

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministre 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**

**Purification et caractérisation d'une substance antifongique  
produite par une souche d'actinomycètes STA<sub>10</sub>.**

Présente par M<sup>elle</sup> : BENLOUNIS Chahrazad

DRAOUI Najet

Nombre du jury :

Président : M<sup>r</sup> : KECHA M

Professeur

Examinatrices : M<sup>me</sup> BOUCHARBA N

MCB

M<sup>me</sup> IDRES N

MDA

Promoteur: M<sup>r</sup> BENDJEDDOU K

MCB

2013/2014

## *Remerciements*

*Avant tout, nos profonds remerciements s'adressent à Allah de nous avoir donné le courage de mener à bien ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement notre promoteur M<sup>r</sup> BENDJEDDOU d'avoir accepté de nous encadrer, son disponibilité, son aide précieux, son patience, son gentillesse et surtout son confiance. Nous exprimons monsieur toutes notre reconnaissance.*

*On tient à exprimer nos vifs remerciements aux membres de jury :*

*M<sup>r</sup> KECHA pour avoir bien voulu examiner ce mémoire et nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de notre haute gratitude.*

*M<sup>me</sup> BOUCHARBA et M<sup>me</sup> IDRES qui ont bien voulu examiner ce travail et participer au jury. Quelles trouvent ici l'assurance de toute notre reconnaissance.*

*Merci à tous nos enseignants en particulier les enseignant de master. Nos vous en somme très reconnaissant.*

*On tient à remercier également tous les gens qui nos aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.*

*Enfin, un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, pour leur, aide et gentillesse.*



# Dedicace

*Je dédie ce modeste travail :*

*Tous d'abord et avant tous à deux être les plus chères au monde*

*Qui m'ont toujours soutenue et encouragé dans mes études.*

*A mon père que j'aime énormément et à ma mère que j'adore*

*A mon frère unique «Amine »*

*A ma sœur « Zahira et son marie et sa fille Ritadje et son fils Obayda*

*à mes sœur Ouarda et Nesrine»*

*Dans mon mémoire ma Grand-Mère que dieu la compte parmi les bien aime  
nechalah.*

*A ma tante Nasima, A ma Malia et « son marie et leurs enfants mahmod,  
mounia et maroin ».*

*A toute ma grande famille de la part de baba et ma*

*A tous mes chères amies Hania, Dalal, Lilia , Tinhinane , Chafika, Linda,  
Nawal, Ghalia, Lamia, Chafia, Nafissa,*

*Et la promotion de biotechnologie microbienne.*

*Chahrazad*

# Dedicace

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ma grande mère*

*Mes très chers parents pour leurs soutiens, et leur encouragement aux moments difficiles.*

*Mes très chers frères Aissa et Rabeh.*

*Mes très chères sœurs Zahra ,Mini,Siham et chams.*

*L'épouse de mon frère Taous et son petit fils Raya*

*Mes très chers amis Dalal, Wassila,nouria,Souhila,Kahina , Khalida ,Nedjoi .hanane.*

*Mon binome Chahra*

*Mes ancres et mes tantes et leurs familles*

*Najet*

## *Liste des abréviations*

***C.albicans***: *Candida albicans*.

**M2**: Williams.

**MEM** : Mincer Eau e Mer.

**pH**: Potentiel d'hydrogène.

**TFA**: Trifluoroacétate.

**UA**: Unité Arbitraire.

**UFC**: unité formant cellulaire.

**v/v**: Volume par volume.

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure n°1</b>	Cycle de développement du <i>streptomycete</i> .	4
<b>Figure n°2</b>	Production des substances antifongiques par la souche STA10 sur milieu M2 liquide.	10
<b>Figure n°3</b>	Montage de la chromatographie en phase inverse effectuée sur gel de C18.	11
<b>Figure n°4</b>	Purification partielle de substances antimicrobiennes produites par la souche STA10.	14
<b>Figure n°5</b>	Activité de la souche STA10 cultivé dans milieu liquide vis-à-vis à <i>Candida albicans</i>	16
<b>Figure n°6</b>	Activité antifongique vis-à-vis à <i>Candida albicans</i> de la fraction obtenue à 0% d'acétonitrile après chromatographie en phase inverse	17
<b>Figure n°7</b>	Activité antifongique de fractions purifiées par chromatographie en phase inverse vis-à-vis à <i>Candida albicans</i>	18
<b>Figure n°8</b>	Unité arbitraire de surnageant concentré à l'égard de <i>Candida albicans</i>	18
<b>Figure n° 9</b>	Unité arbitraire des fractions obtenues après chromatographie en phase inverse vis-à-vis de <i>Candida albicans</i>	19

<b>Figure n°10</b>	Effet du pH sur l'activité antifongique de la fraction concentré issue de la culture Sur milieu liquide envers <i>Candida albicans</i>	20
<b>Figure n° 11</b>	Test d'activité des différentes solutions tampons envers <i>Candida albicans</i>	21
<b>Figure n°12</b>	Effet du pH sur l'activité antifongique envers <i>Candida albicans</i> de la fraction purifiée par chromatographie en phase inverse et des solutions tampons (Témoin)	22
<b>Figure n°13</b>	Effet des enzymes sur l'activité antifongique de la fraction purifiée par la Chromatographie en phase inverse	22

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Tableau I	Répartition des actinomycètes dans la nature.	3
Tableau II	Préparation des différentes solutions d'acétonitrile dans le TFA à 0,05%	12
Tableau I	Milieu MEM (pH7.5).	Annexe I
Tableau II	Milieu M2 (pH7.2).	Annexe I
Tableau III	Bouillon nutritif (pH7.2).	Annexe I
Tableau IV	Gélose Muller Hinton (pH7.3).	Annexe I
Tableau V	Milieu BHIB (pH7.5)	Annexe I
Tableau VI	Diamètres des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide.	Annexe II
Tableau VII	Diamètres des zones d'inhibition pour les solutions tampon témoin	Annexe II
Tableau VIII	Diamètre des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide	Annexe II
Tableau IX	Diamètre des zones d'inhibition pour les enzymes utilisées comme témoins	Annexe II



Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

## **Sommaire**

Introduction.....1

### **Première partie : Synthèse bibliographique**

I.	Généralités.....	2
II.	Taxonomie .....	2
III.	Ecologie des actinomycètes.....	2
IV.	Cycle biologique des actinomycètes.....	3
V.	Les antifongiques produits par les actinomycètes.....	4
VI.	Importance des actinomycètes.....	5
VI. 1.	Importance dans le domaine industriel.....	5
VI. 1. 1.	Production d'antibiotiques.....	5
VI. 1. 2.	Production d'autres substances.....	5
VI. 2.	Importance dans le domaine agronomique.....	6
VII.	Pathogénicité.....	6

## Deuxième partie : Partie expérimentale

### Matériel et méthodes...

I. Matériel biologique .....	7
I.1 Origine des souches.....	7
II. Revivification des souches.....	7
III. Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieu liquide.....	8
III. 1.Prés-culture.....	8
III.2.Culture.....	8
IV. Production de substance antifongiques.....	9
IV.1. Prés-culture.....	9
IV.2. Culture.....	9
V. Purification partielle des substances antimicrobiennes.....	11
V.1. Préparation des solvants organiques.....	11
V.1. Préparation de la colonne.....	12
V. 3. Passage des échantillons à travers la colonne C <sub>18</sub> .....	12
VI. Le calcul du nombre d'unité arbitraires.....	13
VII. Caractérisation physicochimique des substances antifongique.....	15
VII. 1. Effet du pH.....	15
VII.2. Effet des enzymes protéolytiques.....	15

## Troisième partie : Résultats et discussion

I.	Revivification des souches.....	16
II.	Production de substances antifongiques.....	16
II.	Mise en évidence de l'activité antifongique de la souche STA10.....	17
III.	Purification partielle des substances antifongiques.....	17
IV. 1.	Chromatographie en phase inverse.....	17
IV.	calcul du nombre d'unité arbitraires.....	18
VI.	Caractérisations physicochimiques des substances antifongique.....	19
VI.1.	Effet du pH.....	20
VI.2.	Effet des enzymes.....	21
	Conclusion.....	23

Références bibliographiques

Annexe

---

# *Introduction*

---

Les infections fongiques sont provoquées par des microorganismes eucaryotes, elles présentent généralement des problèmes thérapeutiques plus difficiles que les infections bactériennes. En fait, il y a relativement peu d'agents antimicrobiens qui peuvent être employés pour traiter les infections fongiques. De nouveaux fongicides sont nécessaires dans l'agriculture et les domaines agro-alimentaire et médical (Valanarasu et *al.*, 2010).

