République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de :
Master en Biotechnologie Microbienne

Thème

Essai de caractérisation des substances antimicrobiennes produites par une souche d'actinomycètes STA_{10}

Présenté par M^{elles}: MAHFOUD Fatima et RACHDI Katia

Membre du jury :

Président : Mr KECHA M.
Examinatrices : Mme YAHYAOUI H.
Melle DJINNI I.
Promoteur : Mr BENDJEDDOU K.

2012/2013

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Nous tenons à remercier sincèrement Monsieur BENDJEDDOU, qui, en tant que encadreur, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nos remerciements s'adressent également à Messieurs MESSIS et BETACHE: pour leur générosité et leur précieuse aide dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges professionnelles.

Nous exprimons notre gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'honorer ce travail en l'examinant et lui apporter leurs précieux conseils et orientations.

Dédicaces

A la mémoire de ma grand-mère

A mes très chèrs parents pour qui je dois toute gratitude

A mes frères et sœurs

Fatima

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents pour leurs encouragements incessants et leurs soutiens aux moments difficiles.

Ma grande mère

Mon frère et Mes sœurs Kahina et doudah

A ma chère famille

Katia

Liste des abréviations

Ac.e : Acétate d'éthyle.

ACN: Acétonitrile.

ACTN: Acetone.

BHIB: Brain and Heart Infusion Broth.

But: Butanol.

C.albicans: *Candida albicans*.

DCM: Dichloromethane.

E.coli: *Escherichia coli.*

Eth: Ethanol.

MEM: Mincer Eau de Mer.

N-Hex: n-Hexane.

pH : Potentiel d'hydrogène.

S.aureus : *Staphylococcus aureus.*

SCA : Strach Casein Agar.

TFA : Trifluoroacetique.

UA : Unité Arbitraire.

UFC : Unité formant colonie.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure. 1	Cycle de développement d'un *Streptomyces*	3
Figure. 2	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche STA10 sur milieu SCA liquide	10
Figure. 3	Extraction des substances antimicrobienne à partir de la culture sur milieu solide	12
Figure. 4	Aspect de la souche STA_{10} après dix jours d'incubation sur gélose MEM	15
Figure. 5	Test d'activité du surnageant concentré, issus de la culture sur milieu liquide, vis-à-vis de *C. albicans*	17
Figure. 6	Test d'activité de l'extrait de la macération vis-à-vis de *C. albicans*	18
Figure. 7	Effet du pH sur l'activité antifongique du surnageant concentré issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de *C.albicans*	19
Figure. 8	Effet du pH sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*	19
Figure. 9	Test d'activité des différentes solutions tampon vis-à-vis de *C. albicans*	20
Figure. 10	Effet du pH sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*	21
Figure. 11	Effet du pH sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu solide vis-à-vis de C.*albicans*	21
Figure. 12	Effet de la température sur l'activité antifongique du surnageant concentré issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*	23
Figure. 13	Effet de la température sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*	24
Figure. 14	Effet de la température sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*	25

Figure. 15	Effet de la température sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu solide vis-à-vis de C.*albicans*	26
Figure. 16	Effet des enzymes sur l'activité antifongique du surnageant concentré issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*	27
Figure. 17	Effet des enzymes sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*	27
Figure. 18	Effet des enzymes sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*	28
Figure. 19	Effet des différents solvants organiques sur l'activité antifongique de surnageant issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*	29
Figure. 20	Effet de solvants sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*	30
Figure. 21	Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*	31
Figure. 22	Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique des substances produites su milieu solide vis-à-vis de C.*albicans*	31

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Milieu MEM	Annexes I
II	Milieu SCA	Annexes I
III	Bouillon nutritif	Annexes I
IV	Gélose Muller Hinton	Annexes I
V	Milieu BHIB	Annexes I
VI	Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide	Annexes II
VII	Diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération	Annexes II
VIII	Diamètre des zones d'inhibition pour les solutions tampon témoins	Annexes II
IX	Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide	Annexes II
X	Diamètre des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération	Annexes II
XI	Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide	Annexes II
XII	Diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération	Annexes II
XIII	Diamètres des zones d'inhibition pour les enzymes utilisées comme témoins	Annexes II
XIV	Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide	Annexes II
XV	Diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération	Annexes II

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction…… 1

Première partie : Synthèse bibliographique

Les actinomycètes : systématique et importances

I. Taxonomie 2
II. Ecologie des actinomycètes 2
III. Cycle biologique des actinomycètes.....3
IV. Importance des actinomycètes.....4

IV.1. Importance dans le domaine industriel 4

IV.1.1. Production d'antibiotique 4

IV.1.2. Production d'autres substances 4

IV.2. Importance dans le domaine agronomique 5

IV.3. Autres rôles 5

Deuxième partie : partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Origine des souches.....6
II. Revivification des souches.....6
a. La souche test.....6

b. Les souches cibles 6

III..Mise en évidence de l'activité antimicrobienne 6

III.1. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide……..... 6

III.2 La mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide 7

IV..Production de substances antimicrobiennes 7

IV.1. Culture sur milieu liquide 7

a. Pré-culture 7
b. Culture 8

IV.2. Culture sur milieu solide 10

V..Le calcul du nombre d'unités arbitraires 12

VI..Caractérisation préliminaire des substances antimicrobiennes 12

VI.1. Effet du pH 12

VI.2. Effet de la température 13

VI.3 Effet des enzymes 13

VI.4. Effet des solvants organiques 13

Résultats et discussion

I. Revivification de souche STA10 14
II. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne 14

II.1. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide 14

II.2. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide 15

III. Production de substances antimicrobiennes 15
III.1. Culture sur milieu liquide 15

a.Pré-culture 15

b.Culture 15

III.2. Culture sur milieu solide 16

IV. Calcul du nombre d'unités arbitraires 17

V. Caractérisation préliminaire des substances antimicrobiennes 17

a. Effet du pH sur l'activité antifongique du surnageant concentré issu de la culture sur milieu liquide 17

b. Effet du pH sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération 19

V.2. Effet de la température 21

a. Effet de la température sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide 21

b. Effet de la température sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération ... 23

V.3. Effet des enzymes 25

a. Effet des enzymes sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide 25

b. Effet des enzymes sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération 27

V.4. Effet des solvants organiques 27

a. Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique des substances produites par la souche STA_{10} sur milieu liquide 27

b. Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération 29

Conclusion 31

Références bibliographiques 32

Annexes

Introduction

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde entier, mais leur efficacité est confrontée à des problèmes cliniques graves, surtout en raison de l'émergence des bactéries multirésistantes.

De nouvelles approches pour le développement de nouveaux antibiotiques ont été poursuivi, tels que les outils de la chimie combinatoire, mais seuls quelques-uns sont fabriqués par l'industrie pharmaceutique aujourd'hui. (**VALAN ARASU *et al,* 2013**). Ces constats justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules d'antibiotiques. Les actinomycètes et particulièrement les Streptomycètes représentent la principale source de métabolites secondaires à activité antimicrobienne. (**Reghioua *et al,* 2008**).

L'isolement d'actinomycètales actives à partir d'écosystèmes non ou peu exploités permet, éventuellement, la découverte de souches rares ou de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité. **(Boughachiche F *et al,* 2005).** Plus de 4000 nouveaux composés bioactifs ont été obtenus, la recherche de nouveaux actinomycètes d'intérêt pour la biotechnologie est toujours importante. (**Semêdo, *et al,* 2000**)

Les actinomycètes sont une source quasi illimitée de nouveaux composés avec de nombreuses applications thérapeutiques, et tiennent une position de premier plan en raison de leur diversité et leur capacité à produire de nouveaux composés bioactifs. Plus de 70% de métabolites secondaires microbiens sont produit par les actinomycètes. Parmi ces actinomycètes le genre *streptomyces* est considéré comme économiquement important, plus de 10.000 antibiotiques connus, 50-55% sont issus de ce genre. (**Subramani, *et al,* 2012**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, qui consiste en l'étude de l'activité antimicrobienne d'une souche d'actinomycètes STA_{10}. Nous nous sommes fixés comme objectif essentiel : la caractérisation physicochimique préliminaire des substances antimicrobienne produite par cette souche.

Synthèse Bibliographique

Les actinomycètes : systématique et importances

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en G+C% élevé (>55%) (**Badji *et al*, 2011**). Ils possèdent une paroi caractéristique des procaryotes et une morphologie fongique (**Colombié, 2005**).

Ils sont généralement hétérotrophes (certains sont chimiotrophes), aérobie/ anaérobie facultatifs, mésophiles ou thermophiles et neutrophiles (**Lechevalier, 1981 ; Tracy *et al*, 2002**)

Ils sont généralement des saprophytes, mais quelques-uns sont pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes tel que *Actinomyces bovis, et Streptomyces scabies* (**Goodfellow et Williams, 1983; Peltola *et al*, 2001**).

Ils sont les plus grands producteurs d'antibiotiques (**Kitouni *et a*l, 2005 ; Arasu *et al*, 2009**). Environ 75% des antibiotiques, découverts entre 1971 et 1980, proviennent de ce groupe (**Seong *et al*, 2001** ; **Zhao *et al*, 2006**)

I. Taxonomie

Les actinomycètes sont classés actuellement dans le phylum *Actinobacteria* qui referme une seule classe : *Actinobacteria*. Cette classe est subdivisée en 5 sous classes, 6 ordres, 13 sous ordres (dont 9 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 48 familles, 210 genres (dont 188 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales)* et près de 1711 espèces. Le genre *Streptomyces* à lui seul comprend 519 espèces. (**Bergey's Manual, 2004**)

A cause de leur structure filamenteuse, les actinomycètes y compris les *Streptomyces* ont longtemps été sujets à controverse à propos de leur nature : certains les considérants comme des bactéries filamenteuses, d'autres comme des champignons.

Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe est définitivement classé parmi les bactéries. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de l'acide diaminopimelique (**Lechevalier, 1981**)

II. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaire que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (**Rifaat**, **2003**). La grande majorité est d'origine tellurique. Ainsi jusqu'à 10^6 UFC d'actinomycètes sont habituellement présent dans 1 g de sol (**Chen *et al*, 2005 ;**

Badji, 2006). Ils forment une grande partie de la population microbienne du sol, particulièrement dans les conditions alcalines et sèches (**Oskay *et al*, 2004**).

Le genre *Streptomyces* représente plus de 95% des souches *actinomycétales* isolées dans la plupart des sols **(Loqman**, **2009**) leur nombre dépend de nombreux facteurs : la nature et l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'humidité et l'aération. (**Lacey, 1973 ; Williams, 1978, Elwan *et al*, 1985**).

III. Cycle biologique des actinomycètes

Le cycle de développement des actinomycètes est très complexe sur milieu solide (**Sanchez, 2007**). En effet, lorsque les spores trouvent les conditions favorables et les éléments nutritifs ; elles germent et donnent naissance à un mycélium primaire (mycélium de substrat) formé d'hyphes non septés, plurinucléés, ramifiés et ancrés sur milieu solide.

