

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :  
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre  
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

## MASTER

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie

**Filière** : Sciences biologiques

**Spécialité** : biochimie appliquée

**Par : ALLANE Amina & MOBARKI Fatima**

## Thème

**Production d'antifongiques à partir du jus de dattes  
par deux *Streptomyces* antagonistes de *Candida***

**Soutenu publiquement le : 23/06/2019**

### Devant le jury :

|                                 |                         |                |                     |
|---------------------------------|-------------------------|----------------|---------------------|
| <b>Mme. HAMIDOUDJANA Aicha.</b> | Maître de Conférences B | Univ. Ghardaïa | <b>Président</b>    |
| <b>Mme. MAIDI Laila</b>         | Maître Assistant A      | Univ. Ghardaïa | <b>Examinatrice</b> |
| <b>M. BELGHIT Said</b>          | Maître de Conférences B | Univ. Ghardaïa | <b>Rapporteur</b>   |

**Année universitaire 2018/2019**

## ***Remerciements***

Avant tous nous remercions **ALLAH**, le tout puissant de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et sur lequel nous nous appuyons avant toute chose.

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mr **BELGHIT Saïd** Maitre de Conférences B à l'Université de Ghardaïa de nous avoir dirigé, de nous avoir passionnément corrigé ce manuscrit, ainsi que son aide, ses précieux conseils, sa compréhension et son soutien moral lors de la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier Mme **HAMIDOUDJANA Aïcha**, Maitre de Conférences B à l'université de Ghardaïa, qui nous fait l'honneur en acceptant d'examiner notre travail et de présider le jury de soutenance.

Nous tenons à remercier également Mme **MAIDI Laila**, Maitre Assistante A à l'Université de Ghardaïa, d'avoir accepté de donner une partie de leurs précieux temps pour l'évaluation de ce mémoire et apporter leurs critiques pour améliorer notre manuscrit.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants du département de Biologie ainsi que tous les ingénieurs et les techniciens de laboratoire de Microbiologie à l'Université de Ghardaïa pour leur aide et disponibilité, surtout pour leurs gentillesse.

Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.

# Dédicaces

*Je dédie ce travail à :*

*Mon cher père : **Fouzi** ; Qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Ma chère mère : **Aicha** ; qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mes belle sœurs : **Kawtar** et **Nouha** et mes chère frères : **Farid** et **Ibrahim** qui m'ont soutenu avec leurs encouragements et leurs aides, auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.*

*Toute la famille **ALLANE** et la famille **CHOUCHANE** grands et petits.  
Mes chères amies et tous les étudiants, enseignants et personnels du département des Sciences Biologique.*

*Amina*

# Dédicaces

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.*

*A ma mère Aïcha qui m'a tant soutenu tous le long de mon parcours. Aucun hommage ni remerciement ne saurait être suffisant.*

*A mon cher papa Abdelkader qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A mes Très chères sœurs : Salima, Khadidja, Hind.*

*A mes Très chères frères : Mahmoud, Nourddine, Ismaïl*

*A toute ma famille Mobaraki et Elfodda.*

*A ma Binôme «Amina » qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.*

*A tous mes amis.*

*A Tous les étudiants, enseignants et personnels du département des Sciences Biologique.*

*Fatima*

# SOMMAIRE

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Remerciements .....          | I   |
| Dédicace .....               | II  |
| Sommaire .....               | III |
| Liste des tableaux .....     | V   |
| Liste des figures.....       | IV  |
| Liste des abréviations ..... | VI  |
| Résumé .....                 | VII |
| Introduction générale .....  | 1   |

## Etude bibliographique

|  |    |
|--|----|
| I.- CANDIDA ALBICANS .....   | 3  |
| 1.- Taxonomie de <i>C. albicans</i> .....                                    | 3  |
| 2.- Morphologie de <i>C. albicans</i> .....                                  | 3  |
| 3.- Ecologie de <i>C. albicans</i> .....                                     | 4  |
| 4.- Facteurs de virulence de <i>C. albicans</i> .....                        | 5  |
| 5.- Les candidoses .....   | 5  |
| 6.- Résistance des <i>Candida</i> aux antifongiques .....                    | 6  |
| II. LES ACTINOBACTERIES .....  | 7  |
| 1.- Définition .....   | 7  |
| 2.- Morphologie.....   | 7  |
| 3.- Classification.....  | 9  |
| 4.- Ecologie et distribution dans la nature .....                            | 9  |
| 5.- Cycle de développement des actinobactéries .....                         | 9  |
| 6.- Importance des actinobactéries .....                                     | 10 |
| 6.1.- Importance en biotechnologie .....                                     | 10 |
| 6.2.- Importance en agronomie .....  | 10 |
| 7.- Le genre <i>Streptomyces</i> .....                                       | 10 |
| 7.1.- Définition et caractéristiques principales .....                       | 10 |
| 7.2.- Cycle de développement .....   | 11 |
| 7.2.1.-Croissance en milieu solide.....                                      | 11 |
| 7.2.2.-Croissance en milieu liquide .....                                    | 11 |
| 7.3.-Ecologie .....  | 12 |
| 7.4.- Les métabolites secondaires produits par les <i>Streptomyces</i> ..... | 12 |

|  |    |
|--|----|
| III. LES ANTIFONGIQUES .....   | 13 |
| 1.- Définition .....   | 13 |
| 2.- Classification des antifongiques .....                               | 13 |
| 2.1.- Classification selon la structure .....                            | 13 |
| 2.2.- Classification selon leur origine .....                            | 13 |
| 2.2.1.- Antifongiques naturels .....                                     | 13 |
| 2.2.1.1- Antifongiques polyéniques .....                                 | 13 |
| 2.2.1.2- Antifongiques non polyéniques .....                             | 13 |
| 2.2.2.- Antifongiques de synthèse chimique .....                         | 14 |
| 2.3.- Sites et modes d'action des antifongiques .....                    | 14 |
| 3.- Stratégies actuelles de recherche de nouveaux antifongiques .....    | 14 |
| 4.- Les antifongiques utilisés contre <i>Candida</i> .....               | 15 |
| IV. Les dattes .....   | 15 |
| 1. Description des dattes .....  | 15 |
| 2.- Composition biochimique .....  | 15 |
| 2.1.- Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe " .....     | 15 |
| 2.1.1.- L'eau .....  | 15 |
| 2.1.2.- Les sucres .....   | 16 |
| 2.1.3.-Les fibres .....  | 16 |
| 2.1.4.- Les protéines .....  | 16 |
| 2.1.5.- Les acides gras .....  | 16 |
| 2.1.6.- Les minéraux .....   | 16 |
| 2.1.7.- Les vitamines .....  | 16 |
| 2.2.- Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau " ..... | 17 |
| 3.- Jus de dattes .....  | 18 |
| 3.1.- Utilisation du jus de dattes .....                                 | 18 |
| 3.1.1. Production de P.O.U (Protéines d'Organismes Unicellulaires) ..... | 18 |
| 3.1.2.- Production d'oxytétracycline .....                               | 18 |
| 3.1.3.- Production d'acide citrique .....                                | 18 |
| 3.1.4.- Production d'alcool .....  | 19 |
| 3.1.5.- Production de vitamine B12 .....                                 | 19 |
| 4.-Valorisation des dattes à faible valeur marchande .....               | 19 |
| <b>Matériel et méthode</b>   |    |
| 1.-Matériel .....  | 20 |

|   |    |
|---|----|
| 1.1.- Les isolats d'actinobactéries .....                                     | 20 |
| 1.2.- Le germe cible .....  | 20 |
| 1.3.- Les milieux de production .....   | 20 |
| 1.4.- Matériel du laboratoire .....   | 21 |
| 2.- Méthodes .....  | 21 |
| 2.1.- Préparation du jus de dattes .....                                      | 21 |
| 2.2.- Choix de la dilution du jus de dattes (milieu solide) .....             | 22 |
| 2.3.- Cinétique de production d'antifongiques sur milieu solide .....         | 22 |
| 2.4.- Production d'antibiotiques en fioles agitées .....                      | 23 |
| 2.4.1.- Préparation des précultures .....                                     | 23 |
| 2.4.2.- Cinétique de production d'antifongique sur milieu liquide .....       | 23 |
| 2.4.3.- Estimation de la variation du pH .....                                | 24 |
| 3.- Extraction des métabolites antilevuriennes et test d'antibiographie ..... | 24 |
| 5.- Purification des fractions actives par HPLC .....                         | 25 |

### **Résultat et discussion**

|  |    |
|--|----|
| 1.- Choix de la dilution du jus de dattes .....  | 26 |
| 2.- Croissance sur milieu jus de dattes D4 additionné d'une source d'azote .....             | 26 |
| 3.- Caractéristiques culturales et morphologiques .....                                      | 27 |
| 3.1.-Caractéristiques culturales de l'isolat G24 .....                                       | 27 |
| 3.2.-Caractéristiques culturales de l'isolat G68 .....                                       | 27 |
| 4.- Cinétique de production sur milieu solide .....  | 28 |
| 4.1.-Cinétique de production de la souche G24 sur milieu solides .....                       | 28 |
| 4.2.-Cinétique de production de la souche G68 sur milieux solides .....                      | 30 |
| 5.- Cinétique de production des antifongiques sur milieux liquide .....                      | 31 |
| 5.1.-Cinétique de production de la souche G24 sur milieu liquide .....                       | 32 |
| 5.2.-Cinétique de production de la souche G68 sur milieu liquide .....                       | 34 |
| 6.- Comparaison de la production des antifongiques sur les milieux solides et liquides ..... | 35 |
| 7.- Extraction des métabolites antifongiques et test d'antibiographie .....                  | 37 |
| 9. Discussion générale .....   | 39 |
| Conclusion générale et perspectives .....  | 43 |
| Référence bibliographique .....  | 44 |
| Annexes .....  | 54 |

## Liste des tableaux

| Tableau   | Titre  | page |
|-----------|--|------|
| <b>1</b>  | Composition minérale de datte, en mg/100g de la partie comestible  | 17   |
| <b>2</b>  | Composition vitaminique moyenne de la datte sèche  | 17   |
| <b>3</b>  | Provenances et quelques caractéristiques des souches de <i>Streptomyces</i> utilisés.  | 20   |
| <b>4</b>  | Matériel utilisé   | 21   |
| <b>5</b>  | Croissance des deux souches sur jus de dattes de différentes dilutions.  | 26   |
| <b>7</b>  | Caractéristiques culturales et morphologiques des isolats.   | 27   |
| <b>8</b>  | Cinétiques de production d'antifongique de les souches G68 et G24 vis-à-vis <i>C.albicans</i> sur les milieux solide (Jus de datte, Bennett, ISP2).  | 57   |
| <b>9</b>  | Cinétiques de production d'antifongique de les souches G68 et G24 vis-à-vis <i>C.albicans</i> sur les milieux liquide (Jus de datte, Bennett, ISP2). | 57   |
| <b>10</b> | Cinétiques du pH de les souches G68 et G24 dans les milieux liquide (Jus de datte, Bennett, ISP2).   | 58   |
| <b>11</b> | Activité antifongique des extraits organiques de les souches G68 et G24.   | 58   |

## Liste des figures

| Figure | Titre  | page |
|--------|--|------|
| 01     | Différentes formes de <i>Candida albicans</i> .  | 04   |
| 02     | Colonies de <i>Candida albicans</i> sur milieu solide.   | 04   |
| 03     | Candidoses opportunistes dues à <i>Candida albicans</i> .  | 06   |
| 04     | Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries.  | 08   |
| 05     | Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> .  | 11   |
| 06     | Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides.  | 12   |
| 07     | Méthode des cylindres d'agar.  | 22   |
| 08     | Incubation des cultures liquides au shaker.  | 23   |
| 09     | Technique des puits.   | 24   |
| 10     | Culture de la souche G24 sur milieux solides ISP2, Bennett et jus de dattes.                               | 28   |
| 11     | Culture de la souche G68 sur milieux solides ISP2, Bennett et jus de dattes+N.                             | 28   |
| 12     | Cinétique de production des activités anti- <i>Candida</i> de la souche G24 sur milieux solides.           | 30   |
| 13     | Activité anti- <i>Candida</i> de la souche G24 (méthode des cylindres d'agar).                             | 30   |
| 14     | Cinétique de production des activités anti- <i>Candida</i> de la souche G68 sur milieux solides.           | 30   |
| 15     | Activité anti- <i>Candida</i> de la souche G68 (méthode des cylindres d'agar)                              | 31   |
| 16     | Culture de la souche G24 sur milieux liquides ISP2, Bennett et jus de dattes D4+ NaNO <sub>3</sub> .       | 31   |
| 17     | Culture de la souche G68 sur milieux liquides ISP2, Bennett et jus de dattes D4+NaNO <sub>3</sub> .        | 32   |
| 18     | Cinétique de production et du pH des activités anti- <i>Candida</i> de la souche G24 sur milieux liquides. | 33   |
| 19     | Activité anti- <i>Candida</i> de la souche G24 (méthode des puits).  | 34   |
| 20     | Cinétique de production et du pH des activités anti- <i>Candida</i> de la souche G68 sur milieux liquides. | 35   |
| 21     | Activité anti- <i>Candida</i> de la souche G68 (méthode des puits).  | 36   |
| 22     | Moyennes des zones d'inhibition de la souche G24 sur les trois milieux solides.                            | 36   |
| 23     | Moyennes des zones d'inhibition de la souche G68 sur les trois milieux solides.                            | 36   |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>24</b> | Moyennes des zones d'inhibition de la souche G24 sur les trois milieux liquides.             | 37 |
| <b>25</b> | Moyennes des zones d'inhibition de la souche G68 sur les trois milieux liquides.             | 37 |
| <b>26</b> | Activité anti- <i>Candida</i> des extraits organiques des souches G24 et G68.                | 38 |
| <b>27</b> | Test d'antibiogramme des extraits organiques des souches G24 et G68.                         | 38 |
| <b>28</b> | Profil en HPLC de l'extrait brut butanolique de la souche G24 produit sur milieu JDD4+N.     | 54 |
| <b>29</b> | Date à moindre valeur marchand utilisée.   | 55 |
| <b>30</b> | La croissance de la souche G68 sur milieu jus de datte à dilution de 40%.                    | 55 |
| <b>31</b> | La croissance de les souches G68 et G24 sur milieu jus de datte à dilution de 20%.           | 56 |
| <b>32</b> | Extraction des antifongiques par des solvants organiques (utilisation d'ampoule à décanter). | 57 |

## Liste des abréviations

|                     |  |
|---------------------|--|
| ADN :               | Acide désoxyribonucléique                          |
| AE :                | Acétate d'éthyle                                   |
| ARN :               | Acide ribonucléique                                |
| B :                 | n-Butanol  |
| <i>C.albicans</i> : | <i>Candida albicans</i>                            |
| D :                 | Dichlorométhane                                    |
| H :                 | n-Hexane   |
| HPLC :              | Chromatographie Liquide à Haute Performance        |
| ISP2 :              | International <i>Streptomyces</i> Project 2        |
| j:                  | Jour   |
| JDD4+N :            | Jus de dattes dilution 4 (20%) + NaNO <sub>3</sub> |
| M.A                 | mycélium aérien                                    |
| M.S :               | mycélium de substrat                               |
| P.S :               | pigments solubles                                  |
| pH :                | Potentiel Hydrogène                                |
| rpm :               | Rotation par minute                                |
| Z.D.I :             | Diamètre de zone d'inhibition                      |
| µl :                | Microlitre   |

## **Production d'antifongiques à partir du jus de dattes par 2 *Streptomyces* antagonistes de *Candida albicans***

### **Résumé**

Le travail que nous avons entrepris à pour objectif, la production des antifongiques contre la levure pathogène *Candida albicans* à partir de deux souches de *Streptomyces* G24 et G68 en utilisant un à base du jus de dattes à moindre valeur marchande. Les deux souches ont poussé sur ce milieu mais à une dilution faible D4. L'ajout d'une source d'azote minéral NaNO<sub>3</sub> à cette dilution était nécessaire pour avoir une croissance plus abandon. La cinétique de production des activités anti *Candida* sur les milieux solides : jus de dattes, ISP2 et Bennett a montré que le jour de la production maximale sur les deux milieux ISP2 et Bennett est le 2<sup>e</sup> jour. Par contre, pour le milieu Jus de dattes est le 6<sup>e</sup> jour. En ce qui concerne la cinétique de production sur le milieu liquide les activités sont maximales sur les trois milieux au 4<sup>e</sup> jour d'incubation. Le calcul des moyennes des zones d'inhibition a montré que le milieu du jus de dattes est meilleur par rapport aux deux milieux ISP2 et Bennett que se soit liquides ou solides. Les molécules antifongiques des deux souches ne sont apparues extractible que par le solvant *n*-butanol. Le profil en HPLC d'extrait butanolique brut de la souche G24 a montré la présence des 5 fractions.

**Mots-clés :** Jus de dattes, antifongiques, *Candida albicans*, *Streptomyces*

**Production of antifungal compounds antagonists *Candida albicans* from two strains of *Streptomyces* using date juice**

**Abstract**

The aim of our work is the production of antifungal compounds against the pathogenic yeast *Candida albicans* from two strains of *Streptomyces* G24 and G68 using a date juice with lower market value. Both strains G24 and G68 had grown on this medium but at low dilution D4. The addition of a mineral nitrogen source NaNO<sub>3</sub> at this dilution was necessary to have more growth abandonment. The production kinetics of anti-*Candida* activities on solid media: date juice, ISP2 and Bennett showed that the day of maximal production on both ISP2 and Bennett media is the 2nd day. However, in the middle date juice is the 6th day. Concerning the kinetics of production on the liquid medium the activities are maxima on the three media at the fourth day of incubation. The calculation of the averages of the zones of inhibition showed that the medium of the date juice is better compared than the two media ISP2 and Bennett that is liquid or solid. The antifungal molecules of the two strains are only appeared extractable by the n-butanol solvent. The HPLC profile of crude butanolic extract of strain G24 showed the presence of the 5 fractions.

**Key words:** date juice, antifungal compounds, *Streptomyces*, *Candida albicans*.

## إنتاج مضادات فطرية للخميرة *Candida albicans* من طرف سلالتين للجنس *Streptomyces* باستعمال عصير التمر

### ملخص

يهدف العمل الذي قمنا به إلى إنتاج مضادات فطريات فعالة ضد الخميرة الممرضة *Candida albicans* من خلال سلالتين من الجنس *Streptomyces* هما G24 و G68 باستخدام عصير تمر ذو قيمة منخفضة في السوق. تم نمو كل من السلالتين على الوسط الغذائي المحضر من التمر ولكن في تخفيف منخفض منه D4. لم يكن النمو كبيراً، لذا وجب إضافة مصدر من النيتروجين  $\text{NaNO}_3$  لهذا التخفيف للحصول على نمو جيد. حركية إنتاج المضادات الفطرية لـ *Candida* على الأوساط الصلبة: عصير التمر، ISP2 و Bennett أظهرت أن أقصى نشاط للسلالتين على كل من ISP2 و Bennett هو في اليوم الثاني. على العكس من ذلك، تم تسجيل أقصى نشاطاً بالنسبة للوسط المحضر من التمر في اليوم السادس. أما في ما يتعلق بحركية النشاط على الوسط السائل، فإن أقصى نشاط للسلالتين في الأوساط الثلاثة هو في اليوم الرابع من الحضانة. أظهر حساب متوسطات مناطق التثبيط أن الوسط المحضر من عصير التمر أفضل مقارنة بالوسطين ISP2 و Bennet في الحالة السائلة أو الصلبة. لم يتم استخلاص الجزيئات المضادات الفطريات إلا بواسطة محلول البيوتانول. أظهر الطيف المحصل عليه من الكروماتوغرافية السائلة فائقة الجودة HPLC لمستخلص البيوتانول الخام للسلالة G24 وجود 5 أجزاء .

الكلمات المفتاحية: عصير التمر، مضاد فطري، *Streptomyces*، *Candida albicans*.

# ***Introduction***

L'incidence accrue des candidoses en particulier chez les patients immunodéprimés (Thakur *et al.*, 2007), l'émergence d'espèces de *Candida* pathogènes pour l'Homme (Bauda et Monfort, 2004) et le développement de la résistance aux antibiotiques anti-*Candida* (Vandeputte, 2008), ajoutés au nombre réduit d'antifongiques anti-*Candida* utilisables en thérapeutique et la toxicité de certains d'entre eux (Accoceberry et Noël, 2007). Ces facteurs ont incité l'industrie pharmaceutique et les laboratoires de recherche à trouver de nouveaux antifongiques plus efficaces et moins toxiques (Fantaine *et al.*, 2008).

Parmi les candidoses, l'infection par *Candida albicans*, commensal du tractus digestif humain, est la plus commune et représente plus de 60% des levures isolées chez l'Homme (Samaranayake *et al.*, 2002). Il constitue un sérieux problème de santé, notamment chez des patients immunodéprimés et ceux sous thérapie immunosuppressive. En effet, elle affecte les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les macrophages, qui constituent la première et unique ligne de défense de l'hôte immunodéprimé (Mavor *et al.*, 2005).