L'augmentation courante du nombre d'infections fongiques a entraîné une reprise d'intérêt de trouver des nouvelles molécules actives. Les chercheurs retournent vers la recherche de nouveaux antifongiques plus performants et moins agressifs pour l'organisme (Benmansour et *al.*, 2014). Dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives, des investigations récentes s'intéressent à les chercher chez des actinomycètes rares (Loqman, 2009).

Les actinomycètes sont parmi les plus grands producteurs de métabolites secondaires en particulier le genre *Streptomyces* ; par leur capacité de produire de nouveaux composés prometteurs. Elles sont les producteurs de la majorité des antibiotiques et des antifongiques et beaucoup d'autres composants, par conséquent, elles sont largement identifiées en tant que micro-organismes industriels importants (Ramesh et William, 2012).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui consiste en :

- La mise en évidence de la production de substances antifongique par une souche d'actinomycète;
- Un essai de purification partielle de ces substances ;
- Caractérisation physicochimique de ces substances.

---

*Synthèse*  
*bibliographiques*

---

## **I. Généralité**

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, avec un pourcentage (G+C%) élevé (>55 %). Elles sont considérées comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons (Chacko et Ernest, 2012). La plupart des actinomycètes forment un mycélium végétatif et des hyphes aériens; et d'autres forment seulement un mycélium de substrat (Mariadhas et *al.*, 2013).

Elles ont une vie libre, saprophytes ;en plus, elles présentent une source importante dans la production des antibiotiques (Vali *etal.*,2012).Certains genre sont pathogènes pour l'homme et animal tel que le genre *Actinomyces* et *Nocardia* (Beryl et Watsonn, 2006).

## **II. Taxonomie**

D'après (Garrity et *al.*, 2007) le phylum *Actinobacteria* referme une seule classe :*Actinobacteria*. Cette classe est subdivisée en 5 sous classes, 6 ordres, 13 sous ordres, 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces.

Les Bactériologistes ont considéré les actinomycètes comme des bactéries, tandis que les mycologistes les ont considérés comme des champignons. Actuellement, Ce problème a été réglé, et elles sont classées définitivement parmi les bactéries, car elles présentent une cytologie qui ressemble à celle des bactéries par l'absence de la membrane nucléaire et des organites flagellaires et selon leur paroi qui ne contient ni chitine ni cellulose, mais contient une glycoprotéine, lysine et l'acide Diaminopimélique (Kitouni, 2007).

## **III. Ecologie des actinomycètes**

Les actinomycètes sont des bactéries ubiquitaires (Divya et Nawani, 2014),sont largement distribués dans la nature (Semedo *etal.*,2001).Elles varient selon les biotopes et les conditions climatiques, leur densité est de l'ordre de  $10^6$ - $10^9$  cellules par gramme de sol. Le genre de *Streptomyces* représente plus de 95% des souches *actinomycetales* isolées à partir du sol (loqman, 2009).

La distribution et l'abondance des actinomycètes dépend généralement de divers habitats écologiques, incluent le sable de plage, l'eau de mer (Kumar et Kanmabiran ,2010) ;les sols, les eaux douces, les engrais, les terreaux en grand nombre, comme elles peuvent être retrouvées aussi sur les résidus des plantes et des produits alimentaires (Abede et *al.*, 2013) (Tableau I).

Elles forment une partie significative de la flore microbienne du sol, depuis le tournant du siècle ; particulièrement dans les sols neutres et alcalins partiellement secs et avec un contenu important de matière organique (David et Williams, 1970). La majorité des actinomycètes cessent de se développer à environ pH 5, et elles comportent un très petit composant des populations microbiennes des sols acides (Khan et Williams, 1975).

**Tableau I :** Répartition des actinomycètes dans la nature (Kitouni, 2007).

<b>Genre</b>	<b>Habitat</b>
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racine
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

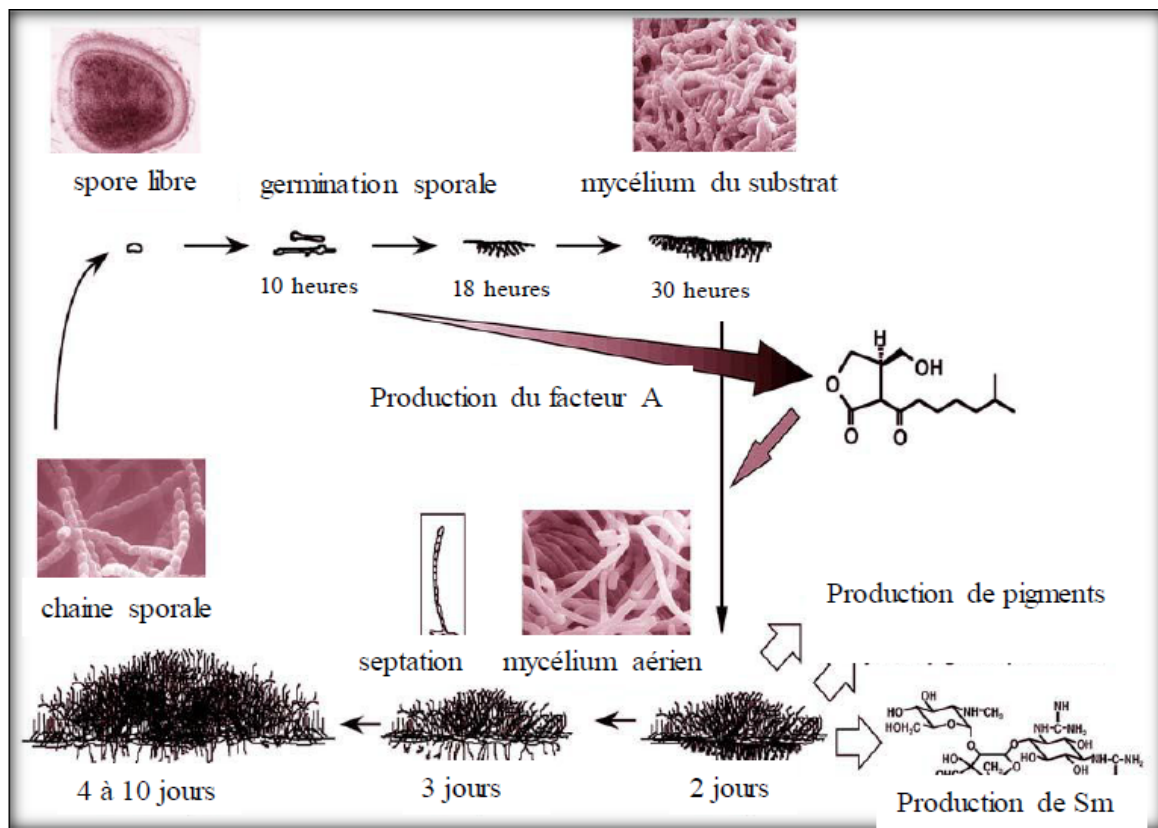
#### **IV. Cycle biologique des Actinomycètes**

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 et forment des hyphes non septés, plurinucléés, ramifiés et ancrés sur milieu solide (Flardh et Buttner, 2009).

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 chaînes de spores uninucléés qui sont des agents de dissémination (**figure. 1**).



En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire (Colombié, 2005).



**Figure.1** : Cycle de développement du *Streptomyces* (Loucif, 2011).

## V. les antifongiques produits par les actinomycètes

Depuis la découverte de streptomycine par Schutz et al en 1944 et de la gentamicine en 1963 ; beaucoup de chercheurs ont été intéressés pour d'autres genres à part les *Streptomyces* comme producteurs de nouveaux composés antimicrobiens (Takahashi et al., 1999).

Près de 20% des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes ont un pouvoir antifongique, les 80% restants ayant des propriétés assez diverses : antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques à la fois) antivirales antitumorales ou insecticides (Buckingham, 1997).

### **V.1. Les antifongiques**

Presque la moitié des substances antifongiques naturelle sont synthétisés par les actinomycètes, en particulier les *streptomycetes*, qui est le genre le plus répons dans l'environnement (Badji et al, 2005).

Les antifongiques sont en nombre restreint, ils représentent 20% des molécules produites par les actinomycètes. Ondistingue deux types selon leur structure chimique :

- Polyéniques ayant un effet actif contre les champignons tel que l'amphotéricine B (Thakur et al., 2007).
- Non polyéniques pouvant avoir un effet antibactérien et antifongique tel que le cycloheximide (Hamoir et al., 2001).

## **VI. Importances des actinomycètes**

### **VI.1.Importance dans l'industrie**

Les actinomycètes constituent une source importante d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires à utilité industrielle.

De ce fait, de nombreux chercheurs portent un intérêt croissant aux actinomycètes et certains pays en ont fait l'un des axes prioritaires de leurs programmes de recherche en biotechnologie (Loqman , 2009).