Le mycélium primaire s'autolyse et les produits qui en résultent sont utilisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se spiralisent, se cloisonnent et se différencient pour former des chaines de spores uninucléés qui sont des agents de dissémination. En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire (**Colombié, 2005**). La **Figure. 1** résume les étapes du cycle de développement d'un *Streptomyces*.

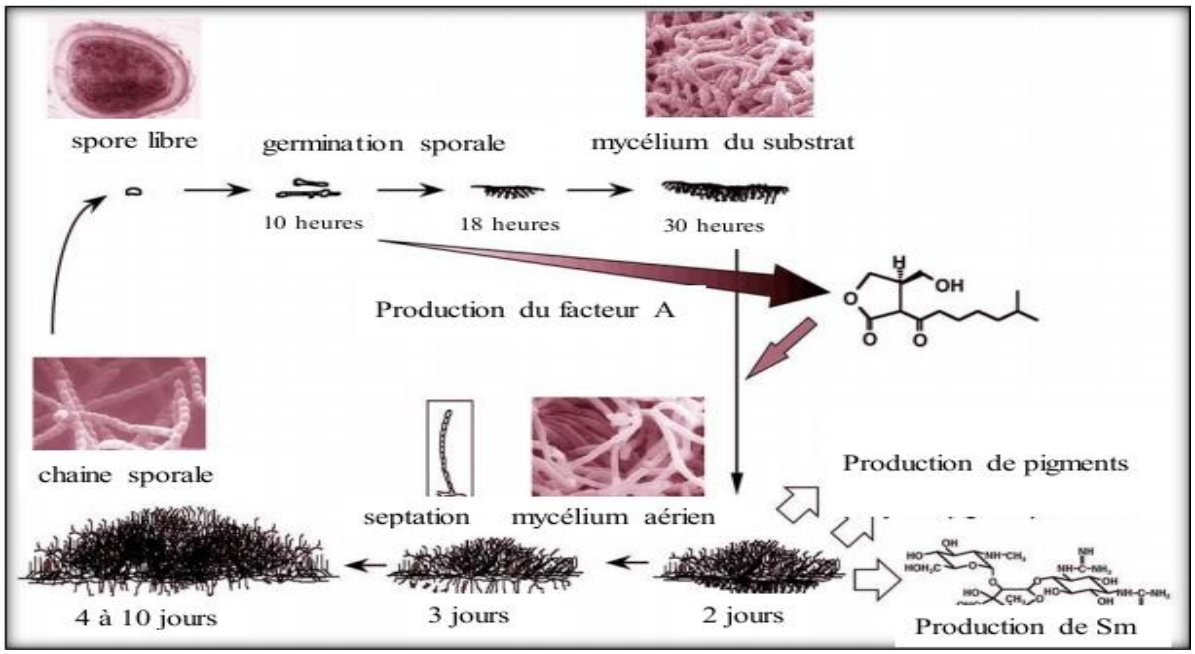


Figure. 1 : Cycle de développement d'un *Streptomyces* (**Loucif, 2011**)

IV. Importance des actinomycètes

Les actinomycètes suscitent un grand intérêt dans diverses applications dues à leurs capacités de synthétiser de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs (**Oskay *et al*, 2004**).

Chaque souche d'actinomycètes possède probablement le potentiel génétique pour produire de 10 à 20 métabolites secondaire (**Arasu *et al*, 2009**). De toutes ces substances, les antibactériennes disposent d'une importance aussi bien thérapeutique que commercial (**Ouhdouch *et al*, 2001**).

IV.1. Importance dans le domaine industriel

IV.1.1 Production d'antibiotiques

Les actinomycètes ont la particularité, pour un très grand nombre d'entre eux, de produire des antibiotiques. Depuis la découvertes de la streptomycine par Waksman en 1943, des centaines d'antibiotiques ont été isolés, tel que la novobiocine (**Okami et Hotta, 1988**).

La production d'antimicrobiens chez les autres genres fait intervenir surtout *Micromonospora* et *Nocardia*, mais également des genres moins fréquents, tel que *actinomadura* et *actinoplanes*, ou encore rares, tel que *Saccharothrix* et *Nocardiopsis* .

Un nombre appréciable d'antibiotiques, de structures chimiques très diversifiées, a trouvé une application en thérapeutique humaine et vétérinaire. Près de 20% des antimicrobiens sécrétés par les actinomycètes ont un pouvoir antifongique, les 80% restants ont des propriétés assez diverses : antibactériennes, antifongique et antibactériennes à la fois, antivirales, antitumorales, insecticides, etc. (**Bakour, 2006**).

IV.1.2. Production d'autres substances

Après les antimicrobiens, les enzymes représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinomycètes. Elles sont utilisées en industrie agro-alimentaire (glucose isomérase), en thérapeutique (cholestérol oxydase), dans le domaine vétérinaire, comme additif pour l'élevage, ou encore en industrie chimique comme les protéases ajouté aux détergents. (**Bakour, 2006 ; Zitouni, 2005**). En plus des enzymes les actinomycètes produisent d'autres substances d'intérêt comme :

Les Insecticides microbiens sont devenus les composants principaux de l'industrie des biopesticides, plusieurs actinomycètes d'origine marine et terrestre ont la capacité de les produire.

Un grand nombre d'antitumoraux est produit par les actinomycètes tels que la doxorubicine, la daunorubicine et l'aclarubicine. Ces substances sont d'une importance thérapeutique majeur, quelques-unes sont utilisés en chimiothérapie contre différent cancers (**Souagui**, **2009**).

Des immunosuppresseurs et des antihistaminiques sont aussi produits par les actinomycètes.

La tetrodotoxine est une neurotoxine qui est produites par environ dix souches d'actinomycètes (**Imada**, **2004**).

IV.2. Importance dans le domaine agronomique

En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes ont un rôle important dans les processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols grâce à leurs capacités de transformation des substances organiques complexes (les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, etc.) **(Lechevalier**, **1981**; **Goodfellow et Williams**, **1983 ; Lacey, 1997**).

Les actinomycètes du genre *Frankia* sont aussi extrêmement importants pour de nombreux genres de plantes, agissant en tant que symbiotes de plantes fixatrices d'azote (**Zaitlina, 2006**).

IV.3. Autres rôles

Certaines espèces d'actinomycètes se sont révélées capables de dégrader ou de transformer des toxines produites par des champignons toxinogènes (mycotoxines).

Des isolats de *streptomyces sp*, sont capables de dégrader l'acide phtalique, le benzène, les dérivés du benzoate et les alcools aliphatiques (**Dixit *et al,* 2000**).

Matériel et méthodes

I. Origine des souches

La souche d'*actinomycètes* (STA_{10}) utilisée dans cette étude appartient à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA); elle nous a été aimablement fournit par Mme BOUDERYES.

Cette souche a été isolée à partir de la station d'épuration d'Aoukas à Béjaia.

Les souches cibles utilisées ont été fournis par le laboratoire d'analyses médicales Ait Bachir, Guendouza, AKBOU.

Il s'agit de :

Bactérie Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

Bactérie Gram négatif : *Escherichia coli*.

Levure : *Candida albicans*.

II. Revivification des souches

a. La souche productrice

La revivification a été réalisée par des repiquages successifs sur milieu solide MEM, l'incubation est effectuée à 28°C pendant 10 jours.

b. Les souches cibles

La souche de *C. albicans* a été repiquée sur milieu BHIB, les souches d'*E. coli* et *S. aureus*, sont repiquées sur bouillon nutritif, l'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24h.

Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

III.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche STA_{10} a été effectuée par la technique des disques d'agar **(Patel et Brown, 1969).** Cette technique consiste en un ensemencement par stries sérés et croisés de la souche $STA_{10,}$ qui sera ensuite incuber à 28°C pendant 10 jours. Après incubation, des disques d'agar de 6mm de diamètre ont été découpés par un embout stérile, puis déposés sur une gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée

en surface par écouvillonnage, en utilisant des suspensions de 10^6 UFC/ml pour chaque souche cible.

Les boites sont mises à 4°C pendant 2h afin de permettre une pré-diffusion des substances antimicrobiennes, et incubées par la suite à 37°C pendant 24h.

L'activité antimicrobienne est révélée par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques d'agar, le diamètre de ces zones est mesuré et exprimé en millimètre.

III.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide

Des précultures sont préparées avec la souche STA_{10} dans des tubes contenant chacun 5 ml du milieu SCA liquide, puis incubées à 28°C pendant trois jours. Au bout du troisième jour d'incubation, des flacons de 250 ml contenant 50 ml du milieu SCA liquide chacun sont ensemencés par les précultures. Une fois ensemencé, ces flacons sont incubés à 28°C pendant dix jours. Au bout du dixième jour d'incubation les cultures sont centrifugées à 8000 g pendant 20 min à 4°C, le surnageant récupéré est concentré sous vide.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne du surnageant concentré est effectué par la technique des puits décrite par **(Cintas *et al*, 1995)** : Les puits sont réalisés stérilement à l'aide d'un embout de 8 mm de diamètre sur une gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée en surface par écouvillonnage en utilisant des suspensions de 10^6 UFC/ml pour chaque souche cible, 100 µl du surnageant concentré sont déposés dans chaque puit.

Les boites sont mises à 4°C pendant 2h pour une pré-diffusion des substances antimicrobiennes puis incubées à 37°C pendant 24h.

L'activité antimicrobienne est révélée par l'apparition de zones translucides autours des puits. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et exprimés en millimètre.

III. Production de substances antimicrobiennes

IV.1. Culture sur milieu liquide

a. Pré-culture

Douze tubes contenant chacun 5ml du milieu SCA liquide, sont ensemencés en utilisant une bonne charge d'une culture fraiche de la souche STA_{10}, prélevée avec une anse de platine. Les tubes sont agités à l'aide d'un vortex puis incubés à 28°C pendant 3 jours.

b. Culture

Douze erlenmeyer de 250 ml remplis à 1/5ème de leur volume (50 ml) avec le milieu SCA liquide, sont ensemencés par les pré-cultures précédemment préparées. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à 28°C pendant 10 jours.

Après incubation le contenu de ces erlenmeyers est centrifugé à 8000g pendant 20 min à 4°C, le surnageant est récupéré et concentré sous vide.

Le test d'activité du surnageant concentré est effectué par la technique des puits précédemment décrite.

