

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA -  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques

Présenté par :

*Melle. MANANE Hiba*  
*Melle. OUDIR Nassima*

*Thème*

**Recherche des Activités Biologiques de Quelques Souches  
Bactériennes Isolées à Partir d'eau de Source Naturelle de Grande  
Kabylie.**

Soutenu le : 11/06/2017

Devant le jury composé de :

*Nom et Prénom*

*Grade*

*M. KADRI N.*

*MCA*

*Univ. de Bouira*

*Président*

*M. CHERGUI A.*

*MAA*

*Univ. de Bouira*

*Promoteur*

*M. ADRAR N*

*MAB*

*Univ. de Bouira*

*Examineur*

**Année Universitaire : 2016/2017**

## **REMERCIEMENTS**

*Avant toute chose, nous tenons à remercier «Allah» qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de microbiologie de l'université Akli Muhand Oulhadj de Bouira.*

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur «**CHERGUI.A**» Nous tenons vivement à lui exprimer notre profonde gratitude pour, ses orientations et sa compréhension.*

*Nous remercions très sincèrement **Mr. KADRI.N** et **Mr. ADRAR.N** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également **Mr.KACIMI.S** et **Mr.MAAMERI.S** pour leur aide précieuse, pour leurs conseils scientifiques, pour leurs soutiens et leurs gentillesse et encouragements et leurs bonnes humeurs.*

# *Dédicace*

*On dédie ce travail :*

*\* A ceux qui nous ont donné le sens de la vie nos pères et nos mères ainsi  
que toute les familles : MANANE et OUDIR*

*\* A tous nos amis de longue date et a tout les étudiant de master analyses  
biologiques et biochimiques 2016/2017*

*\* A tous ceux qui me sont chers : grande famille; et nos amis :  
Haroun ,Hadjila ,soumia ,Hanane ,Brahim ,Saida  
et Messaouda .*

*Manane hiba , Oudir Nassima*

## Résumé

Les *actinomycètes* sont des microorganismes procaryotes, classés parmi les bactéries, prenant généralement le Gram positif, ils sont les candidats les plus potentiels pour la production de molécules bioactives notamment les bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de tester l'activité biologiques de quelques souches bactériennes isolées à partir d'eau de source naturelle de grande Kabylie.

Pour cela, 03 souches de *Streptomyces* ont été isolées, il s'agit de souche CA28, CA30 et CA36, afin de tester leur aptitude à produire quelques enzymes : l'amylase, la cellulase, lipase, la caséinase et la Pectinase ainsi qu'une mise en évidence de la production des molécules antibactériennes par la méthode de diffusion des puits vis-à-vis a deux microorganismes pathogène *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Nos résultats ont démontré que toutes les souches étudiées possèdent une activité enzymatique pour le tween 80 avec un bon développement des *Streptomyces* sur les autres substrats. D'autre part deux souches actives ont montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

-La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec la souche **CA28** avec un diamètre de **13.85mm**.

Finalement les concentrations minimales inhibitrices ont été mesure sur milieu liquide, il s'agit de 4 UA pour les deux souches.

**Mots clés :** *Streptomyces*, eau, activité antimicrobienne, activité enzymatiques, CMI.



## **Abstract**

Actinomycetes are prokaryotic microorganisms, classified among bacteria, generally taking the Gram positive, they are the most potential candidates for the production of bioactive molecules including bacteria belonging to the genus *Streptomyces*.

The aim of this work is to test the biological activity of a few bacterial strains isolated from natural water of great Kabylie.

three strains of *Streptomyces* were isolated, strain CA28, CA30 and CA36, in order to test their ability to produce a few enzymes: amylase, cellulase, lipase, caseinase and Pectinase. A demonstration of the production of antibacterial molecules by the method of diffusion of the wells vis-à-vis two pathogenic microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Our results have shown that all the strains studied possess enzymatic activity. On the other hand, two active strains showed a strong inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*. The largest zone of inhibition was obtained with strain CA28 with a diameter of 13.85 mm. Finally, the minimum inhibitory concentrations were measured on a liquid medium, it is 4 AU for both strains.

**Key words:** *Streptomyces*, water, antimicrobial activity, enzymatic activity, MIC.

## Liste des abréviations

ATCC: American type culture collection.

BHIB : Bouillon cœur-cerveille (Brain Heart Infusion Broth).

°C : température en degré Celsius.

CDB : cellulose binding domain.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

g : gramme.

GC% : coefficient de chargaff.

GEL : gélatine.

g/l : Gramme par litre.

GLU : glucose.

Gly : Glycine.

GN: Gélose nutritive.

H : Heure.

HCL : chlorure d'hydrogène.

ISP : International *Streptomyces* Project.

J : Jours.

kDa : kilodalton.

Leu : *Leucine*.

mg/ml : milligramme/millilitre.

min : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

pH : potentiel d'hydrogène.

Pro : proline.

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la métiline.

Thr : threonine.

ua : unité arbitraire.

$\mu\text{g}/\text{ml}$  : Microgramme/ millilitre.

$\mu\text{l}$  : microlitre.



## *Liste des tableaux*

<i>N° de tableau</i>	<i>Titre de tableau</i>	<i>N° de page</i>
<b>Tableau I</b>	Tableau illustrant l'ensemble des Antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i> .	08
<b>Tableau II</b>	les secteurs d'utilisations des enzymes lipolytiques	16
<b>Tableau III</b>	Inhibition de la croissance de <i>S. aureus</i> par l'extrait d' <i>actinomycètes</i> par la méthode de dilution en milieu liquide.	32

## *Liste des figures*

<i>N° de Figure</i>	<i>Titre de Figure</i>	<i>N° de page</i>
<b>Figure 01</b>	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	05
<b>Figure 02</b>	schéma montrant la morphologie de <i>Streptomyces olindensis</i> cultivé en milieu liquide	06
<b>Figure 03</b>	Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ amylase	12
<b>Figure 04</b>	Exocellulase CBH I de <i>Trichoderma reesei</i>	13
<b>Figure 05</b>	Schéma montrant la structure des enzymes lipolytiques « lipases / esterases »	15
<b>Figure 06</b>	Photo présentant le résultat de l'activité lipolytique des souches : S28, S30 et S36. correspondant aux zones claires montrés par les flèches	26
<b>Figure 07</b>	photo montrant le résultat de la croissance bactérienne prouvant la production des différentes enzymes hydrolytiques en comparaison avec le témoin négatif	28
<b>Figure 08</b>	Activité antibactérienne des souches CA28, CA30 contre <i>Staphylococcus aureus</i> démontre par la technique de diffusion des puits	30
<b>Figure 09</b>	photo montrant le résultat de la CMI de la souche S.28	32
<b>Figure 10</b>	photo montrant le résultat de la CMI de la souche S.30	32

# Table des matières

Introduction générale.....	1
<b>Synthèse Bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Propriétés antimicrobienne des Streptomyces</b>	
1-les actinomycètes.....	4
2-Le genre Streptomyces.....	4
2-1-Définition.....	4
2-2-Cycle de développement.....	5
2-2-1-Croissance sur milieu solide.....	5
2-2-2-Croissance sur milieu liquide.....	6
2-3-Ecologie.....	6
3-Bioactivité des Streptomyces.....	7
3-1- Métabolisme secondaire .....	7
3-2- Activité antibactérienne.....	8
<b>Chapitre II : Les enzymes des Streptomyces.</b>	
<b>1-L'alpha amylase.....</b>	<b>11</b>
1-1- Définition.....	11
1-2- Structure.....	12
1-3- Mode d'action.....	12
1-4- Application.....	12
<b>2-Cellulase.....</b>	<b>13</b>
2-1- Définition.....	13
2-2- Structure.....	13
2-3-Mode d'action.....	14
2-4-Application.....	14
<b>3-Esterase .....</b>	<b>14</b>
3-1-Définition .....	14

3-2-Structure.....	14
3-3-Mode d'action .....	15
3-4-application .....	16
4-Pectinase.....	16
5-Protéase.....	17

## **Partie expérimentale**

### **1-Matériels et méthodes**

#### **1-1-Matériels**

1-1-Matériel biologique.....	21
1-2-Appareillage.....	21

#### **1-2-méthodes**

2-1-Revivification des germes.....	22
2-2-Mise en évidence des activités enzymatiques.....	22
2-2-1- Recherche de l'activité alpha amylase.....	22
2-2-2- Recherche de l'activité cellulase.....	22
2-2-3-Recherche de l'activité caséinase.....	22
2-2-4-Recherche de l'activité lipase.....	22
2-2-5-Recherche de l'activité Pectinase.....	22
2-3-Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des puits.....	23
2-4-La détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI).....	24

### **2-Résultats et discussion**.....26

Conclusion.....	35
-----------------	----

### **Référence bibliographique**

### **Annexes**

Depuis des années, les hommes utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la Biotechnologie (**Smaoui, 2010**).

Les actinomycètes sont les candidats les plus potentiels pour la production d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires bioactifs notamment les bactéries appartenant au genre *Streptomyces* dont plus de la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement sont produits par ces bactéries filamenteuses telluriques qui sont considérées comme le Paradigme des microorganismes capables de synthétiser des molécules naturelles par le biais de leur métabolisme secondaire. (**loucif, 2011**).

Ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques antibactériens et antifongiques ayant un potentiel pour les applications médicales dans le traitement des infections fongiques invasives (**Benouagueni, 2012**).

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes. En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases, des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (**Syed et al., 2009**).

Vue l'importance des actinomycètes dans la production des molécules bioactives, une collection de souches de *Streptomyces* isolées par l'équipe de l'unité de recherche LABAB de Tizi-Ouzou nous a été offerte en vue de l'exploiter dans notre démarche expérimentale qui portera sur :

- La mise en évidence de la production d'enzymes bactériennes, d'intérêt industriel.
- La recherche d'activité antibactérienne des mêmes souches, par la technique de diffusion des puits vis-à-vis de deux souches pathogènes de référence (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) aimablement fournies par la même équipe.
- La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

## 1-Les actinomycètes

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des Actinomycétales. Ce sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, prenant généralement le Gram positive ; possédant un coefficient de chargaff (GC%) compris entre 60-70% formant des colonies à la morphologie (**Strub, 2008**).

Ils comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium, rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat (nourricier), surmonté par un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) qui leur confère un aspect fongique d'où l'expression "ray fungi" ou "champignons rayonnants", utilisée parfois entre 1930 et 1960 (**Lamari, 2006**).

Les actinomycètes et plus particulièrement les *Streptomyces* sont les microorganismes les plus recherchés pour leur capacité de produire beaucoup de métabolites primaires et secondaires essentiels pour la santé (**Boughachicha, 2012**).

