

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**

**Université SAAD DAHLAB – Blida 01**



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

*Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière sciences biologiques

Option : Microbiologie

**Thème**

*Evaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm des deux souches  
d'Actinomycètes vis-à-vis de Staphylococcus aureus associé aux  
infections nosocomiales*

**Soutenu le : 20/09/2021**

**Présenté par :**

**- Ait-Said Hiba**

**- Bacha Safaa**

**Devant le jury :**

- |                          |                          |              |
|--------------------------|--------------------------|--------------|
| • Mme Hamaidi-Chergui .F | Professeur / USDB        | Présidente   |
| • Mme Bokreta .S         | MAA / USDB               | Examinatrice |
| • Mme Ait-Saadi. N       | MCB / USDB               | Promotrice   |
| • Mme Meklat. A          | Professeur /ENS de Kouba | Invité       |

**Promotion 2020/2021**

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, il m'est agréable d'exprimer nos remerciements à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Mme Ait Saadi.N; maître de Conférence B à la Faculté des sciences de la nature et de la vie, Sciences Biologiques, de l'université Saad Dahlab de Blida, pour son encadrement, Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation. Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde graditude.*

*A Mme Hamaidi-Chergui.F Proffeseur A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Sciences Biologiques de l'université Saad Dahlab de Blida d'avoir accepté de nous faire l'honneur de présider ce jury. Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

*Nos très vifs remerciements vont aussi à Madame Bokreta.S maitre Assistante A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Sciences Biologiques de l'Université Saad Dahlab de Blida pour avoir contribué par sa participation à l'examination de ce travail.*

*Nous adressons également une salutation spéciale et chaleureuse de remerciement à Madame Meklat.A pour nous aider à compléter notre partie pratique, pour ces conseils, ses indications et son encouragement.*

*Nous ne savons terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dont la contribution à mon travail est non négligeable notamment tout le personnel de laboratoire, de la bibliothèque et de l'administration.*



# *Dédicace*

*Dieux Merci pour la vie, les parents, la santé et le savoir.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parent **A**bdenour et **F**atiha, les premières personnes qui ont cru en moi qui m'ont encouragée et soutenue le long de mon chemin .Merci pour sacrifices dévouement et surtout de m'avoir fait autant de confiance, de n'aient jamais douté de mes capacités et de m'avoir inculques les valeurs justes de la vie avec autant de sagesse.*

*J'espère que dieu les préservera.*

*Merci papa, Depuis ma tendre enfance, tu es mon plus fort repère un être unique et magnifique, le meilleur de pères .Merci pour ce que tu as été pour moi un chemin de sérénité, merci à toi grand homme, le bonheur dans ma vie tu as semé ce dédicace d'hommage écrit pour toi est un océan de tendresse ma tendresse pour toi mon papa qui m'a enseigné la sagesse, **M**erci de tout mon père je t'aime d'un amour éternel .Merci papa, **A**ujourd'hui je marche sur tes pas de miel.*

*Merci **M**aman de m'avoir écoutée avec autant de patience de m'avoir encouragée pour ton soutien moral .sans toi je ne serais jamais arrivée au bout du chemin Ma mère en or dont le cœur est fait de lumière .Merci **M**aman d'avoir fait la fille belle, **B**rillante et modeste que je suis devenue. **M**erci pour tous ma mère je t'aime d'un amour éternel .Merci maman, **A**ujourd'hui je marche sur tes pas de miel.*

***A** mes chères Freres **T**inhinane et **T**aha qui m'entourent avec beaucoup de protection, d'affection et d'amour.*

***A**insi toute ma famille, aussi a qui souhaite une long vie et que dieux ait leur âmes pour ce qui sont morts.*

***A** mes chères copines et mon binôme **S**afaa **M**erci beaucoup pour le temps passés avec vous lors du chemin universitaire vous êtes pour moi la famille des sœurs que des amies.*

***H**iba*



## **Dédicaces**

**Je dédie ce modeste travail: A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.**

**A mon très cher père Abdennour**

**T'étais toujours pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.**

**A La personne la plus chère à mon cœur : Maman qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie, Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi ; je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté.**

**A mon cher frère Sami et mes très chères sœurs Marwa, Nour & Nada  
Merci pour les moments d'enfance passés avec vous, en gage de ma profonde estime pour l'aide que vous m'avez apporté. Vous m'avez soutenue, réconfortée et encouragée. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.**

**Spécial dédicace à ma chère cousine Insaf qui m'a donnée de la force, la motivation et l'énergie.**

**A mes tantes Amel, Zhor, Samia, Malika, Houria, Safia, Fadila, mes chers oncles Samir, Halim, Merzak, abd el ghani et Noureddine ainsi que mes très chers grands-parents qui nous leur souhaitons un prompt rétablissement, et Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. A toute ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.**

**A mes chères copines : Imene, Rayane, Sabrina, Hiba Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter.**

**Safaa**

# Résumé

## Résumé

---

### Résumé :

Le manque d'hygiène hospitalière pose un grand problème sur la santé humaine, elle favorise l'installation des micro-organismes sur les dispositifs médicaux et cause des infections nosocomiales liées à la formation du biofilm.

Le présent travail vise à l'étude de l'activité antibactérienne et antibiofilm des deux souches d'actinomycètes vis – à – vis de *Staphylococcus aureus* isolées à partir des surfaces hospitalières du CHU Blida. Les résultats obtenus montrent que sur 25 souches de Staphylocoques isolées ,8 souches sont des *Staphylococcus aureus*. La capacité de toutes des souches isolées à former le biofilm a été confirmée par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA) et la méthode Tissue Culture Plate (TCP).

L'activité antibactérienne de deux filtrats issus de deux souches *actinomycétales* (Sa233 et B18) vis-à-vis des souches de *Staphylococcus* réalisée par la méthode des puits a été étudiée, où les résultats révèlent une activité significative pour le filtrat de la souche Sa233 avec une meilleure zone d'inhibition de 28mm vis-vis de la S7 de *S.aureus* . Pour le filtrat de la souche B18, les résultats montrent une absence totale de l'activité antibactérienne vis-à-vis les souches pathogènes

Le test de l'activité antibiofilm des filtrats et des extraits brut des souches Sa233 et B18 a été effectué par la méthode de coloration par le cristal violet sur microplaque. Les résultats ont permis de marquer une variabilité en termes d'activité anti biofilm des souches étudiées sur les huit souches cibles de *Staphylococcus aureus*. Le meilleur taux d'inhibition (76%) a été enregistré par le filtrat de la souche Sa233 vis-à-vis de la S5 de *S.aureus*. La souche actinomycétale Sa233 possède une activité antibiofilm et antibactérienne supérieur à celle de la souche B18.

### Les mots clés :

*Actinomycète*, Antibiofilm, Antibactérienne, Infection nosocomiale, *Staphylococcus aureus*.

# Résumé

---

## **Abstract:**

The lack of hospital hygiene poses a major problem for human health it promotes the installation of microorganisms on medical devices and causes nosocomial infections linked to the formation of the biofilm.

This work aims to study the antibacterial and antibiofilm activity of the two strains of actinomycetes against *Staphylococcus aureus* isolated from hospital surfaces at CHU Blida. The results obtained show that out of 25 strains of Staphylococci isolated, 8 strains are *Staphylococcus aureus*. The ability of all of the isolated strains to form the biofilm was confirmed by the Rouge Congo Agar (RCA) method and the Tissue Culture Plate (TCP) method.

The antibacterial activity of two filtrates from two actinomycetal strains (Sa233 and B18) against *Staphylococcus* strains produced by the well method was studied, where the results reveal a significant activity for the filtrate of the Sa233 strain with a better zone of inhibition of 28mm vis-à-vis the S7 of *S. aureus*. For the filtrate of strain B18, the results show a total absence of antibacterial activity against pathogenic strains. .

The test of the antibiofilm activity of the filtrates and crude extracts of strains Sa233 and B18 was carried out by the method of staining with crystal violet on a microplate. The results made it possible to mark a variability in terms of the anti-biofilm activity of the strains studied on the eight target strains of *Staphylococcus aureus*. The best inhibition rate (76%) was recorded by the filtrate of strain Sa233 against *S. aureus* S5. The actinomycetal strain Sa233 possesses an antibiofilm and antibacterial activity superior to that of the strain B18.

## **The key words:**

*Actinomycete*, Antibiofilm, Antibacterial, Nosocomial infection, *Staphylococcus aureus*.

### ملخص:

يشكل الافتقار إلى النظافة في المستشفيات مشكلة كبيرة على صحة الإنسان ، فالكائنات الحية الدقيقة تفضل التركيب على الأجهزة الطبية ويسبب التهابات المستشفيات المرتبطة بتكوين البيوفيلم.

يهدف هذا العمل إلى دراسة النشاط المضاد للبكتيريا والغشاء الحيوي لسلاسلتين من الفطريات الشعاعية ضد المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من أسطح المستشفى في *CHU Blida*. و تظهر النتائج أنه من بين 25 سلالة من المكورات العنقودية المعزولة ، 8 سلالات هي *ستافيلوكوكيس اوريريوس*. تم تأكيد قدرة جميع السلالات المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي بواسطة طريقة روج كونجو اغار (*RCA*) وطريقة لوحة زراعة الأنسجة (*TCP*).

تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا من سلاسلتين من السلالات الشعاعية (*B18* و *Sa233*) ضد سلالات المكورات العنقودية التي أنجزت و اقيمت بطريقة البئر ، حيث كشفت النتائج عن نشاط كبير لسلالة *Sa233* مع افضل منطقة تثبيط بلغت 28 مم مقابل *S7* من *ستافيلوكوكيس اوريريوس* بالنسبة للفلتر لسلالة *B18* ، أظهرت النتائج الغياب التام للنشاط المضاد للبكتيريا ضد السلالات المسببة للأمراض.

تم إجراء اختبار نشاط المضاد الحيوي للفلترات والمستخلصات الخام للسلالات *B18* و *Sa233* بواسطة طريقة التلوين بالبنفسجي البلوري على صفيحة ميكروية. جعلت النتائج من الممكن تحديد التباين من حيث النشاط المضاد للغشاء الحيوي للسلالات المدروسة على السلالات الثمانية المستهدفة من *ستافيلوكوكيس اوريريوس*. تم تسجيل أفضل معدل تثبيط (76٪) بواسطة ترشيح السلالة *Sa233* ضد *ستافيلوكوكيس اوريريوس S5*. تمتلك السلالة الشعاعية *Sa233* نشاطاً مضاداً حيويًا ومضاداً للبكتيريا يفوق نشاط السلالة *B18*.

### الكلمات المفتاحية :

اكتينومييسات –مضاد حيوي للبيوفيلم- مضاد للجراثيم – عدوى المستشفيات – ستافيلوكوكيس اوريريوس



## ***Liste des abréviations***

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNe: Acide désoxyribonucléique extracellulaire

AIP: peptides auto-inducteurs

AK: Amikacine

ARN r 16 s: Acide ribonucléique ribosomique 16s

ARN : Acide ribonucléique.

ARNe: Acide ribonucléique extracellulaire

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

B.H.I.B : Bouillon cœur cerveau

B18 : *Nocardiosis sp*

C : Cytosine

C.A.C: Centre Anti-Cancer

C.sp. : Chaînes de spores.

