



N° d'ordre 04/2015

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Hajar MAATAOUI

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Isolement et caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes : Essais dans la prévention de la biodégradation du bois de cèdre

Thèse présentée et soutenue le 14 Février 2015 devant le jury composé de

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Pr. ASSOBBHEI Omar	PES	USMBA de Fès	Président
Pr. RIHANI Mohammed	PES	Faculté des Sciences d'El Jadida	Rapporteur
Pr. ENNAJI Moulay Mustapha	PES	FST de Mohammadia	Rapporteur
Pr. FIKRI BENBRAHIM Kawtar	PES	FST de Fès	Rapporteur
Pr. BOUKIR Abdellatif	PES	FST de Fès	Examineur
Pr. IRAQUI HOUSSAINI Mohammed	PES	FST de Fès	Examineur
Pr. HAGGOUUD Abdellatif Pr. IBNSOUDA KORAICHI Saad	PES	FST de Fès	Directeur de thèse

*Laboratoire de Biotechnologie Microbienne
Faculté des sciences et technique-Fès*



Résumé de la thèse

Les actinomycètes sont des bactéries productrices de la plupart des molécules bioactives. Dans ce travail 12 isolats d'actinomycètes ont été isolés à partir d'échantillons de bois de cèdre d'une ancienne maison située dans la médina de Fès.

L'activité antimicrobienne des 12 isolats a été mise en évidence envers des bactéries à Gram négatif, des bactéries à Gram positif, des mycobactéries et des champignons. Sur les 12 isolats d'actinomycètes testés, 3 n'ont montré aucune activité antimicrobienne et 9 une activité vis-à-vis d'au moins un microorganisme test. Par ailleurs, la détermination des activités cellulases et pectinases des 12 isolats ainsi que l'évaluation de leur action sur le bois de cèdre (test de perte de masse) suggèrent qu'ils n'ont pas un effet important sur la biodégradation du bois. Cinq des 12 isolats ont été ensuite identifiés par amplification et séquençage de l'ADNr 16S ; ce qui a permis de les attribuer aux genres *Streptomyces* (4 isolats : H2, H3, H4 et H8) et *Nocardia* (1 isolat : H5). Parmi les cinq souches identifiées, seules H2, H3 et H8 présentent une activité antimicrobienne.

L'évaluation de la sensibilité des principes actifs de ces 3 souches à la protéinase K et à la température suggère qu'ils seraient de nature non protéique. De plus, une étude phytochimique des extraits des 3 souches a montré la présence de flavonoïdes et de polyphénols ; ce qui suggère que leurs activités pourraient être dues à la présence d'un produit phénolique. En outre, les extraits des 3 souches permettent l'extraction des acides nucléiques de microorganismes tests ; ce qui suggère qu'ils agissent au niveau de l'enveloppe cellulaire. Par ailleurs, l'analyse par microscopie électronique à balayage des microorganismes tests après traitement par les extraits des 3 souches a montré que les cellules ont rétréci en comparaison avec les témoins. La séparation des extraits des 3 souches par chromatographie sur couche mince et la bioautographie ont permis d'identifier les fractions responsables de l'activité antimicrobienne.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à la caractérisation physicochimique par la méthode de l'angle de contact de la surface des 5 souches d'actinomycètes identifiées ainsi qu'à l'étude de l'effet de l'extrait ou du surnageant de la souche H3 sur l'adhésion des champignons à la surface du bois de cèdre. Les résultats obtenus montrent que contrairement à la souche H5 (*Nocardia*), les quatre souches de *Streptomyces* sont hydrophiles et présentent un caractère donneur d'électron élevé et accepteur d'électron faible. Par ailleurs, le traitement de la surface du bois par l'extrait ou le surnageant de la souche H3 a mis en évidence un effet antiadhésif contre des champignons impliqués dans la biodégradation du bois.

Mots clés : Actinomycètes, *Streptomyces*, bois de cèdre, activité antimicrobienne, angle de contact, physicochimie de surface, effet antiadhésif.