## 2- Le genre Streptomyces

Le genre *Streptomyces* est un genre immense, constitue 50 % de la population totale des actinobactéries du sol. Les listes homologuées des noms bactériens répertorient 378 espèces. Le Bergey's Manual décrit en détail 142 espèces (**Zouaghi, 2007**). C'est l'actinomycète le mieux étudié en termes de métabolisme, cycle de vie et génétique, du fait de l'intérêt considérable généré par ce genre bactérien pour la découverte d'antibiotiques.

### 2-1-Définition

Les *Streptomyces* (du grec *Streptos* : courbé, tordu et *Myces* : moisissure) sont des bactéries filamenteuses à Gram+, et sporulantes dans des conditions de stricte aérobiose. Elles appartiennent à l'ordre *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria* et à la Famille des *Streptomycetaceae* (**Smaoui, 2010**).

### 2-2-Cycle de développement

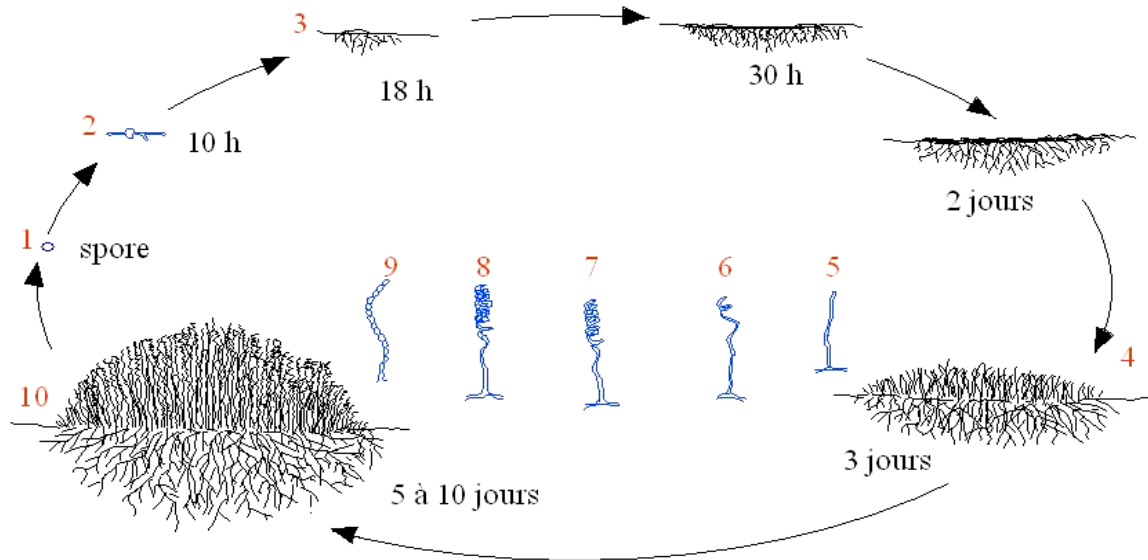
Les *Streptomyces* présentent un cycle de différenciation complexe, caractérisé par une différenciation morphologique et biochimique, qui correspond au passage du métabolisme primaire au métabolisme secondaire avec notamment la production d'antibiotiques.

#### 2-2-1-Croissance en milieu solide

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes possèdent un cycle de vie complexe (**Figure 1**), qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la

croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (**Danilenko et al., 2005**).

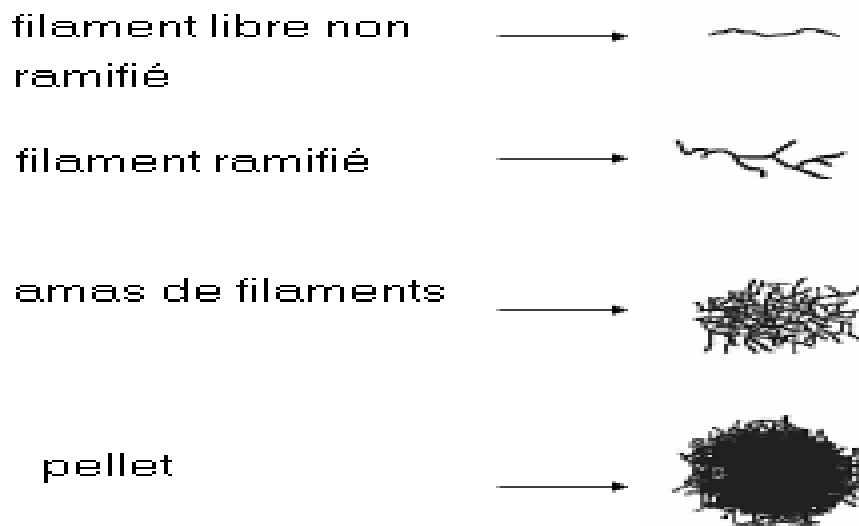
Il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifie. Le développement du mycélium de substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (**Kim et al., 2004**).



**Figure 01** : Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (**Smaoui,2010**).

### 2-2-2-Croissance en milieu liquide

En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (**Keulen et al., 2003**). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former enfin les pellets (**figure 02**). Ces dernières sont composées d'une masse dense d'hyphes enroulés généralement en forme sphérique, les cellules au centre sont privées de nutriment, ainsi, les pellets augmentent donc de taille seulement par la croissance des cellules à la surface de la sphère.



**Figure 02:** schéma montrant la morphologie de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian *et al.*, 2002).

### 2-3-Ecologie

Les actinomycètes sont retrouvés presque partout dans la nature. Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95% du total des actinomycètes (kitouni,2007).

La grande majorité est d'origine tellurique 10 à 20% (Merizig, 2015). Et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre,... etc).

La plupart des streptomycètes peuvent dégrader pas mal de matériaux de plante et d'animaux comme les polysaccharides (ex : amidon, pectine, cellulose et chitine), protéines (ex : kératine et l'élastine), lignocellulose et des autres composés aromatiques (kitouni,2007).

Les membres de genre *Streptomyces* sont impliqués dans la biodégradation de plusieurs polymères qui sont abondants dans le sol ; en basant sur leur capacité de produire des enzymes extracellulaire, les streptomycètes sont l'un de peu de bactéries qui peuvent dégrader la lignine.

Ils produisent ainsi des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyle isobornéol qui est responsable de l'odeur d'humus caractéristique des sols .

Les streptomycètes marins constituent une très importante source de molécules bioactives puisque les conditions de l'environnement marins sont différentes de celle de l'environnement terrestre, elles produisent des antibiotiques de types différents et pas que les antibiotiques mais des autres molécules à usage thérapeutique .

À part leur rôle comme producteurs d'antibiotiques, les streptomycètes de l'environnement marin participent vivement dans le recyclage et la biodégradation continue des différents matériaux (Smaoui,2010) .

### **3-Bioactivité des Streptomyces**

#### **3-1-Métabolisme secondaire des Streptomyces**

Les *Streptomyces* sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques. utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005). Il a été prouvé que 50 % des *Streptomyces* sont actives contre les bactéries Gram positif.

Plusieurs travaux ont été menés pour augmenter la production de métabolites d'intérêt à partir des souches appartenant à ce genre bactérien et il a été démontré qu'il y a une influence majeure des conditions de culture de la bactérie productrice sur la production des métabolites recherchés (Smaoui, 2010).

#### **3-2-Activité antibactérienne des Streptomyces**

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes. Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés au laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (Madigan et Martinko, 2007).

Les antibiotiques produits par *Streptomyces* montrent une grande diversité au niveau de leurs structures et de leurs cibles cellulaires, illustrée dans le **tableau I**. Ils couvrent les familles de composés majeures commercialisées aujourd'hui : macrolides, glycopeptides, pénicillines, aminoglycosides, Ils représentent aujourd'hui un marché considérable de vingt-huit milliards de dollars au niveau mondial (Thomson *et al.*, 2004).



**Tableau I :** Tableau illustrant l'ensemble des Antibiotiques produits par le genre Streptomycetes.

Antibiotique	Producteur	Classe	Cible	Référence
<b>Streptomycine</b>	<i>Streptomyces Griseus</i>	aminosides	Inhibe la traduction des protéines	(Jana et Deb, 2006 ; Belyagoubi, 2014)
<b>Néomycine</b>	<i>Streptomyces Fradiae</i>	Aminoside	Inhibe la traduction des protéines (initiation)	
<b>Spectinomycine</b>	<i>Streptomyces Spectabilis</i>	Aminoside	Inhibe la traduction des protéines (initiation)	
<b>Tétracycline</b>	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Cycline	Inhibe la traduction des protéines (inhibe la liaison des aminoacyl-ARNt sur le site accepteur)	(Tanaka et al. 1972;Belyagoubi, 2014)
<b>Spiramycine</b>	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Macrolide	Inhibe la traduction des protéines (inhibe la translocation lors de l'élongation)	(Ahmed ,1968;Belyagoubi, 2014)
<b>Acide clavulanique</b>	<i>S.clavuligerus</i>	$\beta$ -lactamine	Inhibiteur de $\beta$ -Lactamase	(Kieser <i>et al.</i> , 2000 ; Madigan et Martinko, 2007)
<b>Cephamicine</b>	S.sp	$\beta$ -lactamine	peptidoglycane	
<b>Cycloserine</b>	<i>S.orchidaceus</i>	Peptide cyclique substitue	Peptidoglycane	
<b>Chlorotetracycline</b>	<i>s.aureofaciens</i>	Tétracycline	<b>R</b>	
<b>Chloramphenicol</b>	<i>S.venezuelae</i>	N-dichloroacyl Phenylpropanoide	<b>R</b>	
<b>Fosfomycine</b>	S.sp	AC. phosphonique	peptidoglycane	
<b>Kanamycine</b>	<i>S.kanamyceticus</i>	Aminoglycoside	<b>R</b>	
<b>Lasalocide</b>	<i>S.lasaliensis</i>	Polyether	Membrane (ionophore)	
<b>Lincomycine</b>	<i>S.lincolnensis</i>	Aminoglycoside	<b>R</b>	

Monensin	<i>S.cinnamomensis</i>	Polyether	Membrane (ionophore)	
----------	------------------------	-----------	----------------------	--

**R** : l'antibiotique ce lie au ribosome bloquant ainsi la synthèse protéique

Plus des molécules antibacteriennes, les *Streptomyces* produisent des antifongiques (nystatine), antivirale (tunicamycine), antiparasitaire (ivermectine), immunosuppressive (rapamycine), antitumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur d'enzyme (acide clavulanique) (**Demain, 2000**). Le genre *streptomyces* est particulièrement remarquable pour le nombre et la diversité chimique des antibiotiques qu'il produit (**Watve et al., 2001**).