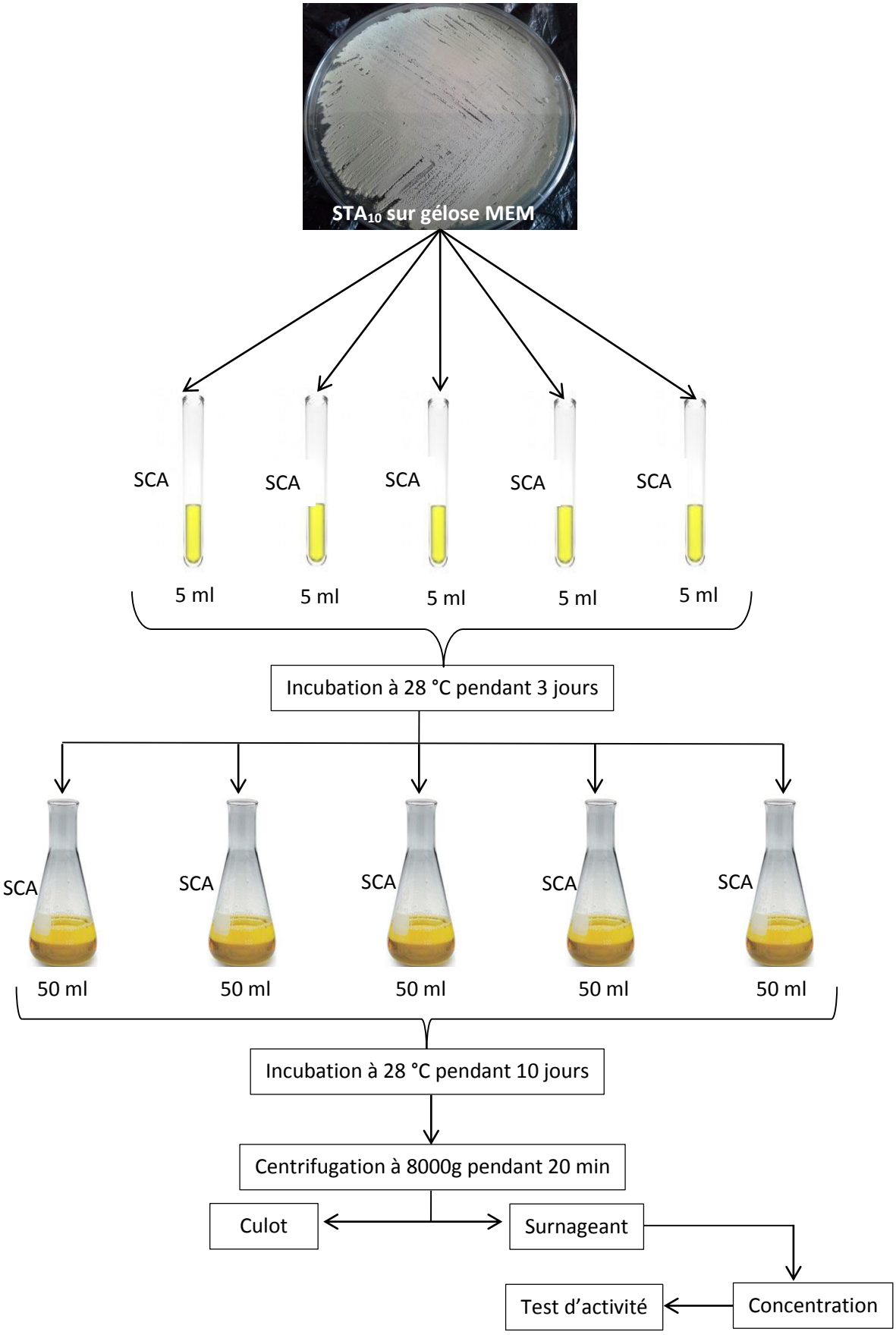


Figure. 2 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche STA10 sur milieu SCA liquide

IV.2. Culture sur milieu solide

Douze boites de gélose MEM sont ensemencées en surface par des stries serrés et croisés avec la souche $STA_{10,}$ puis incubées à 28°C pendant 10 jours.

Après incubation, la culture a subit une macération dans 400 ml d'une solution de TFA/acétonitrile (v/v) (200 ml/200 ml) pendant 4 h à 4°C, puis centrifugée à 8000g pendant 20 min à 4°C. Le culot de la première centrifugation a été remis en suspension dans 100 ml de la solution TFA/acétonitrile (v/v) (50 ml/50 ml), puis recentrifugé une deuxième fois, les surnageants des deux centrifugations ont été récupérés et mélangés. Les solvants organiques ont été éliminés par évaporation sous vide.

Le test d'activité de l'extrait récupéré est effectué par la méthode des puits précédemment décrite.

Culture de 10 jours de la souche STA_{10} sur gélose MEM

Macération dans le TFA /acétonitrile (200ml/200ml)

Centrifugation à 8000g pendant 20 min à 4°C

Surnageant

Culot

Remise en suspension dans le TFA/acétonitrile (50 ml/ 50 ml)

Centrifugation à 8000g pendant 20 min à 4°C

Surnageant

Evaporation des solvants sous vide

Test d'activité

Figure. 3 : Extraction des substances antimicrobienne à partir de la culture sur milieu solide

IV. Le calcul du nombre d'unités arbitraires

Le titre en substances antimicrobiennes est déterminé par le calcul du nombre d'unités arbitraires (UA), décrite par **Joerger et Klaenhammer (1986)** avec quelques modifications. Une série de dilutions en cascade du surnageant concentré et de l'extrait de la macération est effectuée dans de l'eau distillée, suivi d'un test d'activité anti-*C.albicans* de chaque dilution par la méthode des puits, décrite précédemment. Les titre en substances antimicrobiennes exprimé en unités arbitraires par ml (UA/ml) est égal à l'inverse de la dilution maximale donnant encore lieu à une zone d'inhibition détectable multipliée par 10, le volume des aliquotes déposées dans chaque puits étant de 200 µl.

V. Caractérisation préliminaire des substances antimicrobiennes

Après avoir déterminé le nombre d'unités arbitraires, il est indispensable de tester la stabilité des substances antimicrobiennes produites par la souche STA_{10} en présence de certains facteurs physicochimiques tels que la température, le pH, les enzymes et certains solvants organiques.

Après chaque test, l'activité antimicrobienne est vérifiée par la technique des puits vis-à-vis du germe le plus sensible. Les résultats obtenus sont comparés dans chaque cas à des témoins n'ayant pas subit l'action de ces agents.

Ces tests sont appliqués sur le surnageant concentré de la culture sur milieu liquide et sur l'extrait de la macération.

VI.1. Effet du pH

L'activité du surnageant concentré et de l'extrait de la macération a été testé sur une gamme de pH allant de 2 à 9 en utilisant les solutions tampon suivantes : glycine –HCl aux pH 2.0, 3.0 et 4.0, citrate-phosphate aux pH 5.0 et 6.0, phosphate de sodium à pH 7.0, Tris-HCl à pH 8.0 et glycine-NaOH à pH 9.0.

Des aliquotes de 200 µl sont mélangés avec 600 µl de chaque solution tampon afin d'avoir les valeurs de pH voulus, puis gardés à température ambiante pendant 4h. L'activité de ces préparations est testée par la méthode des puits.

Les solutions tampon sont aussi testées pour leur effet antimicrobien pour vérifier si l'activité antimicrobienne est due à l'effet du pH ou aux substances présentes dans le milieu.

VI.2. Effet de la température

Des fractions de 200µl du surnageant concentré et de l'extrait de la macération ont été soumises à différents traitements thermiques aux températures 70°C, 80°C, 90°C et 100°C pendant 5, 10, 15 et 20 min pour chaque température. Après refroidissement le test d'activité de ces fractions a été effectué en utilisant la technique des puits.

VI.3. Effet des enzymes

Les enzymes utilisées dans ce test sont, la Papaïne, la Pepsine et la trypsine. 1 mg de chaque enzyme est mis dans 1 ml de solution tampon appropriée (glycine-HCl à pH 3.0 pour la Pepsine et Phosphate de sodium à pH 7.0 pour la Papaïne et la Trypsine), puis des mélanges de chaque solution enzymatique avec le surnageant concentré (v/v) et avec l'extrait de la macération (v/v) sont préparés séparément, et incubés par la suite à 37°C pendant 4h. Le test d'activité antimicrobienne est réalisé par la technique des puits.

Les solutions enzymatiques sont utilisées comme témoins pour s'assurer que l'activité antimicrobienne vient réellement des substances antimicrobiennes présentes dans le surnageant et l'extrait de macération et non pas sous l'effet des enzymes en elles même.

VI.4. Effet des solvants organiques

Les techniques d'extraction et de purification des substances antimicrobiennes reposent essentiellement sur les techniques chromatographiques, ces techniques utilisent principalement des solvants organiques pour leur fonctionnement, c'est pour cela que l'étude de la stabilité des substances antimicrobiennes produites par la souche STA_{10} face à ces solvants est indispensable.

Les solvants organiques utilisés dans notre cas sont : L'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, le butanol, le n-Hexane, l'acétone, le dichlorométhane, le TFA (0.05%) et l'éthanol.

Des aliquotes de 200 µl sont mélangés avec chaque solvant organique (v/v), on laisse agir par la suite 2h, 4h et une nuit à 4°C. Après traitement les solvants sont évaporés sous vide.

L'activité antimicrobienne des aliquotes est testée en utilisant la technique des puits.

Résultats et discussion

I. Revivification de la souche STA_{10}

La souche STA_{10} montre une croissance visible dès le troisième jour d'incubation sur milieu solide MEM en développant un mycélium de substrat. Cette croissance s'intensifie au bout du septième jour avec l'apparition d'un mycélium aérien qui devient assez dense au dixième jour d'incubation représentant une sorte de tapis blanc **(Figure. 4)**.

Figure. 4 : Aspect de la souche STA_{10} après dix jours d'incubation sur gélose MEM.

II. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

II.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide

L'activité antimicrobienne de la souche STA_{10} à l'égard des souches cibles a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé, qui permet la détection de l'effet inhibiteur de la souche productrice envers les souches cibles utilisées.

La présence d'une substance inhibitrice est détectée par l'apparition d'une zone translucide autour du disque d'agar.

Les resultats obtenus montrent que la souche STA_{10} ne présente d'activité antimicrobienne qu'à l'égard de *C.albicans*. Cette activité est révélée par la présence de zones d'inhibition de 12 mm de diamètre. En ce qui concerne les souches de *S. aureus* et *E. coli*, aucune zone d'inhibition visible n'a été détéctée.

II. 2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide

La mise en évidence de l'effet antagoniste de la souche STA_{10} vis à vis des souches cibles a été effectuée par la technique des puits. Les résultas obtentus ont montré que les zones d'inhibition ne sont visibles que pour *C.albicans*, elle sont de l'ordre de 18 mm de diamètre. En ce qui concerne *S. aureus* et *E. coli* aucune zone d'inhibition n'a été détéctée.

Les resultats de l'effet antimicrobien de la souche STA_{10}, vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques, suggèrent que cet isolat d'actinomycètes produit des substances antifongiques (anti-*C. albicans*).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **(Kitouni *et al*. (2004))** qui ont montré que des souches d'actinomycètes isolées à partir des eaux salées (Sebkha) présentent une activité antifongique et antibacterienne. Toutefois, la présence d'une activité à la fois antibacterienne et antifongique diffère d'une souche d'actinomycetes à une autre.

Dans une étude similaire réalisée par **(Badji *et al*. (2006))**, des souches d'actinomycètes isolées aprtir du sol sont douées d'activité antifongique à l'agard de plusieurs éspèces de champignons y compris *C. albicans*. Cette activité antifongique à été mise en évidence sur milieu solide et milieu liquide (ISP_2). Cependant, contrairement à nos résultats, ces souches présentent une forte activité antibactérienne à l'égard de plusieurs éspèces bactériennes en particulier *E. coli* et *S. aureus*, alors que leur activité antifongique, en particulier anti-*C. albicans*, est très faible.

