbone. Elle est résistante à la pénicilline mais sensible à la rifampicine. Elle ne dégrade pas la xanthine. Elle est capable de croître en présence de 7% (w/v) de NaCl et en présence de phénole mais incapable de croître en présence de 10% (w/v) NaCl et de l'azide de sodium. Cette souche ne produit pas de pigment mélanoides.

L'analyse de gène codant pour l'ARNr 16S a permis de la rattacher à *Streptomyces fradiae* avec un pourcentage de similarité de 99,56% (Meklat, travaux en cours).

La souche B31 a été conservée dans des tubes inclinée contenant le milieu ISP2 à 4°C.

2. Les champignons cibles

Les souches des champignons que nous avons utilisés comme germes cibles proviennent de sources différentes citées dans le tableau ci-dessous.

La majorité des champignons choisis on fait l'objet de l'évaluation de leurs potentiel mycotoxinogènes en particulier la production des aflatoxines et les ochratoxines, par les chercheurs ayant isolées ces champignons (tableau 7).

La souche de *Mucor ramaniannus* a été utilisée dans ce travail comme germe test modèle utilisé fréquemment dans le laboratoire de LBSM au cours des screening des activités antifongique.

Tableau 7 : liste des champignons cibles.

Sources des champignons	Champignons (codes)	Références
Les épices	<i>Aspegillus ochraceus R₂C_m</i>	Azoune (travaux en cours)
	<i>Aspegillus ochraceus R₂C</i>	
	<i>Aspegillus</i> section <i>Flavi R₂₅</i>	
	<i>Aspegillus</i> section <i>Flavi S₂O</i>	
Aliments de bétail et de volaille	<i>Aspegillus</i> section <i>Flavi AFB</i>	Bouti (travaux en cours)
	<i>Aspegillus</i> section <i>Flavi AFP</i>	
Céréales	<i>Aspegillus</i> section <i>Flavi (d₁)</i>	Zebiri (travaux en cours)
	<i>Aspegillus</i> section <i>Flavi (Af 37)</i>	
	<i>Aspegillus</i> section <i>Flavi (T₂)</i>	
	<i>Aspegillus ochraceus (Ao 19)</i>	
	<i>Aspegillus ochraceus (26)</i>	
	<i>Aspegillus carbonarius (AC)</i>	Riba, 2008
	<i>Aspegillus ochraceus (AO)</i>	
	<i>Aspegillus flavus (AF)</i>	
	<i>Aspegillus niger (AN)</i>	
	<i>Aspegillus parasiticus (AP)</i>	
	<i>Penicillium glabrum (PG)</i>	
	<i>Penicillium expansum (PE)</i>	
	<i>Fusarium culmorum (FC)</i>	
ND	<i>Mucor ramaniannus (Mr)</i>	Laboratoire LBSM

ND : non déterminé

3. Milieux de culture utilisés

3.1. Milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antifongique de la souche B31

Quatre milieux de culture ont été utilisés pour tester l'activité antifongique de la souche B31 contre plusieurs champignons. Le choix de ces milieux est basé sur les résultats obtenus par Meklat (2004), Toumatia (2010) et Belkacem (2012) qui ont montré l'efficacité de ces milieux de culture dans la stimulation de la production des antifongiques chez plusieurs souches d'actinobactéries.

3.1.1. Composition du milieu ISP2 « International *Streptomyces* Project 2 » (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glucose.....	4 g
Extrait de levure.....	4 g
Extrait de malt.....	10 g
Eau distillée.....	1000 mL

3.1.2. Composition du milieu Bennett (Warren et *al.*, 1955)

Glucose.....	10 g
Peptone.....	2 g
Extrait de levure.....	1 g
Extrait de viande.....	1 g
Eau distillée.....	. 1000 mL

3.1.3. Composition du milieu SSB « Soluble Starch Broth » (Bouras, 2006)

Amidon soluble.....	5 g
---------------------	-----

Glycerol.....	10 g
Extrait de levure.....	4 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,5 g
Eau distillée.....	1000 ml

3.1.4. Composition du milieu GYEA (Athalye *et al.*, 1981)

Extrait de levure.....	10 g
Glucose.....	10 g
Eau distillée.....	1000 mL

Note: Les milieux solides contiennent 18 g/l d'agar, le pH des quatre milieux est ajusté avant autoclavage à 7,2.

3.2. Milieu de culture pour la croissance des champignons

Le milieu PDA (Rapilly, 1969) a été utilisé comme milieu de croissance des champignons pour les tests des puits et les antibiogrammes.

Composition du milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar) (Rapilly, 1969)

Filtrat de pomme de terre	500 mL
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	500 mL
pH	6,5.

Le filtrat est préparé en mettant à bouillir 200 à 250 g de pomme de terre épluchée dans 500 mL d'eau distillée.

4. Appareil HPLC

L'appareil utilisé est de marque Jasco, équipé des éléments suivants:

- Une pompe (type PU-2080 plus) qui assure des débits de la phase mobile dans la colonne, de 0 à 1 mL/min.
- La phase mobile passe par un dégazeur automatique (type CS16150) lequel élimine toutes les bulles d'air très gênantes dans le processus de chromatographie.
- Un injecteur automatique comporte une vanne (type AS-2055 plus) d'une boucle de 100 μ L permettant d'injecter un volume bien déterminé de l'échantillon.
- L'échantillon injecté traverse une colonne C 18 (type Uptisphère), en phase inverse (silice greffée avec 18 atomes de carbone), dont les dimensions sont les suivantes: longueur de 300 mm, diamètre de 7,8 mm, et une granulométrie de 15 μ m)
- Après leur sortie de la colonne, les produits sont détectés par un détecteur UV-visible (type UV-1575) à longueur d'onde de 220 nm. A cette longueur d'onde tous les composés organiques sont détectés.
- Les résultats sont enregistrés par un ordinateur de la marque hp sous forme d'un profil chromatographique grâce à un logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données (type *ChromNAV*)

5. Autres matériel : voir annexe

II. Méthodes

1. Mise en évidence de l'activité antifongique de la souche B31 par la technique des stries croisées

L'activité antifongique de la souche B31 est évaluée par la méthode des stries croisées sur les milieux ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966), Bennette (Warren *et al.*, 1955), SSB (Bouras, 2006) et GYEA (Athalye *et al.*, 1981). Cette méthode consiste à ensemercer la souche d'actinomycète en un seul trait à la surface du milieu solide et en bordure de la boîte de Pétri (diamètre = 9 cm).

Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les souches-cibles sont ensemençées perpendiculairement à l'actinomycète. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures de la souche-cible et de la souche d'actinomycète, après 36 à 48 h d'incubation (Figure 1).