#### **VI.1.1. Production d'autres substances**

Les actinomycètes sont les meilleure source commune d'antibiotique, et plus récemment se sont avérés être une source prometteuse d'enzymes, inhibiteurs d'enzymes, des vitamines (Semedo *etal.*, 2001),agents antitumoraux, produits cosmétiques, les pesticides, antiparasitaires (Valli et al, 2012).

Les Streptomycètes, en particulier, sont capables de produire des hydrolases et des chitinases qui exercent leur activité maximale à des pH acides (Kitouni ,2007).

Certaines espèces d'actinomycètes sont capables de dégrader ou de transformer des toxines produites par des champignons toxigènes (Mycotoxines), certaines substances comme la spiramycine sont utilisées pour le traitement, des emballages et d'autres pour la protection de certains fromages (Boudjella, 2007).

## **VI.2. Importance dans le domaine agronomique**

Les actinomycètes sont associés à la production de matière organique du sol en raison de leur colorant noir appelé : mélanine, et elles ont également un rôle important dans la décomposition des matériaux organiques et cycle de carbone (Smriti et *al.*, 2012, Semedo et *al.*, 2001).

Quelques actinomycètes forment des associations limitées avec les plantes, afin de coloniser leurs tissus internes sans causer des symptômes d'infections, En plus elles ont la capacité d'empêcher les microorganismes pathogènes pour les plantes (Dinishi, et Dennis ,2008).

Le genre *Frankia* est connu par son rôle dans la fixation d'azote atmosphérique au niveau des nodules racinaires de certains arbres et légumineuses (Beryl et Watson ,2006).

Les actinomycètes ont un rôle important dans la dégradation des polymères de structure relativement complexes comme la cellulose, l'hémicelluloses, la pectine, la kératine et la chitine (kitouni, 2007).

## **VII. Pathogénicité**

Les actinomycètes peuvent être responsables de différentes pathologie :

- L'actinomycose est une infection chronique rare causée par une Actinomycètes anaérobie responsable de la formation d'abcès de localisations cervico -faciales, thoraciques, digestives et génitales (Tamain *etal.*, 2013).
- Les actinomycètes aérobies (Actinomycétomes) peuvent être responsables d'une pathologie inflammatoire chronique appelée mycétome (Iniesta *etal.*, 2013).
- L'espèce *Israelii* présente une cause primaire de décomposition dentaire (Beryl, et Watson ,2006).

---

# *Matériel et méthodes*

---

## **I. Matériel biologique**

### **I.1 Origines des souches**

Les souches utilisées dans cette étude proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA).

Dans cette étude une souche d'actinomycète (STA<sub>10</sub>) est utilisée. C'est une souche isolée à partir de la station d'épuration d'Aokas à Bejaia, elle est conservée à 4°C sur une gélose MEM. Selon des travaux antérieurs, effectués au laboratoire LMA, cette souche est douée d'une activité antimicrobienne.

Le germe cible utilisé pour la mise en évidence de l'activité antifongique de la souche d'actinomycètes est une souche de levure (*Candida albicans*).

## **II. Revivification des souches**

La revivification de la souche productrice STA<sub>10</sub> a été effectuée sur :

- Un milieu solide MEM (Annexe I) ; suivi d'une incubation de 7 jours à 28°C.
- Un milieu liquide M<sub>2</sub> (Annexe I) par des repiquages successifs, suivis d'incubation de 4 jours à 28°C.

La souche cible (*candida albicans*) a été repiquée dans 9 ml de BHIB (Annexe I), puis elle est incubée à 37°C pendant 24h.

### **III. Mise en évidence de l'activité antifongique sur un milieu liquide**

#### **III. 1. Précultures**

Un tube de 5 ml de milieu M<sub>2</sub> liquide est ensemencé, en utilisant une charge d'une culture fraîche sur gélose, de la souche **STA<sub>10</sub>**. Le tube est incubé à 28C° pendant 4 jours avec une agitation manuelle chaque jour. Cette culture va servir de précultures pour ensemenecer le grand volume.

#### **III. 2. Culture**

Un flacon de 250ml, contenant 50 ml du milieu liquideM<sub>2</sub>, est ensemencé par la préculture précédemment préparé. Le flacon est incubé à 28 C° pendant 10 jours avec agitation manuelle journalière. Par la suite, la culture de la souche **STA<sub>10</sub>** est centrifugée à une vitesse de 12000 g pendant 20 min à 4 C°, le surnageant récupéré est concentré 20 fois sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 C°.

La mise en évidence de l'activité antifongique de la souche **STA<sub>10a</sub>** a été réalisée par la technique décrite par de Camargo *et al.* (2013) avec modification. Des puits sont creusés stérilement à l'aide d'un embout de 9mm de diamètre, dans une gélose Muller Hinton ; préalablement ensemencée par écouvillonnage avec une culture fraîche de *C. Albicans* de 10<sup>6</sup>UFC/ml, les puits est rempli avec 100 µl du surnageant concentré.

La boîte est mise à 4 C° pendant 2h, pour arrêter la croissance du germe cible, et permettre une bonne diffusion des agents antimicrobiens, la boîte est ensuite incubée à 37C° pendant 24h.

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

(Yedir *et al.*, 2001).

## **IV. Production des substances antifongiques**

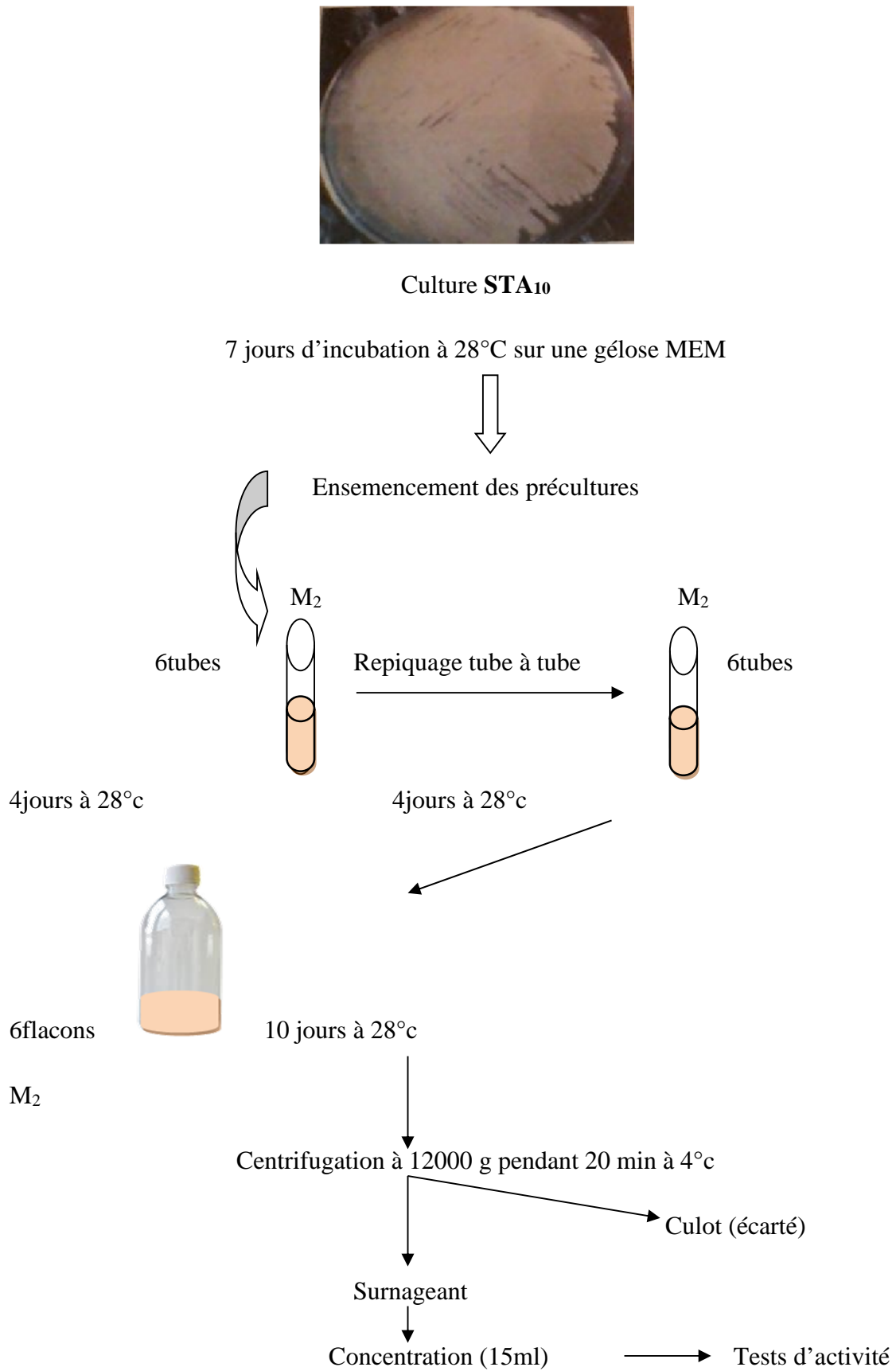
### **IV-1.1. Pré-culture**

Six tubes de 5 ml de milieu M<sub>2</sub> liquide sont ensemencés, en utilisant une bonne charge d'une culture fraîche sur gélose, de la souche **STA<sub>10</sub>**. Les tubes sont incubés à 28°C pendant 4 jours avec une agitation manuelle chaque jour. Ces cultures vont servir de précultures pour ensemer les grands volumes.

