

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Béjaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
DEPARTEMENT MICROBIOLOGIE

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Appliquée au Génie Biologique

Option : Microorganismes d'intérêts industriels

Thème

**Essai de purification de substances
antimicrobiennes
produites par une souche de *Streptomyces sp.***

Présenté par M^{lles} : **ACHOUR Karima** et **KAOUBA Rima**

Membres du Jury:

Président: **M^r KECHA. M**

Examinatrices: **M^{me} BOUDERIES. S**

M^{me} IDRES. N

Promoteur: **M^r BENDJEDDOU. K**

2011/2012

Remerciements

Tout d'abord, on remercie Dieu, le Généreux qui nous a donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.

On a le grand honneur de formuler notre gratitude et profonde reconnaissance à l'égard de Monsieur BENDJEDDOU ; notre promoteur, qui a dirigé notre travail et nous a guidé tout au long de sa réalisation. Son sens des valeurs humaines et son esprit scientifique nous ont conduit à la réussite de ce travail. On vous en est très reconnaissantes.

On tient à exprimer nos vifs remerciements aux membres du jury:

Mr 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^{me} SOUAGUI et M^{me} IDRES qui ont bien voulu examiner ce travail et participer au jury. Qu'elles trouvent ici l'assurance de toute notre reconnaissance.

On tient à remercier également tous les gens qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail. Il nous est agréable de leur exprimer notre reconnaissance et notre profond respect.

Merci ; Karima et Rima

Dédicaces

À ma maman

À mon papa

Et à tous ceux qui me sont chers ;

Franky, Eva, chwi, mimo, djim, tantoun, rex

Kaly

Dédicaces

*C'est avec un grand plaisir que je remercie à travers
se travail toute les personnes qui m'ont aidé de près
ou de loin, qui m'ont encouragé et inciter à réaliser
se travail.*

A la mémoire de ma tante DJIDA

*A mes très chers parents qui M'ont toujours
aidé et soutenu durant tout mon parcours et aux
quels je souhaiterais santé et bonheur ;*

A ma chère sœur Hafida et mon frère aalilou

A toute ma famille ;

A ma chère amie narimane et tous mes amis ;

Mon binôme Karima et toute sa famille.

Ryma

Liste des abréviations

- **UFC/ml** : **U**nité **F**ormant **C**olonies par **M**illilitre
- **ADN** : **A**cide **D**ésoxyribonucléique
- **HPLC**: **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography
- **UV** : **U**ltraviolet
- **MEM** : **M**incer- **E**au de **M**er
- **BHIB**: **B**rain and **H**eart **I**nfusion **B**roth
- **BSA** : **B**ovine **S**erum **A**lbumin

Liste des figures

Figure 1 : Pourcentage des antibiotiques produits par les différents genres d'actinomycètes.....	5
Figure 2 : Cycle biologique d'un Streptomycète.....	7
Figure 3 : Chromatographie sur colonne.....	13
Figure 4 : Concentration sous vide du surnageant de la souche d'actinomycète STA ₁₀	17
Figure 5 : Montage de la chromatographie effectuée sur gel de C18 de type Discovry DSC-18 (supelco 10g-60 ml, USA).....	19
Figure 6: Extraction de substances antimicrobiennes de la souche STA ₁₀ par macération.....	21
Figure 7: Purification partielle des substances antimicrobiennes produites par la souche STA ₁₀	22
Figure 8 : Culture de la souche STA ₁₀ sur milieu MEM solide	24
Figure 9 : les activités de la culture STA ₁₀ à l'égard de <i>Candida albicans</i> (huitième jour d'incubation).....	25
Figure 10 : les activités de la culture STA ₁₀ à l'égard de <i>Candida albicans</i> (dixième jour d'incubation).....	25
Figure 11 : les activités des substances antifongiques produites par la culture STA ₁₀ extraites par macération dans l'eau vis-à-vis <i>Candida albicans</i>	27
Figure 12: les activités des substances antibactériennes produites par la culture STA ₁₀ extraites par macération dans l'eau vis-à-vis <i>Bacillus subtilis</i>	27
Figure. 13: les activités des substances antimicrobiennes produites par la souche STA ₁₀ à l'égard des souches <i>Candida albicans</i> et <i>Bacillus subtilis</i>	28
Figure 14: les activités antimicrobiennes des fractions: solution nettoyage, 10%, et 20% d'acétonitrile.....	29
Figure 15 : Les activités des substances antimicrobiennes contenues dans les fractions obtenues après chromatographie en phase inverse à l'égard de <i>Candida albicans</i> et <i>Bacillus subtilis</i>	30

Liste des tableaux

Tableau I : Les familles d'antibiotiques produits par les actinomycètes.....9

Tableau II : Préparation d'un gradient croissant d'acétonitrile dans la solution de TFA à 0,05%.....20

Tableau III : Absorbances enregistrées de toutes les fractions obtenues après chromatographie en phase inverse.....32

Tableau IV : Concentrations des protéines de toutes les fractions obtenues après chromatographie en phase inverse.....33

Tableau V : Pourcentage de pureté des fractions obtenues après chromatographie en phase inverse qui présente une activité antimicrobienne.....34

Sommaire

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les actinomycètes ; biologie, taxonomie, écologie et importance

1. Biologie et taxonomie des actinomycètes.....	2
2. Ecologie des actinomycètes.....	3
3. Importance des actinomycètes.....	4
3.1. Importance dans le domaine industriel.....	5
3.1.1. Production d'antibiotiques.....	5
3.1.2. Production d'autres substances.....	6
3.1.3. Autres rôles.....	6
3.2. Importance dans le domaine agronomique.....	6

Chapitre II : Métabolisme secondaire des actinomycètes

1. Cycle biologique des actinomycètes.....	7
2. Métabolisme général.....	8
2.1. Le métabolisme primaire.....	8
2.2. Le métabolisme secondaire.....	8
2.2.1. Les antibactériens et les antifongiques.....	8
2.2.2. Les antibiotiques.....	8
2.2.3. Les enzymes.....	10
2.2.4. Autres métabolites.....	11

Chapitre III : Techniques de purification des antibiotiques

1. Chromatographie sur couche mince.....	12
2. Chromatographie sur colonne.....	14
2.1. Chromatographie en phase normale.....	14
2.2. Chromatographie en phase inverse.....	15

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Origines des souches utilisées.....	17
2. Revivification des souches.....	17
3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	17
4. Production de substances antimicrobiennes.....	18
4.1. Culture sur milieu liquide.....	19
4.2. Culture sur milieu solide.....	19
5. Purification partielle des substances antimicrobiennes.....	20
5.1. Préparation de la colonne.....	21
5.2. Chromatographie liquide sur colonne C ₁₈	22
5.3. Dosage des protéines des fractions.....	25

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Revivification des souches.....	26
2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche STA ₁₀	26
3. Production de substances antimicrobiennes.....	28
3.1. Culture sur milieu liquide.....	28
3.2. Culture sur milieu solide.....	28
4. Purification partielle des substances antimicrobiennes.....	31
4.1. Chromatographie en phase inverse.....	31
4.2. Dosage des protéines pour chaque fraction (méthode de Bradford).....	32

Conclusion.....37

Références bibliographiques

Annexes

Annexe I : Résultat expérimental

Annexe II : Milieu de culture

Annexe III : Courbe d'étalonnage de la protéine BSA

Annexe IV : Polarités des solvants utilisés en HPLC

L'utilisation intensive des antibiotiques d'un coté a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces substances, ce qui a provoqué la prolifération des souches pathogènes multi résistantes, en particulier dans les environnements hospitaliers, et l'apparition de nouvelles maladies infectieuses dangereuses, d'un autre coté l'invasion et l'émergence des infections fongiques tel que aspergillose et candidose (**Abou-Elela et al., 2005**). Cette situation a nécessité la recherche de nouvelles molécules antibactériennes et antifongiques (**Boughachiche et al., 2005; Vijayakumar et al., 2007**).

La recherche actuelle s'oriente vers l'isolement de souches à partir d'écosystèmes particuliers et dans des milieux hostiles non exploités auparavant (**Lam, 2006**). Ainsi, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre utilisant des genres rares ou peu fréquents provenant de milieux extrêmes, dans le but de la recherche de nouvelles molécules bioactives et d'obtenir une meilleure utilisation d'antibactériens et antifongiques plus efficaces (**Moncheva et al., 2002; Strub et al., 2008**).

Les antibiotiques naturels sont produits en majorité par les actinomycètes (**Nolan et Cross, 1988**), particulièrement par le genre *Streptomyces* qui en secrète plus de 80% (**Watve et al., 2001**). Ces bactéries sont aussi utilisées dans de nombreux processus biotechnologiques pour la production de diverses molécules bioactives (**Boudjella, 2007**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui consiste en l'essai d'une purification partielle de substances antimicrobiennes produites par une souche d'actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces*.

1. Biologie et taxonomie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, ayant un pourcentage en GC% élevé (>55%) (**AbouI-Enein et al., 2000**). Ils possèdent une paroi caractéristique des procaryotes et une morphologie fongique (**Colombié, 2005 et Pizzul, 2006**). Ils sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (**Larpen et Sanglier, 1989**). La grande majorité est d'origine tellurique (10^6 UFC d'actinomycètes par 1g de sol) (**Chen et al., 2005 ; Badji, 2006**).

Les actinomycètes sont généralement des saprophytes, mais quelques uns peuvent être pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes tels que *Actinomyces bovis* et *Streptomyces scabies* (**Peltola et al., 2001**), ils peuvent également être des symbiotes de plantes ou d'animaux (**Bhathena et al., 2002**).

Les actinomycètes sont généralement des hétérotrophes, neutrophiles, aérobies /anaérobies facultatifs ou microaérophiles, mésophiles ou thermophiles (**Tracy et al., 2002 ; Badji, 2006**).

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

Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète en 1875. En 1878, Harz, nomma *Actinomyces bovis*, un organisme parasite rencontré dans une infection de la mâchoire d'un bovin. Depuis, les actinomycètes ont été isolés des sols, des eaux et presque de tous les habitats où la vie est possible (**Garrity et al., 2007**).

Actuellement et d'après (**Garrity et al., 2007**), le phylum *Actinobacteria* renferme une seule classe : *Actinobacteria* qui est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre, 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces.

Au fil des années, la taxonomie des actinomycètes a subi plusieurs modifications dues à l'application de nouvelles techniques chimiques, biochimiques, génétiques, numériques et de biologie moléculaire (**Abbas, 2006**).