- Liste des figures
- Liste des tableaux
- Liste des abréviations

SOMMAIRE

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

Revue Bibliographique

I.	Actinomycètes.....	4
	1. Propriétés générales des actinomycètes.....	4
	2. Taxonomie et identification des actinomycètes.....	9
	2.1. Identification morphologique.....	9
	2.2. Identification chimiotaxonomique	9
	2.3. Identification moléculaire	12
	3. Classification des actinomycètes	14
	3.1. Actinomycètes nocardioformes.....	14
	3.2. Actinomycètes à sporanges multiloculaires	14
	3.3. Actinoplanes.....	15
	3.4. <i>Streptomyces</i> et les genres apparentés.....	16
	3.5. Maduromycètes	17
	3.6. <i>Thermomonospora</i> et les genres apparentés	17
	3.7. Thermoactinomycètes	18
	3.8. <i>Actinosynnemataceae</i>	18
	4. Ecologie des actinomycètes.....	19
	5. Les actinomycètes en biotechnologie	19
II.	Les Antibiotiques	23
	1. Historique	23
	2. Définition d'un antibiotique	24
	3. Classification des antibiotiques	25
	3.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.....	25
	3.1.1. Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	25
	3.1.2. Antibiotiques actifs sur les structures membranaires.....	26
	3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines	27
	3.3. Antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques	28

4. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes.....	28
4.1. Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes.....	29
4.1.1. Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques	29
4.1.2. Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques.....	30
4.1.3. Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques	30
4.1.4 Influence des oligoéléments	31
4.2. Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation	31
4.3. Taux de croissance	32
5. Signaux régulateurs	33
5.1. Facteurs d'induction	33
5.2. Messagers nucléotidiques phosphorylés	34
5.2.1. AMPc	34
5.2.2. ppGpp et pppGpp	34
6. Résistance bactérienne aux antibiotiques	35
III. Les antifongiques	36
1. Principaux antifongiques utilisés en médecine humaine.....	38
1.1. Griséofulvine	38
1.2. Nystatine.....	38
1.3. Amphotéricine B.....	38
2. Mode d'action des antifongiques.....	39
3. Résistance aux antifongiques.....	39
IV. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques	40
V. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance.....	42
VI. Lutte contre les microorganismes responsables de la biodégradation du bois	43
VII. Caractérisation physicochimique de la surface des microorganismes	45

Matériel et méthodes

Partie I : Isolement et caractérisation des isolats d'actinomycètes

I. Isolement des actinomycètes.....	46
1. Prélèvements des échantillons	46
2. Isolement et conservation des isolats d'actinomycètes	46
II. Caractérisation des isolats d'actinomycètes.....	46
1. Coloration de Gram	46

2. Culture sur lamelle (Slide culture).....	47
3. Croissance des isolats en fonction de la température	47
4. Croissance des isolats en fonction du pH	47
5. Production de pigments mélanoides par les isolats d'actinomycètes.....	47
Partie II : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats	
1. Microorganismes tests	48
2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide.....	48
3. Mise en évidence de l'activité antifongique	48
4. Recherche de l'activité au niveau du surnageant.....	49
Partie III: Mise en évidence des activités enzymatiques et évaluation de la perte de masse	
I. Mise en évidence des activités enzymatiques	49
1. Mise en culture	49
2. Révélation de l'activité cellulase	50
3. Révélation de l'activité polygalacturonase.....	50
II. Evaluation de la perte de masse	50
Partie IV : Identification moléculaire des isolats d'actinomycètes	
1. Extraction de l'ADN génomique	51
2. Amplification de l'ADNr 16S par PCR.....	51
3. Séquençage et analyse des séquences.....	53
Partie V: Purification et caractérisation partielle des substances produites	
1. Choix du milieu de production	54
2. Cinétique de production des molécules bioactives.....	54
3. Extraction par solvant de la substance active	54
4. Etude de la sensibilité des substances actives à la température et à la protéinase K.....	55
5. Tests phytochimiques	55
6. Etude de l'effet des extraits sur la paroi de <i>S. aureus</i> ou <i>C. tropicalis</i>	56
7. Analyse de <i>S. aureus</i> et <i>C. tropicalis</i> par le microscope électronique à balayage (MEB) avant et après traitement par les extraits des isolats H2, H3 et H8	56
8. Séparation et caractérisation des molécules bioactives produites par les isolats d'actinomycètes.....	57
8.1.Chromatographie sur couche mince (CCM).....	57
8.2. Localisation des fractions actives responsables de l'effet antimicrobien	58
8.3. Purification des fractions actives.....	58