## Généralités

Les propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes (**Saci, 2012**). La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre. Principalement, les enzymes des Streptomyces jouent un rôle important dans la dégradation d'une variété de composés polymériques végétaux (**Kheder, 2007**).

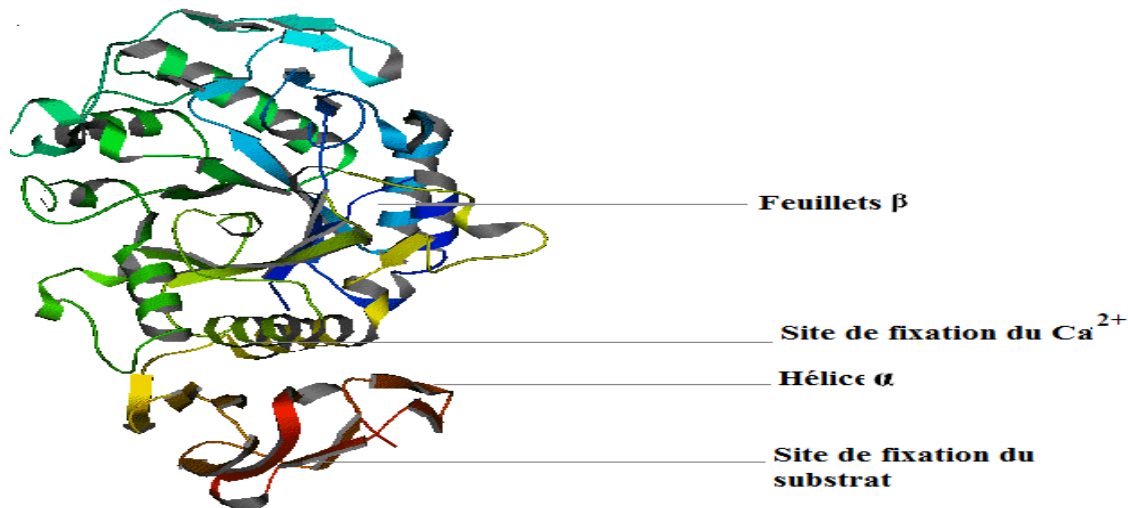
### 1-Alpha-amylases

#### 1-1-Définition

L' $\alpha$ -amylase [ $\alpha$ -(1,4)-D-glucane glucanohydrolase] comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires (**Nouadri, 2011**), de type endoglucanase de la classe des hydrolases, dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60 kDa, qui agissent sur les liaisons osidiques (1,4) (**Benabdellah, 2014**), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' $\alpha$ -dextrines. (**Benaouida, 2008**).

#### 1-2-Structure

L' $\alpha$ -amylase est considérée comme une glycoprotéine renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires A et B (**Nouadri, 2011**). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes. La partie glucidique est formée essentiellement de mannose. Les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' $\alpha$ -amylase est formée de 8 feuillets  $\beta$  plissés et de 8 hélices  $\alpha$  (**Maktouf, 2013**).



**Figure 03 :** Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$  amylase (**KHERRAZ et LORBI , 2015**)

### 1-3-Mode d'action

L'action de l' $\alpha$  amylase est de différentes façons : Une attaque aléatoire (l' $\alpha$ -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glycosidiques, libérant deux fragments qui seront séparément attaqués) (**Nouadri, 2011**). Mécanisme uni-chaine (L'enzyme catalyse la réaction et ne forme pas de complexes actifs, jusqu'à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne). Mécanisme multi-chaine (la dégradation des chaînes est simultanée) (**Kherraz et Lorbi, 2015**). Attaque multiple ou répétitive (le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glycosidiques sans se dissocier du substrat) (**Nouadri,2011**).

### 1-4-Application

Les  $\alpha$ - amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels. ils sont utilisés dans les industries agro-alimentaires (La sucrerie pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats), dans les applications médicales afin d'augmenter le taux des  $\alpha$ - amylases dans le sang (**maktouf, 2013**). Ils sont utilisées aussi dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie (**Teodoro et al .,2000**) et des détergents pour les lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant (**Malhotra et al ., 2002**).

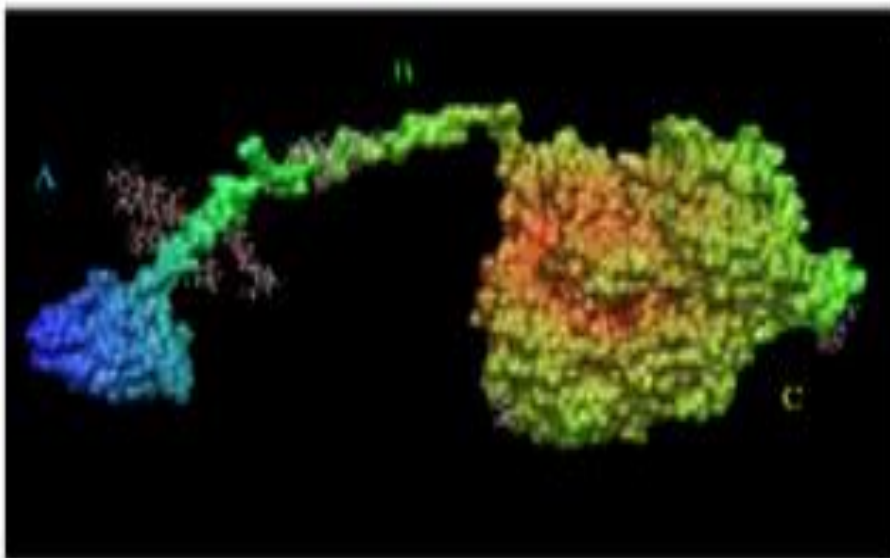
## 2-Cellulase

### 2-1-Définition

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- $\beta$ -D-Glucanohydrolase] sont des enzymes extracellulaires inductibles synthétisés par les microorganismes durant leur croissance sur le matériel cellulosique. Elles ont une action sur les substrats cellulosiques, solubles et insolubles. Les cellulases sont les seules enzymes qui peuvent briser les liaisons  $\beta$ -(1, 4) des polysaccharides de cellulose en glucose. C'est l'un des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases, sont classées selon leur mode d'action catalytique et selon leur structure (Korish, 2003 ).

### 2-2-Structure

La majorité des cellulases ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : Le site catalytique et le site de fixation du substrat ou CDB. Ces sites sont habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Ser / Pro et Thr appelé « linker (Hamoudi, 2011).



**Figure 04 :** Exocellulase CBH I de *Trichoderma reesei* (John *et al* .,2005).

A : le site de fixation. B : le « linker » glycosylé. C : le site catalytique

### 2-3-Mode d'action des cellulases

Ce complexe enzymatique de la cellulase travaille en synergie, c'est-à-dire une coopération d'action entre les trois composantes d'enzymes, dans laquelle le produit d'une réaction enzymatique devient le substrat pour une autre. Trois formes de synergie ont été décrites : une synergie endo-exo entre endoglucanases et exoglucanases ; une synergie exo-exo entre

exoglucanases; une synergie entre les exoglucanases et les  $\beta$ - glucosidases qui hydrolysent le cellobiose, produit final inhibiteur des cellobiohydrolases. (**Leghlimi, 2013**). Ces trois principaux types d'enzymes constituant le complexe cellulastique peuvent présenter différents modes d'action (**Hamoudi , 2011**).

#### **2-4-L'application des cellulases**

Les cellulase sont des enzymes très importantes utilisées dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques, thérapeutique, l'industrie des détergents et la papeterie, pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques (**Hamoudi, 2011**). Ils sont également utilisés en nutrition animale, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes et dans la production de biocarburants (pour la couverture énergétique) (**Smeets et al., 2004**).

#### **3-Estérases**

(E.C.3.1.1.x)

##### **3-1-Définition**

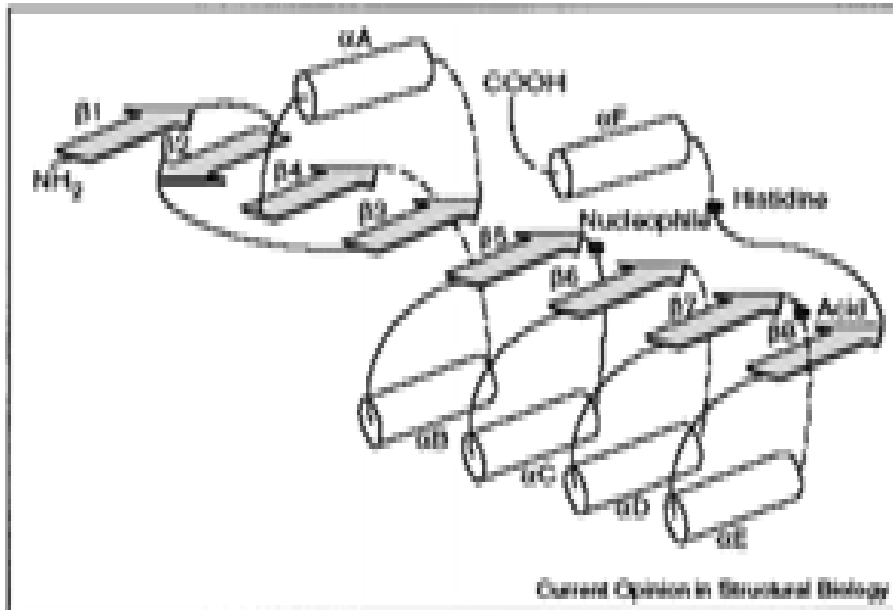
Selon la nature de leur substrat, il est possible de diviser les enzymes lipolytiques en deux catégories (**françois , 2008**).

Les estérases appartiennent au classe des hydrolases (E.C.3.1.1 carboxyle ester hydrolases) qui catalysent la formation ou la coupure des liaisons esters de composés solubles dans l'eau (**Elodie, 2008**).

Les lipases (E.C. 3.1.1.3, tri-acyl glycérol hydrolases) forment une autre catégorie majeure d'hydrolases (**Kheder, 2007**); constituant une classe particulière d'estérases capables d'hydrolyser des esters carboxyliques agrégés en phase aqueuse (**Elodie, 2008**).

##### **3-2- Structure**

La structure commune aux  $\alpha/\beta$  hydrolases comprend en minimum cinq feuillets  $\beta$ , tous parallèles sauf le feuillet  $\beta_2$ , cernés de part et d'autre par des hélices  $\alpha$ . La forme globale est de type canonique, et seule l'hélice  $\alpha_C$  est conservée à travers la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases (**Petersen et al ., 2001**) ont montré que les estérases ont un motif Gly-X-X-Leu tout comme les enzymes montrant de fortes homologues de séquence avec la classe C des L-lactamases (**Elodie, 2008**).



