الجمهـــــــــــــــــــورية الجزائريـــــــــــــــــــة الديـــــــــــــــــمقراطـــية الشعبـــية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليـــــــــــــــــــــــم العـــــــــــــالي و البـــــــحث العـــلمـــــــــــي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



_جـــــــــامـــعة يحـــي فارس _المـــديـــة_
Université Yahia Farès- Médéa

كـلـيـــــة التـــكنـــولـــوجيـــــا
Faculté des Sciences

قســـم عـــلـــوم الطـبـيـعـــة والـــحـــيـــاة
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de Master en Biologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Étudié par :

Romaissaa DJEMAI
Safia OULD HAMADI

Thème

ETUDE DES ACTIVITÉS ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUE DES COMPOSÉS BIOACTIFS GÉNÉRÉS PAR LES MICRO-ORGANISMES D'ENVIRONNEMENT VIVANTS SUR LES CONTAMINATIONS PÉTROLIERES

Soutine publiquement le : Mardi **13/10/2020**

Devant le jury composé de :

Mr. Bouazza CHAMI	MAA, UYFM	**Président**
Mlle. Amel EULDJI	MAA, UYFM	**Examinateur**
Mr. Mahfoud AINAS	MCB, UYFM	**Examinateur**
Mr. Ahmed AZIZI	MCA, UATL	**Rapporteur**

Année universitaire 2019-2020

ETUDE DES ACTIVITÉS ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUE DES COMPOSES BIOACTIFS GÉNÉRÉS PAR LES MICRO-ORGANISMES D'ENVIRONNEMENT VIVANTS SUR LES CONTAMINATIONS PÉTROLIERES

RESUME. Ce contexte résume quelques études antérieures sur les activités : antioxydante, antimicrobienne, antifongique des composés bioactifs générés par les actinobactéries, les actinomycètes et les algues marines, leurs moyens et méthodes de réalisation ainsi que leurs résultats avec leur discussion. Leur isolement a été pris dans divers sites. D'après les résultats de trois travaux, les actinomycètes est présente la source microbienne la plus performent en termes de l'activité antibactérienne et antifongique contre les bactéries et les champignons. Ces activités a été validé par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis de sept bactéries *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterobacter sp*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Proteus sp*, *Morganella sp* et trois champignons filamenteux *Aspergillus niger Fusarium oxysporum Aspergillus fumigatus* et une levure *Candida albicans*. L'activité antibactérienne des actinomycètes testés montre qu'environ 90 % des actinomycètes testés, possèdent une forte activité vis-à-vis d'au moins un des microorganismes-tests.

MOT CLÉS. Bactéries ; Champignon ; Activité antifongique ; Activité antioxydante ; Activité antibactérienne ; Composés bioactifs.

STUDY OF ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF BIOACTIVE COMPOUNDS GENERATED BY LIVING ENVIRONMENTAL MICRO-ORGANISMS ON OIL CONTAMINATIONS

ABSTRACT. This context summarizes some previous studies on the activities: antioxidant, antimicrobial, antifungal and of bioactive compounds generated by actinobacteria, actinomycetes and marine algae, their means and methods of realization as well as their results with their discussion. Their isolation was taken at various sites. According to the results of three studies, actinomycetes is the most successful microbial source in terms of antibacterial and antifungal activity against bacteria and fungi. These activities were validated by the agar cylinder technique against seven bacteria Staphylococcus aureus ATCC 43300, Enterobacter sp, Streptococcus sp, Pseudomonas sp, Acinetobacter sp, Proteus sp, Morganella sp and three filamentous fungi Aspergillus niger Fusarium oxysporum Aspergillus fumigatus and a yeast Candida albicans. The antibacterial activity of the actinomycetes tested shows that approximately 90% of the actinomycetes tested have a strong activity against at least one of the test microorganisms.

KEYWORDS. Bacteria; Fungus; Antifungal activity; Antioxidant activity; Antibacterial activity; Bioactive compounds.

دراسة الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادات الميكروبية والمضادة للفطريات للمركبات الحيوية الناتجة عن الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش في الملوثات النفطية.

ملخص: يلخص هذا السياق بعض الدراسات السابقة حول الأنشطة: مضادات الأكسدة، مضادات الميكروبات، مضادات الفطريات للمركبات النشطة بيولوجيًا المتولدة عن البكتيريا الشعاعية والاكتينوميسيتات والطحالب البحرية، ووسائلها وطرق تحقيقها وكذلك نتائجها مع مناقشتها. تم عزلهم في مواقع مختلفة. وفقًا لنتائج ثلاث دراسات، تعد الفطريات الشعيرية أنجح مصدر ميكروبي من حيث الفعالية المضادة للبكتيريا والفطريات ضد البكتيريا والفطريات. تم التحقق من صحة هذه الأنشطة من خلال تقنية أسطوانة الأجار ضد الستريبتوكوكيس سب ، اونتيروباكتر، بسودوموناس ، ستافيلوكوكيس اوريس ، مورجنيلا وخميرة كانديدا البيكان و اسبيرجوليس فيميجاتوس.

يُظهر النشاط المضاد للبكتيريا للفطريات الشعاعية المختبرة أن حوالي 90٪ من الفطريات الشعاعية المختبرة لها نشاط قوي ضد واحد على الأقل من الكائنات الدقيقة المختبرة.

كلمات المفتاحية: بكتيريا؛ فطر؛ نشاط مضاد النشاط المضاد للأكسدة؛ نشاط مضاد للجراثيم؛ المركبات النشطة بيولوجيا.

Remerciements

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

Je souhaite adresser, à travers ces quelques lignes, ma grande reconnaissance envers l'université Yahia Farès Médéa, Faculté des Sciences Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Nous remerciements tous nos enseignant spécialement Notre encadreurs ***Mr AZIZI AHMED****, Maitre de Conférences A à l'université de Laghouat, Sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir, je remercie pour sa gentillesse, son soutien pour le fait de m'avoir fait partager son expérience,*

Nous remercions très sincèrement le jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions également ***Dr RAHAL MOHAMED****, pour ses conseils judicieux et ses encouragements permanents, et tous les enseignants de département des sciences de la nature et de la vie, et département de biologie de l'université du Yahia Farès-Médéa*

Nous tenons à remercier ***l'équipe aux laboratoires*** *de département des sciences de la nature et de la vie, pour le fait de nous avons accueilli dans son équipe de laboratoire et pour ses conseils.*

Dédicaces

*Je rends grâce à **Allah** le tout puissant et miséricordieux pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.*

A mes parents :

*Ma **mère**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon **père**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.*

*A mes chères sœurs **Saida**, **Nana**, **souhila**, **fella***
*A mes chers **frères***

A Manar, serine, Ishak, Djoud, Anes et mirale

A toute ma famille pour son soutien de tous les instants.
A tous mes collègues et mes amies Romaissaa, Feriel, Imen, Asmaa et Nourhane témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Safia

Dédicaces

*Je rends grâce à **Allah** le tout puissant et miséricordieux pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail*

A mes parents :

*Mon père **Mouhamed djemai**, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse dieu, le tout puissant, lavoir en sa sainte miséricorde !*
*Ma **mère**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*A mes chers sœurs **Fatima el Zohra**, **Linda, nabila**, Soraya*
*A mon cher frères **hamza***

*A **mounira**, **ichrak**, **Med Mido**, **Med Nassim**, **Lina**, **Yacine** , **Adam**, **Rafik**, et **Imad***

A toute ma famille pour son soutien de tous les instants.
*A tous mes collègues et mes amies **safiaines, asma, nesrine, selma,** et témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Romaissaa

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations	*Significations*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATB	Antibiotique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DPPH	2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl
GPx	La glutathion peroxydase
HA	Hydrocarbures aliphatiques.
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.
HCP	Hydrocarbures pétroliers.
ROS	Réactive Oxygène Spécifs
SOD	Superoxyde dismutase
GYEA	Glucose-Yeast-Extract -agar
GLM	Glucose -extrait de levure -extrait de malte
PDA	Gélose dextrosée à la pomme de terre
SA	Souches d'actinomycètes isolés à partir de différents écosystèmes
MSBA	L'université de Mohamed Boudiaf M'sila département de science de la nature et de la vie Laboratoire de la biotechnologie végétale Actinobactéries.
MSBC	L'université de Mohamed Boudiaf M'sila département de science de la nature et de la vie Laboratoire de la biotechnologie végétale Champignons.

LISTE DES FIGURES

Numéros	Titres	Pages
1.1	Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers.	04
1.2	Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants dans l'environnement.	05
1.3	Devenir des HAP dans les écosystèmes	09
1.4	Fréquence (%), par type d'hydrocarbures, des événements de déversements accidentels significatifs (ampleur > 7 tonnes) ayant entraîné une pollution d'eaux continentales ou estuariennes en Europe, pour la période 2005-2009	10
1.5	Étapes initiales de l'oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par les microorganismes.	12
1.6	Produits d'oxydation du benzo[a]pyrène par les algues.	13
1.7	Métabolisme bactérien des hydrocarbures polycycliques aromatiques par clivage ortho et meta	14
1.8	Oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par la voie des enzymes extracellulaires	16
1.9	Oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par la voie des Monooxygénase à cytochrome P450 chez les champignons.	17
3.1	Figure 3.1. Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans l'eau distillée stérile.	36
3.2	Etalement de 0.5ml de chaque dilution sur le milieu de culture. Les boites ensemencées ont été incubées à 30°C pendant 7 jours.	37
4.1	Activité antibactérienne de la souche SAiC contre Staphylococcus aureus ATCC 43300	42
4.2	Activité antibactérienne des souches SA14, SA3, SA31 contre Pseudomonas sp	42
4.3	Activité antibactérienne de la souche S contre Pseudomonas sp	43
4.4	Activité antibactérienne des isolats Sel22, Sel S15,-5 contre Staphylococcus aureus	45
4.5	Activité antibactérienne des isolats Sels, Sol20, SS10-5 ISP2 SH6contre Streptococcus sp	45
4.7	Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole contre la levure contre Candida albicans	47
4.8	Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole Fusarium oxysporum	47
4.9	Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole contre Aspergillus Niger	48
4.10	Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole contre Aspergillus fumegatus	48
4.11	Activité antifongique des boues activées des actinomycètes des boues activées contre Fusarium oxysporum	49
4.12	Activité antifongique des boues activées des actinomycètes des boues activées contre *Aspergillus Niger*	49
4.13	Activité antifongique des boues activées des actinomycètes des boues activées contre Candida albicans	49
4.14	Activité antifongique des boues activées des actinomycètes des boues activées conre *Aspergillus fimugatus*	49

LISTE DES TABLEAUX

Numéros	Titres	Pages
1.1	Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers	3
2.3	Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées	25
3.1	Les caractéristiques analytiques	28
4.1	Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir du sol agricole	41
4.2	Sensibilité des souches testées vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les différents actinomycètes isolés à partir de sol agricole.	42
4.3	Activité antibactérienne d'actinomycètes isolés à partir des boues activées	
4.4	Sensibilité des différentes bactéries tests vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les actinomycètes isolés à partir des boues activées	43
4.5	Activité antibactérienne d'actinomycètes isolés à partir de la Sebkha	43
4.6	Sensibilité des souches testées vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les différents actinomycètes isolés à partir de la sebkha.	
4.7	Activité antifongique des actinomycètes isolés à partir du sol agricole.	44
4.8	Activité antifongique d'actinomycètes isolés à partir des boues activées.	45
4.9	L'activité antimicrobienne de (09) isolats d'actinobactérie.	
4.10	Pourcentage de l'activité antimicrobienne de (09) isolats d'actinobactéries	55
4.11	Évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'algues récoltées d'Oualidia appartenant à la classe des Chlorophycées exprimée en diamètre	56
4.12	Évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'algues récoltées d'Oualidia appartenant à la classe des Phéophycées exprimée en diamètre d'inhibition	57
4.13	Évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits d'algues récoltées d'Oualidia appartenant de la classe des Rhodophycées exprimée en diamètre d'inhibition	58

SOMMAIRE

ملخص, RESUME, ABSTRACT
LISTE D'ABREVIATIONS
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION 1

1. MICRO-ORGANISMES VIVANTS SUR LES CONTAMINATION PETROLIERES 03

1.1 Les contaminations pétrolières 03
1.1.1 Origine 03
1.1.2 La composition chimique 03
1.1.3 Classification 04
1.1.4 Caractéristiques et conditions physico-chimiques de biodégradation des hydrocarbures pétroliers 07
1.1.5 L'impact de la pollution pétrolière sur l'environnement 08
1.1.6 Bioremédiation des contamination pétrolières par les microorganismes 11
1.2 Les microorganismes responsables de la dégradation de hydrocarbures 12
1.2.1 Les algues et les cyanobactéries 12
1.2.2 Les bactérie 13
1.2.3 Les champignons 15

2. ACTIVITES ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUES DES PRODUITS GENERES MICRO-ORGANISMES 19

2.1. L'activité antimicrobienne 19
2.1.1 Généralités 19
2.1.2 Culture des bactéries 19
2.1.3 Les métabolites secondaires 20
2.1.3.1 Ensemble de cours sur le métabolisme primaire 20
2.1.3.2 Exemples de précurseurs de produits industriels ou pharmaceutiques synthétisés par des micro-organismes modifiés 20
2.1.4 Les antibiotiques 21
2.1.4.1 Recherche et découverte d'antibiotiques 21
2.1.6 Notion du bactériostatique et du bactéricide 21
2.2. L'activité antioxydante 22
2.2.1 Généralités 22
2.2.2 Le stress oxydant 22
2.2.3 Les radicaux libres 23
2.2.4 Les antioxydants 23
2.3. L'activité antifongique 25
2.3.1 Généralité 25

2.3.2 Espèces de champignons ayant une activité antifongique 25
2.3.3 Extraits de champignons avec activité antifongique signalée 26

3. MATERIELS ET METHODES 28

3.1 Matériels d'étude 28
3.2 Les bactéries 28
3.2.1 Isolement et caractérisation des souches bactériennes 28
3.2.2 Identification 30
3.2.3 Test de l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens 34

3.3 Les champignons 36
3.3.1 Echantillonnage 36
3.3.2 Milieux de culture 36
3.3.3 Isolement des champignons 36
3.3.4 Dénombrement 37
3.3.5 Purification des souches fongiques 37
3.3.6 Conservation des souches 37
3.3.7 Identification 38
3.3.8 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antifongique 38
3.3.9 Activité antioxydante 39

41

4. RESULTATS ANTERIEURS ET LEUR DISCUSSION

4.1. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes 41
4.1.1 Activité antibactérienne 41
4.1.1.1 Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir du sol agricole. 41
4.1.1.2 Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir des boues activés 43
4.1.1.3 Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir de Sebkha 44
4.1.2 Activité antifongique 47
4.1.2.1 Activité antifongique des actinomycètes isolés à partir du sol agricole 47
4.1.2.2 Activité antifongique des actinomycètes isolés à partir des boues activées 48
4.2. Activité antimicrobienne des actinobactéries isolés de la rhizosphère de Daucus sahariensis Murb. 50
4.2.1 Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries 50
4.2.1.1 Activités antifongiques d'isolats d'actinobactéries 50
4.2.1.2 Activité antibactérienne d'isolats d'actinobactéries 52
4.3. Screening des algues marines d'oualidia a la recherche d'activité antibactérienne. 53
4.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne 53

CONCLUSION 59

BIBLIOGRAPHIES 60

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les microorganismes qui l'habitent dans le sol ou l'eau (milieu marin ou l'eau usée) qui sont déjà contamines par des dérives pétrolières constituent une source infinie de molécules actives à structure chimique originale (Glombitza *et al.,* 1979 ; Smit, 2004). Ces composés sont synthétisés par des voies métaboliques différentes de celles observées en milieu terrestre. Parmi ces microorganismes les algues, les bactéries. Ces dernies capables de réduire les hydrocarbures et génère des différentes molécules comme les antibiotiques qu'ils peuvent être produite par des micro-organismes comme les champignons et les bactéries.

L'utilisation de ce type de microorganismes et surtout qu'ils vivant dans l'environnement à des fins thérapeutiques est loin d'être un phénomène nouveau. Si les principes actifs extraits des bactéries et des champignons utilisés en pharmacie sont peu nombreux, les travaux scientifiques en cours sont importants. Des milliers de molécules ont ainsi été identifiées. Ce sont des polysaccharides, des lipides ou encore de petits métabolites de nature phénolique (Deslandes et *al.,* 2000) ou terpénique (Fleury et *al.,* 1994 ; Ravi et *al*., 1982).

Les activités décrites et associées aux bactéries et les champignons sont très divers : antimicrobiennes (Reichelt et al. ; 1984 ; Etahiri et *al*. ;2007) antioxydantes (Etahiri et *al*. ;2001 ; Zubia et *al.* ;2007) antifongiques (Ktari et Guyot ;2009) ainsi que d'autre activités.

Etant donné le large éventail d'activités associées aux microorganismes d'environnement particulièrement antioxydantes et antimicrobiennes, et face à l'apparition de formes résistantes de plusieurs bactéries à certains antibiotiques, la recherche de nouvelles molécules actives est devenue une nécessité. Ainsi, l'exploration des sites contamines pour la dépollution dans ce sens pourrait être d'un grand intérêt. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de recherche dont l'objectif est d'étudier l'effet de l'extrait des bactéries et des champignons Algérienne sur les activités antioxydants, antibactériennes et antifongiques.

Ce travail s'articule autour de quatre parties :

- *La première partie* récapitule les micro-organismes vivant sur contaminant pétrolières.
- *La deuxième partie* représentes une généralité sur le métabolisme secondaire et les différentes activités antibactériennes, antifongiques et antioxydants apparents chez les micro-organismes vivant sur les contaminations pétrolières.
- *La troisième partie* donne une présentation des matériels et des méthodes permettent la réalisation expérimentale de notre intitulé.
- *La quatrième partie* est dédié à une synthèse des résultats obtenus antérieurement avec leur discussion, suivi par une conclusion générale.

1. MICRO-ORGANISMES VIVANTS SUR LES CONTAMINATION PETROLIERES

1. MICRO-ORGANISMES VIVANTS SUR LES CONTAMINATION PETROLIERES

1.1. Les contaminations pétrolières

1.1.1. Origine

Le pétrole est une roche liquide carbonée, ou huile minérale, constituée d'une multitude de molécules composées majoritairement d'atomes de carbone et d'hydrogène appelés hydrocarbures. Suite à la sédimentation de matières organiques végétales et animales et à leur enfouissement sous d'autres couches sédimentaires. La décomposition de ces matières organiques provoque une perte d'oxygène dans le milieu induisant des réactions réductrices.

Puis, sous l'action combinée de la chaleur (60 °C) et de la pression (enfouissement d'environ 1 200 à 1 800 mètres), la transformation en hydrocarbures débute. Ce pétrole en formation est moins dense que la roche qui l'entoure, il migre donc vers la surface. Si le pétrole est arrêté dans sa progression par des roches imperméables, il se concentre pour former des poches qui sont à l'origine des réservoirs actuels (Tissot et Welte, 1984).

