

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Microbiologie Moléculaire et Médicale



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'activité antibiofilm d'extraits
bruts de souches d'acinetobactéries vis-à-vis
de *Staphylococcus aureus***

Présenté par :

TIBECHE SALIMA & BENYAHIA ZINEB

Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Melle.Djinni I.	MCB	examinatrice
Melle. Yanat B.	MCB	Encadreur
Mme.Saidani K.	MAA	présidente

Année universitaire : 2017 / 2018

REMERCIEMENTS

En rendent grâce au seigneur, qui par savolonté nous a offert cette chance de vivre et l'énergie qui nous a permis de réaliser ce travail .MERCI notre DIEU .

Ca nous a fait un grand plaisir de prendre ces quelques ligne, ces peu nombreuses pour remercier les personnes qui nous ont soutenus tout au long de ce projet.

D'une façon spécial ,on tient à remercier vivement **Melle YANAT** , pour l'honneur qu'ellenous a fait en acceptant de nous encadrer ,pour ses orientations précieuses, ses encouragements , le temps qu'elle nous a consacré durant ce travail et de nous avoir permis de mener ce dernier dans l'excellentesconditions ,son apport et sonprofessionnalisme ont rendu possible la réalisation de ce travail.

On tient aussi à la remercier pour la prise en charge qu'elle a assuré durant notre stage au service .

Sans oublier nos remerciements consacrés pour les Corps professionnelles «Melle Djinniet madame Saidani k ... » pour leurs participations et leurs collaborations avec nous durant notre trajet et sans oublier l'équipe de laboratoire de biochimie.

Enfin, d'une façon général Merci à tous ce qui contribué de prés ou de loin à la réalisation de notre travail.

Dédicaces

Je tiens à dédier mon travail a ;

Aux deux bien être qui me sont les plus chères dans ma vie pour leur bonté, leur générosité, leur encouragement ,leur soutien et leur patience face au moment difficile traversé au cour de ma vie ;ma mère et mon père

MERCI .

A mes très chers frères et sœurs ;

LAHCEN, MARWANE HIND.

A mes très cherres grandes mères ; ZOUINA et SAADIA.

Tous les membres de la famille :

Cousins, cousines, ancles.

A mes cherres tantes :

SALIHA, FADILA, NASSIRA, ZOHRA.

A tous les membres de la famille : TIBECHE ET SERAICHE.

A mes très cherres copines :

ANISSA ,CHIMA,WIDAD ,IMANE , LEYLA ,HALA ,Wafa
BASMA,ZOHRA .

Ma chère ZINEB .

Dédicaces

Je tiens à dédier mon travail a ;

Aux deux bien être qui me sont les plus chères dans ma vie pour leur bonté, leur générosité,leur encouragement ,leur soutien et leur patience face au moment difficile traversé au cour de ma vie ;ma mèresouhila et mon pèreabderrahimMERCI .

A mes très chers frères et sœurs

a.aziz et a .basset ;meka ,sara ,oamayma ,amina ,nardjes ,oafa et ranya

A mes trèscherres grandes mères et grand père

Boshra et rabah ; saida et a .hafid

A tous les membres de la famille : BENYAHIA

Cousins, cousines, ancles.

A mes très cherres copines

AsmaHindaFatimaLilaSadiaShahinazSoumiaFatihaOoufanassimaImane et

Fariza

A machèrreSlim

ZINEB

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

PARTIE I : Synthèse bibliographique

I. Actinobactéries

I.1. Généralités sur les actinobactéries.....	3
I. 2. Importance des actinobactéries.....	3
II. <i>Staphylococcus aureus</i>	
II.1. Généralités.....	5
II.2. Facteurs de virulence.....	5
II.3. Résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques.....	6
III. Formation de biofilm chez <i>S. aureus</i>	
III.1. Composition du biofilm.....	7
III. 2. Formation des biofilms	8
III.3. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	10
III.4. Infections dues aux biofilms.....	12

PARTIE II. Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel analytique	13
I. 2. Matériel biologique	13

II. Méthodes

II.1. Extraction des molécules actives.....	13
II.2. Vérification de la pureté des souches et de l'identification de <i>S. aureus</i>	14
II.3. Etude de la sensibilité des souches de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques.....	14

II.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits bruts (**E4et S19**).....14
II.5. Effet des extraits bruts d'actinobactéries sur la formation de biofilm par *S. aureus*.....18

PARTIE III : Résultats et discussion

I. Résultats

I.1.Test de sensibilité aux antibiotiques20
I.2. Etude de l'activité antibactérienne des extraits bruts.....22
I.3. Etude de l'activité antibiofilm des extraits bruts des souches de *Streptomyces*.....23

II. Discussion

Discussion.....25
Conclusion28

Références bibliographique

Annexes

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positif qui colonise généralement le nasopharynx et la surface de la peau. Ainsi, le portage nasal de *S. aureus* et de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) était de 26% et de 1,5% respectivement chez des patients externes de la wilaya de Béjaia (Djoudi., 2015). *S. aureus* est un pathogène notoire capable de causer diverses maladies, allant des infections de la peau et des tissus mous à l'endocardite chronique ou persistante, l'ostéomyélite et les infections des implants (Liu *et al.*, 2016).

Les infections associées à *S. aureus* entraînent une augmentation des hospitalisations ainsi qu'une augmentation du taux de mortalité en milieu hospitalier avec une grande charge économique et sociale à l'échelle mondiale. Elles sont estimés à 450 millions de dollars au cours de la dernière décennie aux Etats Unis (Parvizi *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018).

S. aureus est capable de produire un grand arsenal de facteurs de virulence contribuant à la colonisation, la persistance et la propagation de la bactérie. Parmi ces facteurs de virulence la production de biofilm. Il s'agit d'une communauté structurée agrégée de bactéries enfermées dans une matrice (souvent appelé substances polymères extracellulaires (EPS)), qui est composée de protéines, d'ADN et de polysaccharides (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Cette formation de biofilm permet à la bactérie d'échapper aux défenses de l'organisme humain et de la protéger du traitement antibiotique rendant les infections par biofilm particulièrement difficiles à éradiquer (Bhattacharya *et al.*, 2015; Venkatesan *et al.*, 2015).

Plusieurs travaux dans le monde ont rapporté l'émergence de nouvelles souches de *S. aureus* résistantes à plusieurs antibiotiques, particulièrement la méthicilline et la vancomycine (Von Nussbaum *et al.*, 2006). Par conséquent, il est impératif de rechercher des antistaphylocoques nouveaux et efficaces avec activité antibiofilm pour lutter contre la menace des infections dues aux souches multirésistantes aux antibiotiques. Parmi les stratégies potentielles est l'isolement de nouvelles molécules bioactives douées d'activité antibactérienne et antibiofilm produites par les actinobactéries (Von Nussbaum *et al.*, 2006).

Les antibiotiques d'origine naturelle sont en grande partie produits par des actinobactéries. Ces micro-organismes sont des bactéries à Gram positif filamenteux à % G + C élevé, et sont largement distribués dans la nature, principalement dans le sol (Goodfellow *et al.*, 2012). Parmi ces actinobactéries, le genre *Streptomyces* est une composante prédominante de la population microbienne dans les sols et est connu pour être commercialement et thérapeutiquement, une source majeure de métabolites secondaires importants par exemple : les enzymes et les antibiotique (Bérdy ., 2012). Il a été estimé qu'environ 45% des antibiotiques ont été isolés des actinobactéries, et environ 75% des

molécules bioactives provenant des actinobactéries sont produites par des membres du genre *Streptomyces* (Solecka *et al.*, 2012).

Les travaux actuels tentent à isoler les actinobactéries d'environnements particuliers afin de rechercher de nouvelles molécules intéressantes ayant une activité contre *S. aureus* et d'autres bactéries pathogènes. C'est ainsi que s'inscrit l'objectif de notre travail qui est l'évaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm d'extraits bruts produits par deux souches de *Streptomyces* l'une isolée au niveau d'une station d'épuration de la wilaya de Béjaïa et l'autre à partir du sol salin de sebkha située à Beni Abbas vis-à-vis de souches de *S. aureus* et ce par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et par le test de l'activité anti-biofilm par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque.

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

I. Les actinobactéries

I.1. Généralités sur les actinobactéries

Les actinobactéries sont des bactérie à Gram positif ayant un pourcentage de guanine cytosine élevé (supérieur à 55%) qui les différencie des autres bactéries. En outre, elles forment phylogénétiquement une branche à part et sont caractérisées par une très grande diversité morphologique, pouvant aller de la forme cocci à la forme mycélienne parfaite (Goodfellow, 2012).

Il existe cependant une diversité physiologique étonnante puisque l'on retrouve des thermophiles, des psychrophiles, des alcalophiles, des acidophiles, des halophiles, des fixateurs d'azote, etc. (Goodfellow *et al.*, 2012). Cette grande diversité métabolique fait que les actinobactéries soient retrouvées pratiquement partout dans l'environnement où elles ont pu coloniser plusieurs milieux, y compris les plus extrêmes et où la vie était considérée comme étant impossible (Tiwari et Gupta., 2013).

Les caractéristiques morphologiques des actinobactéries sont une base importante pour la classification. Le développement et la formation des quelques structures, comme le mycélium aérien, les spores et les sporanges, sont affectées par les conditions de la culture (Qinyuan *et al.*, 2016).

I. 2. Importance des actinobactéries

L'importance des actinobactéries a de tout temps été soulignée dans divers domaines: dans le domaine industriel, médical et vétérinaire, dans l'agriculture et l'agro-alimentaire, etc. (Solecka *et al.*, 2012) et sont largement connues pour leur polyvalence métabolique (Neelu, 2013). En effet, la grande majorité sont dotées d'activités biologiques suite à leur capacité à produire un large éventail de molécules bioactives, telles que les antibiotiques, les antifongiques, les antitumoraux, les composés immunosuppresseurs...etc, Par ailleurs, selon Hashimoto (2005), certaines espèces sont utilisées dans des procédés industriels de bioconversion pour la fabrication de produits chimiques de base et de produits agrochimiques (Ranjani *et al.*, 2016) (figure 1).



Figure 1 : Application des actinobactéries (Ranjani *et al.*, 2016).