Cette évolution fut marquée par quatre périodes essentielles dont chacune a apporté de nouveaux critères de classification :

- La première période s'est étendue jusqu'au début des années 60 (**Zitouni, 2005**). Elle s'est appuyée uniquement sur les critères macro et micromorphologiques pour distinguer les différents genres entre eux.
- La seconde période a débuté à partir des années 60, elle s'est fondée sur une combinaison entre les critères morphologiques et la chimiotaxonomie basée sur l'analyse des constituants cellulaires tels que les sucres cellulaires, les acides aminés et les lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques (**Minnikin et al., 1977**). Cette période fut d'un apport essentiel dans la différenciation de nouveaux genres.
- La troisième période qui a débuté dans les années 70 s'est posée sur la taxonomie numérique, elle combine l'outil informatique utilisant des logiciels appropriés aux tests physiologiques (**Grund et Kkroppenstedt, 1990**).
- La quatrième période a débuté durant les années 80 faisant intervenir des méthodes d'analyse génétiques et moléculaires en utilisant plusieurs techniques telles que L'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (GC%) et le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et 23S.

2. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont universellement répandus, ce sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (**Rifaat, 2003**). Ils forment une grande partie de la population microbienne du sol, particulièrement dans les conditions alcalines et sèches (**Oskay et al., 2004 ; Taddei et al., 2006**).

Ainsi, leur densité est de l'ordre de 10^6 à 10^7 UFC par gramme de sol sec, soit 10 à 20% de la microflore tellurique totale ; la niche écologique la plus intensivement exploitée (**Zitouni, 2005**) et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eaux, fourrage, fumier, grains, débris végétaux, litières,...etc) (**Mellouli et al., 2003**). Ils sont constamment présents dans les sols polaires gelés, les sols désertiques chauds et secs, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds ou le pétrole, les lacs extrêmement alcalins et salés et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (**Khatabi et al., 2002**). En revanche, ils semblent être absents dans les eaux minières très acides (pH <1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (**Lechevalier, 1981**). Les actinomycètes sont largement répandus dans les étendues d'eau très variées, où ils jouent un grand rôle dans le cycle du carbone, dû à leur capacité de croître à de faibles concentrations en substances carbonées et à la dégradation des matières organiques complexes (**Rifaat, 2003**).

3. Importance des actinomycètes

Les actinomycètes éveillent un grand intérêt dans diverses applications. Ils incitent beaucoup de spécialistes à les isoler et à les produire industriellement afin d'obtenir de nouvelles substances.

Chaque souche d'actinomycètes possède probablement le potentiel génétique pour produire de 10 à 20 métabolites secondaires (**Valan Arasu et al., 2009**), de toutes ces substances, les antibiotiques disposent d'une importance aussi bien thérapeutique que commerciale (**Ouhdouch et al., 2001 ; Saadoun et Gharaibeh, 2003**).

3.1. Importance dans le domaine industriel

3.1.1. Production d'antibiotiques

Les actinomycètes ont la particularité de produire des antibiotiques, environ 70% des molécules d'origine naturelle. Depuis la découverte de la streptomycine par Waksman en 1943, des centaines d'antibiotiques ont été isolés tels que la novobiocine et la nystatine (Okami et Hotta, 1988).

La production d'antibiotiques chez les autres genres fait intervenir surtout *Micromonospora* et *Nocardia*, également des genres moins fréquents, tels que *Actinomadura* et *Actinoplanes*, ou encore rares, tels que *Saccharothrix* et *Nocardiosis*.

Un nombre appréciable d'antibiotiques, de structure chimique très diversifiée, a trouvé une application en thérapeutique humaine et vétérinaire.

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

Les antibiotiques sont produits à la phase de transition entre le développement végétatif et le développement du mycélium aérien où la croissance est ralenti à cause de l'épuisement des éléments nutritifs (Charin *et al.*, 2002).

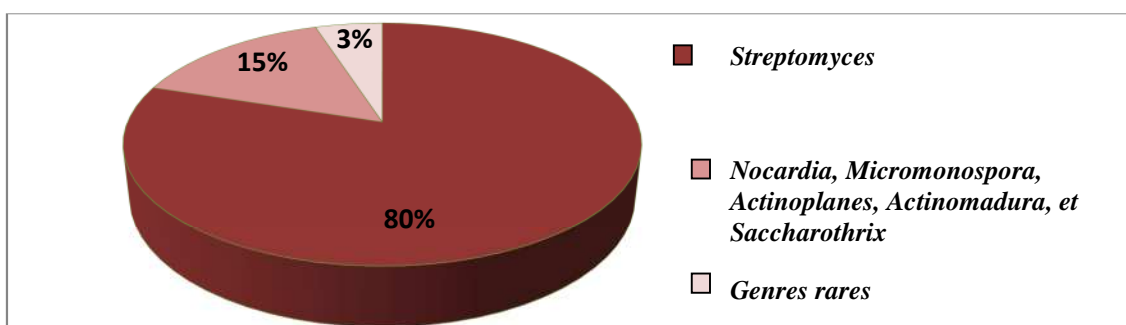


Fig.1 : Pourcentage des antibiotiques produits par les différents genres d'actinomycètes (Okami et Hotta, 1988)

3.1.2. Production d'autres substances

Ces bactéries sont également capables à produire des enzymes telles que la D-xylose isomérase et la cholestérol oxydase, des vitamines, d'immunostimulants, d'immunosuppresseurs, des antihistaminiques, d'anticancéreux, d'antiallergènes, d'antiparasitaires, d'insecticides et d'herbicides (Moreira, 2002 ; Eder *et al.*, 2002).

3.1.3. Autres rôles

Les actinomycètes interviennent dans le processus de biodégradation durant le traitement biologique où ils ont la propriété de s'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire (El-Shatoury *et al.*, 2004).

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

3.2. Importance dans le domaine agronomique

Les actinomycètes produisent une large variété d'hydrolases extracellulaires qui contribuent à la dégradation de polymères complexes tels que la lignocellulose, l'hémicellulose, la lignine et la chitine (Pizzul, 2006 et Vijayakumar *et al.*, 2007), ce qui leur confèrent un rôle dans la décomposition et le recyclage de la matière organique dans le sol. Ils jouent ainsi un rôle dans la fertilité des sols (Valois, 1996).

Les actinomycètes ont une grande aptitude à produire de différentes substances inhibitrices vis-à-vis d'autres microorganismes telluriques nocifs. Ils interviennent ainsi dans la lutte biologique contre certains agents phytopathogènes du sol provoquant des maladies aux plantes (Goodfellow et Williams, 1983).

Les interactions actinomycètes-plantes ont fait l'objet d'études étendues. Certains, tel que le genre *Frankia* sont connus pour leur rôle dans la fixation d'azote atmosphérique en symbiose au niveau des nodules racinaires de certains arbres et légumineuses (Valois, 1996).

1. Cycle biologique des actinomycètes

Le cycle de développement des actinomycètes est très complexe sur milieu solide (Sanchez, 2007). En effet, lorsque les spores (organes de reproduction) trouvent les conditions favorables et les éléments nutritifs ; elles germent et donnent naissance à un mycélium primaire (mycélium de substrat) formé d'hyphes non septés, plurinuclés, 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 uninuclées qui sont des agents de dissémination.

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire (Colombié, 2005). La figure 2 résume les étapes du cycle de développement d'un *Streptomyces*.

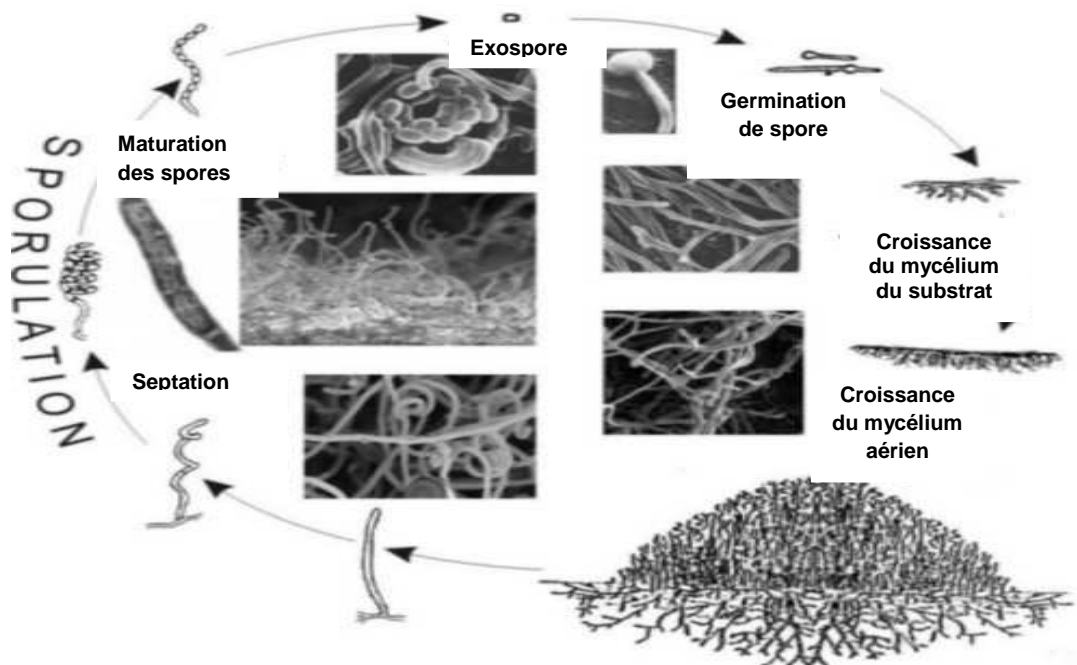


Fig.2 : Cycle biologique d'un *Streptomyces* (Jakimowicz, 2007)

2. Métabolisme général

Les actinomycètes sont capables de se développer sur divers substrats et ils sont aptes à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs (**Imada, 2004**).

2.1. Le métabolisme primaire

Il est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires interviennent dans la formation de la structure cellulaire et permettent le progrès du métabolisme général (**Theilleux, 1993**).

2.2. Le métabolisme secondaire

Il est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse des composés qui n'ont pas de fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (**Colombié, 2005**). Il se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (**Challis et Hopwood, 2003**).

2.2.1. Les antibactériens et les antifongiques

Plusieurs molécules antibactériennes ont été isolées à partir des actinomycètes telles que la Gentamycine produite par le genre *Micromonospora* (**Reiblein et al., 1973**) et la Cifamycine produite par *Streptomyces sp.* (**Stapiey et al., 1972**).

Les antifongiques sont en nombre restreint, ils représentent 20% des molécules produites par les actinomycètes. On distingue 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**).

2.2.2. antibiotiques

Des antibiotiques en nombres de 7000 molécules sont produits par des actinomycètes. Ces antibiotiques sont répartis dans neuf grandes familles chimiques (**tableau I**).