C: Chloramphénicol

C+G% : coefficient de Chargaff

CAMP : Peptides Antimicrobiens Cationiques

CHU: Centre Hospitalo-Universitaire

CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy ATCC

CNRS: Centre National de la Recherche Scientifique

Coa : Coagulase

CoNS: Coagulase Négative *Staphylococcus*

CTS: Centre de Transfusion Sanguine

CV: Cristal Violet

DAP : Acide Diaminopimélique

DM : Dispositifs Médicaux

DO: Densité Optique

DOt: Densité Optique du Témoin

*E.coli* : *Escherichia coli*

E: Erythromycine

EPS: Exopolymères bactériens

FA: Acide Fusidique

FOX: Céfoxitine

G: Guanine

GEN: Gentamicine

HTLV-1: Virus T-Lymphotrope Humain

IN: Infection Nosocomiale

ISP2: International Streptomyces Project2

MH: Mueller Hinton

MSCRAMMs: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

N.I.H: National Institutes of Health

NEAT: la famille de motifs du transporteur proche du fer

NIH: The National Institutes of Health

Nit :Nitrate

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

P: Pénicilline G

Pal :Palmitate

PAM: Peptides Antimicrobiens

PIA : Adhésine intercellulaire polysaccharidique

PIA: Polysaccharidique

PNAG : Poly-N-Acétyl Glucosamine

PNAG: Poly-N-Acétyl Glucosamine

PPDHML: Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)

QS: Quorum Sensing

RCA: Rouge Congo Agar

RCA: Rouge Congo Agar.

RIF: rifampicine

Rpm: Rotation par minute

*S.aureus*: *Staphylococcus aureus*.

*S.epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*

Sa 233 : *Saccharothrix algeriensis*

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline

SASM: *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méthicilline

TCP: Tissue Culture Plate

TE: Tétracycline

TSB : Bouillon Tryptone Soja

TSBG : Bouillon tryptone Soja supplémenté à 2,5% de glucose

UMC: Urgences Médicales- Chirurgicales

V: variable.

WTA: wall teichoic acid

Zym: Réactif enzymatique .

## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Numéro de Page</b>
<b>01</b>	Cellules Staphylococcique adhérentes à un tube endotrachéal ( <b>John et al., 2006</b> )	<b>06</b>
<b>02</b>	Principales infections associées aux biofilms ( <b>David et al., 2012</b> )	<b>07</b>
<b>03</b>	Forme des cellules Staphylococciques sous le microscope électronique à balayage ( <b>Kayser et al., 2004</b> )	<b>11</b>
<b>04</b>	Facteurs de virulence chez <i>Staphylococcus aureus</i> ( <b>Lowy, 1998</b> )	<b>12</b>
<b>05</b>	Processus impliqués dans le développement d'un biofilm ( <b>Fetsch, 2018</b> )	<b>15</b>
<b>06</b>	Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes à sporulation ( <b>Hopwood et al., 1985 ; Barka et al., 2016</b> )	<b>22</b>
<b>07</b>	Pré-culture des souches Sa233 et B18 ( <b>Original</b> )	<b>33</b>
<b>08</b>	Production du métabolite par les deux souches d'actinomycètes ( <b>Original</b> )	<b>33</b>
<b>09</b>	Technique d'extraction des molécules bioactives ( <b>Original</b> )	<b>34</b>
<b>10</b>	Etude de l'activité antagoniste des Filtrats par test des puits ( <b>Original</b> )	<b>36</b>
<b>11</b>	Test d'activité antibiofilm des 2 filtrats par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque pour les souches de <i>S. aureus</i> ( <b>Original</b> )	<b>38</b>
<b>12</b>	Schéma explicatif de l'activité anti biofilm de l'extrait brut des actinomycètes vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ( <b>Original</b> )	<b>40</b>
<b>13</b>	Fréquence des prélèvements	<b>42</b>

<b>14</b>	Aspect macroscopique de <i>S.aureus</i> sur le milieu Chapman ( <b>Original</b> )	<b>44</b>
<b>15</b>	Coloration de GRAM des cellules Staphylococciques ( <b>Original</b> )	<b>44</b>
<b>16</b>	Antibiogramme des deux souches de <i>S. aureus</i> ( <b>Original</b> )	<b>47</b>
<b>17</b>	Production de slime chez les souches isolées sur milieu Rouge Congo ( <b>Original</b> )	<b>48</b>
<b>18</b>	Résultats de microplaque de biofilm ( <b>original</b> )	<b>50</b>
<b>19</b>	Résultats de l'activité antibactérienne par le test des puits ( <b>Original</b> )	<b>51</b>
<b>20</b>	Résultats l'activité antibiofilm des deux filtrats sur microplaque ( <b>original</b> )	<b>52</b>
<b>21</b>	Evaluation de l'activité antibiofilm de filtrat Sa233 vis-à-vis les huit souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>53</b>
<b>22</b>	Evaluation de l'activité antibiofilm de filtrat B18 vis-à-vis les huit souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>54</b>
<b>23</b>	Resultatde l'activite des deux extraits sur microplaque ( <b>Original</b> )	<b>55</b>
<b>24</b>	Evaluation de l'activité antibiofilm de l'extrait Sa233 vis-à-vis les huit souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>56</b>
<b>25</b>	Evaluation de l'activité antibiofilm de l'extrait B18 vis-à-vis les huit souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>57</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Numéro de Page</b>
<b>I</b>	Micro-organismes couramment isolés à partir de biofilms associés aux dispositifs médicaux à demeure ( <b>Ying Deng et Wei, 2017</b> )	<b>10</b>
<b>II</b>	Répartitions des actinomycètes dans la nature ( <b>Goodfellow et Williams, 1983</b> )	<b>21</b>
<b>III</b>	Répartition des souches de <i>S.aureus</i> selon les sites des prélèvements	<b>43</b>
<b>IV</b>	Résultats de l'identification biochimiques des souches isolées	<b>45</b>
<b>V</b>	Résultats de l'identification Biochimique des souches isolées	<b>Annexe III</b>
<b>VI</b>	Résultats de l'antibiogramme	<b>47</b>
<b>VII</b>	Résultat de la détection de la formation du biofilm par les souches isolées par la technique de TCP	<b>49</b>
<b>VIII</b>	Résultats de l'activité antagoniste des deux filtrats	<b>51</b>

## ***Table Des Matières***

**Remerciements**

**Dédicace**

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des Figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction**

**Chapitre I : Synthèse Bibliographique**

<b>1. Généralités sur les infections nosocomiales .....</b>	<b>3</b>
1.1. Définition .....	3
1.2. Fréquence et incidence.....	3
1.3. L'origine des infections nosocomiales .....	4
<b>2. Les biofilms microbiens et leurs implications en pathologie humaine .....</b>	<b>4</b>
2.1. Historique.....	4
2.2. Définition d'un biofilm .....	5
2.3. Conséquences médicales du développement des biofilms.....	5
2.3.1. Les infections liées à un matériel implanté .....	6
2.3.2. Les infections chroniques.....	7
2.4. Biofilms microbiens et risque infectieux : bactéries en cause, les virus aussi .....	8
<b>3. <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>10</b>
3.1. Généralités.....	10
3.2. Caractères morphologiques .....	10
3.3. Caractères culturels .....	11

3.4. Caractères biochimiques .....	11
3.5. Les Facteurs de virulence chez <i>S.aureus</i> .....	12
3.6. <i>Staphylococcus aureus</i> et la résistance aux antibiotiques .....	14
3.7. La formation du biofilm chez <i>S.aureus</i> .....	14
3.7.1. Adhésion initiale .....	15
3.7.2. Adhésion irréversible .....	15
3.7.3. Développement du biofilm.....	16
3.7.4. Dispersion du biofilm .....	16
✓ Le rôle du Quorum Sensing .....	16
✓ Les molécules impliquées dans le quorum sensing .....	17
3.8. La résistance aux antibiotiques au sein d'un biofilm.....	17
3.9. Maladies liées au biofilm de <i>S. aureus</i> .....	18
<b>4. Traitements actuels et nouvelles approches thérapeutiques .....</b>	<b>18</b>
<b>5. Généralité sur les actinomycètes .....</b>	<b>20</b>
5.1. Définition .....	20
5.2. Taxonomie des actinomycètes.....	20
5.2.1.Les critères actuels d'identification .....	20
5.3. Habitat.....	21
5.4.Cycle de développement.....	21
5.5.Importance des Actinomycètes.....	22
5.5.1. Importance dans le domaine médical, vétérinaire et industriel .....	22
5.5.2.Importance dans le domaine agronomique .....	23
5.5.3. Autres Importances.....	24
5.6. Activité anti biofilm des actinomycètes.....	24



## Chapitre II : Matériel et Méthodes

<b>1. Présentation de lieu d'étude .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Matériel.....</b>	<b>26</b>
2.1. Matériel non biologique.....	26
2.2. Matériel biologique.....	26
✓ Prélèvements .....	26
✓ Les souches d'actinomycètes .....	26
<b>3. Méthodes.....</b>	<b>27</b>
3.1. Isolement et identification des <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
3.1.1. Prélèvement, mise en culture et purification .....	27
3.1.2. Identification des souches bactériennes isolées.....	27
A. Identification macroscopique .....	28
B. Identification microscopique .....	28
B. 1. Coloration de GRAM .....	28
B. 2 Test de la Catalase.....	28
B. 3. Test de la Coagulase.....	29
B. 4. Identification Biochimiques.....	29
3.2. Etude de la sensibilité des souches de <i>S.aureus</i> isolées aux antibiotiques.....	30
3.3. Sélection des souches de <i>S.aureus</i> formatrices du biofilm .....	31
3.3.1. Détection de la formation de biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)...	31
3.3.2. Détection de la formation de biofilm par la méthode Tissue Culture Plate (TCP).....	31
3.4. Conservation des souches .....	32
3.5. Production et extraction des molécules bioactives à partir des souches d'actinomycètes..	32
A. Préparation des Pré-cultures.....	32

B. Production des métabolites par les souches d'actinomycètes.....	33
C. Extraction des molécules bioactives .....	33
3.6. Effet du méthanol à différentes concentrations sur la croissance des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
3.7. Evaluation de l'activité antibactérienne du filtrat vis-à-vis des souches de <i>S.aureus</i> .....	36
3.8. Evaluation de l'activité anti biofilm des deux filtrats des actinomycètes vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
3.9. Evaluation de l'activité anti biofilm des deux extraits bruts des actinomycètes vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

1. prélèvement.....	42
1.1. Fréquence des prélèvements.....	42
1.2. Répartition des souches selon le site de prélèvement.....	42
2. Identification des souches isolées.....	43
2.1. Etude macroscopique .....	43
2.2. Etude microscopique.....	44
2.3. Identification biochimique des souches.....	45
3. Etude de la sensibilité des souches de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques.....	46
4. Evaluation de la formation de biofilm.....	48
4.1. Sélection des souches productrices du biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA).....	48
4.2. Sélection des souches productrices du biofilm par la technique de plaque de culture de tissu (TCP).....	49
5. Activité antibactérienne des deux filtrats.....	50
6. Etude de l'activité antibiofilm des deux filtrats des souches d'actinomycète.....	51

7. Etude de l'activité antibiofilm des deux extraits bruts des souches d'actinomycètes... .....54

**II-) Discussion ..... 57**

**Conclusion et perspectives... ..... 67**

**Références Bibliographiques**

**Annexes**

# INTRODUCTION

En milieu naturel, 90% des espèces bactériennes présentent deux modes de croissance : le mode planctonique libre et le mode sessile, attaché aux surfaces dans des biofilms. Le biofilm est une communauté de microorganismes fixée à des surfaces exposées à des environnements humides. La formation de biofilms microbiens permet aux cellules planctoniques uniques d'assumer un mode de croissance multicellulaire (**Briand et al., 2012 ; Rumbaugh et Sauer., 2020**).