I.2.1. Importance en biotechnologie

Les actinobactéries produisent une gamme étendue de composés bioactifs comprenant diverses enzymes ayant des applications biotechnologiques multiples . Ces bactéries filamenteuses et leurs enzymes (β lactamine, Glycopéptides) ont un ensemble d'applications industrielles et environnementales, telles que la décontamination des sols (Yong-chao et al., 2014), la lutte biologique contre les organismes phytopathogènes (Minotto., 2014) et la décomposition de la matière organique et des déchets domestiques (Hirsch et Valdés., 2010; Camacho *et al.*, 2014).

I.2.2. Importance en agronomie

Les actinobactéries sont des éléments clés de l'environnement du sol et contribuent de façon importante à la durabilité des systèmes agricoles. En effet, les membres de nombreux genres ont un potentiel d'utilisation dans la bioconversion des déchets agricoles et urbains en produits chimiques de valeur tels les polymères complexes, la chitine ... (Neelu., 2013).

I.2.3. Importance dans l'environnement et agriculture

Les actinobactéries ont un rôle important dans l'environnement marin qui sont la source de la production d'antibiotiques (Meena *et al.* , 2013). Elles jouent un rôle considérable dans la minéralisation de la matière organique, l'immobilisation d'éléments nutritifs minéraux, la

fixation d'azote, la solubilisation du phosphate et l'amélioration des paramètres physiques (Dastager *et al.*, 2013).

I.2.4. Importance sur le plan médical

Les actinobactéries sont extrêmement importantes pour la santé humaine car elles constituent l'une des sources majeures de synthèse de nouveaux antibiotiques, qui peuvent être efficaces pour combattre la multirésistance bactérienne de certaines espèces. Un grand nombre d'antibiotiques présents sur le marché est obtenue à partir des actinobactéries (RanjaniA *et al.*, 2016; Yu Deng., 2017). Les familles importantes d'antibiotiques produites par les actinobactéries comprennent: les β -lactamines, les aminoglycosides, les lipopeptides, les glycopeptides., les tétracyclines et les macrolides (Adegboye., 2013).

II. *Staphylococcus aureus*

II.1. Généralités

Les staphylocoques sont des microorganismes commensaux, ils peuvent aussi survivre dans une grande diversité d'environnement (EFSA, 2009). Au début du 21^{ème} siècle, plus de 50 espèces et sous-espèces ont été décrites, dont 17 identifiées chez l'Homme (Garrity *et al.*, 2007). L'espèce la plus pathogène est majoritairement *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie se retrouve habituellement dans le nez, la gorge, les aisselles et le tractus intestinal. Cette bactérie cause souvent des infections mineures de la peau et infecte les plaies post-opératoires (Garrity *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus est un aéro-anaérobie facultatif, oxydase positive, catalase positif. Il produit plusieurs enzymes, telles que l'ADNase, la coagulase, et différentes hémolysines (Deurenberg, 2008) . Selon le Bergey's Manuel 2008, *S. aureus* appartient :

Domaine *Bacteria*

Phylum *Birmicute*

Classe *Bacilli*

Ordre *Bacillales*

Famille *Staphylococcaceae*

Genre *Staphylococcus*

Espèce *Staphylococcus aureus* Selon le Bergey's Manuel 2008.

II.2. Facteurs de virulence

S. aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'Homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et

communautaires (Vincenot *et al.*, 2008; Kurlenda et Grinholc., 2012). L'une des caractéristiques remarquables dans la virulence de *S. aureus* est qu'un seul facteur de virulence peut avoir plusieurs fonctions et que plusieurs facteurs peuvent effectuer la même fonction (Gordon et Lowy., 2008).

Pendant la phase de croissance exponentielle, *S. aureus* produit des facteurs de virulence exposés à la surface cellulaire telles que la protéine A, les protéines de liaison aux fibronectines, le facteur d'agglutination, ainsi que d'autres éléments du MSCRAM (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) (Schlievert *et al.*, 2010). Ces facteurs contribuent à l'adhésion, à la colonisation des tissus ainsi qu'à l'échappement au système immunitaire. Au début de la phase stationnaire, les facteurs de surface cellulaire sont remplacés par la synthèse et la sécrétion d'autres facteurs de virulences tels que les cytolysines, les principaux super antigènes (SAg) et autres exoenzymes d'invasion et de destruction des tissus. Cet ensemble complexe de facteurs de virulence est contrôlé par système de régulation dénommé « agr » (accessory gene regulator) (Klevens *et al.*, 2007).

II.2.1. Facteurs d'adhésion

L'adhésion de *S. aureus* aux cellules et tissus de l'hôte constitue une étape essentielle au cours de sa pathogénèse. Pour cela, il possède plusieurs protéines de surface regroupées sous le nom de «MSCRAMM» ou également « adhésines », qui facilitent l'adhérence au tissu (Sinha et Herrmann, 2005).

II.2.2. Facteurs d'invasion

S. aureus peut sécréter une large gamme d'enzymes extracellulaires telles que des protéases, hyaluronidases, lipases et nucléases qui facilitent la destruction tissulaire et la diffusion par plusieurs mécanismes (Schlievert *et al.*, 2010).

II.2.3. Facteurs d'agression et les toxines formant des pores

Ces toxines cytotolytiques sont capables de détruire les cellules de l'hôte par l'intermédiaire de pores créés sur les membranes cellulaires. Généralement, ces toxines sont synthétisées sous forme de monomères hydrosolubles qui s'agrègent en polymère pour former un pore membranaire hydrophobe (Schlievert *et al.*, 2010).

II.3. Résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

S. aureus a un fort pouvoir adaptatif et a développé différents mécanismes de résistance aux antistaphylococciques. Plus de 90 % des souches produisent une pénicillinase. L'oxacilline reste active contre ces souches, mais des staphylocoques (hospitaliers et communautaires), ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (méthicilline,

oxacilline) et les autres β -lactamines par la production d'une protéine, la PLP2a, liant les pénicillines (PLP) et ayant une faible affinité pour ces composés .

Le gène codant la PLP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique qui contient également des gènes de résistance aux métaux lourds et à d'autres familles antibiotiques, ceci expliquant le profil de multirésistance des SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline). (Oana Dumitresu *et al.* , 2010)

Les glycopeptides , vancomycine et teicoplanine sont des alternatives à l'oxacilline en cas de résistance ou d'intolérance. Cependant, des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont rapportées. Leur détection est difficile mais nécessaire, car l'augmentation progressive des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de vancomycine pour des souches considérées jusqu'à présent comme sensibles semble corrélée à une mauvaise évolution sur le plan clinique (Oana Dumitresu *et al.* , 2010) .

III Formation de biofilm chez *S. aureus*

III.1. Composition du biofilm

Les biofilms chez *S.aureus* sont des communautés structurées, où la densité bactérienne sur une surface peut atteindre jusqu'à 10^7 , agrégées de bactéries enfermées dans une matrice (souvent appelée substances polymères extracellulaires « EPS »), qui est composée de protéines, d'ADN et de polysaccharides (Bhattacharya *et al.*, 2015). Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de microorganismes (Bahlau et Gilmore, 2008). La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%) et inclue également des polymères d'exo-polysaccharides, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. Cette matrice à un rôle protecteur et un rôle structurel.

Les bactéries de *S. aureus* acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une révolution du profil d'expression de leurs gènes. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé *quorum sensing* (Behlau et Gilmore, 2008). Ce système est fondé sur la production de molécules diffusibles par les bactéries, qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné (Filloux et Vallet, 2003).

III. 2. Formation des biofilms

La formation des biofilms chez *S. aureus* est largement décrite dans la littérature (Kolter et Greenberg 2006). Le biofilm peut se former très rapidement par un contact direct avec des individus ou des porteurs infectés ou par l'introduction de bactéries à la surface de la peau suite à une incision chirurgicale (Bereket, 2012; Otto, 2013). La surface d'un implant est riche en protéines telle que la fibronectine présente sur le site de la plaie chirurgicale. Ces protéines sont reconnues par des composants de surface microbiens reconnaissant les molécules de matrice adhésive (MSCRAMMs), fournissant une niche pour les bactéries pour former un biofilm (Otto M., 2013) (figure 2).

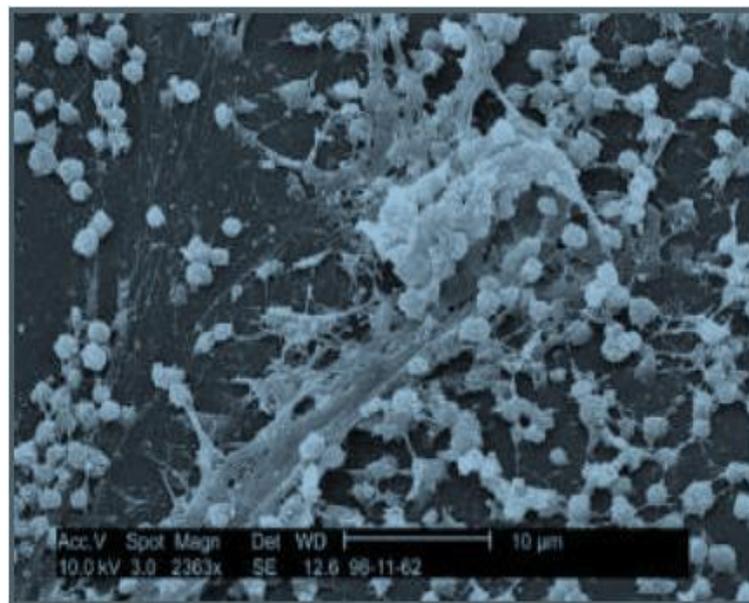


Figure 2: Image obtenue par microscopie, image confocale d'un biofilm formé par *S. aureus* à la surface d'un cathéter veineux (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

La formation du biofilm se fait en plusieurs étapes (figure 3):

III.2.1. Adhésion

L'adhérence de *S. aureus* est réalisée par la prolifération de *S. aureus* (formation de micro-colonies). Cependant, le mécanisme de la première phase peut dépendre de la fixation de *S. aureus* à une surface abiotique ou biotique. Alors que, l'attachement aux surfaces abiotiques comme le verre, les métaux (Co-Cr, 316SS, titane, etc.) et les plastiques (polyester, silicone, polyéthylène, etc.) peuvent être non spécifiques, l'attachement aux surfaces biotiques dépend du MSCRAMM bactériens (la plus grande classe de protéines de surface ancrées à la reconnaissance peptidoglycane des parois cellulaires) (Foster., 2014).