Tableau I : Les familles d'antibiotiques produits par les actinomycètes (Berday et al., 1987)

Familles d'antibiotiques	Exemples d'antibiotiques
Antibiotiques contenant des glucides	Nojirimycines, Streptomycine, Gentamycine, Kanamycine, Vancomycine, Risotocétine
Lactones macrocycliques	Erytromycine, Spiramycines, Nystatines, Amphotéricine, Maytansines
Quinones et antibiotiques apparentés	Tétracyclines, Anthracyclines, Rubomycine, Mitomycine, Saframycine
Acides aminés et peptides	Pénicéline, Cyclosérines, Bacitracine, Valinomycine, Polymyxines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	Mildiomycine , Phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	Monensine
Antibiotiques aromatiques	Chloramphicol, Griséofulvine, Novobiocine
Antibiotiques alicycliques	Cycloheximide, Acide marasmique, Acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	Elaiomycine, Cérulénine, Fosfomycine

2.2.3. Les enzymes

Les enzymes sont les produits industriels les plus importants après les antibiotiques. En effet, les actinomycètes sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que les cellulases et les xylanases utilisées dans le traitement des sous-produits, les protéases, les chitinases, les lipases et les amylases (**Rawashed et al., 2005**).

Nous citerons ici quelques exemples les plus connus ;

Actinoplanes missouriensis et plusieurs espèces de *Streptomyces* produisent la glucose isomérase utilisée pour obtenir des sirops riches en D-fructose.

Streptomyces hydroscopicus et *Streptomyces praecox* produisent un complexe amylasique exploité pour préparer des sirops riches en maltose.

Streptomyces griseus produit des protéases telle que la pronase sous forme libre ou immobilisée employée dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et comme additifs dans les détergents.

2.2.4. Autres métabolites

D'autres métabolites sont produits par les actinomycètes ;

Les insecticides microbiens sont devenus le produit principal de l'industrie des biopesticides. Plusieurs actinomycètes marins et terrestres sont aptes à les produire (**Shi, 2000 ; Xiong et al., 2004**).

Un grand nombre d'antitumoraux ont été isolés à partir des Streptomycètes tels que la daunorubicine et la doxorubicine (**Beehal, 2000**). Ils représentent 5% d'agents anticancéreux les plus utilisés en clinique (**Abdelfattah, 2008**).

La mutamycine est un antibiotique produit par les actinomycètes, elle est douée d'activité antivirale (**Raty et al., 2002**).

Il existe de nombreuses techniques utilisées dans le but de purifier les antibiotiques. Elles varient selon les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées.

Une première étape d'extraction des produits actifs du filtrat de culture est réalisée par des solvants organiques de polarités différentes. L'extrait brut est traité en chromatographie soit:

- sur papier ou sur couche mince (CCM).
- sur colonne à basse pression et / ou encore à haute pression (HPLC).

1. Chromatographie sur couche mince

La CCM est une technique utilisée autant pour séparer des composés polaires que non polaires dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative). Le phénomène d'adsorption est prépondérant mais il y a également partage si le solvant est un mélange.

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire appliquée en une couche mince d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant fixée sur une plaque de verre (**Kamoun, 1997**).

Le système d'élution est l'un des solvants suivants :

- n-butanol-acide acétique-eau (B.A.E) (60: 20: 20) (v/v/v)
- Acétate d'éthyle-méthanol (A.M) (100:15) (v/v)
- Ethanol-ammoniaque-eau (E.A.E) (80: 10: 10), (90:5:5), (60:20:20), (40:30:30)
- Acétonitrile-eau (A.N.E) (30: 70) et (50: 50) (v/v)

La plaque sur laquelle on dépose l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire par capillarité entraînant chaque composant de l'échantillon qui se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant.

Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. A la fin, la plaque est retirée de la cuve et le solvant est évaporé (**Kamoun, 1997**).

Une fois sèches, les plaques sont observées sous une lumière UV afin de localiser les tâches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 366 nm ((**Kamoun, 1997**)). On utilise cette méthode de détection en priorité car elle n'endommage pas la plaque.

2. Chromatographie sur colonne

2.1. Chromatographie en phase normale

Il s'agit d'une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases :

- la phase stationnaire formant le support solide; la silice (SiO_2), l'adsorbant le plus souvent utilisé. La granulométrie des grains sera typiquement comprise entre 50 et 200 μm .
- la phase mobile ou le solvant qui est en général un mélange de deux solvants : l'un est fortement polaire et l'autre faiblement moins polaire.

Le remplissage de la colonne est l'étape clé pour une bonne séparation, mais également, la plus délicate. Il doit être le plus homogène possible et il faut éviter les bulles d'air.

Les colonnes en phase normale, sont des colonnes dont la phase stationnaire est très polaire (la phase mobile est alors généralement peu polaire), les substances sont alors éluées en sens inverse de leur polarité. Les composants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement, les solutés polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Au cours de la séparation et après avoir récupéré les produits apolaires, on réalise un gradient d'éluion en faisant augmenter progressivement la polarité de l'éluant afin de récupérer les produits les plus polaires.

A la fin, les fractions récupérées seront analysées par CCM et celles ayant la même composition seront rassemblées (**Badji, 2006**). (fig.4)



Filtre

Filtre

Fig . 3 : Chromatographie sur colonne

2.2. Chromatographie en phase inverse

La chromatographie en phase inverse est la plus utilisée pour purifier les antibiotiques, notamment ceux extraits par des solvants organiques à polarité faible ou moyenne (**Lamari, 2006**).

C'est une technique de séparation en fonction de l'hydrophobicité des substances. Elle peut être utilisée pour des fins préparatives ou analytiques. L'échantillon à analyser est entraîné par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie, pour permettre une meilleure séparation.

Cependant, le débit d'écoulement de la phase mobile est faible, ce qui nécessite une augmentation de la pression du système. Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles à l'eau et de divers solvants organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane, ...etc).

La phase mobile polaire la plus utilisée est l'eau et le méthanol ou un mélange des deux. La composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit «gradient» ou «élution graduée». La phase stationnaire est peu polaire ou apolaire, les

principaux greffons utilisés comportant des fonctions de nature apolaire sont: Diméthylsilyl (C2), Octylsilyl (C8) et Octadécylsilyl (C18).

Lorsque l'équilibre entre la silice greffée et le soluté est établi, les constituants les moins polaires de la phase éluant s'adsorbent préférentiellement à la surface des chaînes hydrocarbonées.

Ainsi ; au début de l'élution, les composants polaires ou peu hydrophobes ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement, les solutés peu polaires ou très hydrophobes ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués tardivement.

En augmentant progressivement la concentration du solvant organique (moins polaire que l'eau), il se produit un décrochage progressif des constituants liés à la phase stationnaire. Les substances sont alors élues dans le sens de leur apolarité croissante (**Zitouni, 2005 ; Badji, 2006**).

1. Origines des souches utilisées

Dans le but d'un essai de purification partielle de substances antimicrobiennes produites par un actinomycète, une souche **STA₁₀** appartenant à ce groupe bactérien a fait l'objet de cette étude. Le choix de cette souche est basé sur des travaux antérieurs effectués au sein du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA) qui ont démontré que cette souche est douée d'activités antibactériennes et antifongiques. Cette souche est déjà identifiée comme étant une *Streptomyces sp.*

La souche **STA₁₀** est isolée à partir de la station d'épuration d'Aoukas à Béjaia. Elle est conservée à 4°C sur une gélose **MEM** inclinée.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne est réalisée avec deux germes cibles : *Candida albicans* qui est conservée à 4°C sur une gélose Sabouraud et *Bacillus subtilis* conservée à 4°C sur une gélose nutritive.

Ces souches font partie de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA) de l'université A. Mira de Béjaia.

2. Revivification des souches

La revivification de la souche **STA₁₀** est effectuée par des repiquages successifs sur milieu solide et liquide appropriés (**MEM**), ce qui permet la croissance et la production de substances antimicrobiennes. L'incubation est réalisée dans une étuve à 28°C pendant 7 jours.

Les souches cibles, *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* sont repiquées deux fois sur milieu **BHIB** et bouillon nutritif respectivement. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 h.

3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche **STA₁₀** est réalisée par la technique des cylindres d'agar.

Elle consiste en un ensemencement par stries serrées et croisées de la souche d'actinomycète et incubation à 28°C pendant 7 à 10 jours. Ensuite, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés par un embout stérile et déposés sur une gélose Muller Hinton. Préalablement ensemencée par écouvillonnage avec une culture fraîche du germe cible dilué à 1/10. (cette dilution correspond à 10^7 UFC/ml)

Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 2h pour ralentir la croissance des germes cibles et permettre une bonne diffusion des agents antimicrobiens, puis elles sont incubées à 37°C pendant 24 h.

L'activité antimicrobienne est révélée par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques d'agar. Des mesures des diamètres des zones d'inhibition sont effectuées et exprimées en millimètre.

4. La production de substances antimicrobiennes

Les actinomycètes sont connus par leur capacité de produire plusieurs substances, parmi ces dernières, on trouve les antibiotiques et les antifongiques qui sont produits soit sur milieu liquide ou solide.

4.1. Culture sur milieu liquide

a/ Pré-culture

Trois tubes de 9 ml du milieu **MEM** liquide sont ensemencés en utilisant une bonne charge d'une culture fraîche de la souche **STA₁₀**. Les tubes sont agités à l'aide d'un vortex puis incubés à 28°C pendant 7 à 10 jours.

Ces cultures vont servir de pré-cultures pour ensemencer les grands volumes.

b/ Culture

Trois flacons de 250 ml, contenant chacun 100 ml du milieu **MEM** liquide, sont ensemencés par les pré-cultures préparées puis incubés à 28°C pendant 10 jours. Par la suite, l'analyse de la culture est effectuée.

Le surnageant est récupéré et concentré sous vide cinq fois son volume initial en utilisant un évaporateur rotatif (**fig.5**). Les tests d'activité du surnageant brut et concentré sont effectués par la technique des puits. Ainsi; à l'aide d'un embout stérile, des puits d'un diamètre de 8 mm sont réalisés sur une gélose Muller Hinton ensemencée dans les mêmes conditions précédentes. Ensuite, une quantité de 100µl du surnageant brut ou concentré est déposée dans chaque puits. Les boîtes sont laissées à 4°C pour permettre une bonne diffusion de la substance antimicrobienne puis incubées à 37°C pendant 24h.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et exprimés en millimètre.

Fig.4 : Concentration sous vide du surnageant de la souche d'actinomycète **STA₁₀**

4.2. Culture sur milieu solide

Dix-huit boîtes de gélose **MEM** sont ensemencées en surface par des stries serrées avec la souche **STA₁₀** puis incubées à 28°C pendant 10 jours.