### **IV-1.2. Culture**

Six flacons de 250ml, contenant chacun 50ml du milieu liquide M<sub>2</sub>, sont ensemencés par les précultures précédemment préparées. Les flacons sont incubés à 28°C pendant 10 jours avec agitation manuelle journalière. Par la suite, les cultures de la souche **STA<sub>10</sub>** sont centrifugées à une vitesse de 12000 g pendant 20min à 4°C, le surnageant récupéré est concentré 20 fois sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C.

Le test d'activité du surnageant concentré est effectué par la technique des puits décrite précédemment. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et exprimés en millimètre.



**Figure. 2** : Production des substances antifongiques par la souche STA<sub>10</sub> sur milieu M<sub>2</sub> liquide.



## **V. Purification partielle des substances antimicrobiennes**

En vue de purifier partiellement les substances antimicrobiennes produites par la souche d'actinomycète **STA<sub>10</sub>**, une chromatographie en phase inverse est utilisée. La semi-purification est effectuée sur une colonne de gel de silice C<sub>18</sub> (Discovery DSC-18, 10g, 60ml, USA).



**Figure. 3 :** Montage de la chromatographie en phase inverse effectuée sur gel de C<sub>18</sub>.

### **V.1. Préparation des solvants organique**

Les solvants organiques utilisés pour réaliser la chromatographie en phase inverse sont les suivants :

- une solution de TFA à 0.05% préparée en mettant 1 ml de TFA concentré dans 2 L de l'eau distillé.
- Des solutions de 120 ml contenant un gradient croissant et discontinu d'acétonitrile dans la solution de TFA à 0.05% préparées à des concentrations d'acétonitrile allant de 0% à 50%. (Tableau II)

**Tableau II :** Préparation des différentes solutions d'acétonitrile dans le TFA à 0,05%

Volume d'acétonitrile (ml)	Volume de TFA à 0,05% (ml)	Volume final (ml)	Concentration de la solution en acétonitrile(%)
0	120	120	0%
12	108	120	10%
24	96	120	20%
36	84	120	30%
48	72	120	40%
60	60	120	50%

## V.2. Préparation de la colonne

La colonne a été nettoyée avec 120 ml d'acétonitrile puis équilibrée avec 120 ml de la solution de TFA à 0,05%.

## V.3. Passage des échantillons à travers la colonne C18

L'échantillon équilibré (avec TFA à 0,05%, v/v) et filtré en utilisant des membranes de 0,45 µm de nitrocellulose, est passé à travers la colonne à un débit de 2 ml/min. Après le passage de l'échantillon la colonne est lavée avec 240ml de la solution TFA à 0.05%.

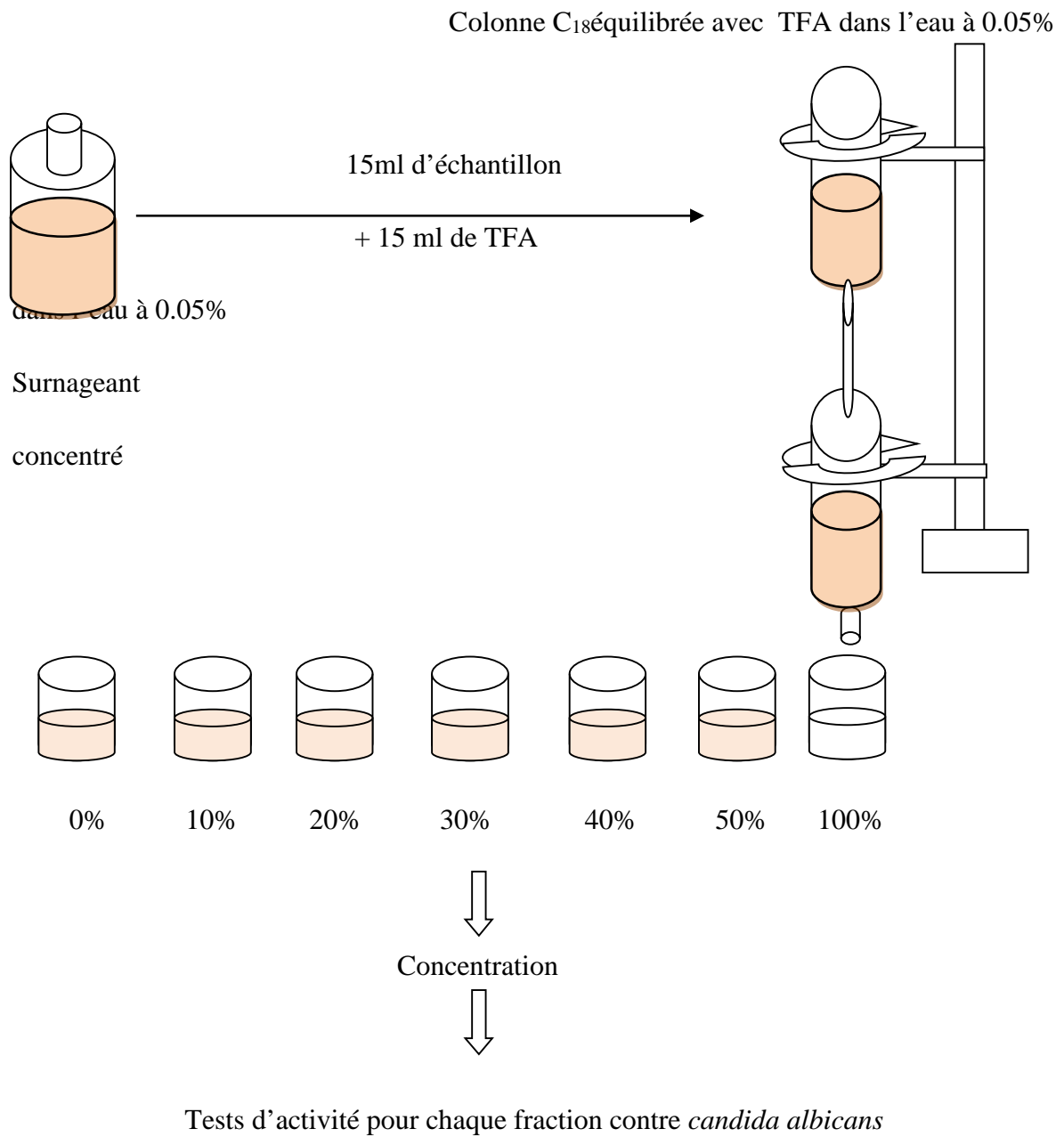
L'élution est assurée par les solutions (120 ml) contenant des concentrations d'acétonitrile allant de 10% à 50%. En fin, la colonne est lavée avec 120 ml d'acétonitrile.

Les fractions récupérées sont évaporées sous vide pour éliminer les solvants organiques.

L'activité antifongique des fractions obtenues est testée à l'égard de *C.albicans* par la méthode des puits.

**VI. Calcul du nombre des unités d'arbitraires :**

La quantification des substances antifongiques des fractions actives (le surnagent concentré et la fraction obtenue avec 0% d'acétonitrile) est réalisée par le calcul du nombre d'unités arbitraires (UA) (Hermine et *al.*, 2010). Une série de dilutions en cascade des fractions actives est effectuée en utilisant l'eau physiologie, un test d'activité antifongique (anti-*C.albicans*) de chaque dilution est réalisé par la méthode des puits décrite précédemment. Le nombre d'unités arbitraires est égal à l'inverse de la dilution maximal donnant encore lieu à une zone d'inhibition détectable. La concentration en substances antifongiques est exprimée en unités arbitraires par ml (UA/ml).



**Figure. 4:** Purification partielle des substances antifongique produites par la souche STA<sub>10</sub>.

## **VII. Caractérisation physicochimique des substances antifongiques**

Il est indispensable de tester la stabilité des substances antimicrobiennes produites par la souche **STA10** en présence de certains facteurs physicochimiques tels que le pH et les enzymes protéolytiques.

Après chaque test, l'activité antifongique est vérifiée par la technique des puits vis-à-vis de *C. albicans*, les résultats des tests sont comparés dans chaque cas à des témoins n'ayant pas subi l'action de ces agents.