III.2.2. Maturation

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (Folkesson et al., 2008), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (Tenke *et al.*, 2006). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (Jacolosen *et al.*, 2008).

III.2.3. Détachement

Après maturation les bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (Kaplan, 2010). Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries. Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Joshi *et al.*, 2010).

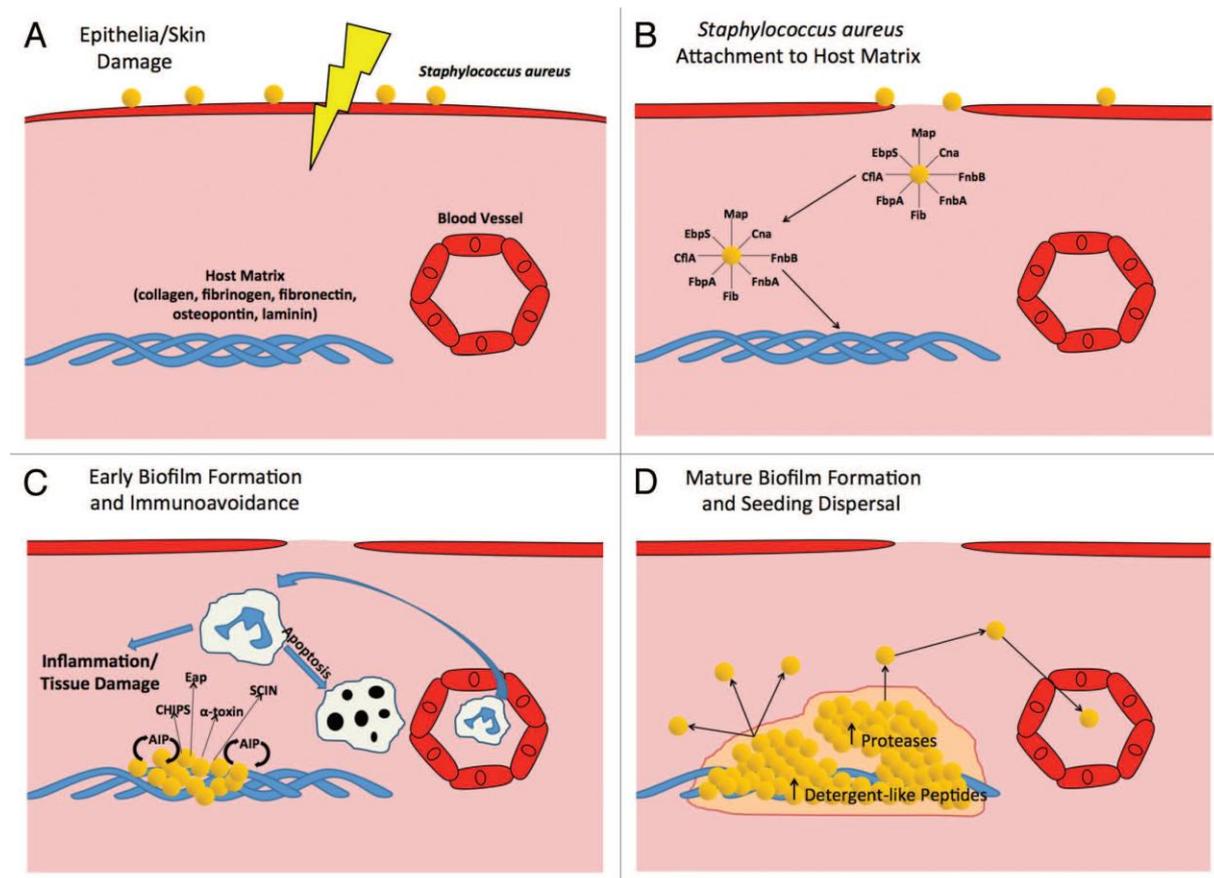


Figure 3 : Etapes de formation de biofilm (Nathan K *et al.*, 2011) (A :pénétration d'un objet (catether a travers la peau ,B :introduction des *S. aureus* ,C : formation de biofilm précoce et immuno-évasion ,D : formation de biofilm mature et dispersion des graines).

III.3. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

III.3.1. Caractéristiques de la surface

- **Rugosité de la surface**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (Donlan, 2002).

- **Propriétés physico-chimiques de la surface**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (Bendinger, 2003).

- **Présence de films protéiques sur la surface**

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (Nobbs, 2009).

III.3.2. Caractéristiques du milieu

- **La température**

Elle est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles, ainsi sur l'adhésion (Dumas, 2007).

- **Le Ph**

Celui du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (Hamadi *et al.*, 2004), ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (Boutaleb, 2007).

- **Concentration en nutriments**

dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm, ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008).

III.3.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de *fimbriae* et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polaire, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (Donlan, 2002).

III.4. Infections dues aux biofilms

Pendant la formation des biofilms, les bactéries peuvent échapper aux défenses de l'hôte et devenir tolérantes aux concentrations d'antimicrobiens qui éliminent les bactéries unicellulaires flottantes (planctoniques), ce qui rend les infections par biofilm particulièrement difficiles à éradiquer (Howlin *et al.*, 2015).

Les infections liées aux biofilms de *S.aureus* touchent majoritairement les personnes immunodéprimées dans le cas des infections tissulaires par exemple (Bjarnsholt, 2013). Ils contribuent ainsi de manière importante aux infections nosocomiales. Ils ont la capacité de se développer sur divers instruments médicaux : sondes urinaires, cathéters veineux, tubes de ventilation artificielle, prothèses orthopédique ... etc (Werdan., 2014).

Le lien entre la capacité d'une souche à former un biofilm et sa virulence est souvent présenté comme direct. Néanmoins, au cours de la phase planctonique d'infection, les bactéries libèrent des facteurs de virulence et altèrent les tissus de l'hôte. Une fois dans un environnement adapté, les bactéries pourraient s'implanter et persister sur la surface *via* l'expression de facteurs impliqués dans la formation de biofilms (Goodman *et al.*, 2004).

Partie II: Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia pendant une période allant du mois de février au mois de mai. L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité antibactérienne et antibiofilm de deux extraits brut de souches de *Streptomyces* vis-à-vis de souches de *S. aureus*.

I. Matériel

I.1. Matériel analytique

Le matériel, les milieux de culture et les solutions utilisées dans ce travail sont résumés dans les annexes I et II.

I. 2. Matériel biologique

➤ Origine des extraits bruts

Les extraits bruts ont été extraits à partir de deux souches de *Streptomyces*:

- ❖ **Souche S19** : Isolée à partir d'une station d'épuration à Bejaia.
- ❖ **Souche E4** : Isolée à partir de sol salin (sebkha) du sud Algérien à Béni Abbés de la wilaya de Bechar.

➤ Origine des souches cibles utilisées

Trois souches de *S. aureus* ont été utilisées comme souches cibles. Il s'agit de la souche de référence ATCC 25923, une souche résistante à la méthicilline (SARM) LGA 251 et une souche entérotoxigène FRI 56 (Pour Food Research Institut).

II. Méthode

II.1. Extraction des molécules actives

Après 7 jours d'incubation, l'extraction de molécules actives est réalisée par macération. En effet, les mycéliums et les géloses sont découpés en petits morceaux de 1 cm² puis introduits dans un flacon additionné d'un volume de 250 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange est mis à macérer sous agitation permanente durant toute une nuit à température ambiante.

L'extrait brut est obtenu après filtration avec du papier Wattman N°1, afin de séparer le solvant des blocs de gélose et du mycélium, puis évaporés à sec en utilisant un Rotavapor.

L'extrait sec obtenu est récupéré dans du méthanol pour l'extrait brut S19 et dans du DMSO pour l'extrait brut E4 (Pimentel-Elardo *et al.*, 2010). Puis la concentration massique de

l'extrait brut est déterminée et le flacon est par la suite conservé à l'abri de la lumière à 4°C pour une utilisation ultérieure.

II.2. Vérification de la pureté des souches et de l'identification

Les souches de *S. aureus* ont été repiquées sur le milieu gélosé de Chapman et incubées à 37°C pendant 24h. L'identification a été basée sur l'aspect des colonies obtenues sur milieu Chapman, sur l'observation sous microscope après coloration de Gram et sur le test de la catalase.

II.3. Etude de la sensibilité des souches de *S. aureus* aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques des souches a été réalisé par l'antibiogramme standard sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CLSI 2016 (Clinical and Laboratory Standard Institut), Les antibiotiques testés (Lioflichem®) sont résumés dans le tableau N°I

❖ Vérification du SARM

Afin de vérifier que la souche LGA 251 est un SARM, un antibiogramme a été réalisé en déposant un disque de céfoxitine au centre de la boîte contenant la gélose Mueller Hinton. La boîte est ensuite incubée à 30°C pendant 24h (CLSI, 2016).

II.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits bruts

II.4.1. Etude de l'activité antagoniste de l'extrait brut sur milieu solide

Les extraits bruts obtenus ont fait l'objet d'un test d'antagonisme visant à tester leur activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches cibles de *S. aureus* préalablement ensemencés sur milieu Mueller Hinton à raison de 10^7 UFC /ml en utilisant la méthode des puits.

A cet effet, des puits de 6 mm de diamètre sont formés à l'aide d'un emporte-pièce puis un volume de 100 µl de chaque extrait est introduit dans les puits. Les deux solvants, méthanol et DMSO ont été utilisés comme contrôle négatif (Figure 4).

Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives puis incubées à 37°C pendant 24 h.

La lecture des résultats est faite en mesurant le diamètre des zones d'inhibition exprimées en millimètre autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse. CLSI, 2016).