Il a été démontré que ces structures sont la source de problèmes de biocontamination dans divers domaines tels que la santé, l'environnement et l'industrie. Dans le domaine de la santé 65% des infections bactériennes sont dues à la présence de biofilm (**CCLIN, 2014 ; Seghir et al., 2017**).

*Staphylococcus aureus* est l'une des causes majeures des infections communautaire et nosocomiales et le plus souvent incriminé dans des infections aiguës et chroniques dont la plus part sont dues à sa capacité à adhérer sur les implants médicaux et à former des biofilms (**Lee et al., 2018**). Cette formation de biofilm permet à la bactérie d'échapper aux défenses de l'organisme humain et de protéger du traitement antibiotique ce qui peut expliquer la résistance aux antibiotiques, sa virulence et ses propriétés de survie sur une variété de surfaces rendant les infections par biofilm particulièrement difficiles à éradiquer (**Bhattacharya et al., 2015 ; Venkatesan et al., 2015**).

Par conséquent, il est impératif de rechercher de nouveaux antistaphylocoques efficaces avec une activité antibiofilm pour lutter contre la menace des infections dues aux souches multirésistantes aux antibiotiques (**Von Nussbaum et al., 2006**).

Face à une telle situation et en tenant compte du nombre limité d'antibiotique, les recherches actuelles s'orientent vers l'exploitation des ressources naturelles comme source alternative de molécules antimicrobiennes. Ainsi, plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces. L'une d'elles vise des souches provenant d'écosystèmes extrêmes et particuliers entre autre, les actinomycètes (**Boubetra et al., 2013 ; Aouiche et al., 2012**).

Ces micro-organismes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif à G + C % élevé et sont les plus largement distribuées dans la nature, principalement dans le sol (**Goodfellow et al., 2012**). Les actinomycètes sont une source riche de substances bioactives, notamment

des antibiotiques, des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes et des agents pharmacologiquement actifs (**Kim et al., 2012**).

Récemment, les recherches sur les biofilms visent à explorer et à découvrir des molécules produites par les espèces d'actinomycètes capable d'inhiber la formation de biofilm du *Staphylococcus aureus* (**Xie et al., 2019**).

L'objectif principal de ce travail est d'étudier premièrement, la mise en évidence de la présence de *Staphylococcus aureus* dans les surfaces hospitalières et de vérifier la capacité de la formation de biofilm par les souches isolées.

Notre deuxième objectif est l'extraction et la production des substances bioactives à partir de deux souches d'actinomycètes *Nocardiopsis sp* et *Saccharothrix algeriensis* et d'étudier l'activité antibactérienne et antibiofilm de leur filtrats et de leur extrait brut vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées.

SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Généralités sur les infections nosocomiales

### 1.1. Définition

Le terme nosocomial, vient du grec « nosos » signifiant maladie et secondairement de « nosokomeone » qui signifie hôpital (Margot et Chantal., 2009) .L'infection nosocomiale (IN) est définie par une infection qui n'est ni présente ni en incubation lors de l'admission dans un établissement des soins (Trifi et al., 2017). En raison de la difficulté d'évaluer la présence d'une infection en incubation, une approche pratique consiste à définir toute infection bactérienne comme nosocomiale si elle devient apparente > 48 à 72 heures après l'admission (Jenkins, 2018).

Ce délai permet de distinguer et de différencier une infection d'acquisition communautaire d'une infection nosocomiale. Pour les infections du site opératoire, il est considéré comme « nosocomial » les infections survenant dans les 30 jours suivants l'intervention chirurgicale, ou s'il y a mise en place d'un matériel étranger ou d'un implant dans l'année qui suit l'intervention (prothèse) (Boulahouat et Aliziane, 2020).

### 1.2. Fréquence et incidence :

Selon l'OMS, les infections nosocomiales touchent plus de 1.4 millions de patients dans le monde (OMS, 2008). Ainsi, plus de 100 000 cas d'infections résultant de soins de santé aboutissent à plus de 5000 décès par an, directement imputables aux infections nosocomiales. Des chiffres dévoilent qu'environ 5 à 10% des patients sont infectés lors de leur séjour à l'hôpital dans les pays développés. Alors que dans les pays en développement le pourcentage des patients affectés des infections nosocomiales peut excéder les 25% (Boulahouat et Aliziane, 2020).

Les infections nosocomiales (IN) frappent environ 1 adulte sur 10 et 1 enfant sur 12 dans les hôpitaux de soins de courte durée. Elles représentent une importante préoccupation en matière de sécurité des patients en raison du risque pour les patients ainsi que des incidences économiques (Bukasa et al., 2021).

En Algérie, pas moins de 30% des patients hospitalisés dans les centres hospitaliers sont victimes des infections nosocomiales. Et dans de nombreux cas le malade ne décède pas à cause de sa maladie mais plutôt d'infections répandues en milieu hospitalier. C'est un taux angoissant qui nécessite alors la mise en œuvre des mesures de lutte et de prévention (Boulahouat et Aliziane, 2020).



Une étude réalisée au niveau du CHU Oran a démontré que Le taux de prévalence des infections nosocomiales était de 8,5% et celui des patients infectés était de 7,8%. Les infections urinaires venaient en première position avec une fréquence de 41,3% (**Guetarni et al., 2016**).

### 1.3. L'origine des infections nosocomiales

- ❖ **Origine exogène** : les infections nosocomiales d'origine exogène sont essentiellement associées à une transmission croisée directe ou indirecte d'un patient à l'autre ou de l'environnement aux patients (par les mains ou matériels des personnels), les personnels ou la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, équipements, alimentation ...) (**Brun-Buisson et Girou, 2000**).
- ❖ **Origine endogène** : qui reste la plus fréquente. Il est considéré que les sites normalement stériles sont contaminés puis colonisés par la flore du patient et notamment à la faveur d'une rupture des barrières de défenses cutanéomuqueuses. La flore du patient est généralement modifiée par la maladie, les traitements antibiotiques antérieurs ou les traitements associés (**Trifi et al., 2017**).

## 2. Les biofilms microbiens et leurs implications en pathologie humaine

### 2.1. Historique

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek, qui observera vers 1683 avec cet appareil des communautés des de microorganismes à la surface de ces propres dents (**Graves, 2004**).

En 1933, Arthur Henrici observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames lors l'expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il a été délégué l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (**Henrici, 1933**). Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Claude Zobell en 1943 (**Roux et Chigo, 2006**).

Bien que les biofilms sont bénéfiques et jouent un rôle écologique capital, ils représentent également une importante source de nuisance en médecine humaine ou vétérinaire, ils sont très difficiles à éliminer (**Roux et Chigo, 2006**).

## 2.2. Définition d'un Biofilm

Le changement brusque de l'environnement qui entoure les microorganismes telle que ; la diminution du taux de l'oxygène et des nutriments, présence des agents antimicrobiens, conduit à un changement important dans le comportement de ces derniers. Ces changements impliquent le passage d'un mode de vie planctonique vers une communauté des microorganismes appelée biofilm (**Meneses et Landoni, 2011**).

Les biofilms sont des structures hétérogènes constituées par des populations microbiennes englobées dans une matrice extracellulaire qui inclut tous les éléments du biofilm autre que les microorganismes (**Lasa et al., 2005**). Elle est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97 %), d'exopolysaccharides, d'acides nucléiques (DNAe et RNAe), de protéines, de lipides et d'autres biomolécules. La formation de communautés de biofilms sessiles implique des événements très complexes et dynamiques par lesquels les EPS jouent des rôles structurels et fonctionnels clés qui sont essentiels pour les propriétés émergentes des biofilms (**Karygianni et al., 2020**). Les biofilms peuvent être trouvés à la fois sur les biotiques et les surfaces abiotiques aussi (**Del Pozo, 2018**).

L'utilisation de la microscopie optique, puis confocale, a permis de montrer que le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes, séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux ; véritables « canaux », ceux-ci y assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation (**Roux et Chigo, 2006**).

## 2.3. Conséquences médicales du développement des biofilms

La contamination microbienne des surfaces médicales aboutit à la formation de biofilms bactériens qui, outre leur tolérance aux biocides, libèrent des bactéries planctoniques à l'origine d'infections systémiques qui en résulte (**Pronovost et al., 2006**).

D'après **Muhsin et al (2018)**, les biofilms bactériens sont généralement de nature pathogène et peuvent provoquer des infections nosocomiales. Les instituts nationaux de la santé (NIH) ont révélé que parmi toutes les infections microbiennes et chroniques, 65% et 80%, respectivement, sont associées à la formation de biofilm.

Selon **Lebeaux et Chigo (2012)**, Plusieurs critères ont été proposés afin de définir si une infection est associée, ou non, à un biofilm :

- les bactéries doivent être associées à une surface ou dépendantes d'un substrat.
- les bactéries doivent être organisées en agrégats cellulaires ou communautés enchâssés dans une

matrice composée d'éléments bactériens ou de l'hôte.

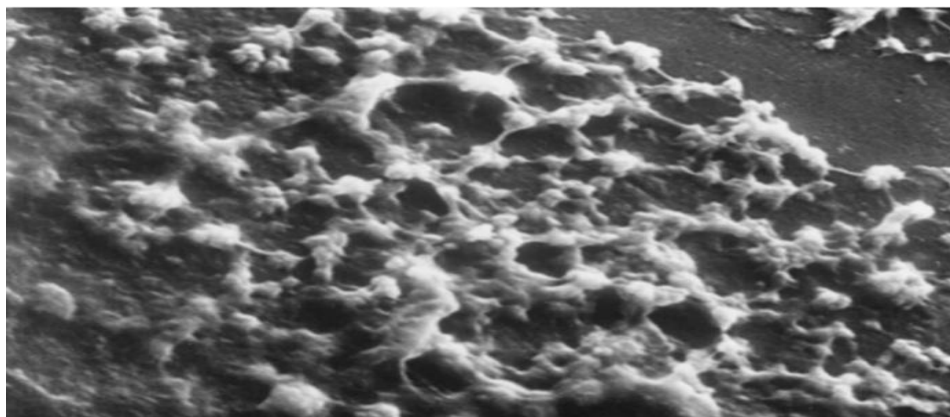
- l'infection initiale doit être confinée à un site de l'organisme.
- l'infection doit résister à l'antibiothérapie, bien que les bactéries testées en phase planctonique y soient sensibles.

Parmi les complications médicales liées aux biofilms, on peut distinguer les infections liées à un matériel implanté et les infections chroniques (**Lebeaux et Chigo, 2012**).

### 2.3.1. Les infections liées à un matériel implanté

L'utilisation de dispositifs médicaux implantés est devenue une partie intégrante de la médecine moderne. Néanmoins, les implants à corps étranger sont une arme à double tranchant, puisque, outre leurs bienfaits exceptionnels, des complications infectieuses sont régulièrement observées (**Del Pozo, 2018**). Ils sont composés de différents matériaux tels que des matériaux polymères, métalliques ou céramiques (**Lasa et al., 2005**). Les dispositifs médicaux ou DM sont utilisés soit dans le milieu interne ou sont partiellement en contact avec les tissus du corps humain. Si les tissus de l'hôte n'adhèrent pas parfaitement à la surface du biomatériau, ils présentent des conditions favorables à l'adhérence microbienne, et donc à la formation de biofilms microbiens (**Kaali et al., 2011 ; Del Pozo, 2018**).