Après incubation, la culture de la souche productrice a subi deux macérations, une dans l'eau et une autre dans le n-butanol, afin de récupérer les substances antimicrobiennes.

a/ Extraction avec l'eau

Neuf boîtes de la culture **STA₁₀** d'un aspect mycélien très développé sont écrasées à l'aide d'une spatule stérile dans un bicher contenant 100 ml d'eau distillée. Puis, cette préparation est maintenue à 4°C pendant 4h afin de permettre la diffusion des substances antimicrobiennes. Ensuite, elle est centrifugée à 8000 g pendant 30 minutes à 4°C. Par la suite, le surnageant est concentré 10 fois son volume initial. Le test d'activité antibactérienne et antifongique du surnageant brut et concentré est réalisé par la technique des puits.

b/ Extraction avec le n-butanol

Les neuf boîtes qui restent de la culture **STA₁₀** sont macérées dans le n-butanol dans les mêmes conditions précédentes. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et a subi une évaporation sous vide afin d'éliminer le solvant organique. Le produit sec ainsi obtenu est récupéré dans 9 ml d'eau distillée et testé pour son activité antibactérienne et antifongique.

5. Purification partielle des substances antimicrobiennes

La purification partielle des substances antimicrobiennes produites par la souche d'actinomycète **STA₁₀** est une méthode d'extraction basée sur l'emploi de la chromatographie en phase inverse.

L'extraction est effectuée sur une colonne de gel de silice de C18 griffé à 18% de type Discovry DSC-18 (supelco 10g-60 ml, USA).

Fig. 5 : Montage de la chromatographie effectuée sur gel de C18 de type Discovry DSC-18 (supelco 10g-60 ml, USA)

5.1. Préparation de la colonne

Une solution de TFA (acide trifluoroacétique) à 0,05% est préparée en ajoutant 1 ml de TFA concentré à 2 L d'eau distillée. Le pH de la solution est vérifié, il ne doit pas être inférieur à 2 pour éviter la dégradation du gel de la colonne.

La colonne est nettoyée avec 120 ml d'acétonitrile puis équilibrée avec 120 ml de la solution TFA dans l'eau à 0,05%.

Des solutions de 120 ml contenant un gradient croissant et discontinu d'acétonitrile dans la solution de TFA à 0,05% sont préparées allant de 10 à 50%. (**Tableau II**)

Tableau II : Préparation d'un gradient croissant d'acétonitrile dans la solution TFA à 0,05%

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

5.2. Chromatographie liquide sur colonne C₁₈

Avant le dépôt de l'échantillon sur la colonne de chromatographie, il doit être mis dans les mêmes conditions d'équilibrage de la colonne. Pour ce faire, l'échantillon présentant l'activité antimicrobienne obtenu par macération dans l'eau est mélangé avec un volume équivalent de la solution de TFA dans l'eau à 0,05%.

L'échantillon équilibré et filtré en utilisant des membranes de 0.45µm de nitrocellulose, est passé à travers la colonne à un débit de 2 ml/min. Ensuite, la colonne est lavée avec 500 ml de solution TFA dans l'eau à 0,05% en utilisant le même débit.

L'élution est assurée par des solutions de volumes de 120 ml contenant un gradient de concentration discontinu d'acétonitrile allant de 10 % jusqu'à 50 %. En fin, la colonne est lavée avec 120 ml d'acétonitrile.

Les fractions obtenues sont évaporées sous vide pour éliminer les solvants organiques et reprises dans 1 ml d'eau distillée.

L'activité antimicrobienne de ces fractions est testée vis-à-vis *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* par la méthode des puits.

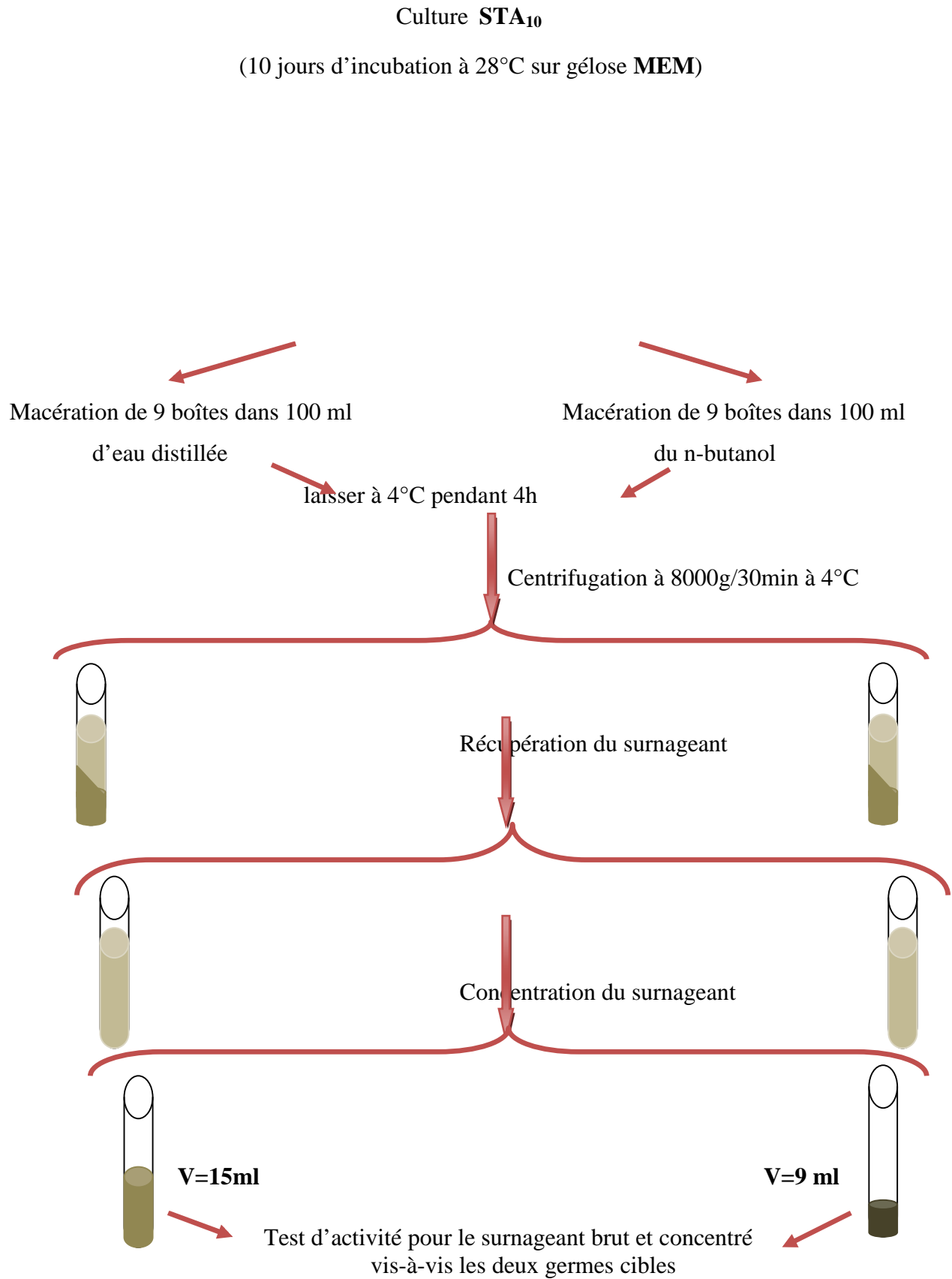


Fig.6 : Extraction de substances antimicrobiennes de la souche **STA₁₀** par macération

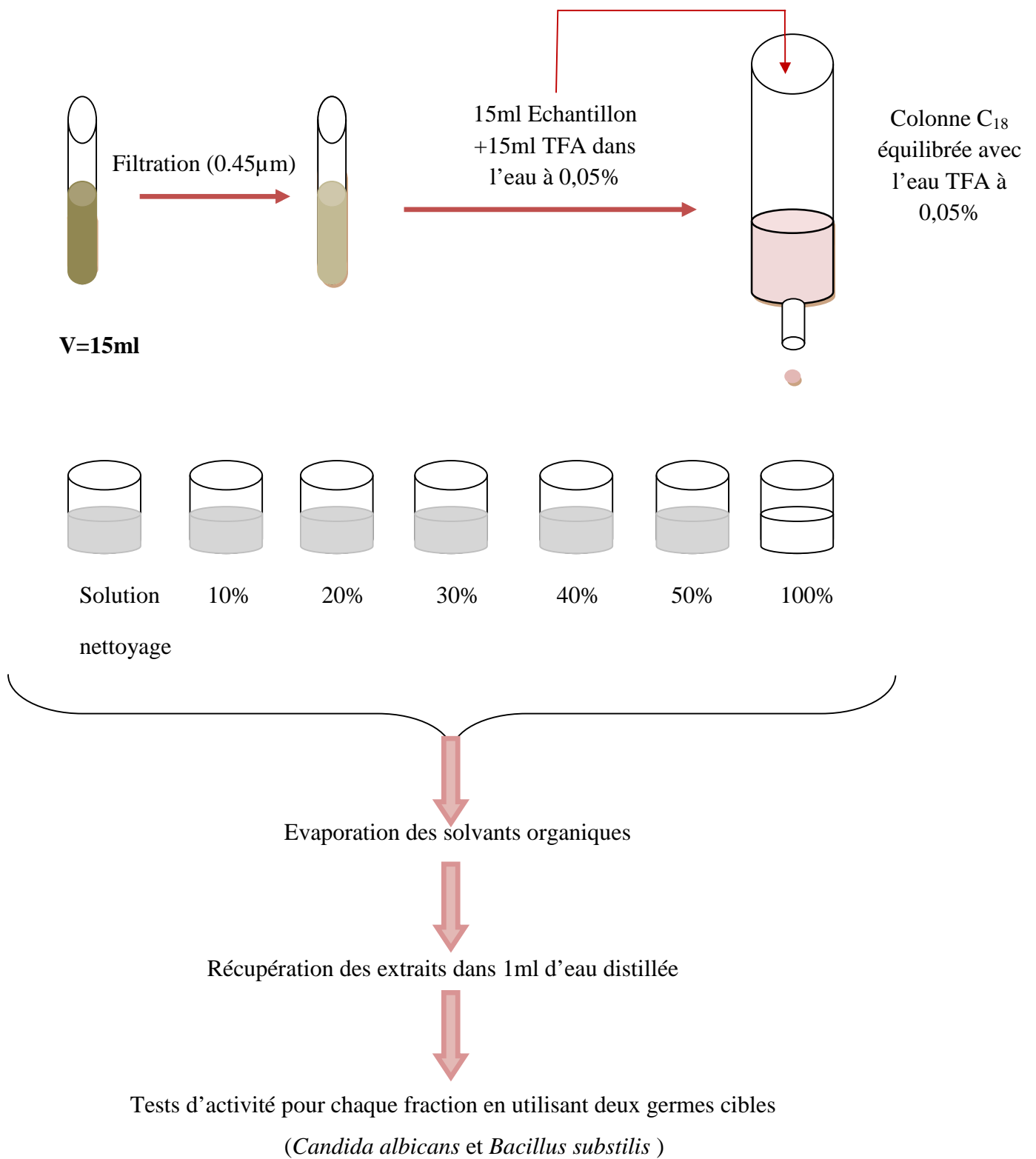


Fig.7 : Purification partielle des substances antimicrobiennes produites par la souche STA₁₀

5.3. Dosage des protéines des fractions

Les échantillons du surnageant brut, solution nettoyage et les fractions obtenues avec 10% jusqu'à 100% d'acétonitrile ont fait l'objet d'un dosage de protéines par la méthode de Bradford.