III. Production des substances antimicrobiennes

III.1. Culture sur milieu liquide

a. Pré-culture

Après trois jours d'incubation, la pré-culture a montré la formation de petites pelotes blanches en suspension dans le milieu liquide.

b. Culture

Le volume total de la culture est de 600 ml, après centrifugation et concentration sous vide, on a obtenu un volume de 25 ml, ce qui correspond à une concentration de 20 fois par rapport au volume initial.

Le test d'activité du surnageant concentré, ayant été effectué par la technique des puits envers *C. albicans*, a montré une activité à l'égard de ce germe. Cette activité se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition, autour des puits, de l'ordre de 18 mm de diamètre **(Figure. 5)**

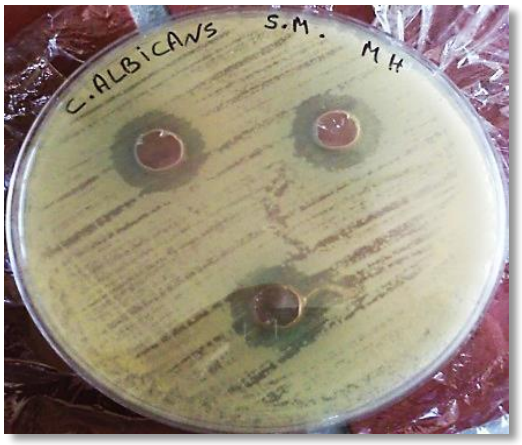


Figure. 5: Test d'activité du surnageant concentré, issus de la culture sur milieu liquide, vis-à-vis de *C. albicans*.

III.2. Culture sur milieu solide

Les cultures ayants subis une macération avec la solution TFA/acétonitrile, ont été centrifugées deux fois à 8000g pendant 20 min à 4°C. Après centrifugation, environ 500 ml de surnageant ont été récupérés. Après évaporation des solvants organiques, 20 ml environ ont été obtenus.

Le test d'activité de l'extrait de la macération a montré une activité antifongique envers *C. albicans* avec des zones d'inhibition de 18 mm de diamètre. **(Figure. 6)**

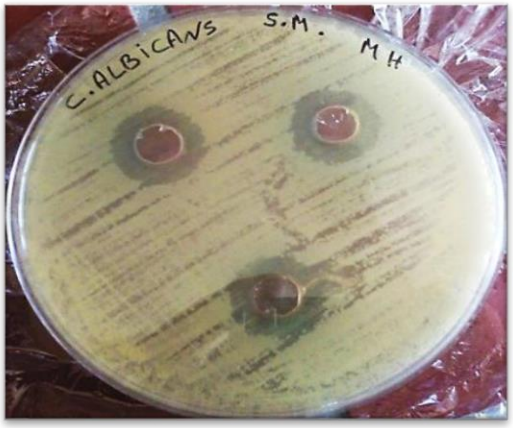


Figure. 6 : Test d'activité de l'extrait de la macération vis-à-vis de *C. albicans*.

IV. Calcul du nombre d'unités arbitraires

Les titre en substances antifongiques, exprimé en unités arbitraires par ml (UA/ml), est égal à l'inverse de la dilution maximale donnant encore lieu à une zone d'inhibition détectable. Dans notre cas, cette dilution correspond à 1/16, avec un volume déposé dans le puit, égale à 200 µl, donc le nombre d'unités arbitraires est égal à 80 UA/ml. Sachant que les volumes totaux de l'extrait de la macération et du surnageant concentré sont 20 ml et 25 ml respectivement, le nombre d'UA total est de 1600 UA pour l'extrait de macération et 2000 UA pour le surnageant concentré. Ce résultat suggère que la souche STA_{10} à tendance à produire plus de substances sur milieu liquide que sur milieu solide. Néanmoins, cette différence reste à discuter par ce que la quantité de substance antifongique contenu dans l'extrait de macération dépond de la solubilité de ces substances dans le mélange TFA/acétonitrile utilisé pour la macération. Ainsi des études plus approfondis sont nécessaires pour arriver à une telle conclusion.

V. Caractérisation préliminaire des substances antimicrobiennes

V.1. Effet du pH

a. Effet du pH sur l'activité antifongique du surnageant concentré issus du la culture sur milieu liquide

Le test a été effectué à l'égard de *C. albicans* par la technique des puits. Après 24 h d'incubation, les cultures ont révélées des zones d'inhibition à des pH neutres et alcalins, le diamètre de ces zones est maximal à pH 7 et 8, il est de l'ordre de 18 mm. A pH 6 et 9, les zones

d'inhibition obtenues sont de 16 mm de diamètre. Cependant, il y a eu une perte totale d'activité aux pH acides **(Figures. 7 et 8)**.

a : pH 2, **b** : pH 3, **c** : pH 4, **d** : pH 5, **e** : pH 6, **f** : pH 7, **g** : pH 8, **h**: pH 9, T: témoin

Figure. 7. Effet du pH sur l'activité antifongique du surnageant concentré issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de *C.albicans*

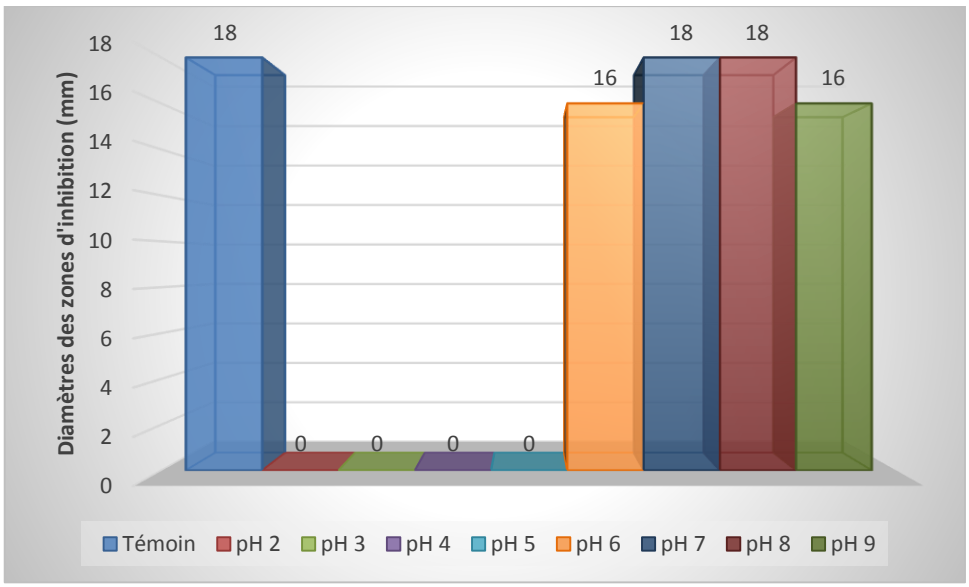
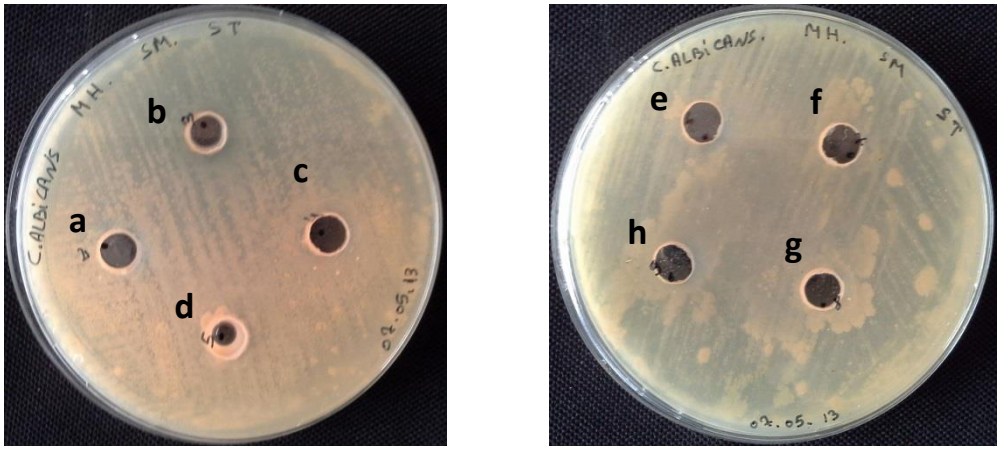


Figure. 8 : Effet du pH sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*.

Le test d'activité des solutions tampon à différents pH vis-à-vis de *C. albicans* a montré que ces solutions ne présentent aucune activité à l'égard de ce germe. Ces résultats montrent que les zones d'inhibition obtenues avec le surnageant du milieu liquide et l'extrait de la macération sous l'effet des différentes valeurs de pH, ne sont pas dues à la sensibilité de *C. albicans* aux variations de pH, mais à des substances antifongiques contenues dans les fractions testées **(Figure. 9).**

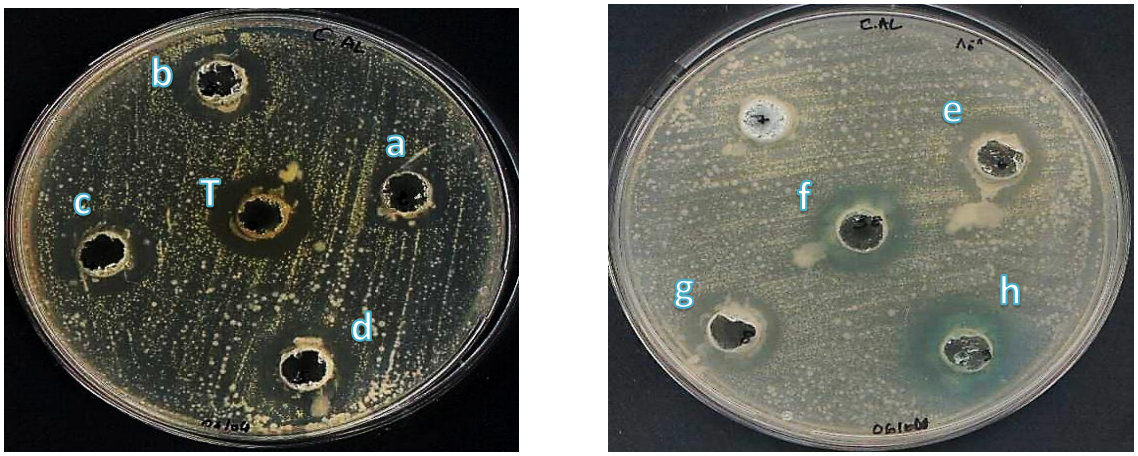


a: pH 2, **b** : pH 3, **c** : pH 4, **d** : pH 5, **e** : pH 6, **f** : pH 7, **g** : pH 8, **h**: pH 9

Figure. 9 : Test d'activité des différentes solutions tampon vis-à-vis de *C. albicans*

b. Effet du pH sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération

L'extrait de la macération présente une activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* pour toutes les valeurs de pH testées **(Figure. 10)**. Cependant, une légère perte d'activité a été observée à pH 2 où une zone d'inhibition de 14 mm a été obtenue. Des pertes négligeables ont été observées au pH 3 et aux pH allant de 5 à 9 avec des zones de 16 mm de diamètre. Le maximum d'activité a été obtenu à pH 4 avec une zone d'inhibition de 17 mm de diamètre **(Figure. 11).**



a : pH 2, **b** : pH 3, **c** : pH 4, **d** : pH 5, **e** : pH 6, **f** : pH 7, **g** : pH 8, **h** : pH 9, **T**: Temoin

Figure. 10 : Effet du pH sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*.