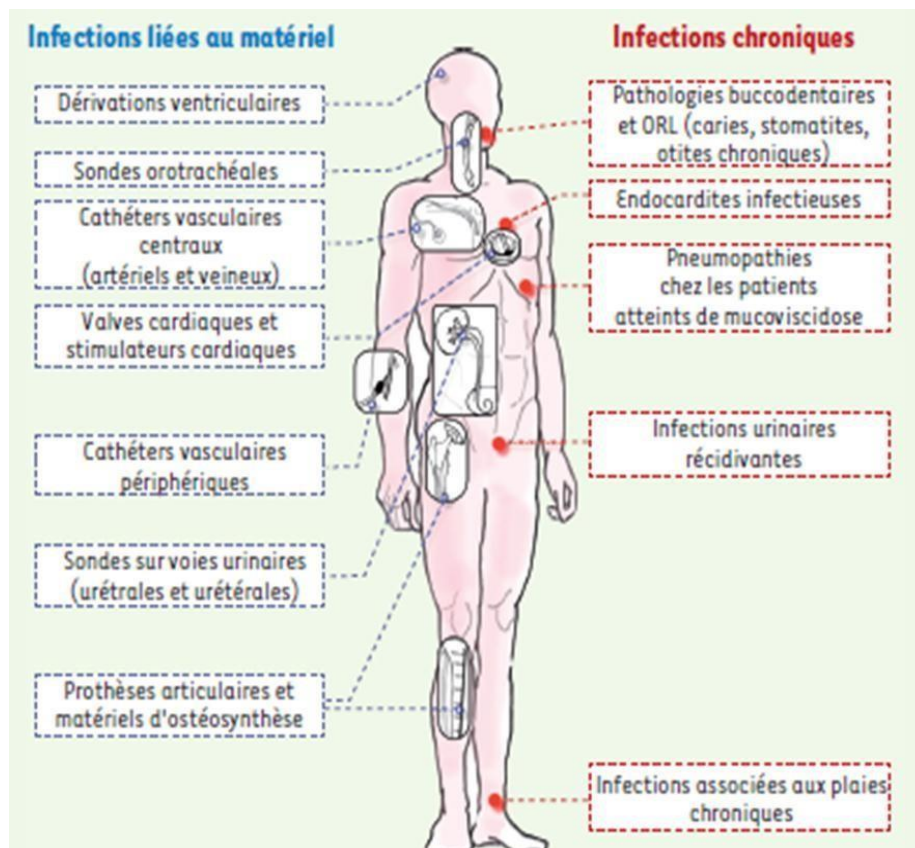
Au cours des 20 dernières années, il a été constaté que 6 à 14% des patients hospitalisés développent des infections nosocomiales qui sont en général associés à des DM internes ou partiels internes (DM invasifs) (**Sousa et al., 2011**), tels que les prothèses vasculaires, dialyseurs électriques, prothèses articulaires, appareils orthopédiques, cathéters intraveineux, appareils urinaires à demeure cathéters, tubes endotrachéaux (**figure 01**), cathéters de dialyse péritonéale, implants mammaires, prothèses vocales, dispositifs intra-utérins, drains abdominaux, etc... (**Del Pozo, 2018**).



**Figure 01:** Cellules Staphylococciques adhérentes à un tube endotrachéal (**Pace et al., 2006**).

### 2.3.2. Les infections chroniques

Plusieurs infections chroniques caractérisées par leur difficulté thérapeutique, l'impossibilité de stériliser certains foyers d'infection et le risque élevé de récurrence également considérées comme des infections liées aux biofilms (**Figure 02**). Certains exemples illustrent ces caractéristiques:



**Figure 02:** Principales infections associées aux biofilms (**Lebeaux et Chigo, 2012**).

#### ✓ L'endocardite infectieuse

L'infection primaire dans l'endocardite est un biofilm composé à la fois de composants bactériens et de composants de l'hôte sur la valve cardiaque (**Lene et al., 2020**). Certains micro-organismes, en particulier le staphylocoque doré, accompagnent leur prolifération de la formation d'un biofilm conduisant à un agrégat plaquettaire enchâssé dans un réseau de polysaccharides et de protéines (**Lebeaux et Chigo, 2012**). La formation d'un biofilm favorise la virulence de l'infection, notamment en protégeant les micro-organismes des défenses immunitaires et des traitements antimicrobiens (**Iung, 2019**).

✓ **La parodontite**

C'est l'une des maladies infectieuses orales les plus courantes associées avec l'établissement d'un biofilm hautement pathogène qui déclenche une réponse immunitaire/inflammatoire de l'hôte qui conduit à la destruction du tissu parodontal de soutien et éventuellement la perte des dents, *Proteus aerobicus* et *Fusobacterium nucleatum* sont parmi les agents responsables de la parodontite

(**Muhsin et al., 2018 ; Del Pozo, 2018**).

✓ **L'otite moyenne**

C'est une infection qui touche l'oreille moyenne, très fréquente chez l'enfant, qui peut survenir sous une forme aiguë ou chronique et qui est causée par un groupe variable de microorganismes, dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Lasa et al., 2005**).

✓ **Infections associées aux plaies chroniques**

En présence d'une plaie chronique, le tissu sous-cutané exposé fournit un substrat favorable pour assurer la croissance et la colonisation d'un large éventail de microorganismes sous forme de biofilms polymicrobiens. Ces contaminants proviennent de l'environnement exogène, de la flore cutanée, de la flore colonisant le tube digestif ou la cavité buccale. Ces trois sources fournissent la vaste majorité des microorganismes colonisant les plaies (**Brook et Randolph, 1981**).

## 2.4. Biofilms microbiens et risque infectieux : bactéries en cause, les virus aussi

Parmi les microorganismes capables de produire un biofilm ; on peut retrouver les algues, es virus, les champignons, les levures et les bactéries. Ces biofilms peuvent être composés d'une seule espèce c'est à dire biofilm homogène, comme ils peuvent être composés de plusieurs espèces; on parle alors d'un biofilm hétérogène ou mixte. Les principaux microorganismes d'intérêt médical sont :

- **D'origine fongique**

Au cours ces dernières années, on constate une évolution intense en matière d'atteinte par les infections systémiques d'origine fongiques causées essentiellement par les levures du genre *Candida*, plus particulièrement par *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* et *C.tropicalis*, qui sont considérées comme la troisième ou quatrième cause des septicémies acquises à l'hôpital. (**Pace et al., 2006**).

- **D'origine virale**

En 2010, et pour la première fois des chercheurs de l'Institut Pasteur et du CNRS Centre national de la recherche scientifique à Paris montrent que certains virus peuvent constituer des structures complexes similaires aux biofilms bactériens. Ces formations, qui assureraient une protection des virus face au système immunitaire, permettent une dissémination efficace de cellule à cellule. Selon l'étude publiée, les biofilms viraux seraient le mode de propagation majeur de certains virus et pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques en infectiologie. Le modèle d'étude des chercheurs français est le rétrovirus HTLV-1 (**Pais-Correia et al., 2010**).

- **D'origine bactérienne**

- ***Pseudomonas aeruginosa***: *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire qui est une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose et les personnes immunodéprimées (**Pang et al., 2019**). Les infections les plus courantes sont les infections du tractus urinaire, des plaies ou les bactériémies. Les infections chroniques se caractérisent par la formation d'un biofilm bactérien vu sa capacité à coloniser les surfaces et à former des biofilms (**Avril et al., 1992**).
- ***Escherichia coli*** : *Escherichia coli* est principalement un agent commensal des oiseaux et des mammifères, y compris les humains, où il peut agir comme un agent pathogène opportuniste (**Touchon et al., 2020**). C'est aussi le premier germe responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Les infections à *Escherichia coli* sont de deux types : les infections intestinales et les infections extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies et méningites) (**Houdt et Michiels, 2005**).
- ***Staphylococcus aureus***: *Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif, omniprésent (**Archer Nathan et al., 2011**). C'est une bactérie commensale de la flore cutanéomuqueuse de l'homme et des animaux. Cependant, la niche écologique dominante est la partie antérieure du nez. Le portage nasal est le principal réservoir impliqué dans la transmission interhumaine de *S. aureus* à l'hôpital mais également en milieu communautaire. C'est aussi le principal facteur de risque d'infection puisque la colonisation peut être une étape préalable à l'infection (**Maalej et al., 2020**). Les staphylocoques envahissants sont alors soit éliminés par la réponse immunitaire innée de l'hôte, soit attachés aux protéines de la matrice extracellulaire et forment un biofilm (**Archer Nathan et al., 2011**).

**Tableau I :** Micro-organismes couramment isolés à partir de biofilms associés aux dispositifs médicaux à demeure (Ying et Wei, 2017).

Matériel médical	Microorganismes
<b>Cathéter veineux central</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
<b>Cathéter urinaire</b>	<i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> , et <i>C. albicans</i>
<b>Tubes endotrachéaux</b>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Acinetobacter spp</i> , Et <i>C. albicans</i>
<b>Alimentation entérale</b>	<i>Enterococcus</i> , <i>staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , et <i>Candida spp</i> .

### 3. *Staphylococcus aureus*

#### 3.1. Généralités

*Staphylococcus aureus* est considéré par l'Organisation mondiale de la santé comme un agent pathogène hautement prioritaire pour lequel des nouvelles solutions thérapeutiques sont nécessaires (Pinto et al., 2019). Les infections causées par *S.aureus* vont des infections cutanées aux infections systémiques. Le succès de *S.aureus* d'être un agent pathogène dangereux peut être attribué en partie à sa résistance aux antibiotiques et à sa capacité à former des biofilms (Vandecandelaere et al., 2017).

Cette bactérie omniprésente est un agent pathogène important en raison à une combinaison de «virulence médiée par la toxine, de caractère invasif, et la résistance aux antibiotiques.» Cet organisme est apparu comme un agent pathogène majeur pour les infections nosocomiales et communautaires (Jhalka et al., 2014).

#### 3.2. Caractères morphologiques

Les staphylocoques sont des coques immobiles, isolés ou groupés en diplocoques, ou en amas de plusieurs éléments (du grec staphylo= grappe de raisin, qui après coloration de GRAM apparaissent des cocci à GRAM positif (Figure 03) (Le Loir et Gautier, 2010).

Le diamètre des cellules varie de 0,5 à 1,0  $\mu\text{M}$ . La microscopie électronique à transmission des cellules montre une paroi cellulaire épaisse, une membrane cytoplasmique distinctive et un cytoplasme amorphe. L'observation au microscope électronique à balayage révèle des cellules de forme grossièrement sphérique à surface lisse (**Gnanamani et al., 2018**).



**Figure 03 :** Forme des cellules Staphylococciques sous le microscope électronique à balayage (**Kayser et al., 2004**).