Cette méthode est un dosage spectrophotométrique basé sur la mesure de l'absorbance à 595 nm des échantillons mélangés avec le réactif de Bradford. Au fait, la présence de protéines se manifeste par le changement de la couleur du bleu de commassie après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines de l'échantillon à analyser.

100 µl de chaque échantillon est mélangé avec 900 µl d'eau distillée (dilution à 1/10), ensuite, un volume de 4 ml du réactif de Bradford est ajouté, puis le mélange est laissé pendant 20 minutes à l'obscurité. A la fin, des mesures de densité optique sont prises.

La détermination de la concentration en protéines est réalisée avec une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant des concentrations connues en BSA dosées dans les mêmes conditions.

Le calcul de quantités de protéines éliminées des fractions présentant une activité antimicrobienne est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Quantité de protéines éliminées (\%)} = 100 - \frac{\text{Quantité en protéines dans la fraction X}}{\text{Quantité de protéines totale (brut)}} \times 100$$

1. Revivification des souches

La croissance bactérienne de la souche **STA₁₀** est visible à partir du quatrième jour d'incubation sur milieu solide, cette croissance devient plus intense au bout du septième jour. Elle se manifeste par un bon développement mycélien avec un mycélium homogène et de couleur blanche (**Fig.8**).



Fig.8: Culture de la souche **STA₁₀** sur milieu **MEM** solide

Sur milieu liquide et après repiquages successifs, la souche **STA₁₀** montre une croissance moyenne. Des petites pelotes et d'un nombre restreint apparaissent au bout du dixième jour d'incubation.

2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche **STA₁₀**

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche **STA₁₀** est effectuée à l'égard de *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* par la méthode des disques d'agar. L'activité antifongique est détectable à partir du huitième jour d'incubation avec une zone d'inhibition de 24mm (**fig.9**). Cette activité est très bonne au bout du dixième jour avec un diamètre d'inhibition de 30mm (**fig.10**). Aucune activité antibactérienne n'est observée envers *Bacillus subtilis*.

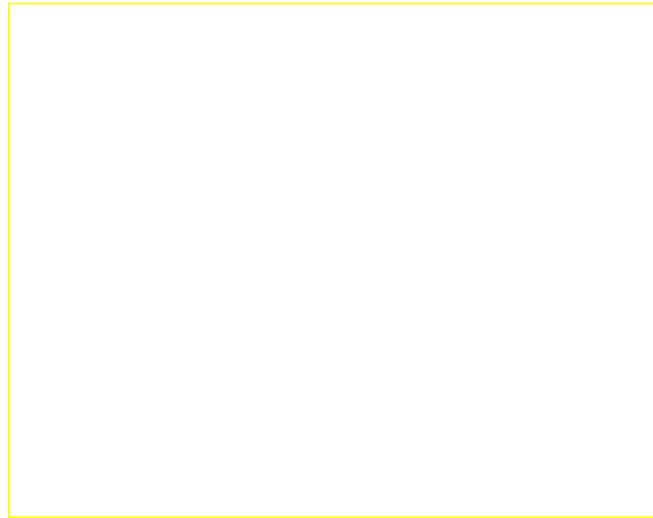


Fig.9 : les activités de la culture **STA₁₀** à l'égard de *Candida albicans*
(huitième jour d'incubation)

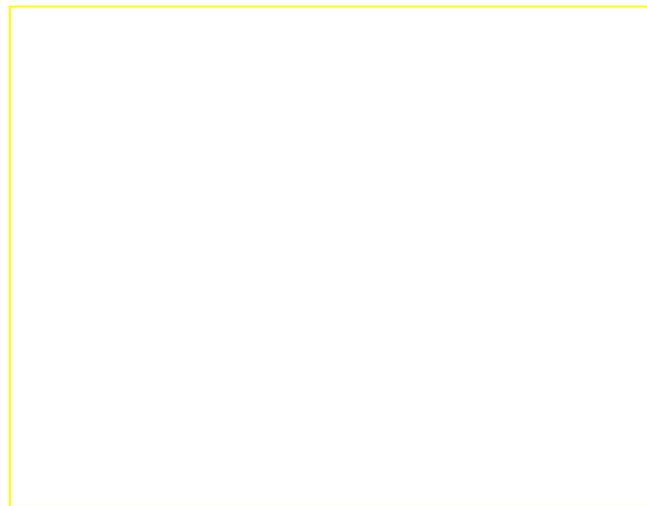


Fig.10 : les activités de la culture **STA₁₀** à l'égard de *Candida albicans*
(dixième jour d'incubation)

Ce résultat suggère que la souche **STA₁₀** ne produit que des substances antifongiques dont l'activité biologique est détectée contre *Candida albicans*. Cependant, cela n'exclue pas l'hypothèse que cette souche pourrait produire des substances antibactériennes mais à faible concentration qui ne permet pas sa détection par la méthode des cylindres d'agar.

3. Production de substances antimicrobiennes

3.1. Culture sur milieu liquide

Le volume total de la culture liquide de la souche **STA₁₀** est de 300 ml. Après centrifugation et concentration 5 fois le volume du surnageant initial, le volume obtenu est de 60 ml.

Les tests d'activité par la méthode des puits du surnageant brut et concentré ont montré qu'aucune activité antimicrobienne détectable n'est révélée, ni envers *Bacillus subtilis* ni envers *Candida albicans*.

Cette absence d'activité pourrait être due aux conditions de culture dont les plus importantes sont la nature du milieu de culture (liquide ou solide) et l'aération. Ainsi ; les travaux de **Bushell (1988)** ont montré que l'utilisation des tubes et des flacons limite le taux de croissance des souches d'actinomycètes et ainsi la production d'antibiotiques à cause de leurs géométries qui limitent la diffusion de l'oxygène dans la culture.

Des travaux similaires menés par **Gavin et al (1995)** ont montré que la production d'antibiotiques par des souches d'actinomycètes est fortement influencée par la quantité d'oxygène dissoute dans l'eau. Ces auteurs ont rapporté que la souche *Saccharopolyspora erythaea* peut produire l'érythromycine à des conditions limitées en oxygène dans des flacons secoués ou des tubes inclinés. En revanche, la souche *Amycolatopsis orientalis* ne produit la vancomycine qu'en présence de quantités suffisantes en oxygène. Des résultats similaires sont obtenus en utilisant un fermenteur en batch.

D'autres travaux ont montré aussi que les niveaux d'aération ont une grande influence sur la croissance et la production d'antibiotiques par des isolats de *Streptomyces* (**Mehdi et al., 2006**).

3.2. Culture sur milieu solide

a/ Macération dans l'eau

Après centrifugation, le surnageant est récupéré et concentré 10 fois son volume initial de 150 ml à 15 ml. Ensuite, les tests d'activités du surnageant brut et concentré sont effectués.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait brut est doué d'une activité antifongique importante vis-à-vis la souche de *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 24mm (**fig.11**), alors qu'il ne présente aucune activité vis-à-vis la souche *Bacillus subtilis*. (**fig.12**)

STA₁₀ dn l'eau
C.A (10⁻¹)

Fig.11: les activités des substances antifongiques produites par la culture STA₁₀ extraites par macération dans l'eau vis-à-vis *Candida albicans*

STA₁₀ dn l'eau
B.S (10⁻¹)

Fig.12 : les activités des substances antibactériennes produites par la culture STA₁₀ extraites par macération dans l'eau vis-à-vis *Bacillus subtilis*

Cependant, le surnageant concentré présente une bonne activité vis-à-vis les deux souches cibles avec des zones d'inhibition de diamètres de 38 mm et 33 mm correspondant à *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* respectivement (**Fig. 13**)

L'absence d'activité anti *Bacillus subtilis* dans l'extrait brut pourrait être expliquée par la concentration faible en substances antibactériennes de cet extrait ou par l'incapacité de ces substances d'agir à une faible concentration. Cependant, la présence d'activité anti *Candida albicans* dans le même extrait pourrait être attribuée à une quantité importante en substances antifongiques ou la capacité de ces substances d'agir à une faible concentration. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec les disques d'agar.

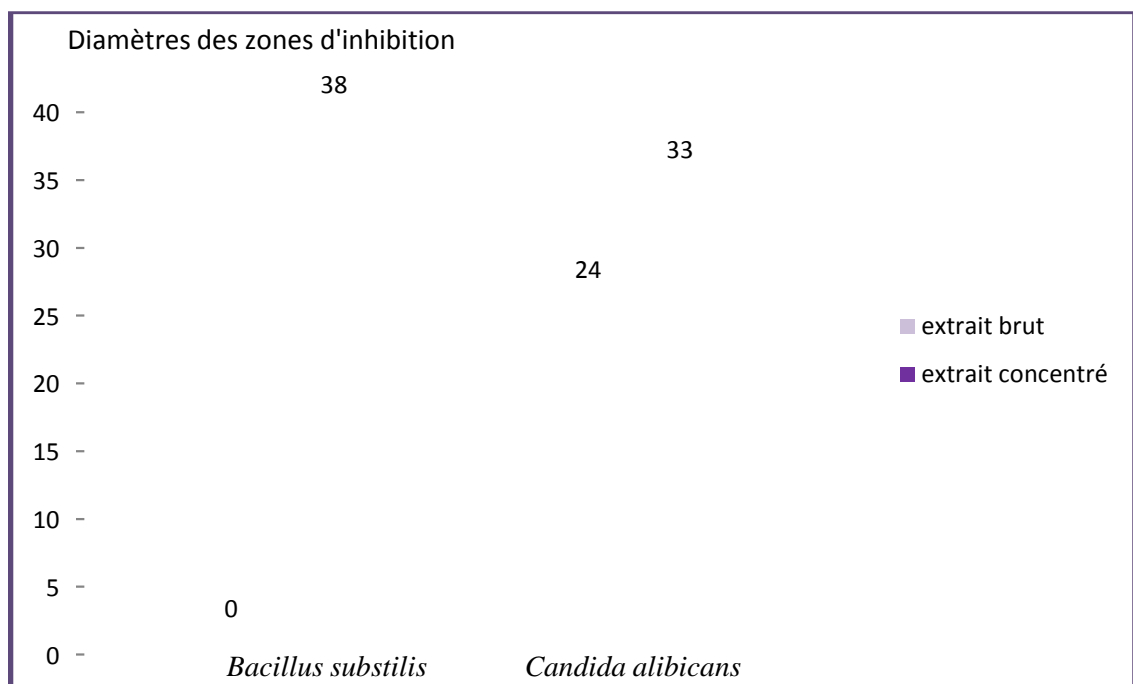


Fig. 13 : les activités des substances antimicrobiennes produites par la souche STA₁₀ à l'égard des souches *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*

b/ Macération dans le n-butanol

Après centrifugation, le surnageant est récupéré et a subi une évaporation sous vide afin d'éliminer le solvant organique. Le produit sec ainsi obtenu est récupéré dans 9 ml d'eau distillée et testé pour son activité antibactérienne et antifongique.