Les antifongiques disponibles à l'heure actuelle en thérapeutique ne réunissent pas les critères définissant l'antibiotique idéal: toxicité spécifique vis-à-vis du champignon pathogène, bonne diffusion dans l'organisme, large spectre d'activité *in vivo*, absence de problèmes liés à l'apparition de souches résistantes et absence d'effets secondaires (Nafis *et al.*, 2016). De ce fait, la recherche de nouvelles substances s'avère nécessaire pour lutter contre ce genre d'infections.

Depuis le début des années quatre-vingt-dix du 20<sup>e</sup> siècle, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques (Hancock et Strohl, 2001; Donadio *et al.*, 2002). La recherche de molécules actives à partir du milieu naturel est l'une d'entre-elles.

La capacité de produire un grand nombre de métabolites secondaires chimiquement différents est associée avec les actinobactéries et plus spécialement le genre *Streptomyces*. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005; Smaoui, 2010). Différents *Streptomyces* ont été explorés dans l'espoir de découvrir de nouvelles molécules organiques tels que les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les enzymes, les antibiotiques et les antifongiques (Smaoui, 2010).

Les sols sahariens d'Algérie ont montré une grande diversité en genres d'actinobactéries, des plus fréquents comme *Streptomyces* (Sabaou *et al.*, 1992) aux moins fréquents ou au plus rares tels que *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *catellatospora*, etc. (Boudjella, 1994;

**Zitouni, 1995; Sabaou *et al.*, 1998; Meklat, 2012).**

Après le choix de l'actinobactérie productrice, l'étape suivante est le choix du milieu de production. Celui-ci est généralement semisynthétique composé de diverses sources carbonées (glucose, lactose, amidon, dextrines, glycerol, etc.) et azotées minérales (ammonium, nitrates, nitrites,...) ou organiques (extrait de levure, de malt et de viande, peptones, caséines, diverses aminoacides...) qui sont souvent des substrats relativement coûteux.

Les dattes de part leur grande richesse en sucres, en acides organiques, en sels minéraux, et en vitamines peuvent servir en tant que matière première en fermentation pour la production de divers métabolites tels que l'acide citrique, l'oxytétracycline, l'alcool, la vitamine B12 (**Abou-zeid et khoja 1993**), mais pas pour la production des antifongiques.

Notre étude s'inscrit dans cette thématique et a pour objectif principal l'utilisation du jus de dattes d'une variété à moindre valeur marchande pour la production des antifongiques des deux souches de *Streptomyces* d'origine Saharienne actifs contre la levure pathogène *Candida albicans*.

Ce travail est présenté en trois chapitres:

Le premier chapitre est réservé à une analyse bibliographique qui tourne autour des 4 mots clés : *Candida albicans* et ses candidoses, les actinobactéries et le genre *Streptomyces*, les antifongiques et en fin le jus de dattes.

Le deuxième chapitre est réservé à la présentation du matériel et à la description des méthodes utilisées.

Le dernier chapitre consacré aux résultats et discussion suivi d'une conclusion et perspectives.

*Etude  
bibliographique*

## I.- CANDIDA ALBICANS

*Candida albicans* est le pathogène fongique le plus commun chez l'Homme (**Sardi et al., 2013**). Il fait partie de la microflore indigène orogastro-intestinale et vaginale de l'être humain et de nombreuses espèces animales (**Kannan et al., 2010**). Il est responsable de diverses candidoses orales et vaginites (**Segal, 2005**). Il est détecté chez au moins 70% de la population humaine saine (**Schulze et Sonnenborn, 2009**). Il possède des mécanismes d'adaptation, lui permettant de survivre dans diverses conditions environnantes et de causer une grande variété d'infections tant superficielles (candidoses mucocutanées) ou profondes (candidoses systémiques, souvent mortelles) (**Segal, 2005**).

### 1.- Taxonomie de *C. albicans*

Les *Candida* sont des micromycètes eucaryotes appartenant au règne des champignons/ Fungi (*Mycota*), à la division des *Ascomycetes*, à la classe des *Saccharomycetes*, à l'ordre des *Saccharomycetales* et à la famille des *Saccharomycetaceae* (**Born, 2013**). Le genre *Candida* constitue un groupe d'organismes hétérogènes comprenant plus de trois cent cinquante espèces, seule une minorité d'entre elles peut être pathogène pour l'Homme (**Williams et al., 2010**).

### 2.- Morphologie de *C. albicans*

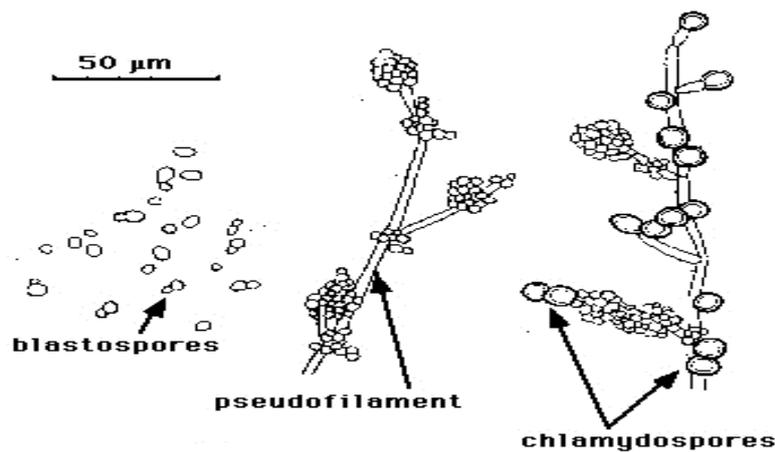
*C. albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Elle est diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (**Chu, et al 1993**), et se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (**Graser et al 1996**), formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15  $\mu\text{m}$ , et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *C. albicans* (**Buffo et al., 1984**) Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés (Figure 1):

- la forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4  $\mu\text{m}$  avec parfois un bourgeon déformation ;
- la forme pseudo mycélium, mesurant de 500 à 600  $\mu\text{m}$  de longueur et de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien (**Sudbery, 2001 ; Sudbery, 2004**) Chaque compartiment cellulaire est identique en

longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants (Barelle, et al 2006).

- la forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure Appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (Gow, 2002).



**Figure 01.** Différentes formes de *Candida albicans* d'après Whiteway et Bachewich (2007).

Sur milieu solide, les *C. albicans* donnent de petites colonies de 1 à 2 mm de diamètre, rondes, blanches, crémeuses, lisses et brillantes (Vaubourdolle, 2007) (figure 2).



**Figure 02.** Colonies de *Candida albicans* sur milieu solide (Belghit, 2016).

### 3.- Ecologie de *C. albicans*

*C. albicans* est considéré chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne (Odds, 1988 ; Mavor, 2005). C'est un champignon cosmopolite dont les fréquences d'isolement montrent que chez des sujets sains la levure se répartit différemment en fonction des sites de

prélèvement : peau (3%), vagin (13%), tractus ano-rectal (15%), cavité buccale (18%), estomac et duodénum (36%), et jéjunum et iléon (41%). Le réservoir principal est donc le tube digestif où la fréquence de portage varie selon les sujets.

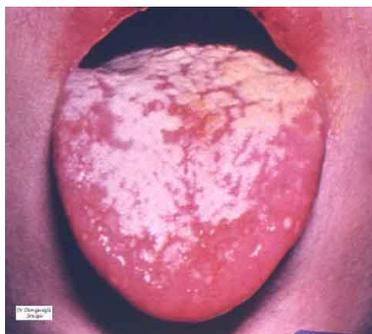
*C.albicans* peut aussi être isolé de manière exceptionnelle dans la nature (sol, plante, atmosphère, eau...) mais cela résulte en général d'une contamination fécale.

#### 4.- Facteurs de virulence de *C. albicans*

Bien que les facteurs de virulence soient semblables chez toutes les espèces de *Candida*, c'est surtout chez *C. albicans* que ceux-ci ont été bien étudiés (**Calderone et Fonzi, 2001**). Parmi les facteurs de virulence reconnus de *Candida*, on retrouve : une capacité d'adhérence aux cellules de l'hôte, une production d'enzymes cytolytiques, une variabilité phénotypique ou switching et surtout la capacité de passer d'une forme blastospore à une forme filamenteuse (**Bendel et al., 2003**).

#### 5.- Les candidoses

Habituellement commensales des muqueuses digestives et urogénitales chez l'Homme et d'autres mammifères, les *Candida* sont susceptibles de devenir pathogènes et d'envahir les tissus superficiels (candidoses superficielles) ou profonds (candidoses invasives) chez de nombreux sujets tels que les personnes âgées, les immunodéprimés, les souffrants de désordres hématologiques (VIH-positif, leucémie), les sujets traités par chimiothérapie, les individus ayant un traitement antibiotique à large spectre ou un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse) (**Eggiman, 2003**). Ces levures peuvent également affecter les nouveaux nés, les patients ayant subi une chirurgie viscérale profonde, ayant une alimentation parentérale ou bien ayant subi une radiothérapie (**Beucher, 2007**). D'un point de vue clinique, les candidoses concernent deux types de lésions, les candidoses superficielles et les candidoses profondes (figure 3).



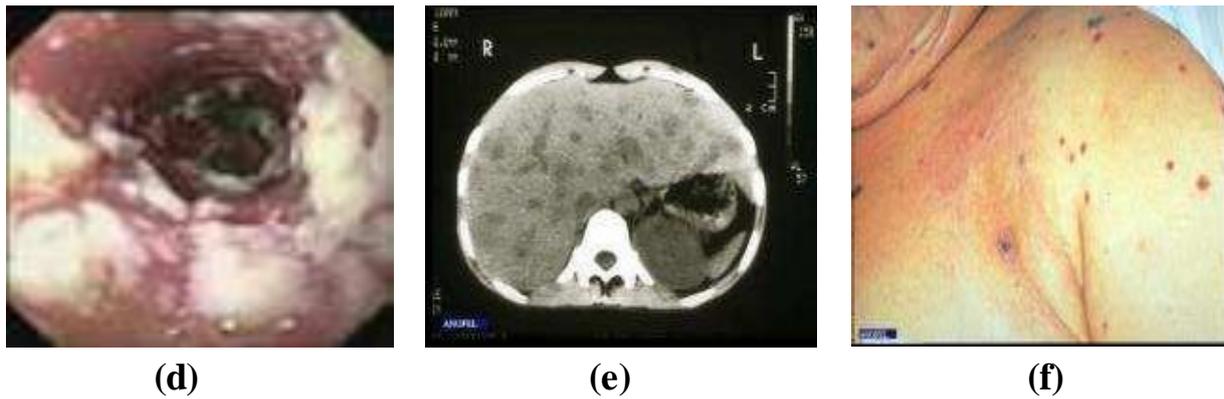
(a)



(b)



(c)



**Figure 3.** Candidoses opportunistes dues à *Candida albicans*

(a) candidose buccale, (muguet) (b) mycose des pieds, (c) candidose du cou, (d) candidose gastro-intestinale (e) Candidose hépatosplénique, (f) Septicémie à levures (**Belghit, 2016**).

### 6.- Résistance des *Candida* aux antifongiques

La résistance aux antifongiques est apparue parallèlement avec le développement du traitement chimique (**White et al, 1998**). Selon **Yang et Lo (2001)**, les mécanismes moléculaires de résistance aux antifongiques chez les *Candida* sont les suivants :

- altération de la membrane cellulaire et/ou de la paroi pour empêcher l'entrée des molécules antifongiques.
- surexpression d'une pompe d'efflux pour réduire l'accumulation de l'antifongique dans la cellule .
- modification de la cible de l'antifongique pour l'empêcher de se fixer sur elle;
- surexpression de la cible de l'antifongique pour empêcher ce dernier d'agir sur toutes les cibles.
- mutations génétiques dans la voie de biosynthèse de la molécule cible de l'antifongique qui permet à la cellule de se passer de cette molécule cible;
- inactivation ou destruction de la molécule antifongique.

## II. LES ACTINOBACTERIES

### 1.- Définition

Les actinobactéries sont des microorganismes procaryotes filamenteuses (forment une masse de filament ramifiés s'appelle Mycélium), prenant généralement le Gram positif (**Andriambololona, 2010 ; Dgigal, 2003**). Elles sont de haut coefficient de Chargaff (ayant un pourcentage en guanine et cytosine (GC%) relativement élevé dans leur ADN (>55%) (**Pizzul, 2006**). La plupart des actinobactéries ne sont pas mobiles, mais quelque genre produit des spores flagellées permettant leur mobilité (**Djaballah, 2010**).

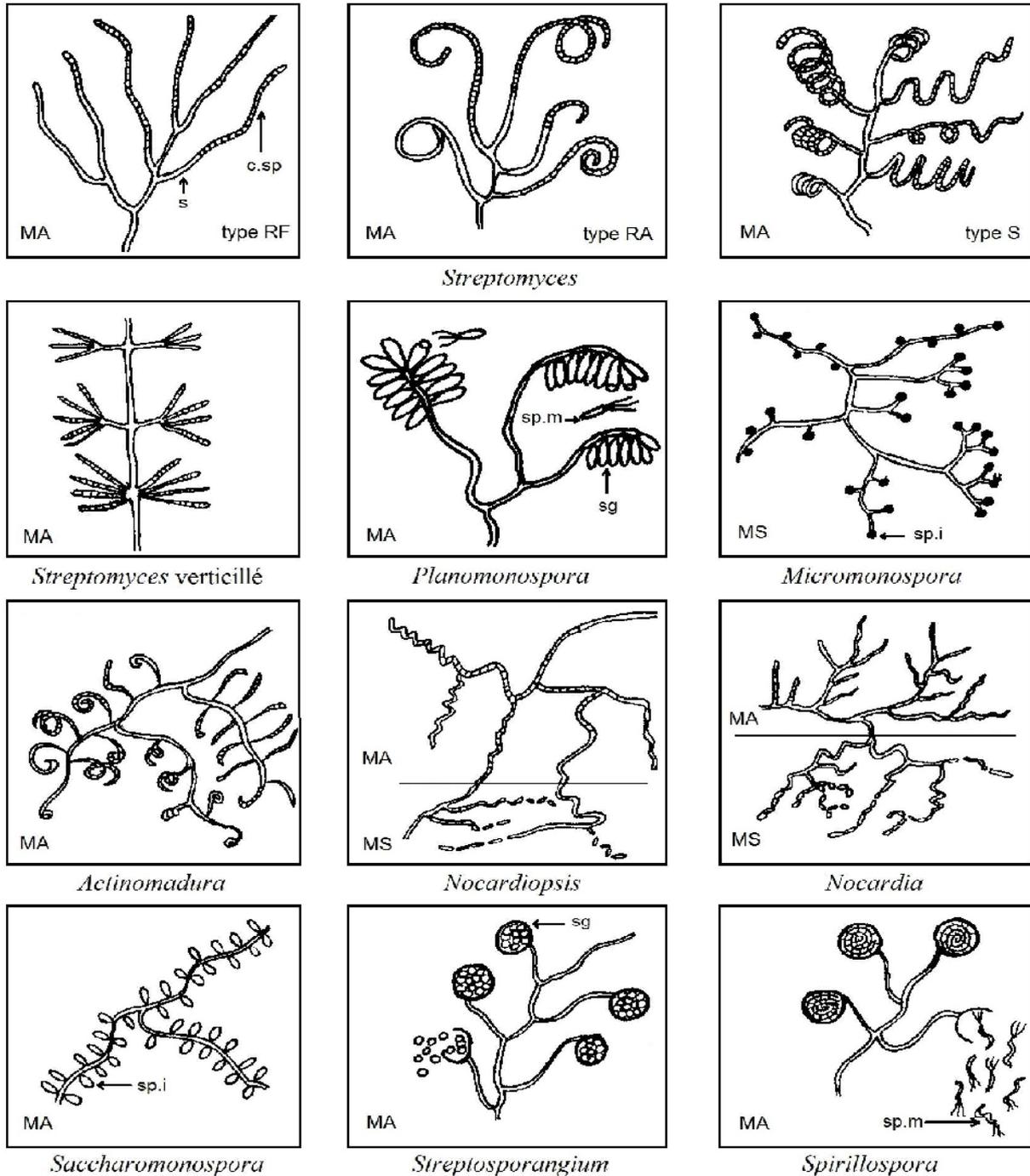
### 2.- Morphologie

Les différents groupes d'actinobactéries sont très variables morphologiquement. Ils comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (**Smaoui, 2010**). Les colonies formées par les actinobactéries sur milieu gélosé sont très particulières, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et le diamètre de ces colonies est variable (entre 1 à 10 mm), elles sont souvent pigmentées (blanc, gris, crème, jaune, violet, rose etc....) (**Perry, 2004**).

L'étude macroscopique des colonies formées sur milieux solides capable à regrouper les colonies en trois types:

- Colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens.
- Colonies pâteuses rugueuses ou lisse qui peuvent être détachées facilement de milieu.
- Colonies exemptes de mycélium de substrat et habituellement renfermées d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons (**Belyagoubi, 2014**).
- Le mycélium est organisé en mycélium de substrat (appelé aussi mycélium végétatif) et mycélium aérien, on distingue trois cas:
  - Dans le cas de la formation de mycélium de substrat uniquement (exemple chez *frankia*, *Dactylosporangium*), la multiplication localisée au sein ou bien à la surface du milieu.
  - Dans le cas de la formation de mycélium aérien uniquement (exemple chez *Sporichthya*), les hyphes de ce mycélium sont attachés au substratum par crampons.
  - Dans le cas de la formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien (exemples chez *streptomyces*), le mycélium aérien croît à la surface de mycélium de base (de substrat ou végétatif) et utilise ce dernier comme substrat (**Djaballah, 2010**).

La morphologie de mycélium d'actinobactéries est très variable, il va de forme rudimentaire (exemple chez la plupart des *mycobactérium*), ou bien fugace (exemple chez certain *Nocardia*), à un mycélium développé et persistant chez le genre *Streptomyces* (Belyagoubi, 2014) (figure 4).



**Figure 04.** Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (d'après, Bergey, 1989). Abréviations: MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles); S, *Spira* (chaînes spiralées); s, sporophore; c.sp., chaînes de spores; sp.i., spores isolés; sp.m., spores mobiles; sg, sporanges.

### 3.- Classification

Les actinobactéries appartiennent au règne des Procaryotes, ils sont rattachés au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae* et à l'ordre des *Actinomycetales* créé par Buchanan en 1917 (**Bergey's manual, 2007**).

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

### 4.- Ecologie et distribution dans la nature

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (Larpent et Sanglier, 1989), et principalement dans les sols de différentes natures (**Williams et al., 1984**). Ils ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques: eau de mer et de sédiments marins (**Ghanem et al., 2000**), eau douce (**Kitouni et al., 2005**), et eau issue de marécages salés (**Boughachiche et al., 2005**).

Les actinobactéries du sol sont généralement saprophytes, leur rôle dans le sol est important en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries (**Crawford et al, 1993**). Elles sont présentes depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. D'après **Waksman (1967)**. Elles produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsable de l'odeur caractéristique des sols (**Zaitlin et al., 2003; Zaitlin et Watson, 2006**).

Généralement, Le pH adoptif par les actinobactéries est le pH neutre ou peu alcalin, elles sont mésophiles et autres sont thermophiles tolérants des températures allant jusqu'à 60°C (**Omura, 1992 ; Ensign et al., 1993**). Le genre *Streptomyces* a montré une capacité à s'adapter à différentes conditions hostiles, sous la forme de spores résistant à ces conditions: le froid (psychrophile), des teneurs en sels élevées (halophile) ou des pressions élevées (barotolérance) (**Zaitlin et al., 2003**), Donc le genre *Streptomyces* est très ubiquitaire (**Lacey, 1997**).

### 5.- Cycle de développement des actinobactéries

Le cycle de vie des actinobactéries commence par la germination des spores, Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (**O'Gara et al., 2008**). Le

développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (Kim *et al.*, 2004 ; Smaoui, 2010).

## 6.- Importance des actinobactéries

Quelques espèces d'actinobactéries sont pathogènes pour l'Homme et les plantes, mais la plupart forment un groupe fort utile dans les domaines agronomique et surtout biotechnologique.

### 6.1.- Importance en biotechnologie

Les actinobactéries ont fourni beaucoup de composés bioactifs importants. Près de 45% des molécules actives connues provenant de microbes sont sécrétées par ce groupe de microorganismes (Takizawa, 1993; Chorin, 2009). Ils produisent 64% des antibactériens, 60% des antifongiques et 93% des antitumoraux (Barakate, 2002). Des antiparasitaires, des antiviraux, des insecticides et des herbicides sont aussi produits par les actinobactéries (Bouras, 2005). Plusieurs enzymes sont produites également par les actinobactéries (Chorin, 2009). Ce sont surtout des protéases, des chitinases (Vonothini *et al.*, 2008), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases etc (Park *et al.*, 2002).