### 3.3. Caractères cultureux

*S. aureus* peut croître dans une large gamme de températures (7°C à 48,5°C; optimum 30°C à 37°C), pH (4,2 à 9,3; optimum 7 à 7,5) avec concentration de chlorure de sodium jusqu'à 15% de NaCl (**Rapuoli, 2017**). Ce caractère est parfois mis à profit dans l'utilisation des milieux sélectifs (milieu de Chapman) pour les isoler (**Le Loir et Gautier, 2010**).

*S. aureus* est un organisme aérobic et anaérobic facultatif qui forme des colonies jaunes ou blanches assez grandes sur des milieux gélosés riches en nutriments. La couleur jaune des colonies est conférée par les caroténoïdes produits par l'organisme. Le terme « aureus » est dérivé du latin, qui fait référence à la couleur de l'or (**Gnanamani et al., 2018**). La culture se fait à température ambiante, pendant 18-24h, les colonies des Staphylocoques semblent luisantes, lisses et translucides, souvent avec un pigment doré (**Rapuoli, 2017**).

### 3.4. Caractères biochimiques

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S.aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (**Kloos et Veron., 1990**). De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque (**Couture, 1990**).

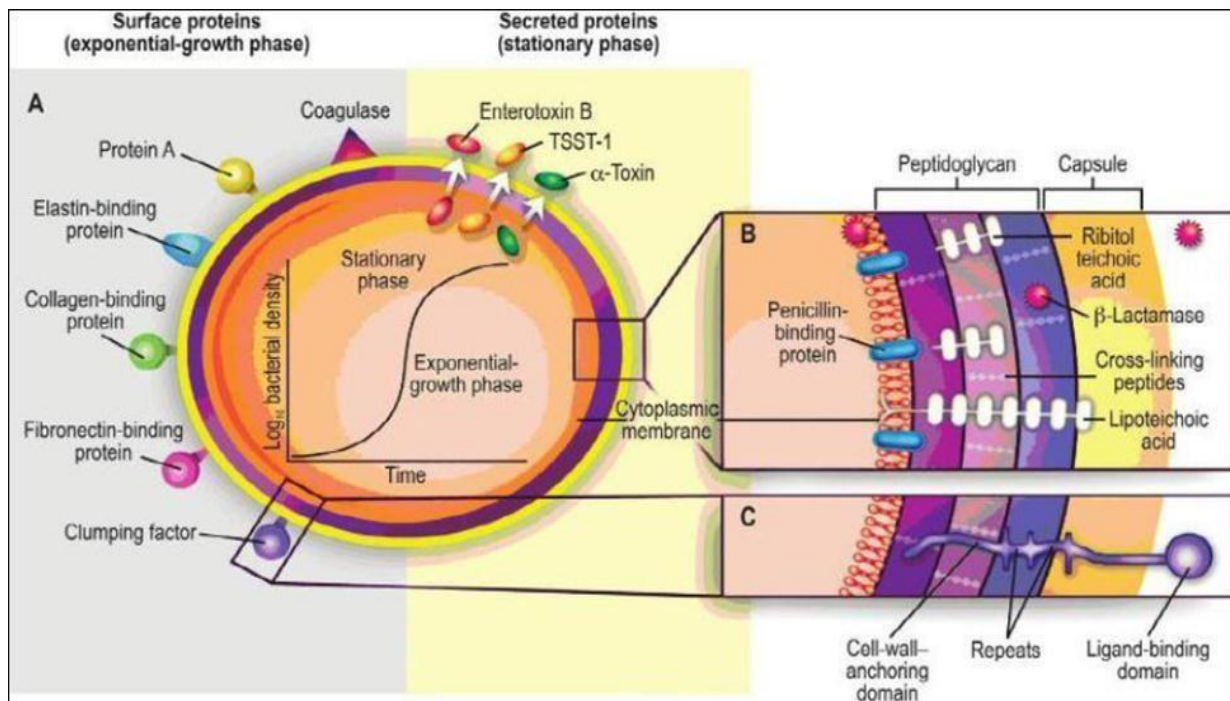


Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* (Fauchere et Avril, 2002).

Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase (Fauchere et Avril, 2002). Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (Couture, 1990).

### 3.5. Les Facteurs de virulence chez *S.aureus*

*Staphylococcus aureus* est une cause majeure d'infections nosocomiales et sécrète un spectre diversifié des déterminants de la virulence ainsi que capacité à former le biofilm (Kong et al., 2018). Elle représente la 2ème espèce pathogène responsable de ce type d'infections après *E. coli* (Vincenot et al., 2008). Bien que *S.aureus* soit principalement un microbe commensal, il a la capacité de provoquer un large éventail de maladies dont la gravité peut varier considérablement. Les problèmes les plus courants sont les infections cutanées, l'endocardite, l'ostéomyélite, la fasciite nécrosante ainsi que des septicémies (Jenul et Horswill, 2018). Parmi les facteurs de virulence qui caractérisent l'espèce *S.aureus* (figure 04) :



**Figure 04 :** Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus*

**A :** protéines de surface et sécrétées en fonction de la phase de croissance, **B :** organisation de la paroi bactérienne et de la capsule. **C :** Détail de l'organisation du « clumping factor ». La majorité des protéines de surfaces ont une organisation similaire (Lowy, 1998).

✓ **Les toxines:** *S. aureus* produit en fonction de la souche une grande variété de toxine sécrétées capables de nuire directement les cellules de son hôte.

Ils comprennent (1) des toxines endommageant la membrane, (2) des toxines qui interfèrent avec le récepteur fonction mais n'endommagent pas la membrane, et (3) enzymes sécrétées, qui sont capables de dégrader les molécules de l'hôte ou d'affecter les mécanismes de défense de l'hôte (**Vincenot et al., 2008**).

✓ **Enzymes de *S. aureus*:** Ces enzymes ont un intérêt pathogénique et/ou diagnostique important.

- **Coagulase libre :** En 1903, *S. aureus* provoquerait la coagulation du plasma humain en raison de la libération de l'enzyme coagulase (Coa). L'enzyme coagulase est codée par les chromosomes et pourrait coaguler à la fois le plasma de lapin et le plasma humain (**Algammal et al., 2020**). Un staphylocoque produisant cette protéine sera identifié comme *S. aureus*. Elle joue un rôle dans la formation de thrombophlébites suppurées et inhiberait la phagocytose (**Avril et al., 1992**).

- **Coagulase liée ou dumping factor ou facteur d'affinité pour le fibrinogène :** A côté de cette coagulase « libre », on reconnaît une coagulase insoluble, « liée » à la surface des germes et également appelée dumping factor. Elle se lie au fibrinogène et est responsable de l'agrégation sur lame des staphylocoques en présence de sérum ; ce facteur d'affinité pour le fibrinogène peut être mis en évidence par contact de la souche à étudier avec des hématies de mouton ou des particules de latex recouvertes de fibrinogène ; une agglutination apparaissant en quelques secondes est trouvée chez 98 % des souches de *S. aureus* (**Avril et al., 1992**).

- **Nucléase (DNase) :** La nucléase staphylococcique, connue à l'origine sous le nom de DNase micrococcale, a été identifiée dans les surnageants de culture de *S. aureus* par **Cunningham et al. en 1956**. La nucléase nécessite des ions  $Ca^{2+}$  pour son activité, mais pas d'autres cations divalents. La nucléase staphylococcique est également connue sous le nom de thermonucléase, du nom de sa résistance à l'inactivation thermique (**Tam et Torres, 2019**). La nucléase staphylococcique fonctionne à la fois comme une endo- et une exo-nucléase qui staphylococcique catalyse l'hydrolyse de l'ADN et l'ARN, par le clivage de la liaison ester 5'-phosphorylé (**Naeem Khwen et al., 2021**).

✓ **Acides téichoïques :**

Ils représentent des polymères de paroi cellulaire qui sont soit liés de manière covalente au peptidoglycane (WTA), ou ancrés via un glycolipide à la membrane cytoplasmique, c'est-à-dire les acides lipotéichoïques. Le WTA est l'un des facteurs de virulence les plus importants contribuant à la colonisation par *S. aureus* des surfaces abiotiques et à la colonisation nasale,

la protection contre les dommages cellulaires en permettant la résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (CAMP), la résistance aux antibiotiques cationiques (glycopeptides), aux antimicrobiens gras acides, lysozyme et autres facteurs (**Fetsch, 2018**).

✓ **Adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA)/Poly-N-Acétyl Glucosamine (PNAG)**

Le PIA/PNAG est un glycopolymère qui a été découvert pour la première fois comme antigène de biofilm chez le *Staphylococcus*, où il joue un rôle important dans l'adhésion aux biomatériaux (**Rapuoli, 2017**).

### 3.6. *Staphylococcus aureus* et la résistance aux antibiotiques

Les espèces du genre *Staphylocoque* font parties des germes qui ont un fort pouvoir adaptatif et ont développés différents mécanismes de résistance aux antibiotiques ainsi qu'à plusieurs agents antimicrobiens (**Boukhatem et al., 2015**). Cette résistance est souvent acquise par les mutations chromosomiques, les transferts génétiques tels que l'échange des plasmides, les transposons etc... (**Rapuoli, 2017**).

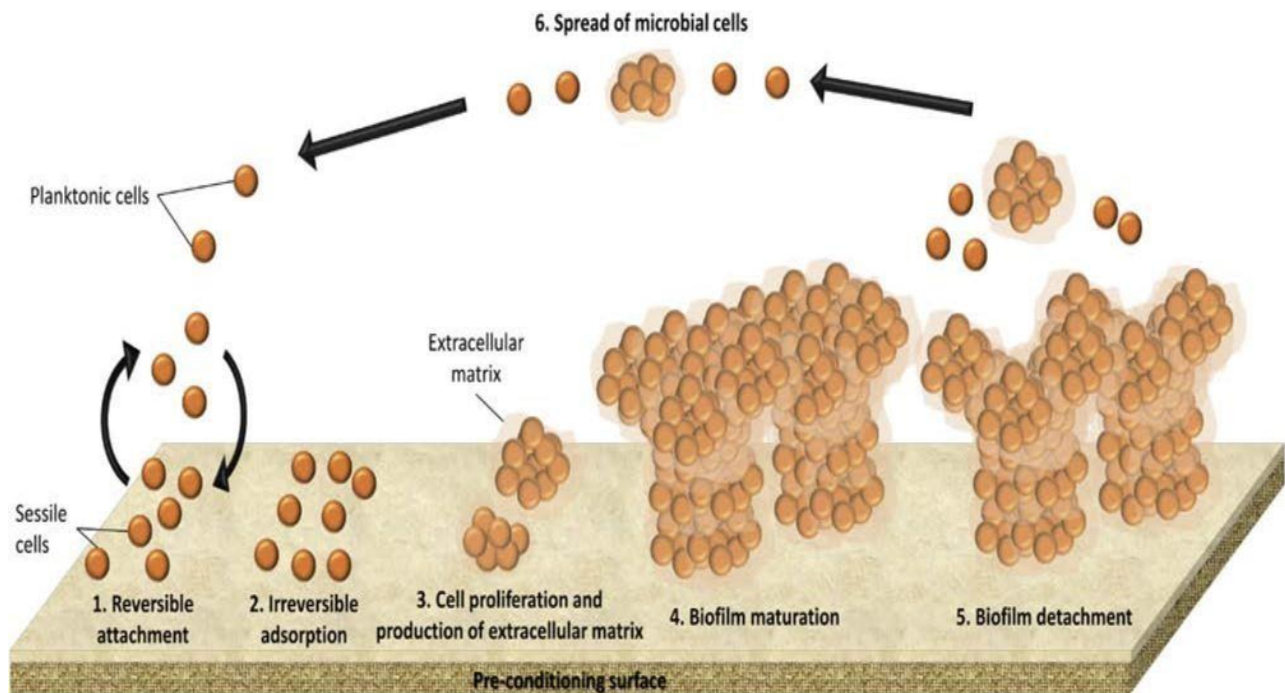
Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) constitue une des principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales chez ces patients a montré une évolution rapide au cours des dernières années (**Sakly et al., 2020**).