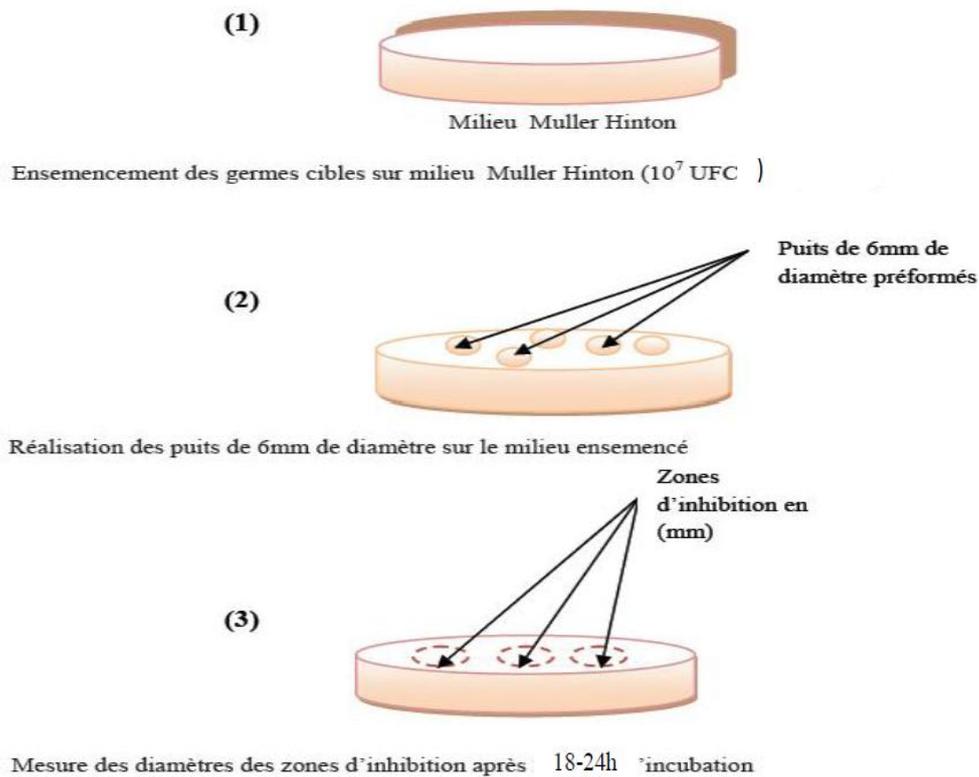


Figure 4: Etude de l'activité antagoniste des extraits bruts par test des puits .

II.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches de *S. aureus* vis-à-vis des extraits d'actinobactéries

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18h. La technique de micro-dilution dans des microplaques à fond incurvé de 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des deux extraits bruts testés. Cette méthode est basée sur les étapes suivantes illustrées dans la figure 5.

- **Standardisation de l'inoculum**

A partir d'une culture fraîche, quelques colonies ont été prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique. La suspension bactérienne a été standardisée à l'aide d'un spectrophotomètre (RayLeigh®Vis-723G) pour une DO de 0,08 à 0,1 à 625 nm correspondant à 10^8 UFC/ml. Par la suite, une dilution 1/10 a été réalisée.

- **Préparation de la microplaque**

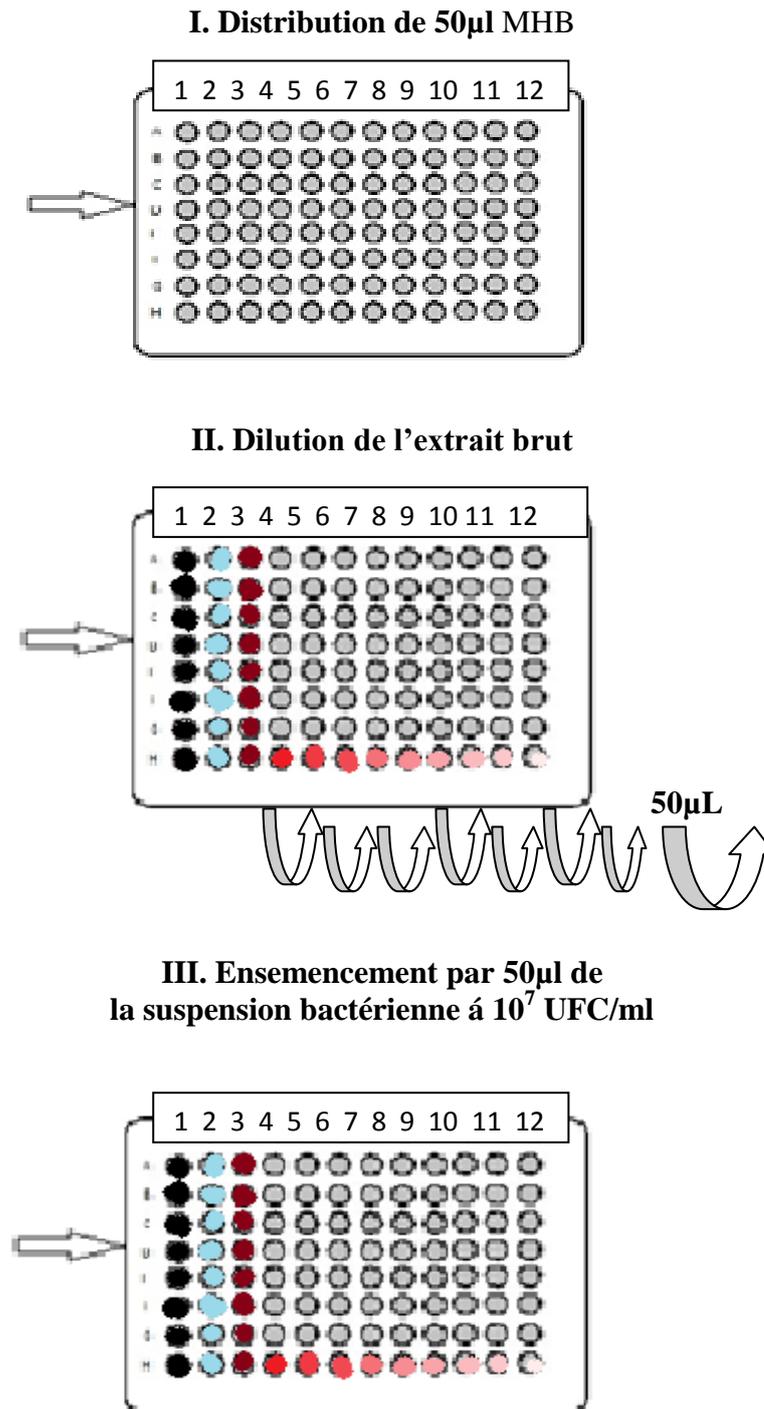
Un volume de 50 μ l de bouillon de Mueller-Hinton (MHB) ont été distribués dans les 96 microcupules que contient la microplaque.

- **Dilution**

- A partir d'une solution mère de l'extrait brut (E4 à $92,6 \cdot 10^2$ mg/L; S19 à $37 \cdot 10^3$ mg/L), 50 μ l ont été prélevés puis mélangés aux 50 μ l de MHB contenu déjà dans la première cupule.
- Par la suite, 50 μ l du contenu de la première cupule ont été prélevés puis déposés dans la cupule adjacente et ainsi de suite. Ces dilutions permettent d'obtenir des concentrations décroissantes de l'extrait brut entre $46,3 \cdot 10^2$ et $0,08 \cdot 10^2$ mg/l pour E4 et allant de $18,5 \cdot 10^3$ à $0,03 \cdot 10^3$ mg/l pour S19.
- Une rangée de cupules ne contenant que du MHB est utilisée comme contrôle négatif afin de vérifier que le bouillon ne soit pas contaminé.
- Des puits contenant du DMSO et du méthanol ont aussi été utilisés comme témoins afin de vérifier si ces deux solvants n'auraient pas une éventuelle activité inhibitrice.

- **Ensemencement**

- A partir de la suspension bactérienne standardisée à 10^7 UFC/ml, 50 μ l ont été déposés dans toutes les cupules de la microplaque qui est ensuite incubée à 37°C pendant 18 h. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche.
- Une rangée de cupules ne contenant que du MHB estensemencée et est utilisée comme témoin à fin de vérifier l'inoculum.



Cupule 1 = MHB

Cupule 2 = MHB + Souche

Cupule 3-12. = MHB + Souche + Extrait

Figure 5: Détermination des CMI par la méthode de microdilution sur microplaque

II.5. Effet des extraits bruts d'actinobactéries sur la formation de biofilm par *S. aureus*

La détection de l'activité antibiofilm est réalisée en plusieurs étapes selon un protocole bien établi en utilisant des microplaques à fond plat contenant 96 puits. Le test utilisé est basé sur la formation de biofilm à l'interface solide-liquide et par l'addition de l'extrait brut à différentes concentrations qui pourraient éventuellement avoir un effet antibiofilm (figure 7) (Driche et al., 2017). Il est à noter que les souches cliniques de *S. aureus* ont été testées au préalable pour leur capacité à produire un biofilm. Les souches ayant donné de meilleurs résultats ont été sélectionnées pour tester l'activité anti-biofilm. Ce test a été répété à trois reprises.

Jour 1 :

- Les souches ont été inoculées dans 10ml de TSB supplémenté à 2,5% de glucose (TSBG) puis les suspensions ont été incubées à 37°C pendant 24H sous agitation.

Jour 2 :

- L'inoculum a été standardisée à 10^8 UFC/ml dans le milieu TSBG.
- Un volume de 200µl de la suspension bactérienne a été réparti dans chaque cupule de la microplaque.
- Trois concentrations de l'extrait brut (5, 23 et 46 mg/L pour E4 et 9, 18.5 et 37 mg/L pour S19) ont été préparées et réparties dans une rangée de cupules contenant la suspension bactérienne.
- Une rangée contenant uniquement du TSBG est utilisée comme contrôle négatif et une autre contenant du TSBG + l'inoculum sans extrait brut est utilisée comme contrôle positif.
- La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24h.

Jour3

- Le contenu dans la microplaque a été retiré puis un lavage avec 350µl d'eau distillée stérile a été réalisé 3 fois afin d'éliminer les bactéries planctoniques.
- La microplaque a été incubée à l'étuve à 60°C pendant 45min pour fixer le biofilm.
- Un volume de 200µl de cristal violet à 0,2% a été ajouté à la microplaque puis laissé à température ambiante pendant 15min.
- Un lavage à l'eau distillée stérile a été réalisé 3 fois afin d'éliminer toute trace de colorant non fixé.