Les résultats obtenus ont montré qu'aucune activité détectable vis-à-vis les germes cibles n'est observée, que ce soit pour le surnageant brut ou le concentré. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les substances antimicrobiennes produites ne sont pas solubles dans le n-butanol.

4. Purification partielle des substances antimicrobiennes

4.1. Chromatographie en phase inverse

Après chromatographie, les fractions obtenues sont évaporées à sec puis récupérées chacune dans 1ml d'eau distillée et testées pour leur activité antibactérienne et antifongique.

Les résultats obtenus ont montré que les fractions actives sont celles correspondant aux fractions 0% (solution de nettoyage), 10% et 20% d'acétonitrile. (**fig.14**)

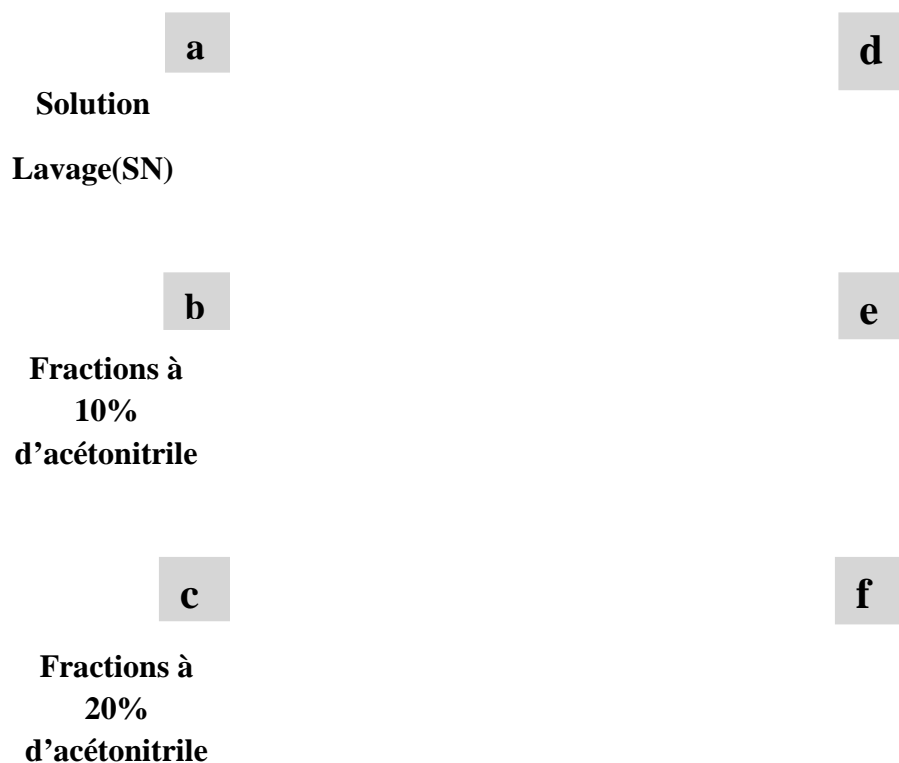


Fig.14 : les activités antimicrobienne des fractions: solution nettoyage, 10%, et 20% d'acétonitrile

a, b, c : *Candida albicans*

d, e, f : *Bacillus subtilis*

La solution de nettoyage présente une activité antibactérienne et antifongique en donnant des zones d'inhibition de diamètre de 11 et 16mm correspondant respectivement à *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Cependant, la fraction obtenue avec 10% d'acétonitrile ne présente qu'une activité antifongique avec une zone d'inhibition de 12mm.

Concernant la fraction éluée à 20% d'acétonitrile, elle présente une activité antibactérienne et antifongique avec des zones d'inhibition de 10 et 15mm respectivement.

(fig.15)

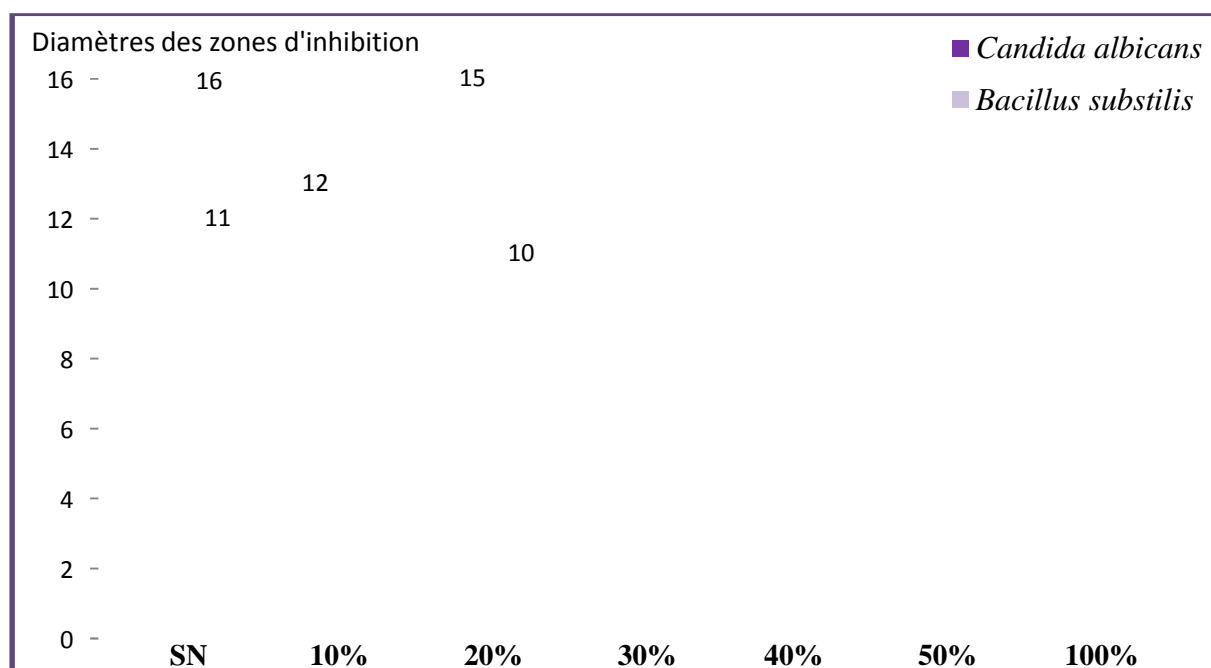


Fig.15 : les activités des substances antimicrobiennes contenues dans les fractions obtenues après chromatographie en phase inverse a l'égard de *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*

Pour les fractions obtenues avec 30% jusqu'à 100% d'acétonitrile, elles ne présentent aucune activité antimicrobienne.

Le fait que les fractions actives sont éluées à des concentrations en acétonitrile inférieur ou égal à 20% signifie que les substances douées d'activités biologiques produites par la souche **STA₁₀** ont une apolarité (hydrophobicité) faible, ce qui explique leur insolubilité dans le n-butanol fortement apolaire (hydrophobe).

La présence d'activité dans la fraction à 0% d'acétonitrile (solution nettoyage) est fort possible due à l'excès en substances antimicrobiennes dans le volume mort de la colonne (substances non accrochées au gel du fait que tous les sites de fixation sont occupés). Comme il se peut aussi qu'il soit dû au fait que ces substances antimicrobiennes sont tellement hydrophiles qu'elles ne s'accrochent pas du tout au gel.

L'activité antifongique est détectée dans les fractions 10 et 20%, cela pourrait être expliqué soit par l'existence de deux substances antifongiques différentes ; l'une est éluée à 10% et l'autre à 20% ou par la répartition de la même substance entre les deux fractions 10% et 20%.

La substance antibactérienne (anti *Bacillus Subtilis*) est éluée à 20% d'acétonitrile mais aucune activité antibactérienne n'est détectée à 10% d'acétonitrile ce qui écarte l'hypothèse que l'activité antibactérienne et antifongique soit due à la même substance.

D'un autre côté, la présence d'activité antifongique à la fois dans les fractions 10% et 20% peut être due à la quantité élevée de la substance antifongique comparée à la substance antibactérienne, ce qui pourrait expliquer le résultat obtenu lors du test des disques d'agar.

4.2. Dosage des protéines pour chaque fraction (méthode de Bradford)

Les résultats d'absorbance de chaque échantillon sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau III : Absorbances enregistrées de toutes les fractions obtenues après chromatographie en phase inverse

Echantillon (100µl)	Absorbance à 595 nm (nm)	Moyenne des absorbances enregistrées (nm)
Extrait brut	A ₁ =0,0476 A ₂ =0,0463 A ₃ = 0,0457	A ₁ =0,046
Solution nettoyage	A ₁ = 0,1130 A ₂ =0,1094 A ₃ = 0,1074	A ₂ =0,109
Fraction de 10% d'ACN	A ₁ =0,0114 A ₂ =0,0117 A ₃ = 0,0115	A ₃ = 0,011
Fraction de 20% d'ACN	A ₁ =0,0280 A ₂ =0,0220 A ₃ = 0,0210	A ₄ =0,023
Fraction de 30% d'ACN	A ₁ =0,2656 A ₂ =0,2626 A ₃ = 0,2633	A ₅ =0, 263
Fraction de 40% d'ACN	A ₁ = 0,2775 A ₂ =0,2745 A ₃ = 0,2737	A ₆ =0 ,275
Fraction de 50% d'ACN	A ₁ =0,083 A ₂ = 0,0796 A ₃ = 0,0781	A ₇ =0,080
Fraction de 100% d'ACN	A ₁ = 0 ,0616 A ₂ = 0,0604 A ₃ = 0,0597	A ₈ =0,060

Selon ces résultats, 20,18 µg/ml de protéines sont éliminées par la solution de lavage, ce qui représente 84,2% des protéines totales. La fraction à 10% d'acétonitrile ne contient que de 2,03 µg/ml de protéines, ce qui représente 1.59% des protéines totales avec une quantité de protéines éliminées égale à 98,41% par rapport au surnageant brut.