Partie VI : Caractérisation physicochimique de la surface des microorganismes et du bois de cèdre et évaluation de l'effet de la souche H3 sur les champignons

1. Principe de la caractérisation physicochimique de la surface des microorganismes	59
2. Caractérisation physicochimique des actinomycètes	61
3. Caractérisation physicochimique du bois de cèdre.....	61
4. Prédiction théorique de l'adhésion des actinomycètes à la surface du bois de cèdre.....	62
5. Effet de l'extrait et du surnageant de la souche H3 sur <i>Aspergillus niger</i> et <i>Thielavia hyalocarpa</i> évalué par angle de contact	62
6. Mesure de la rugosité du bois de cèdre.....	63
7. Quantification de l'adhésion des champignons au bois de cèdre par le logiciel Matlab avant et après traitement par l'isolat H3	63
Partie VII : Analyses statistiques des résultats.....	64

Résultats et discussions

Partie I : Isolement et caractérisation des isolats d'actinomycètes

I. Isolement d'actinomycètes.....	65
II. Caractérisation des isolats d'actinomycètes.....	66

Partie II : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats

1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide.....	70
2. Mise en évidence de l'activité antifongique	73
3. Recherche de l'activité au niveau du surnageant.....	74

Partie III: Mise en évidence des activités enzymatiques des isolats et évaluation de la perte de masse

1. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	75
2. Evaluation de la perte de masse.....	77

Partie IV : Identification moléculaire des isolats d'actinomycètes

1. Amplification de l'ADNr 16S par PCR	78
2. Séquençage et analyse des séquences	79

Partie V: Purification et caractérisation partielle des substances produites par les souches H2, H3 et H8

1. Choix du milieu de production	81
2. Cinétique de production des molécules bioactives.....	83
3. Etude de la sensibilité des substances actives à la température et à la protéinase K.....	85

4. Tests phytochimiques	86
5. Etude de l'effet des extraits sur la paroi de <i>S. aureus</i> ou <i>C. tropicalis</i>	87
6. Analyse de <i>S. aureus</i> et <i>C. tropicalis</i> par le microscope électronique à balayage (MEB) avant et après traitement par les extraits des souches H2, H3 et H8.....	89
7. Séparation et caractérisation des molécules bioactives produites par les souches H2, H3 et H8.....	91
Partie VI : Caractérisation physicochimique de la surface des microorganismes et du bois de cèdre et évaluation de l'effet de la souche H3 sur les champignons	
1. Détermination de l'hydrophobicité de la surface des actinomycètes	95
2. Détermination du caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes	97
3. Caractérisation physicochimique du bois de cèdre.....	98
4. Prédiction théorique de l'adhésion des actinomycètes à la surface du bois de cèdre.....	98
5. Effet de l'extrait et du surnageant de la souche H3 sur <i>Aspergillus niger</i> et <i>Thielavia hyalocarpa</i> évalué par angle de contact	99
6. Effet de l'extrait et du surnageant de la souche H3 sur l'adhésion d' <i>Aspergillus niger</i> et de <i>Thielavia hyalocarpa</i> évalué par le MEB	104
7. Quantification de l'adhésion d' <i>Aspergillus niger</i> et de <i>Thielavia hyalocarpa</i> au bois de cèdre par le logiciel Matlab	106
Conclusion générale et perspectives	108
Références bibliographiques	111
Annexes	151