- Un volume de 150µl d'une solution d'éthanol à 95% a été ajouté pour libérer le colorant fixé au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé.
- La densité optique (DO) de tous les puits est déterminée par l'intermédiaire d'un lecteur de microplaque BIOTEK à une longueur d'onde de 630 nm (figure 8)

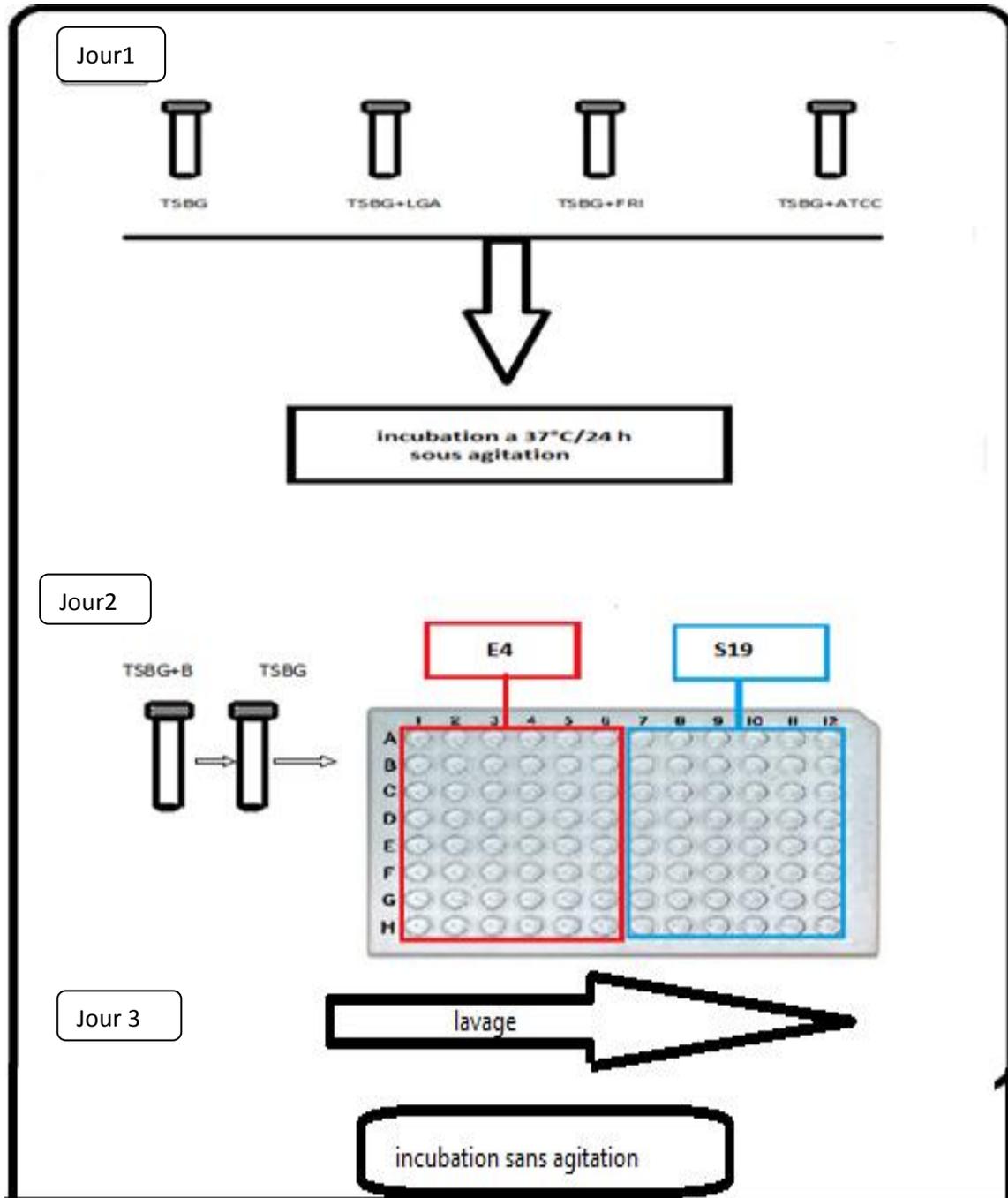


Figure 6 : Test d'activité antibiofilm par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque pour les souches de *S. aureus*.

A, Témoin (TSBG); B, LGA251 sans extrait; C, LGA 251 avec l'extrait; D, FRI56 sans extrait; E., FRI 56 avec l'extrait; F, ATCC29213 sans extrait; G, ATCC29213 avec l'extrait.

Partie II: Résultats et discussion

I. Résultats

I. 1. Vérification de l'identification des souches de *S. aureus*

- Sous microscope, après coloration de Gram, les cellules apparaissaient sous forme de cocci violet regroupé en amas (figure 7 a).
- Sur la boîte Chapman, des petites colonies de couleur jaune avec diffusion de la couleur sur le milieu sont observées (figure 7 b).
- Les trois souches cibles ont donné des résultats positifs pour le test de la catalase (effervescence).

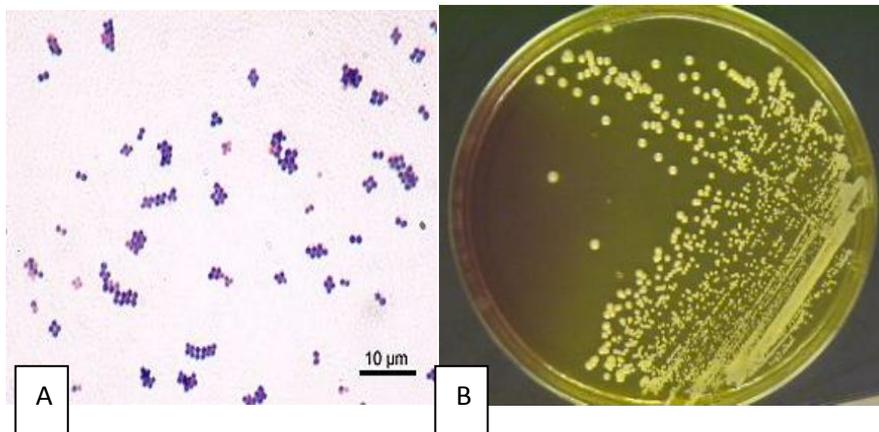


Figure a : *S. aureus* sous microscope

Figure b : Aspect des colonies de *S. aureus* sur gélose Chapman.

Figure 7. Résultats de l'identification des souches de *S. aureus*.

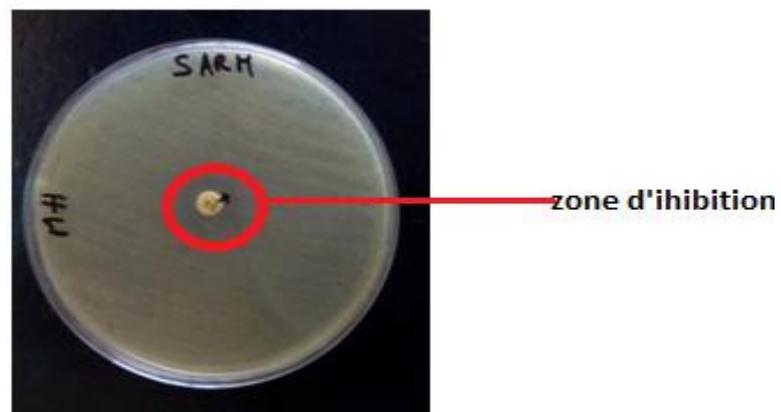
I.2. Test de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme des souches de *S. aureus* ont montré que toutes les souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés (tableau I). Le diamètre de la zone d'inhibition pour la céfoxitine de la souche LGA251 était de 15 mm et selon les recommandations du CLSI 2016, il s'agit bien d'un SARM (figure 8 et 9).

Tableau I: Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées

Diamètre des zones d'inhibition (mm)	Souche	VA	CN	RD	TE	FA	E
	ATCC29213	18(S)	25(S)	33(S)	24(S)	31(S)	25(S)
	LGA251	19(S)	21(S)	31(S)	25(S)	30(S)	22(S)
	FRI56	18(S)	23(S)	32(S)	23(S)	30(S)	29(S)

VA: Vancomycine , CN: Gantamycine , RD: Rifampicine ,TE: tétracycline, FA : Acide fusidique, E: Erythromycine

**Figure 8 :** Antibiogramme de la souche *S. aureus* FRI 56**Figure 9:** Test de sensibilité à la céfoxitine pour la souche de SARM LGA251

I.3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits bruts

I.3.1. Résultats du test des puits

- **Cas de l'extrait E4**

Il y a une activité antibactérienne pour les trois souches cibles avec une meilleure activité pour la souche FRI (diamètre d'inhibition de 24mm) (tableau II, figure 10).