### **VII.1 Effet de pH**

Des aliquotes de 200 µl des fractions actives sont ajustées à différentes valeurs de pH allant de 2 à 9, en utilisant les solutions tampons 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 (Faria et al., 1994).

Des aliquotes de 200 µl sont mélangés avec 600 µl de chaque solution tampon afin d'avoir les valeurs de pH voulues, les fractions sont laissées 4h à température ambiante. Elles sont ensuite testées pour leur activité antifongique par la technique des puits décrite précédemment.

Un échantillon de 200µl de la fraction active est additionné de 600 µl d'eau distillée est utilisé comme témoin positif. Les solutions tampons sont utilisées comme témoin négatif, pour s'assurer que l'activité antifongique vient effectivement des substances antifongiques ; présentes dans la fraction active et non pas sous l'effet du pH des tampons.

### **VII.3 Effets des enzymes protéolytiques**

Les enzymes utilisées dans ce test sont la papaine et la trypsine. Des solutions enzymatiques de 1mg/ml de chaque enzyme sont préparées dans un tampon phosphate de sodium à pH 7.0. Des aliquotes de 200µl de la fraction active sont mélangés séparément avec 200 µl des différentes solutions enzymatiques; les mélanges sont incubés à 37°C pendant 4h. Le test d'activité antifongique est effectué par la technique des puits.

Un échantillon de 200µl de la fraction active est additionné de 200 µl d'eau distillée est utilisé comme témoin positif. Les solutions enzymatiques sont utilisées comme témoin négatif, pour assurer que l'activité antifongique vient vraiment des substances antifongiques ; présentes dans la fraction et non pas sous l'effet des enzymes.

---

# *Résultats et discussion*

---

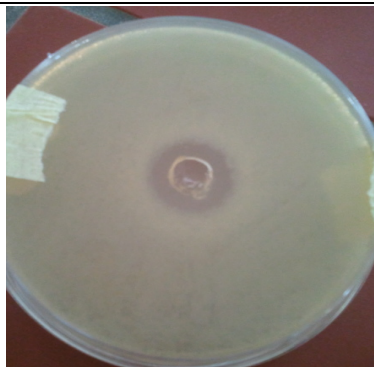
## **I- Revivification des souches**

La croissance de la souche STA<sub>10</sub> est remarquée : Au bout du quatrième jour d'incubation sur le milieu solide MEM. Au septième jour, le mycélium aérien apparaît sous forme de poudre avec une couleur blanche à beige qui couvre la gélose. Sur milieu liquide M<sub>2</sub>, la croissance est visible dès le deuxième jour d'incubation, l'apparition de pelotes a commencé dès le troisième jour d'incubation.

Ces résultats sont similaires à ceux reportés dans la littérature. La souche **STA10** est une souche filamenteuse, elle a un aspect poudreux sur la surface du milieu gélosé (Valli *et al.*, 2012) ; en milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire (Colombié, 2005).

## **II-Production des substances antifongiques**

Une bonne croissance de la souche STA<sub>10</sub> dans le milieu liquide M<sub>2</sub> est manifestée après 3 jours d'incubation ; par l'apparition de petites pelotes bombées d'un diamètre de 1 à 2 mm avec une couleur blanche à beige.



**Figure. 5** : l'activité de la souche **STA10** cultivée dans milieu liquide

vis à vis à *Candida albicans*.

### III-Mise en évidence de l'activité antifongique de la souche STA10

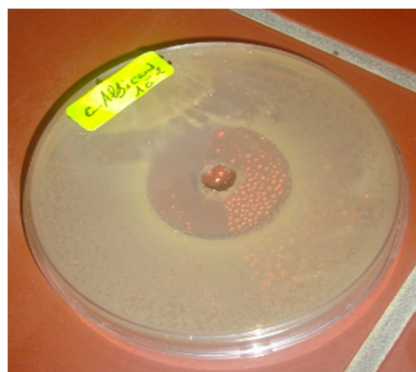
L'effet inhibiteur du surnagent concentré de la souche STA10 sur *C. albicans* est détecté par l'apparition d'une zone d'inhibition au tour des puits de 20 mm de diamètre (figure. 5).

D'après Mariadhas et al (2013) les actinomycètes ont une large capacité pour la production de métabolites antimicrobiens ayant une forte activité, qui les met parmi les très importants microorganismes ciblés dans les recherches des nouvelles molécules.

### IV. Purification partielle des substances antifongiques

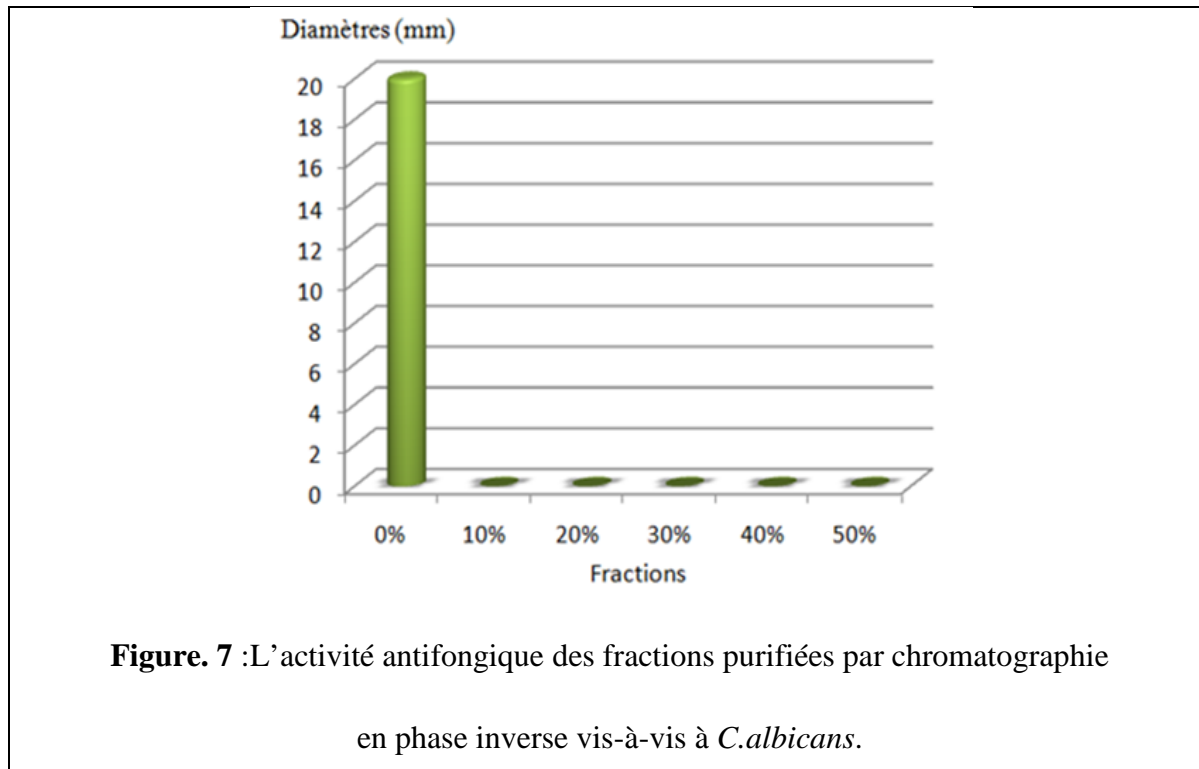
#### IV-1.Chromatographie en phase inverse

D'après les résultats obtenus pour les différentes fractions testées ; seulement la fraction obtenue à 0% d'acétonitrile présente une activité antifongique à l'égard de *C.albicans* avec une zone d'inhibition de 34 mm (**figure. 6**).



**Figure. 6 :** Activité antifongique vis-à-vis à *C.albicans* de la fraction obtenue à 0% d'acétonitrile après chromatographie en phase inverse.