Tableau 1.1. Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers

Éléments	**Pourcentage (%)**
Carbone	83 à 87
Hydrogène	10 à 14
Azote	0.1 à 2
Oxygène	0.05 à 6
Soufre	0.05 à 6
Métaux (aluminium, nickel, etc.)	< 0.1

1.1.2 Composition chimique

Le pétrole brut est parmi les mélanges les plus complexes des composés organiques qui se produisent sur la terre. Les progrès récents de la spectrométrie de masse à ultra-hauteré solution ont permis d'identifier plus de 17 000 composants chimiques distincts et le terme de pétroleomique est inventé pour exprimer cette complexité récemment découverte (Hassanshahian et Cappello, 2013).

Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcanes non cycliques (ou paraffines), des cycloalcanes (ou naphtènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques (Harayama *et al*, 1999). D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et les composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes (Balba *et al*, 1998). La composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers est présentée dans la figure 1.1

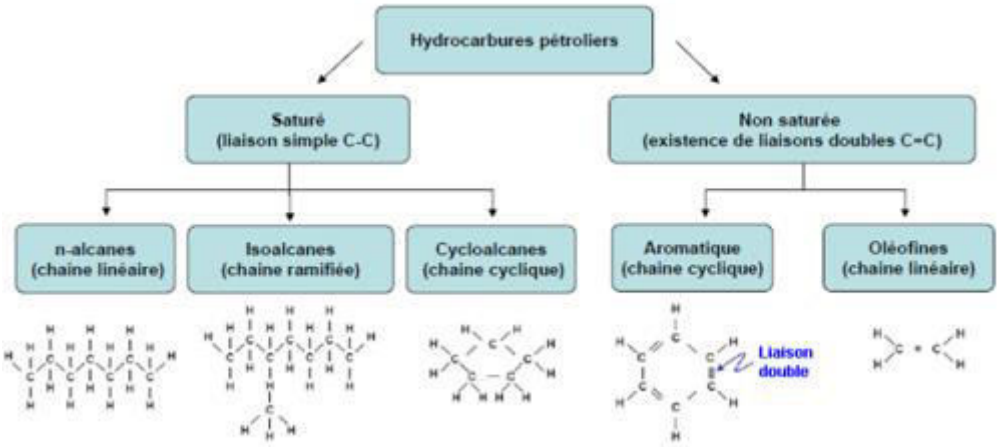


Figure 1.1. Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano et *al*, 2008).

1.1.2. Classification

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes, les résines et les métaux (0 à 10 %) (Syakti, 2004). Selon Harayama *et al*, (1999), les hydrocarbures pétroliers sont classés comme suit :

1.1.2.1. Hydrocarbures saturés : Parmi les hydrocarbures saturés on distingue

- **Alcanes linéaires**

Les alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne (n) varie entre 7 et 40 constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (Bertrand et Mille, 1989).

- **Alcanes ramifiés**

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple : pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensible mentégales à celles des n-alcanes

- **Cycloalcanes**

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpènes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille +++peut représenter entre 30 et 40 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

1.1.2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les HAP sont une famille de composés constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène, assemblés en au moins deux cycles benzéniques reliés entre eux par les arêtes. Il existe une grande variété de molécules (Cerniglia,1992). Quelques exemples de HAP parents sont présentés dans la figure 1.2

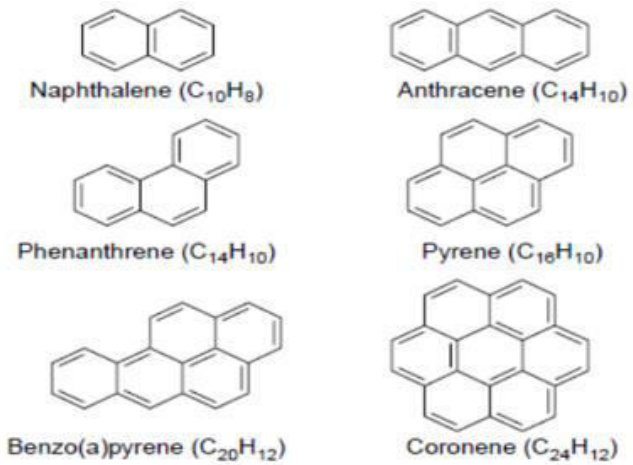


Figure 1.2. Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants (HAP) dans l'environnement (Sudip et *al,* 2002).

De nombreux HAP sont toxiques, mutagènes et / ou cancérogènes (Goldman et *al,* 2001 ; Mastrangelo et *al,* 1997*)*. Les HAP les plus connus vont du naphtalène (C10H8) formé de deux cycles jusqu'au coronéne ($C_{24}H_{12}$) formé de sept cycles (Kennish, 2001).

Certaines molécules peuvent être composées jusqu'à plus de 9 noyaux benzéniques non substitués

Les HAP se subdivisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 $g.mol^{-1}$ (HAP de moins de quatre cycles) et les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 g.mol-1. Les HAP sont produits sous la forme de mélange de HAP dont la composition exacte dépend de la source et également des conditions de leur formation. Les principaux types de sources des HAP sont : anthropique (pétrole et combustibles) et naturelles (Wakleham et *al*, 1980 a et b). La première source de HAP dans l'environnement contemporain est l'utilisation des combustibles fossiles. C'est-à-dire le pétrole et le charbon. Le pétrole brut contient de 20 à 45 % de HAP (Tissot et Welte, 1984). La composition du mélange varie selon la gamme de température de distillation (Haritash et Kaushik, 2009). De nombreux HAP sont considérés comme des polluants environnementaux qui peuvent avoir un effet néfaste sur la flore et la faune des milieux concernés, aboutissant à l'absorption et l'accumulation de produits chimiques toxiques dans les chaînes alimentaires et dans certains cas, aux graves problèmes de santé et/ou des défauts génétiques chez les humains. Par conséquent, l'U.S. Environnemental Protection Agency a classé 16 HAP comme polluants fortement toxiques (Kunlei et *al*, 2001).

1.1.3.3. Les composés non-hydrocarbonés

- **Résines et asphaltènes**

Les résines contiennent des structures aromatiques (polys condensés ou non) dont le nombre de cycles est supérieur à 6 (Speight, 2004). La définition générale présente les asphaltènes comme la fraction insoluble d'une matrice pétrolière dans un solvant paraffinique (n-heptane ou n-pentane) (Beens et Brinkman, 2000). Les composés appartenant à la fraction des résines et asphaltènes peuvent être complexés à d'autres éléments que l'hydrogène et le carbone tels que l'azote, l'oxygène et le soufre pour former des hétéroéléments. Ces éléments peuvent également être complexés à des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium, généralement présents à l'état de trace dans les pétroles (Tissot et Welte, 1984).

- **Les composés azotés, soufrés et oxygénés**

Ce sont, en général, des constituants mineurs d'un pétrole brut (Lefebvre, 1978), à l'exception des pétroles très lourds ; les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (Bertrand et Mille, 1989).

- **Les métaux**

Les métaux sont présents dans les pétroles bruts à l'état de traces. Le vanadium, le nickel sont généralement les plus abondants mais le fer, le cuivre et l'uranium sont également détectés (Bertrand et Mille, 1989 ; Escobar et *al*, 2012).

1.1.3. Caractéristiques et conditions physico-chimiques de biodégradation des hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures pétroliers (HP) sont des composés organiques qualifiés de peu volatiles, apolaires et hydrophobes (Johnsen et *al*., 2005). Leur solubilité dans l'eau est faible à très faible et leur pression de vapeur, de faible à modérément élevée. Leur coefficient de partage octanol/eau est relativement élevé, ce qui représente un important potentiel d'adsorption sur le sol et sur les matières particulaires (ADEME, 1995). La température est un facteur important dans la biodégradation des HP (Hogan, 1997). D'après cet auteur, les composés les plus légers disparaissent pour des températures de l'ordre de 35 à 55°C et les composés les plus lourds ont besoin d'une période de 20 jours à 45°C pour se dissiper, à l'exception du Chrysène qui disparait très rapidement à 60°C. Les hydrocarbures pétroliers sont généralement caractérisés par :

1.1.3.1. Viscosité

La viscosité est définie comme étant la mesure de la résistance d'un fluide (Fingas, 2013). Elle est influencée par la température et agit directement sur le processus d'évaporation des hydrocarbures (Fingas, 2011). En effet, plus la température est élevée, plus la viscosité est basse et plus les hydrocarbures pétroliers ont tendance à s'évaporer ou à se propager rapidement au niveau du sol (EPA, 2013).

1.1.3.2. Tension superficielle

Elle correspond à la force d'attraction ou de répulsion qui s'exerce à l'interface entre l'hydrocarbure et l'eau (EPA, 2013). La tension superficielle est considérée avec la viscosité pour évaluer la rapidité de la propagation des hydrocarbures sur l'eau. Puisque la tension superficielle a tendance à diminuer lorsque la température augmente, les hydrocarbures se répandent plus facilement dans les eaux plus chaudes (EPA, 2013).

1.1.3.3. Densité

Elle correspond à la masse par unité de volume. La densité est utilisée pour distinguer les hydrocarbures pétroliers (HP) légers et lourds. La densité tend à diminuer lors des processus d'altération des hydrocarbures, en particulier dans des situations suivantes : évaporation des fractions plus légères, augmentation de la température ou interaction avec les particules du sol (Radovic et *al*, 2012).

1.1.3.4. Solubilité

C'est la capacité d'une substance à se dissoudre dans une autre substance. Les hydrocarbures pétroliers les plus solubles sont essentiellement les hydrocarbures légers. Plus la proportion d'hydrocarbures légers sera importante, plus la solubilité du produit pétrolier dans l'eau sera significative. La solubilité des HP est considérée par certains auteurs comme étant un facteur important à leur biodisponibilité face aux attaques microbiennes (Grimberg et *al*., 1996, Sabatini et *al.,* 1996). Ces mêmes scientifiques considèrent que les techniques d'amélioration à la biodisponibilité des HP par des adjuvants comme les surfactants sont d'un grand avantage dans la bioremédiation des sols.

1.1.3.5. Risque toxicologique

Le risque toxicologique existe lorsqu'il y a une exposition chronique aux hydrocarbures et une atteinte à la santé humaine. Selon Shuttleworth et Cerniglia, (1995) et Feix et *al*. (1995), les HP, et à l'occurrence les hydrocarbures aromatiques (HAP), peuvent présenter un potentiel carcinogène. Celui-ci augmenterait avec le nombre de cycles de la molécule. Par exemple, le naphtalène et les composés de faible poids moléculaire, étant plus solubles et plus volatiles sont peu persistants et donc peu toxiques (Kanaly et Harayama,2000). À contrario des composés à poids moléculaires élevés.

1.1.4. L'impact de la pollution pétrolière sur l'environnement

1.1.4.1. Sur les sols et les eaux souterraines

L'ère industrielle a engendré une pollution importante des sols et sous-sols par des mélanges complexes de substances organiques et inorganiques parmi lesquelles on retrouve les hydrocarbures, les solvants chlorés, les métaux, Ces pollutions issues pour la plupart de déversements accidentels ou ponctuels résultant de comportements délibérés ou non, de fuites de réservoirs de stockage constituent un problème environnemental majeur notamment terme de risque de transfert d'hydrocarbures vers les nappes phréatiques, mais également un risque humain non négligeable (Gautier, 2007)

La pollution des sols par les hydrocarbures résulte généralement de l'infiltration à partir de la surface ou de l'enfouissement de produits pétroliers ou de résidus hydrocarbonés.

La pollution des aquifères par des hydrocarbures solubles résulte d'un contact de la nappe d'eau avec un produit infiltré ou enfoui ou parfois provient d'une rivière polluée en charge par rapport à une nappe alluviale. En fonction du volume déversé, de sa nature, des caractéristiques géologiques et hydrogéologiques du sous-sol, le produit pétrolier en tant que phase liquide peut rester entièrement piégé au-dessus de la nappe phréatique ou atteindre celle-ci si le volume infiltré est supérieur au volume piégé, le volume excédentaire s'étalant à la surface de la nappe (Bocard, 2006).

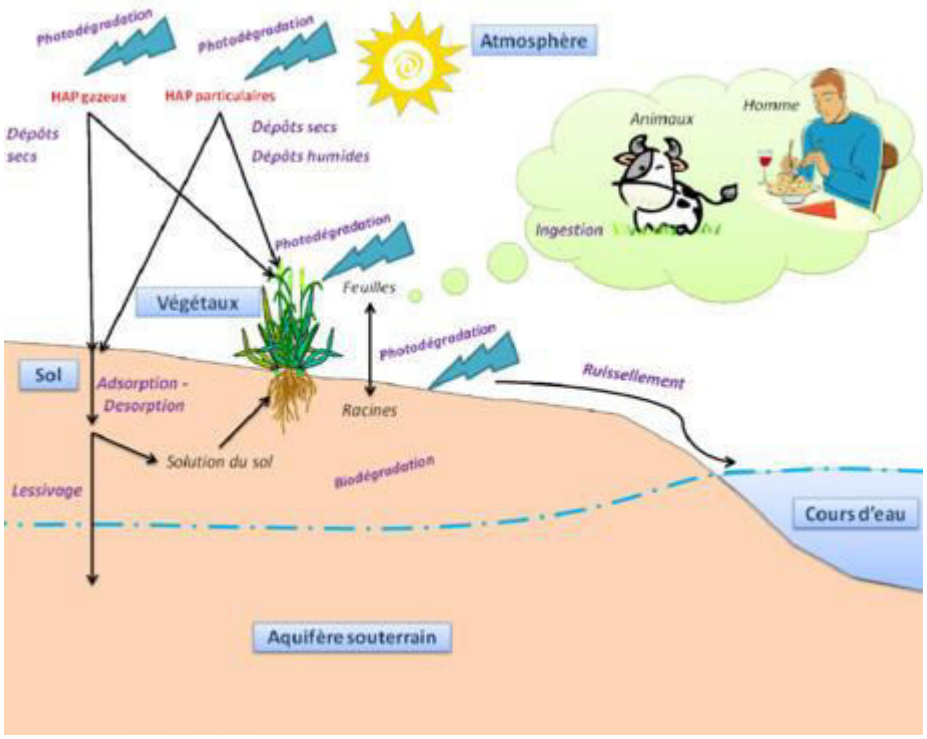


Figure 1.3. Devenir des HAP dans les écosystèmes (Desalme, 2011).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaines alimentaires. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Gabet., 2004). Aux polluants transitant par les cours d'eau s'ajoutent ceux provenant des territoires proches de la mer. Ils peuvent avoir une origine diffuse (principalement agricole) ou ponctuelle (stations d'épuration industrielles ou urbaines).

1.1.5.2. Sur les milieux marins.

Les risques localisés de la production pétrolière sont identifiables tout au long de la chaine d'activité pétrolière, de l'exploitation-production jusqu'au transport de pétrole, à la pétrochimie et au raffinage. L'impact environnemental du transport des hydrocarbures peut également être considérable et constitue la face la plus célèbre et dangereuse de cette menace

environnementale. Le réseau d'oléoducs constitue en lui-même un danger écologique, du fait des menaces de sabotages ou d'attentats et de défauts d'entretien des infrastructures. Le délabrement des têtes de pont et d'oléoducs dans l'ouest sibérien est source de fuites permanentes qui pourraient atteindre, selon Greenpeace, 15 millions de tonnes de pétrole par an soit une pollution quotidienne égale à deux Érika. Mais le principal danger dans le certitudes du transport maritime (De Lestrange *et al*, 2005).

En termes quantitatifs, le pétrole est l'un des polluants organiques les plus importants dans les milieux marins et il est estimé que dans le monde entier, entre 1,7 et 8,8×106 tonnes d'hydrocarbures pétroliers ont un impact annuel sur les eaux marines et les estuaires (National Research Council, 2002).

L'étude statistique montre que les produits pétroliers les plus couramment déversés dans les eaux continentales et estuariennes sont les produits raffinés dits "produits blancs". Ces produits sont impliqués dans 40 % des pollutions d'hydrocarbures, avec notamment le gazole qui à lui seul représente 27 % des déversements d'hydrocarbures en eaux continentales. Les produits bruts viennent en deuxième position avec 21 % des pollutions. Enfin, les produits raffinés lourds représentent 14 % des pollutions (figure 1.4) (Cedre, 2012).

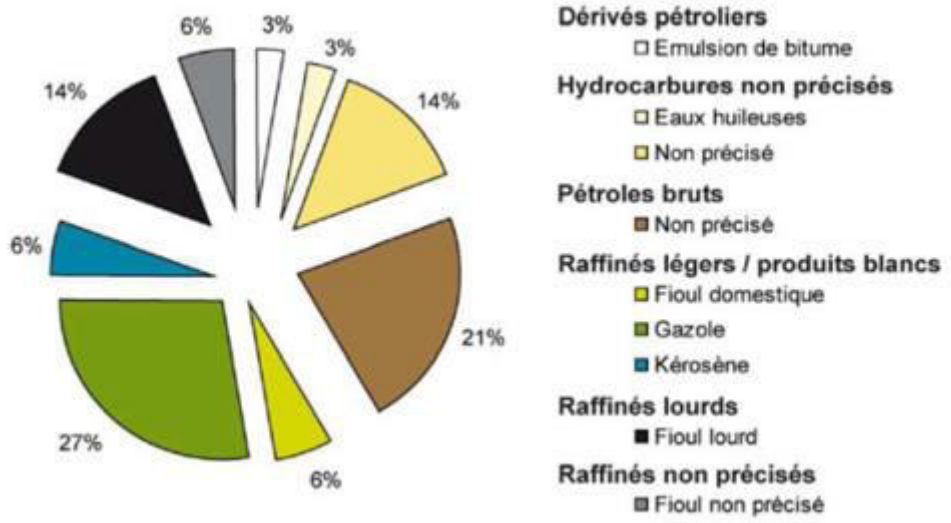


Figure 1.4. Fréquence (%), par type d'hydrocarbures, des événements de déversements accidentels significatifs (ampleur > 7 tonnes) ayant entraîné une pollution d'eaux continentales ou estuariennes en Europe, pour la période 2005-2009 (Cedre, 2012).

Les déversements d'hydrocarbures peuvent avoir des impacts très divers sur l'environnement marin. Les marées noires sont présentées comme responsables de conséquences terribles pour la survie de la faune et la flore marines (Soltani, 2004). En cas d'accident majeur, l'impact environnemental à court terme peut être grave et frappe

sérieusement les écosystèmes et les populations qui vivent à proximité du littoral contaminé, du point de vue tant de leurs moyens de subsistances que de leur qualité de vie.