- **Cas de l'extrait S19**

Toutes les souches sont sensibles à l'extrait. La meilleure activité antibactérienne a été observée pour la souche FRI56 (tableau II, figure 10)

- Pour les deux contrôles utilisés (méthanol et DMSO)

Tableau II : Résultats de l'activité antagoniste de l'extrait brut

Diamètre des zones d'inhibition (mm)	Extrait brut	ATCC29213	LGA251	FRI56
		E4	10	14
	S19	12	12	20

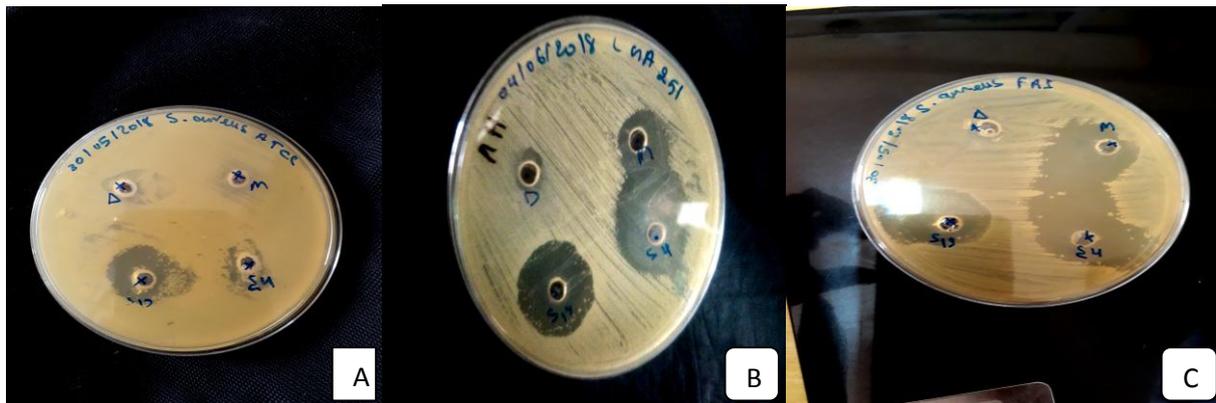


Figure 10: Résultats de l'activité antagoniste de l'extrait brut E4 et S19 à l'égard des souches : ATCC29231 (A), LGA251 (B) et FRI56(C) par le test des puits

I.3.2. Détermination des CMI des extraits bruts des souches de *S. aureus*

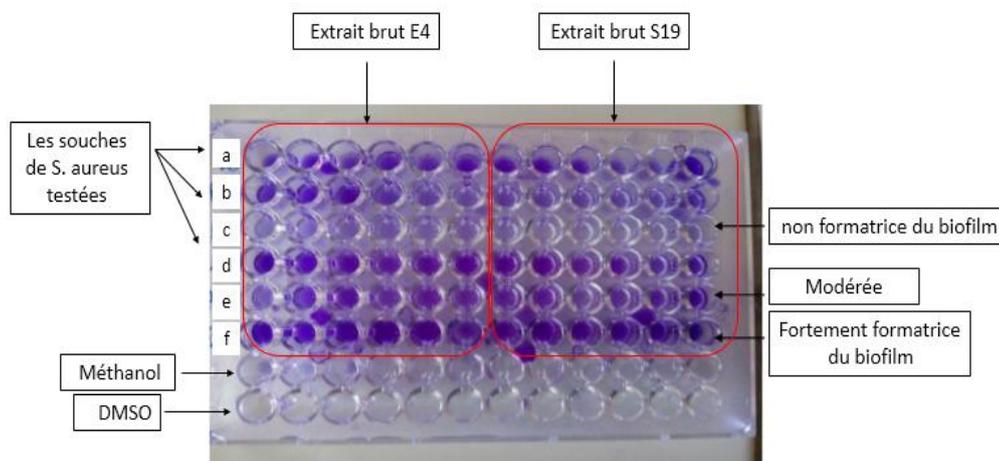
Selon les résultats, Les deux extraits ont une activité antibactérienne vis-à-vis des souches de *S. aureus*. Cependant, l'extrait E4 a une activité relativement plus élevée par rapport à celle de S19 avec des CMI $\leq 5.78 \cdot 10^2$ mg/L pour l'extrait E4 et $\geq 46.10^2$ mg/L pour l'extrait S19 (tableau III).

Tableau III : Résultats des CMI pour les trois souches de *S. aureus*

souches	CMI mg/L	
	E4	S19
<i>S.aureus</i> LGA251	$5.78 \cdot 10^2$	$92.5 \cdot 10^2$
<i>S.aureus</i> ATCC29213	$5.78 \cdot 10^2$	$92.5 \cdot 10^2$
<i>S.aureus</i> FRI56	$1.44 \cdot 10^2$	$46 \cdot 10^2$

I.4. Etude de l'activité antibiofilm des extraits bruts des souches de *Streptomyces*

L'activité antibiofilm des extraits bruts E4 et S19 des souches de *Streptomyces* a été testée à l'égard des trois souches de *S.aureus* (LGA 251, FRI56 et ATCC 29213) dans un système de formation de biofilms. Les absorbances indiquant la formation de biofilms et leurs inhibitions ont été mesurées après coloration au cristal violet et par lecture sur spectrophotomètre (BioTeK®) (DO à 630 nm) puis comparées au témoin (sans ajout de l'extrait brut). (Figure 11).

**Figure 11** : Résultats de microplaque de biofilm .

- **Cas de l'extrait E4**

D'après les résultats obtenus, il est clairement remarqué qu'il y a une diminution de la formation de biofilms des souche LGA 251, FRI 56 et ATCC 29213 après l'ajout de l'extrait brut E4 à partir de la concentration de 5mg/L avec des taux de diminution de la formation de biofilms de 42%, 44% et 24% respectivement. De plus, la réduction de la formation de biofilms est légèrement plus élevée avec l'augmentation des concentrations de l'extrait brut

à 23 et à 46 mg/L pour FRI56, LGA 251 et avec une moindre mesure pour la souche ATCC 29231 (figure 12).

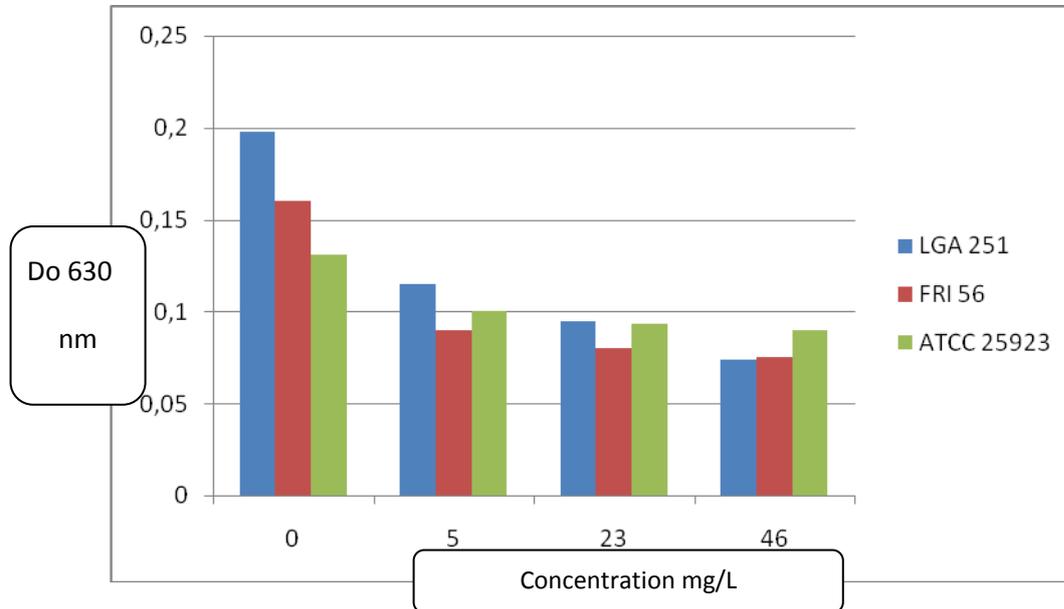


Figure 12 : Effet de l'extrait brut E4 sur le biofilm formé par les souches de *S. aureus*

- **Cas de l'extrait S19**

De même pour l'extrait S19, une diminution de la formation de biofilms des souches LGA 251, FRI 56 et ATCC 29213 a été observée et ce à partir de la concentration de 9mg/L avec des taux de 64%, 56% et 47% respectivement. De plus, la réduction de la formation de biofilms est légèrement plus élevée avec l'augmentation des concentrations de l'extrait brut à 18 et à 37 mg/L pour LGA 251 mais reste plus ou moins stable pour ATCC 29231 et FRI 56 (figure 13).

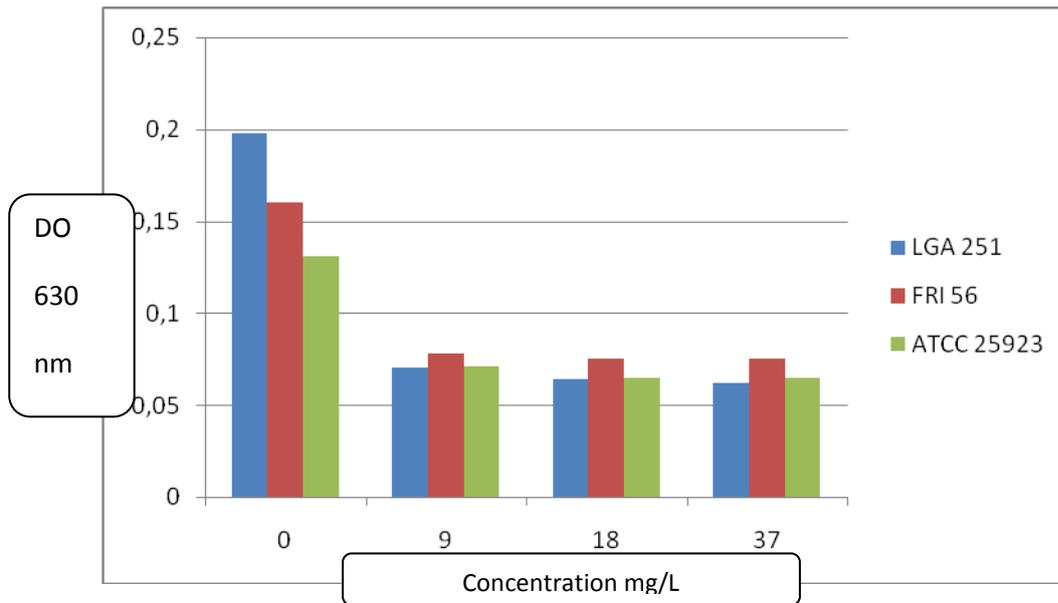


Figure 13 : Effet de l'extrait brut S19 sur le biofilm formé par les souches de *S. aureus*

II. Discussion

S. aureus est une bactérie qui possède de nombreux facteurs de virulence lui conférant l'aptitude à former des biofilms sur des surfaces inertes ou vivantes avec une grande tolérance aux agents antimicrobiens et aux systèmes de défense de l'hôte. En outre, la capacité de cette espèce à causer diverses maladies et infections, et l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques telles que les SARM ont fait de *S. aureus* un problème majeur. Ainsi, il est impératif de rechercher des antistaphylocoques nouveaux et efficaces avec activité antibiofilm pour lutter contre la menace des infections dues aux souches multirésistantes aux antibiotiques. Parmi les stratégies potentielles est l'isolement de nouvelles molécules bioactives douées d'activité antibactérienne et antibiofilms produites par les actinobactéries isolées d'environnements particuliers, à savoir, sol saharien de la région de Béni Abass (E4) et station d'épuration (S19).