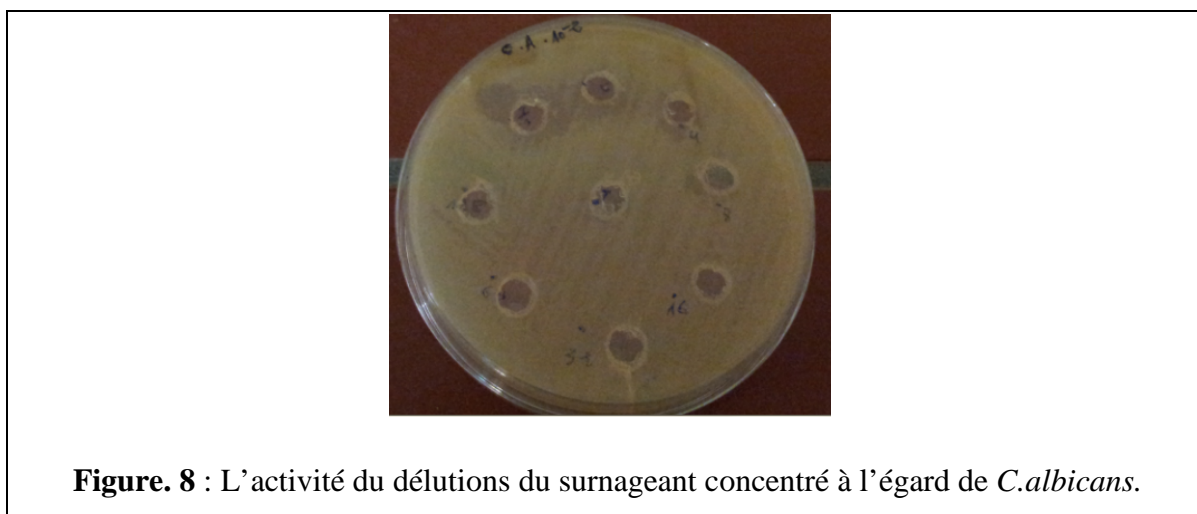


## V. Le calcul du nombre d'unités d'arbitraires

Le nombre d'unité arbitraire est calculé pour le surnageant et les fractions actives

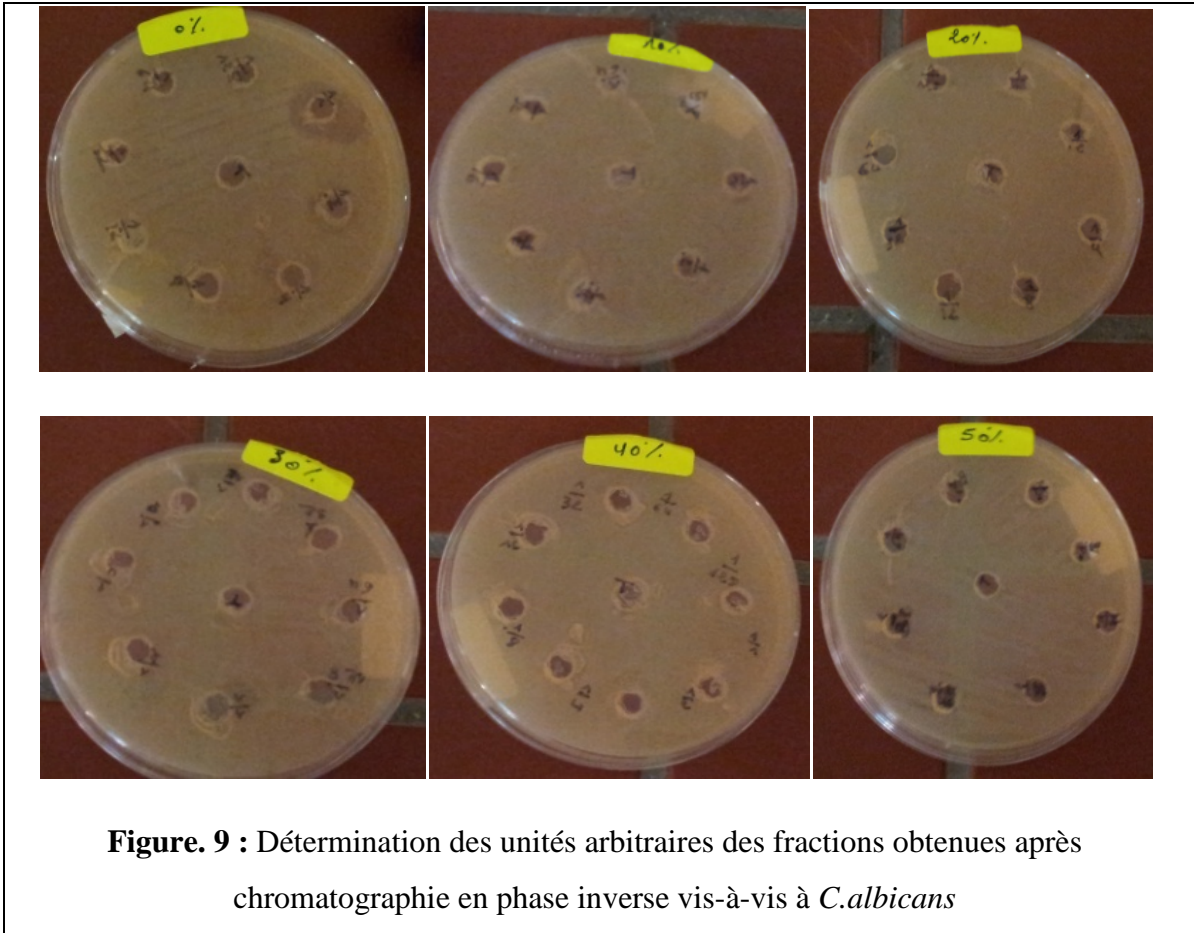
- Le surnageant concentré:

Le nombre d'unités d'arbitraires dans le surnageant obtenues est égal à 40UA/ml, avec un total de 600UA (15 ml du surnageant concentré) (**Figure. 8**).



- Les fractions obtenues par la chromatographie en phase inverse :

Le nombre total d'UA est de 300 UA/ml pour la fraction à 0% d'acétonitrile (**Figure. 9**).

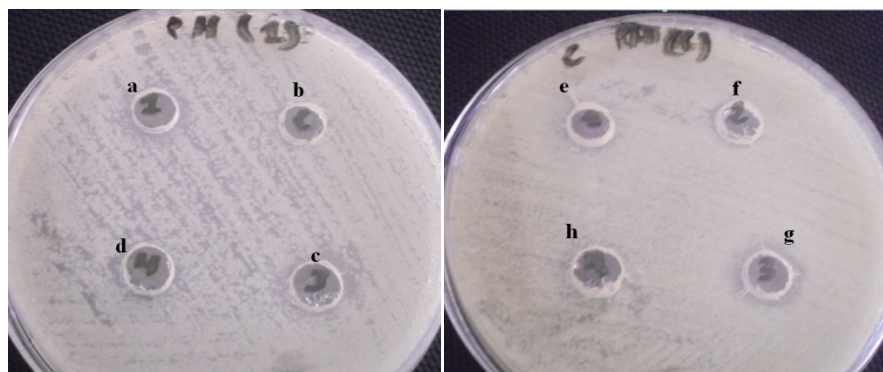


**Figure. 9** : Détermination des unités arbitraires des fractions obtenues après chromatographie en phase inverse vis-à-vis à *C.albicans*

## VI. Caractérisation physicochimique des substances antifongiques produite par la souche STA10

### VI.1 Effet du pH

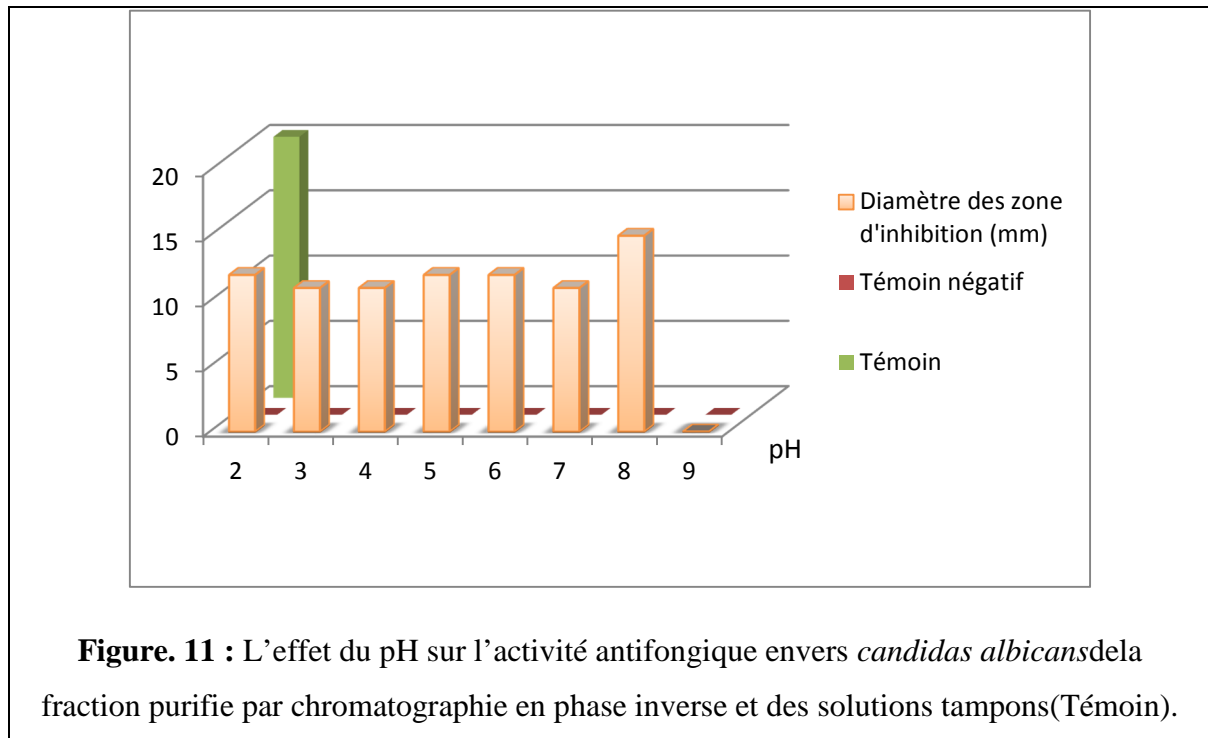
Après 24 h d'incubation, les cultures ont révélées des zones d'inhibition à des pH acides, neutres et alcalins, le diamètre de ces zones est maximal à pH 8, il est de l'ordre 15 mm. A pH 2 à 7, les zones d'inhibition obtenues sont de 11 à 12 mm de diamètre. Cependant, il y a eu une perte totale d'activité à pH 9 (**Figure.10**).