La surveillance mondiale a montré que Le SARM représente un problème à l'échelle mondiale, déterminant une augmentation de la mortalité et la nécessité d'utiliser la dernière ressource des antibiotiques coûteux (**Rapuoli, 2017**).

### 3.7. La formation du biofilm chez *S.aureus*

Les biofilms se forment généralement en raison d'un mécanisme de défense par défaut pour obtenir un habitat favorable, retenir les nutriments et assurer la survie (**Khatoon et al., 2018**).

La capacité d'adhérence de *S. aureus* aux cellules eucaryotes et aux surfaces abiotiques grâce aux protéines de sa paroi cellulaire avec une formation ultérieure de biofilm est caractérisée comme l'un des facteurs de virulence importants dans les infections associées aux soins (**Otto, 2018**). La formation de biofilm est divisée en quatre étapes essentielles ; adhésion initiale à une surface, adhésion irréversible, formation de microcolonie et maturation du biofilm avec détachement de cellules bactériennes (**figure 05**) (**Oliveira et al., 2017**).



**Figure 05 :** Processus impliqués dans le développement d'un biofilm (Fetsch, 2018)

### 3.7.1. Adhésion initiale

Selon Donlan (2002) et Palmer et al (2007), la stratégie de fixation initiale des cellules de *S. aureus* varie entre les surfaces abiotiques et biotiques. Ainsi, l'adhésion initiale aux surfaces abiotiques dépend principalement des caractéristiques physico-chimiques des deux cellules et la surface de contact. Les interactions hydrophobes et électrostatiques participent généralement à cette fixation initiale.

### 3.7.2. Adhésion irréversible

En deuxième étape, les cellules bactériennes adhèrent de manière irréversible aux substrats par des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques et des interactions dipoléhydrophobes, mais certaines molécules de surface bactériennes spécifiques telles que les autolysines ou les acides téichoïques ont également été décrits comme étant impliqués chez les staphylocoques (Roux et Chigo, 2006) ; (Vallet et al., 2001) ; (Fetsch, 2018) ; (Oliveira et al., 2017). En revanche, l'attachement de *S. aureus* aux surfaces biotiques nécessite des interactions beaucoup plus spécifiques, qui sont médiées par une grande variété de protéines ancrées à la paroi cellulaire (Fetsch, 2018). Parmi ces protéines on distingue ; le composant de surface microbienne reconnaître les molécules de la matrice adhésive (MSCRAMMs), la famille de motifs du transporteur proche du fer (NEAT), et la famille de répétitions G5 – E qui sont impliquées dans l'adhésion de *S. aureus* aux surfaces biotiques (Otto, 2018).

### 3.7.3. Développement du biofilm

Une fois que les bactéries sont fixées aux surfaces, elles commencent à se diviser et les cellules filles se propagent autour du site de fixation, formant une microcolonie semblable à la façon dont se produit au cours du processus de formation des colonies sur des plaques de gélose (Lasa et al., 2005).

Dans un stade ultérieur, la bactérie commence à sécréter une substance polymérique extracellulaire (EPS) constituée d'ADN extracellulaire, de protéines, de lipides et principalement de polysaccharides (homo- et hétéro polysaccharides) qui facilite l'adhésion entre les cellules et les surfaces (Dunne, 2002). Les bactéries adsorbées devenant ensuite encapsulées dans une couche d'hydrogel qui forme une barrière physique entre la communauté microbienne et l'environnement extracellulaire (Oliveira et al., 2017).

### 3.7.4. Dispersion du biofilm

Pendant la dispersion, la dernière étape du cycle de vie du biofilm, des cellules individuelles sortent du biofilm pour reprendre un mode de vie planctonique (Rumbaugh et Sauer, 2020).

La principale stratégie de dispersion du biofilm utilisée par *S.aureus* est la production de divers exo-enzymes et tensioactifs pour dégrader la matrice polymère extracellulaire. L'efficacité des mécanismes individuels dépend fortement de la composition de la matrice de la souche de *S. aureus* en question. En général, les mécanismes utilisant l'autodestruction enzymatique de la protéine et / ou de l'ADNe dans le matrice sont moins efficaces pour disperser les polysaccharides des biofilms (Horswill et al., 2014 ; Clutterbuck et al., 2007).

#### ❖ Le rôle du Quorum Sensing

L'enveloppe cellulaire bactérienne joue un rôle crucial dans la signalisation intercellulaire ainsi que dans la communication entre les cellules voisines dans des petites microcolonies qui aident dans des processus décisionnels. Une partie de cette communication se produit par le quorum sensing (QS), un phénomène qui implique un contrôle dépendant de la densité cellulaire de l'expression des gènes (Khatoon et al., 2018).

Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transrationnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome et du protéome, avec un

contrôle de l'expression de facteurs de virulence comme les protéases par exemple (Tomlin, 2005).

### ❖ Les molécules impliquées dans le quorum sensing

Le *Staphylococcus aureus* synthétise des peptides auto-inducteurs (AIP), dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Un dernier type de molécules a été mis en évidence par Bassler en 1994, mais sa structure n'a été connue qu'en 2001, il s'agit d'une furanone (ou AI-2) qui permettrait une communication inter-espèces, contrairement aux deux autres qui se limitent à l'intra-espèce (Irie et Parsek, 2008).

### 3.8. La résistance aux antibiotiques au sein d'un biofilm

La formation de biofilm en soi est connue depuis longtemps pour conférer une résistance aux attaques des phagocytes, qui ne parviennent pas à pénétrer à travers la matrice de biofilm. De même, la matrice du biofilm peut être imperméable à certains antibiotiques. D'un autre côté, certains peuvent facilement pénétrer, ce qui dépend probablement des caractéristiques chimiques de de l'antibiotique. Il a été estimé que les biofilms offrent une tolérance 10 à 1000 fois accrue aux effets des antibiotiques (Otto, 2018).

La résistance aux antibiotiques des bactéries dans les biofilms contribue également aux infections chroniques (Sharma et al., 2019). D'après Oliveira et al (2017) et Kaali et al (2011), plusieurs mécanismes contribuent à la résistance du biofilm aux antimicrobiens, tels que :

- La faible pénétration de l'agent antimicrobien en raison de la fonction de barrière de la matrice du biofilm.
- La présence de cellules dormantes persistantes et de petites colonies de variantes très résistantes.
- Les réponses adaptatives au stress des cellules bactériennes dans le biofilm peuvent entraîner un retard de la pénétration du médicament ou un ralentissement de la croissance cellulaire.
- Des modifications du microenvironnement chimique dans le biofilm et une régulation positive de plusieurs gènes de résistance spécifiques au biofilm.
- Les antibiotiques ne sont pas capables de pénétrer dans toute la profondeur du biofilm et la diffusion des antibiotiques dans les EPS sont relativement lents.
- Certaines bactéries du biofilm peuvent survivre sans se diviser ce qui les rend résistants aux antibiotiques qui attaquent les cellules en division.

### 3.9. Maladies liées au biofilm de *S. aureus*

*S. aureus* provoque un large éventail d'infections chez l'homme. Les infections cliniques de *S. aureus* sont classées en catégories communautaires et nosocomiales en fonction de l'origine de l'infection (Gnanamani et al., 2018).

Les infections chroniques associées au biofilm causées par *Staphylococcus aureus* entraînent souvent une augmentation de la morbidité et de la mortalité, en particulier lorsqu'il est associé à des dispositifs médicaux à demeure (Moormeier et Bayles, 2017).

Parmi les infections associées au biofilm formé par *S.aureus* on donne l'exemple de :

- **Staphylococcies osseuses** : l'ostéomyélite aiguë est une affection de l'enfant ou de l'adolescent : elle touche classiquement les os longs et peut devenir chronique. Les infections osseuses staphylococciques post-chirurgicales sont très préoccupantes (Avril et al., 1992 ; Kolenda et al., 2019).
- **Les infections cutanées à staphylocoque** : ce sont l'un des motifs fréquents de consultation en pédiatrie. Il existe un polymorphisme clinique, rendant parfois le diagnostic difficile. La plupart des infections sont bénignes, mais peuvent évoluer vers des infections plus graves en l'absence de traitement, ou vers des syndromes toxiques de pronostic moins bon ( Larquey et Mahè, 2018).
- **Infection oculaire** : Les infections oculaires associées au biofilm de *S. aureus* comprennent la conjonctivite, l'endophtalmie et la kératite infectieuse. Les staphylocoques, en particulier *S. aureus*, présentaient le taux d'isolement le plus élevé chez les patients atteints de conjonctivite, et il est prévu que Les cultures de SARM sont plus fréquentes dans les infections oculaires graves que les souches sensibles à la méthicilline. De plus, *S. aureus* est la deuxième cause d'endophtalmie postopératoire et la formation de biofilm peut jouer un rôle important dans une telle infection ( Heidari et al., 2018).

## 4. Traitements actuels et nouvelles approches thérapeutiques

Les biofilms causant des infections sont progressifs et, dans certains cas, peuvent devenir un problème chronique. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques pose un problème pour le traitement des patients atteints des dispositifs médicaux contaminés. Ainsi, de nombreuses recherches ont été menées à la recherche de stratégies alternatives pour prévenir et traiter les infections basées sur les biofilms (Khatoon et al., 2018).

- **Peptides antimicrobiens**

Elle représente l'une des stratégies qui se concentre sur le développement de composés antibactériens bactéricides. Au centre de cette approche se trouvent les PAM, dont la plupart fonctionnent en formant des pores dans la membrane bactérienne. Cependant, les PAM sont soumises à une série de mécanismes de résistance basés sur la fonction barrière de la matrice du biofilm en plus de mécanismes plus spécifiques, tels que les pompes à efflux et la répulsion des PAM. De plus, les staphylocoques ont appris à détecter la présence d'PAM au cours de leur co-évolution avec les humains et à réagir avec des contre-mesures efficaces (Otto, 2018).

- **La phagothérapie**

Les bactériophages, ou phages, sont des virus naturels qui infectent uniquement les bactéries sans endommager les cellules eucaryotes. Les phages lytiques infectent et se répliquent au sein d'une bactérie hôte spécifique, provoquant la mort de la cellule bactérienne et la libération d'un grand nombre de virions nouvellement assemblés qui peuvent attaquer plus de bactéries cibles, perpétuant le cycle aussi longtemps que des cellules cibles bactériennes vivantes sont présentes. Par conséquent, contrairement aux antibiotiques dont la concentration diminue en dessous de la surface des biofilms bactériens, les phages peuvent pénétrer dans les biofilms, ce qui les rend particulièrement utiles pour la gestion des maladies chroniques, infections bactériennes persistantes (Morris et al., 2019).

La phagothérapie constitue une des alternatives thérapeutiques suscitant actuellement le plus d'intérêt pour les Infections causées par *S.aureus* (Kolenda et al., 2019).