Selon nos résultats, les deux extraits ont une activité antibactérienne vis-à-vis des trois souches de *S. aureus* issues de différentes origines: de référence, clinique et résistante aux antibiotiques et alimentaire à savoir ATCC29213, LGA251 et FRI56 respectivement, avec toutefois, une meilleure activité antibactérienne à l'égard de la souche FRI56 et ce pour les deux extraits. En outre, on a noté que l'extrait E4 a une activité relativement plus élevée par rapport à celle de S19 avec des CMI $\leq 5.78 \cdot 10^2$ mg/L pour l'extrait E4 et $\geq 46 \cdot 10^2$ mg/L pour l'extrait S19. Une étude récente menée par Driche *et al.*, (2017) a montré une activité antibactérienne importante d'un extrait pur de *Streptomyces* AT37 isolée du sol saharienne

dans la région de Adrar à l'égard de souche de *S.aureus* ATCC25923 (32mm) et de *S.aureus* R2 résistante à la méthicilline (30mm) et ce par la méthode des stries croisées.

D'autre part, selon Alliouch-kerboua (2015), une souche de *Streptomyces* SM2/2GF isolée de sédiment de la lagune El-Mellah (El-Kala) a été testée contre divers microorganismes pathogènes incluant des *S.aureus* et SARM. Les résultats du test de l'activité antimicrobienne de l'isolat SM2/2GF par la méthode des stries croisées ont montré une meilleure activité contre *S. aureus* SARM ATCC 43300 (20mm) comparé au *S. aureus* ATCC 29213 (11mm). De même, une étude récente a également démontré que des souches de streptomycètes isolées du Sahara indien étaient productrices de substance douées d'activité antibactérienne (SAS02, SAS09, SAS13 ..) vis-à-vis d'une souche de SARM et ce par le test des stries croisées avec une distance de 30mm (Masand et al., 2018).

Dans notre étude, les tests d'activité anti-biofilms par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque a révélé un résultat positif pour les extraits bruts E4 et S19, avec des taux de réduction de formation de biofilms de 42%, 44% et 24% pour E4 et de 64%, 56% et 47% pour S19 des souches LGA 251, FRI 56 et ATCC 29213 respectivement.

De plus, la réduction de la formation de biofilms est légèrement plus élevée avec l'augmentation des concentrations de l'extrait brut.

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés dans une étude récente menée sur *Streptomyces* AT37-1 isolée du sol saharienne dans la région de Adrar produisant des dérivés furanones contre deux souches cibles de *S. aureus* (SASM ATCC 29523 et SARM ATCC 43300). En effet, cette étude a démontré une diminution de la formation de biofilms de 50% à partir de la concentration de 2mg/L et cette diminution continue parallèlement avec l'augmentation de la concentration (Driche et al., 2017).

Par ailleurs, une récente étude a rapporté que l'alnumycine D produite par une souche recombinantes de *Streptomyces albus* a montré un effet antimicrobien aussi bien sur les cellules planktoniques que sur les cellules liées aux biofilms de la souche de *S.aureus* 25923 et suggère que la manipulation des voies et d'autres outils de biologie synthétique pouvant entraîner une production accrue de produits de dérivation peuvent être utilisés plus largement à des fins de découverte de médicaments (Oja et al., 2015).

Une étude récente menée par Asli et al., (2017), consistant à tester différentes molécules de Chitosan (CHOS) produites par *Streptomyces sp* (isolées au Canada) contre une

souche de SARM d'origine alimentaire (bovins), a montré que le Chitosan est capable d'inhiber la formation de biofilm à partir de la concentration de 16mg/ml.

Conclusion

Au terme de cette étude, les deux extraits bruts des souches de *Streptomyces* issues d'environnements particuliers, à savoir le sol saharien de sebkha (souche E4) et la station d'épuration (souche S19), ont une activité antibactérienne et antibiofilm contre les trois souches cibles de *S. aureus* issues de différentes origines (ATCC29213, FRI56, LGA), avec une meilleure activité antibactérienne pour la souche FRI (diamètre d'inhibition de 24mm) pour l'extrait E4 et S19 ; et une meilleure activité antibiofilm pour FRI56 et LGA 251, avec des taux de réduction de formation de biofilms de 42%, 44% et 24% pour E4 et de 64%, 56% et 47% pour S19 des souches LGA 251, FRI 56 et ATCC 29213 respectivement.

Ainsi, au vue de l'émergence actuelle de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques associés aux gènes de virulence chez les souches de *S.aureus* ayant pour conséquence la complication de la prise en charge thérapeutique des patients, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinobactéries est crucial pour la découverte de nouvelles espèces et/ou de nouvelles substances naturelles bioactives non toxiques pour l'hôte douées d'activité antibactérienne et antibiofilm.

Les résultats obtenus dans notre étude sont probants et méritent d'être plus approfondies. De là de, nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les principales sont les suivantes :

- Elargir l'étude a d'autre souches cibles formant le biofilm telle que le germe oportuniste *Staphylococcus epidermidis* isolée du catheter .
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm.
- Purification et caractérisation structurale de chacune des molécules bioactives produite par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques.
- Etude de l'effet des extraits bruts qui ont montré un effet sur la formation de biofilm, sur la viabilité cellulaire et sur des biofilms établi et qui seront confirmés par des tests *in vivo* pour un intérêt thérapeutique.
- Des études de structure-activité sont encore nécessaires pour mieux assigner les caractéristiques structurelles essentielles responsables de l'activité antibiofilm
- Rechercher les actinobactéries dans d'autres écosystèmes inexplorés afin d'augmenter les chances de trouver des molécules innovantes qui possèdent un potentiel important, en particulier le Sahara algérien.

- Recherche de nouvelles substances antimicrobiennes

Liste des bibliographique

A

Asli A., Eric Brouillette., Ce Aline Ster ., Mariana Gabriela Ghinet1., Ryszard Brzezinski1., Pierre Lacasse., Mario Jacques., FrancËois Malouin.(2017). Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. 12 page 30.

Archer Gordon. L. 1998. *Staphylococcus aureus*. A Well-Armed Pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 26:1179–81..

B

Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J. (2003). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. 59: 3973-3977.

Behlou,I.& Gilmore, M. S.(2008).Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases.Arch Ophthalmol .126,1572-1581.

Bereket W., Hemalatha K., Geten B . (2012). Update on bacterial nosocomial infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*; 16(8):1039–1044. [PubMed: 22913154]

Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley P. & Hall-Stoodley L. (2015). Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 13, 1499–1516

C

(Centers for Disease Control and Prevention, (2009). Soins infirmiers et gestion des risquesl'UE 4.5.S2. <http://www.infirmiers.com> .

Chérifa Alliouch-Kerboua .,Djamila Gacemi Kirane1.,Bernard La Scola3.(2015). Activité antimicrobienne d'une *Actinomycetale* isolée d'une lagune en Algérie. *73* , 176-80

D

Dastager. S.G., Damare. S. (2013). Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Curr.Microbiol.* 66, 421-427.

Davies DG., Marques CNH(2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bactriole* . 19, 1393–1403.

De Chalvet De Rochemonteix A. (2009). Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.

Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E.(2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 8,747-63.

Donlan RM, Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.*15, 167- 193.

Djoudi F.(2015) .caractérisation moléculaire et épidémiologie de la résistance aux antibiotique de souches de staphylococcus aureus . these de doctorat de Microbiologie . Université de A .MIRA , faculté SNV , courte ,83 page.

Dumas C. (2007). Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

E

El Hadj Driche., Nasserline Sabaou., Christian Bijani., Abdelghani Zitouni., Frédéric Pont., Florence Mathieu., Boubekeur Badji. (2017). *Streptomyces* sp. AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. 33,105.

EFSA. (2009). Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. The European Food Safety Authority. 99,73.

F

Fenical W., Jensen PR. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete. bacteria. *Nat Chem Biol*, vol 2 p 666–73.

Fodor AA., Klem ER., Gilpin DF. (2012). The adult cystic fibrosis airway micro-biota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS One.*; 7(9):e45001. [PubMed: 23049765]

Folkesson, A., Haagensen, J. A. J., Zampaloni, C., Sternberg, C. and Molin, S. (2008). —Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides, *Public Library of Science*, Vol.3 No. 4, pp. 1-11

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* ; 12(1):49–62. A comprehensive overview of the various surface proteins in *S. aureus*, describing the ability of multiple proteins to have a wide array of functions ranging from adhesion to virulence. [PubMed: 24336184]

Filloux, A. et Vallet, I. (2003). risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Med Sci (Paris)* 19, 77-83

G

Garrity G.M., Johnson K.L., Bell J. et Searles D.B.(2007). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. New York.

Goodfellow L.M., Macduff C., Leslie G., Nolfi D., Blakwood D(2012). Nurse scholar's knowledge and use of electronic theses and dissertations. <http://doi.org/10.1111/J.1466-7657.2012.01008.x>.

Gordon R.J. et Lowy F.D. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin. Infect. Dis.* 46, 350–359.

H

Hassan. U. S. S, Anjum . K., Abbas . S. Q., Akhter. N., Shagufta. B. I, Shah. S. A. A, Tasneem.U. (2017) . Review Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 49, 34–47.

Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. (2004). Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology.* 54, 213-225.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P.(2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108

Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, et al. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *ClinMicrobiol Rev.* 2011; 24(1):29–70. [PubMed: 21233507]

Hirsch. A and Valdés. M . (2010). *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry.* 42, 536–542.