**Figure 05** : Schéma montrant la structure des enzymes lipolytiques « lipases / estérases» (Nardini *et al.*, 2000).

### 3-3-Mécanisme d'hydrolyse

Le mécanisme d'hydrolyse de l'estérase implique la participation de trois acides aminés soit une sérine, une histidine et un acide aspartique retrouvés au niveau d'une triade catalytique (Gariépy, 2000). Il emploie deux substrats avec libération de deux produits. Il commence par la formation d'un intermédiaire acyle-enzyme suite à l'attaque nucléophile du carbonyle du lien ester (1<sup>er</sup> substrat) par la sérine activée par une histidine proximale. Le groupement alcool de l'ester est libéré (1<sup>er</sup> produit) et l'intermédiaire tétraédrique (enzyme modifiée) formé entre l'enzyme et l'acide gras est stabilisé par des liens hydrogènes proximaux provenant de chaînes latérales situées au centre oxyanionique. L'histidine proximale active ensuite une molécule d'eau (2<sup>e</sup> substrat) qui attaque la forme acylée de l'enzyme ce qui libère l'acide gras (2<sup>e</sup> produit) et régénère du même coup l'enzyme (Guillaume, 2014).

### 3-4-L'application

la lipase joue un rôle important dans divers secteurs notamment les détergents (le plus important commercialement), les dégraissants (Catherine, 2009). Le Tableau II résume les différents domaines d'application des lipases.

**Tableau II:** les secteurs d'utilisations des enzymes lipolytiques (Amélie, 2010).

<b>Industries</b>	<b>Exemples d'applications</b>
<b>Agro-alimentaire</b>	-Développement de saveurs dans les fromages. -Transformation/production d'huiles et matières grasses. -Fermentation (saucissons, thé noir, etc...).
<b>Pharmaceutique et biomédical</b>	-Production d'énantiomères spécifique. -Biomarqueurs / indicateurs pour diagnostiquer certaines maladies. -Acide à la digestion.
<b>Produits nettoyants</b>	-Détergents pour éliminer les dépôts graisseux sur le linge et dans les tuyaux. -Transformation d'acide gras pour la production de savon.
<b>Environnement</b>	-Traitement des eaux usées. -Production de biopolymères.
<b>Pâtes et papiers</b>	-Améliorer le blanchissement du papier.
<b>Cosmétiques</b>	-Synthèse d'émollient pour des crèmes et huiles de bains.
<b>Industrie du textile</b>	-Dégrossage de peaux animales. -Modification de fibres synthétiques.

#### 4-Les Pectinases

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques (Lamrini, 2012) et leur production est élaborée par différents genres d'actinomycètes tel que : Micromonospora, Microbispora, Actinoplanes, Streptosporangium et les Streptomyces (Massaoudi, 2015).



Les substances pectiques sont des macromolécules contenant des acides galacturoniques polymérisés, de haut poids moléculaire, chargées négativement, largement répandues dans le règne végétal ou elles constituent avec l'hémicellulose et la cellulose, l'un des composants majeurs de la paroi des cellules végétales (**Haberra, 2014**).

Par définition, les pectinases forment une catégorie d'enzymes [polygalacturonases (E.C 3.2.1.15 et E.C 3.2.1.67), pectine lyases (E.C 4.2.2.10) et pectate lyases (E.C 4.2.2.2)] qui coupent les liaisons glycosidiques des résidus d'acide galacturonique dans les matériaux pectiques (**Kheder, 2007**). Il est important de mentionner que les pectinases sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Lamrini, 2012**).

Finalement, Les enzymes pectinolytiques sont classées parmi les enzymes les plus importantes dans le secteur industriel (**Massaoudi, 2015**) et largement utilisées dans l'industrie alimentaire telle que la clarification des jus de fruits, la fermentation du café et du thé (**Haberra, 2014**).l'extraction des huiles d'olive, de colza et de tournesol. En effet, ces enzymes réduisent les propriétés émulsifiantes des pectines et permettent la dégradation de la paroi cellulaire, puis les huiles sont libérées facilement (traitement enzymatique) (**Lamrini, 2012**). Dans l'extraction du pétrole, le traitement des eaux usées industrielles contenant des matières pectiques et d'autres industries, l'application des pectinases est en cours de réalisation (**Lamrini, 2012**).

### **5-Protéases**

Les enzymes protéolytiques font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Ces enzymes peuvent être localisées dans le domaine intracellulaire ou extracellulaire (**Belmessikh,2011**).

Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques et permettent ainsi le clivage des protéines, mais différent dans leur mode d'action sur les polypeptides. Il existe 2 familles de protéases (**Jyothi, 2010**), les exoprotéases (les peptidases), et les endoprotéases (Les protéinases) (**Jyothi,2010**).

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont les actinomycètes, de moisissures et de levures. Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (**Belmessikh, 2011**). Elles sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires et le caillage du lait pour la production du fromage (**Hupé, 2008**). Dans l'industrie pharmaceutique et médicale elles sont utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces, par exemple des collagénases provenant de *Clostridium sp* ou des subtilisines qui sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlures, des plaies et des ulcères dermiques (**Belmessikh, 2011**).

## **I.1 Matériel**

### **I.1.1 Matériel biologique**

#### **a) Souches bactériennes de *Streptomyces* :**

Isolées par l'équipe du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de Tizi-Ouzou en 2015 et fournies par notre encadreur M. CHERGUI Achour.

Ces souches bactériennes ont été isolées à partir de l'eau de source naturelle de la région de Kabylie : CA28 isolée à partir d'eau de source de la région montagneuse de Tikjda (W. BOUIRA), CA30 et CA36 isolées à partir d'eau de source naturelle de la commune de Mekla Wilaya de Tizi-Ouzou.

Après leur purification et identification morphologique, les souches sont conservées dans des tubes contenant le milieu ISP2 à -20°C en présence d'un cryoprotecteur (glycérol) en plusieurs exemplaires pour leurs utilisations ultérieures.

#### **b) Bactéries cibles pour la recherche de l'activité antibactérienne :**

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons choisi deux bactéries pathogènes :

*Staphylococcus aureus* FRIS6, *Bacillus cereus* ATCC10876.

Ces bactéries sont des souches de référence isolées en 2015 des produits carnés au niveau de la Wilaya de Tizi-Ouzou et identifiées au laboratoire des *Staphylococcus* en France, par M. TITOUCHE. Y du laboratoire LABAB de Tizi-Ouzou.

### **I.1.2 Equipements et verrerie**

Les listes d'équipements, verreries et autres appareillages utilisés sont données dans les annexes.

## **II. Méthodes**

### **II.1. Revivification des souches de Streptomyces**

La revivification des souches a été réalisée sur le milieu gélosé ISP2 (dont la composition est mentionnée dans l'annexe2) additionné de l'acide Nalidixique à 10µg/ml pour éviter la contamination de bactéries à Gram négatives. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 28 °C pendant 10 jours.

### **II.2.Mise en évidence des activités enzymatiques**

#### **II.2.1.Recherche de l'activité alpha-amylase**

Ce test est réalisé sur le milieu ISP9 contenant 1% de l'amidon soluble selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies à l'inverse les zones contenant de l'amidon qui se colorent en brun.

#### **II.2.2.Recherche de la cellulase**

Cette activité a été testée sur le milieu ISP9 additionnée de cellulose à 1% .Le milieu est coulé dans des boites de Pétri puisensemencé par des stries de la souche à tester et incubé à 28°C. Après 14 jours, une solution aqueuse de rouge Congo à 1% pendant 15 mn permet de mettre en évidence la dégradation de la cellulose (**Pinky et al., 2012**).

#### **II.2.3.Recherche de la caséinase**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**. Sur le milieu ISP9 contenant 1% de caséine, les colonies sontensemencées par stries. L'apparition de toute zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 28° C, témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

#### **II.2.4.Recherche des lipases (estérases)**

La recherche de l'estérase est réalisée sur le milieu ISP9 ajouté de tween 80(C64H124O26). Après 14 jours d'incubation à 28° C, l'apparition d'un halo opaque autour des colonies traduit la présence d'une estérase (**Camille, 2007**).

#### **II.2.5.Recherche de la Pectinase**

Ce test est réalisé sur le milieu ISP9 ajouté de 1 % de pectine. Les colonies sontensemencées par stries puis incubé pendant 5 jours à 28° C (**Camille, 2007**). Les boites sont recouvertes par la solution d'acétate de cuivre et laissées à température ambiante pendant quelques minutes. L'apparition d'un halo claire indique la présence d'une activité pectinolytique.

## **II.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne**

### **II.3.1. Méthode des puits**

### **II.3.2. Préparation de l'inoculum des souches cibles**

Chaque germe cible est inoculé dans le bouillon BHIB et incubé pendant 24h à 37°C.

### **II.3.3. Préparation des surnagent**

Les souches de *Streptomyces* sont mises en culture dans 50ml de bouillon ISP2 et incubées pendant une semaine à 28°C, puis les surnageants sont récupérés pour tester leur activité antibactérienne.

### **II.3.4. Réalisation du test**

-Deux puits de 5mm sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte pièce (le bout ouvert de la pipette pasteur) sur la gélose nutritive inoculée par la souche pathogène.

-Le premier puits contenant de l'eau distillée stérile (témoin négatif), le deuxième renfermant la souche de *Streptomyces*.

-Laisser sur la paillasse 1 à 2h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne.

-Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h (**Lemriss *et al.*, 2003 ; Valanarasu *et al.*, 2010**).

### **II.3.4. Lecture du résultat**

Après 24h d'incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour des puits contenant les extraits d'actinomycètes contenant des antibactériens actifs contre la souche test. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, en utilisant une règle graduée. La présence de zones d'inhibition claires autour des puits, indique un résultat positif qui montre que les bactéries sont sensibles aux substances produites par les actinomycètes. Plus cette zone est grande, plus l'activité antibactérienne est importante (**Petrosyan *et al.*, 2003**).

## **II.3.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice**

### **II.4.1. Méthode des dilutions en milieu liquide**

#### **a) Principe**

Il s'agit de mettre un inoculum bactérien en contact des concentrations décroissantes d'antibiotiques afin de déterminer, après un temps de contact à 37°C, la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber 99 % de l'inoculum.