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. 10 :** Effet du pH sur l'activité antifongique de la fraction concentré issue de la culture sur milieu liquide envers *Candidas albicans*.

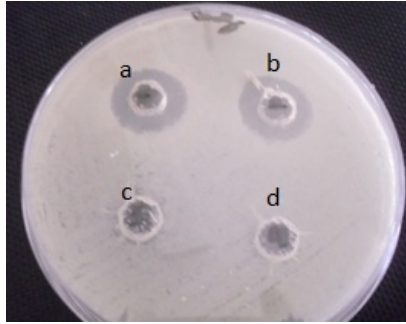
Les résultats donnés par les solutions tampon à différentes valeur de pH montrent que les zones d'inhibition obtenue ne sont pas dues à la sensibilité du germe cible aux variationsde pH, mais à des substances antifongiques contenues dans les fractions testées.



## VI.2 Effets des enzymes

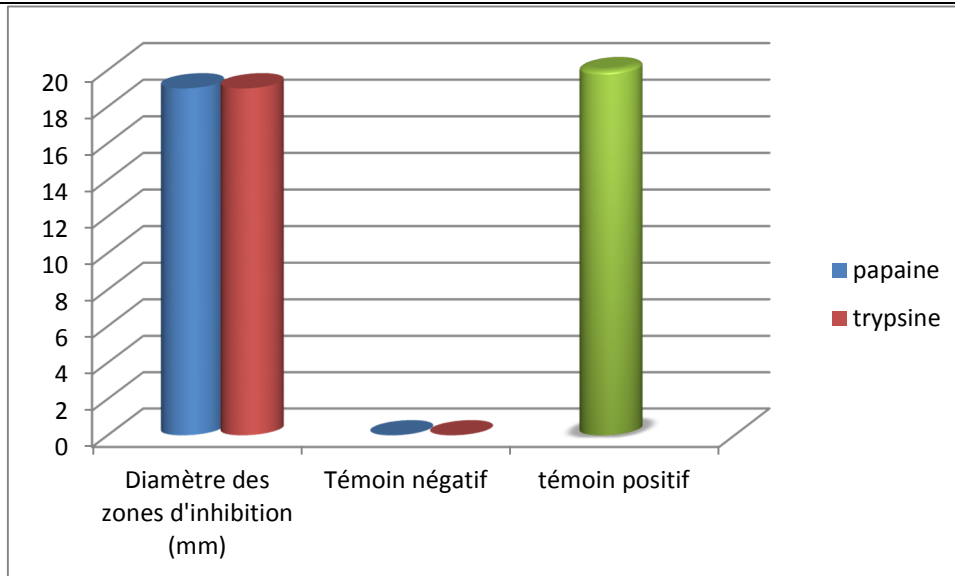
A près 24 h d'incubation, des zones d'inhibition de 19 mm sont révélées autour des puits contenant la fraction active traitée par les enzymes protéolytiques, cependant aucune zone d'inhibition n'est détectée autour des puits contenant les solutions enzymatiques seules (témoin négatif) (fig. 13). Une légère différence de diamètres des zones d'inhibition est observée entre la fraction active traitée et le témoin positif (20 mm de diamètre) (Fig. 14). Ces résultats suggèrent que les substances antifongiques produites par la souche STA10 sont résistantes à l'effet protéolytique de la papaïne et de la trypsine, ce qui signifie qu'elles ne sont pas, du tout, de nature protéique ou bien elles sont insensibles à ces deux enzymes protéolytiques. (Figure. 12).

Ces résultats ne permettent pas de déterminer la nature des substances antifongiques produites par la souche STA10. En effet, plusieurs travaux effectués sur des substances antimicrobiennes de nature protéique ont montré que ces substances purifiées sont insensibles partiellement ou totalement à l'effet des enzymes protéolytiques citées ci-dessus (Tiwari et Srivastava, 2008 ; Xie et al., 2009 ; Vamanu et Vamanu, 2019).



a:Papaïne, b:Trypsine, c:Témoin (papaïne), d:Témoin(Trypsine)

**Figure. 12 :** Effet des enzymes sur l'activité antifongique de la fraction purifiée par la chromatographie en phase inverse.



a : témoin, b: Papaïne, c: Trypsine, d: Témoin négatif 1, e: Témoin négatif 2

**Figure. 13 :** Effet des enzymes sur l'activité antifongique de la fraction purifiée par la chromatographie en phase inverse.

---

## *Conclusion*

---

Dans cette étude, une souche d'actinomycètes **STA 10** a montré sa capacité de produire des substances antifongique contre de *C. albicans* ; cette production a été réalisée sur milieu liquide M2.

Une purification partielle de ces substances antifongique a été réalisée par une chromatographie en phase inverse sur gel de silice C18.

Après la chromatographie, la seule fraction qui présente l'activité antifongique est celle de 0% d'acétonitrile.

Les résultats obtenus par les caractérisations physicochimiques des substances antifongiques, produite sur milieu liquide M<sub>2</sub>, a montré que ces substances sont influencées par des diverses conditions qui entoure le milieu de croissance de leur souche productrice tels que :

- L'effet du pH qui a été présenté par des réductions partielles et totales ;
- l'effet des enzymes (papaïne et pepsine) ; ou l'activité est partiellement réduite.

---

*Références  
bibliographiques*

---



Abede B , Feleke M, Berham A. (2013). Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soil in Gondai town,north west Ethiopia . Asian Pac J trop Dis. p 375-381.

Alapati K, peddikotla P , Muvvn V, Yenamandra V. (2010). Purification and biological evaluation of the metabolite produced by streptomyces sp. TK-VL-333. Research in Microbiology. p 335-345.

Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabou N. (2005). Activité antifongique d'une souche D'actinomadura d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie médicale. p 211-219.

Benmansour W. , Boucherit-Otmani Z. , Boucherit K. . (2014). Dormance de *Candida albicans* ATCC10231 en présence d'amphotéricine B. Investigation au microscope électronique à balayage (MEB). Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology.

Beryl Z, Watson S. B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water : Myths,temets and turths . Water research. p1741-1753.

Boudjella H. (2007). Etude taxonomie et des propriétés antagonistes des streptosporangium des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de doctorat, institut national agronomique EL-Harrach(Alger).

Chacko V. S. S, Ernest D. (2002). A comparative study on selected marine actinomycetes from pulicat, muttukadu, and Ennore estuaries. Asian pacific journal of tropical biomedecine . p 1827-1834.

Chu .W.S., Magee B B et Magee P T. (1993). Construction of an sfil macroresrtiction map of the *Candida albicans* genome .J Bactériol. 175. p 6637-6651.

Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de doctorat. Spécialité : Science écologique, vétérinaires, agronomiques et bio ingénieries. 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. p 23-24.

Camargo N N, Souza M, M M O L F R C d Bomfim, Beretta A L R Z. (2013). In vitro efficacy of antiseptics to control *Candida albicans* present in the oral mucosa of apparently healthy patients. Journal of Dental and Medical Sciences. 8. p 41-45.

Danikenloo V. N, Mironov V. A and Elizarov S M. (2005). Calcium as a regulator of intracellular process in Actinomycetes : A review. App.Biochem. Microbiol. 41(4), 319-329.

Dinishi J, Dennis P. (2008). Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi applied Soil ecology. p 109-118.

Dirceu M, Reginaldo D. R, Alan W V P J, Souza T. (2008). Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of moniliophthora (ex crinipellis) permiciosa by phyloplane actinomycetes. Biological control. p 309-314.

Divya P, Nawani N. N. (2014). A rapid and improved technique for scanning electron microscopy of actinomycetes. Journal of Microbiological Methods. p 54-57.