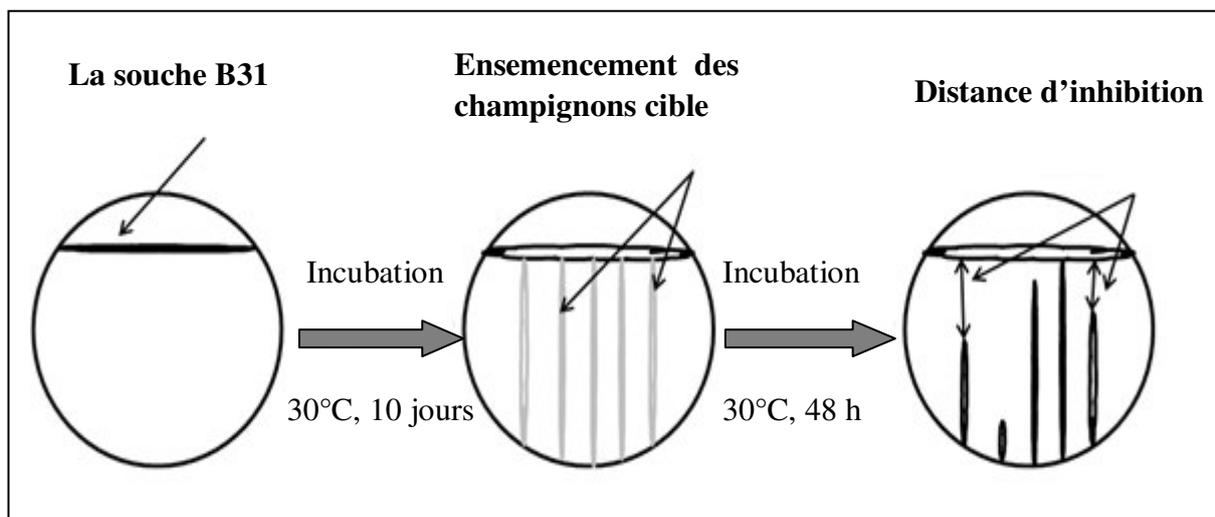


Figure 1. Schéma représentatif de la méthode des stries croisées (Belkacem, 2012).

2. Cinétique de production des antifongiques en milieux liquides

La cinétique de production des antibiotiques a été réalisée en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées et de comparer cette production entre les milieux de culture sélectionnés (SSB, GYEA et Bennett).

2.1. Pré-cultures

Pour obtenir les pré-cultures, les spores sont raclées à partir d'une culture en boîte de Pétri de la souche d'actinomycète âgée de 10 jours, et inoculés dans des Erlenmeyers contenant 50 mL de chaque milieu désiré à utiliser par la suite. Après 48 h d'incubation dans un agitateur (250 rpm; 30°C), les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production.

2.2. Cultures

Des Erlenmeyer de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu (pH 7,2) sontensemencées avec 3 mL de la pré-culture. Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 250 rpm dans un agitateur. Des prélèvements sont effectués toutes les 24 h pendant 8 jours pour être analysés. L'évolution de l'activité antifongique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement.

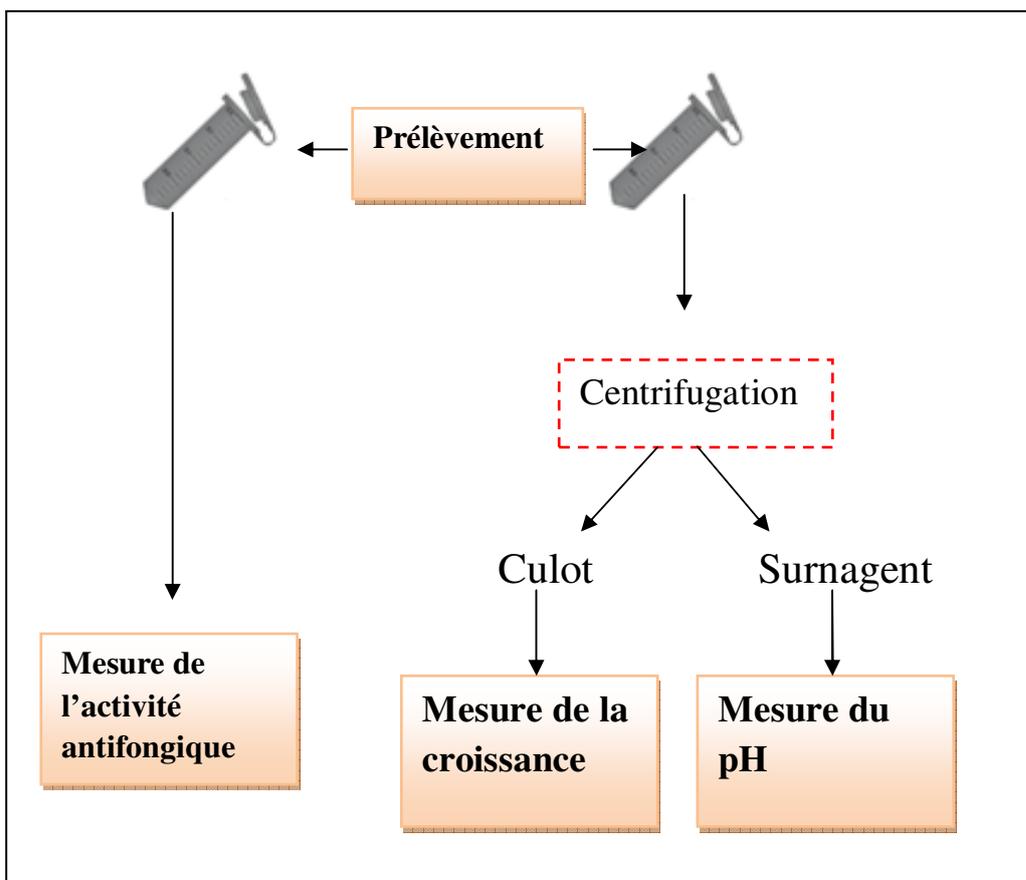


Figure 2 : schémas descriptive des étapes de la cinétique de la production des antifongiques

2.3. Mesure de l'activité antifongique

L'activité antifongique est déterminée par la méthode de diffusion des puits (Ericsson et Sherris, 1971; Parente *et al.*, 1999) contre les champignons les plus sensibles suivant les résultats de la méthode des stries croisées: *Mucor ramanianus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium culmorum* et *Aspergillus carbonarius*.

Dans cette méthode on utilise le milieu PDA (contenant 13 g/L d'agar) en surfusion est préensemencé avec le germe-cible avant d'être coulé en boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Une quantité de 0,2 mL de surnageant de culture à analyser, est prélevée stérilement puis introduite dans le puits. Les boîtes de Pétri sont mises 2 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits après 48 h.

2.4. Mesure de la croissance et du pH

L'évolution de la biomasse durant la fermentation est estimée selon la méthode de (Pfefferle *et al.*, 2000). Pour cela, 1.5 mL de culture sont prélevés tous les 24 h puis centrifugés à 6000 g dans des tubes Eppendorf préalablement tarés. Le surnageant est récupéré et va servir pour suivre l'évolution du pH du milieu grâce à un pH mètre. Le culot (biomasse) dans les tubes est ensuite séché à 100°C durant 24 h puis pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare.

3. Production et extraction des substances antifongiques

La production des antifongiques est réalisée dans des Erlenmeyer de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu de production. Pour cela, 200 mL des milieux SSB, GYEA et Bennett sont inoculés par les pré-cultures (à raison 3 mL de la pré-culture). Les cultures sont incubées dans les conditions optimales de production (durée d'incubation, agitation et température 30°C, 225rpm)

Les activités antifongiques sont extraites à partir du filtrat de culture selon les étapes décrites dans la Figure 3.

La culture est d'abord centrifugée (10 min, 6000 g) puis filtrée, de manière à séparer le filtrat de culture du mycélium. Une extraction liquide-liquide en ampoules à décanter est effectuée pour le filtrat de culture. Ce type d'extraction nécessite le choix d'un solvant organique non miscible à l'eau. Trois solvants de différentes polarités sont testés: le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol.