### 6.2.- Importance en agronomie

En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinobactéries possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, elles sont vitales pour le recyclage des nutriments et comptent parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en bioremédiation, capable de dégrader des composés organiques complexes tels que la chitine (Zaitlin et Watson, 2006). Les actinobactéries du genre *Frankia* sont des fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique, formant des nodules chez de nombreuses plantes dicotylédones arbustives autres que les légumineuses (Hochoer *et al.*, 2009).

## 7.- Le genre *Streptomyces*

### 7.1.- Définition et caractéristiques principales

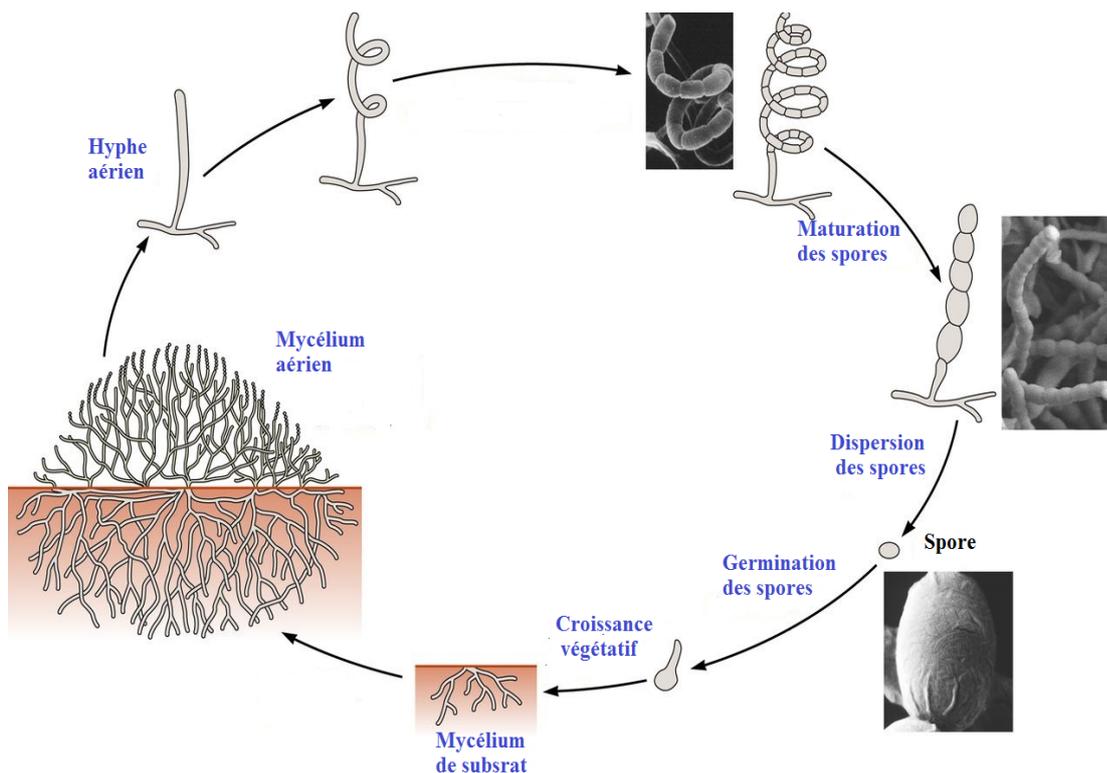
Le genre *Streptomyces* comprend actuellement 848 espèces et 38 sous espèces (Euzeby, 2016). C'est l'actinobactérie la plus étudiée en termes de métabolisme, cycle de vie et génétique, du fait de l'intérêt considérable généré par ce genre bactérien pour la découverte d'antibiotiques. Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram

positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria* (Stackebrandt et al., 1997), sont des procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse. Cela explique leur dénomination : Du Grec *Strepto.myces*: *Streptos*: tordu ou courbe et *myces*: champignons (Williams et al., 1989).

## 7.2- Cycle de développement

### 7.2.1-Croissance en milieu solide

Les *Streptomyces* ont un cycle de développement complexe qui se divise en plusieurs étapes. Sur milieu solide (Figure 5), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinuclés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire. Les extrémités des hyphes aériens se spiralent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninuclées, ces spores sont des agents de dissémination (Samaoui, 2010).



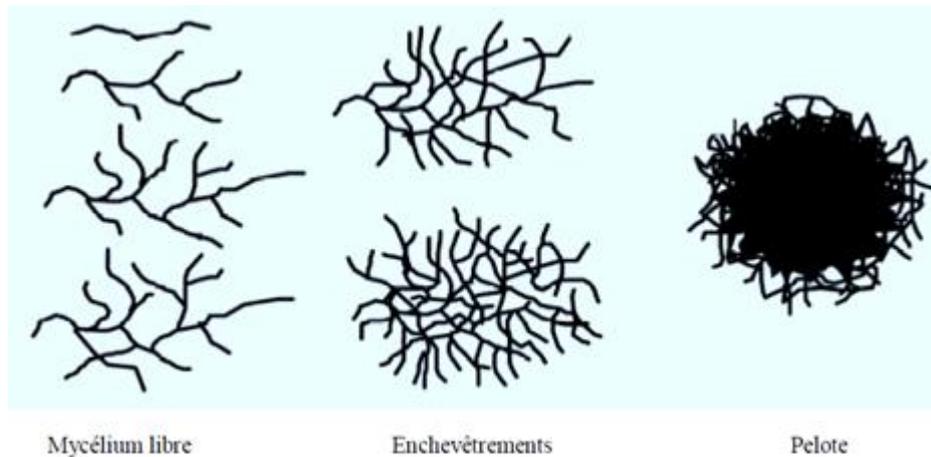
**Figure 05.** Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood et al., 1985)

### 7.2.2.-Croissance en milieu liquide

La croissance en milieu liquide nécessite une aération du milieu par agitation, et/ou par injection d'air ou d'oxygène puisque ces bactéries sont aérobies strictes. Les *Streptomyces*, dans ces conditions, croissent par élongation des filaments et peuvent par la suite présenter

trois types de morphologie (figure 06): les hyphes, branchées ou non, sous forme de mycélium dispersé, un mycélium plus ramifié formant des enchevêtrements ou encore des pelotes denses dont la taille peut varier de 0,1  $\mu\text{m}$  à plusieurs millimètres (**Amanullah et al., 2000**).

Ces pelotes peuvent donner lieu à des limitations de transfert d'oxygène et/ou des nutriments du milieu de culture vers les bactéries se trouvant à l'intérieur de la pelote (**Papagianni, 2004**).



**Figure 06.** Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (**Amanullah et al., 2000**).

### 7.3.- Ecologie

Les *Streptomyces* représentent une partie significative de la population microbienne du sol (**Dhanasekaran et al., 2009**). Donc, la plupart des *Streptomyces* se comportent en bactéries mésophiles (avec une croissance maximale à une température variant entre 25°C à 30°C) et neutrophiles (croissance entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité) (**Madigan et Martinko, 2007**). Les *Streptomyces* ont également été détectés dans les eaux marines mais à de faibles concentrations en comparaison avec les eaux douces et dans l'air ou généralement ils sont présents sous forme de spores (**Reponen et al., 1998**).

### 7.4.- Les métabolites secondaires produits par les *Streptomyces*

Les *Streptomyces* représentent la source la plus importante de métabolites secondaires présentant une activité biologique d'intérêt pour la santé humaine et animale: antibactérienne (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), antifongique (nystatine), antivirale (tunicamycine), antiparasitaire (ivermectine), immunosuppressive (rapamycine), antitumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur d'enzyme (acide clavulanique) (**Demain, 2000**).

### III. LES ANTIFONGIQUES

#### 1.- Définition

Le mot antifongique réfère à un composé capable de tuer ou d'inhiber la croissance d'un champignon. De nombreux antifongiques sont utilisés en médecine tel la nystatine qui est produite par *Streptomyces noursei* est par exemple utilisée pour le traitement de différentes infections par des levures, notamment des *Candida* (Fjaervik and Zotchev, 2005). Ces substances antifongiques ont d'origines: soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse ou semi synthèse.

#### 2.- Classification des antifongiques

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

##### 2.1.- Classification selon la structure

Les antibiotiques antifongiques présentent une large diversité structurale (Odds *et al.*, 2003). Ils peuvent être des lactones macrocycliques (ex: la nystatine), des analogues de nucléosides (ex: les azolés et leurs dérivés), des diterpènes tétracycliques (ex: les sordarines), des oligopeptides cycliques (ex: les pneumocandines), des  $\beta$ -aminoacides (ex: la cispentacine), des oligosaccharides (ex: les fusacandines), des quinones (ex: les pradimicines), des allylamines (ex: la naftifine, la terbinafine), des thiocarbamates (ex: la tolnaftate, la triallate), des peptides cationiques naturels (ex: les cécropines, les dermaseptines) ou synthétiques (ex: la dolastatine 10), etc (Vago *et al.*, 1994; Groll *et al.*, 1998; Andriole, 1999).

##### 2.2.- Classification selon leur origine

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

###### 2.2.1.- Antifongiques naturels

###### 2.2.1.1- Antifongiques polyéniques

Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B, la nystatine et la natamycine (Vandeputte, 2008).

###### 2.2.1.2- Antifongiques non polyéniques

Les antifongiques non polyéniques possèdent des structures chimiques très variées et peuvent appartenir aux groupes suivants: glucides (ex: la validamycine, la kasugamycine), quinones (ex: les nanaomycines), polypeptides (ex: la cyclosporine A), hétérocycles azotés (ex: la tunicamycine, la blasticidine S, les polyoxines), polyéthers (ex: la nigéricine, la nonensine), composés alicycliques (ex: le cycloheximide) et composés aromatiques (ex: la griséofulvine). Parmi les antifongiques non polyéniques commercialisés, on a la griséofulvine, la flucytosine, des échinocandines, les pneumocandines, les pradimicines et les bénanomicines (**Dupont, 2006**).

### 2.2.2.- Antifongiques de synthèse chimique

Une partie considérable des molécules de synthèse est employée en fongithérapie humaine et vétérinaire (**Desroy, 2004; Sangamwar et al., 2008**). Nous pouvons citer comme exemple: les quinolones, les allylamines et dérivés, l'amorolfine, la tolnaftate, les thiocarbamates, la flucytosine, le ciclopirox, les azolés, les conazoles, les dérivés de l'imidazole et du triazole, etc.

### 2.3.- Sites et modes d'action des antifongiques

Selon **Hulin et al. (2005)**, les antifongiques agissent principalement selon quatre mécanismes d'action:

- altération du fonctionnement de la membrane cellulaire (ex: l'amphotéricine B);
- inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN (ex: la flucytosine);
- inhibition de la synthèse de l'ergostérol nécessaire à la formation de la membrane de la cellule fongique (ex: les dérivés azolés);
- inhibition de la synthèse des glucanes de la paroi cellulaire (ex: les échinocandines).

### 3.- Stratégies actuelles de recherche de nouveaux antifongiques

Quatre voies principales de recherche des molécules antifongiques sont en exploitation (**Bretagne, 2005**):

- la première voie consiste à créer de nouvelles molécules dérivées d'antifongiques connus. Le meilleur exemple est celui des triazolés (posaconazole, ravuconazole et voriconazole) (**Diekema et al., 2003**).

- la deuxième voie cherche à mettre en évidence des cibles spécifiques des champignons comme la biosynthèse des glucanes, des mannanes ou de la chitine (**Bretagne, 2007**). Celle-ci a généré des dérivés semi-synthétiques d'antifongiques tels que les échinocandines

(ciclofungine, versicor ou V-candin), les pneumocandines (caspofungine ou cancidas), les bénomonicines, les pradimicines ou les nikkomyces (**Fantaine et al., 2008**).

- la troisième voie utilise des formulations originales à base de liposomes, de cyclodextrines, de cochléates ou de nanoparticules susceptibles d'améliorer la biodisponibilité et de diminuer la toxicité des antifongiques connus (**Hulin et al., 2005**).

- la dernière et quatrième voie est la recherche de nouveaux antifongiques naturels.

#### **4.- Les antifongiques utilisés contre *Candida***

*Candida albicans* répond habituellement aux antifongiques suivants : L'amphotéricine B [AmB] désoxycholate qui reste le médicament de référence (inconvenient majeur : toxicité rénale), les azolés (kétoconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole), et les échinocandines (caspofungine, anidulafungine, micafungine) (**Ascioglu et al., 2002**).

## **IV. LES DATTES**

### **1. Description des dattes**

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, ou arrondie. Elle est composée d'un noyau ayant une consistance dure, entouré de chair.

La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée de:

- un épicarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau.
- un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et est de couleur soutenue.
- un endocarpe de teinte plus claire et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (**Espiard, 2002**).

La forme, la taille et la couleur des fruits varient selon la variété. Leurs dimensions sont très variables de 1,5 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 15 g. Leur couleur varie du blanc jaunâtre au sombre très foncé presque noir, en passant par les ambres, rouges et bruns (**Munier, 1973**).

### **2.- Composition biochimique**

#### **2.1.- Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe " :**

##### **2.1.1.- L'eau**

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % (**Noui, 2007**).

### 2.1.2.- Les sucres

Les sucres sont les constituants majeurs des dattes. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement trois types : saccharose, fructose et glucose (**Estanove, 1990**) Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol (**Favier et al., 1993; Siboukeur, 1997**). La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 70 et 90 % du poids de la matière sèche (**Belguedj, 2001**).

### 2.1.3.-Les fibres

La datte est riche en fibres, elle en apporte 8.1 à 12.7 % du poids sec, (**Al-Shahib et Marshall, 2002**). Selon **Benchabane (1996)**, les constituants pariétaux de la datte sont : la pectine, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

### 2.1.4.- Les protéines

Les dattes présentent des teneurs faibles en composés protidiques, généralement moins de 3% (MS) (**Khallil et al., 2002 ; Besbes et al., 2009**). **Favier et al., (1993)** ont noté la présence des acides aminés suivants dans la datte: Isoleucine, Leucine , Lysine, Méthionine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Thréonine, Tryptophane, Valine, Arginine ,Histidine, Alanine ,Acide aspartique, Acide glutamique, Glycocolle ,Proline, Sérine.

### 2.1.5.- Les acides gras

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais (**Djouab, 2007**). Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation.

### 2.1.6.- Les minéraux

La caractéristique la plus remarquable des dattes réside dans la présence de minéraux et d'oligoéléments particulièrement abondants dépassant nettement les autres fruits secs. (**Benchelah et Maka, 2008**) (Tableau 1).

### 2.1.7.- Les vitamines :

La datte ne constitue pas une source importante de vitamines. La fraction vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs appréciables de vitamines du groupe B (Tableau 2). Ce sont des précurseurs immédiats des coenzymes indispensables à toutes les cellules vivantes et jouent un rôle primordial (**Vilkas, 1993**).

**Tableau 1.** Composition minérale de datte, en mg/100g de la partie comestible (**Siboukeur, 1997**)

| Eléments minéraux | Teneur |
|-------------------|--------|
| Potassium (K)     | 664    |
| Chlore (Cl)       | 256    |
| Calcium (Ca)      | 80,50  |
| Magnésium (Mg)    | 17,38  |
| Fer (Fe)          | 2,03   |
| Sodium (Na)       | 2,03   |
| Cuivre (Cu)       | 1,92   |
| Manganèse (Mn)    | 2,10   |

**Tableau 2.** Composition vitaminique moyenne de la datte sèche (**Favier et al., 1995**)

| Vitamines                | Teneur moyenne pour 100g |
|--------------------------|--------------------------|
| Vitamine C               | 2,00 mg                  |
| Thiamine (B1)            | 0,06 mg                  |
| Riboflavine (B2)         | 0,10 mg                  |
| Niacine (B3)             | 1,70 mg                  |
| Acide pantothénique (B5) | 0,80 mg                  |
| Vitamine (B6)            | 0,15 mg                  |
| Folates (B9)             | 28,00 µg                 |

## 2.2.- Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "

Le noyau présente 7 à 30 % du poids de la datte. Il est composé d'un album en blanc, dur et corné protégé par une enveloppe cellulosique (**Espiard, 2002**). Les travaux de recherche menés sur la composition des noyaux ont démontré la présence de protéines, de glucides, de lipides, et de minéraux (K, P, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Cu). En plus des protéines, le noyau contient des acides gras tels que l'acide oléique, palmitique, laurique et linoléique mis en évidence dans l'huile extraite des graines (**Al Houti et al., 1998**).

### 3.- Jus de dattes

La fabrication du jus de dattes est connue depuis l'antiquité dans les pays de Moyen orient où on trouve une grande quantité de dattes de qualité médiocre destinée à la transformation (**Chaira et al., 2007**). Concernant la préparation de jus, les pulpes de datte sont finement hachées et une quantité d'eau est ajoutée (**Mahjoub et Jraidi, 1992**), le mélange est ensuite incubé au bain-marie selon un couple temps-température donnée. Puis, on procède à une étape de filtration suivie d'une clarification pour éliminer les déchets et les solides insolubles. D'après **Episard (2002)**, on peut obtenir après six à dix heures de diffusion, selon la variété, un jus titrant à environ 50 % d'extrait sec soluble mesuré au réfractomètre. Le jus de dattes peut être utilisé dans nombreuses préparations alimentaires telles que les boissons gazeuses, le vinaigre, l'alcool, etc (**Estanove, 1990**).

#### 3.1.- Utilisation du jus de dattes

##### 3.1.1. Production de P.O.U (Protéines d'Organismes Unicellulaires)

**Bessah et Touzi (2001)** ont essayé d'explorer le jus de dattes en tant que substrat de fermentation pour la production de *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus ont montré que les sucres de jus de dattes constituent une matière première de base pour la production de protéines d'organismes unicellulaires. Des travaux ont été entrepris par **Nancib et al. (1997)** ont montré que le jus des dattes enrichi en hydrolysats et en cendres de noyaux de dattes, constitue un bon milieu de culture pour la production de *Saccharomyces cerevisiae*.

##### 3.1.2.- Production d'oxytétracycline

Différentes souches productrices d'oxytétracycline ont été utilisées dans un milieu à base de dattes. Les résultats obtenus ont montré que *Streptomyces rimosus* est la plus performante (**Abou Zied et al., 1991**).

##### 3.1.3.- Production d'acide citrique

Le jus de dattes constitue un bon milieu pour la production d'acide citrique. **Siboukeur et al. (2001)**, ont montré que l'utilisation du jus de dattes non enrichie améliore la production de l'acide citrique à partir d'*Aspergillus niger*. De même **Abou-Zeid et Khoja (1993)** ont montré que l'enrichissement du jus de dattes avec l'hydrolysats des noyaux de dattes permet d'améliorer la production de l'acide citrique à partir de *Yarrowia lipolytica*. **Al Obaidi et Berry (1979)** ont obtenu un rendement de 62% en utilisant un milieu à base de jus de dattes déionisé et une culture d'*Aspergillus niger*.

### 3.1.4.- Production d'alcool

La production d'éthanol à partir de jus de datte repose principalement sur l'utilisation de levures. **Kaidi et Touzi (2001)** ont utilisé des cellules libres et immobilisées de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont utilisés les deux souches: *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces uvarum* pour la production d'éthanol. Les meilleures performances ont été obtenues avec *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.1.5.- Production de vitamine B12

Le jus de dattes a été utilisé comme source de carbone pour la production de la vitamine B12 par *Streptomyces albidoflavus* et *Streptomyces antibioticus*. Les rendements obtenus sont similaires à ceux obtenus sur d'autres substrats tels que les mélasses (**El-Akidi- Hassen, 1982**).

## 4.-Valorisation des dattes à faible valeur marchande

Les dattes à moindre valeur marchand sont produites en grande quantité par le secteur phoenicicole algérien. Ses rebuts contiennent non seulement des teneurs élevées en sucres mais également en protéine, lipides, élément minéraux et vitamines (**Abou Zied et al., 1991**). Elles sont utilisées pour la production d'acides et alcools et de biomasse.

Actuellement, grâce aux procédés biotechnologiques, il est possible de valoriser les dattes de faible valeur marchande et de mettre leurs produits sur le marché local ou international. La datte peut être utilisée comme matière première dans l'élaboration de nombreux produits dont le sucre, les pates de datte, les jus, les sirops, les boissons gazeuses, la confiserie, l'alcool et le vinaigre (**Ould el Hadj, 2001**).