1.1.6. Bioremédiation des contamination pétrolières par les microorganismes

La dégradation microbienne est un mécanisme naturel et primordial pour dépolluer les sites contaminés par le déversement des hydrocarbures pétroliers *(*Lal et Khanna,1996 ; Perelo, *2010)*. Une grande variété de micro-organismes indigènes du sol et des eaux présente la capacité à dégrader les hydrocarbures pétroliers (Dhaker et Jain, 2011 ; Jain et *al*,2011). Les bactéries et les champignons sont des médiateurs primaires dans la dégradation des hydrocarbures, les plus étudiés et semblent les plus efficaces. En effet, ils sont capables de métaboliser une large gamme des hydrocarbures, les transformant partiellement en métabolites ou en les minéralisant complètement (Chikere, 2011). Les bactéries se sont avérées plus polyvalentes et actives que les champignons et peuvent donc jouer un rôle plus important au cours de la biodégradation des hydrocarbures (Rahman et al, 2003, Brooijmans et *al*, 2009).

L'exposition préalable aux hydrocarbures entraîne l'adaptation de la communauté microbienne à l'utilisation des hydrocarbures comme sources de carbone et d'énergie. Les trois moyens par lesquels l'adaptation peut se produire sont : l'induction d'enzymes spécifiques, les changements génétiques qui aboutissent à des voies métaboliques et l'enrichissement sélectif de microbes capables de transformer les hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990). Les microorganismes d'un sol non exposé à des composés contaminants ne possèdent pas forcément la capacité de les métaboliser. Cependant, lorsqu'ils sont exposés à de tels composés, ils sont souvent capables de s'adapter, c'est-à-dire d'acquérir le potentiel métabolique de dégradation de ces polluants par recrutement vertical ou horizontal de gènes spécifiques (George et Hay, 2011).

Le recrutement des voies métaboliques, présentes dans le génome non exprimé, peut se faire par des évènements de mutation ponctuelle, de réarrangement génétique ou de transposition (Habe et Omori, 2003). Les microorganismes peuvent aussi acquérir des clusters de gènes cataboliques via des éléments mobiles transférés d'un hôte donneur à un hôte receveur (transfert horizontal).

Les bactéries présentent ces phénomènes plus que tout autre groupe microbien après une perturbation des hydrocarbures dans le sol. Chez les bactéries, les phénomènes de transferts les plus connus sont la conjugaison via des plasmides, la transformation ou la transduction (Juhas et al, 2009). Ces phénomènes de transferts horizontaux augmentent les capacités métaboliques des bactéries, notamment en élargissant leur gamme de substrats, et permettent l'adaptation des populations microbiennes à de nouveaux contaminants (van derMeer et *al*, 1992 ; van der Meer et Sentchilo, 2003). Le transfert horizontal de gènes est plus répandu dans les bactéries, il est

signalé comme l'un des principaux mécanismes responsables de l'évolution de la dégradation accrue des hydrocarbures (Obayori et Salam, 2010).

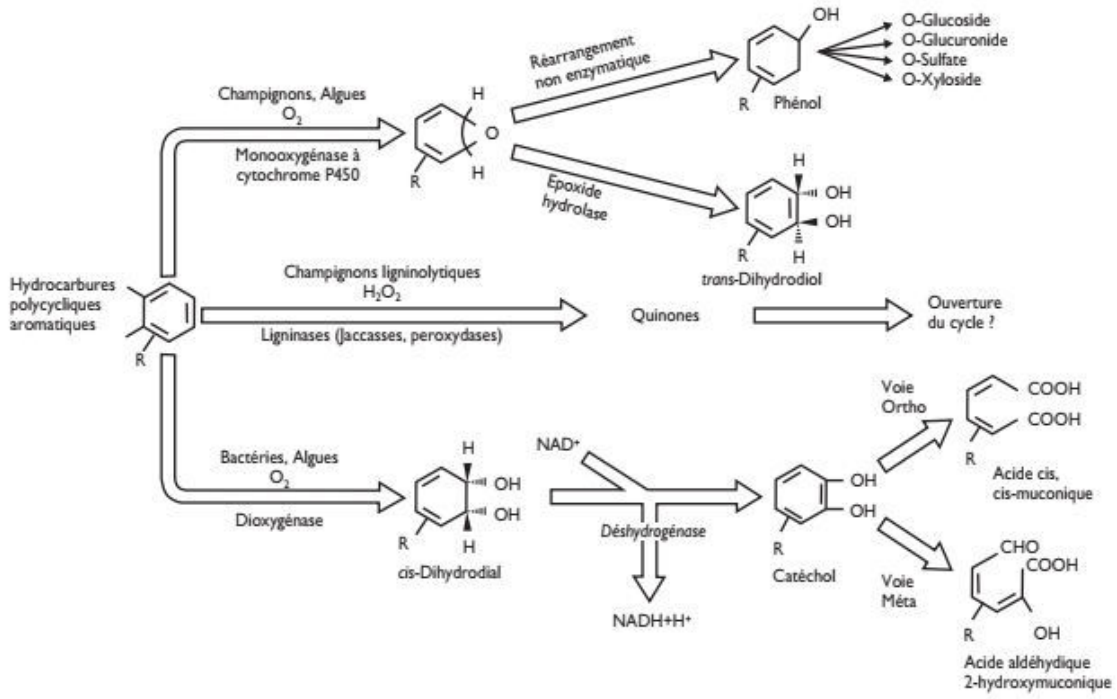


Figure 1.5. Étapes initiales de l'oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par les microorganismes (Cerniglia, 1993).

1.2. Les microorganismes responsables de la dégradation de hydrocarbures

1.2.1. Les algues et les cyanobactéries

Quelques études ont démontré l'aptitude des algues vertes, rouges et brunes ainsi que des cyanobactéries à dégrader les HPAs. Il semble cependant que cette capacité se limite aux HPAs de faible poids moléculaire (Juhasz et Naidu, 2000), même si quelques travaux ont prouvé la capacité d'une algue verte (Selanastumcapricornutum) à dégrader le benzo(a)pyrène (LindquistetWarshawsky, 1985). La voie métabolique Généralement empruntée conduit à la formation de cis-dihydro diols ou plus rarement de trans-dihydrodiols (figure 1.6) (JuhashetNaidu, 2000)

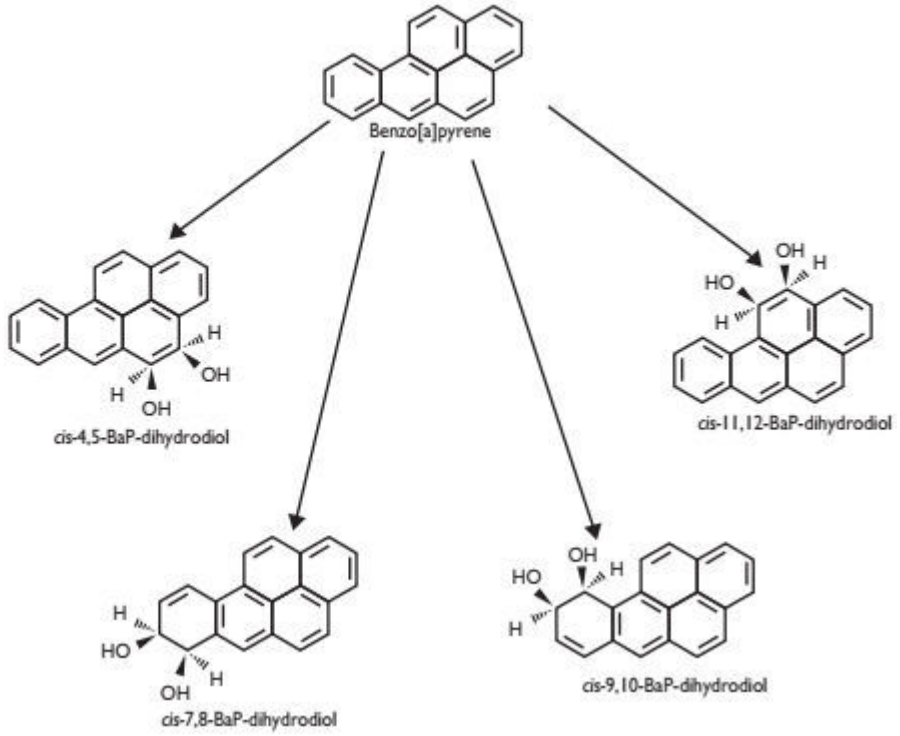


Figure 1.6. Produits d'oxydation du benzo(a)pyrène par les algues (Juhasz et Naidu, 2000).

1.2.2. Les bactéries

Les bactéries ont été le groupe de microorganismes le plus étudié, et leur aptitude à dégrader les hydrocarbures a été démontrée depuis plus de50 ans. Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leur capacité à dégrader les HPAs sont : Acinetobacter, Alcaligenes, Beijerinckia, Gordona, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardi Pseudomonas, Rhoddococcus, Sphingomonas (Cerniglia, 1992 ; Juhash et Naidu, 2000). La dégradation des HPAs par les bactéries se fait en plusieurs étapes afin d'obtenir des composés simples servant comme source de carbone (figure 1.7).

La première étape consiste en une attaque initiale des HPAs par l'intermédiaire d'une enzyme de type dioxygénase (addition dans le cycle benzénique de deux atomes d'oxygène en dispositions bien précises en fonction de l'HPA considéré). Cette première étape conduit à la formation de cis-dihydrodiols qui sont métabolisés, dans un second temps, en catéchol ou acides gentisiques qui sont à leur tour dégradés selon deux voies, dites en méta et en ortho, en composés simples (pyruvate, succinate…) facilement utilisables par les microorganismes (Juhash et Naidu, 2000). Cependant, parallèlement à cette voie majoritaire, des métabolites de typetrans-dihydrodiols ont cependant été mis en évidence lors de la dégradation du naphtalène et du pyrène par *Mycobacterium sp.,* suggérant l'intervention de monooxygénases à cytochrome P450 (Kelley *et al.*, 1991).

Alors que les exemples de dégradation des HPAs de faible poids moléculaire sont nombreux, les HPAs de hauts poids moléculaires, de 4 cycles et plus, semble être plus réfractaires à la biodégradation bactérienne. De manière générale, les bactéries semblent dégrader plus efficacement et plus rapidement les composés à trois cycles par rapport aux composés plus lourds (Cerniglia, 1992; Juhash et Naidu, 2000). La raison invoquée est que l'attaque des HPAs les plus lourds nécessite la présence d'une source de carbone supplémentaire cette dégradation se ferait par Co métabolisme (Heitkamp *et al.*, 1988). Des travaux ont cependant démontré l'aptitude de plusieurs souches bactériennes à dégrader de façon limitée des HPAs de haut poids moléculaire comme unique source de carbone et d'énergie (Juhasz *et al.*, 1997).

Récemment, les techniques moléculaires (hybridation moléculaire, approche PCR, dénaturent gradient gel électrophorèses) ont été mises à profit afin de pouvoir évaluer les potentialités dégradatives des souche sautochtones d'un biotope. C'est ainsi que plusieurs souches bactériennes (*Gordona, Mycobacterium, Rhodococcus* et deux *Pseudomonas, Xanthomonas*) capables de dégrader le naphtalène et les HPAs de haut poids moléculaire ont été isolées par (Hamann *et al.* 1999) grâce à l'utilisation d'une sonde correspondant à un fragment du gène *ndoB*(codant pour l'ISPα (large ironsulfurprotein)) de la naphtalène-Dioxygénase de *Pseudomonas putida* (PaW736)

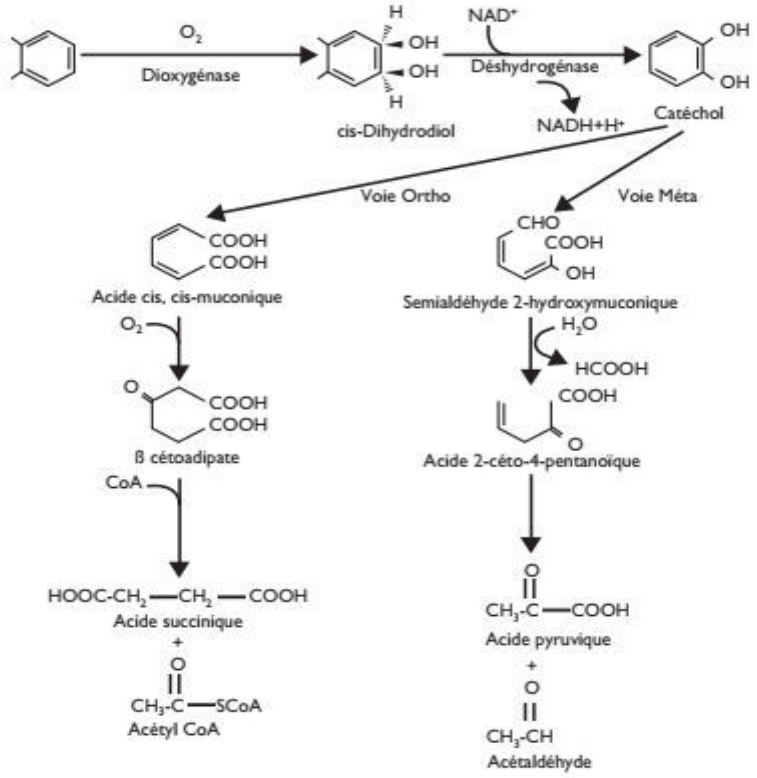


Figure 1.7. Métabolisme bactérien des hydrocarbures polycycliques aromatiques par clivage ortho et meta (Juhasz et Naidu, 2000)

1.2.3. Les champignons

Les avantages principaux des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires à large spécificité de substrats. De nombreuses études en sols ont démontré l'utilité et l'efficacité des champignons pour la bioremédiation des sols pollués par les HPAs (Haemmerli *et al.*, 1986, Sutherland *et al.*, 1991 ; Eggen et Majcherczyk, 1998 ; Bogan*et al.*,1999). Cependant, alors que les voies de dégradation des HPAs par les bactéries ont été clairement démontrées, les connaissances sur la dégradation des HPAs par les champignons sont beaucoup plus limitées. Les champignons semblent dégrader les HPAs principalement en présence d'une autre source de carbone : les HPAs n'interviendraient pas dans la croissance mais cette attaque servirait uniquement à réduire les propriétés toxiques, mutagéniques et cancérigènes de ces composés (Cerniglia *et al.*, 1985).

Deux voies principales ont été avancées comme pouvant intervenir dans le métabolisme des HPAs par les champignons : la voie des enzymes ligninolytiques et celle des enzymes de type monooxygénase à cytochrome P450

1.2.3.1. La voie des enzymes ligninolytiques

Elle concerne les champignons ligninolytiques (c'est-à-dire ayant l'aptitude à dégrader la lignine) qui appartiennent à la classe des Basidiomycètes, encore appelés « champignons de la pourriture blanche » (ou « whiterot-fungi »), en raison de l'aspect blanchâtre du résidu de dégradation de la lignine suite à leur attaque. Les genres plus couramment étudiés sont *Phanerochaete* (qui constitue le modèle pour les champignons ligninolytiques), *Pleurotus, Trametes* et *Bjerkandera*.

Ces champignons ont la particularité de produire, souvent en abondance, l'une et/ou l'autre de ces enzymes extracellulaires : laccase et peroxydases (dont les principaux types sont les lignine peroxydase et manganèse dépendante peroxydase). Ces enzymes étant peu spécifiques, elles peuvent dégrader d'autres composés organiques présentant des analogies de structure avec la lignine ce qui est le cas des HPAs, tous deux possédantes cycles aromatiques dans leur structure. Dans le cas des études menées en sols, il a été prouvé que leurs activités enzymatiques extracellulaires leurs confèrent un avantage certain sur les bactéries en ce qui concerne la dégradation de HPAs, ceux-ci étant peu ou pas biodisponibles puisque fortement adsorbés aux particules du sol (Field *et al.*, 193).

Cette voie d'oxydation, qualifiée de non spécifique, conduit à la formation de métabolites de type quinones (figure 1.8) (Sutherland *et al.*, 1995).

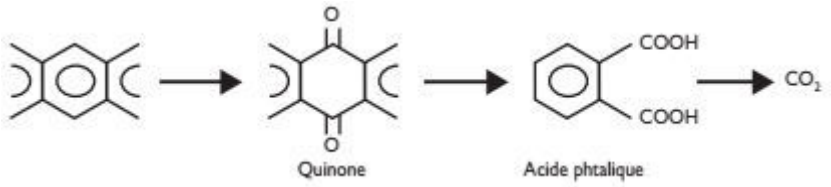


Figure 1.8. Oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par la voie des enzymes extracellulaires (Sutherland et *al*., 1995).

- **La voie des monooxygénases à cytochrome P450**

Cette voie a souvent été attribuée aux champignons dits non ligninolytiques. Chez ces champignons, l'oxydation des HPAs fait appel à un système enzymatique intracellulaire impliquant une monooxygénase à cytochrome P 450, système connu chez les mammifères et l'homme pour intervenir dans la dégradation des xénobiotiques (Cerniglia, 1992). L'intervention des cytochromes a de nombreuses fois été suggérée mais de façon indirecte (utilisation d'inhibiteurs, dosage de la cytochrome P450réductase (CPR), dosage du NADPH, détection de l'incorporation d'oxygène marqué dans le substrat…) (Dutta *et al.*, 1983 ; Ghosh et *al.*, 1983; Rafin *et al.*, 2000; Verdin et *al.*, 2004.1.a). Des exemples de purification et de caractérisation de cytochrome P 450 n'ont été que très peu rapportés en raison de la forte instabilité et de la faible expression de cette enzyme (van den Brink, 1998).Cette voie de dégradation régio et stéréosélective conduit à la formation de métabolites de type trans dihydrodiols, phénols et quinones (figure 1.9) (Sutherland *et al.*, 1995). Peu de souches fongiques autres que les champignons de la pourriture blanche ont été décrites comme capables de métaboliser les HPAs.

Le champignon *Cunningham Ella elegans*, appartenant à la classe des Zygomycètes, constitue le modèle d'étude pour les champignons non ligninolytiques. *Fusarium solani*, autre champignon n'appartenant pas aux « white-rot-fungi », isolé au laboratoire MPE (ULCO) à partir d'un sol pollué, a fait l'objet d'études approfondies et il a été démontré que cette souche est capable de dégrader une large gamme d'HPAs (Rafin et *al*, 2000 ; Veignie et *al*,2002 ; Verdin *et al.*, 2004a, 2004b).