Pour la fraction 20%, elle contient 4,25 µg /ml de protéines, ce qui représente 3.33% des protéines totales avec une quantité de protéines éliminées égale à 98,41% par rapport au surnageant brut.

Il est important de noter que l'apparition d'une activité antibactérienne dans la fraction 20% est accompagnée d'une augmentation de la concentration en protéines, ce qui suggère que la substance antibactérienne pourrait être un composé de nature protéique (bactériocine ou antibiotique).

Cette dernière hypothèse est appuyée par beaucoup de travaux qui ont rapporté que les *Streptomyces* produisent des substances antibactériennes de nature protéique de type bactériocine (Wang *et al*, 2009 ; Farris *et al.*, 2010) ou antibiotique polypeptidique (Rahmane *et al*, 2010).

A partir de la courbe d'étalonnage, le calcul des concentrations de chaque fraction est réalisé (Tableau IV)

Tableau IV: Concentrations des protéines de toutes les fractions obtenues après chromatographie en phase inverse

Echantillon	Absorbance (nm)	Concentration (µg/ml)
Extrait brut	$A_1=0,046$	127,8
Solution nettoyage	$A_2=0,109$	20,18
Fraction de 10% d'ACN	$A_3= 0,011$	2,03
Fraction de 20% d'ACN	$A_4=0,023$	4,25
Fraction de 30% d'ACN	$A_5=0, 263$	8,7
Fraction de 40% d'ACN	$A_6=0 ,275$	50,92
Fraction de 50% d'ACN	$A_7=0,080$	14,81
Fraction de 100% d'ACN	$A_8=0,060$	11,11

Le calcul de la quantité de protéine éliminées de chaque fraction présentant une activité antimicrobienne (solution nettoyage, 10% d'acétonitrile, 20% d'acétonitrile) est illustré dans le tableau suivant. (**Tableau V**)

Tableau V: Quantités de protéines éliminées des fractions obtenues après chromatographie en phase inverse présentant une activité antimicrobienne

Echantillon	Pourcentage de pureté approximatif (%)
Solution nettoyage	84,2%
10% d'acétonitrile	98,41%
20% d'acétonitrile	96,67%

Notre travail a pour objectif principal d'effectuer une purification partielle de substances antimicrobiennes produites par une souche d'actinomycète (STA₁₀). Cette purification est réalisée par une chromatographie en phase inverse sur gel de silice C₁₈.

Les résultats obtenus ont montré que la souche *Streptomyces sp.* utilisée présente une activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*, dont l'activité antifongique est plus importante.

Après chromatographie, les fractions à 0%, à 10 et à 20% d'acétonitrile révèlent une activité antimicrobienne.

Les activités antibactérienne et antifongique sont probablement dues à deux substances différentes éluées séparément dans les fractions de 10 et de 20% d'acétonitrile.

Dans la fraction à 20 % d'acétonitrile, la détection d'activité antibactérienne est accompagnée d'une augmentation de la concentration en protéines, ce qui suggère que la substance responsable de cette activité est de nature protéique.

Cependant, les résultats obtenus restent insuffisants pour tirer une conclusion définitive. Ainsi, ce travail peut être complété par d'autres études plus approfondies comme :

- Etude du spectre d'activité des substances antimicrobiennes en utilisant une gamme plus large de microorganismes (bactéries et champignons).
- Estimation du degré de pureté des fractions 10% et 20% d'acétonitrile par CCM ou électrophorèse.
- l'utilisation de protéases pour déterminer la nature de la substance antimicrobienne.
- Amélioration de la purification des fractions de 10% et de 20% en utilisant un gradient continu en acétonitrile.

Abdelfattah M.S. (2008). Screening of terrestrial *Streptomyces* leading to identification of new stereo-isomeric anthra cyclines. *World journal of Microbiol Biotechnol*, **24**, 2619-2625.

Abbas I.H. (2006). A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *Journal of Applied Science Research*, **2**, (10), 809-815.

Abou-Elela G. Met Ghanem N.b. (2005). Phenotypic characterization and numerical taxonomy of some actinomycetes strains isolated from burullus lake. *Egyptian journal of aquatic research*, **31** (2), 125-144.

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

Beehal V. (2000). Bioactive products from *Streptomyces*. *Academic. Applied. Microbiol.* **47**:113-156

Garrity.G.M.; Lilburn.T.G; Cole.J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall.B.J. (2007). Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright, Michigan State University Board of Trustees.

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

Bhathena Z. P., Vora C et Kadam K. (2002). Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycal consortium. *Pollution Research.*, **21(3)**, 265-275.

Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L, Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A et Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la SEBKHA DE AIN MLILA Sciences & Technologie pp 5-10

Buckingham J. (1997). Dictionary of natural products. Chapman and Hall/CRC, England CRC Press.

Bushell, M. E. (1988). Growth, metabolism and fermentation technology. In *Biotechnology of the Actinomycetales*. pp. 185-215. (Ed): Academic Press. London. pp. 185-215.

Charin T., Thanakorn C., Naiyatat P., Masanori W et Ken S. (2002). Thermostable and alkaline-tolerant Cellulase- free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **98.4** :431-433.

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

Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat, option : Microbiologie et Biocatalyse industrielles, Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés UMR-CNRS 5504, URINRA792 du Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA de Toulouse. pp. 23- 24.

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

Eder C., Kurz M. et Wink J. (2002). Use of thiolutin dioxide and its derivatives for the treatment of CNS disorders and a process for the preparation thereof. *Eur. Pat. Applied.*, p.11.

Farris M.H., Dutty C., Findlay R.H et Olson J.B. (2011). *Streptomyces scopuliridis* sp. nov., a bacteriocin-producing soil streptomycete. In journal systematic microbial .Flärdh K. et Buttner M.J. (2009). - *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature reviews Microbiology* Vol:7.

Garrity.G.M.; Lilburn.T.G; Cole.J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall.B.J. (2007). Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. pp .399-539.

- Gavin J., Clarklt., David Langley etBushelli M.E.(1995).**Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology*.141, 663-669.
- Goodfellow M. et Williams S.T. (1983).**Ecology of actinomycetes.*Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.
- Grund EetKkroppenstedt R.M. (1990).** Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis Meyer* 1976.*Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.
- Hamoir J., Goret M., Mignon B et Gustin P. (2001).** Actualité sur les antifongiques en enregistrés Belgique dans le cadre de traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Ann. Méd. Vét.*, **145**, 226-232.
- Imada C., Koseki N., kamata M., Kobayashi T et Hamada-Sato N. (2007).** Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater *Actinomycetol.* **21**, (1), 27-31.
- Jakimowicz D. (2007).**Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*.*Postepy Hig. Med. Dosw.* **61**:565-75.
- Kamoun P. (1997).**Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.Edition : Flammarion Médecine – Science.Paris.418p.
- Khattabi A., Hilali L., Dari K., Assobhei O et Gavini F. (2002).**Isolement de microorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. *Rev Biol Biotech*; **2**:28–32.
- Kitouni M., Boumdemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Hmdiken H., Couble a., Mouniee D., Boulehrouf A et Boiron P. (2005).**Isolation of actinomycetes producing bioactivesubsances from water, soil and tree bark samples of north-east Algeria. *Journal of mycology médical*.**15** :45-51

Lam K.S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Ecol and Indus Microbiol Techn.* **9**:245-251.

Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrixalgeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou.

Larpent JP et Sanglier JJ.(1989). Biotechnologie des antibiotiques. Paris: Ed. Masson. p. 481.

Lechevalier H. Aet Lechevalier M.P. (1970). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.

Mehdi., R.B.A., S. Sioud., L.F. Ben-Fguira., S. Bejaret L. Mellouli. (2006). Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Proc. Biochem.* **41**, 1506-1513.

Mellouli L., Mehdi Rb., Sioud S., Salem M., et Begar S. (2003). Isolation and purification and parietal caractérisation of antibactériel activities produced by newly *Streptomyces* sp. US24 strain. *Rev Microbiol.* **154** : 52-345.

Minnikin D.E., Patel P.V., Alshamaony Let Goodfellow M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**, 104-117.

Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S., Bogatzevska, N. (2002). Characteristics of soil actinomycetes from antarctica.

Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A.L. Fet Lima Filho J.L. (2002). Application of protease from *Nocardiopsis* sp. as a laundry detergent additive. *journal of Microbiol. Biotechnol.*, **18** (4), 307-312.

Nolan R.D et Cross T. (1988). Isolation and screening of actinomycetes in bio technology. In : *Biology of industrial microorganisms*. Demain A. L. and Solomon N. A. (Eds). Academic Press, London. pp. 1 - 32.

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

Oskay M., Tamer A.Ü et Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soil of Turkey. *African journal of biotechnology*. **3.9** :441-446.

Ouhdouch Y., Barakate M et Finance C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil. Biol.*, **37**:69-74.

Peltola J.S.P., Anderson M.A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R.M., Busse H.J., Salkinoja-Salonen M.S et Rainey F.A. (2001). Isolation of toxigenic *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.*, **67**, 4293-4304.

Pizzul L. (2006). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp 39 .

Rahman A., Zahidul M., Khondar P et Islam A. (2010). Characterization and antimicrobial activities of a polypeptide antibiotic isolate from strain *Streptomyces parvulus*. *Bangladesh pharmaceutical journal*. Vol.13 .

Raty K., Kantola J., Hautala A., Hakala J., Ylihon K. et Mantsala P. (2002). Cloning and characterization of *Streptomyces galilausa* clacinomycin polyketides synthase (PKS) cluster. *Gene*. **293**, 115-122.

Rawasheh R., Saadoun I et Mahasneh A. (2005). Effect of culture conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) a dist potential to utilize tomato pomace. *African Journal of Biotechnology*. **4**: 251-255.

Reiblein W.J., Watkins P.D etWagman G.H. (1973). Binding of Gentamicin and other Aminoglycoside antibiotics to mycelium of various actinomycetes.*Antimicrob.Agen.Chemother.*,**6**, 602-606.

RifaatH.M. (2003).The biodiversity of *actinomycetes* in the River Nile exhibiting antifungal activity.*Journal of Mediterranean ecology*.**4** (4-3), 5-7.

Saadoun I et Gharaibeh R. (2003). The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordon and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria.*J. Arid Environ.* **53**, 365-371.