# *Matériel et méthodes*

## 1.-Matériel

### 1.1.- Les isolats d'actinobactéries

Deux isolats d'actinobactéries ont été utilisés dans le présent travail. Il s'agit de *Streptomyces* G24 et G68 isolés sélectivement par Belghit (2010) à partir de sols de palmeraies ou de Reg de Metlili (W. Ghardaïa) à profond de 20 mm. Le séquençage de ses ADNr a confirmé leur appartenance au genre *Streptomyces*. Ils ont été sélectionnés pour leurs activités antilevuriennes contre *Candida albicans*. Leurs provenances ainsi que leurs caractéristiques morphologiques sont consignées dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Provenances et quelques caractéristiques des souches de *Streptomyces* utilisés.

| Souches | Sol de :  | Antibiotique d'isolement | Morphologie                             |
|---------|-----------|--------------------------|---|
| G24     | Palmeraie | Pénicilline              | Chaines de type S, 1 à 3 tours, MA gris |
| G68     | Reg       | Rifampicine              | Chaines de type S, 1 à 6 tours, MA gris |

Note : S=Spira (chaines de spores spiralées) ; MA : Mycélium Aérien

### 1.2.- Le germe cible

Le germe cible utilisé est une levure de *Candida albicans*. Il provient du laboratoire d'analyse Ibn Rochd (Ghardaïa). Cette souche a été cultivée sur milieu solide convenable Sabouraud.

### 1.3.- Les milieux de production

Dans ce travail on a utilisé trois milieux de culture, un milieu naturel : jus de dattes, et deux milieux semi synthétiques couramment utilisés pour la production d'antibiotiques par les actinobactéries. Il s'agit d'ISP2 à base de (glucose, extrait de levure, extrait de malt, agar) et Bennett à base de (glucose, peptone, extrait de viande, agar) (la composition précise de ces milieux est donnée en annexe I). Le milieu du jus de dattes a été préparé à partir d'une variété de dattes « ghars » qui est à moindre valeur marchande (12 Da pour le Kg) (Photo en Annexe). Le pH a été ajusté entre 7,2. Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclave (HIRAYAMA) en cycle humide 20 min à 120 °C.

Les caractéristiques culturales des deux souches ont été notées sur les milieux de culture utilisés et sur le jus de dattes. Cette étape consiste à déterminer la couleur du mycélium Aérien (MA) et de Substrat (MS) ainsi que la production ou non des pigments solubles. La micromorphologie consiste à déterminer le type des chaines de spores. L'étude des caractéristiques culturales des colonies a été effectuée aux 7<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> jours d'incubation à 30°C

## 1.4.- Matériel du laboratoire

Les appareils, les produits chimiques et petit matériel utilisés sont représentés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Matériel utilisé

| Appareils           | Produits chimiques | Petit matériel     |
|---------------------|--------------------|--------------------|
| Autoclave           | Méthanol           | Bec bunsen         |
| Etuve               | Ethanol            | Boites de Pétri    |
| Shaker              | Glucose            | Emporte pièce      |
| Bain marie          | Extrait de levure  | Pipettes Pasteur   |
| pH mètre            | Extrait de malt    | Eprouvette graduée |
| Balance             | Agar               | Entonnoir          |
| Réfrigérateur       | NaNO <sub>3</sub>  | Filtre seringue    |
| Congélateur         | Peptone            | Micro seringue     |
| Evaporateur rotatif | HCl (0,1 N)        | Flacons 250 ml     |
| Four Pasteur        | NaOH (0,1 N)       | Erlenmeyers        |
| Séchoir             | Hexane             | Disques de papiers |
| Vortex              | Dichlorométhane    | Papiers Joseph     |
| Plaque chauffante   | Acétate d'éthyle   | Piluliers          |
| Chauffe ballon      | Butanol            | Béchers            |
| HPLC                | Eau ultra pure     | Pied à coulisse    |

## 2.- Méthodes

### 2.1.- Préparation du jus de dattes

Après avoir lavé et dénoyauté les dattes, on a ajouté de l'eau à raison 2 litres par Kilogramme de pulpe de datte, puis chauffé le mélange à 80 C° pendant 2 heures à l'aide d'une plaque chauffante munie d'un agitateur magnétique. Le mélange a été filtré à travers un tissu puis le jus obtenu a été centrifugé à 6000 g tours/min pendant 10 minutes. Le surnagent recueilli a été utilisé comme une solution mère (D0) pour la préparation des dilutions suivantes : Jus de dattes /eau distillé (mL) : D1 (80/20), D2 (60/40), D3 (40/60) et D4 (20/80). Ces dilutions ont été utilisées pour la préparation des milieux de production d'antifongiques par les actinobactéries.

## 2.2.- Choix de la dilution du jus de dattes (milieu solide)

Afin de choisir les meilleurs milieux solides de croissance et de production des antifongiques, nous avons préparé des milieux solides en ajoutant de l'agar à raison de 20 g/L aux différentes dilutions du jus de dattes. Les pH ont été ajustés entre 7,2 en utilisant HCl (0,1N) et NaOH (0,1N).

Chaque souche d'actinobactérie a étéensemencée en stries très serrées à la surface des boîtes de Pétri contenant chacune 20 ml de milieu de culture. Les cultures sont incubées jusqu'à 14 jours à 30°C. Cette étape vise à apprécier la croissance de la souche d'actinobactérie, ainsi que la couleur du mycélium aérien et de substrat.

## 2.3.- Cinétique de production d'antifongiques sur milieu solide

L'activité antifongique des souches est évaluée par la méthode des cylindres d'agar (figure 7). Cette méthode consiste à ensemencer les souches à tester (les souches G68 et G24 de *Streptomyces*) sur les milieux solides (ISP2, Bennett, et milieu basé sur jus de datte) en stries très serrées, puis incubé dans l'étuve à 28°C. Au cours de l'incubation, des cylindres d'agar de 10 mm sont prélevés quotidiennement durant 10 jours à l'aide d'un emporte-pièce stérile et déposés à la surface du milieu sabouraud préalablementensemencé par *Candida albicans* à raison de  $10^7$  spores/ml (la concentration a été ajustée selon l'indice Mcfarland 0,5) correspondant à  $10^7$  spores/ml à l'aide d'un spectrophotomètre). Les boîtesensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 48h d'incubation à 28°C à l'aide d'un pied à coulisse (Bastide *et al.*, 1986).



Figure 7. Méthode des cylindres d'agar (Allane et Mobarki, 2019).

## 2.4.- Production d'antifongiques en fioles agitées

Nous avons voulu savoir s'il y a une production sur milieu liquide en plus déterminé le jour de production maximale. Pour cela, des expériences ont été menées sur 3 milieux de culture: ISP2, Bennett et jus de dattes.

### 2.4.1.- Préparation des précultures

Des pré-cultures sont préalablement préparées à partir de cultures des deux souches de *Streptomyces* (G68 et G24) poussant sur milieu solide ISP2. Les spores sont ainsi récupérées en surface et inoculées dans des tubes à essais contenant chacun 3 ml de milieu liquide. Les suspensions sont incubées au shaker à 30°C sous agitation à 250 rpm durant 2 jours. Un seul tube (meilleure croissance) servira à ensemercer 50 ml du même milieu liquide contenu dans des Erlenmeyers de 250 ml. Ces derniers sont incubés 10 jours à 28°C dans un shaker (figure8).



**Figure 8.** Incubation des cultures liquides au shaker (Allane et Mobarki, 2019).

### 2.4.2.- Cinétique de production d'antifongique sur milieu liquide

La cinétique de production d'antifongique a été suivie pendant 10 jours. Elle a pour but de déterminer le temps nécessaire pour qu'elle soit maximale. Pour cela, des Erlenmeyers (de 250 mL) contenant chacun 50 mL de l'un des 3 milieux (ISP2, Bennett et jus de dattes), sont ensemençés par la préculture correspondante et incubés à 30°C sous agitation rotative à 250

rpm. Des prélèvements quotidiens (200 µl) sont effectués afin de mesurer la production d'antifongiques contre la levure test utilisée.

La technique de mesure utilisée est celle des puits (Figure 8). Ces derniers ont été réalisés grâce à un emporte-pièce en cuivre (de 10 mm de diamètre) stérile sur le milieu ISP2 semi-solide (12 g d'agar par litre de milieu), coulé dans des boîtes de Pétri et préalablementensemencé par le germe cible. Une fois les puits sont prêts, la quantité aliquote (200 µL) est déposée dans le fond du puits. Les boîtes de Pétri sont mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances actives, tout en arrêtant momentanément la croissance des germes tests, puis incubées pendant 24 heures à 48 heures à 30°C. Le diamètre des zones d'inhibition est alors mesuré par un pied ou une règle millimétrée (Nouasri, 1996).

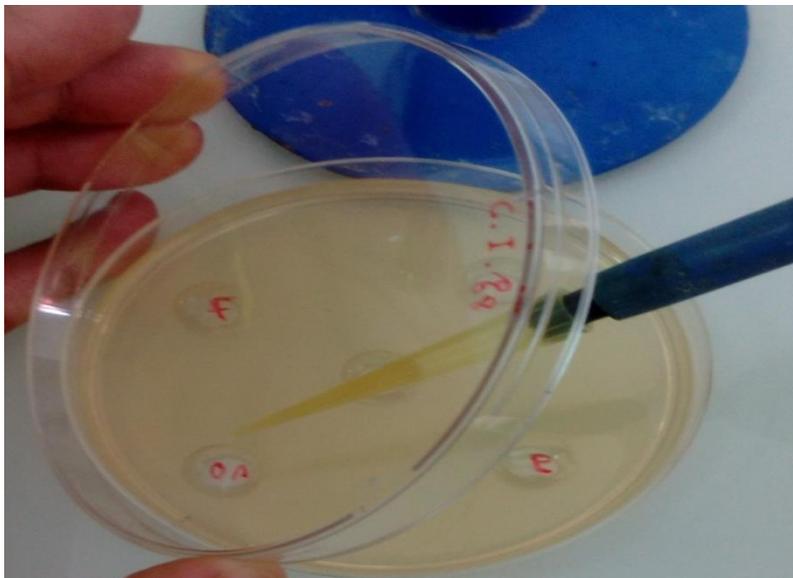


Figure 9. Technique des puits (Allane et Mobarki, 2019).

#### 2.4.3.- Estimation de la variation du pH

Des prélèvements quotidiens à intervalle de 24 h ont été effectués pour l'évolution du pH pendant 10 jours, sur les 3 milieux (ISP2, Bennett et Jus de datte) dans des conditions aseptiques à partir des erlenmeyers en agitation. Le volume prélevé est 2ml.

### 3.- Extraction des métabolites antilevuriennes et test d'antibiographie

L'extraction des métabolites des activités antilevuriennes à partir des filtrats de culture est faite avec des solvants non miscibles à l'eau et de polarité différente (l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol). Ainsi, 200 ml de filtrat de chaque milieu de chaque souche sont divisés en quatre lots de 50 ml. Le même volume de chaque solvant leur a été ajouté dans une ampoule à décanter. Les phases organiques ont été récupérées, puis

déshydratées après passage à travers un filtre contenant du sulfate de sodium anhydre. Elles ont été ensuite évaporées à 40°C à l'aide d'un rotavapeur (sous vide). Les résidus secs sont solubilisés dans du méthanol, transvasés dans des piluliers, puis séchés et conservés à 4°C. Ils sont ensuite repris dans 0,5 ml de méthanol et leur activité a été testée par antibiographie sur disques de papier whatman n° 3 (6 mm). Ces derniers sont imprégnés de 70 µl d'extraits organiques à tester et sont séchés jusqu'à évaporation du solvant (méthanol) puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 min et déposés aseptiquement à la surface du milieu ISP2 semi solide préensemencées par le germe cibles de *Candida albicans* et coulé en boîtes de Pétri. Les boîtes sont mises à 4°C durant 2 heures pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance du germe cible. Elles sont ensuite incubées à 30°C, pendant 48 heures. L'activité antibiotique est appréciée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques (Belghit, 2016).

### 5.- Purification des fractions actives par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée comme dernière étape de purification des antifongiques.

L'appareil utilisé est analytique de marque YL9100 plus équipé des éléments suivants:

- un injecteur de type Rhéodine 7725i relié à une boucle d'injection de 20 µL.
- un Système de pompe: YL9110.
- un détecteur UV-Visible dual bande type YL9160
- une colonne à phase inverse TEKNOKROMA C18 (5 µm, 250 mm) avec sa pré-colonne (5 µm, 10 x 10 mm)
- une pré-colonne de garde TEKNOKROMA C18, 5 µm, 10 x 10 mm.
- un Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données: YL Clarity

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 d'antifongique sont injectés et analysés. Le gradient utilisé est linéaire et continu de 20 à 100% méthanol/eau pendant 40 min. Les produits sont détectés par UV aux longueurs d'onde de 220 nm et 254 nm.

# ***Résultats et discussion***

### 1.- Choix de la dilution du jus de dattes

Avant de réaliser la production d'antifongiques des deux souches d'actinobactéries. Nous avons évalué leur croissance sur le milieu solide (jus de datte + agar) de différentes dilutions (D0, D1, D3 et D4). Il faut rappeler que D0 est la solution mère qui correspond à 1Kg de pulpe de dattes dans 2L d'eau, D1 (80% de D0 + 20% d'eau distillé ), D2 (60% de D0 + 40% d'eau), D3 (40% de D0 + 60% d'eau) et D4 (20% de D0 + 80% d'eau).

Les actinobactéries qui ont étéensemencées en stries serrées ont été incubées pendant 14 jours à 30°C. Les caractéristiques culturales sont notées au 7è et au 14è jour d'incubation. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Les milieux de dilutions D0, D1 et D2 n'ont pas montré aucune croissance pour les deux souches d'actinobactéries. Sur le milieu de la dilution 3, une croissance très faible a été remarquée pour la souche G68 alors pour la souche G24 est nulle. Une croissance moyenne a été remarquée pour les deux souches sur le milieu de la dilution D4.

**Tableau 5. Croissance des deux souches sur jus de dattes de différentes dilutions**

| Dilution<br>Souche | D0 | D1 | D2 | D3 | D4 |
|--------------------|----|----|----|----|----|
| G24                | –  | –  | –  | –  | +  |
| G68                | –  | –  | –  | ±  | +  |

Note: – pas de croissance ; ± faible croissance ; + croissance moyenne

### 2.- Croissance sur milieu jus de dattes D4 additionné d'une source d'azote

Bien que les deux souches G24 et G68 n'ont pas montré qu'une croissance faible à moyenne sur les milieux de jus de dattes D3 et D4, nous avons essayé d'améliorer cette croissance en ajoutant d'une source d'azote au milieu de jus de dattes de la dilution D4. Ainsi, Nous avons testé 4 sources d'azote dont 3 sont organique complexes (extrait de levure, extrait de malt et peptone) et une simple minérale (NaNO<sub>3</sub>). La croissance des deux souches a été notée au 7è et au 14è jour d'incubation à 30°C. Les résultats sont consignés dans le tableau 6.

**Tableau 6. Croissance sur milieu jus de dattes D4 additionné d'une source d'azote**

| milieu<br>Souche | D4 + Extrait de levure | D4 + Extrait de malt | D4 + Peptone de caséine | D4 + NaNO <sub>3</sub> |
|------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
| G24              | –                      | –                    | –                       | +++                    |
| G68              | ++                     | –                    | –                       | +++                    |

Note: – pas de croissance ; ++ croissance bonne ; +++ croissance très bonne

Les résultats obtenus ont montré que les deux souches n'ont pas poussé sur la dilution D4 additionnée d'extrait de malt et de peptone. La seule souche G68 qui a poussé bien sur le milieu de la dilution D4 additionné de l'extrait de levure. Cependant, une meilleure croissance des deux souches a été constatée sur le milieu de la dilution D4 additionné d'une source azotée minérale (NaNO<sub>3</sub>).

### 3.- Caractéristiques culturelles et morphologiques

Les résultats des caractéristiques culturelles et morphologiques des 2 isolats (G24 et G68) cultivés sur différents milieux solides (ISP2, Bennett et Jus de dattes D4+ NaNO<sub>3</sub>), sont rapportés dans le tableau 7. Les caractéristiques culturelles de chaque isolat sont les suivantes :

#### 3.1.-Caractéristiques culturelles de l'isolat G24

La croissance de l'isolat G24 est bonne sur les milieux ISP2, Bennett et JDD4+N après 2 semaines d'incubation à 30°C. Il a un mycélium aérien gris blanchâtre sur les milieux ISP2 et JDD4 et avec une couleur grise sur Bennett. Son mycélium de substrat n'est pas fragmenté, de couleur gris clair sur ISP2, gris jaunâtre sur BN, et ISP4 et jaune clair sur JDD4. Ses chaînes de spore sont spiralées de type S. Les pigments diffusibles ne sont pas produits sur tous les milieux (figure 10).

#### 3.2.-Caractéristiques culturelles de l'isolat G68

L'isolat G68 possède une croissance bonne sur les milieux ISP2, Bennett et JDD4+N. Le mycélium aérien est gris sur ISP2 et gris blanchâtre sur Bennett et JDD4+N. Le MS est gris foncé sur ISP2, jaune grisâtre sur Bennett et jaune claire sur JDD4+N. Cet isolat a une morphologie typique des *Streptomyces* de type S (spira). Les pigments diffusibles sont produits sur le milieu ISP2, Bennett de couleur marron et traces sur JDD4+N (figure 11).

**Tableau 7.** Caractéristiques culturelles et morphologiques des isolats

| Isolat | Milieu  | Croissance | Macromorphologie |                |        | Micromorphologie    |
|--------|---------|------------|------------------|----------------|--------|---------------------|
|        |         |            | M.A.             | M.S.           | P.S.   |                     |
| G24    | ISP2    | +++        | gris blanchâtre  | gris claire    | -      | Type S, 1 à 3 tours |
|        | Bennett | +++        | gris             | gris jaunâtre  | -      | Type S, 1 à 3 tours |
|        | JDD4+N  | +++        | gris blanchâtre  | jaune claire   | -      | Type S, 1 à 3 tours |
| G68    | ISP2    | +++        | gris             | gris foncé     | marron | type S, 2 à 6 tours |
|        | Bennett | +++        | gris blanchâtre  | Jaune grisâtre | marron | type S, 2 à 6 tours |
|        | JDD4+N  | +++        | gris blanchâtre  | jaune claire   | traces | type S, 2 à 6 tours |



**Figure 10.** Culture de la souche G24 sur milieux solides ISP2, Bennett et jus de dattes.



**Figure 11.** Culture de la souche G68 sur milieux solides ISP2, Bennett et jus de dattes+N.

#### 4.- Cinétique de production sur milieu solide

La cinétique de production des molécules anti-*Candida* ont été suivies pendant 10 jours. Les activités ont été mesurées par la méthode des disques d'agar. Nous avons effectué la production en utilisant le milieu jus de dattes de la dilution D4 additionné d'azote minéral ( $\text{NaNO}_3$ ). Ce milieu a présenté une bonne croissance pour les deux souches G24 et G68. La production sur ce milieu a été comparée à celle sur les deux milieux semi synthétiques ISP2 et Bennet.

##### 4.1.-Cinétique de production de la souche G24 sur milieu solides

La cinétique de production pour cette souche débute le 2<sup>e</sup> jour d'incubation et atteint son maximum le 6<sup>e</sup> jour (30mm d'inhibition) dans le milieu de jus de dattes additionné de l'azote. Pour les deux autres milieux le maximum est atteint dès le 2<sup>e</sup> jour (21mm) dans le milieu ISP2 et dès le 3<sup>e</sup> jour (22mm) dans le Bennett. Les résultats de la cinétique de production de la souche G24 sont consignés dans les figures 12 et 13. Le phénomène de diauxie est clair sur le milieu de jus de dattes.