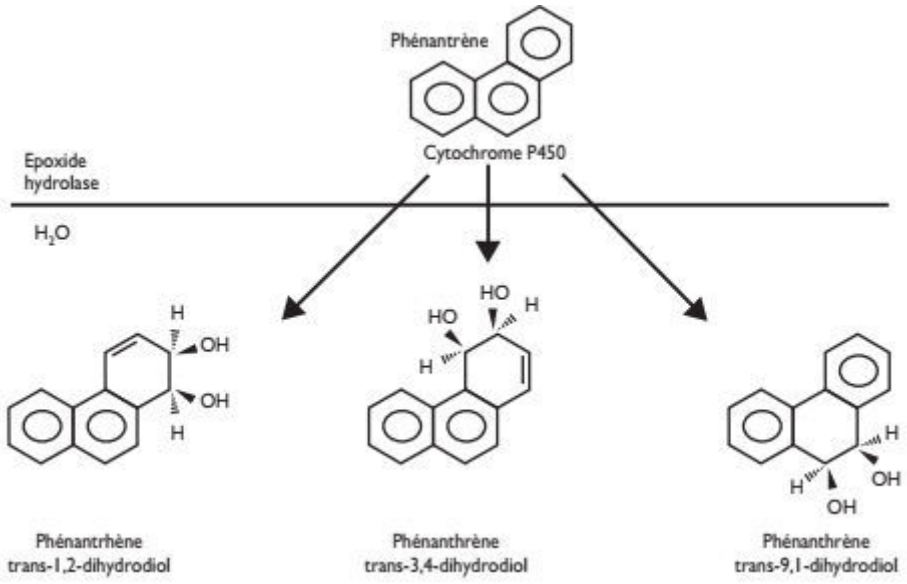


Figure 1.9. Oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par la voie des monooxygénase à cytochrome P450 chez les champignons (Sutherland et al., 1995).

Il a été clairement démontré, *in vitro* et *in vivo* (en milieu de culture), que les enzymes ligninolytiques ont la capacité d'attaquer les HPAs. Ce système enzymatique a souvent été attribué comme unique voie de dégradation des HPAs pour les champignons ligninolytiques. Ceci a été remis en cause par Sutherland *et al.* (1991) et Hammel *et al.* (1992) qui ont démontré que dans le cas d'une étude de dégradation du phénanthrène par *Phanerochaete chrysosporium*en conditions non ligninolytiques, les métabolites obtenus étaient analogues à ceux formés par les champignons du modèle *Cunninghamellaelegans* (trans-dihydrodiols et phé-nols). Réciproquement, des champignons non-ligninolytiques produisent des cétones et quinones sans que les voies de formation soient élucidées (Launen, 1995).

Les travaux de Bezalel *et al.* (1996) et Masaphy *et al.* (1995, 1996) ont montré l'implication, à la fois, des enzymes ligninolytiques et des monooxygénases à cytochrome P450dans la dégradation des HPAs chez le champignon ligninolytique *Pleurotus* sp. Enfin, une nouvelle voie alternative de dégradation qui mettrait en jeu des formes activées de l'oxygène lorsque sont inhibées les voies classiques d'utilisation de l'H2O2(peroxydases et cytochrome P450) a été décrite récemment chez *F. solani* (Veignie et al, 2004).

1.2.3.2. Intérêt des consortiums champignon-bactéries

Il est connu que les HPAs deviennent dangereux par « activation » lors de leur métabolisme : c'est-à-dire que des composés hautement réactifs, transitoires ou non, sont produits au cours de leur dégradation. Le danger est donc que la dégradation soit incomplète et

aboutisse à l'accumulation de métabolites intermédiaires qui se révéleraient bien plus toxiques pour L'Homme et son environnement que le composé parent. Bien que plusieurs exemples de minéralisation des HPAs par les champignons aient été décrits, Fan et Krishnamurthy (1995) considèrent que la dégradation des HPAs par les champignons serait généralement incomplète, et une association avec des bactéries serait nécessaire pour une minéralisation totale. En effet, Field *et al* (1992), ont démontré que certains champignons minéralisaient l'anthracène alors que d'autres accumulaient des intermédiaires de dégradation (anthraquinone) dans le milieu culture. Plusieurs travaux ont démontré l'intérêt des consortiums pour obtenir une minéralisation des polluants comme c'est le cas pour des substances poly aromatiques naturelles (ex : lignine) (Tuomela *et al.*, 2000). Il semblerait qu'il existe une synergie entre champignons et bactéries pour la dégradation des HPAs (l'activité extracellulaire des champignons permettant l'oxydation de l'HPA en quinones correspondantes solubles et accessibles pour les bactéries qui les minéralisent) (Field *et al.*, 1992; Cerniglia, 1997; Kotterman *et al.*, 1998).

2. ACTIVITÉS ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUES DES PRODUITS GÉNÉRÉS PAR LES MICRO-ORGANISMES

2. ACTIVITES ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUES DES PRODUITS GENERES PAR LES MICRO-ORGANISMES

2.1. Activité antimicrobienne

2.1.1. Généralités

Un microbe, ou micro-organisme, fait partie d'un groupe large et extrêmement divers D'organismes. Ces organismes sont regroupés sur la base d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne peuvent être visualisés sans l'aide d'un microscope. Les microbes sont Indispensables à la vie. Parmi leurs nombreux rôles, ils sont nécessaires au cycle géochimique et la fertilité de sols. Ils sont utilisés pour produire des aliments ainsi que des composants Pharmaceutiques et industriels. D'un autre côté, ils peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires. Enfin les microbes sont largement utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les processus cellulaires (Nicklin et *al.,*2000).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

2.1.2. Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux et obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas

de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (Nauciel et Vildé., 2005).

2.1.3. Les métabolites secondaires

Les métabolites primaires (métabolisme primaire) sont associés aux fonctions vitales pour la cellule : aucun organisme ne peut vivre sans la glycolyse ou une voie métabolique équivalente.

2.1.3.1. Ensemble de cours sur le métabolisme primaire

Les métabolites secondaires (aussi appelés produits naturels) sont des molécules organiques non directement impliquées dans le développement ou la reproduction d'un organisme. Leur absence n'entraîne pas une mort immédiate mais peut limiter la survie, la fécondité ou l'apparence d'un organisme. Cette absence peut aussi n'avoir aucun effet. Les métabolites secondaires ont essentiellement pour rôle d'accroître la compétitivité de l'organisme qui les biosynthétise : les métabolites secondaires lui procurent un avantage sur d'autres organismes.

Malgré tout, les métabolites secondaires ont des fonctions biologiques qui peuvent s'avérer essentiels. Exemples :

- Les pigments isoprénoïdes et les parfums (isoprénoïdes volatils) des plantes attirent les insectes pollinisateurs (essentiels pour la reproduction)
- Moyens de défense contre des agressions d'origines biotiques et abiotiques
- Communication entre plantes, micro-organismes ou animaux (hormones, phéromones,)

Les métabolites secondaires sont souvent spécifiques d'une espèce. Exemples : les bactéries (*Actinomyces*, *Streptomyces*), les champignons filamenteux (Penicillium), les éponges marines (Invertébrés),

2.1.3.2. Exemples de précurseurs de produits industriels ou pharmaceutiques synthétisés par des micro-organismes modifiés

- Introduction de fragments d'ADN de 36.000 paires de bases codant pour 20 enzymes et/ou protéines impliquées dans le catabolisme d'alginate pour la production de biocarburant à partir d'algues.

- Dérivés d'intérêt pharmaceutique :

1. L'anti-oxydant naringenine (produite par *Escherichia coli*)

2. L'anti-cholestérol lovastatine, précurseur de la simvastatine (produite par *Aspergillus terrus)*

3. production par Saccharomyces cerevisiae de l'acide artemisinique (terpenoide), précurseur de l'artémisinine utilisée contre la malaria

- Synthèse de butanediols.

Le 1,3-propanediol est naturellement produit pas certaines bactéries lors de la fermentation du glycérol. Il est utilisé pour la synthèse de poly-methylène térephthalate (Vendu sous le nom déposé "Soron" par DuPont).

- La diamine putrescine, utilisée pour la synthèse du nylon 4,6, a été produite par Escherichia coli après délétion d'un gène (rpoS) codant un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress.
- Synthèse des monomères 3-hydroxypropionate et 3-hydroxybuyrate et synthèse de leurs polymères et co-polymères respectifs.
- Synthèse des polymères bactériens poly-hydroxy-alcanoates.

2.1.4. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement Synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

2.1.4.1. Recherche et découverte d'antibiotiques

L'utilisation généralisée d'antibiotiques à partir des années 1940 (notamment la pénicilline -découverte en 1928 et la streptomycine - découverte en 1943) a transformé la médecine en fournissant des remèdes efficaces contre les maladies les plus fréquentes de l'époque. Les antibiotiques naturels ont évolué afin de rompre les barrières qui empêchent la pénétration dans les bactéries cibles et la plupart des antibiotiques introduits en médecine ont été découverts à partir de microorganismes du sol cultivables. Cependant, le développement de résistances limite la durée de vie utile des antibiotiques et exige de découvrir en permanence de

nouveaux composés. Mais la découverte de médicaments anti-microbiens est d'une rare difficulté, principalement en raison de la faible pénétration des composés dans les bactéries.

La surexploitation de cette ressource limitée dans les années 1960 a mis fin à la découverte d'antibiotiques et ce d'autant que les approches par synthèse chimique n'ont pas pu remplacer les antibiotiques naturels.

2.1.5. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Quand l'ATB inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet Bactériostatique, mais lorsque l'ATB provoque la mort des bactéries on parle de l'effet Bactéricide (Haddouchi et *al*., 1999).

- **L'effet bactériostatique**

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît. En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'a plus des germes microbiens visibles (Muanda, 2010).

- **L'effet bactéricide**

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux Concentrations d'ATB utilisées in vivo ou in vitro ; s'il persiste moins de 0,01% de survivants Après 18 h de culture (Muanda, 2010).

2.2. L'activité antioxydante

2.2.1. Généralités

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (Tarnawski et *al*.,2005).

L'appellation ROS n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $O2^{\bullet -}$, radical hydroxyl OH•, monoxyde d'azote NO•, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O2, peroxyde d'hydrogène H2O2, peroxynitrite $ONOO^-$ (Favier, 2003). Ces derniers endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et

de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques et accélèrent le processus de vieillissement (Dasgupta et De, 2007).

2.2.2. Le stress oxydant

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Smirnoff, 2005).

2.2.3. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (électrons célibataires). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction enchaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003). Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (par exemple les macrophages pendant la phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment les cellules humaines, sont l'oxygène, les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition. Les radicaux libres présents dans la cellule en oxydent les molécules (molécules se trouvant à l'intérieur des cellules, en particulier des lipides), ce qui provoque la mort des cellules. Toutefois le corps humain possède des mécanismes de défense contre les effets des radicaux libres. Ce sont les enzymes qui dégradent les peroxydes et les métaux de transition et des protéines ou d'autres molécules qui emprisonnent les radicaux libres (Hubert, 1998).

2.2.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyle, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes (White, 1994).

Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire (Poknory, 2001).

Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate), et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) (White, 1994).

2.2.4.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika et *al*., 2004).

- La superoxyde dismutase (SOD) : accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD)] (Piquet et Hebuterne, 2007).
- La catalase : présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Piquet et Hebuterne, 2007).
- La glutathion peroxydase (GPx) : La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec L'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (Piquet et Hebuterne, 2007).

2.2.4.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Wang et al., 2003).

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo ont était proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, la β-carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les sources alimentaires de ces antioxydants naturelles sont présentées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Principaux nutriments Antioxydants	**Sources alimentaires**
Vitamine C	Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile : de tournesol, de soja, de maïs, Beurre, œufs, noix.
β-carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poissons, œufs, viande, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits, laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers, Brocoli, chou œufs, poissons, viande

2.3. L'activité antifongique

2.3.1. Généralité

Les antifongiques sont des substance (naturelles) capables de détruire sélectivement ou non les différents champignons recentrés en mycologie. Ils s'administrent par voie locale ou générales (O'fel ,1982).

2.3.2. Espèces de champignons ayant une activité antifongique

Signalée à notre connaissance, 52 espèces ont été signalées comme ayant une activité antifongique la plupart sont des champignons comestibles (44 référencés parmi 52 espèces). Malgré le moindre intérêt des chercheurs pour les champignons non comestibles par rapport aux espèces comestibles, ils contiennent également différents métabolites pouvant être utilisés dans les produits pharmaceutiques.

La plupart des champignons qui ont révélé une activité antifongique sont sauvages, ce qui permet une plus grande diversité parmi les espèces étudiées. La culture des champignons nécessite plusieurs conditions spécifiques, étant difficile à obtenir. Plusieurs facteurs influent sur la culture des champignons, principalement les conditions environnementales et physiologiques, ainsi que l'existence de fléaux. Selon Pinna et *al*, les conditions du sol affectent le phénotype de tous les champignons, bien que chaque espèce ait une réponse spécifique. Un bon exemple est l'humidité du sol qui peut stimuler (par exemple Boletus edulis et Lactarius deterrimus) ou retarder (Cortinarius caperatus et Catathelasma ventricosum) la période de fructification initiale. De plus, la présence d'insectes, d'acariens, de crustacés et d'autres arthropodes décomposant des substrats synthétiques ou du bois utilisé dans la culture des champignons a été signalée comme compromettant leur croissance. Une autre étude rapporte également que des substrats complétés par un précipité de carbonate de sodium (CaCO3) augmentent le rendement et la taille du champignon shiitake Par conséquent, en raison de tous les problèmes mentionnés, seul un nombre limité d'espèces est cultivé et la meilleure façon d'obtenir une grande variété de champignons, c'est les récolter dans les habitats naturels et originaux.

Les champignons les plus étudiés en ce qui concerne les propriétés antifongiques proviennent de Turquie et de Chine. Vingt et une espèces sont exclusivement saprotrophes, décomposant la matière organique morte et étant très importantes pour l'équilibre de l'écosystème. Seize espèces sont mycorhiziennes, qui établissent des relations symbiotiques avec les racines des plantes et des arbres, et six sont des parasites biotrophes, infectant un hôte et profitant de cette relation. Quatre espèces sont des champignons parasites nécrotrophes qui tuent l'hôte puis continuent de se nourrir de matière morte, passant au saprotrophe ; enfin cinq espèces sont saprotrophes mais aussi mycorhiziennes.

2.3.3. Extraits de champignons avec activité antifongique signalée

Différents extraits obtenus à partir de plusieurs espèces de champignons ont été décrits dans la littérature comme possédant une activité antifongique.

En ce qui concerne les espèces Agaricus, Öztürk et *al.* Ont rapporté une activité antifongique d'extraits méthanoliques d'A. Bisporus, A. bitorquis et A. essettei contre Candida albicans et C. tropicalis, étant Agaricus bitorquis le plus actif pour les deux espèces. Néanmoins, Barros et *al.* n'ont pas trouvé d'activité d'Agaricus bisporus contre *Candida albicans.*

L'extrait méthanolique de *Ganoderma lucidum* a donné une activité contre *Trichoderma viride* (CMI = 0,005 mg / mL) supérieure à celle des standards testés, le bifonazole (CMI = 0,15 mg / mL) et le kétoconazole (CMI = 1,0 mg / mL). De plus, il a montré une activité démélanisante contre *Aspergillus niger*.

Des extraits d'acétate d'éthyle et d'eau avec 5% de DMSO d'*Agrocybe perfecta, Climadocon pulcherrimus*, *Oudemansiella canarii* et *Pycnoporus sanguineus* ont montré une activité antifongique contre *Candida krusei.* Parmi ces espèces, seul l'extrait d'Oudemansiella canarii a montré une activité contre d'autres espèces de Candida (*C. albicans, C. glabrata et C. tropicalis*). Des extraits d'acétate d'éthyle et d'eau avec 5% de DMSO *d'Agrocybe perfecta*, *Climadocon pulcherrimus*, *Oudemansiella canarii* et *Pycnoporus sanguineus* ont montré une activité antifongique contre *Candida krusei*. Parmi ces espèces, seul l'extrait d'*Oudemansiella canarii* a montré une activité contre d'autres espèces de *Candida* (C. albicans, C. *glabrata* et C. *tropicalis*).

L'extrait éthanolique de champignon *Albatrellus dispansus* a montré l'activité la plus élevée contre *Sclerotinina sclerotiorum* et *Fusarium graminearum*
L'extrait éthanolique *d'Armillaria mellea* a montré une activité plus élevée (IZD = 19 mm) que l'extrait chloroformique (IZD = 2 mm) contre *Candida albicans*, en utilisant le nistatyn (IZD = 22 mm) comme contrôle positif.

L'activité antifongique de l'extrait de chloroforme d'Hygrophorus agathosmus était faible pour *Saccharomyces cerevisiae* (CMI = 250 µg / mL) par rapport au témoin positif (fluconazole, CMI 62,5 µg / mL). La même chose a été observée pour l'extrait de dichlorométhane de Suillus collitinus contre *Saccharo- myces cerevisiae* et *Candida albicans*
Malgré la faible activité antifongique révélée par les espèces de *Lactarius*, *L. camphoratus* a été celui qui a démontré une activité contre *Candida albicans*.

L'extrait éthanolique de *Laetiporus* sulfureuses semble prometteur contre *Candida albicans (*IZD = 21 ± 1 mm), montrant une activité plus élevée que le témoin positif, la nystatine (IZD = 19 mm).

3. MATEIREILS & METHODES

3. MATERIELS & METHODES

3.1. Matériels d'étude

- Le sol pollué par les hydrocarbures
- Les hydrocarbures : Les déchets d'hydrocarbures utilisés pour l'isolement de souches microbiennes.

Tableau 3.1. Les caractéristiques analytiques

Eléments	C	N	P
Teneur en %	45-50	0.2-0.8	0.015-0.03

- Trois **milieux de culture sont envisageables**
  - *La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.*
  - *Le milieu Sabouraud pour la culture et l'isolement des champignons.*
  - *Gélose de Muller-Hinton : pour le test de la diffusion en gélose.*

3.2. Les bactéries

3.2.1. Isolement et caractérisation des souches bactériennes

3.2.1.1. Les cultures d'enrichissement

La plupart de nos connaissances sur les microorganismes proviennent d'études réalisées sur des cultures pures isolées de l'environnement. Cet isolement est précédé par une phase d'enrichissement qui va favoriser la croissance d'un type donné de microorganismes, sélectionné en fonction des conditions physiques et nutritionnelles du milieu.

3.2.1.2. La dilution

Seulement deux des neufs échantillons prélevés ont fait l'objet d'une investigation et ont donné lieu à un travail laborieux qui a duré environ neuf mois. Pour isoler les souches bactériennes, il faut procéder par des dilutions décimales à partir des deux solutions mères du sol préparées.

3.2.1.3. L'isolement

A partir de l'enrichissement il est possible d'isoler des espèces pures. Pour ce faire on dispose de techniques classiques qui sont : l'isolement sur boite, la dilution successive en milieu liquide ou dans l'agar. Pour chacune des méthodes plusieurs repiquages successifs des souches isolées sont nécessaires pour s'assurer de la pureté de l'isolat. Une fois la souche isolée il convient de la caractériser, c'est-à-dire de définir les caractères phénotypiques et génotypiques qui permettront de la comparer avec d'autres microorganismes préalablement isolés. On réalise alors une taxonomie.