Le filtrat de culture est mesuré et partagé sur trois (à raison de 60 mL), on rajoute à chacun de ces volumes un volume égal des solvants cités avant, puis agité doucement quelques secondes avec dégazage de temps à autre.

Après décantation et séparation des deux solutions, la phase organique est récupérée, filtrée sur du papier filtre (Whatman n° 1) contenant une couche de sulfate de sodium anhydre, qui permet d'éliminer les contaminants hydrophiles et les traces d'eau résiduelles, puis évaporée à sec dans des ballons à l'aide d'un rotavapeur. Les extraits bruts obtenus sont repris dans un minimum de solvant (méthanol ou dichlorométhane) et transférés dans des piluliers préalablement tarés, puis séchés sous hotte par un séchoir. La masse des extraits secs a été déterminée après soustraction du poids de la tare.

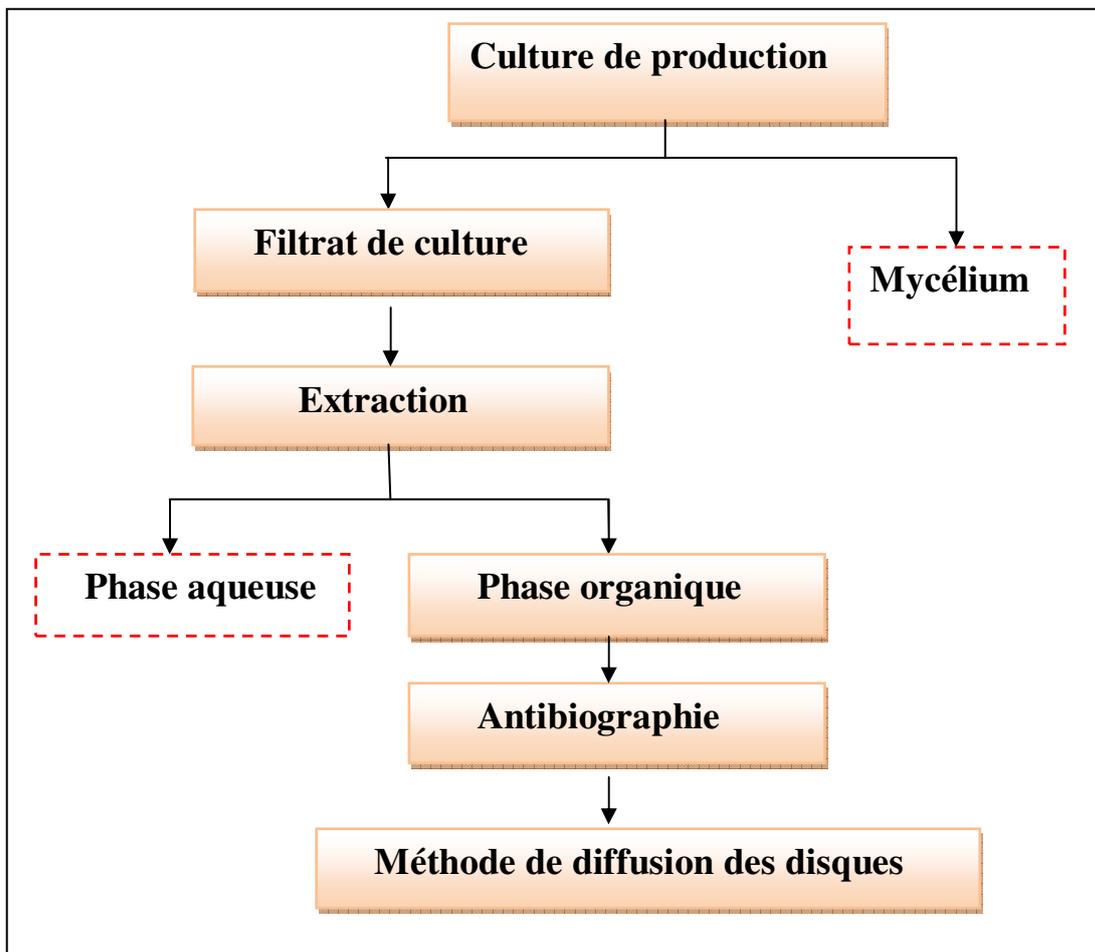


Figure 3 : schéma descriptive des étapes d'extraction et de mesure des activités antifongique

4. Méthode de diffusion des disques de papier

L'activité antifongique des extraits de la phase organique a été évaluée par la méthode de diffusion des disques de papier (Bauer *et al.*, 1966). Pour cela, les extraits à tester de la phase organique sont redissouts dans des volumes de méthanol ou le dichlorométhane qui nous permis d'obtenir la concentration de 10 µg/µL, puis des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés avec 100 µL de chaque extrait (10 µg de chaque extrait/disque, la CMI des antifongiques commercialisés est de cet ordre selon Aouiche (2012). Ils sont séchés pour faire évaporer le solvant, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 30 mn. Les disques imprégnés sont ensuite déposés stérilement à la surface du milieu PDA (13g/L d'agar), pré-ensemencé avec les champignons-cibles. Les boîtes de Pétri sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion de l'activité antibiotique dans le milieu de culture, avant d'être incubées à 30°C pendant 48 h. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

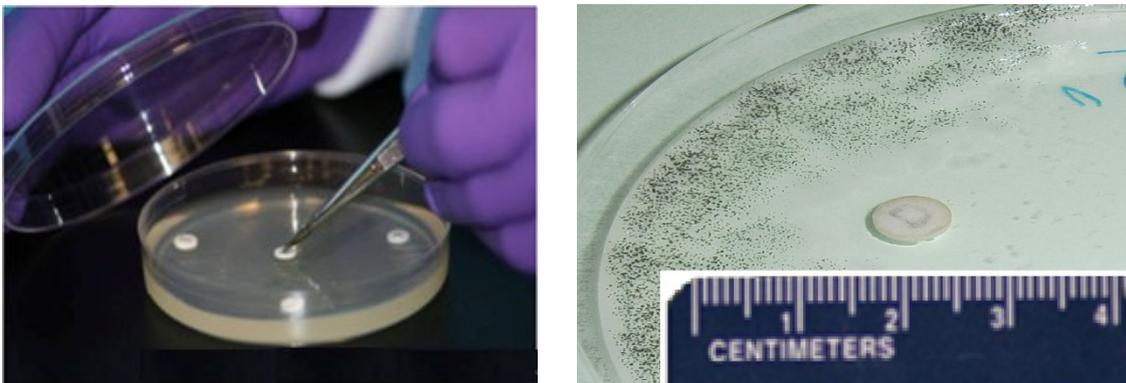


Figure 4: Photographies montrant le dépôt des disques imprégnés sur le milieu de culture (photo à gauche) et la lecture du résultat (photo à droite).

5. Analyse par spectroscopie UV-visible

L'étude spectroscopique dans l'UV-visible permet d'avoir un aperçu général sur le produit obtenu. Les spectres obtenus nous renseignent sur le degré de saturation des molécules (présence ou non de doubles liaisons). Le spectre UV-visible est déterminé pour les extraits bruts actifs obtenus à partir de meilleur milieu de production afin de noter la présence ou non de polyènes.

L'extrait est solubilisé dans du méthanol puis analysé à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU UV 260, précédemment étalonné avec du méthanol. Un balayage de l'absorbance a été réalisé entre 240 et 460 nm (intervalle d'absorbance des polyènes).