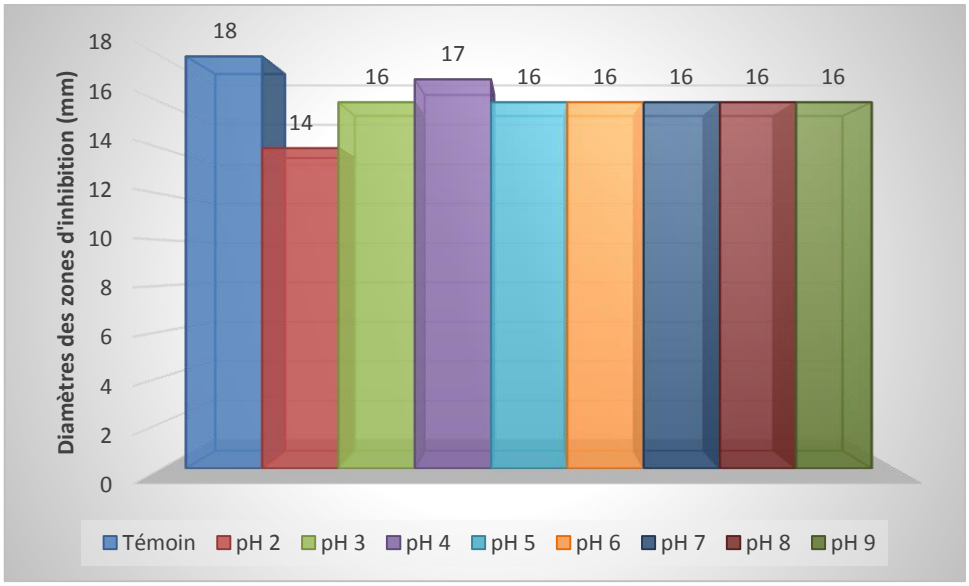


Figure. 11 : Effet du pH sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu solide vis-à-vis de C.*albicans*.

D'après ces résultats, il semble que les substances antifongiques produites sur milieu liquide et sur milieu solide ne sont pas les mêmes, du fait qu'elles présentent des comportements différents aux mêmes valeurs de pH. Ainsi, les substances antifongiques produites dans le milieu liquide ont perdu complètement leur activité aux pH allant de 2 à 5 contrairement à celles produites sur milieu solide qui n'ont perdues que partiellement leur activité (une légère perte d'activité aux pH 2, 3 et aux pH allant de 5 à 9 et une perte négligeable à pH 4). De plus, le maximum d'activité a été trouvé à pH 7 et 8 pour les substances antifongiques produites sur milieu liquide et à pH 4 pour les substances produites sur milieu solide.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **(Badji et *al.* (2006**)). Selon ces auteurs, l'activité des substances antifongiques produites par une souche d'actinomycètes (*actinomadura sp*. AC104), sur milieu liquide, est variable en fonction du pH ; le maximum d'activité a été trouvé à pH 7 et 8. Cependant, contrairement à nos résultats ces substances antifongiques ne présentent qu'une perte partielle d'activité à pH acide (entre 2 et 5).

Dans une autre étude rapportée par **(Reghioua *et al.* (2008**)), les substances produites par une souche d'actinomycètes (*Streptomyces sp*.) présentent un maximum d'activité à pH 4 et une légère perte partielle d'activité à des pH supérieurs ou inférieurs à ces valeurs.

V.2. Effet de la température

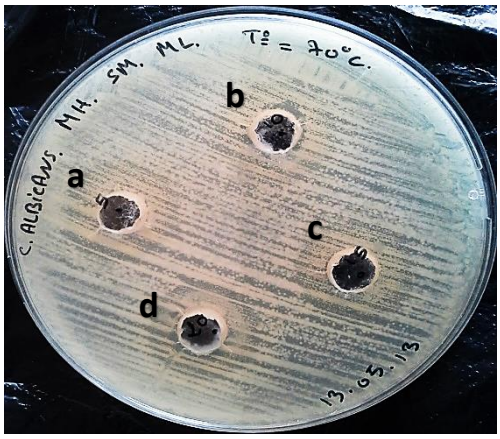
Des fractions de 200 µl du surnageant concentré et de l'extrait de la macération sont soumis à des traitements thermiques, à différentes températures, sur un intervalle de temps allant de 5 à 20 min pour chaque température.

a. Effet de la température sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide

Les résultats du traitement thermique des substances antifongiques produites sur milieu liquide montrent qu'elles gardent partiellement ou totalement leur activité envers C. *albicans* **(Figure. 12)**. En effet, ces substances sont stables à des températures de 70°C pendant 15 min, 80°C pendant 10 min, 90°C et 100°C pendant 5 min. A ces valeurs de température et de temps, aucune perte d'activité n'a été enregistrée. Toutefois, le même degré de perte d'activité (11%) a été observé après traitement à 70°C pendant 20 min, 80°C pendant 15 et 20 min, 90°C et 100°C pendant 10 et 15 min. Néanmoins, une

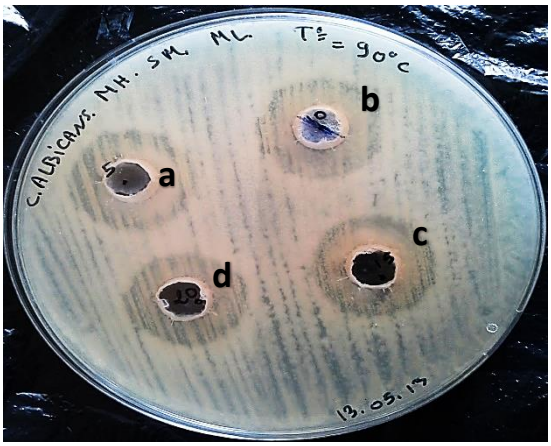
perte partielle mais plus importante que la précédente (22%) a été notée après traitement thermique à 90 et à 100°C pendant 20 min **(Figure. 13)**.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **(Badji *et al.* (2006)),** ces auteurs ont rapporté que les substances produites par une souche d'actinomycètes (*Actinomadura sp*. AC104) ont perdues totalement leur activité à 100°C pendant 30 min. cependant, il y a une perte partielle de l'activité à des températures plus basses (60°C pendant 60 min et 80°C pendant 45 min).



Température 70°C

Température 80°C



Température 90°C

Température 100°C

a : 5 min, **b** : 10 min, **c** : 15 min, **d** : 20 min

Figure. 12 : Effet de la température sur l'activité antifongique du surnageant concentré issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*.

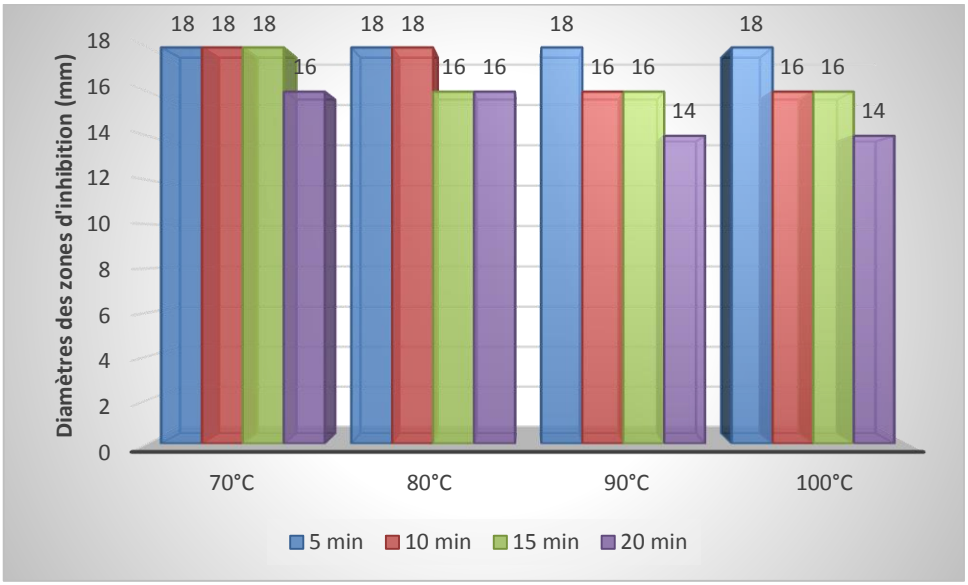
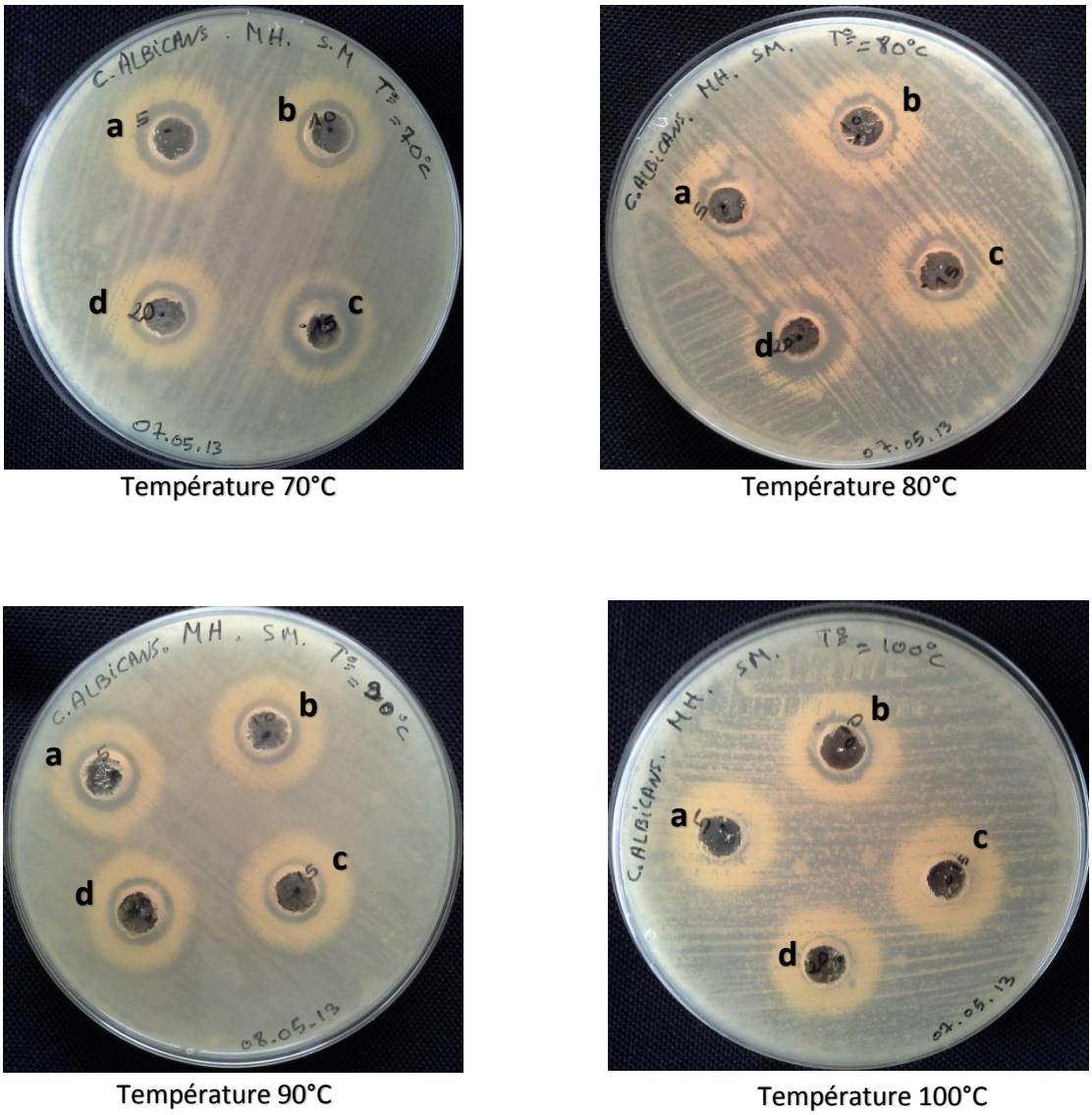