- **Destruction mécanique :**

La destruction mécanique du biofilm reste encore l'un des moyens les plus efficaces pour s'en débarrasser. Grâce à la création de forces de cisaillement, les bactéries se détachent de leur support et sont éliminées. Le nettoyage doit toujours être combiné à l'utilisation d'antibiotiques afin de détruire les potentielles cellules adhérentes restantes. Le traitement des infections liées à des dispositifs médicaux implantés reste cependant difficile et nécessite la plupart du temps de retirer entièrement le matériel afin de réduire le risque de récurrence infectieuse (Zimmerli et Moser, 2012).

- **Elaboration des Actinomycètes comme des nouveaux agents de lutte biologique contre la formation du biofilm par *S.aureus***

Il y a de plus en plus des recherches sur les biofilms visant à explorer comment les bactéries



contrôlent la formation biofilm et de découvrir des composés non toxiques qui peut atténuer la formation de biofilm sans permettre aux bactéries de développer une résistance (Xie et al., 2019). Au cours des dernières décennies, les actinomycètes ont été utilisés comme ressource pour la production de composés bioactifs. Les actinomycètes sont également de riches sources de diverses enzymes qui ont une importance industrielle et de nombreux composés bioactifs avec un large éventail de propriétés pharmaceutiques comme les antibiotiques, les antimicrobiens, les antibiotiques, etc (Gupta et al., 2019).

## 5. Généralité sur les actinomycètes

### 5.1. Définition

Le mot actinomycète dérive de mot grec « Aktis » qui veut dire rayon et « mykes » champignon (Prescott et al., 2013). Ils sont des bactéries filamenteuses à Gram positives dont la morphologie ressemble à celle d'un champignon (Tanvir et al., 2018).

Ces micro-organismes sont répandus dans la nature et peuvent se produire dans des environnements extrêmes. Ainsi, des groupes d'actinomycètes acidophiles et alcaliphiles, psychrophiles et thermophiles, halophiles et haloalcaliphiles et xérophiles ont été décrits (Meklat et al., 2011).

### 5.2. Taxonomie des actinomycètes

#### 5.2.1. Les critères actuels d'identification

##### 5.2.1.1. Critères Morphologique

Les caractères macromorphologiques et culturels des actinobactéries sont déterminés sur différents milieux de culture, ils contribuent dans la différenciation des genres d'actinobactéries (Kelly et Judd, 1976). Y compris la germination des spores, l'élongation et la ramification du mycélium végétatif, la formation du mycélium aérien, la couleur du mycélium aérien et du substrat et la production de pigments, ont été utilisées pour identifier les *Actinobacteria* (Prokopenko et al., 2019 ; Subhashini, 2018; Meklat et al., 2013).

##### 5.2.1.2. Critères chimio taxonomique

La chimie des constituants cellulaires des actinomycètes a joué un rôle de plus en plus important dans la taxonomie de ces bactéries ramifiées à Gram positif (Lechevalier et al., 1977). La composition de la paroi cellulaire, y compris les acides aminés (acide diaminopimelique et glycine), les sucres et les lipides tels que les acides mycoliques (Palla et al., 2018 ; Barka et al., 2016).

### 5.2.1.3. Critères Moléculaires

Base sur la biologie moléculaire vers le début des années 1980, donc les méthodes traditionnelles ont été remplacées par les techniques moléculaires qui reposent sur les analyses des : séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) (Kim et al., 2014), l'hybridation ADN-ADN (Mobolaji Felicia et Olubukola Oluranti, 2012), la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%) (Barka et al., 2016; Tanvir et al., 2018).

### 5.3. Habitat

Plusieurs études sur l'écologie des actinomycètes ont montré que ces micro-organismes sont répandus dans la nature et peuvent se produire dans des environnements extrêmes (Meklat et al., 2011).

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques (Tableau II) (Goodfellow et Williams, 1983). Elles peuvent être dans les sols, dans les eaux douces ou salines et dans l'air. Toutefois, elles sont particulièrement abondantes dans le sol, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques où elles constituent une part importante de la population microbienne (Loqman, 2009 ; Barka et al., 2016).

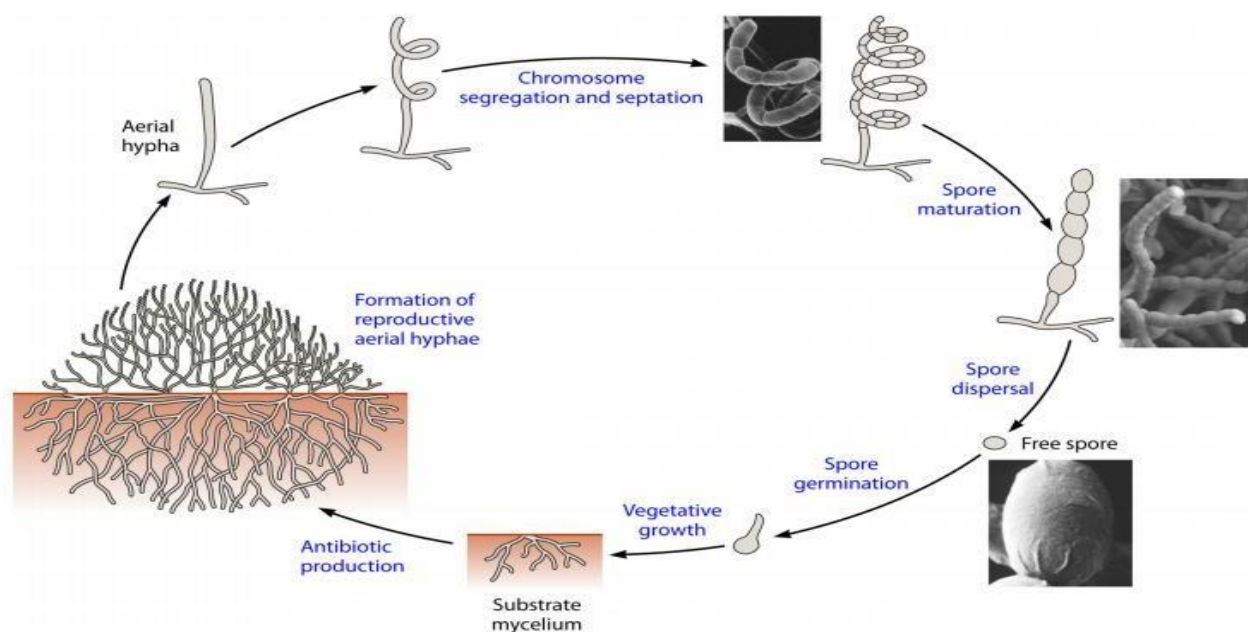
**Tableau II:** Répartitions des actinomycètes dans la nature (Goodfellow et Williams, 1983)

Genres	Habitat
Actinomadura	Sol
Actinoplanes Frankia	Sol, Eau, Litière végétale Nodules racinaires
Microbispora	Sol
Micromonospora	Sol, Eau
Nocardia	Sol, Eau
Rhodococcus	Sol, Eau, fumier, Litière végétale
Saccharomonospora	Matériaux auto-chauffants
Streptomyces	Sol, Eau, Litière végétale
Streptosporangium	Sol
Thermomonospora	Matériaux auto-chauffants

### 5.4. Cycle de développement

La Croissance végétative des Actinobactéries dans le sol favorisée par une faible humidité, en particulier lorsque les spores sont submergées dans l'eau. Dans les sols secs où la tension d'humidité est plus élevée, la croissance est très limitée et peut être interrompue. (Barka et al., 2015).

Le cycle de développement des *Streptomyces* débute par la germination des spores, il comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et enfin la croissance. Parfois, l'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*, puis le tube de germination croît et donne des hyphes non séptés et plurinucléés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide appelés le mycélium primaire de substrat ou végétatif. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien ou secondaire composé des hyphes dressés sur le mycélium de substrat, leurs extrémités se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées (**Figure 06**) (Hopwood et al., 1985 ; Van der Majj, 2017).



**Figure 06** : Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes à sporulation (Hopwood et al., 1985 ; Barka et al., 2016)

## 5.4. Importance des Actinomycètes

Les caractéristiques générales des actinomycètes sont connues depuis longtemps. Cependant, au cours des dernières années, il a été possible d'en apprendre d'avantage sur leurs multiples fonctions dans la nature (Amoroso et al., 2013).

### 5.4.1. Importance dans le domaine médical, vétérinaire et industriel

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs d'antibiotiques et de nombreux autres composés utiles comme les enzymes et les vitamines (Sanglier et al., 1993). Ils secrètent près de 70% des molécules antibiotiques d'origine microbienne. Parmi les antibiotiques d'origine actinomycétale, 75% sont produits par le seul genre *Streptomyces* (Watve et al., 2001).

Les antibiotiques secrétés par les actinomycètes sont utilisés comme agents antibactériens, antifongiques (de nombreuses molécules) ou antiviraux (nucléosides ... ect). Les actinomycètes produisent également des substances à propriétés antimotrices et Cytostatiques (anthracimycine , adriamycine) , antimitotiques , analgésiques, vasodilatateur ,inhibiteurs enzymatiques , immunostimulants et immunosuppresseurs (**Demain, 1999 ; Lee et al., 2016** ).

A cote de ces molécules , les actinomycètes produisent également des substances ayant des activités antiparasitaires telles que les antimalaria, les acaricides, les anticoccidiens (**Stapley et Woodruff, 1982 ;Lombardi et Crisanti, 1997 ; Chaudhary et al., 2013 ; Van der Maij et al., 2017**), les insecticides ,les pesticides ( antimycine A ) ( **Demain, 1999 ; Benhadj et al., 2018**).

Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux. Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux et des plantes, mais aussi dans l'alimentation (cas de la spiramycine) pour accroître les rendements zootechniques (**Schwarz et al., 2001**). Tous utilisées dans le contrôle de diverses maladies fongique d'arbre fruitiers et de légumes .ils sont également utilisés comme herbicides telles que la phosphinothricine (**Takahashi et al., 1995**).

Les enzymes sont après les antibiotiques les plus importants produits des actinomycètes. Certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (glucose isomérase) et dans celle des détergents (protéases). Certaines enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases) ou en biologie moléculaire (endonucleases de restriction) (**Prakash et al., 2013**).

Les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes après les antibiotiques comme : les protéases, les lipases, les cellulases, les amylases, les pectinases. Les domaines d'application enzymatiques sont très divers tel que dépollution (**Mehnaz et al., 2017 ;Tsujiro et al., 2003**).

Les actinomycètes sont non seulement une source riche d'enzymes, mais aussi une source d'inhibition d'enzymes. En effet en plus des nombreux antibiotiques produits (qui seront traités plus loin), les souches de ce genre secrètent d'autres substances intéressantes comprenant des enzymes (amylase, pectinase et cellulase) des inhibiteurs d'enzymes et des promoteurs de croissance utilisables comme additifs nutritionnels aux animaux (**Bischoff et al., 1981 ; Lazzarini et al., 2000**).

#### **5.4.2.Importance dans le domaine agronomique**

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans les phénomènes de biodégradation et de transformation de la matière organique. Ils peuvent dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries, tels que les polysaccharides des plantes (**Lechevaliers, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**) .Ils jouent par conséquent un rôle important dans la fertilité des sols. Grâce à un potentiel enzymatique riche (cellulases, amylases,

protéases et chitinases), les actinomycètes peuvent dégrader la biomasse et décomposer des déchets agricoles ou urbains (**Goodfellow et al., 1984 ; Van der Maij et al., 2017**).