6. la purification de l'antibiotique par HPLC

Les antifongiques de la souche B31 ont été produits dans le milieu de culture qui a donné de meilleurs résultats de point de vue activité biologique, ensuite ils ont été extraits avec le meilleur solvant d'extraction. L'extrait obtenu a été analysé par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) semi-préparative dans le but de séparer les différentes fractions qui composent l'extrait brut.

Les conditions de purification ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires.

Le débit d'élution utilisé est fixé à 1 mL/min et la température de la colonne à 30°C. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 10 min. Lorsque la colonne est équilibrée, 20 µL de l'échantillon de l'extrait du filtrat de culture ultra-filtrés à l'aide d'un filtre de 0,2 µm puis injectés et analysés. Le gradient utilisé est linéaire et continu pendant 35 min, de 40 à 100% méthanol/eau et la détection des antifongiques a été réalisée à 220 nm (à cette longueur d'onde tous les composés sont détectés). Une phase de lavage de la colonne à 100 de méthanol et programmé à la fin de l'élution des fractions et cela pendant 5 min.

Les différentes fractions récoltées sont concentrées, séchées par rotavapeur puis testées par antibiographie contre *Aspergillus carbonarius*.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antifongique de la souche *Streptomyces* sp. B31, et la nature de ces antifongiques dans le but de trouver de nouvelles molécules qui peuvent être utilisés comme des additifs alimentaire en présent.

Dans une première partie du travail, nous avons déterminé le spectre d'activité de la souche en milieu solide par la méthode des stries croisées, une méthode de criblage communément utilisée par les chercheurs comme étape préliminaire à la recherche de souches productrices de nouvelles molécules antibiotiques. Les résultats de ce test d'antagonisme ont montré que la souche B31 présentait une bonne activité contre les *Aspergilli*, les *Penicillia*, les *Fusaria* et *Mucor*. Ces résultats nous ont permis également de sélectionner cinq souches de champignons à utilisés comme cibles pour l'évaluation de la production d'antifongiques en milieux de cultures liquide, et aussi d'éliminé le milieu ISP2 qui n'a pas donné des bon résultats.

Dans une deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de meilleurs milieux de culture pour la production des antifongiques par la souche *Streptomyces* sp. B31. Pour cela, les cinétiques de croissance et de production sont réalisées avec trois milieux de culture: SSB, GYEA et Bennett dans des conditions expérimentales identiques. Le but est de rechercher un milieu de culture favorable à la production d'antibiotiques antifongiques.

Les résultats de ces cinétiques nous ont permis de définir le milieu de culture favorable à la production d'antifongiques: le milieu complexe Bennett.

Afin de confirmer le choix du milieu et de sélectionner le meilleur solvant organique pour l'extraction des antifongiques produits par la souche B31, des cultures ont été réalisées dans les trois meilleurs milieux et dans les mêmes conditions. L'extraction a été réalisée par trois solvants organiques : *n*-butanol, acétate d'éthyle et dichlorométhane en ampoules à décanter. Les différents extraits obtenus sont concentrés et analysés par antibiographie, ceci est pour mesurer l'activité antifongique produite. Parmi les extraits testés, celui à l'acétate d'éthyle est le plus actif. La

comparaison des résultats obtenus avec le milieu Bennett et les deux autres milieux de culture et en tenant compte des valeurs des diamètres d'inhibition, nous pouvons conclure que le milieu Bennett est le meilleur milieu de culture. L'acétate d'éthyle a été désigné comme le meilleur solvant d'extraction.

En suite, nous avons voulu savoir si les activités antifongiques produites étaient de nature polyénique ou non. Pour cela, l'extrait actif à l'acétate d'éthyle a fait l'objet d'une analyse par spectrophotométrie UV-visible. Le spectre obtenu a permis de conclure que les activités antifongiques produites par la souche *Streptomyces* sp. B31 ne sont pas polyéniques, autrement dit, les antifongiques produits par cette souche ne sont pas toxiques à l'homme, ce qui permet de penser à les utiliser dans le domaine de l'industrie alimentaire comme additifs ou bio-conservateurs.

A la fin de ce travail, nous avons réalisé une purification par HPLC de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle du filtrat de culture sur milieu Bennett. Le profil HPLC a révélé 10 pics, quatre d'entre eux se sont montrés actifs après test d'antibiogramme.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que la souche *Streptomyces* sp. B31 produit des activités antifongiques intéressantes et appréciables. Notre étude a permis de sélectionner le meilleur milieu de culture pour la production des antifongiques. Nous avons également dévoilé la nature non polyénique des antifongiques de cette souche. Ainsi, ils peuvent faire l'objet de plusieurs applications à l'échelle pharmaceutique, agronomique ainsi qu'à l'échelle alimentaire.

Nous pouvons également conclure que ce travail ne représente qu'une étude préliminaire sur la production des antifongiques par la souche B31. Les résultats nous ont cependant permis de dégager quelques pistes de recherche. En effet, il serait intéressant dans le but de déterminer les conditions de culture optimales de production d'antifongiques par notre souche, en perspective du travail:

- De tester d'autres milieux de culture.
- D'optimiser des paramètres culturels en testant différentes concentrations de chaque source nutritionnelle.

- D'étudier l'effet du pH, de la température, de l'agitation et de l'aération.

D'autre part, il serait important aussi

- D'étudier la production d'antibiotiques antibactériens synthétisés par cette souche
- D'essayer l'activité antifongique de la souche B31 sur les plantes souffrantes des maladies fongique peu étudiées l'efficacité de ce produit dans le domaine de l'agronomie.
- D'étudier les structures chimiques des produits actifs de la souche B31.

Un tel travail d'optimisation permettra d'obtenir des rendements de production élevés notamment en fermenteur, aussi d'identifier les antifongiques produits par la souche B31 et les utiliser dans plusieurs domaines.

A

Abou-Zeid A.A. and Abou-el-Atta A.Y. (1971). *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd, Infectionskr. Hyg., Abt.*, **126**, 371-377.

AFSSA (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments), (2006). -Evaluation des risques liés a la présence de mycotoxines dans les chaines alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique 181p.

AFSSA (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments), (2003). Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique.

Aghighi, S., Bonjar G.H.S., Rawashdeh R., Batayneh S. and Saadoun I. (2004). First report of antifungal spectra of activity of iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian J. Plant Sci.*, **3**, 463-471.

André J. M. and Leroy G. (2004). All-electrons band structure of polyene. *Int. J. Quantum Chem.* **5** (5), 557-563

Andriole V.T. (1998). Current and future therapy of invasive fungal infections. *In: Current clinical topics in infectious diseases.* Remington G. and Swartz M. (Eds.). Vol. 18. Balckwell Sciences. Malden, pp. 19-36.

Andriole V.T. (2000). Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **16**, 317–321.

Andriole V.T. (1999). Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J. Antimicro. Chemo.*, **44**, 151-162.

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

Ayalew. A, Fahraman. H, Lepsch. J, Beck. R, Abate. D, (2006). Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia, *Mycopathologia*, 162(1), 57-63.

B

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

Baginski M., Sternal K., Czub J., Borowski E. (2005). Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim. Polon.* **52** (3), 655–658.

Baltimore, 657-881

Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turk M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493-496.

Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turk M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493-496.