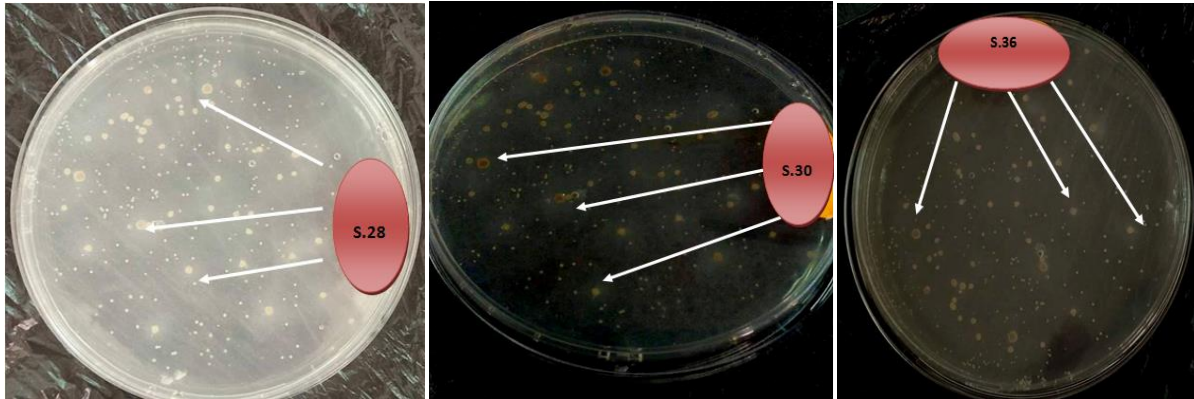
**b) Réalisation du test**

A partir de la solution mère de l'extrait d'actinomycètes à tester une série de tubes à essais est préparée avec différentes dilutions (on utilisant le facteur  $\frac{1}{2}$ ). Puis, le même volume (1ml) de la suspension du germe cible standardisée est ajouté dans chaque tube , à l'exception du premier qui servira de témoin de croissance de la souche à tester. La galerie ainsi préparée sera incubée à 37°C pendant 18 heures. Après quoi on les observe macroscopiquement, Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice, encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée.

## I. Mise en évidence des activités enzymatiques

### I.1. Dégradation du tween 80

Le test de tween 80 montre un résultat positif pour toutes les souches actinomycétales étudiées. Cette activité se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie, visible sans l'ajout d'aucun réactif.



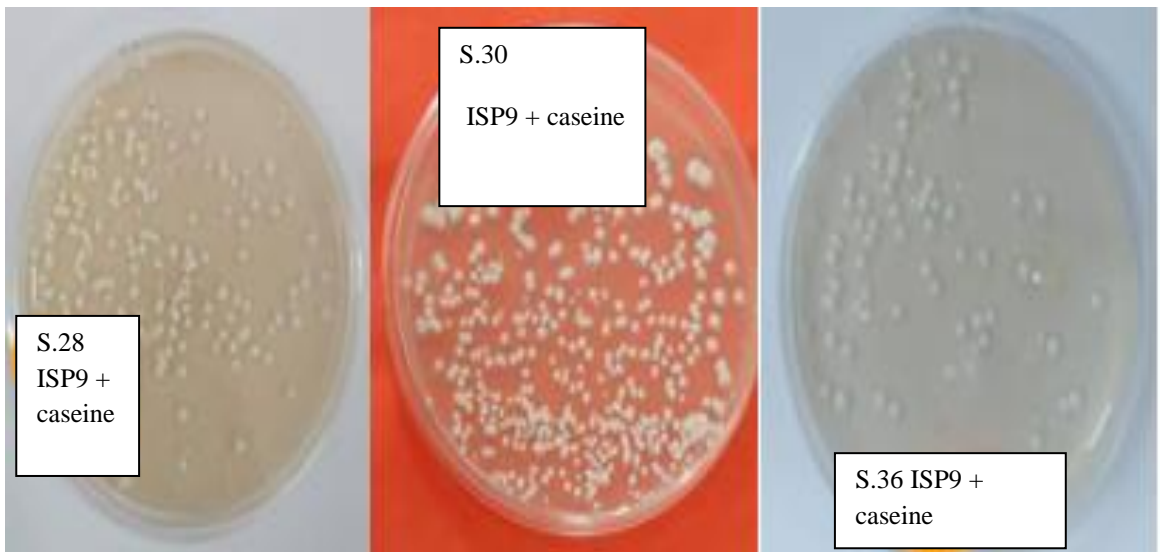
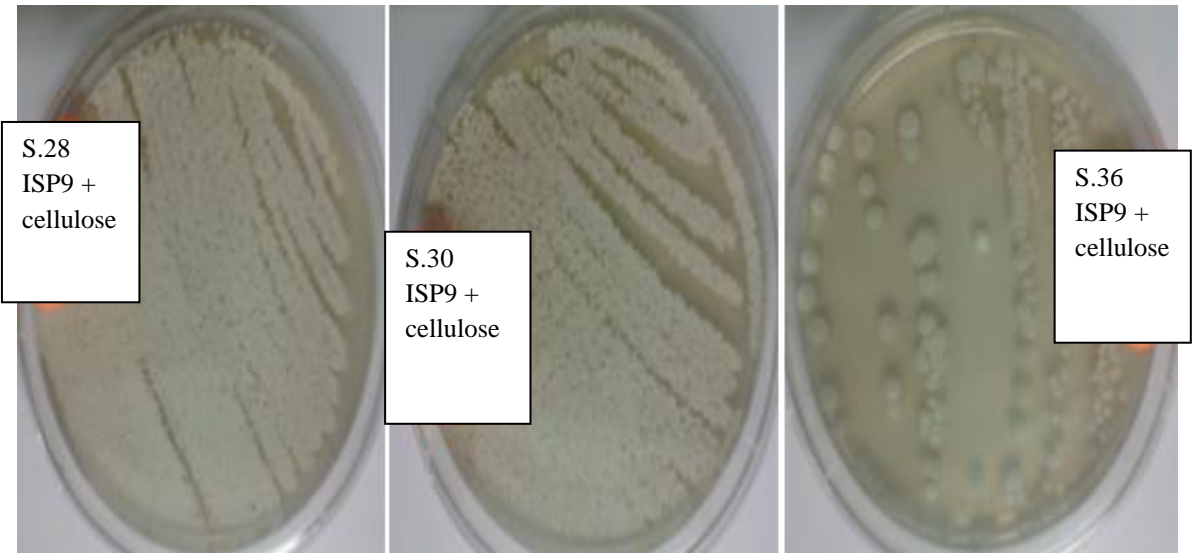
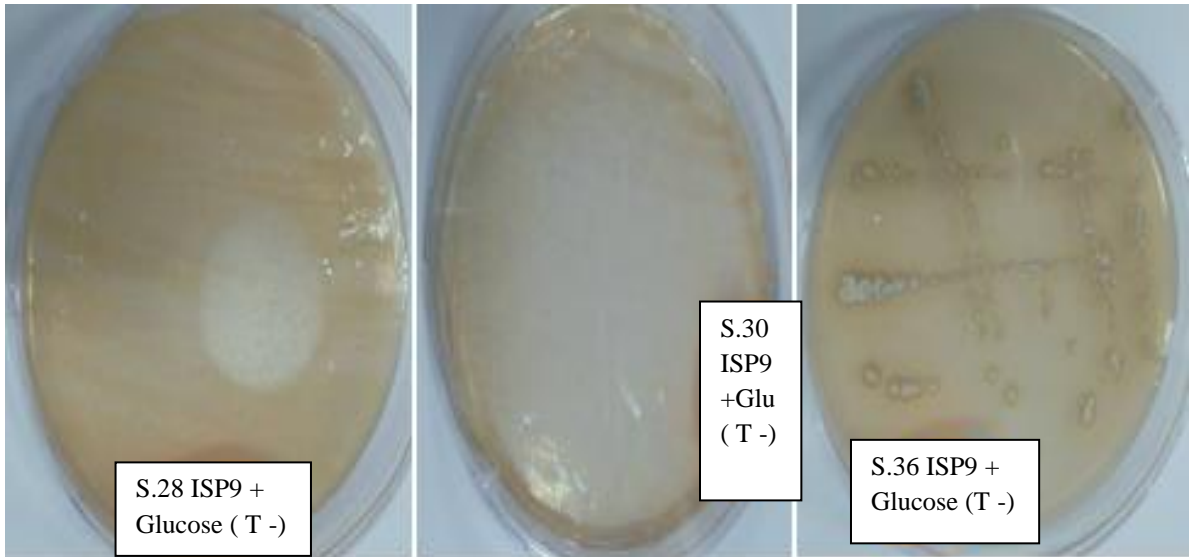
**Figure 06 :** Photographie présentant le résultat de l'activité lipolytique des souches : S28, S30 et S36 correspondant aux zones claires montrées par les flèches.

**Iftikhar et al. (2002)**, ont démontré que le tween 80 additionné dans le milieu à la concentration de 1% peut être considéré comme une meilleure source de carbone qui permet une forte production de lipase.

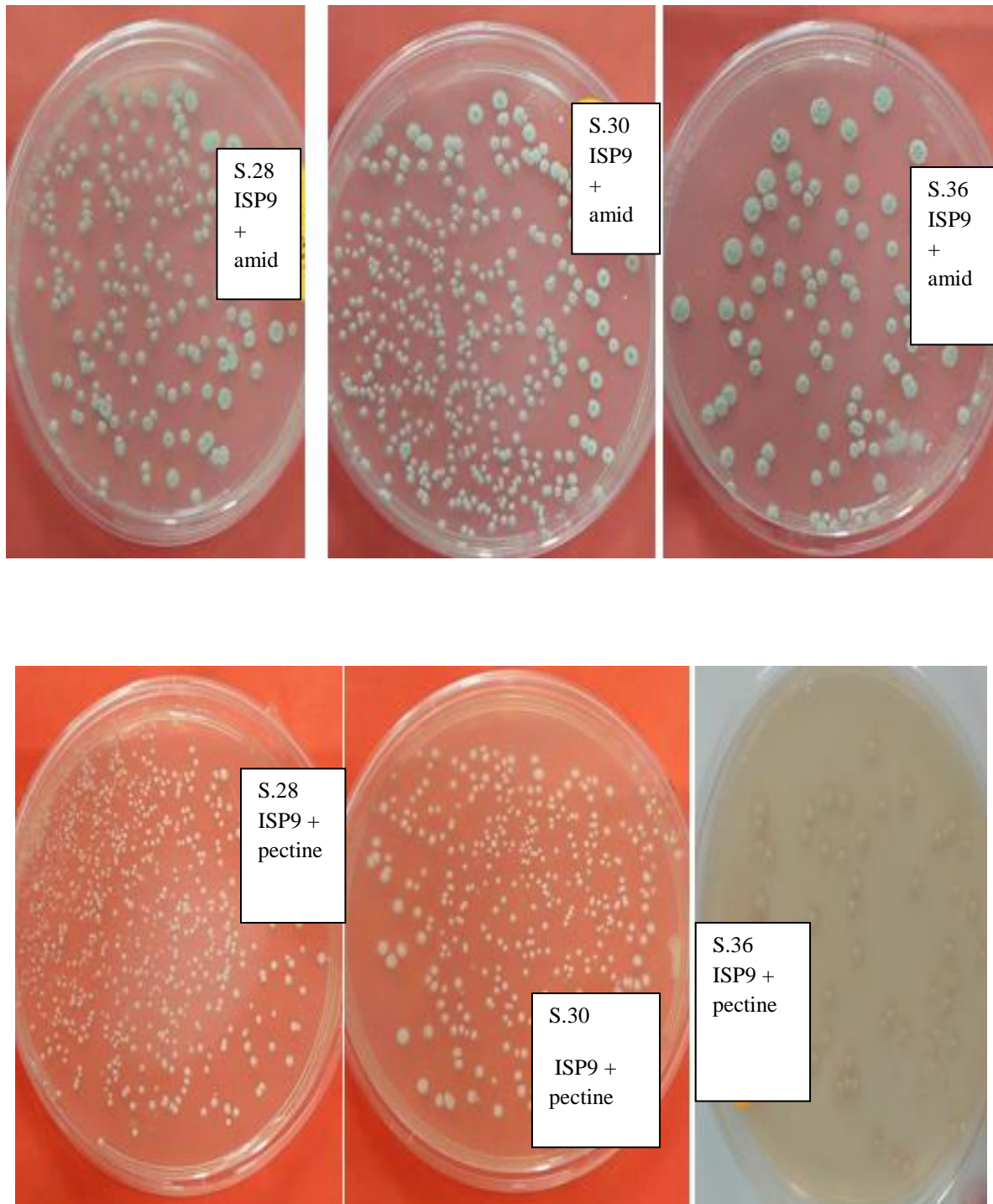
### I.2. Dégradation de l'amidon, cellulose, pectine et caséine