3.2.1.4. La purification

C'est une étape très importante et très délicate, qui demande beaucoup de temps, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes, et c'est de la pureté des cultures que va dépendre le reste de travail taxonomique.

Après le premier ensemencement sur boite de Pétri, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie d'aspect différent est ensemencée à part dans un milieu liquide. Les tubes ensemencés seront incubés 18 à 24h à 30°C. La purification des souches se fait par des passages successifs et alternés en milieu liquide, puis en milieu solide jusqu'à l'obtention au sein d'une boite de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur. Après plusieurs passages sur milieu gélosé, la souche est en général purifiée et nous procédons au test d'émulsification.

3.2.1.5. Vérification de la pureté des souches

La pureté des souches microbiennes utilisées a été vérifiée par repiquages successifs des souches bactériennes sur le milieu Müller-Hinton et incubation à 37°C pendant 24 heures.

3.2.1.6. Conservation des isolats (à long et court terme)

Deux techniques peuvent être utilisées pour la conservation des souches pures

- **Conservation à court terme :** La conservation de courte durée se fait par ensemencement d'une colonie sur gélose solide inclinée, après incubation à 30°C pendant 24h, les géloses sont conservées à 4°C pour quelques semaines (Font de Valdez, 2002).
- **Conservation à long terme :** Les bactéries sont conservées dans des crayon-tubes de 1 ml contenant 0.30ml de glycérol stérile (50%V /V) additionné de suspension bactérienne en phase exponentielle (0,70 ml). Le mélange homogénéisé est conservé à -20°C (Font de Valdez, 2012).

3.2.2. Identification

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques (Lamouliatte et *al*., 1992). Sur chacun des boites servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation. Chaque colonie suspectée est purifiée deux fois par isolement sur le milieu King A, King B pour l'isolat P6 et gélosé nutritive pour l'isolat B1. Pour une identification préliminaire de ces bactéries, nous sommes basés sur des études :

- Morphologique (les formes caractéristiques des colonies, leur arrangement, la présence ou non de spores et leur coloration de Gram, coloration des spores).
- Etude biochimiques (test de mobilité, test de catalase et de type respiratoire).
- Le profil biochimique par l'utilisation des galeries API 20E pour *Bacillus* et API 20 NE pour Pseudomonas.

3.2.2.1. Etude morphologique

Suite à la purification des isolats, deux souches ont été retenues, dont nous avons étudié les genres conformément au protocole de (Carr et *al*., 2002).

- **Aspect macroscopique.** Cette méthode est basée sur l'observation visuelle des colonies, (la forme, la couleur, contour, l'élévation …) permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (Singleton, 1999).
- **Aspect microscopique.** L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de Gram.
- **L'état frais.** Permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparé avec l'eau physiologie et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope au grossissement × 100 (Singleton, 1999).

- **Coloration de Gram.** Est une coloration complexe qui permet de connaitre la forme, l'arrangement, la pureté, ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram+). La consistance et la valeur de coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries selon leur Gram. (Marchal et Bourdon, 1982). La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par (Prescott et *al.*, 2003).
- **Recherche des spores.** Coloration par vert de Malachite, les spores apparaissent vert foncé sur fond vert clair (Delarras, 2007). La coloration des spores a été effectuée selon le protocole décrit par (Dorner, 1926).

3.2.2.2. Étude biochimiques (les tests d'orientations)

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les bactéries étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique pour les souches microbiennes. Les épreuves biochimiques permettent, en général, de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Tortora *et al* ,2003).

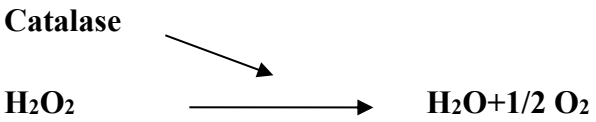
a- Étude du type respiratoire

Selon (Marchal et Bourdon 1982), Le type respiratoire estimé en évidence par l'ensemencement d'un milieu gélosé (viande- foie) dans des tubes fins et profonds dans lesquels l'oxygène n'est présent qu'en surface et sur une zone étroite de 1cm. Après incubation des milieux à 30°C pendant 24 heures, 4 types respiratoires peuvent être distingués

- ❖ Croissance en surface : bactéries aérobies strictes.
- ❖ Croissance en profondeur : bactéries anaérobies strictes.
- ❖ Croissance le long du tube : bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- ❖ Croissance dans la partie supérieure proche de la surface : bactéries micro aérophiles.

b- Recherche de la catalase

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Sur la lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (Tortora *et al.*, 2003).

c- Test d'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase, enzymes entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraine la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-diméthyle paranitro-phénylène-diamine, qui est préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile, déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraichement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (Singleton, 1999).

d- Recherche de nitrate réductase

L'étude de réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose. Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N2). A une culture de 24 à 48h d'incubation à 30°C en bouillon nitraté, cinq gouttes des réactifs de Nit 1 puis Nit 2 ajoutés. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Lorsque la coloration est jaune ou rouge ; les nitrates sont réduits en réduites, on parle de nitrate réductase positive (NR+).
- Lorsque le milieu reste incolore, de la poudre de zinc est ajouté (réducteurs des nitrates), après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés.
- Si le milieu devient rose, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie : nitrate réductase négative (NR-).
- Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduits au-delà du stade nitrites : nitrate réductase positive (NR+) (Tortora *et al.*, 2003).

3.2.2.3. Étude physiologique

Consiste à étudier la sensibilité des germes à différentes variations de facteurs de l'environnement. Ont été testées les croissances des germes isolés à différentes températures (4, 20, 28, 37 et 41°C), à différents pH (4, 6, 7, 8 et 9), à la tolérance à la salinité, ainsi qu'à la tolérance à la concentration des hydrocarbures.

3.2.2.4. Test de Mannitol mobilité

Le Mannitol est un produit de réduction de D-Mannose. Sa dégradation conduit à la formation du fructose dont l'attaque aboutit à la formation des acides à chaines très courtes (acide acétique, Acide formique). Le milieu Mannitol mobilité permet la recherche simultanément de la fermentation du Mannitol et la mobilité des bactéries (Marchal et Bourdon, 1982).

- La fermentation du Mannitol entraine le virage du milieu au jaune.
- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement.

3.2.2.5. Recherche de lécithinase

Ce test a été réalisé par l'ensemencement de la souche en strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile. Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition de zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase (De Vos *et al.,* 2009).

3.2.2.6. Recherche d'amylase

Ce test a été réalisé en cultivant la souche sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon. Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (De Vos *et al,* 2009).

3.2.2.7. Recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé**.** Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (De Vos *et al.,* 2009).

3.2.2.8. Utilisation des galeries API

L'utilisation de galeries miniaturisées prêtes à l'emploi ont permis l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires (API 20 NE et API 20 E, bio Mérieux sa), qui occupent une place de choix pendant notre étude.

3.2.3. Test de l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens

- **Méthode des disques**

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide, ensuite des disques d'antibiotiques ou des autres agents antimicrobiens sont déposés sur le tapis bactérien. Après incubation, les boites sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (BERECKA *et al*., 2009).

- **Méthode des Puits**

Cette méthode, telle que décrite par BERGHE ET VLIETINCK (1991), consiste à inoculer, par inondation ou en profondeur avec une dilution adéquate (suspension microbienne), un milieu coulé dans une boîte de Pétri sur une épaisseur de 8 mm, et à réaliser des puits de 6 mm de diamètre de manière concentrique qui seront remplis de 50ul de la solution à base d'agent antimicrobien tester. Après une pré-diffusion de 45 mn à température ambiante, les souches sont incubées à 35°C pendant 24 heures pour les bactéries et 25°C pendant 48 heures pour les levures et moisissure. A la fin de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (KUETE *et al.*, 2004).

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'agent antimicrobien à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. L'agent diffuse radialement et crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (DORMAN ET DEANS, 2000).

La gélose Muller Hinton a été coulée dans des boites de Pétri préalablement ensemencée de 1 ml à partir d'une suspension bactérienne de 107 UFC/ml puis la suspension a été homogénéisée avec des mouvements circulaires avant la solidification de la gélose.

Pour les champignons et levures, après avoir coulé la gélose Sabouraud dans les boites de Pétri, environ 60 µl de la suspension fongique ont été étalés en surface de la gélose et solidifiés à l'aide d'un râteau. Les puits sont imprégnés de 50 µl de l'agent antimicrobien. Un témoin négatif est aussi réalisé avec le DMSO afin d'écarter son effet.

Les boites sont maintenues à température ambiante pendant 30 mn pour permettre la diffusion de l'agent antimicrobien, puis elles sont incubées à 35°C/24h pour les bactéries,

25°C/72h pour les levures et moisissures. La lecture des résultats se fait en mesurant les diamètres de la zone d'inhibition autour des puits.

- **Méthode des spots**

Elle consiste à couler 8 mm de gélose liquéfiée sur une boite de Pétri suivie d'une deuxième couche de gélose (3 ml), cette dernière a été homogénéisée avec la substance antimicrobienne à des concentrations différentes.

Une culture fraîche de la souche test est ensuite ensemencée sur ce tapis sous forme de spots. Après incubation, les boites sont examinées. L'inhibition ou la densité du tapis cellulaire est un facteur déterminant la CMI dans cette méthode (TAGG et *al*., 1976 ; RILEY ET CHAVAN, 2007).

Après une incubation, la détermination de la CMI est basée sur l'observation de la présence ou non d'une croissance microbienne. L'absence d'une croissance indique une inhibition du développement microbien.

3.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de la substance antimicrobienne pour laquelle aucune croissance microbienne n'est observée après 24h pour les bactéries et après 48h pour les levures et moisissures (MARTINI ET ELOFF, 1998).

La concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) correspond à la plus faible concentration en agent antimicrobien capable de tuer plus de 99,99 % de l'inoculum microbien initial (soit moins de 0,01 % de survivants) (DEGRYSE, 2008).

La concentration minimale létale (bactéricide ou fongicide) est déterminée par un repiquage d'un inoculum à partir des boites de la CMI sur un milieu gélosé. Après une incubation à 30°C pendant trois jours, la CMB/CMF est déterminée par l'observation de la présence ou non d'une subcroissance microbienne. La CMB/CMF correspond à la plus petite concentration de l'agent antimicrobien testée pour laquelle aucune subcroissance n'a été observée.

3.3. Les champignons

3.3.1. Échantillonnage

Les échantillons du sol contaminé par les hydrocarbures (pétrole cru) ont été pris à partir de trois pots différent contenant chacun une quantité du sol pollué par un hydrocarbure et exposé à l'air libre. Les hydrocarbures utilisés pour la pollution sont : le pétrole cru.

3.3.2. Milieux de culture

- Le milieu Sabouraud pour la culture et l'isolement des champignons
- Gélose de Muller-Hinton : pour le test de la diffusion en gélose.
- Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé pour l'isolement et la purification des microorganismes. Le milieu MSM (Minéral Salt Medium) a été utilisé pour tester la capacité de dégradation des hydrocarbures. Le pH du milieu MSM a été ajusté à 7.2 par un pH mètre (CRISON) (figure 8) en ajoutant quelques gouttes de solution HCl.

3.3.3. Isolement des champignons

1g de sol a été prélevé de chacun des trois pots renfermant les sols pollués par les hydrocarbures (pétrole cru, gasoil et huile de moteur brulée) puis versé dans des tubes contenant 9 ml d'eau distillée stérile et agitée pendant quelques minutes au vortex pour assurer l'homogénéisation. Une série de dilutions a été faite à partir de la solution mère allant de 10-1 jusqu'à 10-5 (figure 3.1)

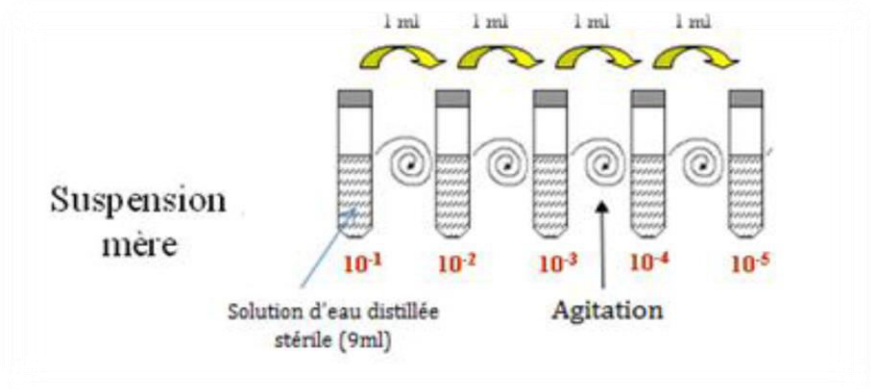


Figure 3.1. Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans l'eau distillée stérile.

Un volume de 0.5 ml de chaque dilution a été étalé avec un étaloir stérile sur la surface des boites Pétri contenant le milieu PDA (figure 3.2).

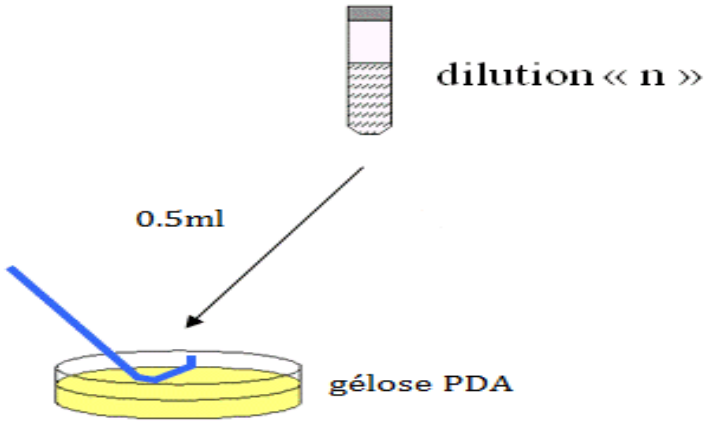


Figure 3.2. Étalement de 0.5 ml de chaque dilution sur le milieu de culture. *Les boites ensemencées ont été incubées à 30°C pendant 7 jours.*

3.3.4. Dénombrement

Le dénombrement a été effectué sur des boites de pétri présentant des colonies fongiques après 7 jours d'incubation à 30 °C.

3.3.5. Purification des souches fongiques

Après 7 jours d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées.

La surface des boites de Pétri contenant le milieu PDA stérile a été divisé en quatre secteur, chaque secteur a été inoculé, à l'aide d'une anse stérile, par une quantité des spores et des hyphes de chaque colonie présente dans les boites d'isolement précédente. Les boites sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

3.3.6. Vérification de la pureté des souches

Le repiquage des souches fongiques a été réalisé sur le milieu Sabouraud et incubation à 25°C pendant 72 heures.

3.3.7. Conservation des souches

Les souches isolées ont été conservées pour des études ultérieures. La conservation a été effectuée à 4 °C dans le milieu PDA. Cette méthode présente un intérêt de conserver l'aspect des colonies et l'utilisation de la souche par repiquage directe, mais elle nécessite des repiquages fréquents, tous les 6 mois environ.

3.3.8. Identification

Les champignons microscopiques présentent une grande variabilité physiologique, mais aussi une grande variabilité génétique. Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'observation des critères morphologiques par l'observation macroscopique et microscopique.

- **Observation macroscopique**

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation (aspect des colonies et de leurs revers, la taille et la couleur).

- **Observation microscopique**

Nous avons placé une quantité de spores ainsi que des mycéliums dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. La préparation est observée ensuite au microscope optique au grossissement (X 40) puis (X100).

3.3.9. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antifongique

L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion sur disques.

- **Méthode de diffusion en milieu solide**

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (milieu Muller- Hinton) pour l'activité antibactérienne et (milieu Sabouraud) pour l'activité antifongique. De ce fait, chacun des disques de papier Wattman stérile N°3 et de diamètre 6 mm est imprégné par 20 µl de chaque extrait algal à une concentration de 50 mg /ml et placé à la surface du milieu de la boite de pétri en présence des disques imbibés par une solution aqueuse (témoins négatifs). Des disques d'ampicilline commercialisée (à 10µg/ disque**)** comme témoins positifs, et des disques de cycloheximide (10µg/ disque) qui ont été pris comme antifongique pour les témoins positifs. Les boites ont été ensuite incubées 2h à 4°C puis à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48 h pour les champignons. La mesure des diamètres des zones d'inhibition entourant les disques contenant les échantillons à tester a été réalisée.

- **La méthode de microdilution**

La méthode de microdilution sur milieu liquide utilisant des plaques Elisa à 96 puits a été utilisée des précultures sont préparées de la même façon que celles décrites précédemment pour le test de diffusion. L'inoculum a été préparé afin d'obtenir une densité cellulaire finale d'environ 106 CFU/ml. Dans les plaques à 96 puits, des dilutions en série de l'extrait algal,

convenablement solubilisés ont été préparées. En parallèle des contrôles appropriés ont été utilisés comme témoins positifs et négatifs. Les plaques ainsi préparées ont été incubées sous agitation modérée, à la température optimale de croissance du microorganisme : à (37°C) pendant 24 h pour les bactéries et à (30°C) pendant 48h pour les champignons. Les tests ont été réalisés deux fois à raison de 3 puits/échantillon lors de chaque essai. Suite à une incubation, la CMI a été déterminée en suivant le virage de la coloration rouge brique du phénol à une coloration jaune, en présence de microorganismes en croissance. Une fois la croissance a été bloquée, on remarque que la couleur rouge du phénol persiste. La CMI correspond à la première concentration en échantillon du premier puits rouge et ne présentant ni trouble ni culot bactérien.

- **Méthode de dilution**

*(Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI)***.** Afin de mieux évaluer cette activité une étude plus poussée a été menée par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits algaux contre les différentes souches bactériennes selon la méthode de micro-dilution. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance microbienne visible à l'œil nu.

3.3.10. Activité antioxydante

- **Test de blanchissement du β- carotène**

Dans cette analyse la capacité antioxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydro-peroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Tepe *et al.,* 2006). Brièvement 2 mg de β - carotène ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue a été introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2.5 ml sont transférés dans des tubes, et 350µl de chaque extrait (2g/l) et du témoin BHT sont ajoutés. L'absorbance a été immédiatement mesurée pour le BHT à 490 nm. D'autres lectures sont mesurées à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h, et 48h) (Tepe *et al.,* 2006).

L'activité antioxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

AAR = (Abs Échantillon/ Abs BHT) x 100

Où :

AAR : activité antioxydante relative.
Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon après 48 heures.
Abs BHT : absorbance du BHT après 48 heures.

- **Test au DPPH**

En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al., 2006)*.