Belghit S., (2010). Recherche dans les sols sahariens algériens d'actinomycètes producteurs de molécules actives contre *Candida albicans*. Mémoire de Magister de l'ENS de Kouba, 90 p

Belkacem (2012). Evaluation de la production d'antibiotiques antifongiques par une souche saharienne de *streptomyces (actinomycetale)* dans différents milieux de culture

Bérdy J. (2004). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.*, **58**, 1–26. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2004).** Vol. 4. Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 401.

Berdy J., Aaszalos A. and McNitt K.L. (1987). CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol 13. Microbial metabolites. part 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.

Botton B. (1990).- Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2ème ed. Masson ed, Paris. 1990.

Boudjella H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des Streptosporangium des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique El-

Boulahbal F., (2006). Microbiologie S1 clinique. OPU, Alger, 134 pp.

Bourais Ihame et Amine Aziz (1996). Méthodes officielles d'analyse des aflatoxines : AOAC Official Methods of Analysis (1995) Natural Toxins. Chapter 49.

Bouras N. (2006). Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme and Microbial Technology.*, **39**, 1423–1429.

Brautaset T., Sekurova O.N., Sletta H., Ellingsen T.E., Strom A.R., Valla S. and Zotchev S.B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.*, **7**, 395-403. Harrach.188p

Buchanan R. (1917). *In*: Gottlieb D.: Order I The Actinomycetales. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds). Williams and Wilkins Co.

C

Chotia Youssouf (1999). Les principales mycotoxines rencontrées en agroalimentaire et leurs facteurs de production.

Cook, R. J. and Baker, K. F. (1983) *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society, St Paul, 539 pp

Currie, D. C., Lueck, C., Milburn, H. J., Harvey, C., Longbottom, J. L., Darbyshire, J. H., Nunn, A. J. And Cole, P. J., 1990. Controlled trial of natamycin in the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Thorax*, **45**, 447–450.

D

Davidson, P. M. And Doan, C. H., 1993. Natamycin. In: *Antimicrobials in Foods* (P. M. Davidson and A. L. Branen, Editors), pp. 395–407. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel and Hong Kong.

Deacon J.W. (1984) – Introduction to modern mycology. (Wilkinson J.F., Eds) Blakwell Scientific Publications Inc. California, USA. Vol. 7, 2nd edition., 239p

Dessin h. 1993. Contamination fongique et mycotoxique d'aromates et de condiments du commerce. Thèse d'état, Faculté

Dinya Z.M., Sztaricskai F.J. (1986). Ultraviolet and light absorption spectrometry. *In: Modern analysis of antibiotics*. Aszalos A. (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 19-96.

Dinya ZM, Sztaricskai FJ. Ultraviolet and light absorption spectrometry, (1986). In: Aszolas A, editor. *Modern analysis of antibiotics*, editor. New York: Copyright by Marcel Dekker,

Driche E.H., (2010). Recherche de *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes pour l'Homme multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister de l'ENS de Kouba, Alger, 121 p.

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

Drouhet E., Dupont B. (1987). Evolution of antifungal agents: past, present and future. *Rev. Infect. Dis.*, **9**, 4-16. de pharmacie de Dijon.

Inc.; p. 19–96.

E

Ericsson J.M., Sherris J.C. (1971). Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **217** (1), 1-90.

Euzéby J.P. (2010). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesa.html>

Euzéby J.P., (2012). List of prokaryote names with standing in Nomenclature- Genus *Streptomyces*, <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesa.html>

G

Groll A.H., Sein T., Petraitis V., Petraitiene., Callender D., Gonzalez C.E., Giri N., Bacher J., Piscitelli S. and Walsh T.G. (1998). Compartmental Pharmacokinetics and Tissue Drug Distribution of the Pradimicin Derivative BMS 181184 in Rabbits. *Am. Soc. Microbiol.*, **42**, 2700-2705.

Gunnarson N., Bruheim P. and Nielson J. (2004). Production of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* sp. ATCC 39727: Influence of medium composition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30** (3), 150-156.

Gupta, A., Sharma, A., Mohan, K. And Gupta, A., 1999. Mycotic keratitis in non-steroid exposed vernal keratoconjunctivitis. *Acta Ophthalmol Scand.*, **77**, 229–231.

Gupte M., Kulkarni P. and Ganguli B. N. (2002). Antifungal antibiotics. Mini-Review. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 46–57.

I

Iwasa T., Yamamoto H., Shibata M. (1971) Studies on validamycins, new antibiotics. I. *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* nov, validamycin-producing organism. *J. Antibiot.* 23, 595-602.

J

Jay, J.M. 1983. Antibiotics as food preservatives. In *Food Microbiology*, ed. A.H. Rose, 117–143. New York: Academic Press.

JECFA Comité mixte experts FAO/OMS Additifs alimentaire (2002)

K

Kellal. Z. (1992). L'organisme humain face aux agressions. Sous thème : nutrition. L'agression alimentaire.

Khebizi. N., (2010). Taxonomie et activités antimicrobiennes de souches d'actinomycètes d'origine saharienne. Mémoire de Magister en Microbiologie de l'ENS de Kouba, Alger, 127 p.

Kiermeier, F., 1973. Zum Einsatz von Pimaricin zur Verhinderung der Schimmelpilz Entwicklung auf Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **151**, 179–186.

Kimura K., Bugg T.D.H. (2003). Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 252-273.

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. Thèse de Doctorat de l'Université de Constantine, 176 p.

Knopik-Skrocka A., Bielawski J., Glab M., Klafaczynska A., Wulkiewicz M. (2003). A kinetics study of pig erythrocyte hemolysis induced by polyene antibiotics. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **8**, 439-454.

Kobayashi GS, Medoff G. (1977). Antifungal agents: recent developments. *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**:291–308.

Koopmans, M., and Duizer, E., (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *Int.J. Food Microbiol.* 90:23–41.

L

Lamari. L, (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*

Larpent J.P. et Sanglier J.J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Edition Masson, 496 p.

Lee L. S, dunn J.J, Delucca A.J, Ciegler A (1981). Role of lactone ring of aflatoxin B1 in toxicity and mutagenicity. *Experientia*, **37**, 16-17.

Levinskas, G. J., Ribelin, W. E. and Shaffer, C. B., 1966. Acute and chronic toxicity of pimaricin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **8**, 97–109.

Liao G., Li J., Li L., Yang H., Tian Y., Tan H. (2009). Selectively improving nikkomycin Z production by blocking the imidazolone biosynthetic pathway of nikkomycin X and uracil feeding in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microb. Cell Fact.*, **8**, 61.

Liu C.M., McDaniel L.E., Schaffner C.P. (1975). *Antimicro. Agents Chemother.*, **7**, 196-203.

M

Martin J.F. (1979). Polyene macrolide antibiotics. *Acad. Press, Lon.*, **3**, 355-387.

Martin J.F., McDaniel L.E. (1977). Production of polyene macrolide antibiotics. *Adv. Appl. Microbiol.*, **21**, 1-52.

Maskey R.P., LI F.C., QIN S., Fiebig H.H. and Latsch H. (2003). Chandrananimycins A~C: Production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *J. Antibiot.*, **56** (7), 622-629.

Miller J.D et Trenholm H.L (1994). –mycotoxins in grain : compounds other than Aflatoxin. Eagan press, st paul, Minnesota, USA

Misato T. (1982). – Present status and future prospects of agricultural antibiotics. *J. Pesticides Sci.*, **7**, 301-305.