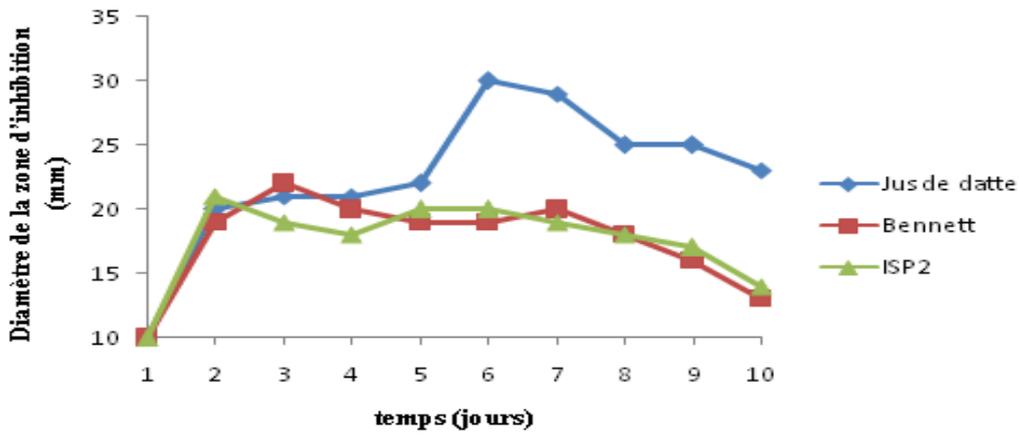


Figure.12. Cinétique de production des activités anti-*Candida* de la souche G24 sur milieux solides (Les valeurs des diamètres d'inhibition sans compter le diamètre du disque d'agar 10 mm)

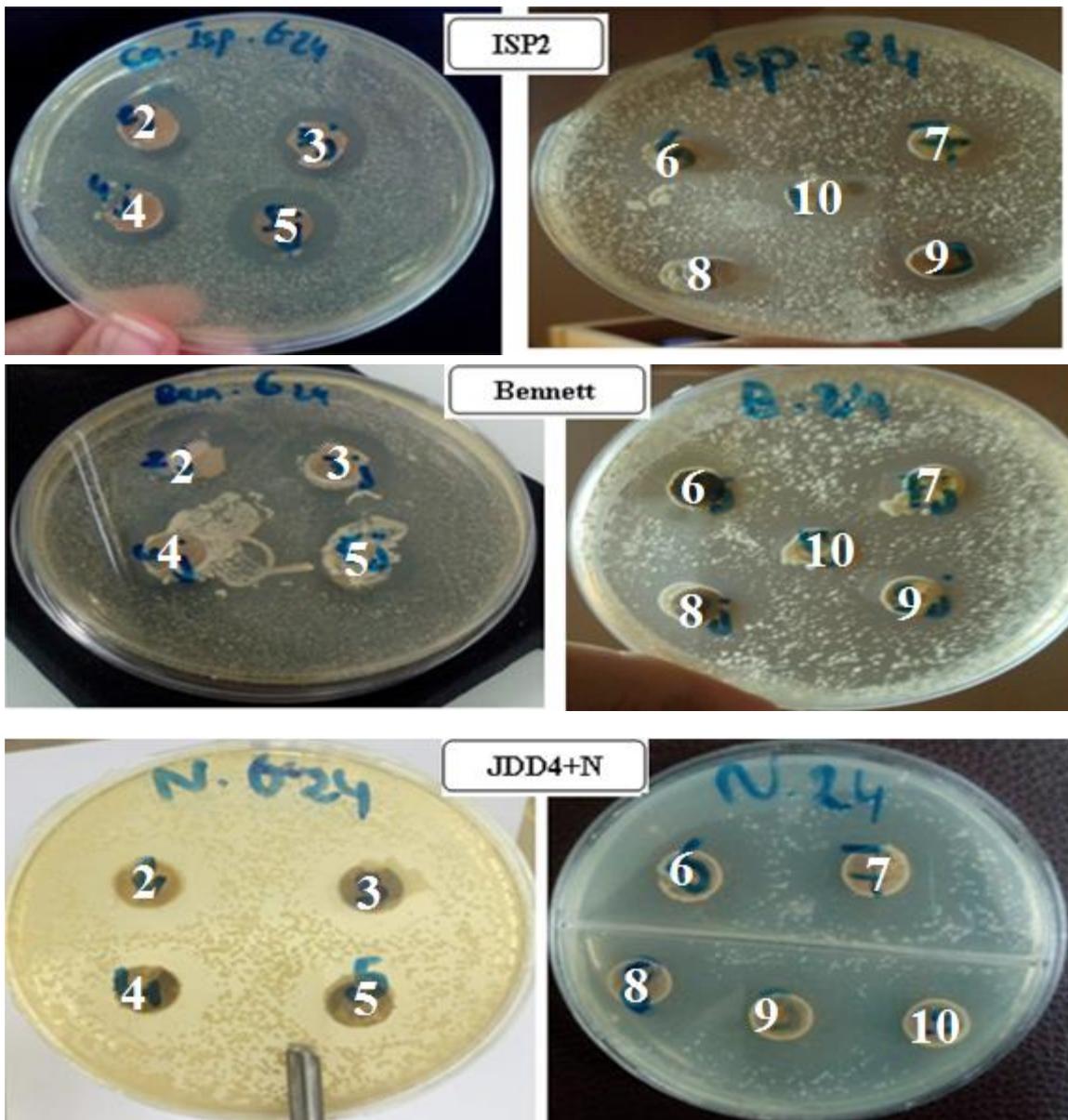


Figure. 13. Activité anti-*Candida* de la souche G24 (méthode des cylindres d'agar)

#### 4.2.-Cinétique de production de la souche G68 sur milieux solides

L'activité anti-*Candida* de la souche G68 a été décelée à partir du 2<sup>e</sup> jour d'incubation dans les trois milieux de culture. Elle est meilleure dans le milieu de jus de dattes et atteint son maximum (27 mm) au 6<sup>e</sup> jour d'incubation. Par contre, elle atteint son maximum au 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jour pour les deux milieux ISP2 et Bennett successivement. Ses diamètres d'inhibition sont 20 et 21mm. Le phénomène de diauxie a été constaté également sur milieu jus de dattes. Les résultats sont présentés dans les figures 14 et 15.

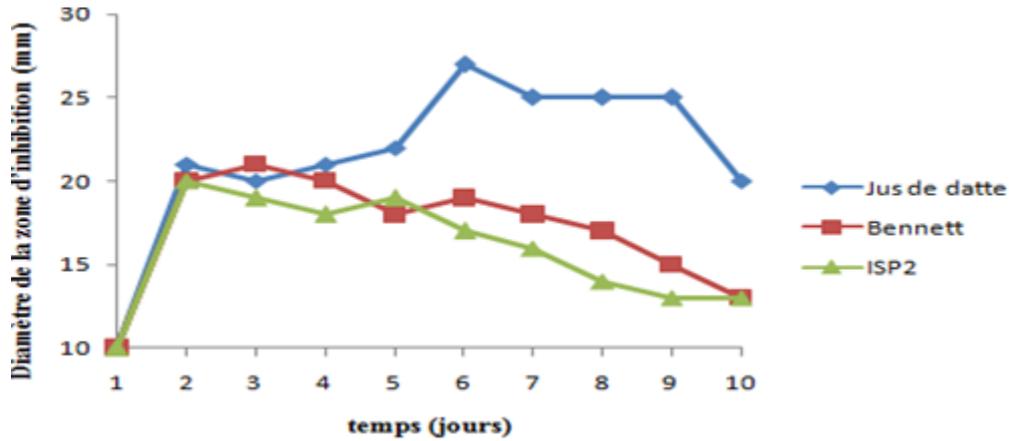
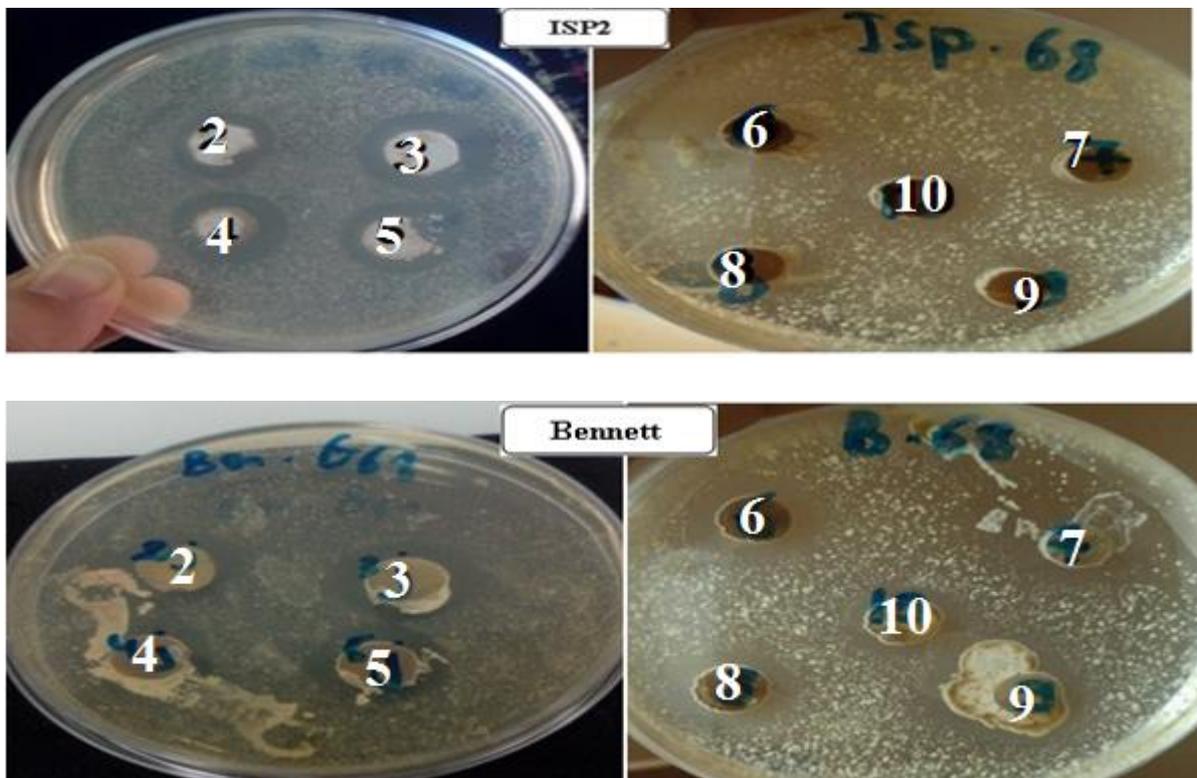
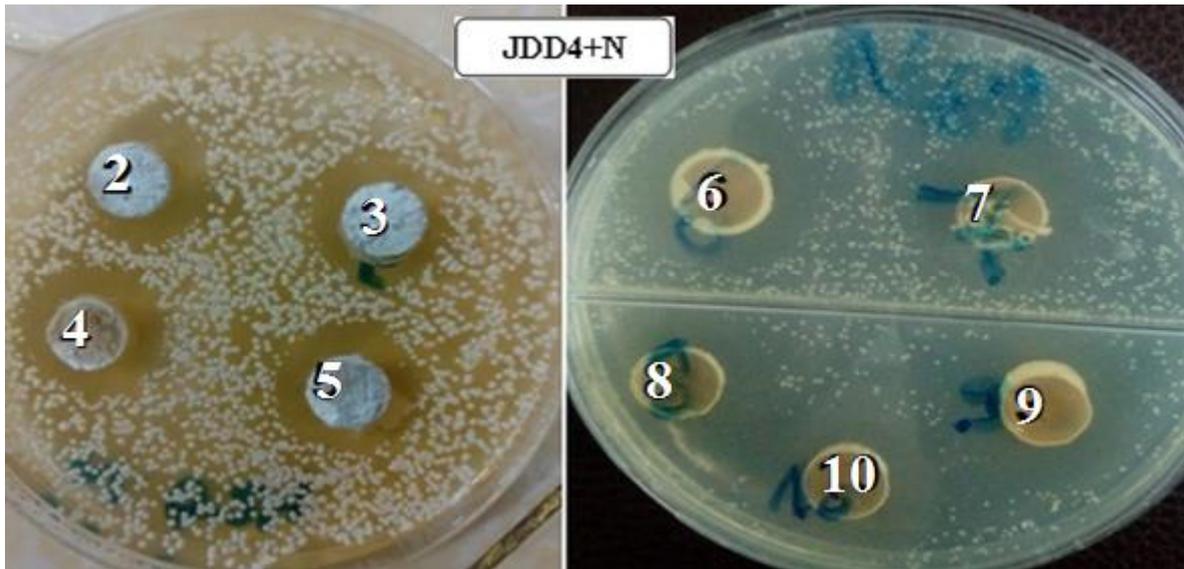


Figure.14. Cinétique de production des activités anti-*Candida* de la souche G68 sur milieux solides. (Les valeurs des diamètres d'inhibition sans compter le diamètre du disque d'agar 10 mm)





**Figure. 15.** Activité anti-*Candida* de la souche G68 (méthode des cylindres d'agar)

### 5.- Cinétique de production des antifongiques sur milieux liquides

Les cinétiques de production des métabolites antifongiques, ont été suivies en culture liquide pour les deux souches de *Streptomyces* (G24 et G68) sur milieux Bennett, ISP2 et jus de datte pendant 10 jours (figure16 et 17).



**Figure 16.** Culture de la souche G24 sur milieux liquides ISP2, Bennett et jus de dattes D4+NaNO<sub>3</sub>.

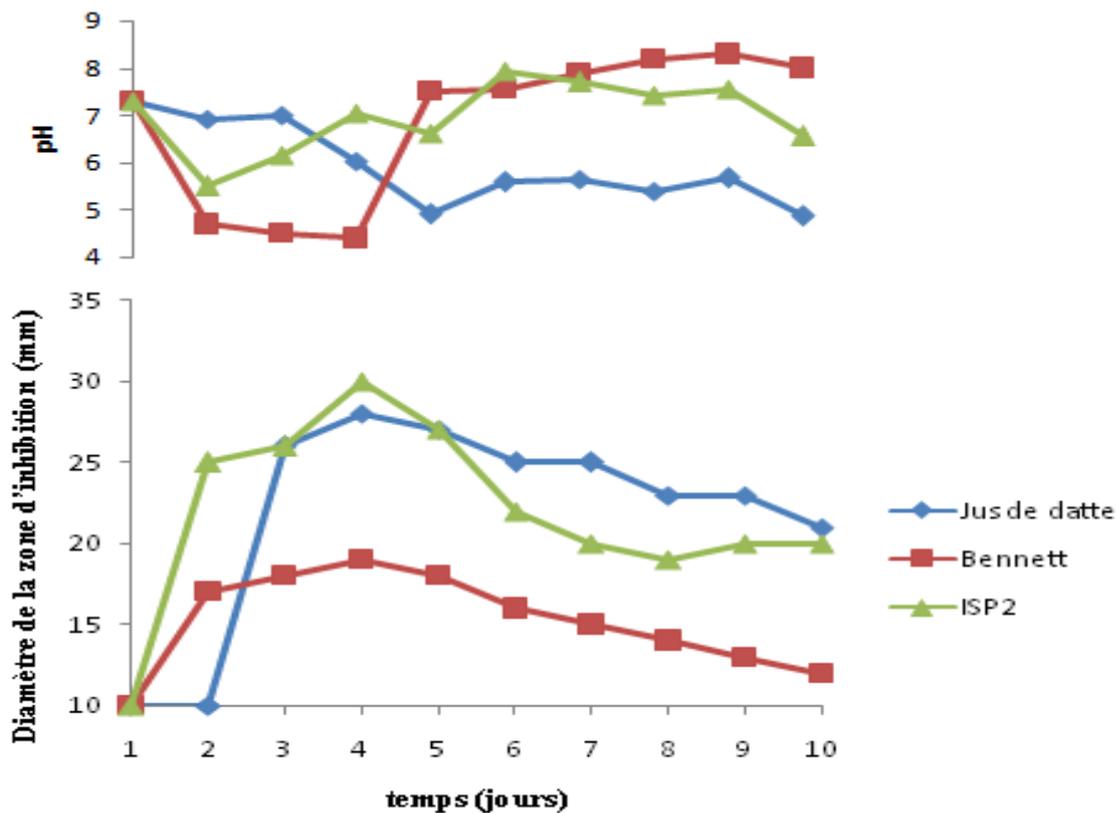


**Figure 17.** Culture de la souche G68 sur milieux liquides ISP2, Bennett et jus de dattes D4 + NaNO<sub>3</sub>.

### 5.1.-Cinétique de production de la souche G24 sur milieu liquide

La production des métabolites antifongiques pour cette souche apparaît dès le Deuxième jour d'incubation sur les milieux ISP2 et Jus de dattes. Elle est maximale au quatrième jour sur les deux milieux et atteint les diamètres d'inhibition (30 mm) et (28 mm) successivement. Par contre sur le milieu Bennett la production ne s'est manifestée qu'à partir du 3è jour d'incubation et atteint le maximum au 4è jour (18 mm) puis diminue.

Pour la cinétique du pH, on peut dire d'une façon générale qu'un abaissement léger du pH dans les trois milieux de culture est remarqué durant les premiers jours d'incubation (jusqu'au pH = 4,9 en milieu jus de dattes+NaNO<sub>3</sub>, pH = 5,5 en milieu ISP2 et pH= 4,4 en milieu Bennett). Il augmente progressivement pour atteindre des valeurs peu alcalines dans les milieux ISP2 et Bennett (pH= 7,93 en milieu ISP2 et pH= 8,3 en Bennett) puis diminue pour se rapprocher de la neutralité en fin de culture. Par contre, en milieu de dattes le pH augmente légèrement mais reste toujours acide au tour du pH= 5,67. Les résultats sont illustrés aux figures 18 et 19.



**Figure.18.** Cinétique de production et du pH des activités anti-*Candida* de la souche G24 sur milieux liquides (Les valeurs représentent le diamètre d'inhibition sans compter le diamètre du puits qui est de 10 mm).

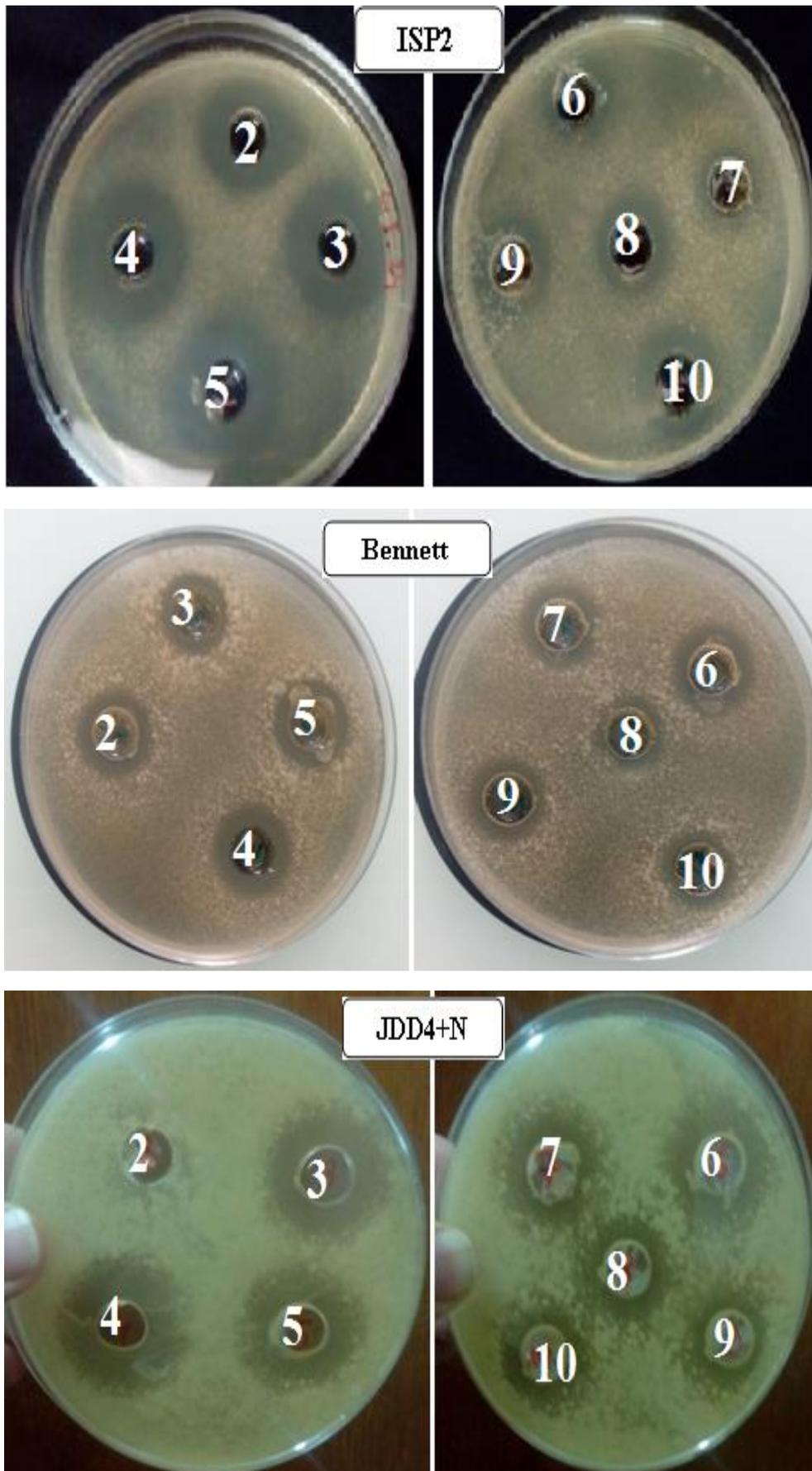
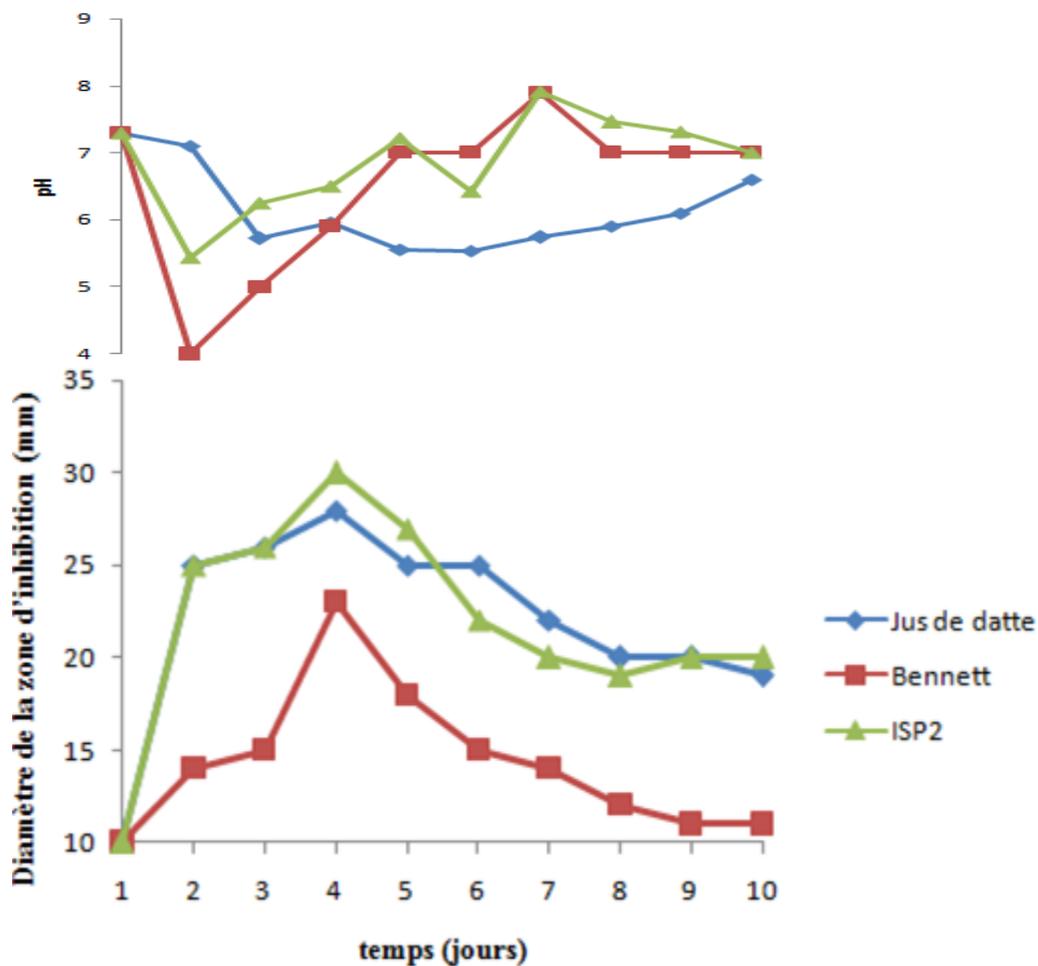