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al.,* 2008). Dans des tubes on introduit 2.5 ml de chaque extrait (0.1mg/ml) et 1ml de la solution méthanoïque au DPPH (0.3 mm), après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm. Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% = 1 + \frac{nx}{1!} + \frac{n(n-1)x^2}{2!} + \cdots \qquad (Eq.2.1)$$

% = [1 – (Abs Échantillon – Abs Contrôle négatif)] x 100

Où

% : pourcentage de l'activité anti-radicalaire.

Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon.

Abs Contrôle négatif : absorbance du contrôle négatif.

4. RESULTATS ANTERIEURS ET LEUR DISCUSSION

4. RESULTATS ANTERIEURS & LEURS DISCUSSION

4.1 Étude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes

4.1.1. Activité antibactérienne

- **Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir du sol agricole.**

Les résultats de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes tests sont reportés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1: Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir du sol agricole.

	Staphylococcus aureus ATCC 43300	*Entérobacter sp* (soucheclinique	*Streptococcus sp (*souche clinique)	*Pseudomonas sp* (souche clinique*)*	*Acinetobacter sp* (souche cliniqu e)	*Proteus sp* (Souche clinique)	*Morganella sp* Souche clinique)
SA55	- (6)	- (6)	- (6)	- (6)	+ (8)	- (6)	-(6)
SaiGN	- (6)	- (6)	- (6)	+ (11)	- (6)	- (6)	-(6)
SA14	- (6)	- (6)	- (6)	+ (20)	-(6)	- (6)	-(6)
SaiC	+ (12)	- (6)	- (6)	+ (16)	- (6)	- (6)	-(6)
SA3	- (6)	- (6)	+(10)	+(15)	-(6)	- (6)	-(6)
SA10	- (6)	+ (18)	+ (15)	+ (13)	- (6)	+ (16)	-(6)
Sai4x	- (6)	- (6)	+ (28)	- (6)	- (6)	- (6)	+ (14)
SA31	- (6)	-(6)	- (6)	+(22)	- (6)	- (6)	-(6)
SAi2BX	- (6)	(12)	- (6)	- (6)	+ (20)	- (6)	-(6)
S31	- (6)	- (6)	- (6)	+ (12)	- (6)	- (6)	+ (14)
SAiB1	- (6)	-(6)	-(6)	+ (17)	-(6)	- (6)	-(6)
Sai9x	- (6)	- (6)	-(6)	+ (10)	- (6)	- (6)	+(7)
SaiXB	- (6)	- (6)	- (6)	- (6)	-(6)	- (6)	-(6)
Sai3B	- (6)	- (6)	+ (13)	- (6)	- (6)	+ (11)	-(6)
SAi2BX (3)	- (6)	- (6)	- (6)	- (6)	- (6)	-(6)	-(6)

= 6 mm : activité négative,> 6mm : activité positive

D'après le tableau 4.1, sauf pour les isolats SAixB, SAi2BX (3), tous les isolats ont montré une activité antibactérienne contre au moins une bactérie test. Les sept souches SA55 ; SAiGN, SA14, SA31, S31, SAiB1, SAi9X sont actives uniquement contre des bactéries à coloration de Gram négatif. Alors que les six souches restantes sont actives à la fois contre des bactéries à

coloration de Gram positif et négatif.

Les deux plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues par la souche SAi4X contre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, avec un diamètre de 30 mm et contre *Streptococcus* avec un diamètre de 28 mm. Alors que la plus petite zone est observée avec la souche SAi9x contre *Morganella sp* (Souche clinique) avec une zone d'inhibition de 7 mm de diamètre (Figure4.1 et 4.2). La comparaison entre la sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des substances bioactives sécrétées par nos isolats est représentée dans le tableau 4.2.

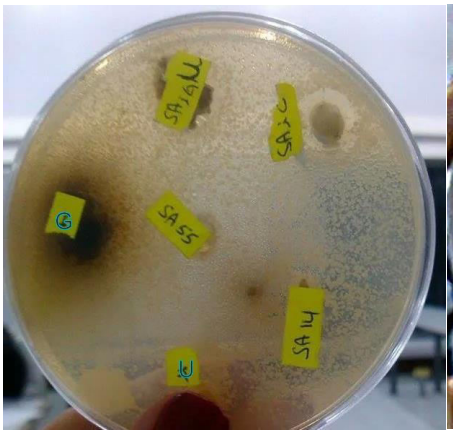


Figure 4.1. Activité antibactérienne de la souche SAiC contre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

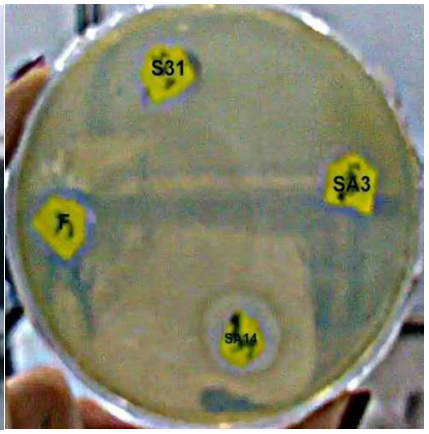


Figure 4.2. Activité antibactérienne des souches SA14, SA3, SA31 contre *Pseudomonas sp*

Tableau 4.2. Sensibilité des souches testées vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les différents actinomycètes isolés à partir de sol agricole

Souche testé	*Staphylococcus aureus*	*Enterobacter* Sp	*Streptococcus* Sp	*Pseudomonas* Sp	Acinetobacter sp	*Proteus* sp	*Morganella* sp
Actinomyc-ètes Actifs	2	2	4	9	2	2	3

Neuf souches d'actinomycètes sont actives contre *Pseudomonas sp.* Ce qui nous amène à dire que c'est la bactérie la plus sensible, suivie par *Streptococcus* avec quatre souches d'actinomycètes actives. Tandis que les plus résistantes sont *Proteus, Acinetobacter*, *entérobacter et Staphylococcus aureus* avec seulement deux isolats actifs.

- **Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir des boues activées**

Les résultats de l'activité antibactérienne des actinomycètes qui proviennent des boues activées vis-à-vis des souches bactériennes tests sont reportés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3. Activité antibactérienne d'actinomycètes isolés à partir des boues activées

Souche test	*Staphylococcus Aureus ATCC 43300*	*Entérobacter sp* souche Clinique	*Streptococcus sp* souche clinique	*Pseudomonas sp* souche Clinique	*Acinetobacter sp* souche clinique	*Proteus sp* souche clinique	*Morganella sp* souche clinique
G	-(6)	-(6)	-(6)	+ (24)	+(7)	+(14)	-(6)
U	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	+(12)	-(6)	-(6)
V	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)
F	-(6)	-(6)	-(6)	+ (14)	-(6)	-(6)	-(6)
S	-(6)	-(6)	+ (10)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)
X	+ (20)	-(6)	-(6)	+(16)	-(6)	+ (12)	-(6)

= 6 mm : activité négative,> 6 mm : activité positive

Les résultats indiqués dans le tableau 6montrent que les trois souches G, U, F sont actives uniquement contre des bactéries à Gram négatif. Tandis que la souche S agit sur une bactérie à Gram positif seulement. La souche X est active à la fois contre des bactéries à coloration de Gram positif et négatif. La souche V n'est pas active contre toutes les bactéries testées.

Les deux plus grandes zones d'inhibition sont obtenues par la souche G contre *Pseudomonas sp* avec un diamètre de 24 mm (Figure 4.3). La souche X est active contre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 avec un diamètre de 20mm.

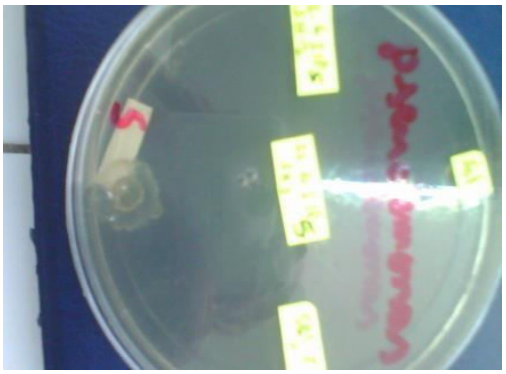


Figure 4.3. Activité antibactérienne de la souche S contre *Pseudomonas sp*

La sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des substances bioactives sécrétées par les isolats d'actinomycètes isolés des boues activées est représentée dans le tableau **4.4.**

Tableau 4.4. Sensibilité des différentes bactéries tests vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les actinomycètes isolés à partir des boues activées

Souche testes	*Staphylococcus aureus*	*Entérobacter sp*	*Streptococcus sp*	*Pseudomons sp*	*Acintobacter sp*	*Proteus sp*	*Morganella sp*
Actinomycètes actifs	1	0	1	3	2	2	0

Sur les sept bactéries tests étudiées, *Entérobacter sp* et *Morganella sp* apparaissent comme les souches les plus résistantes, alors que *Pseudomonas sp* est la plus sensible aux antibactériens produits par nos actinomycètes.

- **Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir de Sebkha**

Les résultats de l'activité antibactérienne des actinomycètes qui proviennent de la Sebkha d'El-Oued vis-à-vis des souches bactériennes tests sont représentés dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5. Activité antibactérienne d'actinomycètes isolés à partir de la Sebkha d'ElOued

	Staphylococcus aureus	*Entérobacter sp*	*Streptococcus sp*	*Pseudomonas sp*	*Acinetobacter sp*	*Proteus sp*	*Morganella sp*
S1	+(10)	- (6)	-(6)	+(14)	-(6)	-(6)	-(6)
Sol	+(15)	+(15)	-(6)	+(12)	+(10)	+(11)	-(6)
Sels S_{16}	+(20)	-(6)	-(6)	+(14)	-(6)	+(14)	-(6)
SS-6ISP_5 SH_1	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)
SS-6 ISP_5SH_3	+(12)	- (6)	+(11)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)
Sels	+(16)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)
Sol 20	+(40)	-(6)	-(6)	-(6)	+(12)	+(14)	- (6)
Sol $_{15}$ S_{14}	+(12)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)
S-20-4	+(21)	-	(6)	+(12)	- (6)	+(10)	-
SS10-5 ISP2 SH6	-(6)	-(6)	+(14)	-(6)	-(6)	+(10)	-
SP106ISP2 SH7	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	+(10)	-
Sel22	-	(6)	+(32)	+(20)	+(30)	+(35)	-
-5	+(28)	-	(6)	+(15)	-(6)	-(6)	-(6)
Sel S15	+(8)	+(17)	-	(6)	+(20)	-(6)	-(6)
SS-5 ISP5 SH4	-	(6)	-	(6)	+(25)	-(6)	-(6)
Sol S18	-(6)	-(6)	-(6)	+(15)	-	(6)	+(20)
SS-6 ISP5 SH5	-	(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	+(30)
Sol20 S17	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)
SS-5 ISP5	+(15)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	-(6)	+(10)

= 6mm : activité négative,> 6mm : activité positive

D'après le tableau 8 les souches SS-6 ISP_5SH_5, Sol $S_{18,}$ et $SP10^6ISP_2$ SH_7 présentent une activité antibactérienne vers les bactéries tests à coloration de Gram négatif seulement. Alors que les souches Sels, Sol $_{15}$ S_{14}, SS-6 ISP_5 $SH_{3,}$ SS-5 ISP_5 SH_4 agissent sur les bactéries à Gram positif seulement. Les deux souches SS-6 ISP_5 SH_1 et Sol_{20} S_{17} n'ont pas d'activité

antibactérienne détectée. Les 12 souches restantes sont actives à lafois contre des bactéries à coloration de Gram positif et négatif. Les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues par les deux isolats Sol 20 contre *Staphylococcus aureus* et B_6 S_{19} contre *Proteus sp* avec le même diamètre de 40 mm. L'isolat B6S19 contre *Morganella sp* est actif avec un diamètre d'inhibition de 37 mm. La plus petite zone est observée avec l'isolat Sel S15 contre la bactérie *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 8 mm (Figure 4.4,4.5,4.6).

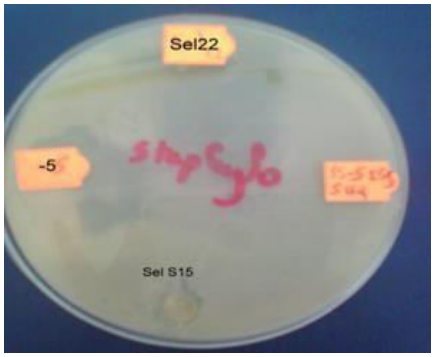


Figure 4.4. Activité antibactérienne des isolats Sel22, Sel S15, -5 contre *Staphylococcus aureus*



Figure 4.5. Activité antibactérienne des isolats Sels, Sol20, $SS10^{-5}$ ISP_2 SH_6contre *Streptococcus sp*

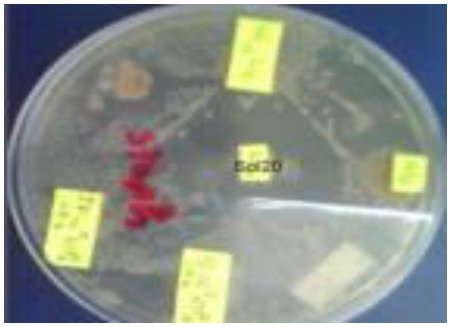


Figure 4.6. Activité antibactérienne de l'isolat Sol20 contre *Staphylococcus aureus*

La sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des substances bioactives sécrétées par les isolats d'actinomycètes isolés à partir de la sebkha est représentée dans le tableau 4.6.

Tableau 4.6. Sensibilité des souches testées vis-à-vis des substancesantibactériennes sécrétées par les différents actinomycètes isolés à partir de la sebkha.

Souche tests	*Staphylococcus aureus*	*Entérobacter* Sp	*Streptococcus sp*	*Pseudomonas sp*	*Acintobacter sp*	*Proteus sp*	*Morganella sp*
Actinomycètes actifs	11	4	6	7	4	8	6

Sur les sept bactéries tests étudiées, *Acinetobacter sp* et *Proteus sp* apparaissent comme les souches les plus résistantes, alors que *Staphylococcus aureus* est la plus sensible aux antibiotiques produits par les actinomycètes étudiés.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'ensemble des actinomycètes de cette collection (15souches isolées à partir du sol agricole, 6 souches à partir des boues activées et 20 souches d'une sebkha). Les résultats indiquent que sur les 41souches d'actinomycètes testées, 36soit exactement (87.80%) présentent une activité vis-à-vis d'au moins une bactérie test. Ce résultat est très encourageant, il montre que nos écosystèmes peuvent offrir des actinomycètes possédant des activités antibactériennes importantes. Les résultats indiquent aussi que la moyenne des diamètres des zones d'inhibition varie d'un écosystème à un autre. Il est intéressant de signaler que les plus grandes valeurs des zones d'inhibition sont enregistrées avec les souches isolées à partir de la sebkha. (Gayathri *et al.,* 2011) ont isolé des actinomycètes à partir de différents échantillons de sol de la sebkha de Kenadsa et confirment que les actinomycètes isolés à partir de ces milieux extrêmes possèdent un pouvoir antimicrobien remarquable par rapport à leurs homologues isolés à partir des milieux naturels normaux (rhizosphère, eau douce, sol floristique).

Selon ces mêmes résultats, les deux souches *Pseudomonas sp* et *Staphylococcus aureus* présentent une grande sensibilité aux antibiotiques produits par les actinomycètes. Bien que ces souches sont considérées comme des souches très résistantes aux antibiotiques.

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 (Carbon *et al*., 1991).

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 méticilline 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.

L'usage intensif des antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, a conduit aussi à une

sélection fréquente de souches de *Pseudomonas aeruginosa*, résistante à la majorité des antibiotiques (Véron, 1990). L'utilisation importante de la ciprofloxacine a été associée à une baisse de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le nombre de souches de sensibilité a diminué (Véron, 1990).

D'après les résultats obtenus dans notre étude, il est très probable que les actinomycètes isolés à partir des trois écosystèmes extrêmes étudiés, offrent de nouvelles molécules bioactives qui agissent sur les bactéries résistantes en question.

4.1.2. Activité antifongique

- **Activité antifongique des actinomycètes isolés à partir du sol agricole**

Le tableau ci-dessous rassemble de l'Activité antifongique des actinomycètes isolés à partir du sol agricole.

Tableau 4.7. Activité antifongique des actinomycètes isolés à partir du sol agricole.

	Champignon			**Levure**
	Aspergillus Niger	*Aspergillus Fimugatus*	*Fusarium Oxysporum*	*Condida Albicans*
SAiGN	-	-	+	-
SAi3B	-	-	+	-
SA 55	-	-	+	-
SAiXB	+	+	+	-
SAiC3	+	+	+	+
SAi9x	-	-	+	-
SA3	+	+	+	-
SA31	-	-	+	+
SA14	+	+	+	+
SAiB1	+	+	+	-
SAi4x	+	-	+	-
SAi2BX	+	-	+	-
SA10	-	-	+	-

(-) : pas d'inhibition, (+) : présence d'inhibition.

Les 13 souches d'actinomycètes ont présenté une activité antifongique vis-à-vis d'au moins une souche test utilisée (Tableau 4.7). Les deux souches SA14 et SAiC3 sont actives sur les trois champignons et la levure. Cependant, *Candida albicans* présente une résistance aux antifongiques produits par la plupart des actinomycètes, alors que *Fusarium oxysporum* est le plus sensible (Figures 4.7, 4.8, 4.9 et 4.10).



Figure 4.7: Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole contre la levure contre *Candida albicans*



Figure 4.8: Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole *Fusarium oxysporum*

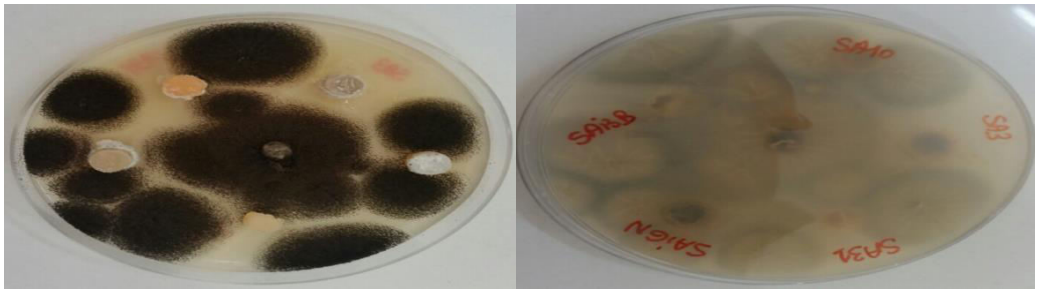


Figure 4.9: Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole contre *Aspergillus* niger

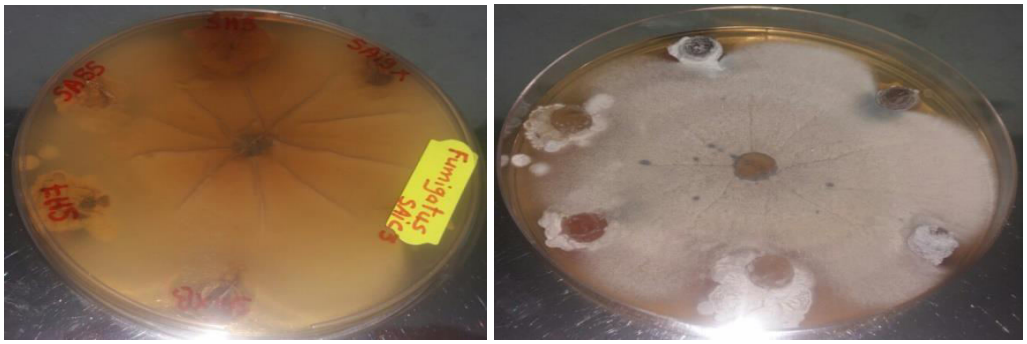


Figure 4.10: Activité antifongique des actinomycètes du sol agricole contre *Aspergillus fumegatus*

- **Activité antifongique des actinomycètes isolés à partir des boues activées**

Tableau 4.8. Activité antifongique d'actinomycètes isolés à partir des boues activées

	Champignon			**Levure**
	Aspergillus Niger	*Aspergillus Fimugatus*	*Fusarium Oxysporum*	*Candida Albicans*
G	+	+	+	+
U	+	+	+	-

V	+	-	+	-
F	-	+	+	-
S	+	-	+	-

(-) : pas d'inhibition, (+) : présence d'inhibition.