N

Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., (1983), *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. editor

Nett M., Ikeda H., Moore B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 1362-1384.

O

OMS (organisation mondiale pour la santé) (2002). –Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante-seizième réunion du comité FAO/OMS d’experts des additifs alimentaire, série de rapports techniques de l’OMS no 906, organisation mondiale de la santé (OMS), Genève, suisse.

Ortega Y. R. (2006). Foodborne parasites. 285p.

P

Panisset J-C, Dewailly E, Doucet-leduc H. (2003). Contaminants alimentaire. Environnement et santé publique. 369-395.

Parente E. and Ricciardi A. (1999) Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**: 628-638.

Park D.I. (1993). Ps and contaminants, respectives on mycotoxin decontamination procedures Food additive 10.49-60.

Park S.R., Yoo Y.J., Ban Y.H., Yoon Y.J. (2010). Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress. *J. Antibiot.*, **63**, 434-441.

Pedersen, J. C., 1992. Natamycin as a fungicide in agar media. *Appl. Env. Microbiol.*, **58**,

Perry J.J., Staley J., Lory S. (2004). Microbiologie. Edt Dunod. Paris. 1064–1066.

Pfefferle, C., Theobald, U., Gurtler, H. and Fiedler, H.P. (2000). - Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*, **80**, 135–142

Pfohl-Ieszkowicz A (1999) Ecotoxinogénèse. In : les mycotoxines dans l'alimentation évaluation et gestion du risque. Ed Tec&Doc, lavoisier, paris, 17-35.

Pfohl-Ieszkowicz A (2001) définition et origines des mycotoxines. In : les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Ed Tec&DOC, 3-14.

Pitt J.I. Basilico J.C., Abarca M.L. et Lopez C. (2000).- Mycotoxins and toxigenic fungi. Medical Mycology, **38**, 41–46.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., (2010). Microbiologie. Edition Deboeck, 1133 p.

R

Raper, K. et Fennell, D.J. (1965). - The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

Rapilly (1969). Techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphy.*, **19**, numéro hors série.

Riba A.(2008). Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filiere Blé en Algérie. Diplôme de docteur en science biologiques. 190p. option : Microbiologie. Soutenu le 13/12/2008 à l'UMMTO. Algérie.

Roquebert M.F, (1998), Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "*Moisissures des aliments peu hydratés*", Ed. Tec & Doc, 39-95.

Ruiz, B., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. and Langley E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Rev. Microbiol.*, **36**, 146– 167.

Rusul, G. and Marth, E. H., 1988. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium at different pH values and with or without pimaricin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **187**, 436–439.

S

Scheidegger K.A. et Payne G.A. (2003).- Unlocking the secrets behind secondary metabolism, Are view of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, **22**, 427–463

Sehgal S.N., Baker H., Vézina C. (1975). Rapamycin AY-22989, a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, **28**, 727-733.

Shirling E.B., Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**, 3313-3340.

Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.

Solanki R, Kahanna M. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol*;48:410- 31

Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.*, **7** (3), 373-390.

Stackebrandt E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47** (2), 479–491.

Strub C. (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse INP-ENSAT, France, 174 p

Sugita konishi Y, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Aoyama K, Fujita K, Kai S, Kumagai S, (2006). Occurrence of aflatoxins, ochratoxin, and fumonisins in retail foods in japan. *J food prot*, 69(6); 1365-1370.

T

Tabuc C. (2007).- Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat, 190p. INP Toulouse, France.

Toumatia O. (2010). Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, ENS. de Kouba, Alger, 115 p.

Trejo W.H., Bennett R.E. (1963). *Streptomyces nodosus* sp. nov., the amphotericin - producing organism. *J. Bacteriol.*, **85**, 436-439.

V

Vandamme E.J (1985). Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical science. Vol 22, Marcel Dekker. New York. P 808.

W

Waksman S.A. and Henrici A.T. (1943). The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **46** (4), 337-341.

Waksman, S. A., and Woodruff, H. B (1940) cité par Asselineau J. et Zalta J.P. (1973). – Les antibiotiques. Structures et exemples de mode d’action. Herman Ed., Paris

Warren H.B., Prokop J.F. and Grundy W.E. (1955). Non-synthetic media for antibiotic producing actinomycetes. *Antib. Chemother.*, **5**, 6-12.

Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* ? *Arch. Microbiol.*, **176**, 386-390.

Wellington E. M., Ul-Hassan A. (2009). *Actinobacteria*. Encyclopedia of Microbiology (Moselio Schaechter, Ed.), pp. 26-44, Oxford: Elsevier.

Williston E.H., Zia-Walrath P., Youmans G.P. (1947). Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against Virulent human type Tubercle Bacilli. *J. Bacteriol.*, **54**, 563-568.

Y

Yang P.W., Li M.G., Zhao J.Y., Zhu M.Z., Shang H., Li J.R. (2010). Oligomycins A and C, major secondary metabolites isolated from the newly isolated strain *Streptomyces diastaticus*. *Folia Microbiol.*, **55**, 10-16.

Yilma S., Cannon-Sykora J., Samoylov A., Loc T., Liu N., Brinker C. J., Neely W. C., Vodyanoy V. (2007). Large-conductance cholesterol–amphotericin B channels in reconstituted lipid bilayers. *Biosensors Bioelectron*, **22**, 1359–1367.

Yoshida M, Matsubara K, Kudo T, Horikoshi K (1990). *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int J Syst Bacteriol* 41:15–20

Z

Zhang L. and Demain A.L. (2005). Natural Products : Drug Discovery and Therapeutic Medicine. Human Press, Totowa, New Jersey. pp. 3-56.

Zhi X-Y, Li WJ, Stackebrandt E (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:589–608