Toutefois, lors de la recherche de l'activité enzymatique des différentes enzymes (alpha amylase, cellulase, Pectinase et caséinase) sur le milieu ISP9 et selon les substrats respectifs (amidon, cellulose, pectine et caséine), cette dernière n'est pas nettement apparente (absence de zones claires) et ce, en dépit du bon développement du *Streptomyces* sur les substrats et comparativement au milieu ISP9 + glucose servant de témoin où on a enregistré un très faible développement de la souche considérée. (**figure07**).

Cela atteste de la production des enzymes en question et s'expliquerait, selon (**lemriss et al., 2003**) par l'influence de certains paramètres réactionnels sur l'issue de l'activité enzymatique dont on citera, notamment, le pH du milieu, la faible concentrations du substrat et de l'enzyme d'une part, et d'autre part la mauvaise diffusion de cette enzyme. Afin d'y remédier et d'améliorer la performance enzymatique, il serait nécessaire de procéder à l'optimisation maximale des paramètres sus-cités.







**Figure 07:** photo montrant le résultat de la croissance bactérienne des *Streptomyces* sur les différents substrats en comparaison avec le témoin négatif.

En effet, les données littéraires ont rapporté que les actinomycètes sont capables de produire un grand nombre d'enzymes, qui sont d'une valeur commerciale **élevée** (Zhou *et al.*, 2000 ).

*Streptomyces* est le genre le plus étudié des actinomycètes. Ce genre est capable de produire une large variété d'enzymes :

**Jeffrey et Azrizal, (2007)** ont rapporté la production des cellulases à partir de *Streptomyces gancidicus*, *Streptomyces malachitofuscus*, *Streptomyces stramineus* et *Streptomyces glomeratus* isolés de différentes locations à Peninsular en Malaisie.

Des lipases, des amylases, et des pectinases ont été aussi produites à partir de *Streptomyces* (**Stamford et al., 2001 ; Rodrigues 2006**).

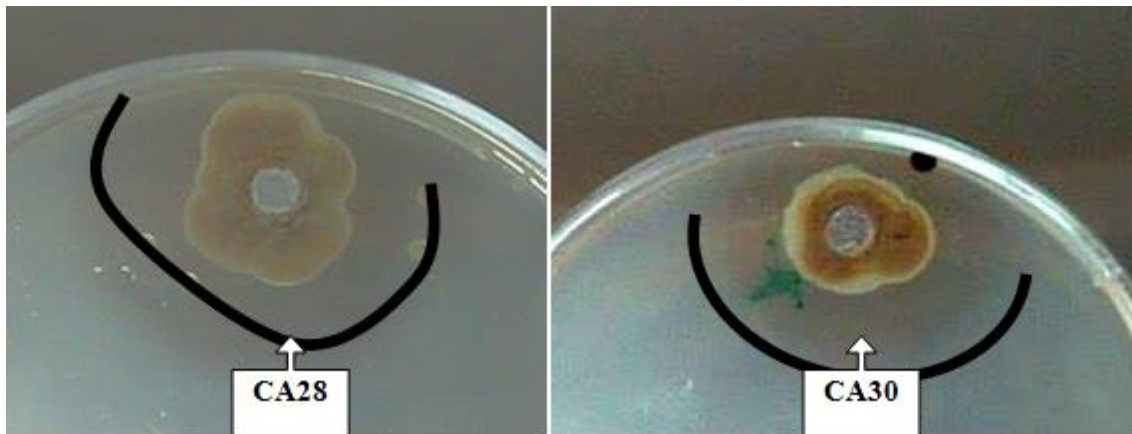
## **II. Mise en évidence de l'activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne de nos souches a été mise en évidence par la technique des Puits. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Elle nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les bactéries-tests utilisées (**Tortora et al., 1979**). La croissance de la bactérie-test inoculée sur la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice et cela par l'apparition d'une zone translucide au niveau de la zone de diffusion, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

le choix du bouillon BHIB a été dicté par sa spécificité et sa richesse permettant une bonne croissance aux bactéries-tests et offrant des résultats claires grâce à sa limpidité.

Les isolats CA28 et CA30, sélectionnés à partir d'eau de source naturelle de grande Kabylie, ont montré une activité contre une seule bactérie teste (*Staphylococcus aureus*) par rapport à la souche CA36. N'a montré aucune activité.

Le diamètre de la zone d'inhibition le plus important a été enregistré avec l'isolat **CA28** avec 13,83 mm. par rapport à 9,95 mm pour l'isolat CA30.



**Figure 08 :** Activité antibactérienne des souches CA28, CA30 contre *Staphylococcus aureus* démontre par la technique de diffusion des puits.

Aucun des isolats n'a présenté d'activité vis-à-vis *Bacillus cereus*.

**Srivibool et Sukchotiratana. (2006)**, ont obtenu des résultats comparables et ont expliqué que l'absence d'activité antibiotique vis-à-vis de souches de *Bacillus cereus* ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car n'étant pas polaire ou alors qu'elle est constituée de composition non polaire.

Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les actinomycètes.

Il est également probable que cette bactérie nécessite, pour la production de certaines substances antibiotiques, des milieux de culture spécifiques. (**Boughachiche et al., 2005**) et (**Boudemagh et al., 2005**), expliquèrent que les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes dont la nature dépend de la composition du milieu de culture.

Selon nos résultats, les *Staphylococcus aureus* présentent une grande sensibilité aux antibiotiques produits par les actinomycètes. Bien qu'il a été démontré que cette dernière est multiresistante à une large gamme d'antibiotiques conventionnels d'où l'importance de l'activité antimicrobienne de nos souches d'actinomycètes.

Le *Staphylococcus aureus* est la cause d'un grand nombre d'infections sévères, telles que les septicémies, les endocardites, les pneumonies, les infections des tissus mous, des os et des

articulations. Malgré un traitement approprié, la mortalité due à ces infections à *Staphylocoques dorés* reste élevée elles atteignent (20 à 30 %).

Aujourd'hui, 90 % des souches de *Staphylococcus aureus* sont non seulement résistantes à la pénicilline G mais aussi aux pénicillines à large spectre. En Algérie, le taux de résistance à la pénicilline G est d'environ 12,5 % (Smati *et al.*, 1994). Les pourcentages de résistance à la pénicilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM) étaient les plus élevés dans les pays du Sud de l'Europe (la Grèce 44 %, l'Italie 38 %, le Portugal 38 %, la France 33 % et l'Espagne 23 %). Comparé à 2001, les pourcentages de SARM en 2002 étaient demeurés identiques pour la France mais avaient augmenté (de 19 à 22 %) pour l'ensemble de ces pays.

Ce résultat est très encourageant car il montre l'importance de nos souches d'un part, et confirme, d'autre part, les données bibliographiques qui soulignent le pouvoir antibactérien remarquable que possède ce genre de microorganismes (Sibanda *et al.*, 2010).

### III. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Suite aux résultats positifs obtenus lors de la recherche de l'activité antibactérienne des souches CA28 et CA30 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (FRIS6), la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est limitée au germe en question.

La CMI n'est pas, pour une bactérie donnée, une constante biologique. Elle est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en, demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible. La CMI est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures suivantes :

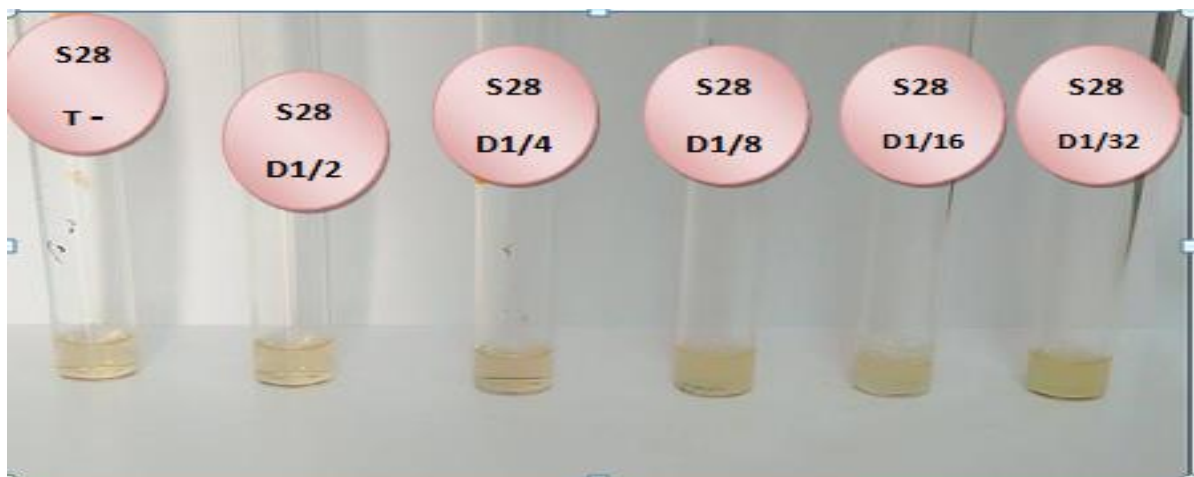


Figure 09 : photo montrant le résultat de la CMI de la souche S.28.