Figure. 19. Activité anti-*Candida* de la souche G24 (méthode des puits)

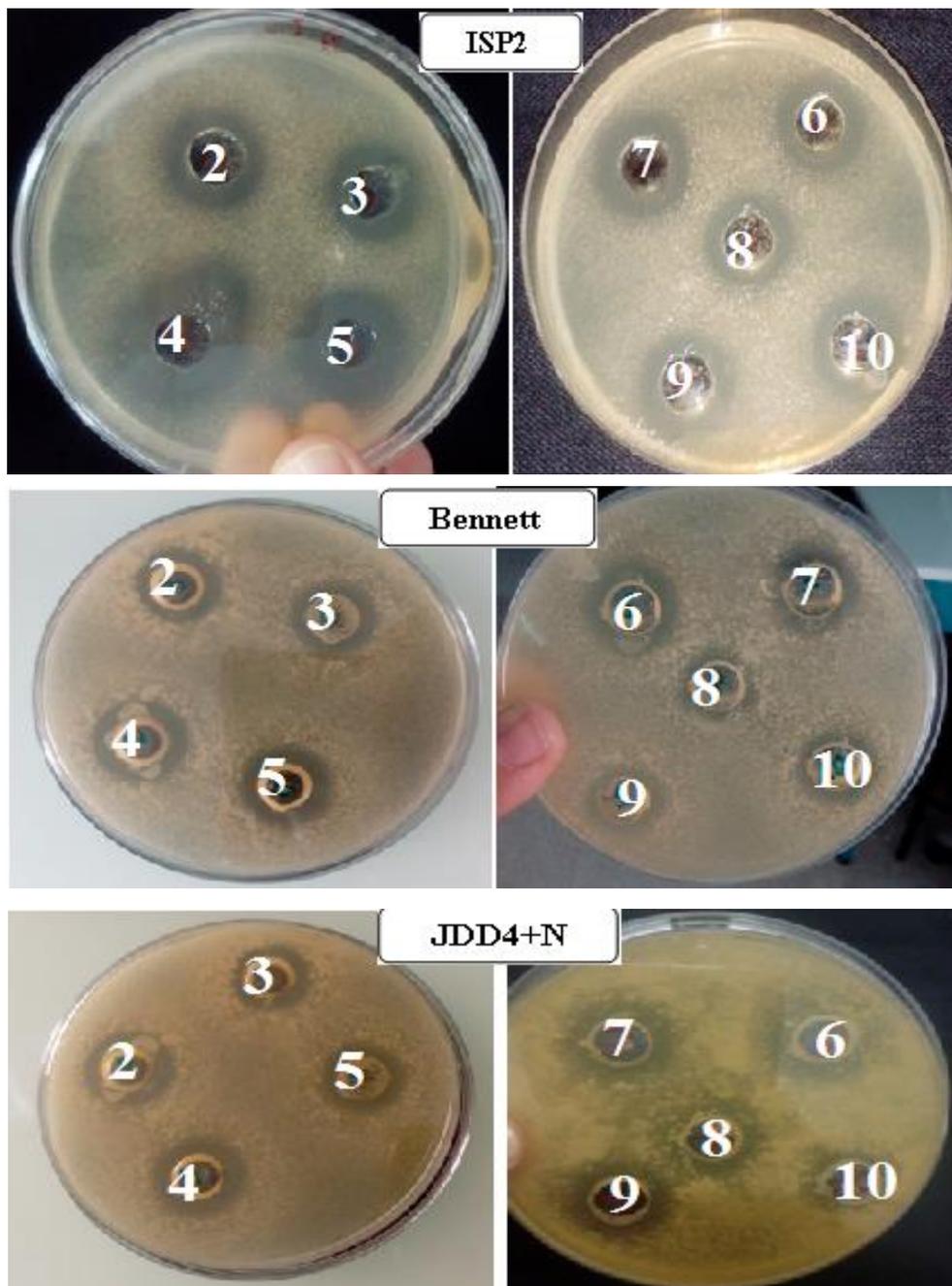
### 5.2.-Cinétique de production de la souche G68 sur milieux liquides

Les résultats de la cinétique de production et du pH de la souche G68 sont consignés dans les figures 20 et 21. L'activité anti-*Candida* est observée dès le 2<sup>e</sup> jour d'incubation dans tous les milieux, puis augmente jusqu'au 4<sup>e</sup> jours où elle enregistre son maximum (30 mm en milieu ISP2), (23mm en milieu Bennett) et (28 mm en milieu JDD4+NaNO<sub>3</sub>) puis enfin diminue.

Les courbes représentant la variation du pH montrent que ce dernier abaisse légèrement au début (jusqu'au pH = 5,44 en ISP2, pH = 4 en milieu Bennett et pH = 5,53 en milieu JDD4+N). Il augmente progressivement pour atteindre des valeurs neutres ou peu alcalines (jusqu'au pH = 7,9 en milieux ISP2 et Bennett et pH = 6,6 en milieu JDD4+NaNO<sub>3</sub>)



**Figure.20.** Cinétique de production et du pH des activités anti-*Candida* de la souche G68 sur milieux liquides (Les valeurs représentent le diamètre d'inhibition sans compter le diamètre du puits qui est de 10 mm).



**Figure. 21.** Activité anti-*Candida* de la souche G68 (méthode des puits).

#### 6.- Comparaison de la production des antifongiques des deux souches G24 et G68 sur les milieux solides et liquides

Nous avons voulu comparer la production des antifongiques des deux souches G24 et G68 sur les trois milieux utilisés ISP2, Bennett et jus de dattes additionné de  $\text{NaNO}_3$ . Pour cela, nous avons calculé les moyennes de production sur tous les milieux solides et liquides. Les résultats obtenus sont représentés dans les histogrammes suivants dans les figures 22, 23, 24 et 25.

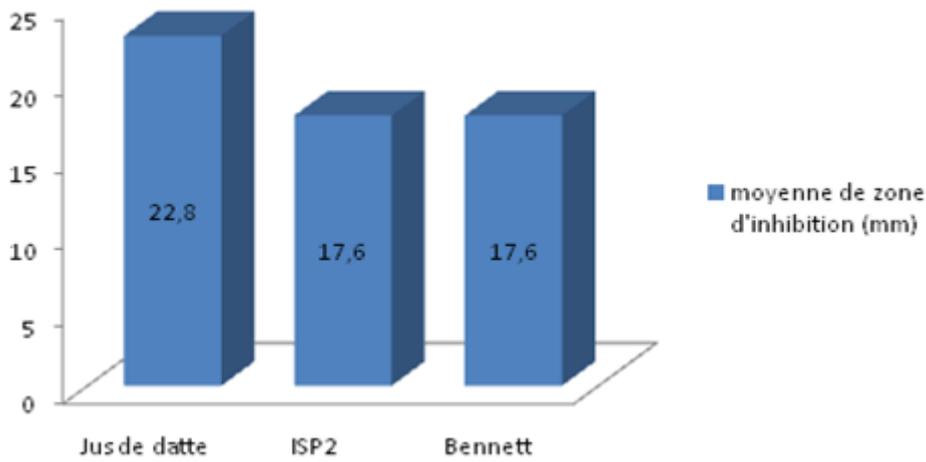


Figure 22. Moyennes des zones d'inhibition de la souche G24 sur les trois milieux solides

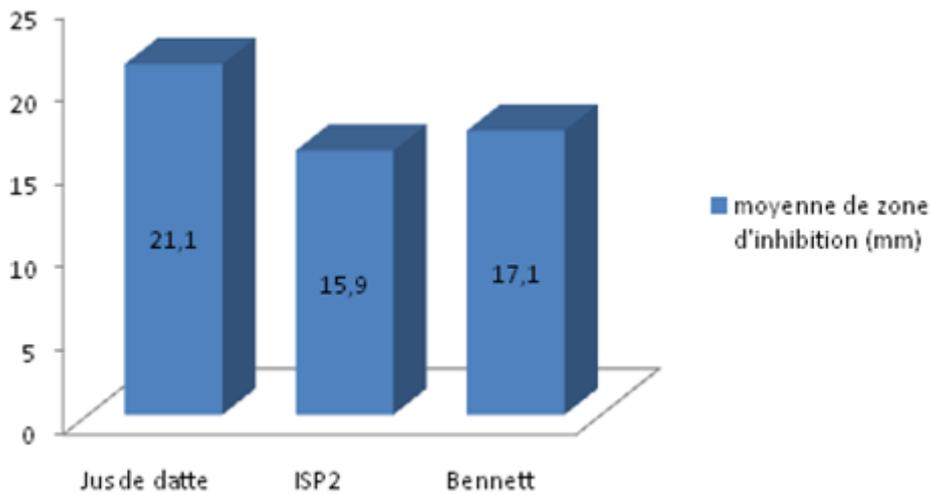


Figure 23. Moyennes des zones d'inhibition de la souche G68 sur les trois milieux solides

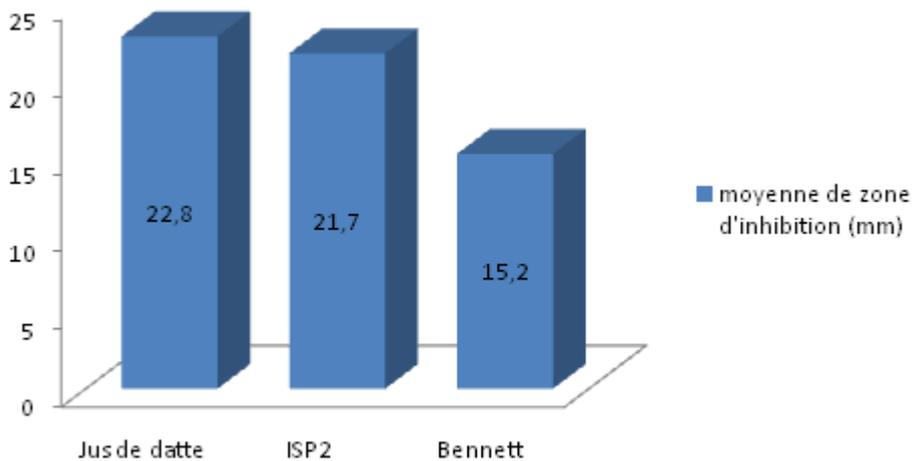


Figure 24. Moyennes des zones d'inhibition de la souche G24 sur les trois milieux liquides

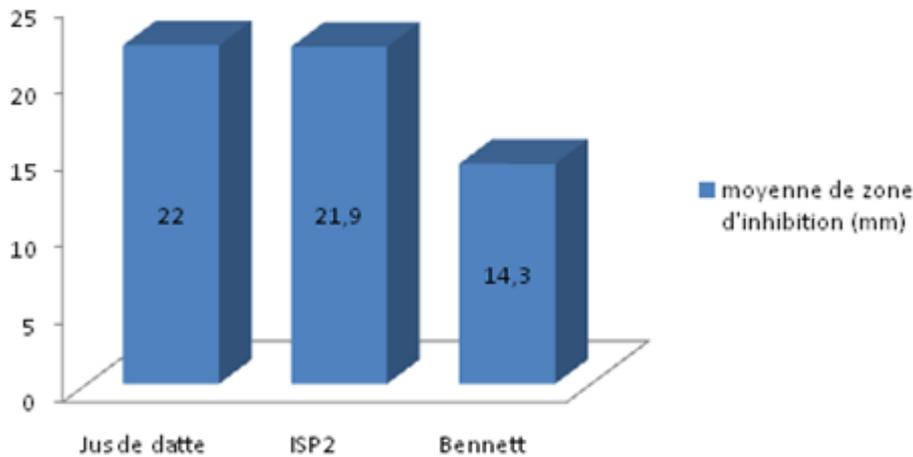


Figure 25. Moyennes des zones d'inhibition de la souche G68 sur les trois milieux liquides

D'après les résultats des moyennes des zones d'inhibition illustrés dans les figures, on peut remarquer que le milieu à base de jus de dattes additionné de NaNO<sub>3</sub> donne la plus grande moyenne des zones d'inhibition pour les deux souches que ce soit sur milieux liquides ou solides (G24= 22.8 mm, G68= 21.7 mm sur milieu solide ; G24=22.8mm G68 =22mm sur milieu liquide),

### 7.- Extraction des métabolites antifongiques et test d'antibiographie

L'extraction des produits anti-*Candida* a été effectuée à partir du surnageant de culture des deux souches G24 et G68 cultivée sur milieu jus de dattes additionné de NaNO<sub>3</sub>. L'extraction est effectuée le 4<sup>e</sup> jour d'incubation (jour de production maximale pour les deux souches sur milieu liquide). Les résultats obtenus ont montré que ces produits ne sont extractibles que par le *n*-butanol pour les deux souches G24 et G68. Les résultats sont consignés dans les figures 26 et 27.

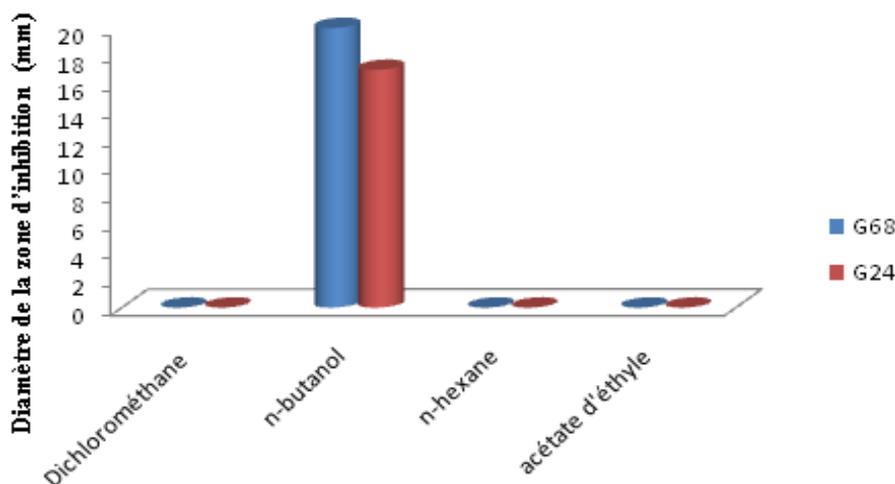


Figure. 26. Activité anti-*Candida* des extraits organiques des souches G24 et G68



Figure. 27. Test d'antibiogramme des extraits organiques des souches G24 et G68 .

### 8.- Purification des fractions par HPLC

La purification par HPLC a été entreprise avec l'extrait brut butanolique du filtrat de culture de la souche G24 sur le milieu de jus de dattes additionné de NaNO<sub>3</sub>. Le profil (figure 28) a montré que cet extrait n'est pas très chargé en impuretés et contient 5 grands pics. Leurs temps de rétention sont les suivants : (3,7 min, 4,1 min, 4,8 min, 40,3 min et 45,4 min). Ces fractions sont partagées entre hydrophiles et moyennement hydrophiles.

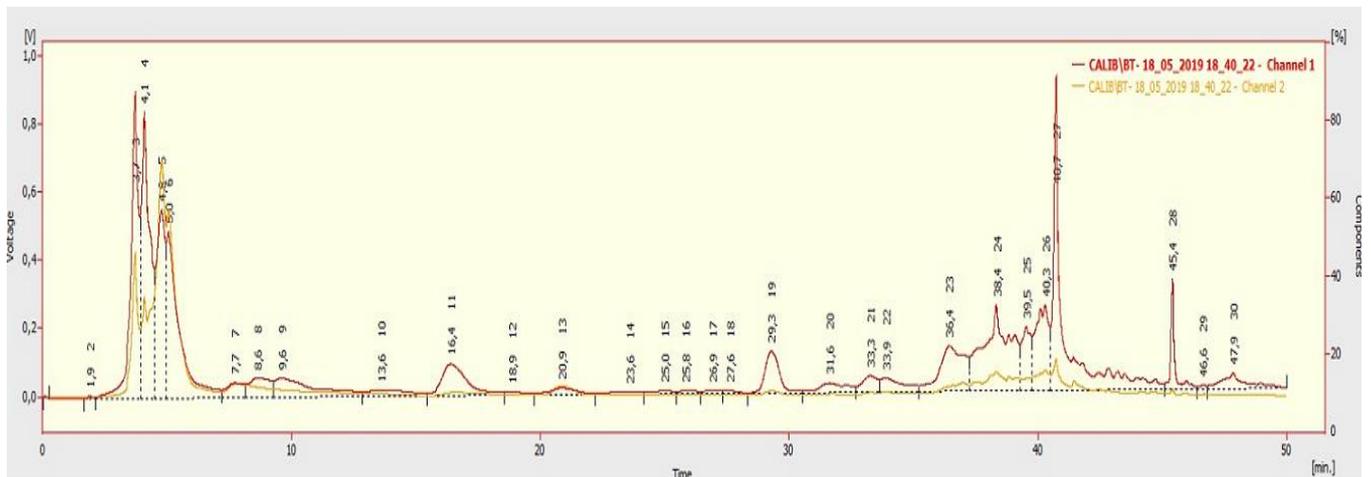


Figure. 28. Profil en HPLC de l'extrait brut butanolique de la souche G24 produit sur milieu JDD4+N.

### 9. Discussion générale :

Le travail que nous avons effectué à pour objectif l'utilisation du jus de dattes pour la production des antifongiques secrétés par deux souches de *Streptomyces* isolés à partir du Sahara algérien. Les résultats obtenus ont montré que les deux souches n'ont pas poussé sur les dilutions de dattes D0, D1, et D2 et même D3 pour la souche G24. Une croissance faible de la souche G68 a été remarquée sur D3 et moyenne pour les deux souches sur la dilution D4. L'absence de croissance des souches sur les dilutions D0, D1 et D2 peut être lié à l'excès du glucose dans le milieu à base de dattes. Il faut signaler que la datte « Ghars » contient 67 à 80% de sucres totaux, dont le glucose est le composant majeur (**Abou-zeid et al., 1991**). Ce composé est un substrat rapidement métabolisé, est connu pour inhiber la croissance des souches et la production des métabolites secondaire (**Martin et demain, 1980**). Ce phénomène s'appelle « répression catabolique ou effet négatif du glucose (**Larpent et Lrpent-Gourgaud, 1990**).