La souche G est active contre *Aspergillus niger*, *Aspergillus fimugatus*, *Fusarium oxysporum* et *Candida albicans* (Tableau 4.9*). Fusarium oxysporum* est le plus sensible alors que *Candida albicans* est la plus résistante aux antifongiques (Figure 4.11, 4.12, 4.13 et 4.14).



Figure 4.11. Activité antifongique des actinomycétes des boues activées contre F u s a r i u m *oxysporum*



Figure 4.12. Activité antifongique des des actinomycétes des boues activées contre *Aspergillus niger*



Figure 4.13. Activité antifongique des actinomycétes des boues activées contre *Candida albicans*

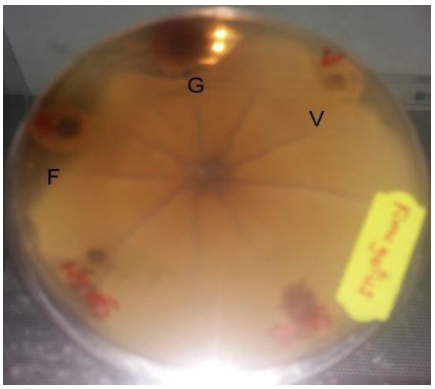


Figure 4.14. Activité antifongique des actinomycétes des boues activées contre *Aspergillus fimugatus*

Les champignons et les levures causent de graves pathologies qui touchent l'homme, parmi lesquelles on peut citer les mycotoxicoses (causés par *Aspergillus* et *Fusarium*), les mycoallergies (*Penicillium* et *Mucor*) et les mycoses superficielles ou profondes (dont les

agents causals sont *Candida albicans*, *Microsporum* et *Trichophyton*) (Drouh et 1978**).** Les mycoses ont augmenté ces dernières années d'une manière drastique et se classent au quatrième rang dans les infections nosocomiales. (Beck-Saguè et Jarvis, 1990).

Parmi les molécules à activité antimicrobienne, la gamme des antifongiques est beaucoup plus restreinte que celles des antibactériens (Domenico, 1999). Les travaux de Hacène *et al.*, 1994, démontrent que 11,18 % de l'ensemble des actinomycètes isolés du sahara Algérien ont une activité antifongique. Les travaux de Hilali *et al*., 2002 confirment également les mêmes résultats. L'arsenal en molécules antifongiques est donc très pauvre à cause de la rareté des organismes producteurs de ce type de substance. Par conséquence, les recherches dans ce domaine doivent continuer afin de palier à ce manque flagrant.

Nos résultats indiquent que 18 souches actinomycètales isolées des boues activées et du sol agricole ont montré une nette performance à produire des molécules à activité antifongique. Nous n'avons constaté que deux souches dénommées SA14 et SAiC3 isolées à partir de sol agricole qui semblent être les plus actives contre la totalité des champignons tests et même contre la levure *Candida albicans*. Il est intéressant de noter que ces résultats sont captivants et méritent d'être poursuivis

4.2. Activité antimicrobienne des actinobactéries isolés de la rhizosphère de Daucus sahariensis Murb.

4.2.1. Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries

L'activité antimicrobienne a été effectués sur milieu du culture ISP2. Les résultats obtenus après incubation à 30°C pendant 24h à 48h pour les bactéries et la levure, les champignons pendant 5 à 7 jours, indiquent la présence ou non d'activité antimicrobiennes sur les germes cibles.09d'actinobactéries ont été isolés à partir des échantillons de sol rhizosphériques, collectés de *Daucus sahariensis* qui poussent dans régions du centre d'Algérie (Boussaâda). Ils ont été identifiés par des méthodes morphologiques et testés pour leur activité antagoniste vis-à- vis de divers microorganismes pathogènes par la technique des stries croisées les résultats sont présentés au tableau 05. Les travaux de (Sabaou et *al.,*1992 et Sabaou et *al., 1998* ; Boudjella,1994 ; zitouni et *al.,* 2004 et 2005 ; Badji et *al.,* 2006 ; Lamari, 2006) confirment la richesse de sol saharienne en actinobactéries, qui est parfois dépassent les autre groupe microorganisme en densité.

Tableau 4.9. L'activité antimicrobienne de (09) isolats d'actinobactérie

Isolats	Diamètre de la zone d'inhibition(mm)						
	Germescibles						
	Bactéries					Champignons	
	Gram$^+$			*Gram*$^-$			
	Bacillus subtilis	*Staphyloc occu s aureus*	*Enterococcu s faecalis*	*E. coli*	*Kelbseuill apheumon iae*	*Candi da albica ns*	*MSBC 1*
MSBA1	00±00b	6.67±5.77ba	7.33±2.89ba	10.00±8.66 a	7.67±2.31 ba	00±00b	00±00 b
MSBA2	0±00c	11.33±15b	10±00ba	13.33±1.15 a	8.67±5.77 ba	7.67±4.0 4B	2.67±2 .52c
MSBA3	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00
MSBA4	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00
MSBA5	0±00b	12.33±0.58a	12±10.39a	15.33±2.89 a	13.33±9.8 1a	13.67±5. 77a	14±3.6 a
MSBA6	2±1.73b	9.33±1.15a	5.33±4.62ba	5.67±0.58b a	6.67±5.77 ba	5.33±4.6 2Ba	0.67±0 .58b
MSBA7	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00
MSBA8	00±00b	00±00b	00±00b	00±00b	2.67±2.31 a	00±00b	0±00b
MSBA9	00±00b	2.67±2.31a	3.33±2.89a	00±00b	00±00b	00±00b	3.33±1 . 53a

Tableau 4.10. Pourcentage de l'activité antimicrobienne de (09) isolats d'actinobactéries

Isolats	Isolats à activité antibactériennes	Isolats à activité antifongique	Isolats à activité antimicrobiennes
09	02 (22.22%)	00 (00.00%)	04 (44.44%)

Le criblage préliminaire des isolats d'actinomycètes, a montré que parmi les neuf 09 isolats étudiés, deux 02 isolats (22.22%) à une activité antibactérienne, et aucune activité antifongique et 04 (44.44%) à un large spectre d'activité à la fois sur les bactéries et les champignons (tableau 4.10). L'inhibition de la croissance des germes cible révélée par l'apparition d'une zone claire, confirme l'activité des Actinobactéries testés.

4.2.1.1. Activités antifongiques d'isolats d'actinobactéries

L'analyse des résultats, a montré que les cinq isolats d'actinobactéries. MSBA1, MSBA3, MSBA4, MSBA7, MSBA8 aucune activité antifongique mais l'isolat MSBA5 a une activité élevée sur les champignons de *phytophthora infestant* (MSBC1) par rapport *Condida albicans*. Dans d'autres études de plusieurs auteurs montre que l'activité antifongique élevée (Kataoka et Futai, 2011 ; Cuesta et *al*., 2012 ; Bubici et *al*.,2013 ; Kaur et *al*., 2013). En effet, Thakur et *al*.,

(2007), Bubici et *al*., (2013), suggèrent que cette activité antifongique est probablement due à la production des antibiotiques et des enzymes lytiques.

Les travaux de Jayasingh et Parkinson, (2008), indiqué que les antibiotique émis par les espèces d'actinobactéries provoquent l'arrêt de la croissance mycélienne et même dans certains cas un éclatement des hyphes chez certaines espèces fongique.

Parmi les molécules de l'activité antimicrobienne, la gamme des antifongiques est beaucoup plus restreinte que celles des antibactériens (Domenico, 1999). Des genres d'actinomycètes parfois assez rares dans le monde, ont été isolés en nombre important et dont plusieurs sont producteurs d'antifongiques à large spectre d'action (Boudjella, 1994 ; Zitouni,1995).

4.2.1.2. Activité antibactérienne d'isolats d'actinobactéries

À partir 09 isolats d'actinobacteries ont été obtenus.22.22% de deux isolats produits Substances antibactériens contre les bactéries Gram positif et des bactéries Gram négatif, activité antibactérienne sur la bactérie phytopathogène sélectionnée Comme les organismes d'essai ont été montrés que l'isolant MSBA4, MSBA7 n'est pas active contre tous les bactéries-teste, ces résultats convergent parfaitement avec ceux de Mustafa et *al.,* 2004, qu'été observé chez les isolats *streptomyces sp* (5c8).

Trois isolats MSBA1, MSBA2 et MSBA5 a une activité sur toutes les bactéries-tests sauf sur *Bacillus subtilis*. Par contre les travaux de Mustafa et *al.,* 2004 rapporté que l'isolat *Streptomyces phaeochromogenes* (9B40) montrent une activité seulement sur *Bacillus subtilis* ATTC6633, (avec une zone d'inhibition=18mm).

En effet, les deux isolats MSBA2, MSBA5, ont montré une forte activité antibactérienne contre la plupart des bactéries gram négatif. Par contre, pour les bactéries cibles Gram positif assez faibles. Ces résultats non comparables avec les travaux de (Mellouk et *al.,* 2016) ; qui montre que l'isolat *Streptomycètes sp* (TA4) est fortement active contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus)* avec des diamètres d'inhibition de 40 et 32 mm, respectivement ; aucune activité n'est enregistrée contre les bactéries à Gram négatif.

Donc l'activité antibactérienne contre les bactéries-tests de Gram négatif apparait plus importante que celle contre les bactéries Gram positif ; les bactéries-tests à Gram négatif concernées par l'inhibition sont : *E. coli, Klebsiella pheumoniae.*

D'ailleurs Les différences en composition de la paroi entre les bactéries Gram positive et négative peuvent être responsables de leurs différences de sensibilité. En effet, les bactéries Gram négative portent dans leurs membranes externes des sucres de nature lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés

lipophiles, contrairement aux bactéries à coloration de Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (Sateesh *e tal.,*2011).

Les résultats des tests de l'activité antimicrobienne possèdent une activité bien remarquable des quatre isolats testés (MSBA2, MSBA5, MSBA6 et MSBA9), en particulier contre les champignons. En effet, les quatre isolats ont montré une forte activité contre les bactéries Gram négatif. Les isolats MSBA5 et MSBA2 ont donné une activité antimicrobienne plus élevée par rapport aux autres isolats (tableau 4.11). Aussi actifs contre un large spectre de microorganismes cibles.

L'analyse des résultats obtenus, montre que l'isolat MSBA5 possède un spectre d'activité inhibitrice très large sur les germes cibles testés. Les inhibitions les plus marquées sont observées contre *E. coli*, *phytophthora infestant, Candida albicans*, *Klebseuilla pheumoniae* avec zone d'inhibition 15mm,14mm, 13.67mm, 13.33 mm respectivement. En effet, l'application de ces isolats a donné une zone d'inhibition remarquable vis-à-vis les bactéries Gram négatif, les bactéries Gram positif et les champignons testés. Ces résultats se rapprochent de ceux trouvés par plusieurs chercheures, En effet, Barakete et al., 2002 montre que l'activité antimicrobiennes plus élève *Bacillus subtilis*, 37mm; *Staphylococcus aureus* , 39mm) sauf *E. coli* a le même zone d'inhibition = 15mm et Aouiche., 2012 a montré dans une autre étude que l'isolat *Streptomyces sp*PAL111 possèdent une activité antimicrobienne importante sur les 04 bactéries(*Bacillus subtilis* = 2mm; *Staphylococcus aureus*= 10; E coli = 20; *Klebseuillapheumoniae*= 20) et un seul champignon *Candida albicans* d'un zone d'inhibition entre 7 à 13.

4.3. Screening des algues marines d'OUALIDIA à la recherche d'activités antimicrobienne et antiinflammatoire

4.3.1. Évaluation de l'activité antibactérienne

Des vingt-deux espèces d'algues étudiées, dix-neuf espèces représentant 86,4% du total ont montré au moins une activité contre une souche microbienne. Dans la classe des Chlorophycées, 80% des espèces ont présenté une activité antibactérienne et presque 83% des espèces appartenant à la classe des Phéophycées et 90% des espèces appartenant à la classe des Rhodophycées ont présenté la même activité. Les tests de l'activité antifongique ont montré que presque 50% des algues présentent une activité contre *C. neoformens*.

Certains travaux ont trouvé que 80% d'espèces la classe des Rhodophycées présentent plus d'activité antimicrobienne que les deux autres classes d'algues Elkouri *et al*. (2004) ;

Mahasneh *et al*. (1995) ; Padmakumar et Ayyakkannu (1997). Etahiri (2002) a rapporté que parmi les algues récoltées sur la côte d'El Jadida, la classe des Phéophycées est la plus riche en espèces actives (85%) suivie par la classe des Chlorophycées (40%) et les Rhodophycées (38%). D'autres travaux montrent que les deux classes d'algues Rhodophycées et Phéophycées ont une activité antimicrobienne intéressante ; alors qu'elle est absente chez les Chlorophycées (Caccamese *et al.* 1985). Pour les algues récoltées des îles Baléares, parmi les 60 espèces testées, une seule espèce a une activité antibactérienne appartenant à la classe des Phéophycées et trois espèces appartenant à la classe des Chlorophycées. Dans ces extraits d'algues, les auteurs ont montré que 70% des algues testés présentent une activité antifongique (Ballesteros *et al.*1992).

Les extraits des algues vertes, *E. linza, E. intestinalis et U. lactuca,* ont présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm contre *S. aureus* (tableau 4.10). Reichelt et Borowitzka (1983) ont montré que les ulves ont des effets antimicrobiens sur les bactéries gram positif et gram négatif, par contre Kumar et Rengasamy (2000), Caccamese et Azzolina (1979) ainsi que Ktari (2000), ont montré que l'activité antimicrobienne est absente dans les extraits d'algues des ulves.

Kumar et Rengasany (2000), Elkouri *et al.* (2004), ont rapporté que les extraits d'Entéromorphes ont une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries étudiées sauf pour la souche *E. coli*. Ces résultats s'accordent avec ceux obtenus par Jing-wen et Wei-ci (1984) qui ont rapporté que les extraits d'algues, récoltées sur la côte Qingdao de Chine, préparés dans le mélange toluène / méthanol de *E. intestinalis et E. linza*ne présentent aucune activité antibactérienne.

Pour la classe des phéophycées, l'extrait de *B. bifurcata*a montré un diamètre d'inhibition de 17mm vis-à-vis de *S. aureus* et *B. cereus* est de 13mm contre *B. thuringiensi*et de *B. subtilis*. Ces résultats s'accordent avec ceux trouvés par Etahiri (2002), qui a montré que l'extrait de *B. bifurcata*, récoltée des côtes atlantiques d'El Jadida, présente un effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries testées. *B. thuringiensi*et de *B. subtilis*. Ces résultats s'accordent avec ceux trouvés par Etahiri (2002), qui a montré que l'extrait de *B. bifurcata*, récoltée des côtes atlantiques d'El Jadida, présente un effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries testées.

Tableau 4.10. Évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'algues récoltées d'Oualidia appartenant à la classe des Chlorophycées exprimée en diamètre d'inhibition.

	Chlorophycées	***C.tomentosum***	***E. linza***	***E. intestinalis***	***U. crispa***	***U. lactuca***
Bactéries Gram+	*S. aureus*	-	++	+ +	+	+ +
	B. cereus	-	+	+	-	+
	B. subtilis	-	-	-	*ND*	-
	B. thuringiensis	-	+	-	*ND*	-
	C. sporogènes	-	-	-	*ND*	-
Bactéries Gram-	*E. coli*	-	-	-	-	-
Levure	*C. tropicalis*	**-**	**-**	**-**	***ND***	**-**
	C. neoformens	+	+	**-**	**-**	**-**

(-) : absence d'activité (+) : diamètre d'inhibition inférieur à 10mm. (++) : Diamètre d'inhibition entre 10 et 15mm. (+++) : Diamètre d'inhibition supérieur à 15mm (ND) : non déterminé.

Le même résultat a été trouvé par Chiheb *et al.* (2009) pour *B. bifurcata* récoltée à Rabat vis-à-vis de *S. aureus*. Gonzalez et Platas (2001) ont trouvé que cette *B. bifurcata*, récoltée des Îles canaries, ne montre aucune activité vis-à-vis des bactéries testées.

Pour les algues rouges (tableau III), l'extrait de *P. complanata*a montré un diamètre d'inhibition important de l'ordre de 19 mm vis-à-vis de *S. aureus* et *B. cereus*. Le même résultat a été trouvé par Elkouri (2004). L'extrait de *H. incurvus*a présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 15 mm contre *B. subtilis et B. thuringiens*. Etahiri *et al.,* (2003) a rapporté que l'extrait acétonique de cette même algue a présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 15mm vis-à-vis *S. aureus.*

Tableau 4.11. Évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'algues récoltées d'Oualidia appartenant à la classe des Phéophycées exprimée en diamètre d'inhibition.

		B. bifurcata	***C. humilis***	***C. Tamariscifolia***	***F. Spiralis***	***L. ochroleuca***	***S. bulbosa***
BactériesGram +	*S. aureus*	+++	+++	+	+	++	-
	B. cereus	+++	+++	+	+	+	-
	B. subtilis	++	++	-	-	-	ND
	B. thuringiensis	+	++	-	-	-	ND
	C. sporogènes	-	-	-	-	ND	-
Bactérie Gram -	*E coli*	+	-	-	-	-	-
Levure	*C.tropicalis*	-	-	-	-	ND	-
	C.neoformens	+	+	+	-	++	-

(-) : absence d'activité (+) : diamètre d'inhibition inférieur à 10mm. (++) : Diamètre d'inhibition entre 10 et 15mm. (+++) : Diamètre d'inhibition supérieur à 15mm (ND) : non déterminé.