Figure. 13 : Effet de la température sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*.

b. Effet de la température sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération

D'après les résultats obtenus, il semble que les substances antifongiques produites sur milieu solide sont plus sensibles aux traitements thermiques que celles produites sur milieu liquide **(Figure. 14)**. En effet, une perte de 22% d'activité a été observée après traitement de 5 min à 70°C et 80°C. Cette perte d'activité atteint 27% après chauffage à 70°C pendant 10 et 15 min. Des pertes d'activité de 33% ont été observées après traitement thermique à 70°C pendant 20 min, 80°C et 90°C pendant 10 et 15 min et 100°C pendant 5 min. Après traitement de 20 min à 90°C et 10 min à 100°C une perte de 44% d'activité a été enregistrée. Cependant, après à 15 min à 100°C aucune activité n'a été détectée **(Figure. 15)**.

Ces résultats renforcent l'idée que la souche STA 10 produit des différentes substances antifongiques en fonction du milieu de culture.



a : 5 min, **b** : 10 min, **c** : 15 min, **d** : 20 min

Figure. 14 : Effet de la température sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*.

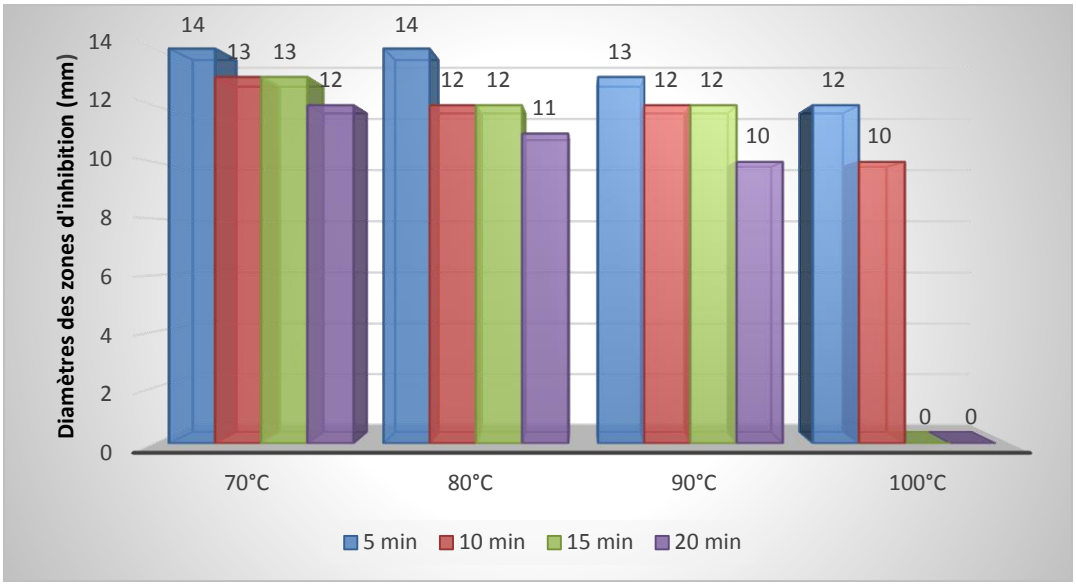


Figure. 15 : Effet de la température sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu solide vis-à-vis de C.*albicans*.

V.3. Effet des enzymes

a. Effet des enzymes sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide

L'étude de l'effet des enzymes protéolytiques sur l'activité des substances antifongiques, produites par la souche STA_{10} sur milieu liquide, a montré que ces substances sont partiellement sensibles à l'effet de la pepsine où une perte d'activité de 11% a été enregistrée. Toutefois, il semble que la trypsine et la papaïne n'ont aucun effet sur l'activité antifongique de ces substances **(figures. 16 et 17)**.

Ces résultats ne permettent pas de déterminer la nature des substances antifongiques produites par la souche STA_{10}. En effet, plusieurs travaux effectués sur des substances antimicrobiennes de nature protéiques ont montrées que ces substances purifiée sont insensibles partiellement ou totalement à l'effet des enzymes protéolytiques citées si dessus **(Tiwari et Srivastava, 2008 ; Xie et al. 2009 ; Vamanu et Vamanu 2010; Bendjeddou *et al*. 2012).**

De plus, cette activité antifongique pourrait être due à l'effet combiné de plusieurs substances de nature protéiques et non protéiques, ce qui pourrait expliquer la perte partielle de l'activité antifongique après traitement par la trypsine.

a : Pepsine, **b** : Papaïne, **c** : Trypsine.

Figure. 16 : Effet des enzymes sur l'activité antifongique du surnageant concentré issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*.

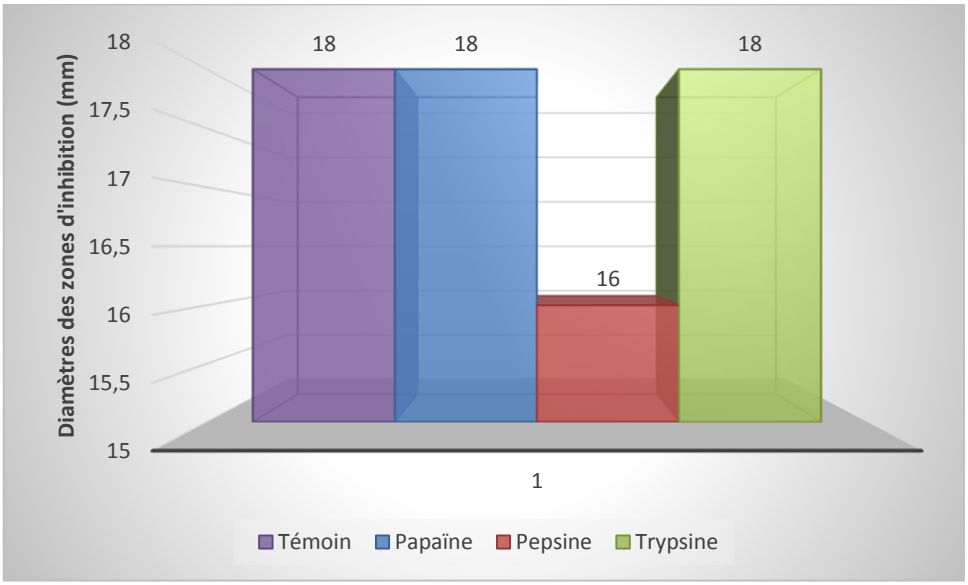


Figure. 17 : Effet des enzymes sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*.

b. Effet des enzymes sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération

Les résultats de l'étude de l'effet des enzymes protéolytiques sur l'activité des substances antifongiques produites par la souche STA_{10} sur milieu solide, ont montrés que ces substances présentent un comportement différent à celui des substances produites sur milieu liquide. Cette différence est révélée par une perte partielle d'activité des substances antifongiques, produites sur milieu solide, après traitement par les trois enzymes citées précédemment contrairement à celle produites sur milieu liquide où l'inactivation partielle n'est obtenue qu'en cas de traitement avec la trypsine. Ces résultats se concordent bien avec les résultats précédents (effet de pH, effet de la température) qui ont suggérés que les substances antifongiques produites par la souche STA_{10} sur milieu liquide et milieu solide sont différentes.

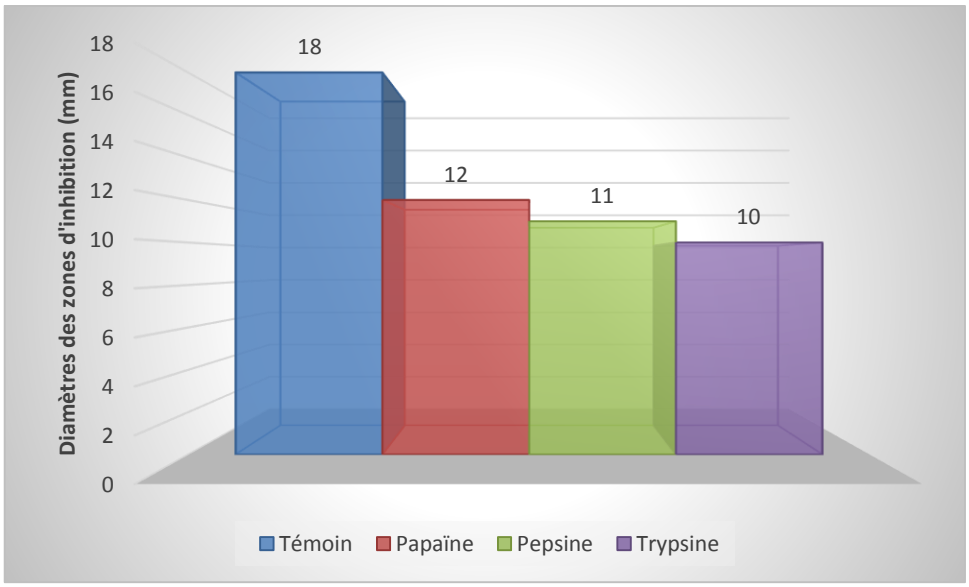


Figure. 18 : Effet des enzymes sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*.