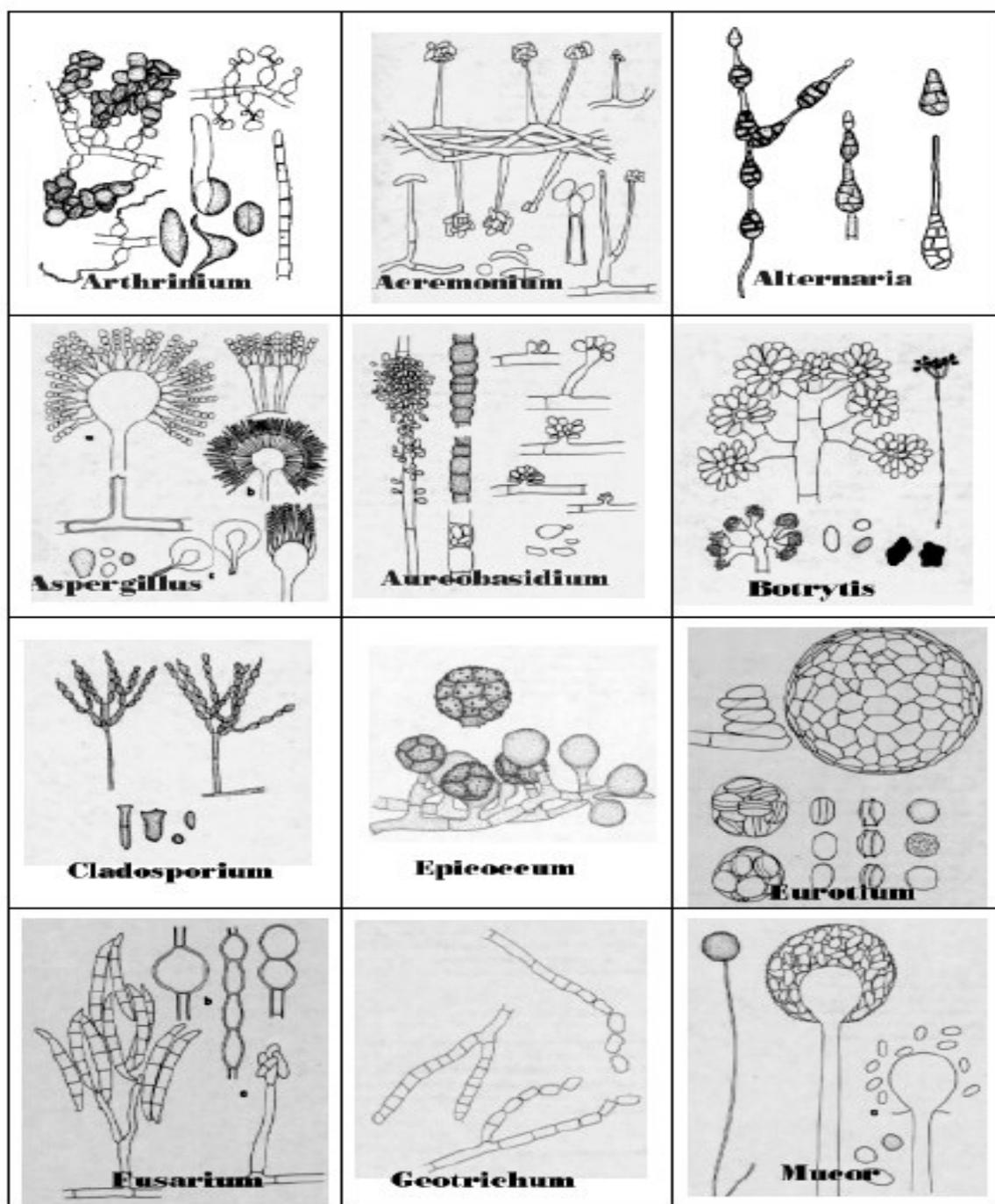
Zinedine A (2009). Détermination des mycotoxines dans les aliments commercialisés au Maroc et étude sur les bactéries lactiques et leur pouvoir de conservation.

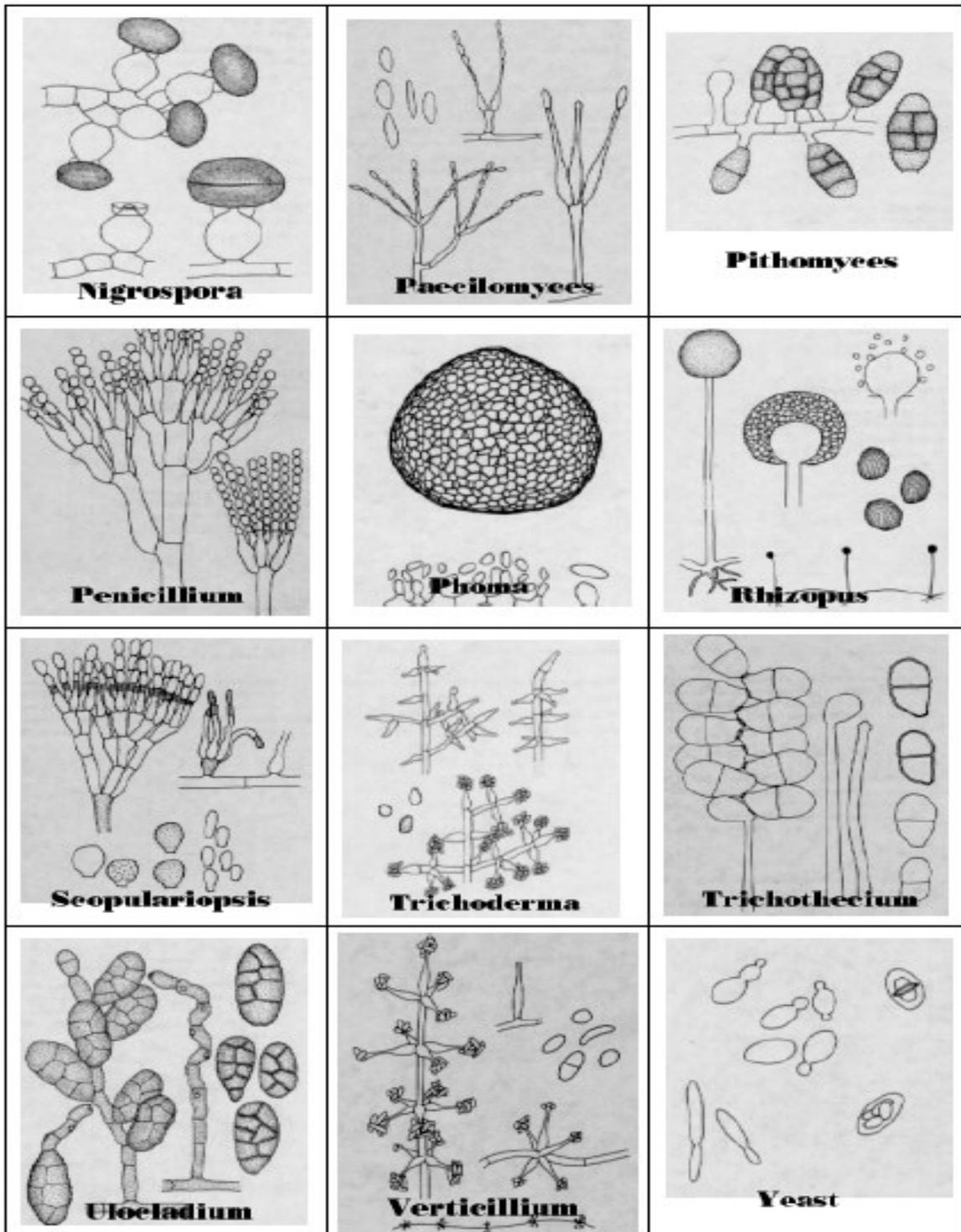
Annexe 01

Structures micromorphologiques des moisissures rencontrées couramment dans les produits alimentaires.

Les images ont été reprises à partir de la page web de Mycological Research group de St. George Campus, Université de Toronto (Canada).