Le même résultat a été trouvé par Chiheb *et al.* (2009) pour *B. bifurcata* récoltée à Rabat vis-à-vis de *S. aureus*. Gonzalez et Platas (2001) ont trouvé que cette *B. bifurcata*, récoltée des Îles canaries, ne montre aucune activité vis-à-vis des bactéries testées.

Pour les algues rouges (tableau III), l'extrait de *P. complanata*a montré un diamètre d'inhibition important de l'ordre de 19 mm vis-à-vis de *S. aureus* et *B. cereus*. Le même résultat a été trouvé par Elkouri (2004). L'extrait de *H. incurvus*a présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 15 mm contre *B. subtilis et B. thuringiens*. Etahiri *et al.,* (2003) a rapporté que l'extrait acétonique de cette même algue a présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 15mm vis-à-vis *S. aureus.*

Tableau 4.12. Évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'algues récoltées d'Oualidia appartenant à la classe des Phéophycées exprimée en Diamètre d'inhibition.

		B. bifurcata	***C. humilis***	***C. Tamariscifolia***	***F. Spiralis***	***L. ochroleuca***	***S. bulbosa***
BactériesGram +	*S. aureus*	+++	+++	+	+	++	**-**
	B. cereus	+++	+++	+	+	+	**-**
	B. subtilis	++	++	**-**	**-**	**-**	***ND***
	B. thuringiensis	+	++	**-**	**-**	**-**	***ND***
	C. sporogènes	**-**	**-**	**-**	**-**	***ND***	**-**
Bactérie Gram -	*E coli*	+	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Levure	*C.tropicalis*	**-**	**-**	**-**	**-**	***ND***	**-**
	C.neoformens	+	+	+	**-**	++	**-**

(-) : absence d'activité (+) : diamètre d'inhibition inférieur à 10mm. (++) : Diamètre d'inhibition entre 10 et 15mm. (+++) : Diamètre d'inhibition supérieur à 15mm (ND) : non déterminé.

Sridhar et Vidyavathi (1991) ont rapportés que *A. armata* récoltée des côtes de l'Espagne a montré un effet inhibiteur contre *S. aureus*. Aussi L'extrait de *H. incurvus*a une activité supérieure à 15 mm de diamètre d'inhibition vis-à-vis de *B. cereus*. Etahiri (2002) a rapporté que cette algue a montré une activité inhibitrice contre *S. aureus* et *B. cereus*.

Les extraits de *C. officinalis, G. sesquipedale, G. spinulosum et P. complanata*ont montré un effet inhibiteur faible contre *E. coli*. Jing-wen et Wei-ci (1984) ont rapporté que *C. officinalis* récoltée des côtes Chinoise n'a montré aucune activité inhibitrice vis-à-vis de cette bactérie. Par contre, Freile-Pelegrin et Morales (2004) ont rapporté que l'extrait préparé dans le mélange chloroforme / méthanol de Hypnea récolté de Pureto Rico a montré une activité inhibitrice contre *E. coli.*

Tableau 4.13. Évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits d'algues récoltées d'Oualidia appartenant de la classe des Rhodophycées exprimée en diamètre d'inhibition.

	Rhodophycées	***A. Armata***	***C. Officinalis***	***C. Crispus***	***G. sesquipedale***	***G. spinulosum***	***G. Ascicularis***	***G. Multipartite***	***H. incurvus***	***L. pinnatifida***	***P. Coccineum***	***P. complanata***
Gram +	*S aureus*	+	+	+	++	++	++	+	++	-	++	+++
	B.cereus	++	+	+	++	++	+	+	+++	-	+	+++
	B.subtilis	+++	*ND*	-	-	-	*ND*	*ND*	-	-	*ND*	+
	B.thuring	+++	*ND*	-	-	-	*ND*	*ND*	-	-	*ND*	++
	C. sporogène	-	-	-	-	-	*ND*	*ND*	-	-	*ND*	-
Gram -	*E. coli*	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Levure	*C. tropicalis*	-	-	-	-	-	*ND*	*ND*	-	-	*ND*	-
	C. Neoforme	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-

(-) : absence d'activité (+) : diamètre d'inhibition inférieur à 10mm. (++) : Diamètre d'inhibition entre 10 et 15mm. (+++) : Diamètre d'inhibition supérieur à 15mm (ND) : non déterminé

Par ailleurs, vis-à-vis les deux souches bactériennes, *C. sporogènes et de C. tropicalis*, aucun extrait d'algues appartenant à la classe de Rhodophycées n'a montré un effet inhibiteur.

Cette variation peut être la cause des paramètres écologiques induits par les facteurs climatiques, la température, la salinité, la lumière, l'oxygène dissous et les sels nutritifs, ou liée à la biologie et la physiologie de l'algue elle-même (Hornsey et Hide1985, Valls *et al*. (1993) ont rapporté que La composition chimique (diterpenoides) de l'espèce Cystoseiratamariscifolia, récoltée de la côte Sicilian de l'Italie, est différente de la même algue récoltée de la côte marocaine. De même la composition chimique des algues Cystoseirastricta et Cystoseiramediterranea, récoltées de la côte Sicilian, est différente de celles récoltées de la côte méditerranée Française.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le sol, les eaux usées et les environnements marins contaminés par le pétrole et leur dérivés sont divers habitats écologiques lesquels ont été traité par les micro-organismes d'environnements (bactéries et les champignons) produites des molécules actifs très utiles dans le domaine pharmaceutique par leurs effets antibactériens, antifongiques et antioxydants.

Cette étude se compose de travaux évalués par différents techniques, le premier était sous le titre « Activité antimicrobienne des actinobactéries isolés de la rhizosphère *de Daucus sahariensis* Murb *» le deuxième «* Etude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes », et le troisièmes « screening des algues marines d'oualidia a la recherche d'activités antimicrobiennes et anti-inflammatoire ».

Les actinomycètes sont les plus actifs contre les bactéries et les champignons les plus résistants. Par rapport aux autres microorganismes. Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont Les antibiotiques. C'est dans cette optique, qu'ils ont orienté leur recherche. Ainsi, dans leurs résultats de l'activité antibactérienne des actinomycètes antérieurement isolés à partir des sols de sebkha, des boues activées et des sols agricoles, montrent qu'environ 90 % de ces souches sont actives. Environ 32 % proviennent du sol agricole d'Ain M'Lila, 12 % des boues activées et 46 % de Sebkha. Et la plupart des actinomycètes isolés à partir des boues activées et du sol agricole, présentent une activité antifongique importante contre *Aspergillus niger* et *Fusarium Oxysporum* tandis que seulement quatre souches actinomycétales sont actives contre la levure *Candida albicans* qui apparait comme la souche la plus résistante.

BIBLIOGRAPHIES

BIBLIOGRAPHIES

[1] **Agarry S.E. and Ogunleye O.O (2012)** Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulationstrategy. International Journal of Energy and Environmental Engineering., 3(31) : 1-14 agents, J. Environ. Manag., 95: 280-284. Algerian Saharan soil. Can. J. Microbiol., 52: 373-382. américaine par Claire-**Michelle-Bacq-Calberg et Jean Dussart**. Edition de Boeck- Antibiotic Production by Actinomycetes YJ1 Strain against Sclerotinia sclerotiorum. Antibiotiques synthétisés. Thèse de magister, spécialité : Microbiologie. Ecole Normale Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment.

[2] **Aprill W. et Sims R.C. (1990)** Evaluation of the use of prairie grassesfor stimulating polycyclic aromatic hydro Argentine. 163- 171.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Pp : 469-473.

[3] Badji B., Riba A., Mathieu Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., and Sabou S.,

[4] **Barakate M., Ouhdouch Y., Onfdon K.H., et Beaulien C., (2002)** Characterization of

[5] **Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1996**) Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus Pleurotus ostreatus. Appl. Environ. Microbiol., 62, 292-295.

[6] **Binet P, Portal JM, Leyval C. (2001)** Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. Organic Geochem. 32, 217-222.

[7] **Binet P., Portal J.-M., Leyval C. (2000)** Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of reygrass. Soil Bio. Biochem. 32, 2011- 2017.biological activities and partial characterization of antibiotics. Research in Microbiology.,156 :

[8] **Bogan B.W., Lamar R.T., Burgos W.D. at Tien M. (1999).** Extent of humification of anthracene, fluoranthene and benzo(a)pyrene by Phanerochaete chrysosporium during growth in PAH-contaminated soils. Lett. in Appl. Microbiol. 28, 250-254.

[9] **Boudjella H., (1994)** Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement

[10] **Boudjella H., lamaril L., boutik K., sabaoun N., (2014)** Activité antilevurienne d'une souche

[11] **Braun-Lüllemann A., Hüttermann A. et Majcherczyk A. (1999)** Screening of ectomycorrhizal fungi for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 127-132.

[12] **Brooks R.R. (1997)** Plant hyperaccumulators of metals and their role in meral exploration, archaeology, and land reclamation. In : Iskandar I.K., Adriano D.C. (eds) Remediation of metal-contaminated soils. Science Reviews Northwood, UK, pp 123-133.

[13] **Bubici G., Marsico A.D., D'Amico M., Amenduni M., and Cirulli M., (2013)** Evaluation

[14] **Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N.** (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey.

[15] **Cerniglia C.E. (1992)** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3, 351-368.

[16] **Cerniglia C.E. (1993)** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 4, 331-338.

[17] **Cerniglia C.E. (1997)** Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 19, 324-333. Cerniglia C.E., White G.L. et Heflich

[18] **Chaineau C.H., Morel J.-L. et Oudot J. (1997).** Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. J. Eviron. Qual. 26, 1478-1483.chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential

[19] **Chioma B.C., Gideon C.O., and Blaise O.C. (2011)** Monitoring of microbial hydrocarbonremediation in the soil.3 Biotech., 1 : 117–138.couleurs. Le Lait, 6 (51), 8-12.

[20] **Criquet S., Joner E.J., Léglize P. et Leyval C. (2000**) Effects of anthracene and mycorrhiza on the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of Lucerne (Medicago sativa L.). Biotechnol. Lett. 22, 1733-1737.Critical Rev. Microbiol, 28 : (4) 281-370.

[21] **Cunningham S.D., Anderson T., Schwab A.P. and Hsu F.C. (1996**) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Adv. Agron. 56, 55-114. d'actinobacterie appartenant au gener streptosporangium et isolee d'un sol saharien., Algerian d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse., 9 : 147-153.

[22] **Das N. and Chandran (2011)** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants:An Overview. Biotechnology Research International de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologies, E.N.S. de Kouba., p177.

[23] **DelarrasC.,** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou decontrol des échantillons à la chaleurs sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares

[24] **Donnelly P.K. et Fletcher J.-S. (1994)** Potential use of mycorrhizal fungi as bioremediation agents. In: Bioremediation

[25] **Donnely P.K., Entry J.A. et Crawford D.L. (1993**) Degradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid bymycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2642-2647.

[26] **Dutta D., Ghosh D.K., Mishra A.K. et Samanta T.B. (1983)** Induction of a benzo[a]pyrene hydroxylase in Aspergillus

[27] **Eggen T. et Majcherczyk A. (1998)** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by the white-rot fungus Pleurotus ostreatus. Int. Biodeter. Biodegr. 41, 111-117.

[28] **Elkouri A. (2004)** : Recherche des propriètés : antibactérienne, antifongique, et antiinflamatoire de quatourz espèces d'algues marines récoltées sur la côte d'El Jadida (Côte Atlantique Marocaine). Thèse de doctorat en Science. Fac. Sci. ElJadida, Maroc. Univ. Pp 138.

[29] **Etahiri S. (2002) :** Isolement et caractérisation de composés pharmacologiquement extracts from Canary species of Phaeophyta and Chlorophyta. Phytotherapy Res.

[30] **Fan C.Y. et Krishnamurthy S. (1995)** Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils : a brief review. J. Air Waste Manag. Ass. 45, 453-460.

[31] **Febles CI, Arias A, Hardisson A., et Lopez A S. (1995) :** Antimicrobial activity of

[32] **Field J.-M., de Jong E., Costa G. F et de Bont J.A.M. (1992)** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2219-2236.

[33] **Field J.-M., de Jong E., Costa G. F et de Bont J.A.M. (1993)** Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Tib. Tech. 11, 44-49.

[34] **Font de valdez,G**(2002). Maintenance of lactic acid bacteria.In food Microbiology protocols.

[35] For Antimicrobial Metabolites Production from a New Streptomyces sp. RUPA-08PR

[36] **Freile-Pelegrin Y., et MORALES J L. (2004)** : Antibacterial activity in marine algae

[37] from the coast of Yucatan, Mexico. Bot. Mar. 47 : 140 - 146. fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1): gastroduodénale. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Editions techniques. EMC.

[38] **Ghosh D.K., Dutta D., Samanta T.B. et Mishra A.K. (1983)** Microsomal benzo[a]pyrene hydroxylase in Aspergillus ochraceus TS: Assay and characterization of the enzyme system Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 497-505.

[39] **Günther T., Dornberger U. et Fritsche W. (1996)** Effect of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. Chemosphere 33, 203-215.

[40] **Haemmerli S.D., Mattis S.A.L., Sanglard D., Fiechter A. (1986)** Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of Phanerochaete chrysosporium. J. Biol. Chem. 261, 6900- 6903

[41] **Hamman C., Hegemann J. et Hildebrandt A. (1999)** Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridisation. FEMS Microbiol. Lett. 173, 255-263.

[42] **Hammel K.E., Gai W.Z. et Green B (1992)** Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1832-1838.

[43] **Heitkamp M.A., Franklin W. et Cerniglia C.E. (1988)** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2556-2565. Hydrochim. Hydrobiol. 19 : 455-496 identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol Isolated from Bangladeshi Soil. Mycobiology. The Korean Society of Mycology. Vol : 37. isolated fromframing soils of turkey.African Journal of Biotechnologie., 3(9): 441-446.

[44] **Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea J.-M. (2003)** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi is sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biol. Fert. Soils 37, 1-16.

[45] **Joner E.J. et Leyval C. (2001)** Arbuscular mycorrhizal influence on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. Mycorrhiza 10, 155-159. Juhasz A.L., Britz M.L. et Stanley G.A. (1997) Degradation of pyrene, benz(a)anthracene and dibenz(a, h)anthracene by Burkholderia cepacia. J. Appl. Microbiol. 83, 189-198. JouRipa. F. A, F. Nikkon. F, S. Zaman. S and P. Khondkar. P. 2009. Optimal Conditions journal of arid environment.,2 :3-18.

[46] **Juhasz, A., Naidu, R., (2000)** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons : a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. Int. Biodeter. Biodegr. 45, 57-88. Kelley I., Freeman J.-P. et Cerniglia l'identification biochimique des bactéries. Ed. *Doin,* Paris.

[47] **Lamari L., (2006)** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une **Lamouliatte H., Mégrand F., et Cayla R.,** (1992) Helicobacterpylori et pathologie

[48] **Leahy J.G. and Colwell R.R**. **(1990)** Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment.Microbiological Reviews., 54(3) : 305-315

[49] **Lefebvre G., Germain P., (1998)** Les sols des oasis du Sahara algérien, source

[50] **Lewis K. (2012)** "Antibiotics : Recover the lost art of drug discovery" Nature 485, 439 - 440

[51] **Lewis K. (2012)** "Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery" Nature 485, 439 - 440

[52] **Ling et al. (2015)** "A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance" Nature 517,

[53] **Ling et al. (2015)** "A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance" Nature 517, 455 - 459

[54] McKenzie. N. L ; Thaker. M ; Koteva. K ; Hughes.D. W ; Wright. G. D ; and Nodwell.J. N.

[55] Mellouk I., Meklat A., Nalubega F., Chaabane C., Fawzia., Ait Yahia A., Bounas N., Mokrane S., Mathieu F., et Sabaou N., (2016) Description et potential antagoniste d'une Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou., p186.

[56] **Mustafa O., Usame T., and Cem A., (2004)** Antibacterial activity of some actinomycetes Mythili. B and Ayyappa Das. M. A. 2011. Studies on Antimicrobial Activity

[57] **Mythili. B and Ayyappa Das. M. A. 2011.** Studies on Antimicrobial Activity ofN° 3. Pp : 211-214.rnal of Agricultural Science ; Vol. 4, No. 7. Pp : 95-102 nouvelle espèce d'actinomycètes, Saccharothrixal geriensis. Thèse de Doctorat. Université nouvelle souche d'actinobactéries isolée de la cote de Tipaza., 9(1): 65-78.

[58] **ochraceus TS**: Evidence for multiple forms of cytochrome P450. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 692-699. of eggplant, Appl.Soil Ecology., 72:128-134.of Streptomyces spp. For the biological control of corky root of tomato and Verticillium wilt oils. *Phytochemistry*, 69 :1732-1738.potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem*., 95: 200-204.

[59] **R.H. (1985).** Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. Arch. Microbiol. 143, 105- 110.Rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. Journal of Ecobiotechnology., 3 : 48-

[60] **Reimer et al. (2016)** "Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase" Nature 529, 239–242

[61] **Reimer et al. (2016**) "Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase" Nature 529, 239–242 Renouveau Pédagogique Inc. Pp. 945. rhizospheries soil Streptomycetes from Monoccan habitats and their antimicrobial

[62] Sabou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Sahariens : taxonomie numérique : extraction, purification et caractérisation de quelques sanitaire. 427 p.

[63] **Sateesh V., Naikpatil et Rathod J.L., (2011)** Selective isolation and antimicrobial activity of Science. Fac. Sci. El Jadida, Maroc. Univ. Pp 142. Sciences. Vol : 2. N° : 1. Pp : 104-106. Sciences. Vol : 2. N° : 1. Pp : 104-106

[64] **Song. Q, Huang. Y & Yang. H. 2012**. Optimization of Fermentation Conditions for Spencer. D. F. T. ET R agout ET spencer,A.L eds Humana press. Totowa New jersey.

[65] **Sridhar KR., et Vidyavathi N. (1991)** : Antimicrobial activity of seaweeds. Acta. Streptomyces spp. Isolates from Tea Plantation Soil. Research Journal of Agricultural Streptomyces spp. Isolates from Tea Plantation Soil. Research Journal of Agricultural Supérieur de Kouba, Alger., p177. **Tepe**, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. 2006. Screening of the antioxidant The Streptomyces coelicolor gene absA. The Journal of Antibiotics. Pp : 1– 6

[66] **Through Rhizosphere Technology, eds Anderson T.A. et Coats J.-R.,** pp 93-99, Washington DC : American Chemical Society.

[67] **Valli S. Sugasini. S. S, Aysha O. S, Nirmala. P, Vinoth Kumar P, Reena. 2012.** A.

[68] Yadav B.K and Hassanizadeh M.S. (**2011)** An Overview of Biodegradation of LNAPLs in Coastal (Semi)-arid Environment. Water Air Soil Pollut., 220 :225–239. DOI 10.1007/s11270-011-0749-1.