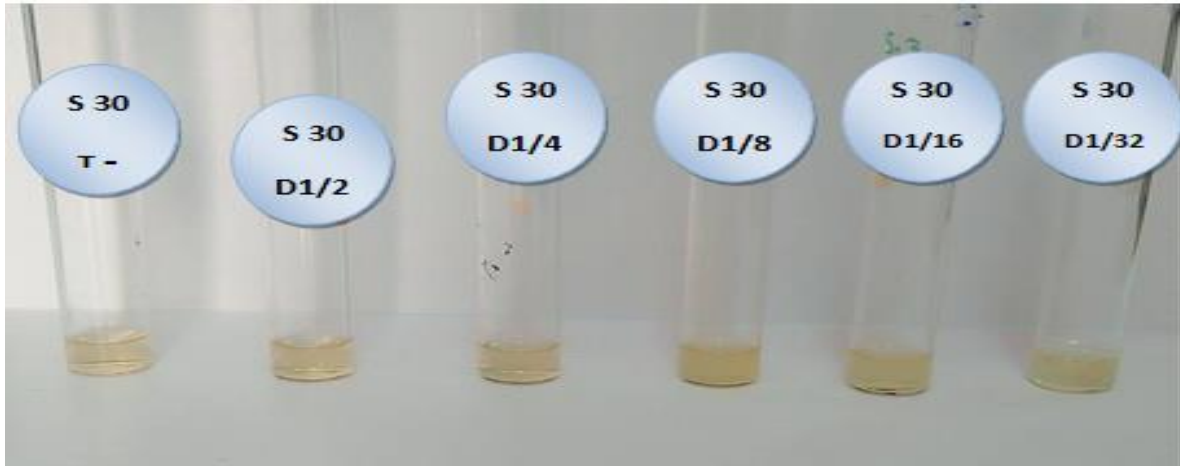


Figure10 : photo montrant le résultat de la CMI de la souche S.30

Les résultats de la détermination de la CMI des 02 souches étudiées sont illustrés dans le tableau ci-dessous

**Tableau III** : Inhibition de la croissance de *S. aureus* par l'extrait d'*actinomycètes* par la méthode de dilution en milieu liquide.

(+) : présence de trouble dans le tube; (-) : absence de trouble

Dilution Souches	C0(témoin négatif)	C1/2	C1/4	C1/8	C1/16	C1/32
S.CA28	---	---	---	+++	+++	+++
S.CA30	---	---	---	+++	+++	+++

D'après les résultats du tableau III, l'apparition du trouble dans les tubes débute dès la dilution de 1/8 pour les deux souches d'*actinomycètes* étudiées sur *S. aureus*. (FRIS6). L'absence de trouble dans les dilutions de 1/2 et 1/4 des deux souches s'explique par l'inhibition de leur croissance par les deux bactéries CA28 et CA30 dont le calcul de la CMI est de 4UA.

L'apparition de trouble à partir de la dilution de 1/8 est dû à la résistance de *Staphylococcus aureus* à la concentration 8UA.

Les extraits d'*actinomycètes* ont donc une action bactériostatique vis-à-vis *S.aureus*. Ceci confirme l'étude de (Lee et al., 2003) qui a montré l'effet antibactérien des autres microorganismes sur les bactéries à gram + et complète les conclusions de (Polyak et al., 2007).





La recherche de nouveaux produits naturels bioactifs est absolument nécessaire, d'une part pour lutter contre le nombre croissant de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques et d'autre part la recherche d'enzymes d'intérêt industriel.

Durant ces dernières années les chercheurs se sont orientés même vers la recherche des Actinomycètes dites rares afin de trouver de nouvelles molécules bioactives.

Les objectifs essentiels de ce travail étaient la mise en évidence de la production d'enzymes bactériennes, d'intérêt industriel et la recherche de nouvelles activités antibactériennes à l'égard de souches pathogènes multi résistantes.

L'activité antibactérienne des trois souches actinomycétales (CA28, CA30 et CA36) a été mise en évidence par la technique de diffusion des puits vis-à-vis de deux souches pathogènes : *Staphylococcus aureus* (FRIS6) et *Bacillus cereus* (ATCC10876)

Les résultats obtenus montrent que les 02 souches actinomycétales étudiées présentent une activité antibactérienne contre la souche de *S.aureus* testée.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été faite par la méthode de dilution sur milieu liquide, où la valeur de 4 UA a été obtenue.

D'autre part, toutes les souches étudiées ont montré des activités enzymatiques. la lipase est l'enzyme la plus produite par nos souches, elle est la seule matérialisée par une zone claire autour des colonies.

Notre étude n'est qu'une ébauche et nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi, car plusieurs perspectives peuvent être envisagées, notamment :

- L'extraction, la séparation et l'identification structurale des substances actives produites par les isolats d'actinomycètes sélectionnés.

- Le test *in vivo* de la toxicité des antibiotiques sécrétés sur des rats.
- L'optimisation des conditions de production des enzymes industrielles étudiées suivi des protocoles d'extraction et purification.

## Reference

**Aouiche A.,(2006).**Activité antimicrobienne de *streptomyces* sp. PAL 111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotique. Journal de Mycologie Médicale,France :02p

**Amélie C., (2010).**Identification Et Caractérisation De Nouvelles Enzymes Lipolytiques Thermostables Provenant D'une Banque Métagénomique. Mémoire de Magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier.38p.

**Avramenko SV and Galynkin VA (2010).** Features of Biosynthesis of Chitinolytic Enzymes by *Streptomyces griseus* Var. *Streptomycini*. Applied Biochemistry and Microbiology,Vol. 46, No. 4, pp. 405–408.

**Belmessikh A., (2011).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine.Algérie.25p.

**Benabdallah A., (2014).**Screening de souches extrémophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkhia D'Oran (caractérisation phénotypique). Mémoire De Master. Université de Tlemcen. Algérie.35p.

**Benaouida K., (2008).**Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire Magistère. Université Mentouri. Constantine. 104p.

**Benouagueni S., (2012).**Recherche De Nouvelles Souches D'actinomycètes Productrices De Molécules Antifongique (Cas Des Eaux Du Lac Mellah D'EL Kala). Thèse de Doctorat .Université Badji Mokhtar-Annaba. Algérie.44p

**Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. (2005).** Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. J Myc Med., 15:39–44.



**Boughachiche F., (2012).** Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebka. Thèse de Doctorat. Université Mentouri- Constantine. Algérie. 26p

**Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005).** Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebka de Ain Mlila. *Sciences Technologie*, 23:5–10.

**Catherine M., (2009).** Isolement Et Caractérisation D'enzymes Lipolytiques Par Criblage D'une Banque Métagénomique. Mémoire de Magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. 27p.

**Camille D., (2007).** Microbiologie pratiques pour le laboratoire d'analyse et de contrôle sanitaire. Lavoisier. 126-173.

**Danilenko. V.N; Mironov. V.A; and Elizarov. S.M. (2005).** Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *App. Biochem. Microbiol.* 41(4)319–329.

**Demain, A.L. (2000).** Small bugs, big business: the economic power of the microbe.

*Biotechnol Adv*, 18(6): 499-514.

**Elodie N., (2008).** Biodégradation du 2-éthylhexyl nitrate par *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173 : De l'élucidation de la voie de dégradation aux enzymes impliquées. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier Grenoble. 38-41p.

**François Hupé J., (2008).** Enrichissement Et Recherche De Certaines Activités Enzymatiques Produites Par Des Bactéries Aérobies Thermophiles. Mémoire De Magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. 5-18p.

**Gariépy m., (2000).** Étude Du Mécanisme D'Action D L' Acétyle-Xylane Estérase a De *Stretomyces* Lividans. Mémoire De Magister. INRS-Institut Armand-Frappier. 7p.

**Gordon R. E. and Smith M. M., (1953).** Rapidly growing, acid fast bacteria Species descriptions of *Mycobacteriimu* *J. Bacteriol.* 66: 41-48.

**Guillaume B., (2014).** Approche Enzymatique Pour La Synthèse D'esters Carboxyliques Employés Industriellement Comme Aromes Et Fragrances. Thèse de Doctorat. Université du Québec Institut national de la recherche scientifique.18-20p.

**Haberra S., (2014).** Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. Thèse de Doctorat. Faculté Des Science Département De Biochimie.17p.

**Hamoudi H., (2011).** Criblage de souches d'*actinomycètes* productrices de cellulases industrielles. Mémoire De Magister. Université A.Mira de Bejaia. Algérie.14p.

**Hupé J., (2008).** Enrichissement Et Recherche De Certaines Activités Enzymatiques Produites Par Des Bactéries Aérobie Thermophiles. Mémoire de Magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier.5p.

**Jana, S., Deb, J.K. (2006).** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70(2): 140–150.

**Jeffrey LSH and Azrizal MR (2007).** Screening for cellulase activities in actinomycetes isolated from different locations of Peninsular Malaysia. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. Vol.35, No 1, 153–157.

**John W. B., Michael E. H., Linghao Z., Michael F. C., and Mark R. N. (2005).** Towards Understanding the Action of Cellulases: Molecular Dynamics Simulation of *T. reesei* Cellobiohydrolase I and Crystalline Cellulose. Department of Food Science.55p.

**Jyothi B., (2010).** Production Améliorée, Récupération Et Application D'une Protéase Alcalin Produite En Utilisation Les Boues D'Épuration Comme Substrat. Thèse de Doctorat. Université du Québec Institut national de la recherche scientifique .7-17p.

**Keulen G.V., Jonkers H.M., Cloesson D., L. D. and Woston H.A.B. (2003).** Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185 (4), 1455-1458.

**Kheder F., (2007).** Production et Purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse d'esters phénoliques. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique De Lorraine.4-39p.

**Kherraz Z., Lorbi S., (2015).** Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures. Mémoire de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar D'El-oued. Algérie.24p.

**Kitouni M., (2007).** Isolement De Bactéries Actinomycétales Productrices D'antibiotiques à Partir D'écosystèmes Extrêmes .Identification Moléculaire Des Souches Actives et Caractérisation Préliminaire Des Substances Elaborées .Doctorat d'état. Université Mentouri-Constantine. Algérie.22p.

**Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M., (2004).** Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 54, 211-214.

**Korish M., (2003).** Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg- University, Mainz, Germany.13p.

**Lamari L., (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*.33p.

**Lamrini S ., (2012).** Etudes préliminaires des propriétés physico-chimiques de cellulases et pectinases chez des isolats microbiens. Mémoire de magéster. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.14-28p.

**Leghlimi H., (2013).** Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes.Thèse de Doctorat. L'Université De Reims Champagne- Ardenne.5-10p.

**Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J. M., Saintpierre-Bonaccio, D.,Rifai, S., Fassouane, A., Boiron, P. (2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49(11): 669–674.

**Loucif K., (2011).** Recherche De Substance Antibactériennes À Partir D'une Collection De Souches D'Actinomycètes. Caractérisation Préliminaire De Molécules Bioactives. Mémoire De Magister. Université Mentouri-Constantine.Algérie.66p

**Madigan M. T., Martinko J.M. et Parker J. (1997).** Biology of microorganisms. *Printice Hall International Inc, New York*: 146-147.

**Maktouf S.,(2013).** Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus* Production sur milieu solide et caractérisation. Thèse de Doctorat. Université De Toulouse .27p.

**Malhotra R., Noorwez S. M., Satyanarayana T. (2002).** Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol*, 31(5):378-384

**Massaoudi Y., (2015).** Contribution à la recherche et l'isolement de *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) et à la caractérisation des bactéries productrices d'enzymes hydrolytiques et à effet antagoniste de *Dickeya* sp. Mémoire de Magister. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.13p.

**Merizig H.,Naami F., (2015).** Etude taxonomique de quelques souches d'actinomycètes isolées de la région de Ouargla. Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah Ouaregla. Algérie.15p

**Nardini, M.,Lang ,D. A. ,Liebeton, K. ,et al.(2000).**Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* 275(40) :31219-25.

**Nouadri T., (2011).** L' $\alpha$ -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Thèse de Doctorat. Université Mentouri –Constantine. Algérie.28p

**Pamboukian C. R. D., Guimarães L. M. and Facciotti M.C. R. (2002).** Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture . *Braz. J. Microbiol.* 33 (1), 17-21.

**Petersen, E. I., Valinger, G., Solkner, B., Stubenrauch, G. & Schwab, H. (2001).** A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases. *J Biotechnol* 89, 11-25.

**Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madriral A., Huitron C. et Floress M.E. 2003.** *Streptomyces mexicans* Nov., à xylanolytic microorganism isolated from soil. *Int.Jo. Syst.Evol.Microbial.*53 : 269-273.

**Pinky P (2012).**In vitro Cellulose Rich Organic Material Degradation by Cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768).*Mal. J. Microbiol.* Vol 8(3) 2012, pp. 164-169.

**Rodrigues K (2006).** Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. MSc Dissertation. Agricultural and Environmental Microbiology Post-Graduation. Universidade Federal Rio Grande do Sul, Brazil. p. 129.

**Saci A., (2012).** Production d'alpha-amylase par *Streptomyces sp.* Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Thèse de Doctorat. Université Mentouri, Constantine. Algérie.07p

**Sibanda T, Mabinya LV, Mazomba N, Akinpelu DA, Bernard K, Olaniran AO and Okoh AI**

**(2010).** Antibiotic producing potentials of three freshwater actinomycetes isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. Int. J. Molecular. Sci. 11: 2612-2623

**Smaoui.S.,(2010).** Génie de Procédés et Environnement : Purification et

Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.pp182

**Smeets E., Faaij A., Lewandowski I. (2004).** A quickscan of global bioenergy potentials to 2050. Report NWSE2004109, ISBN 9039339090, enzymes in detergent surfactant science series. 69. P: 175-202.

**Srivibool R. and Sukchotiratana M. (2006).** Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. Songklanakarin J. Sci. Technol., **28**, 493-499.

**Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB and Araujo JM (2001).** Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardioopsis sp.* endophyte of yam bean . Bioresource Technology,vol.76, no.2,pp. 137–141,2001.

**Strub. C; Brandam. C; Meyer. X and Lebrihi. A. (2008).** Investigations of *Saccharothrix algeriensis* Growth on Synthetic Media. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 106 (2),148-153.

**Sujatha P., Bapi-Raju K. V. V. S. N. and Ramana T. (2005)** .Studies on a new marine *streptomycte* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160: 119-126.

**Syed DG, Agasar D and Pandey A (2009).** Production and partial purification of  $\alpha$ - amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis* . Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 36,no.2, pp.189–194.

**TEODORO C.E.D., MARTINS M.L.L. (2000).** Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. (31):28-302.

**Thomson, C.J., Power, E., Ruebsamen-Waigmann, H., Labischinski, H. (2004).** Antibacterial research and development in the 21(st) Century-an industry perspective of the challenges. Curr Opin Microbiol,7(5):445–50.

**Valanarasu, M., Kannan, P., Ezhilvendan, S., Ganesan, G., Ignacimuthu, S., Agastian, P. (2010).** Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Med Mycol*, 20(4): 290–297.

**Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. Arch Microbiol, 176(5): 386–90.

**Williams and Cross (1971).** Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. Methods Microbiol. 4 : 295-334.

**Zhou X, Huang J, Ou Z, Wang H and Wang R (2000).** Conditions of enzyme production and properties of alkaline lipase by *Streptomyces* Z94-2. Wei Sheng Wu Xue Bao. 40, 75–79.

**Zouaghi A., (2007).**Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Projet de fin d'études. Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie. Tunisie.13p



## **Annexe 1 : liste de verrerie, équipement et autres**

### ✓ **verrerie et matériel en plastique**

- Boites Pétri.
- Bécher.
- Pipettes pasteur.
- Erlenmeyer de 500 ml .
- Micropipettes 50,500 et 1000  $\mu$ l
- Portoir.
- Tubes à essais stériles.
- Fiole graduées a 100 ml.

### ✓ **Equipement**

- Bain marie réglable à 100°C (nuve bath).
- Réfrigérateur (Maxipower).
- pH mètre électronique (HANNA)
- Plaque chauffante réglable à 90°C (hotplate stirrer)
- Balance de précision (scout se).
- Agitateur. (Stuart)
- Etuves réglables à 37°C et à 28°C (venticell).
- Auto clave (WiseClave)
- Hotte chimique et hotte microbiologique. (CRUMA FL-2)
- Bec bunsen (Erd gass).



## **Annexe 2 : composition des milieux de culture**

### **ISP1 (international Streptomyces Project selon smaoui, 2010)**

Extrait de levure .....3 g/l  
Tryptone..... 5 g/l  
Agar..... 15 g/l

pH: 7-7.1

### **ISP2 (smaoui, 2010)**

Agar.....20g/l  
Extrait de levure.....4g/l  
Extrait de malt.....10g/l  
Glucose.....4g/l

pH: 7,3

### **ISP9 (smaoui, 2010)**

Agar.....20g/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2,38g/l  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....5,65g/l  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....1g/l  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>.....2,64g/l  
Solution saline .....1ml.

pH : 6,8 -7,0

### **Gélose nutritive (Guiraud, 2003)**

Peptone..... 10g/l  
Extraits de viande..... 5g/l  
Glucose.....10g/l  
Chlorure de sodium .....5 g/l  
Agar..... 9g/l  
Eau distillée..... qsp 1l

pH = 7,2

### **bouillon cœur cervelle (BHIB) (Guiraud,2003)**

proteose-peptone.....10g/l  
infusion de cervelle de veau..... 12.5g/l  
infusion de cœur de bœuf.....5g/l  
chlorure de sodium.....5g/l

phosphate disodique.....2.5 g/l  
glucose.....2g/l  
eau distillée qsp.....1000ml

**N.B.** Tous les milieux utilisés sont stérilisés pendant 20mn à 120°C.

L'ajustement du pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH  
ou d'une solution d'HCl.

### **Annexe 3: composition de réactif**

#### **Solution saline standard**

FeSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
Eau distillée.....	100 ml

#### **La solution aqueuse de Rouge Congo**

Rouge Congo.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

#### **La solution d'acétate de cuivre**

Acétate de cuivre.....	10 g
Eau distillée.....	100 ml

#### **La solution de lugol**

iodure de potassium.....	2g
Iode métalloïde I <sub>2</sub> .....	1g
Eau distillée.....	100ml

#### **Eau distillé stérile.**

#### **Eau physiologique.**

## **Annexe 1 : liste de verrerie, équipement et autres**

### ✓ **verrerie et matériel en plastique**

- Boites Pétri.
- Bécher.
- Pipettes pasteur.
- Erlenmeyer de 500 ml .
- Micropipettes 50,500 et 1000  $\mu$ l
- Portoir.
- Tubes à essais stériles.
- Fiole graduées a 100 ml.

### ✓ **Equipement**

- Bain marie réglable à 100°C (nuve bath).
- Réfrigérateur (Maxipower).
- pH mètre électronique (HANNA)
- Plaque chauffante réglable à 90°C (hotplate stirrer)
- Balance de précision (scout se).
- Agitateur. (Stuart)
- Etuves réglables à 37°C et à 28°C (venticell).
- Auto clave (WiseClave)
- Hotte chimique et hotte microbiologique. (CRUMA FL-2)
- Bec bunsen (Erd gass).

## **Annexe 2 : composition des milieux de culture**

### **ISP1 (international Streptomyces Project selon smaoui, 2010)**

Extrait de levure .....3 g/l  
Tryptone..... 5 g/l  
Agar..... 15 g/l

pH: 7-7.1

### **ISP2 (smaoui, 2010)**

Agar.....20g/l  
Extrait de levure.....4g/l  
Extrait de malt.....10g/l  
Glucose.....4g/l

pH: 7,3

### **ISP9 (smaoui, 2010)**

Agar.....20g/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2,38g/l  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....5,65g/l  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....1g/l  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>.....2,64g/l  
Solution saline .....1ml.

pH : 6,8 -7,0

### **Gélose nutritive (Guiraud, 2003)**

Peptone..... 10g/l  
Extraits de viande..... 5g/l  
Glucose.....10g/l  
Chlorure de sodium .....5 g/l  
Agar..... 9g/l  
Eau distillée..... qsp 1l

pH = 7,2

### **bouillon cœur cervelle (BHIB) (Guiraud,2003)**

proteose-peptone.....10g/l  
infusion de cervelle de veau..... 12.5g/l  
infusion de cœur de bœuf.....5g/l  
chlorure de sodium.....5g/l

phosphate disodique.....2.5 g/l  
glucose.....2g/l  
eau distillée qsp.....1000ml

**N.B.** Tous les milieux utilisés sont stérilisés pendant 20mn à 120°C.

L'ajustement du pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH  
ou d'une solution d'HCl.

### **Annexe 3: composition de réactif**

#### **Solution saline standard**

FeSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
Eau distillée.....	100 ml

#### **La solution aqueuse de Rouge Congo**

Rouge Congo.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

#### **La solution d'acétate de cuivre**

Acétate de cuivre.....	10 g
Eau distillée.....	100 ml

#### **La solution de lugol**

iodure de potassium.....	2g
Iode métalloïde I <sub>2</sub> .....	1g
Eau distillée.....	100ml

#### **Eau distillé stérile.**

#### **Eau physiologique.**