Sánchez C. (2007).Nature ReviewsMicrobiology., **3**, 214-224.

Seong C.N., Choi J. H., et Baik K-S.(2001).An Improved selective isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil.*Journal of microbiology*.**39** :17-23.

Stanbury P. FetWhitaker A. (1984). Principles of Fermentation Technology.Oxford: Pergamon Press.

Stapley E.O., Jackson M., Hernandez S., Zemmerman S.B., Currie S.A., Monchales S., Mata J.M., Woodruff H.B et Hendlin D. (1972). Cephamycin, new family of β - Lactame antibiotics.Produced by actinomycetes including *Streptomyceslactamdurans* Sp. *Antimicrob.Agen.Chemother.*,**4**, 122-131.

Strub C.,Brandam C., Meyer X etLebrihiA. (2008).Investigations of *Saccharothrixalgeriensis* Growth on Synthetic Media.*Journal of Bioscience and Bioengineering*.**106** (2), 148-153.

Taddei A., Vaderrama M., Giarrizzo J., Rey MetCastelli C. (2006). Chemical screening: A simple approach to visualizing *Streptomyces* diversity for drug discovery and further research. *Research in Microbiology*, **157**: 291–297.

Thakur D., Yadav A., Gogoi B. Ket Bora T.S. (2007). Isolation and screening *Streptomyces* in soil from *areas* from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Med Microbiol.*, **17**, 242-249.

Theilleux J. (1993). Les actinomycètes *In* : Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Lavoisier , Tech et Doc, V 612p, pp 425.

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

Shi Y.F. (2000). Advances of insecticidal microorganisms. *Plan. Protec.*, **26**, 32-34.

Valan Arasu M., Duraipandiyar V., Agastian P et Ignacimuthu S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces spp.* ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J. Mycol. Medic.*

Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., De' Ry C., Brezezinski R., et Beaulieu C. (1996). Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent raspberry root rot. *Applied and Environmental Microbiology*. **62.5** : 1630-1635.

Vijayakumar R., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A et Saravanamuthu R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, **21**(2), 59-65.

Wang J., Kevin L et Gregg S.P. (2009). Growth-Regulated Expression of a Bacteriocin, Produced by the Sweet Potato Pathogen *Streptomyces ipomoeae*, That Exhibits Interstrain Inhibition. *Applied and Environmental Microbiology*. (75). pp. 1236–1242.

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

Xiong L., Li Jet Kong F. (2004). *Streptomyces sp.* 173, an insecticidal microorganism from marine. *Lett. Appl. Microbiol.*, **38**, 32-37.

Zhao H., Parry R.L., Ellis D.I., Griffith G.W et Goodacre R. (2006). The rapid differentiation of *streptomyces* isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, **40**: 213-218.

Zitouni A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou, (Algérie). pp 230.

Annexe I : Résultat expérimental

Tableau I : Résultats des tests d'activité antimicrobienne du surnageant brut et concentré de la culture liquide de la souche STA₁₀ à l'égard de *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*

Nature du surnageant	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Surnageant brut	-	-
Surnageant concentré 5 fois	-	-

Tableau II : Résultats des Tests d'activité des substances antimicrobiennes produites par la souche STA₁₀ extraites par macération dans l'eau à l'égard des souches *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*

Naute de l'extrait	Diamètres des zones d'inhibition des germes cibles exprimés en mm	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Extrait brut	24	0
Extrait concentré	33	38

Tableau III : Résultats des Tests d'activité des substances antimicrobiennes produites par la souche STA₁₀ extraites par macération dans le n-butanol à l'égard des souches *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*

Naute de l'extrait	Diamètres des zones d'inhibition des germes cibles Exprimés en mm	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Extrait brut	0	0
Extrait concentré	0	0

Tableau IV : Résultats des Tests d'activité antimicrobienne des substances antimicrobiennes de la souche **STA₁₀** contenues dans les fractions obtenues après chromatographie en phase inverse à l'égard de *Candida albicans* et *Bacillus substilis*.

	Diamètres des zones d'inhibition des germes cibles Exprimés en mm	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus substilis</i>
Solution nettoyage (SN)	16	11
Fraction d'ACN à 10%	12	0
Fraction d'ACN à 20%	15	10
Fraction d'ACN à 30%	0	0
Fraction d'ACN à 40%	0	0
Fraction d'ACN à 50%	0	0
Fraction d'ACN à 100%	0	0

Annexe II : Milieu de culture**Tableau I : Milieu MEM (pH = 7,5)**

Composition	Quantité g/l
Amidon	10
Extrait de levure	4
Peptone	2
Agar	20

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

Tableau II: Bouillon nutritif (pH = 7,2)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5

Tableau III : Gélose Muller Hinton (pH= 7,3)

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	3
Hydrolysat acide caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	16

Tableau IV : Gélose Sabouraud (pH= 6)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10
Glucose massé	20
Agar	15

Ce milieu est additionné de vitamines et des facteurs de croissance

Tableau V : Gélose nutritive (pH= 7)

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2,5
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15

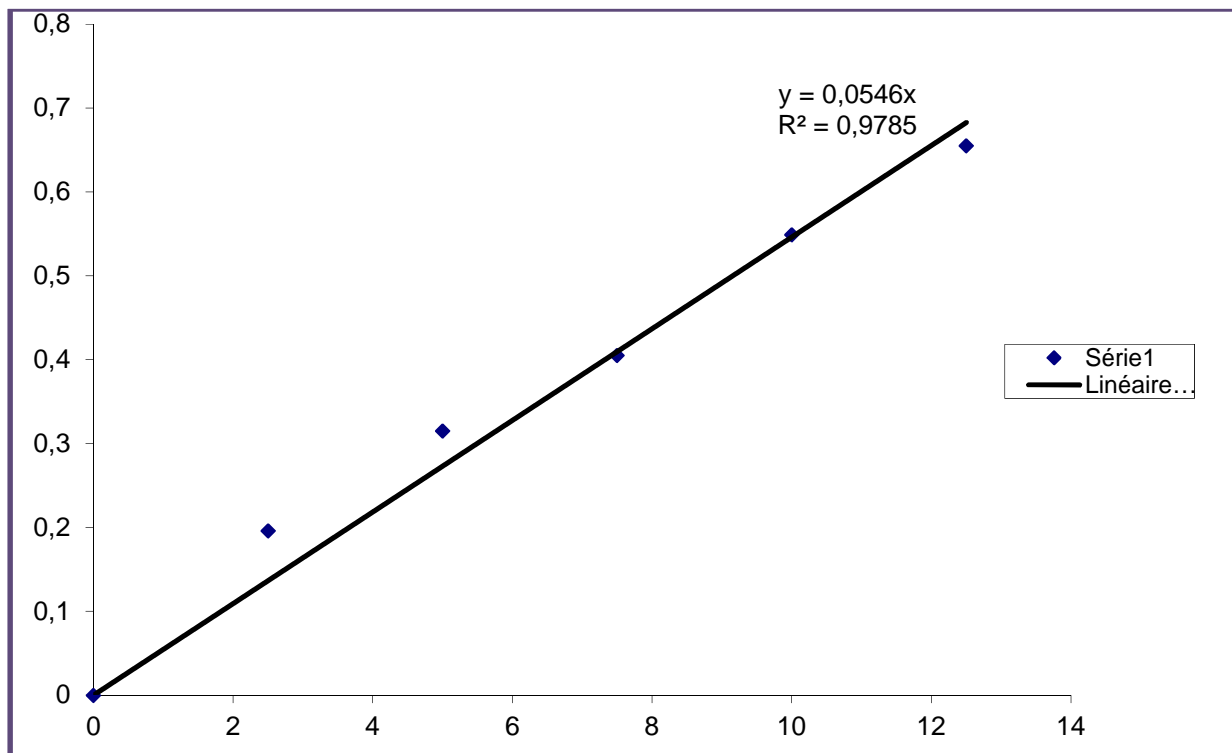
Tableau VI : Milieu BHIB (pH = 7,5)

Composition	Quantité g/l
Infusion cœur- cervelle / peptone de viande	12
Peptone de caséine	15
Extrait de levure	5
Dextrose	2
Chlorure de sodium	5,5
Phosphate dipotassique	2,5
L-cystéine	0,5
Hémine	0,005
Vitamine K	0,010

Sang de mouton défibriné : **50 ml**

Annexe III : Courbe d'étalonnage de la protéine BSA**Tableau I** : Résultats d'absorbance des échantillons de la solution BSA

Volume d'échantillon (µL)	Absorbance à 595 nm
0	0
2,5	0,196
5	0,315
7,5	0,405

**Fig.1** : Courbe d'étalonnage de la protéine BSA

Annexe IV: Polarités des solvants utilisés en HPLC**Tableau I :** classification des solvants selon leurs polarités

solvant	polarité
eau	10
DMSO	7
Acétonitrile	6
Acide acétique	6
méthanol	5
Ethanol	4
Chloroforme	4
Propan-2-ol	4
THF	4
Propanol	4
Fluorobenzene	3
Chlorure de méthylène	3
Bromoethane	2
Chloroethane	1
Cyclohexane	0
Isooctane	0

Ce tableau est retiré du site suivant : [www. Lachimie. fr](http://www.Lachimie.fr)

Résumé

Cette étude est réalisée dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules antifongiques ou antibactériennes. Pour cela, les substances antimicrobiennes produites par la souche d'actinomycète **STA₁₀** ont fait l'objet d'un essai d'une purification partielle. Cette dernière est réalisée par une chromatographie en phase inverse sur gel de C₁₈.

La souche **STA₁₀** présente une activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* respectivement.

Après chromatographie, les fractions 0, 10 et à 20% d'acétonitrile révèlent une activité antimicrobienne. Les substances antifongiques et antibactériennes sont probablement de natures différentes puisque elles sont éluées séparément dans des fractions de 10 et 20% d'acétonitrile.

L'activité antibactérienne retrouvée dans la fraction à 20% est accompagnée par une augmentation de la concentration en protéines.

Mots clé : Actinomycète, la souche **STA₁₀**, activité antimicrobienne, purification, chromatographie.

Abstract

This study is released to search a new antifungal or antibacterial molecule. For that, the antimicrobial substances produced by the strain of actinomycete were the subject of a test of partial purification. The latter is carried out by chromatography on column in opposite phase C₁₈.

The Strain **STA₁₀** presents a antibacterial and antifungal activity opposite *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* respectively.

After chromatography, the fractions 0, 10 and 20% of acetonitrile reveal an antimicrobial activity. The antifungal and antibacterial substances are probably of different nature.

The antibacterial activity found in the fraction 20% is accompanied by an increase by the proteins concentration.

Keywords: Actinomycete, the strain **STA₁₀**, antimicrobial activity, purification, chromatography.