En croyant de notre part que pour avoir une bonne production d'antibiotique, il faut que le milieu de culture assure la croissance des souches des actinobactéries, fournir des sources d'énergie et les conditions physico-chimiques soient adéquates, nous avons essayé de rechercher le meilleur milieu de croissance tout d'abord. Comme l'a signalé **Badji (2006)**, la production des antibiotiques dépend à la fois du microorganisme producteur, de la composition de milieu de culture et des conditions de culture. A travers les résultats obtenus de la croissance de nos souches d'actinobactéries sur les différentes dilutions de jus de dattes, nous avons constaté que leur croissance n'était pas bonne et très lent. Ainsi, et afin d'améliorer leur croissance nous avons essayé d'ajouter une source d'azote organique (extrait de levure, extrait de malt ou peptone) ou minérale ( $\text{NaNO}_3$ ) à la dilution qui a montré la meilleure croissance pour les deux souches, celle-ci est la dilution D4. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout d'une source d'azote organique n'a pas amélioré la croissance, à l'exception pour la souche G68 sur milieu D4 + extrait de levure. Cette souche a poussé lentement et faiblement sur ce milieu. Il faut noter que nos souches poussent convenablement sur les milieux ISP2 et Bennett (milieux contenant les sources organique utilisés). Alors, le facteur principal d'inhibition pourrait être dû à la concentration élevée du glucose. Notamment, lorsqu'on sait que ces composés naturel contenant aussi des quantités glucidiques. Par exemple, l'extrait de malt contient une teneur élevée en maltose, en glucose, en dextrans et des faibles teneurs en saccharose et protéines (**Belghit, 2010**), et L'extrait de levure de sa part riche en azote diversifié, en protéine, en glucose et en vitamine notamment la vitamine B (**Djidel, 2007**).

Au contraire des résultats précédents, l'ajout d'une source minérale  $\text{NaNO}_3$  à la dilution D4 de jus de dattes a révélé une bonne croissance pour les deux souches G24 et G68. Selon **Morakchi (2011)**, les sources d'azote minérales donnent également une biomasse conséquente et production des molécules antibiotiques. La plus part des microorganismes utilisés en industrie peuvent utiliser à la fois une source d'azote inorganique et organique (**Omura et al., 1980**)

La cinétique de production d'antifongiques a été menée au début sur milieu solide en utilisant la technique de cylindres d'agar. Le milieu de jus de dattes utilisé et celui de la dilution 4 additionné du  $\text{NaNO}_3$ . Il faut rappeler que ce dernier a montré une bonne croissance pour les deux souches G24 et G68. Les deux milieux autres utilisés sont L'ISP2 et le Bennett en but de comparaison. Les deux souches ont commencé à produire leurs molécules antifongiques dès le 2<sup>e</sup> jour d'incubation sur les trois milieux de culture. Elles ont montré une activité maximale au 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jour dans les deux milieux ISP2 et Bennett, puis une diminution a été enregistrée. Par contre, le maximum de production des souches sur le milieu de jus de dattes+N a été constaté au 6<sup>e</sup> jour d'incubation et le phénomène de diauxie est nettement visible. Ceci, pourrait être dû à la composition de ce milieu à base dattes qui contient plusieurs sources de carbone. Selon **Acourène et Tama, (2011)**, le jus de dattes se compose de sucres réducteurs « glucose et fructose » et de sucres non réducteurs « saccharose... », des protéines ( des acides aminés ) et des sels minéraux (Zn, Fe, Co, Ni, Cu, Mg, Ca, K, Na, P, .....), Ces sources de carbone et d'azote et des oligoéléments influençant la production des métabolites secondaires (**Sanchez et Demain, 2002**) ; (**Hassan et al., 2001**) ; (**Narayana et Vijayalakshmi., 2008**). Par comparaison, il apparaît clairement que le meilleur milieu solide de production est le milieu de jus de dattes.

En ce qui concerne, la cinétique de production des antifongiques sur milieu liquide, l'expérience a été effectuée par la méthode de puits. Les activités de la souche G24 sur les deux milieux ISP2 et Bennett ont été remarquées au 2<sup>e</sup> jour d'incubation. Par contre. Sur le milieu de dattes cette souche a commencé la production qu'à partir du 3 jour. Le maximum est atteint au 4<sup>e</sup> jour sur tous les milieux avec une supériorité légère pour le milieu ISP2 par rapport au milieu du jus de dattes+N. Sur le milieu Bennett la souche G24 est moins active. .

La cinétique de production de la souche G68 ne diffère pas beaucoup à celle de la souche G24. Le jour de production maximale est le 4<sup>e</sup> jour dans tous les milieux de production. Des activités moindres ont été notées sur milieu Bennett par rapport aux ISP2 et Jus de dattes. Selon **Alharbi et al., (2012)**, la production des métabolites antibiotiques est parfois influencé par la composition du milieu de culture et les conditions de cultures, tels que

l'aération, l'agitations, le pH, la température d'incubation, la salinité, le temps d'incubation, la source de carbone et d'azotes, et cela varie d'un microorganisme à un autre.

L'évolution du pH a été suivie quotidiennement durant la période d'incubation. Il a été constaté une diminution du pH, les premiers jours d'incubation suivie d'une alcalinisation ou retour vers la neutralité. La diminution du pH est due à la dégradation du glucose qui a conduit à la production d'acides organiques (**Surowitz et al., 1985**), tandis que l'augmentation est 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 ce qui induit la basification du milieu.

Les résultats des moyennes de la zone d'inhibition montrent que le milieu de jus de datte +N est meilleur par rapport aux milieux ISP2 et Bennett. Il faut rappeler que ceci est en plus de la source de carbone et d'azote, il est riche en source minéraux (Zn, Fe, Co, Ni, Cu, Mo, Ca, K, Mg, P) (**Acourène et Tama, 2011**). Ces éléments minéraux jouent un rôle important dans la production des métabolites secondaires par les *Sreptomycetes* (**Hassan et al., 2001**). Il faut signaler que les deux milieux semi synthétiques utilisés ISP2 et Bennett sont couramment utilisés pour la production d'antibiotiques (**Badji, 2006 ; Belghit, 2010**). L'ISP2 est composé de glucose, extrait de levure, et extrait de malt (**Shirling et Gottling, 1966**) ; le Bennett est composé de glucose, extrait de levure, extrait de viande et peptone (**Wrren et al., 1955**). Ces ingrédients sont extrêmement chers : le glucose coûte 35,6€/kg ; l'extrait de levure est estimée au 232 €/kg ; extrait de malt environ 162 €/kg et la peptone peut coûter 208€/kg [1].

Afin d'extraire les molécules antifongiques des deux souches, 4 solvants non miscibles à l'eau de polarité différente sont testés et sont les suivants: l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Le résultat montre que l'activité anti-*Candida* de des deux souches n'a été extraite que par le n butanol. plusieurs travaux ont confirmé l'efficacité du butanol par rapport à d'autres solvants utilisés, l'étude effectuée par **Boudjella et al., (2006)** sur le genre *Streptosporangium* montre que le butanol est le meilleur solvant d'extraction des substances actives. Par ailleurs **Zitouni et al., (2005)**, a aussi un taux d'extraction important avec le butanol sur le genre *Saccharothrix*. **Badji et al., (2005)** ont montré que le butanol est le meilleur solvant d'extraction d'une souche *Actinomadura* d'origine saharienne.

Nous avons remarqué que la production en milieu liquide est légèrement plus importante qu'en milieu solide. Ce résultat est très intéressant et assez rare chez les actinobactéries. D'habitude, c'est sur le milieu solide que l'activité est plus importante (**Badji et al., 2005**).



***Conclusion Générale  
et perspectives***

Cette étude avait pour objectif principal, la production d'antifongiques actifs contre *Candida albicans* par deux souches de *Streptomyces* (G68, G24) en utilisant un milieu naturel (Jus de datte).

Les résultats obtenus ont montré que les deux souches ont pu pousser sur ce milieu, mais à une dilution faible D4. L'ajout d'une source minérale d'azote  $\text{NaNO}_3$  a amélioré bien la croissance des souches sur cette dilution.

La cinétique de production des antifongiques a été effectuée sur les milieux solides et liquides. Les trois milieux de production choisis sont : le milieu de jus de datte D4+  $\text{NaNO}_3$ , ISP2 et Bennett. Le milieu solide jus de datte a permis une meilleure production par rapport aux deux autres milieux ISP2 et Bennett utilisés couramment pour la croissance et la production des antibiotiques des actinobactéries. Le phénomène de diauxie n'a été enregistré que sur le milieu de jus de dattes.

La cinétique de production sur milieu liquide a montré que les milieux ISP2 et jus de datte sont meilleurs par rapport à celui du Bennett. L'activité maximale a été remarquée au quatrième jour d'incubation sur les trois milieux utilisés.

D'une manière générale, la détermination des moyennes des zones d'inhibition sur les trois milieux utilisés a confirmé que le milieu de jus de dattes est meilleur pour la production des antifongiques que ce soit sur milieu solide ou liquide.

Les molécules antifongiques des deux souches ne sont pas extractibles que par le solvant *n*-butanol.

Le profil en HPLC d'extrait butanolique brut de la souche G24 a montré 5 fractions. Ces dernières sont hydrophiles et moyennement hydrophiles.

Comme perspectives pour ce travail il serait nécessaire de:

- Continuer la purification par HPLC des antifongiques des deux souches et déterminer les composés actifs afin de les purifier ultérieurement.
- Déterminer les structures chimiques en utilisant les outils spectroscopiques indispensables (infrarouge, spectrométrie de masse et résonances magnétiques nucléaires au proton et au C13).
- Étudier la stabilité des activités en fonction de certains facteurs physicochimiques telles que le pH, la température et la lumière et du mode de conservation (réfrigération et congélation).
- Tester *in vivo*, la toxicité des antifongiques sécrétés.

*Références  
bibliographique*

- Abou-Zeid A.A. et Kodja S.M. (1993). Utilization of dates in the fermentative formation of citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Zentrabl. Microbiol*, 148, 213-221.
- Abou-Zeid A.A., Baeshin N.A., Baghlaf A.O. (1991). The formation of oxytetracycline in a date-coat medium. *Bioresource Technology*, 37, 179-84.
- Accoceberry I. et Thierry N. (2006). Antifongiques: cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie* 61 (3): 195–199.
- Accourène S. et Tama M. (2001). Utilisation des dattes de faible valeur marchande comme substrat pour la fabrication de la levure bolongaire, Ed. Rev. Energ. Ren : Production et valorisation –Biomasse.
- Alharbi S. A., Arunachalam C., Murugan A. M., Wainwright M., (2012). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from terrestrial soil of Saudi Arabia. *Journal of food, agriculture and environment*. 2(10), 1093-1097.
- Al-Hooti S., Sudhus S. and Gabazard H. (1998). Chemical composition of seeds of date fruit cultivars of United Arab Emirates. *J.Food Chem.Technol.* 35: 44-46.
- Al-Obaidi Z.S. et Berry D.R. (1979). The use of deionised date syrup as a substrate for citric acid fermentation. *Biotechnol Letters*, 1, 153-158.
- Al-Shahib W. et Marshall R.J. (2002). Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54, 247-259.
- Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A. W. et Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Streptomyces antibioticus* chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of macrolactone ring. *Mol. Gen. Genet.* 259: 299-308.
- Andriambololona T. (2010). Etude bibliographique et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'ANKAFOBE. Mémoire de recherche pour l'obtention du Diplôme d'études approfondies de biochimie. Université d'Antananarivo, Madagascar : p5.
- Andriole V. T. (1999). Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44 (2): 151–162.
- Ascioglu S., Rex J. H., De Pauw B., Bennett J. E., Bille J., Crokaert F., Denning D. W. (2002). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international

- consensus. *Clinical Infectious Diseases* 34 (1): 7–14.
- Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trios souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant au genre *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Algerie, p. 6 - 17.
- Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2005). Antifungal activity of a saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *Journal de Mycologie Médicale* 15 (4): 211–219.
- Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. H. et Beaulieu C. (2002). Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (1): 49–54.
- Barelle C. J., Richard M. L., Gaillardin C., Gow N. A. and Brown A. J. (2006). *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryot Cell*. 5: 359-367.
- Bastide, A., De Méo, M., Andriantsoa, M., Laget, M., Duménil, G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure nonpolyéniques. *MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol*, 2: 453–466.
- Bauda P., et Monfort P. (2004). Agents pathogènes et modifications des environnements: quels risques actuels et futurs? *Environnement, Risques & Santé* 3 (3): 165–172.
- Belghit S.(2016). Actinobactéries des sols sahariens algériens antagonistes de *Candida albicans*: Isolement, taxonomie et caractérisation de leurs antifongiques. Thèse de doctorat. L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE KOUBA-ALGER .
- Belghit S. ,Badji B., Zitouni A., Sabou N.( 2010)..Recherche dans les sols sahariens algériens d'actinomycètes producteurs de molécules actives contre *Candida albicans* .15<sup>èmes</sup> journées nationales de microbiologie, Bejaia, 15-16novembre p 63
- Belguedj M. (2001). Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérien, N° 11, INRAA. El-Harrach , Alger. 289 p.
- Belyagoubi L.(2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de doctorat. Université aboubakr belkaïd-tlemcen.p95.
- Benchabane A. (1996). Rapport de synthèse de l'atelier « Technologie et qualité de la datte ». In options méditerranéennes, série A, N° 28. Séminaire méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain, 205-210.

- Benchelah A.-C. et Maka M. (2008). Les Dattes, intérêt et nutrition. *Phytothérapie (ethnobotanique)*. 6: 117 -121.
- Bendel C. M., Donavon J. Robb H., Garni M., Henry-Stanley M. et Carol L. W. (2003). Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Critical care medicine* 31 (2): 501–507.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989). - Vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 2648.
- Bergey's Manuel. (2007). Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. In : Part 10 : Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright, Michigan State University Board of Trustees.
- Besbes S., Drira, L., Blecker, K., Deroanne, C. and Hamadi, A. (2009). Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera L.*): compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *J. Food. Chem.* 112: 406-411.
- Bessah R. et Touzi A. (2001). Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P. O. U) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren*, 37-40.
- Beucher B. (2007). Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte. Université d'Angers. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00346346/>.
- Born F. (2013). Les candidoses buccales: revue de littérature. Thèse de doctorat University of Geneva.
- Boudjella H. (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177
- Boudjella H., Boutia K., Zitounia A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*. P:1-11.
- Boughachiche F., Reghioia S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycetales productrices de substances.
- Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., et Klenk H. P. (2015). *Nocardiosis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 107 (2): 313–320.
- Bretagne S. (2007). Antigènes fongiques en réanimation: tests disponibles et état des lieux. *Réanimation* 16 (3): 232–239.

- Buffo J., Herman M.A and Soll D.R.(1984) .A characteisation of pH regulated dimorphism in *candida albicans* .mycopatologia 85,21-30.
- Calderone R.A. et Fonzi W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* 9 (7): 327–335.
- Chaira N., Smaali, M I., Martinez-Tomé M., Mrabet, A., Murcia, M. A. and Ferchichi, A. (2009). Simple phenolic composition, flavonoid contents and antioxidant capacities in water–methanol extracts of Tunisian common date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *Inter. J. Food Sci. Nutr.* 60: 316–329.
- Chorin A. C. (2009). Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000982/>.
- Chu W.S., Magee B.B. and Magee P.T. (1993). Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol* .175: 6637-6651.
- Demain A.L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe.
- Demain Arnold L. (2000). Microbial biotechnology. *Trends in biotechnology* 18 (1): 26–31.
- Desroy N. 2004. Synthèse de béta-lactames polycycliques et du fragment C15-C30 des dolabélides, macrolides cytotoxiques d'origine marine, par catalyse organométallique *Chimie ParisTech*.
- Dgigal D. (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. p157.
- Dhanasekaran D., Rajakumar G., Sivamani P., Selvamani S., Panneerselvam A., Thajuddin N. (2005). Screening of salt pans actinomycetes for antibacterial agents. *The Internet J Microbiol*, 1(2): 6–12.
- Diekema D. J., Messer S. A., Hollis R. J., Jones R. N., et Pfaller M. A. (2003). Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (8): 3623–3626.
- Djaballah C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés se la sebkhia de Ain M'Lila. Mémoire de l'obtention du Diplôme de Magister en Micbiologie. Université Mentouri Costantine : p73.
- Djouab A. (2007). Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Mémoire de Magister.option génie alimentaire, Université de Boumerdès.24 p.

- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. et Puglia A. M. (2002). Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of biotechnology* 99 (3): 187–198.
- Dupont B. (2006). Utilisation des antifongiques topiques. *Thérapie* 61 (3): 251–254.
- Eggimann P., Garbino J., et Pittet D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet infectious diseases* 3 (11): 685–702.
- El-Akidi Hassen H. (1982). Les sucres de dattes, les fermentations et les domaines d'application dans le monde Arabe. Séminaire sur les sucres de dattes, 4-9 Décembre, 100- 111.
- Ensign J.C., Normand P., Burden J.P., Yallop C.A. (1993). Physiology of some actinomycete genera. *Res Microbiol*, 144(8): 657–660.
- Espiard E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc.Lavoisier, Paris. P147-155.
- Estanove P. (1990). Note technique : Valorisation de la datte. In : Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM. pp 301-318.
- Euzeby J.P. (2016). List of bacterial names with standing in nomenclature, *Streptomycetaceae*. [http://www. bacterio.net /streptomyces.html](http://www.bacterio.net/streptomyces.html).
- Fantaine T., Hartland R., Mouyna I. et Latge J.P. (2008). Method for sorting antifungal molecules acting on the glucanosyltransferase activity 68: 33-50.
- Favier J.C., Ireland R.J., Laussucq C. et Feinberg M. (1993). Répertoire général des aliments. Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique. Tome III, Ed. ORSTOM , Lavoisier, INRA. p27-28 .
- Favier J.C., Ireland R.J., Toque C. et Feinberg M. (1995). Répertoire générale des aliments. Table de composition. Ed. Tec et Doc-Lavoisier, INRA Editions, CNEVA et CIQUAI, 897.
- Fjaervik E., Zotchev SB. (2005). Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67(4):436-43.
- Ghanem N.B., Sabry S.A, El-Sherif Z.M., Abu El-Elal G.A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol*, 46(3): 105–111.
- Gow N. A. (2002). *Candida albicans* switches mates.10: 217-218.
- Groll A. H., Sein T., Petraitis V., Petraitiene R., Callender D., Gonzalez C. E., Giri N., Bacher J., Piscitelli S. et Walsh T. (1998). Compartmental pharmacokinetics and tissue drug

- distribution of the pradimicin derivative BMS 181184 in rabbits. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42 (10): 2700–2705.
- Hancock R. E. et Strohl W. R. (2001). Editorial overview: Antimicrobials in the 21st century. *Current Opinion in Microbiology* 4 (5): 491–492.
- Hassan MA., El-Naggar MY., Said WY. (2001). Physiological factor affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egyptian Journal of Biology*. 3, 1-10.
- Hoher V., Auguy F., Bogusz D., Doumas P., Franche C., Gherbi H, Laplaze L., Obertello M. et Svistoonoff S. (2009). Les symbioses actinorhiziennes fixatrices d'azote: un exemple d'adaptation aux contraintes abiotiques du sol. *Cahiers Agricultures* 18 (6): 498–505.
- Hopwood D.A., Bibb M. J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C. P., Ward J.M. and Schrempf H. (1985) .Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Hulin A., Deguillaume A. M., Bretagne S. et Bézie Y. (2005). Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives. *Journal de Pharmacie Clinique* 24 (3): 125–138.
- Kaidi F., Touzi A. 2001. Production de bioalcool à partir des déchets de dates. *Revue des énergies renouvelables: Production et valorization- Biomasse*, 75-78.
- Kannan K., Takahashi S., Fujiwara N., Mizukawa H. et Tanabe S. (2010). Organotin compounds, including butyltins and octyltins, in house dust from Albany, New York, USA. *Archives of environmental contamination and toxicology* 58 (4): 901–907.
- Khalil K.E., Abd-El-Bari M.S, Hafiz .N.E. and Ahmed E.Y. (2002). Production, evaluation and utilization of date syrup Concentrate (Dibis). *Egypt. J. Food Sci*, 30(2): 179- 203.
- Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M. (2004). Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 211-214.
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J Med Mycol*, 15(1) : 45–51.
- Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, 4: 113–121.
- Larpen J.P. et Larpen-Gourgand M. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3<sup>ème</sup> Edition, Tech & doc., Lavoisier. P 1039.

- Madigan M. T et Martinko J.M. (2007). Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11e édition : 331-423, 686-718.
- Martín J. F. et Demain A. L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological reviews* 44 (2): 230.
- Mavor A.L., Thewes S and Hube B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets*. 6: 63-874.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F., et Lebrihi A. (2011). Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Applied and environmental microbiology* 77 (18): 6710–6714.
- Morakchi H. (2011)-Isolement et identification de souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives au niveau du lac Oubeira : étude morphologique, physiologique, moléculaire et spectre d'activité. Diplôme Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba : p129.
- Munier P. (1973). Le palmier dattier. Ed. Maisonneuve, Paris p 221.
- Nafis A., Azmani A., Oubaha B., Hassani L., Niedermeyer T. et Barakate M. (2016). Extraction et purification des antifongiques non polyéniques de la souche *Streptomyces* sp. Z26 isolée des écosystèmes Marocains. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* 26 (2): 113–114.
- Nancib N., Nancib A. et Boudrant J. (1997). Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol*, 60, 67-71.
- Narayana KJP., Vijayalakshmi M. (2008). Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by *Streptomyces albidoflavus*. *Research Journal of Pharmacology*.2 (1), 4-7.
- Nouasri A. (1996). Les genres *Micrellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (Actinomycétales) dans les sols sahariens: Taxonomie numérique; production, extraction, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. Thèse de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.p.52.
- Noui Y. (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de dattes Mech-Degla. Mémoire Magister, Boumerdès. p 62.
- Odds F. C., Brown A J. et Gow N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology* 11 (6): 272–279.