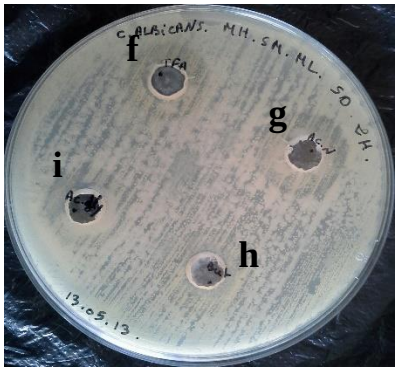
V.4. Effet des solvants organiques

a. Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique des substances produites par la souche STA_{10} sur milieu liquide

L'étude de l'effet des solvants organiques sur l'activité antifongique des substances produites par la souche STA_{10} sur milieu liquide a montré que ces substances sont stables après 2h en présence du TFA, acétonitrile, acétate d'éthyle, éthanol, n-hexane et le mélange

TFA/acétonitrile, à l'exception du butanol et le dichlorométhane où une légère perte d'activité a été enregistrée. Cependant, après 4h de contact avec l'éthanol, le dichlorométhane et le mélange TFA/acétonitrile des pertes partielles ont été observées contrairement au butanol où une perte total de l'activité a été notée. Après une nuit de contact avec les solvants organiques, une perte complète de l'activité a été enregistrée en présence du butanol, acétate d'éthyle et l'acétonitrile, cette perte est partielle pour le reste des solvants organiques, le degré de perte est diffèrent d'un solvant organique à un autre **(Figures. 19 et 20).**

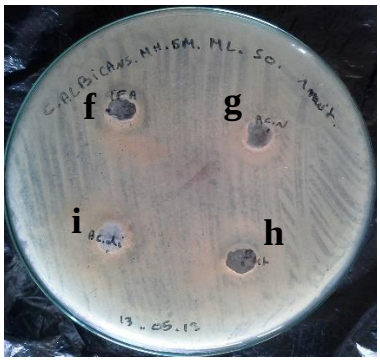
Après 2h



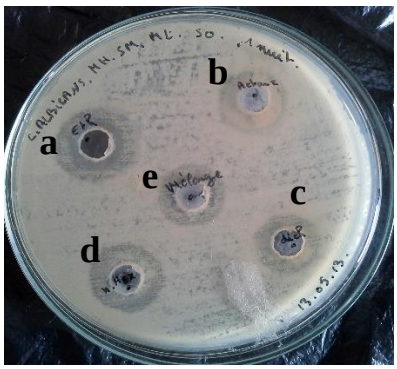
Après 2h

Après 4h

Après 4h



Après 1 nuit



Après 1 nuit

a : Eth, **b** : Act, **c** : Dich, **d**: n-Hex, **e**: TFA/AcN, **f**: TFA, **g**: AcN, **h**: But, **i**: Ac.e

Figure. 19 : Effet des différents solvants organiques sur l'activité antifongique de surnageant issus de la culture sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*.

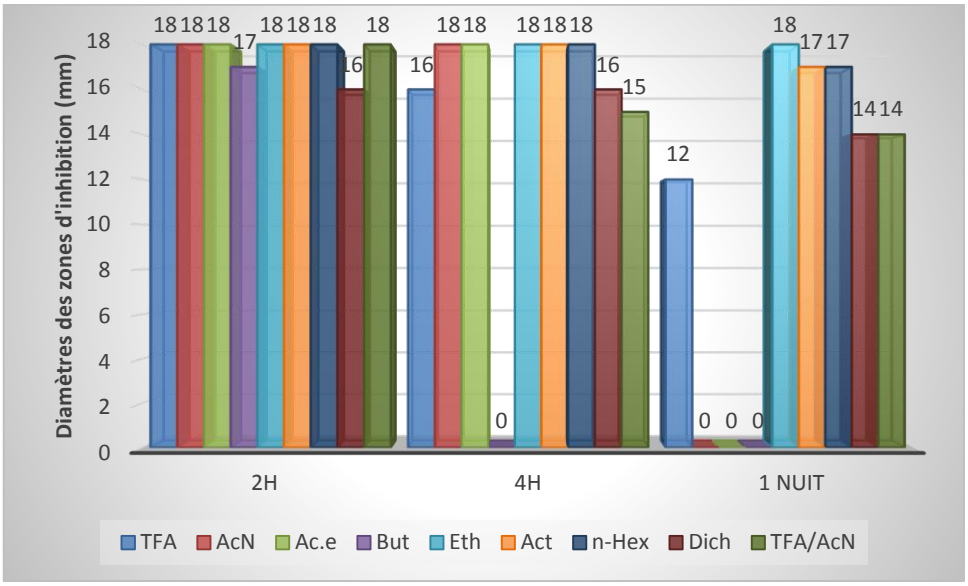
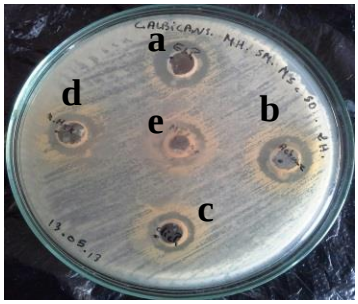


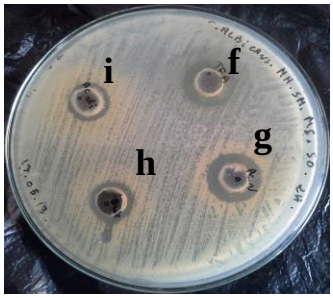
Figure. 20 : Effet de solvants sur l'activité antifongique des substances produites sur milieu liquide vis-à-vis de C.*albicans*.

b. Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération

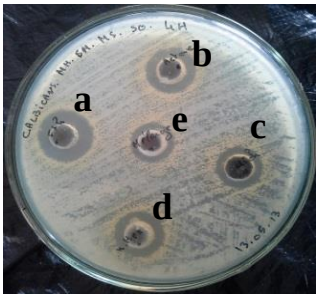
Les résultats obtenus ont montré que les solvants organiques utilisés ne provoquent aucune perte totale de l'activité des substances antifongiques produites par la souche STA_{10}. Les pertes partielles observées sont variables en fonction des solvants organiques et le temps de contact **(Figure. 21)**. Il est important de noter que ces substances antifongiques sont stables après 1 nuit de contact avec le TFA, l'acétonitrile et le mélange TFA/acétonitrile, ce dernier est très utilisé en chromatographie en phase inverse. Des pertes partielles ont été observées pour le restant des solvants organiques à l'exception de l'éthanol pour lequel les substances antifongiques sont résistantes après 4h de contact **(Figure. 22)**.



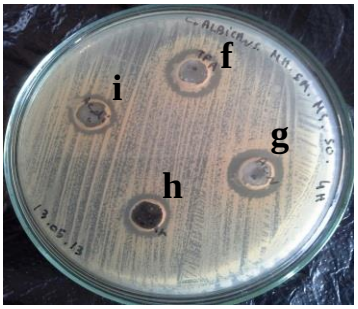
Après 2h



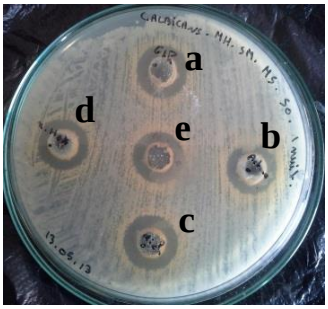
Après 2h



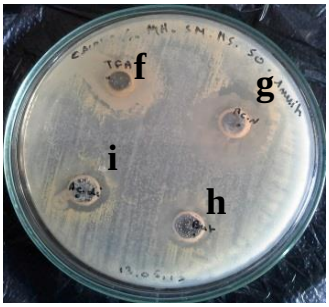
Après 4h



Après 4h



Après 1 nuit



Après 1 nuit

a : Eth, **b** : Act, **c** : Dich, **d**: n-Hex, **e**: TFA/AcN, **f**: TFA, **g**: AcN, **h**: But, **i**: Ac.e

Figure. 21 : Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique de l'extrait de la macération vis-à-vis de C.*albicans*.

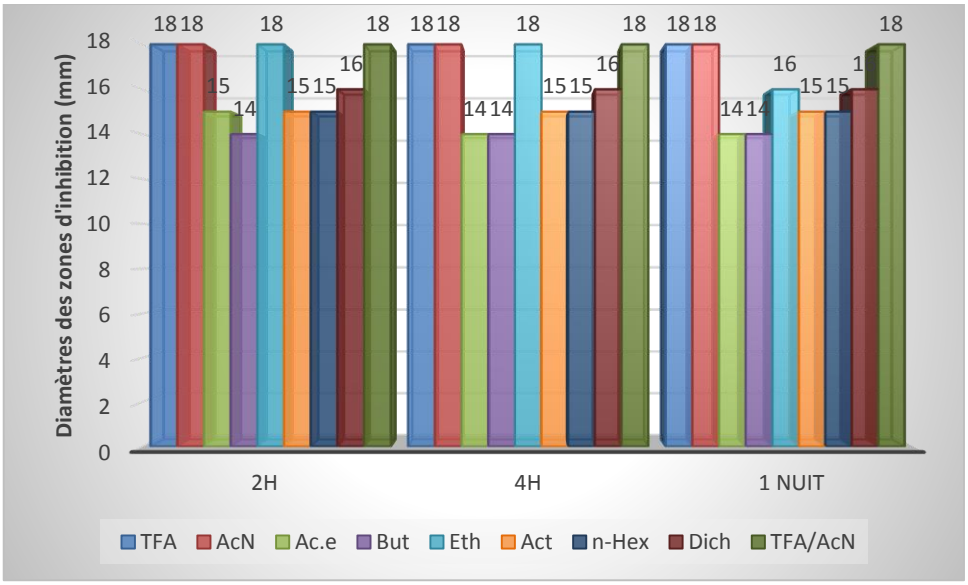


Figure. 22 : Effet des solvants organiques sur l'activité antifongique des substances produites su milieu solide vis-à-vis de C.*albicans*.

Conclusion

Dans cette étude, une souche d'actinomycètes STA_{10} a prouvé sa capacité de produire des substances antifongique à l'égard de C. *albicans*. La production de ces substances a été réalisée sur milieu SCA liquide et sur gélose MEM. Les résultats obtenus suggèrent que la quantité de substances produites sur milieu liquide est légèrement plus élevée que celles des substances produites sur milieu solide.

La caractérisation physicochimique des substances antifongiques, produites sur milieu liquide et celles produites sur milieu solide, a montré que leurs caractéristiques physicochimiques sont différentes, ce qui suggère que ces substances sont influencées par la nature et la composition du milieu de culture. En effet, les substances produites sur milieu liquide sont plus stable aux différents traitements thermiques et à l'action des enzymes protéolytiques comme la papaïne et la trypsine. Néanmoins, l'activité de ces substances est partiellement réduite sous l'effet de la pepsine, elle est cependant inhibée sous l'influence des pH acides.

Les substances antifongiques produites sur milieu solide, sont toutefois plus sensibles aux variations du pH et à l'action des enzymes protéolytiques. La température élevée influence sévèrement sur l'activité de ces substances vue qu'après 15 min de chauffage à 100°C il y a une perte totale de l'activité antifongique.

L'effet des solvants organiques sur les substances antifongiques produites par la souche STA_{10} est également étudié. L'activité antifongique de ces agents antagonistes est altérée par certains solvants organiques comme le dichlorométhane, le butanol et l'acétate d'éthyle. Cette altération dépond des solvants organiques et du temps de contact.

Références bibliographiques

Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., & Ignacimuthu, S. (2009). In vitroantibacterial activity of *streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock siol (India). J. mycolo. Medic.p. 56.

Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Mathieu, F., & Lebrihi, A. (2011). Identification of a new strain of Actinomadura isolated from Saharan soil and partial characterization of its antifungal compounds. *African Journal of Biotechnology*, *10*(63), 13878-13886.

Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2006). Antimicrobial compounds produced by Actinomadura sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Canadian journal of microbiology*, *52*(4), 373-382.

Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., Oulmi, L., Boudemagh, A., Kitouni, M., & Boulahrouf, A. (2005). Production et caractérisation préliminaire des antibiotiques isolés d'une Actinomycetale isolée de Sebkha de Ain Mlila (Algérie). *Antibiotiques*, *7*(4), 234-238.

Chen, M., Xiao, X., Wang, P., Zeng, X. and Wang, F. (2005). *Arthrobacter ardleyensis* sp.nov., isolated from Antarctic lake sediment and deep-sea sediment. *Arch. Microbiol.*, **183**,301-305.

Cintas L.M., Rodriguez J.M., Fernandez M.F., Sletten K., Nes I.F., Hernandez P.E. et Holo H. (1995). Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643–2648.

Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens.* Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thése de doctorat Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Filière : Microbiologie et Biocatalyse industrielles, Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés UMR-CNRS 5504, URINRA 792 du Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA de Toulouse. pp 23-24.

Dixit V. S., Pant A. (2000). Comparative characterization of two serine endopeptidases from *Nocardiopsis sp.* NCIM 5124. Bi*ochim. Biophys. Acta,* **1523 (2-3),** 261-268.

Elwan S.H., Dab A. and Al-Gounaim Y. (1985). Ecology of the Streptomycetes flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.,* **6**, 99-104.

George M. garrity Julia A. Belland Timothy G. Lilburne (2004). Taxonomie Outline of the Prokaryote Bergey's Manual of systématique Bacteriology.

Goodfellow M. and Williams S. T. (1983). Ecology of actinomycetes**.** *Ann. Rev***.** *Microbiol.*, **37**, 189-216.

Imada, C. (2004). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **87**, 59-63.

Joerger M.C. et Klaenhammer T.R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol*., 167: 439–446.

Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., ... & Boiron, P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, *15*(1), 45-51.

Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol.,Symp. Ser.*, **2**, 231-251.

Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts**.** *Ann. Agric Environ Med.*, **4**, 113–121**.**

Lechevalier M.P. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. *In: Acttinomycetes. Shaal and Pulverer (Eds.). Zbl. Bakt. suppl.,* **11**,159-166.

Loqman, S. (2009). *La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine* (Doctoral dissertation).

Loucif Karima (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de Magister spécialité : Microbiologie appliquée et Biotechnologie microbienne. Université Mentouri-Constantine, Algérie, P 9.

Okami, Y et Hotta, K (1988). Search and discovry of new antibiotics. In: M.Goodfellow,S.T.Williams& M. Mordarski (eds) Actinomycetes in Biotechnology. Acadamic Press, New York, pp. 33-67.

Oskay M., A. Tamer. and Azeri C. (2004).. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol*., **3**(9), 441–446.

Ouhdouch, Y., Barakate, M., & Finance, C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *European journal of soil biology*, *37*(2), 69-74.

Patel J.J. and Brown M.E., (1969). Interactions of *Azotobacter* with rhisosphere and root-surface microflora. Plant and soil, 31, 273-281.

Peltola, J. S., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Auling, G., Kroppenstedt, R. M., Busse, H. J., & Rainey, F. A. (2001). Isolation of Toxigenic NocardiopsisStrains from Indoor Environments and Description of Two NewNocardiopsis Species, N. exhalans sp. nov. andN. umidischolae sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, *67*(9), 4293-4304.

Reghioua S.Boughachiche F. Oulmi L. Zerizer H. Kitouni M. Boudemagh A. Boulahfrouf1 A. (2008). Separation et caracterisation preliminaire d'antibiotiques

produits par une souche representative d'actinomycetes isoles de sol aride de la region de BISKRA. Sciences & Technologie.

Rifaat H.M. (2003). The biodiversity of *Actinomycetes* in the River Nile exhibiting antifungal activity. *J. Medit. Eco.*, **4,** 5-7.

Sanchez C. (2007). Nature eviews Microbiology., 3, 214-224.

Semêdo, L. T. A. S., Linhares, A. A., Gomes, R. C., Manfio, G. P., Alviano, C. S., Linhares, L. F., & Coelho, R. R. R. (2001). Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiological research*, *155*(4), 291-299.

Seong C. N., Choi J. H., and Baik K.S. (2001). An Improved Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil. *J. Microbiol.,* **39** (1), 17-23.

Souagui. (2009).Sélection de souches d'actinomycètes modérément halophiles productrices d'antibiotiques. Thése de magister Spécialité : Microbiologie Appliquée. Université de A/Mira, Béjaia, Algérie, p.41

Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*.

Tiwari S.K. et Srivastava S. (2008). Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 79: 759 – 767.

Tracy J.M., Jensen P.R., Kauffman C.A. and Fenical W. (2002). Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Env.Microbiolo*., **68** (10), 5005–5011.

Vamanu E. et Vamanu A. (2010). The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB16. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4 (7): 534-537.

VALAN ARASU, M., DURAIPANDIYAN, V., & IGNACIMUTHU, S. (2013). Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine Streptomyces sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chemosphere*, *90*(2), 479-487.

Williams S.T. (1978). Streptomycetes in the soil ecosystem. *In: Nocardia and Streptomyces.*
Mordarski M., Kurylowicz W. and Jeljaszewicz J. (Eds.), Fisher Verlag G., Stuttgart, 137-144.

Xie J., Zhang R. et Shang C. et Guo Y. (2009). Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *Afr. J. Biotechnolo.*, 8 (20): 5611-5619.

Zaitlin, B., & Watson, S. B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Research*, *40*(9), 1741-1753.

Zitouni A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des Saccharothrix et des Nocardiopsis des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives secrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou. p231.

Zitouni A., Boudjella H, Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005). *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*, **156,** 984–993.

Annexes

Les milieux de culture

Tableau I : Milieu MEM (pH = 7.5)

composition	Quantité (g/l)
Amidon	10
Extrait de levure	4
Peptone	2
Agar	20

On ajoute 500 ml d'eau de mer et 500 ml d'eau distillée.

Tableau II : Milieu SCA (pH = 7.2)

composition	Quantité (g/l)
Agar	18
Amidon	10
KNO_3	2
K_2HPO_4	2
NaCl	2
Caséine	0.3
$MgSO_4, 7H_2O$	0.05
$CaCO_3$	0.02
$FeSO_4, 7H_2O$	0.01

Tableau III : Bouillon nutritif (pH = 7.2)

composition	Quantité (g/l)
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5

Tableau IV : Gélose Muller Hinton (pH = 7.3)

composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	3
Hydrolysat acide caséine	17.5
Amidon	1.5
Agar	16

Tableau V : Milieu BHIB (pH = 7.5)

composition	Quantité (g/l)
Infusion cœur-cervelle/peptone de viande	12
Peptone de caséine	15
Extrait de levure	5
Dextrose	2
Chlorure de sodium	5.5
Phosphate dipotassique	2.5
L-Cystéine	0.5
Hémine	0.005
Vitamine K	0.010

Sang de mouton défibriné : 50 ml.

Les résultats des tests d'activité

Effet du pH

Tableau VI : Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide

pH	T	2	3	4	5	6	7	8	9
Zone	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Diamètre (mm)	18	0	0	0	0	16	18	18	16

Tableau VII : Diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération

pH	T	2	3	4	5	6	7	8	9
Zone	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diamètre (mm)	18	14	16	17	16	16	16	16	16

Tableau VIII : Diamètre des zones d'inhibition pour les solutions tampon témoins

pH	T	2	3	4	5	6	7	8	9
Zone	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Diamètre (mm)	18	0	0	0	0	0	0	0	0

Effet de la température

Tableau IX : Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide

Température (°C)	**70**				**80**				**90**				**100**			
Temps (min)	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
Zone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diamètre (mm)	18	18	18	16	18	18	16	16	18	16	16	14	18	16	16	14

Tableau X: Diamètre des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération

Température (°C)	**70**				**80**				**90**				**100**			
Temps (min)	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
Zone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Diamètre (mm)	14	13	13	12	14	12	12	11	13	12	12	10	12	10	0	0

Effet des enzymes

Tableau XI: Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide

Enzyme	Papaïne	Pepsine	Trypsine
Zone	+	+	+
Diamètre (mm)	18	16	18

Tableau XII: Diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération

Enzyme	Papaïne	Pepsine	Trypsine
Zone	+	+	+
Diamètre (mm)	12	11	10

Tableau XIII : Diamètres des zones d'inhibition pour les enzymes utilisées comme témoins

Enzyme	Papaïne	Pepsine	Trypsine
Zone	-	-	-
Diamètre (mm)	0	0	0

Effet des solvants organiques

Tableau XIV: Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide

Solvants		TFA	Ac.n	Ac.e	But	Eth	Act	n-Hex	Dich	Mélg
Temps	2heurs	18	18	18	17	18	18	18	16	18
	4heurs	16	18	18	0	18	18	18	16	15
	1 nuit	12	0	0	0	18	17	17	14	14

Tableau XV : Diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de la macération

Solvants		TFA	Ac.n	Ac.e	But	Eth	Act	n-Hex	Dich	Mélg
Temps	2heurs	18	18	15	14	18	15	15	16	18
	4heurs	18	18	14	14	18	15	15	16	18
	1 nuit	18	18	14	14	16	15	15	16	18

Résumé

Objectif : Etude de l'activité antimicrobienne d'une souche d'actinomycètes (STA_{10}) et une caractérisation physicochimique préliminaire des substances antimicrobiennes produites par cette souche.

Matériel et méthodes : La souche STA_{10} a été cultivée sur milieu solide MEM et sur milieu liquide SCA, la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de cette souche a été effectuée par deux techniques (cylindres d'agar et la technique des puits) vis-à-vis de trois germes. La caractérisation préliminaire des substances antimicrobiennes produites par cette souche a été faite envers plusieurs facteurs physicochimiques (pH, température, enzymes et solvants organiques).

Résultats : La souche STA10 a montré une activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans*. La caractérisation physicochimique a démontré que les substances antifongiques produites sur milieu liquide et celles produites sur milieu solide sont différentes du moment qu'elles présentent des caractéristiques physicochimiques différentes.

Mots clés : Actinomycètes, Antifongiques, Caractérisation physicochimique, *Candida albicans*, Substances antimicrobiennes.

Abstract

Objective: Study of the antimicrobial activity of actinomycetes strain (STA_{10}) and preliminary physicochemical characterization of antimicrobial substances produced by this strain.

Materials and methods: The STA_{10} strain was grown on solid medium MEM and liquid medium SCA, the antimicrobial activity of this strain was performed by two techniques (agar cylinders and technical wells) against three microorganisms. The preliminary characterization of antimicrobial substances produced by this strain was made to several physicochemical factors (pH, temperature, enzymes and organic solvents).

Results: STA_{10} strain showed antifungal activity against *C. albicans*. The physicochemical characterization showed that the antifungal substances produced in liquid medium and those produced on solid medium are different as long as they have different physicochemical characteristics.

Keywords: Actinomycetes, Antifungal, physicochemical characterization, *Candida albicans*, antimicrobial substances.