Howlin RP., Brayford MJ., Webb JS. Antibiotic-loaded synthetic calcium sulfate beads for prevention of bacterial colonization and biofilm formation in periprosthetic infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(1):111–120. [PubMed: 25313221]

Hui Liu¹, Weilong Shang., Zhen Hu., Ying Zheng¹., Jizhen Yuan¹., Qiwen Hu¹., Huagang Peng¹., Xinyu Cai., Li Tan., Shu Li., Junmin Zhu., Ming Li., Xiaomei Hu., Renjie Zhou., Xiancai Rao and Yi Yang. (2018) . A novel SigB(Q225P) mutation in *Staphylococcus aureus* retains virulence but promotes biofilm formation. 7,72.

J

Jacobsen,S.M., Stickler,D.J., Mobley,M.L.& shitiliff,M.E.(2008).Complicated Catheterassociated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*.*Clin Microbiol Rev* .21,26-59.

Joshi. P., Wadhvani., T., Bahaley., P. and Kothari., V. (2010). —Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing, *The IUP Journal of Life Sciences*. 4 No , 59-72.

K

Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S, Harrison L.H., Lynfield R., Dumyati G., Townes J.M., Craig A.S., Zell E.R., Fosheim G.E., McDougal L.K., Carey R.B. et Fridkin S.K. (2007). Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMA*. 298,1763–1771.

Kurlenda, J. et M. Grinholc. (2012). Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochim. Pol.* 59:171-184.

L

Landini P., Antoniani D., Burgess JG., Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbial Biotechnology* , (2010). 86, 813–823.

Lam KS.(2006).Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 92 , 45–51.

Locci. R and Sharples . G. P. Morphology. In: Goodfellow.G. M, Mordarski.M,Williams. S.T. (eds). (1984) .The biology of Actinomycetes. Academic ,orlandon.; p: 165-199.

Lowy F.D. 1998.*Staphylococcus aureus* infections. *NEJM.* 339: 520-539.

Liu, Y., Xu, Z., Yang, Z., Sun, J. & Ma, L. (2016). Characterization of community associated *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections: a multicenter study in China. *Emerg. Microbes Infect.* 5, 127

M

Martinez LR, Casadevall A. (2007). *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology.* 4592- 4601.

Meena. B, Rajan. L.A ., Vinithkumar.N.V., Kirubakaran. R.(2013). Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. *BMC microbial,* 13 , 1.

Minotto E.(2014).Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. PhD. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande doSul, Brasil,.

N

Neelu Nawani., Dr. D. Y.(2013). Patil Biotechnology and Bioinformatics Institute, Tathawade, Pune 411033, India

Nedal. A. (2007). Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. Thèse de Doctorat. Norwegian University. Norvège.

Nobbs, A. H., Lamont, R. J. and Jenkinson, H. (2009), —Streptococcus adherence and colonization, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 73 , 407-505

O

Oana Dumitrescu ,oliver Dauwalder,Sandrine Boisset,Marie-Elisabeth Reverdy,Anne Tristan et Francois Vandenesch.(2010).*Staphylococcus aureus* resistance to antibiotic :key point in .26, 943-949.

Otto M . (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.*; 64:175–188. [PubMed: 22906361]

Ou. X, Zhang. B., Zhang. L., Dong. K., Liu. C, Zhao. G et Ding. X. (2008). SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta. Biochimica et Biophysica Sinica.* 40, 877-882.

P

Parvizi J., Pawasarat IM., Azzam KA., et al.(2010) Periprosthetic joint infection: the economic impact of methicillin-resistant infections. *J Arthroplasty.*; 25,103–107. [PubMed: 20570103]

Q

Qinyuan. L., Chen. X., Jiang.Y and Chenglin. J. (2016). Morphological Identification of Actinobacteria. Additional information is available at the end of the chapter3.<http://dx.doi.org/10.5772/61461>.

R

Ranjani Anandan, Dhanasekaran Dharumadurai and Gopinath Ponnusamy Manogaran .(2016). An Introduction to Actinobacteria.

S

Schlievert PM., Kristi L S ., Donald Y.M.L.(2010) .Secreted virulence factor compairison between Methicilin – Resistant and Méthicillin –Sensitive *Staphylococcus. aureus* ,and its relevance to atopic dermatitis.125,39

Sinha B. et Herrmann M. 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb. Haemost.* 94, 266-77

Solecka J.,Rabcenkod., Anna L.,Gouanna Z ., Postek M (2012) .Characterzation and optimization of biosynthesis of bioactive secendry by metabolites produced by streptomycetes sp .8812.65

Spormann AM. (2008). Physiology of microbes in biofilms stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*.5208- 5218

Sujatha P., Bapi Raju KV.,Ramana T. (2005). Studies on a new marine *Streptomyces* BT 408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*,vol 160,p119–126.

T

Tarkka. M; and Hampp. R. (2008). Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions in Secondary Metabolites in Soil Ecology. *Soil Biology*, P. Karlovsky (ed.), 14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Tenke,P.Kovacs.,B.,Jackel.,M.& Nagy,E.(2006).The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* 24,13-20.

Terhi Oja.,a Paola San Martin Galindo.,a Takaaki Taguchi.,b Suvi Manne.,a Pia M. Vuorela,c Koji Ichinose,b Mikko Metsä-Ketelä,d Adyary Fallareroa,c.(2015). Effective Antibiofilm Polyketides against *Staphylococcus aureus* from the Pyranonaphthoquinone Biosynthetic Pathways of *Streptomyces* Species. 59 , 10.

Trautner B., W., Darouiche R., O. (2009). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, 32 , 177–183.

V

Venkatesan, N., Perumal, G. & Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm associated bacteria. *Future Microbiol* 10, 1743–1750

Von Nussbaum F ., Brands M .,Hinzen B., Weigand S., Habich D(2006) .Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival 45, 5072-129.

W

Werdan K., Dietz S., Löffler B. (2014). Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. *Nat Rev Cardiol.*; 11(1):35–50. A recent review on the pathogenesis of bacterial infections causing endocarditis and one of few

Wikler, M.A.(2016). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 26th Inform Suppl 36, 100-S25

Vincent A., Saint GenisLava.l,Laprugne-Garcia E., Saint Genis Lava (2008).Infections Associées Aux Soins définition, Fréquence et facteurs de risque.Octobre ; CCLIN Sud-Est.1-5.

Williams.S.T, Locci .R, Beswick .A, Kurtboke .D.I, Kuznetsov .V.D , Le Monnier. F.J, Long.P.F, Maycroft. K.A, palma .R.A, Petrolini .B, Quaroni .S, Todd. J.I et West .M. Detection and identification of novel actinomycetes. *Res. Microbiol.* (1993); 144(8): 653-6.

Y

Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* 78:110-116.

Yang L, Liu Y, Wu H, et al. Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2012); vol 65;p. 146–157.

Yong-chao G., Shu-hai G., Wang J., Li D., Wang H., Zeng DH. (2014). Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere*; 117:486–493.

Annexe I

Milieu s de cultures utilisé :

- Milieu Chapman
- Gélose nutritive
- Mueller Hinton

- PH.....7.4±0

- PBS :
 - KH₂PO₄ (0.14g/1L)
 - Na Cl8, 5g /1l
 - Na₂HPO₄0.79g /1l
 - H₂O.....1l
- TSB30g /1l
- Cristal Violet 2% (2g/100ml) (CV) est un colorant basique qui se lie sur les bactéries et les exopolysaccharides dans la matrice extracellulaire du biofilm (Peeters et al, 2008).

- DMSO
- Acide acétique 33%
- méthanol

Annexe II

MATERIEL

- Autoclave
- Bain-marie(GFL)
- Balance analytique
- Béchers boites de pétri
- Bec bunsen
- Ecouillons
- Erlenmeyers
- Etuve a 37°
- Flacons

- Four pasteur
- Microplaque
- Micropipettes
- Microscope optique
- Pipettes pasteur
- Plaque agitatrice
- Spectrophomètre
- Tubes a essais
- Vortex

Annexes III

Tableau I : Résultats des CMI pour les trois souches de *S. aureus*

souches	CMI mg/L	
	E4	S19
<i>S.aureus</i> LGA251	$5.78 \cdot 10^2$	$92.5 \cdot 10^2$
<i>S.aureus</i> ATCC29213	$5.78 \cdot 10^2$	$92.5 \cdot 10^2$
<i>S.aureus</i> FRI56	$1.44 \cdot 10^2$	$46 \cdot 10^2$

Tableau II : l'activité antibiofilm de l'extrait brut E4

	Concentrations de E4 (mg/L)			
	0	5	23	46
LGA 251	0,198	0,115	0,095	0,074
FRI 56	0,16	0,09	0,08	0,075
ATCC 25923	0,131	0,1	0,093	0,09

Tableau III : l'activité antibiofilm de l'extrait brut S19

	Concentrations de S19 (mg/L)			
	0	9	18	37
LGA 251	0,198	0,07	0,064	0,062
FRI	0,16	0,078	0,075	0,075
ATCC 25923	0,131	0,071	0,065	0,065

Résumé

L'objectif principal de cette étude était de tester l'activité antibactérienne et antibiofilm de deux extraits bruts E4 et S19 produits par des souches *Streptomyces*, l'une isolée de sol saharien de Béni Abbas et l'autre d'une station d'épuration de Béjaia et ce à l'égard de souches 3 souches de *S.aureus* (LGA251 , FR56I, ATCC29231)

Les tests d'activité antagoniste ont été réalisés par la méthode des puits et par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). De plus, le test de l'activité antibiofilm a été effectué par la méthode de coloration par le cristal violet sur microplaque.

Nous avons détecté un effet inhibiteur non négligeable des extraits bruts testés sur les biofilms formé par les trois souches cibles de *S .aureus*.

Ce qui implique que la famille des actinobactéries issues d'environnement particuliers peuvent jouer un rôle potentiel dans la lute contre les biofilm.

Abstract

The main objective of this study is to test the antibiofilm activity of two crude extract produced by the actinobactirium family *Streptomyces* ,one isolated from the Sahara soil of Beni Abbas ,and the other from selected from purification station in Béjaia; and this with regard to three strains of *S.aureus* (LGA251 , FR56I, ATCC29231) .

The antagonist activity tests were carried out by the method of staining with crystal violet on a microplate .

We detected a signification inhibitory effet of the crude extracts tested on the biofilms formed by the three target strains of *S.aureus*.

Implying that the family of actinobacteria from particular environment can play a potential role in the fight against biofilms.