- Omura S., Tanaka Y., Kitao C., Tanaka H., et Iwai Y. (1980). Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18 (5) : 691-5.
- Ould El Hadj M.D., Sebihi A.H. et Siboukeur O. (2001). Qualité hygiénique et caractéristique physico-chimique du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette de Ouargla. *Revue Energie Renouvelable : Production et Valorisation- biomasse.* 87- 92p.
- Park J.O., El-Tarabily K.A., Ghisalberti E.L., and Sivasithamparam. K. (2002). Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 361–365.
- Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. et Cole E.C. (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl Environ Microbiol.* 64 : 3807-3812.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Lefèbvre G. et Germain P. (1998). les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Science et changements planétaires/Sécheresse* 9 (2): 147–153.
- Sabaou N., Hacene H., Bennadji A., Bennadji H., Bounaga N. (1992). Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne, *Can. J. Microbiol.* 38 :1066–1073.
- Samaranayake L.P., Fidel P.L., Naglik J.R., Sweet S.P., Teanpaisan R., Coogan M. M., Blignaut E and Wanzala P. (2002). Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis.* 2: 151-160.
- Sanchez S., Demain A. L. (2002) . Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzymes Microbiology Technology.* 31: 895-906.
- Sangamwar A., Deshpande U. et Pekamwar S. (2008). Antifungals: need to search for a new molecular target. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 70 (4): 423.
- Sardi J.C.O., Scorzoni L., Bernardi T., Fusco-Almeida A. M. et Giannini M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options . *Journal of medical microbiology* 62 (1): 10–24.
- Schulze J. et Sonnenborn U. (2009). Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int* 106 (51-52): 837–842.
- Segal E. (2005). *Candida*, still number one—what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 48 (s1): 3–11.

- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species *Int J Syst Bacteriol* 16: 313–340.
- Siboukeur O. (1997). Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes. Thèse Magister, INA. El-Harrach, Alger, p 106.
- Siboukeur O. (2001). Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes. Thèse Magister, INA. El-Harrach, Alger, 106 p.
- 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. 207p.
- Sudbery P., Gow, N. and Berman, J.( 2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2. 12: 317-324.
- Sudbery P. E.(2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160: 119-126.
- Sujatha, P., Bapi Raju, K.V.V.S.N. and Ramana T. (2005). Studies on a new marine Streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160:119-126.
- Surowitz K. G.et Pfister R. M. (1985). Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*. *Canadian journal of microbiology* 31 (8): 702–706.
- Takizawa M., Colwell R. R. et Hill R. T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (4): 997–1002.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K. et Bora T.C. (2007). Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* 17 (4): 242–249.
- Vago T., Baldi G., Colombo D., Barbareschi M., Norbiato G., Dallegrì F. et Bevilacqua M. (1994). Effects of naftifine and terbinafine, two allylamine antifungal drugs, on selected functions of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38 (11): 2605–2611.
- Vandeputte V. (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France).p 168.
- Vaubourdolle M. (2007). *Infectiologie*. Vol. 3. Wolters Kluwer France.
- Vonothini G., Murugan M., Sivakumar. K. and Sudha. S. (2008). Optimization of protease

- production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afr. J. of Biotech.*, 7 (18), 3225-3230.
- Waksman S.A. (1967). Distribution, isolation and methods of study. In : The actinomycetes a summary of current knowledge. The Ronald Press Company. New York. pp: 9–21.
- White, S. H. & Wimley, W. C. (1998). Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, 1376, 339-352.
- Whiteway M., et Bachewich C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual review of microbiology* 61: 529.
- Williams D., Sladjana M., Katja E.H James R., A Haves Ralves. (2007). Characterization of *Candida albicans* infection of an *in vitro* oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Oral microbiology and immunology* 22 (3), 188-194.
- Williams MM, Davis EG, KuKanich B, 2010. Pharmacokinetics of oral terbinafine in horses and Greyhound dogs, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34 : 232-237.
- Williams S.T., Goodfellow M. et Alderson G. (1989). Genus *Streptomyces*, dans: Williams S.T., Sharpe M.E. et Holt J.H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (volume 4). *Williams & Wilkins, USA*: 2452-2492.
- Williams ST., Lanning S., Wellington EMH. (1984). Ecology of Actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Eds: M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. p. 481–528.
- Yang Y. L., et Lo H. J. (2001). Mechanisms of antifungal agent resistance. *Journal of microbiology, immunology, and infection* 34 (2): 79–86.
- Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T. et Parkinson D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production. *Peer-Review J.* 95(2): 113–118.
- Zaitlin. B; and Watson. S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. 40 (9), 1741-175

[1]: <https://www.humeau.com/>.

# *Annexes*

## Annexes I

- ❖ **Milieu ISP2** : Extrait de levure : 4 g ; extrait de malt : 10 g ; glucose : 4 g ; agar : 20g, Eau distillé 1000 ml ; pH = 7,2.
- ❖ **Milieu Bennett** : Glucose : 10 g ; peptone : 2 g ; extrait de levure : 1 g ; extrait de viande : 1 g, Eau distillé 1000 ml ; pH = 7,2.
- ❖ **Milieu Sabouraud** : Peptone 10 g, Glucose massé 20 g, Agar 15 g, Vitamine et facteur de croissance 10 g, Eau distillé 1000 ml ; pH = 5,6.
- ❖ **Le jus de datte** : Les dattes utilisées : Ghares sèche de palmiers d'ELMENIAA, a une faible qualité marchande.



**Figure. 29** : Datte à moindre valeur marchand utilisée

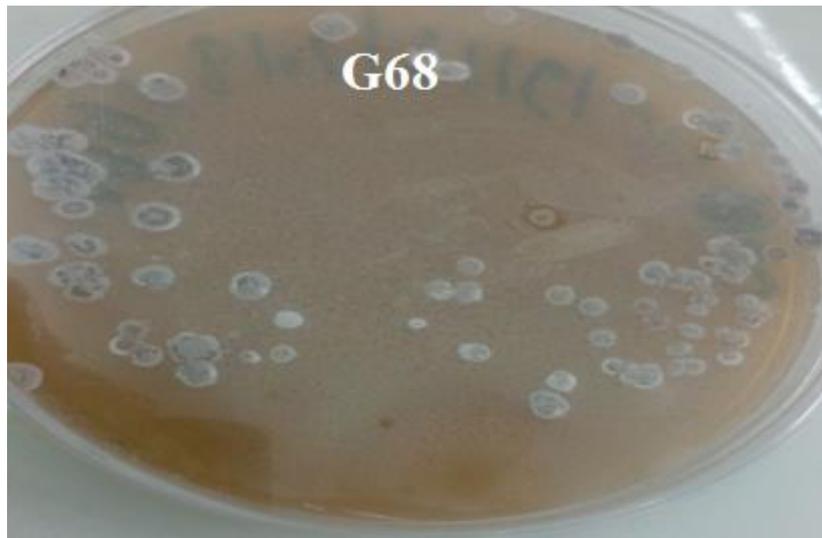
- ❖ Le jus est préparé de cette façon :
  - Laver les dattes à l'eau de robinet.
  - Dénoyer les.
  - Rajouter l'eau à raison de 2 litres par kilogramme de pulpe de datte.
  - Chauffer le mélange à 80°C au bain-marie pendant 2 heures sous agitation (ou laisser macérer une nuit).
  - Filtrer le mélange à travers un tissu (une gaze).
  - Centrifuger le jus obtenu à 15000g pendant 10 minutes.
  - Recueillir le surnageant et l'utiliser en tant que solution mère pour la production d'antibiotiques.
  - Effectuer les dilutions suivantes :

D1 = 40% D0 + 60% eau.

D2 = 20% D0 + 80% eau.

- le jus de datte est supplémenté avec 2g / L de nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), le pH est ajusté à  $\text{pH} = 7,2$ .

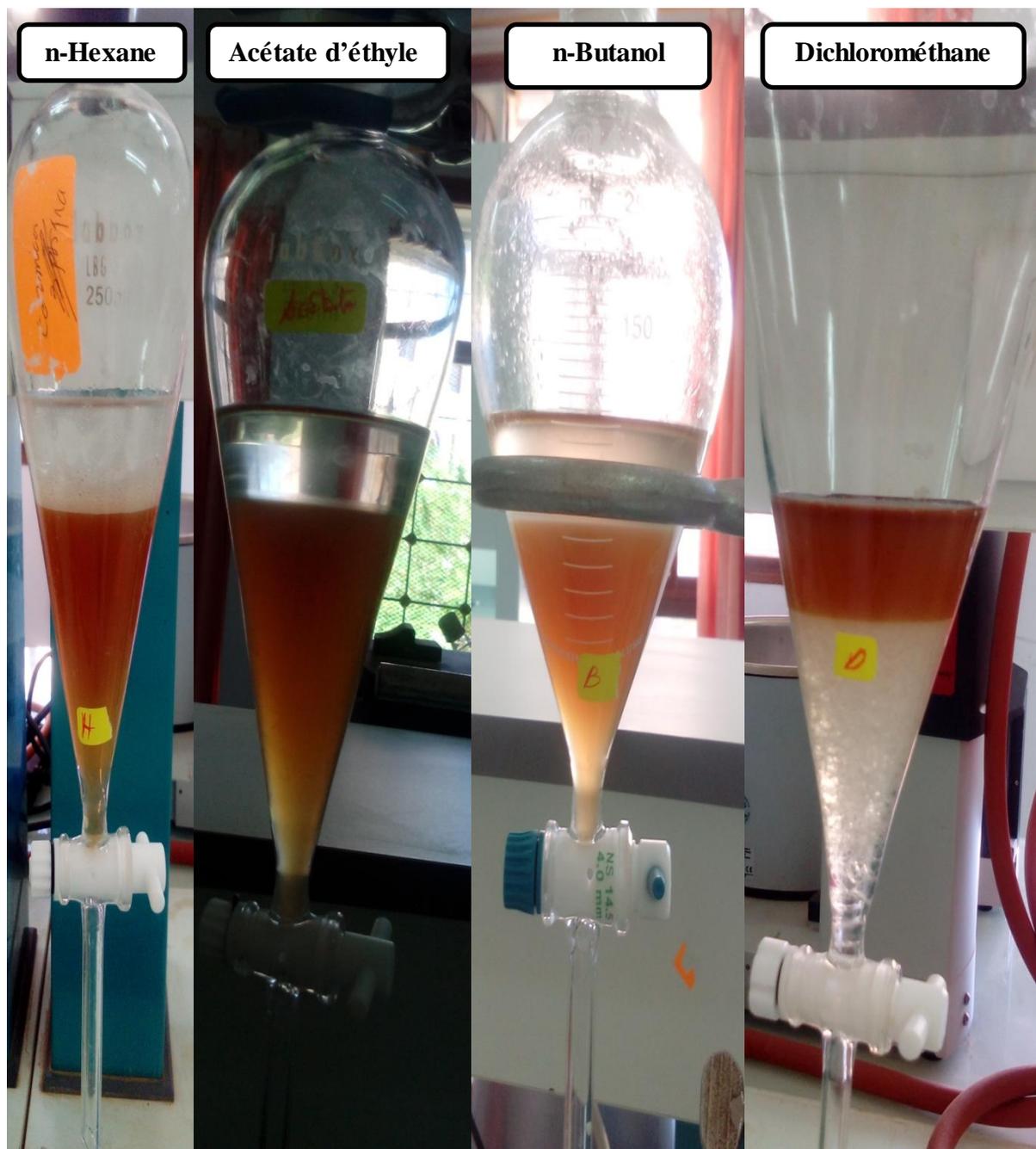
## Annexes II



**Figure. 30 :** La croissance de la souche G68 sur milieu jus de datte à dilution de 40% (D3).



**Figure .31.** La croissance de les souches G68 et G24 sur milieu jus de datte à dilution de 20% (D4).



**Figure .32.** Extraction des antifongiques par solvants organiques (Hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol) (utilisation d'ampoule à décanter)

## Annexes III

**Tableau .08.** Cinétiques de production d'antifongique de les souches G68 et G24 vis-à-vis *C.albicans* sur les milieux solide (Jus de datte, Bennett, ISP2).

| Milieu                | Jus de datte |      | Bennet |      | ISP2 |      |
|-----------------------|--------------|------|--------|------|------|------|
| Souche                | G24          | G68  | G24    | G68  | G24  | G68  |
| 1 j                   | 10           | 10   | 10     | 10   | 10   | 10   |
| 2 j                   | 20           | 21   | 19     | 20   | 21   | 20   |
| 3 j                   | 21           | 20   | 22     | 21   | 19   | 19   |
| 4 j                   | 21           | 21   | 20     | 20   | 18   | 18   |
| 5 j                   | 22           | 22   | 19     | 18   | 20   | 19   |
| 6 j                   | 30           | 27   | 19     | 19   | 20   | 17   |
| 7 j                   | 29           | 25   | 20     | 18   | 19   | 16   |
| 8 j                   | 25           | 25   | 18     | 17   | 18   | 14   |
| 9 j                   | 25           | 25   | 16     | 15   | 17   | 13   |
| 10 j                  | 23           | 20   | 13     | 13   | 14   | 13   |
| Moyenne de Z.D.I (mm) | 22.8         | 21.1 | 17.6   | 17.1 | 17.6 | 15.9 |

**Tableau .09.** Cinétiques de production d'antifongique de les souches G68 et G24 vis-à-vis *C.albicans* sur les milieux liquide (Jus de datte, Bennett, ISP2).

| Milieu                | Jus de datte |     | Bennett |      | ISP2 |      |
|-----------------------|--------------|-----|---------|------|------|------|
| Souche                | G24          | G68 | G24     | G68  | G24  | G68  |
| 1 j                   | 10           | 10  | 10      | 10   | 10   | 10   |
| 2 j                   | 10           | 25  | 17      | 14   | 25   | 25   |
| 3 j                   | 26           | 26  | 18      | 15   | 27   | 26   |
| 4 j                   | 28           | 28  | 19      | 23   | 28   | 30   |
| 5 j                   | 27           | 25  | 18      | 18   | 28   | 27   |
| 6 j                   | 25           | 25  | 16      | 15   | 22   | 22   |
| 7 j                   | 25           | 22  | 15      | 14   | 18   | 20   |
| 8 j                   | 23           | 20  | 14      | 12   | 19   | 19   |
| 9 j                   | 23           | 20  | 13      | 11   | 20   | 20   |
| 10 j                  | 21           | 19  | 12      | 11   | 20   | 20   |
| Moyenne de Z.D.I (mm) | 21.8         | 22  | 15.2    | 14.3 | 21.7 | 21.9 |

- **Z.D.I** : Diamètre de la zone d'inhibition.

**Tableau .10.** Cinétiques de pH de les souches G68 et G24 dans les milieux liquide (Jus de datte, Bennett, ISP2).

| Milieu<br>souche | Jus de datte |     | Bennett |     | ISP2 |     |
|------------------|--------------|-----|---------|-----|------|-----|
|                  | G24          | G68 | G24     | G68 | G24  | G68 |
| 1 j              | 7.2          | 7.2 | 7.2     | 7.2 | 7.2  | 7.2 |
| 2 j              | 6.9          | 7.1 | 4.7     | 4   | 5.5  | 5.4 |
| 3 j              | 7            | 5.7 | 4.5     | 5   | 6.1  | 6.2 |
| 4 j              | 6            | 5.9 | 4.4     | 5.9 | 7    | 6.5 |
| 5 j              | 4.9          | 5.5 | 7.5     | 7   | 6.6  | 7.2 |
| 6 j              | 5.5          | 5.5 | 7.5     | 7   | 7.9  | 6.4 |
| 7 j              | 5.6          | 5.7 | 7.9     | 7.9 | 7.7  | 7.9 |
| 8 j              | 5.3          | 5.9 | 8.2     | 7   | 7.4  | 7.4 |
| 9 j              | 5.6          | 6.1 | 8.3     | 7   | 7.5  | 7.3 |
| 10 j             | 4.8          | 6.6 | 8       | 7   | 6.5  | 7   |

**Tableau .11.** Activité antifongique des extraits organiques de les souches G68 et G24.

| Extraits organiques | Diamètres de zone d'inhibition en (mm) |            |
|---------------------|--|------------|
|                     | Souche G68                             | Souche G24 |
| n-Hexane            | 0                                      | 0          |
| n-Butanol           | 20                                     | 17         |
| Acétate d'éthyle    | 0                                      | 0          |
| Dichlorométhane     | 0                                      | 0          |

## ملخص

يهدف العمل الذي قمنا به إلى إنتاج مضادات فطريات فعالة ضد الخميرة الممرضة *Candida albicans* من خلال سلالتين من الجنس *Streptomyces* هما G24 و G68 باستخدام عصير تمر ذو قيمة منخفضة في السوق. تم نمو كل من السلالتين على الوسط الغذائي المحضر من التمر ولكن في تخفيف منخفض منه D4. لم يكن النمو كبيراً، لذا وجب إضافة مصدر من النيتروجين  $\text{NaNO}_3$  لهذا التخفيف للحصول على نمو جيد. حركية إنتاج المضادات الفطرية لـ *Candida* على الأوساط الصلبة: عصير التمر، ISP2 و Bennett أظهرت أن أقصى نشاط للسلالتين على كل من ISP2 و Bennett هو في اليوم الثاني. على العكس من ذلك، تم تسجيل أقصى نشاطاً بالنسبة للوسط المحضر من التمر في اليوم السادس. أما في ما يتعلق بحركية النشاط على الوسط السائل، فإن أقصى نشاط للسلالتين في الأوساط الثلاثة هو في اليوم الرابع من الحضانة. أظهر حساب متوسطات مناطق التثبيط أن الوسط المحضر من عصير التمر أفضل مقارنة بالوسطين ISP2 و Bennett في الحالة السائلة أو الصلبة. لم يتم استخلاص الجزيئات المضادات الفطريات إلا بواسطة محلول البيوتانول. أظهر الطيف المحصل عليه من الكروماتوغرافية السائلة فائقة الجودة HPLC لمستخلص البيوتانول الخام للسلالة G24 وجود 5 أجزاء.

كلمات المفتاحية: عصير التمر، مضاد فطري، *Streptomyces*، *Candida albicans*.

## Résumé

Le travail que nous avons entrepris à pour objectif, la production des antifongiques contre la levure pathogène *Candida albicans* à partir de deux souches de *Streptomyces* G24 et G68 en utilisant un à base du jus de dattes à moindre valeur marchande. Les deux souches ont poussé sur ce milieu mais à une dilution faible D4. L'ajout d'une source d'azote minéral  $\text{NaNO}_3$  à cette dilution était nécessaire pour avoir une croissance plus abandon. La cinétique de production des activités anti *Candida* sur les milieux solides : jus de dattes, ISP2 et Bennett a montré que le jour de la production maximale sur les deux milieux ISP2 et Bennett est le 2<sup>e</sup> jour. Par contre, pour le milieu Jus de dattes est le 6<sup>e</sup> jour. En ce qui concerne la cinétique de production sur le milieu liquide les activités sont maximales sur les trois milieux au 4<sup>e</sup> jour d'incubation. Le calcul des moyennes des zones d'inhibition a montré que le milieu du jus de dattes est meilleur par rapport aux deux milieux ISP2 et Bennett que se soit liquides ou solides. Les molécules antifongiques des deux souches ne sont apparues extractible que par le solvant *n*-butanol. Le profil en HPLC d'extrait butanolique brut de la souche G24 a montré la présence des 5 fractions.

**Mots-clés :** Jus de dattes, antifongiques, *Candida albicans*, *Streptomyces*.

The aim of our work is the production of antifungal compounds against the pathogenic yeast *Candida albicans* from two strains of *Streptomyces* G24 and G68 using a date juice with lower market value. Both strains G24 and G68 had grown on this medium but at low dilution D4. The addition of a mineral nitrogen source  $\text{NaNO}_3$  at this dilution was necessary to have more growth abandonment. The production kinetics of anti *Candida* activities on solid media: date juice, ISP2 and Bennett showed that the day of maximal production on both ISP2 and Bennett media is the 2nd day. However, in the middle date juice is the 6th day. Concerning the kinetics of production on the liquid medium the activities are maxima on the three media at the fourth day of incubation. The calculation of the averages of the zones of inhibition showed that the medium of the date juice is better compared than the two media ISP2 and Bennett that is liquid or solid. The antifungal molecules of the two strains are only appeared extractable by the *n*-butanol solvent. The HPLC profile of crude butanolic extract of strain G24 showed the presence of the 5 fractions.

**Key words:** date juice, antifungal compounds, *Streptomyces*, *Candida albicans*.