www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/IDPlateI.html





Annexe 02

Exemple de spectres d'absorption dans l'UV-visible des macrolides polyéniques

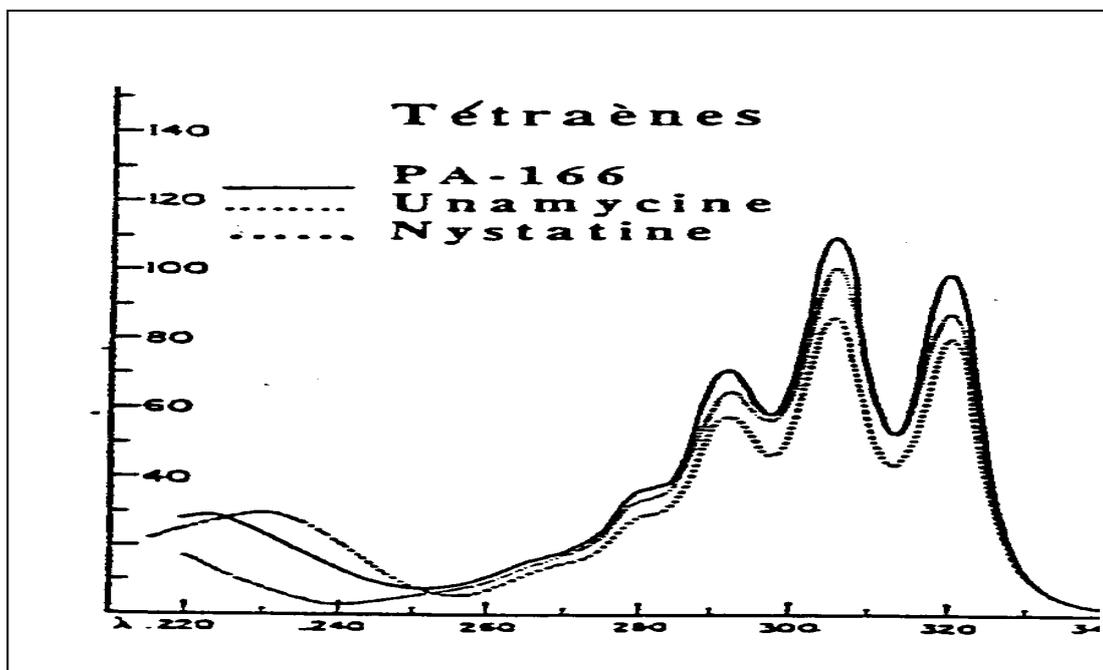


Figure a. Exemple de trois tétraènes, la nystatine, l'unamycine et l'antifongique PA-166 (Oroshnik et Mebane, 1963).

Pour chaque polyène, le spectre présente trois bandes d'absorption entre 290 et 330 nm.

Annexe 03

Matériel du laboratoire utilisé

Appareils :

- Agitateur magnétique chauffant (TÜV Bayern Geprüfte Sicherheit).
- Autoclave (pbi).
- Balance analytique (KERN ABJ).
- Centrifugeuse (Jouan E96) avec réfrigération.
- Centrifugeuse des eppendorfs (P SELECTA).
- Congélateur -32° C (LIEBHERR comfort).
- Etuve (memmert).
- Four Pasteur (memmert).
- Hotte chimique (PBL mobili).
- HPLC.
- Hotte microbiologique à UV (FLUFRANCE).
- Micro-onde (Easytronic).
- pH mètre (HANNA instruments).
- Réfrigérateur 4° C (IGNIS).
- Séchoir (MégaTurbo).
- Spectrophotomètre (modèle SHIMADZU UV 260).
- Vortex (OSI).

Produits chimiques :

- Sulfate de sodium anhydre (SIGMA-ALDRICH).
- Acétate d'éthyle (SIGMA-ALDRICH).
- Dichlorométhane (SIGMA-ALDRICH).
- HCl, 0.1N (SIGMA-ALDRICH).
- Méthanol(SIGMA-ALDRICH).
- NaOH, 0.1N (SIGMA-ALDRICH).
- n-butanol (SIGMA-ALDRICH).

Petits matériel et consommables :

- Ampoules à décanter 500 ml avec des supports adéquats.
- Anse en platine.
- Bec Bunsen.
- Boîtes Petri en plastique 90 mm.
- Coton cardé.
- Cuve de chromatographie.
- Disques en papier d'un diamètre de 6 mm.
- Embouts 200 ml et 1000 ml.
- Emporte pièce de 9 mm de diamètre.
- Entonnoirs en verre.
- Eppendorfs 1,5 ml et 2 ml.
- Eprouvettes graduées 100 ml et 500 ml.
- Erlenmeyers 250 ml et 500 ml.
- microfiltre (0,2 μm).
- Flacons 250 ml.
- Godets de centrifugeuse 110 ml.
- Micropipettes réglables.
- Microseringues 25 μl .
- Papier aluminium.
- Papier filtre Whatman.
- Papier Jausef.
- Piluliers 25 ml.
- Pincettes.
- Pipettes Pasteur.
- Règle graduée.
- Seringue.
- Tubes à essai 20 ml.
- Tubes à hémolyse.

CHAPITRE I
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE II

MATERIEL

ET

METHODES

CHAPITRE III

RESULTATS

ET

DISCUSSION

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

Liste des abréviations

Ac : Aspergillus carbonarius	GRAS: Generally Recognized As Safe
Additives	HPLC: High Performance Liquid Chromatography
AE : Acétate d'éthyle	ISP2: International Streptomyces Project 2
Af : Aspergillus flavus	JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food
Af37 : Aspergillus section Flavi	Mr: Mucorramaniannus
AFB : Aspergillus section Flavi	OMS : Organisme Mondial de la Santé
AFP : Aspergillus section Flavi	Pe : Penicilliumexpansum
Af-T2: Aspergillus section Flavi	Pg : Penicillium glabrum
An : Aspergillus niger	pH : Potentiel hydrogène
Ao : Aspergillus ochraceus	PMTDI : prise quotidienne tolérable maximale temporaire
Ao19: Aspergillus ochraceus	PTWI: prise tolérable temporaire de semaine
Ao26: Aspergillus ochraceus	R25 : Aspergillus section Flavi
Ap : Aspergillus parasiticus	R2C : Aspergillus ochraceus
ARN : Acide ribonucléique	R2Cm: Aspergillus ochraceus
B : n-butanol	S: Spirale
C : absence de croissance	S2O: Aspergillus section Flavi
C : Cytosine	SSB: Soluble Starch Broth
D : Dichlorométhane	UV : Ultraviolet-Visible
d1 : Aspergillus section Flavi	
Fc: Fusariumculmorum	
FDA: Food and Drug Administration	
G: Guanine	

الملخص

تعتبر السلالة B 31 من البكتيريا الهيفية التي تنتمي لرتبة *Streptomyvetale* و الجنس *Streptomyces*.

في هذا البحث قمنا بتحديد الوسط الغذائي المناسب لإنتاج المضادات الحيوية المضادة للفطريات، كما درسنا طبيعة المضادات الفطرية المنتجة من طرف هذه البكتيريا، وعددها.

في المرحلة الاولى خضعت السلالة B31 لدراسة خصائصها التضادية اتجاه مختلف انواع الفطريات: *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Mucor* وقد بينت النتائج ان هذه البكتيريا تتمتع بنشاط مضاد لكل الفطريات المستهدفة.

تمت مواصلة البحث بمتابعة تطور حركية انتاج المضادات الحيوية من طرف السلالة B31 في مرق الاستنبات *SSB, GYE, Bennett* وفقا للنتائج فإن الوسط *Bennett* هو أفضل وسط غذائيو بغرض تحديد أفضل مذيب عضوي لاستخراج هذه المضادات قمنا باعتماد طريقة الكشف الحيوي (*Bioantographie*) وأظهرت النتائج أن أسيتات الإيثيل هو الأفضل.

كما تمكنا من خلال تحليل طيف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية من أن نستنتج أن المستخلصات المضادة للفطريات خالية من المركبات متعددة الروابط الهيدروجينية (*Polyènes*)

كما تبين بعد معالجة وتنقية مستخلص المضادات الفطرية بالكروماتوغرافيا السائلة فائقة التجلية أنها تحتوي على أربعة مضادات فطرية.

الكلمات المفتاحية: *Streptomyces*، المضادات الفطرية، انتاج، حركية الانتاج، *Polyènes*، تنقية.