Garrity G. M, Lilburn T. G, Cole J. R, Harrison S. H, Euzéby J, and Tindall B.J. (2007). Taxonomie outline of the Bacteria and Archeae. p 399-539.

Graser Y, Volovsek M, Arrington T, Schonian G, Presber W, Mitchell T.G. E. T, Vilgalys R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. Proc Natl Acad Sci USA. p 12473-12477.

Iniesta A, Baptista C, Guinard D, Legré R, Goy A. (2013). Mycétome actino-mycosique du Pied, à propos d'un cas. Annales de chirurgie plastique esthétique, XXX,XXX-XXX .

Khan M. R, William S. T. (1975). Studies on the ecology of actinomycetes in soil-VIII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. Soil Biol. Biochem. Vol .7.p345-348.

Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystème extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de doctorat de microbiologie appliquée. Université Mentouri –Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Constantine. 176P.

Lagane C. (2007). Rôle de l'il-13 et des ligands de ppar-& dans la réponse anti-infectieuse des Macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de ppar-&. Thèse de doctorat de l'Université Toulouse III-Paul Sbatier.

Loqman S. (2009). La lutte Biologique contre la parriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols Rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de doctorat des sciences exactes et biologie. Université de Reims Champagne-Ardenne. Faculté des sciences exactes et naturelles. Ardenne .216P.

Loucif K. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de doctorat. Microbiologie appliquée et biotechnologie microbienne. Université mentouri-constantine faculté des sciences de la nature et de la vie département de biochimie et de microbiologie.139 P.

Maridhas V. A, Veeranuthu D, Savarimuthu I. (2013). Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine streptomyces sp. AP-123 and its cytotoxic effect. Chemosphere. p 479-487.

Ramesh S, William A. (2012).Marine actinomycetes : An ongoing source of novel Bioactive metabolites. Microbiological research. 167, p 571-580.

Sanchez C. (2007). Nature reviews Microbiology. p214-224.

Semedo L. T. A. S, Linhares A. A. G. R. C, Manfio G. P, Alviano C. S , Linharas L. F, Goelho R. R. R. (2001). Isolation and characterisation of actinomycetes from Brazilian tropical soil. Microbiol.Res.155, 291-299.

Sergey B, Zotchere. (2012). Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. Journal of Biotechnology. p168-175.

Smriti S, Pramod K, Gopalan N, Bhuvnesh S, Kuhad RC, Hotam S C. (2012). Isolation and partial characterisation of actinomycetes with antimicrobial activité against multidrug resistant bacteria. Asian pacific journal of tropical biomedecine .S1147-S1150.

Szpirglas H, Ben Slama L. (1999). Pathologie de la muqueuse buccale. Paris : Ed Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, 308.

Tamain M, Samou F, Guieze R, Trouillier S. (2013). Actinomycose et lymphome du malt gastrique de découverte simultanée : A propos d'un cas et étude de la littérature. La revue de Médecine interne. p 85- 86.

Thukar D, Yadav A, Gogi B. K, and Bora T. S. (2007). Isolation and screening streptomycetes in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. J. Med.Microbiol. p 242-249.

Tiwari S. K et Srivastava S. (2008). Purification and characterisation of plantaricin LR14 : a novel bacteriocin produced by *lactobacillus plantarum* LR114 .Appl.Microbiol .p 759-767.

Valli S, Suvathi S S, Aysha O. S, Nirmalla P, Vinoth K P , Reena A. (2012). Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. Asian pacific journal of tropical biomedicine. p 469 -473.

Vamanu E, et Vamanu A. (2010). The influence of probiotics on bacteriocin synthesis using the strain *lactobacillus paracasei* CMGB16. Afr. J. Microbiol. Res. 4(7):p534-537.

Valanarasu M. , Kannan P. , Ezhilvendan S. , Ganesan G. , Ignacimuthu S. .P. (2010). Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology. p 290–297.

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

Yedir O, Mustapha B, Chantal F. (2001). Actinomycetes of maroccan habitats: Isolation and screening of antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.*37, 69-74.

---

# *Annexes*

---

**Annexe I : Les milieux de culture :****Tableau I : Milieu MEM (pH7.5)**

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

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

**Tableau II : Milieu M2 (pH7.2)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g/l)</b>
<b>Amidon</b>	<b>10</b>
<b>KNO3</b>	<b>2</b>
<b>K2HPO4</b>	<b>2</b>
<b>Na Cl</b>	<b>2</b>
<b>Caséine</b>	<b>0.3</b>
<b>MgSO4, 7H2O</b>	<b>0.05</b>
<b>CaCO3</b>	<b>0.02</b>
<b>FeSO4, 7H2O</b>	<b>0.01</b>

**Tableau III : Bouillon nutritif (pH7.2)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g/l)</b>
<b>Peptone</b>	<b>10</b>
<b>Extrait de viande</b>	<b>5</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5</b>

**Tableau IV : Gélose Muller Hinton (pH7.3)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g/l)</b>
<b>Extrait de viande</b>	<b>3</b>
<b>Hydrolysate acide caséine</b>	<b>17.5</b>
<b>Amidon</b>	<b>1.5</b>
<b>Agar</b>	<b>16</b>



**Tableau V : Milieu BHIB (pH7.5)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g/l)</b>
<b>Infusion Cœur-cerveille/peptone de viande</b>	<b>12</b>
<b>Peptone de caséine</b>	<b>15</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>5</b>
<b>Dextrose</b>	<b>2</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5.5</b>
<b>Phosphate dipotassique</b>	<b>2.5</b>
<b>L-Cystéine</b>	<b>0.5</b>
<b>Hémine</b>	<b>0.005</b>
<b>Vitamine K</b>	<b>0.010</b>

Sang de mouton défibriné : 50 ml

## Annexe II : Les résultats des testes 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
<b>Zone</b>	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<b>Diamètre (mm)</b>	20	14	12	12	12	12	11	15	0

**Tableau VII :** Diamètres des zones d'inhibition pour les solutions tampon témoin

pH	T	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Zone</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Diamètre (mm)</b>	20	0	0	0	0	0	0	0	0

### Effet des enzymes

**Tableau VIII :** Diamètre des zones d'inhibition pour le surnageant du milieu liquide

Enzyme	papaïne	Trypsine
<b>Zone</b>	+	+
<b>Diamètre (mm)</b>	19	19

**Tableau IX :** Diamètre des zones d'inhibition pour les enzymes utilisées comme témoins

Enzyme	papaïne	Trypsine
<b>Zone</b>	-	-
<b>Diamètre (mm)</b>	0	0

## **Résumé :**

**Objectif :** Etude de l'activité antifongique des substances produites par une souche d'actinomycète **STA<sub>10</sub>** et une caractérisation physicochimique de ces substances après semi-purification par la technique de chromatographie en phase inverse.

**Matériel et méthodes :** La souche **STA<sub>10</sub>** a été cultivée sur milieu **M<sub>2</sub>** liquide, la mise en évidence de l'activité antifongique des substances a été réalisée par la technique des puits à l'égard de *Candida albicans*. La semi-purification a été réalisée par chromatographie en phase inverse sur gel de silice **C18**. La caractérisation physicochimique de ces substances a été effectuée à différents pH et des enzymes protéolytiques.

**Résultats :** Les substances antifongiques produites par la souche **STA<sub>10</sub>** d'actinomycètes présentent une activité antifongique à l'égard de *Candida albicans*. Après la purification partielle seulement la fraction obtenue à 0% d'acétonitrile présente une activité antifongique à l'égard de *C. albicans*. Les enzymes protéolytiques ne permettent pas de déduire sa nature protéique du fait que cette substance n'est pas sensible à ces enzymes.

**Mots clés :** Actinomycètes, *Candida albicans*, Activité antifongique, substances antifongiques, Purification, Chromatographie, Caractérisation.

## **Abstract:**

**Objective:** Study of antifungal activity of substances produced by a strain of actinomycete **STA<sub>10</sub>** and physicochemical characterization of these substances after semi-purification technique of reverse phase chromatography.

**Materials and methods:** **STA<sub>10</sub>** The strain was grown on liquid medium **M<sub>2</sub>**, the formatting of the antifungal activity evidences substances was performed by the technique of the wells with respect to *Candida albicans*. The semi-purification was accomplished by reverse phase chromatography on **C18** silica gel. The physicochemical characterization of these substances has been carried out at different pH and proteolytic enzymes.

**Results:** The antifungal substances produced by actinomycetes strain **STA<sub>10</sub>** exhibit antifungal activity against *Candida albicans*. After partially purifying the fraction obtained only at 0% acetonitrile shows antifungal activity against *C. albicans*. Proteolytic enzymes do not allow to deduce its protein made nature of this substance is not sensitive to these enzymes.

**Keywords:** Actinomycetes, *Candida albicans*, antifungal activity, antifungal substances, purification, chromatography, characterization.