### 5.4.3. Autres Importances

Les actinobactéries sont l'un des groupes dominants de micro-organismes qui produisent des métabolites secondaires d'importance industrielle. Une large gamme d'antibiotiques sur le marché est obtenue à partir d'actinobactéries. Des produits tels que des enzymes, des herbicides, des larvicides, des phytohormones et des tensioactifs sont produits par ces plusieurs genres d'actinobactéries, qui ont une grande valeur commerciale. Ils sont capables de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et leur potentiel métabolique offre un domaine de recherche important. Cependant, de nombreux genres rares d'actinobactéries n'ont été ni découverts dans des endroits inexplorés ni utilisés pour leur potentiel biotechnologique et industriel (**Ranjani et al., 2016 ; Selim et al., 2021**).

### 5.6. Activité anti biofilm des actinomycètes

Au regard des problèmes posés par les biofilms, différentes stratégies de lutte ont été envisagées et expérimentées dans les différents domaines concernés. Quel que soit le domaine, les stratégies adoptées visent 2 buts : d'une part prévenir l'adhésion des microorganismes et/ou éliminer ceux-ci, et ce, d'autre part, tout en prenant en compte la contrainte de limiter voire annihiler les effets adverses sur l'environnement et l'homme (**Alain Aka Kacou, 2019**).

Les bactéries présentes dans les biofilms sont plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules individuelles en suspension. A cause de ce type de résistance envers les agents antimicrobiens, il y'a en effet un besoin pour développer de nouvelles stratégies tuant efficacement les cellules pathogènes protégées en biofilms (**Kavanaugh et Ribbeck, 2012**).

De plus en plus des recherches sur les biofilms visent à explorer comment les bactéries contrôlent leur formation de biofilms et à découvrir des composés non toxiques qui peuvent atténuer la formation de biofilms sans permettre aux bactéries de développer une résistance aux médicaments (**Kim et al., 2012**).

Il existe différentes stratégies permettant d'inhiber la formation du biofilm (**Yang et al., 2012**). Celles-ci peuvent prévenir l'adhérence initiale du microorganisme, prévenir la croissance microbienne, empêcher la communication entre les cellules bactériennes, inhiber la synthèse de la matrice polymérique ou bien dégrader cette matrice. Le criblage à haut débit de banques de composés chimiques (naturels ou synthétiques) est utilisé afin d'identifier des produits capables

d'interférer avec la formation d'un biofilm ou capables de disperser un biofilm existant (**Landini et al., 2010**).

Les actinomycètes sont une source riche de substances bioactives, notamment des antibiotiques, des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes et des agents pharmacologiquement actifs (**Kim et al., 2012**). Récemment, certains Il a été rapporté que les espèces d'actinomycètes produisaient des inhibiteurs contre la formation de biofilm par *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (**Lee et al., 2012 ; Naik et al., 2013 ; Oja et al., 2015 ; Suzuki et al., 2015 ; Xie et al.,2019**).

MATERIEL  
ET  
METHODES

## 1. Présentation de lieu d'étude

Notre travail qui note sur l'étude de l'activité antibactérienne et antibiofilm des deux souches d'actinomycètes vis – à – vis de *Staphylococcus aureus* a été réalisé au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida, le laboratoire de recherche de la Microbiologie au niveau de l'école normale supérieure – KOUBA- et au niveau du Centre de Transfusion Sanguine de BLIDA -CTS- durant la période allant du 1 Avril 2021 jusqu'à 22 Juin 2021.

## 2. Matériel

### 2.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans notre étude (les appareillages, les verreries, les réactifs, les milieux de culture, les disques d'antibiotiques) est consigné en **Annexe I**.

### 2.2. Matériel biologique

#### ➤ Prélèvements

Un nombre total de 100 prélèvements ont été effectués au niveau du C.H.U de Blida respectivement dans les services suivants :

- Centre Anti-Cancer (C.A.C) :
- Service de Chirurgie générale.
- Service des Urgences Médicales-Chirurgicales(UMC).

Les prélèvements ont été effectués à partir de différentes origines en commençant par les surfaces du sol, des murs des blocs opératoires, les salles septiques et les salles de soin. D'autres prélèvements ont été aussi obtenus à partir du matériel médical (les portes seringues, les appareils d'anesthésie, les tables opératoires, les portoirs, les bistouris électriques, les chariots, les scopes, les électrochocs etc...) et le matériel d'hospitalisation à savoir les lits, les portes, les poignées de porte, les lavabos, les tables fixes et les chaises.

#### ➤ Les souches d'actinomycètes

Deux souches d'actinomycètes ont été utilisées pour l'extraction des molécules bioactives. La souche *Saccharothrix algeriensis* Sa233 isolée d'un échantillon de sol saharien d'une palmeraie à Adrar- Algérie (**Zitouni et al., 2004**) et la souche *Nocardiopsis sp* B18



isolée de sol non rhizosphérique dans la région de Ouargla (Meklat et al., 2020). Les deux souches ont été aimablement fournies par Pr MEKLAT.A.

### 3. Méthodes

#### 3.1. Isolement et identification des *Staphylococcus aureus*

##### 3.1.1. Prélèvement, mise en culture et purification

Les prélèvements ont été effectués dans des conditions d'asepsie, tout en respectant toutes les normes d'hygiène en portant des tenues vestimentaires jetables (tenue de bloc, calot, gants). Les prélèvements ont été effectués en humidifiant l'écouvillon avec quelques gouttes d'eau physiologique stérile à l'aide d'une seringue et en éliminant l'excès du liquide en pressant légèrement le coton sur la paroi du tube. Par la suite, nous avons frotté l'écouvillon sur la surface abiotiques (point de prélèvement) verticalement, horizontalement et en diagonale, pendant moins de 20 secondes. Une pression aussi forte que possible doit être appliquée et l'écouvillon doit être retourné. À la fin, nous avons introduit l'écouvillon délicatement dans son tube. Les prélèvements ont été ensuite acheminés directement au laboratoire dans une glacière et maintenues à 4C jusqu'à leurs utilisation.

Après enrichissement dans des tubes contenant 5ml de bouillon nutritif ou Bouillon cœur cervelle (B.H.I.B) (Annexe II ) et incubation pendant 24h à 37°C, l'ensemencement a été effectué à l'aide d'une anse en platine ou une pipette Pasteur par des stries serrées à la surface des milieux Chapman (Annexe II) solides en faisant tourner la boîte à chaque fois et incubées pendant 24 h à 37 °C.

La purification des colonies bactériennes a été effectuée par réisolement sur le même milieu sélectif afin d'obtenir des souches pures pour entamer l'identification. Les colonies sont repérées selon leurs aspects et leurs morphologies.

##### 3.1.2. Identification des souches bactériennes isolées

Pour identifier les souches bactériennes, plusieurs étapes ont été réalisées à travers les changements qui se produisent dans le milieu de culture vers l'observation au microscope optique ainsi que l'interaction des bactéries avec les réactifs utilisés.

## A. Identification macroscopique

L'identification macroscopique est la première étape dans l'identification des souches bactériennes en lisant les résultats sur les différents milieux de culture utilisés après 24h de culture. Cette dernière est basée sur la forme des colonies, les bordures, la couleur, le relief et la taille des colonies bactériennes qui caractérisent la souche.

## B. Identification microscopique

### B. 1. Coloration de GRAM

C'est la coloration de référence en bactériologie (Denis, 2011). La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique sur des cultures jeunes de moins de 24h. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame propre et fixé à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène. Après fixation, des solutions de violet de Gentiane et de lugol ont été respectivement appliquées sur le frottis, qui ensuite a été traité avec, la fushine pendant 30 secondes. Le frottis a été observé sous microscopique avec l'ajout de l'huile à immersion au grossissement X100. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positifs (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram négatifs (-).

### B. 2 Test de la Catalase

Ce test a pour but de différencier les bactéries à Gram positive. Les bactéries des genres *Staphylococcus* ont une catalase positive tandis que les bactéries des genres *Enterococcus*, *Streptococcus*, possèdent une catalase négative.

La catalase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxydoréductase) est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, selon la réaction suivante ( Vainshtein *et al.*, 1981) :



#### ➤ Technique :

Une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> placée sur une lame propre et mise en contact avec une colonie isolée prise directement avec une pipette pasteur ou une anse de platine.

➤ **Lecture :**

- S'il y a la formation des bulles d'air, les bactéries ont une enzyme catalase.
- Si rien n'est observé, la bactérie n'a pas d'enzyme catalase.

### **B. 3. Test de la Coagulase :**

Le test de la coagulase différencie les souches de *Staphylococcus aureus* des autres espèces à coagulase négative (SCN). Ce test est valable uniquement pour les bactéries à Gram positives ressemblant à des *Staphylocoques* car certains bacilles à Gram négatifs, tels que *Pseudomonas*, peuvent provoquer une réaction faussement positive. Le mécanisme de coagulation dans ces organismes n'est pas dû à la coagulase.

➤ **Technique :**

Avec une anse de platine, les tubes étiquetés appropriés de plasma ont étéensemencés avec quelques colonies ressemblant à des *Staphylocoques*. Les tubes bien fermés ont été par la suite incubés à 37 °C approximativement entre 30 minutes à 24 H.

### **B. 4. Identification Biochimiques :**

Sur le plan pratique, l'identification de *Staphylococcus aureus* est obtenue à l'aide de la galerie Api 20 Staph de Bio Mérieux (**Lecuire et al., 2007**).

API Staph est un système standardisé conçu, dans les années 1980, permettant d'identifier 20 espèces et sous espèces de *Staphylococcus*. La galerie est composée de 20 microtubes, surmontés de cupules, contenant des substrats déshydratés qui permettent de réaliser dix-neuf tests biochimiques correspondant au métabolisme respiratoire, glucidique et protéique des bactéries (**Le loir et al., 2010**).

➤ **Technique :**

- A partir d'une culture pure de *Staphylococcus*, de 18 à 24h d'incubation sur milieu Chapman (**Annexe II**), préparer une suspension bactérienne homogène, d'opacité égale à 0.5 Mac Farland, dans une ampoule de milieu APIStaph Medium.
- Remplir le support de la galerie par quelques gouttes d'eau pour créer une atmosphère humide et met le couvercle par-dessus.
- A l'aide d'une pipette pasteur stérile déposer la suspension bactérienne dans chacun des tubules de la galerie. Pour éviter la formation des bulles d'air au fond des tubes,

poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE, en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine ensuite renfermer la boîte d'incubation et incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- La plaque ensuite est incubé à 37°C pendant 18-24h.

Le rouge phénol, indicateur de pH, vire au jaune en présence des acides produits par l'utilisation des différents sucres testés. Dans le cas contraire in conserve sa couleur initiale.

#### ➤ Lecture de la galerie

- Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :
  - Test VP : VP 1 et VP 2. Attendre 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.
  - Test NIT : NIT 1 et NIT 2. Attendre 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.
  - Test PAL : ZYM A et ZYM B. Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive. Une couleur beige-rosé ou violet très pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.
- Noter les résultats sur la fiche de résultats

### 3.2. Etude de la sensibilité des souches de *S.aureus* isolées aux antibiotiques

Ce test permet de mettre en évidence la résistance des bactéries vis à vis de différents antibiotiques. L'antibiogramme des souches isolées a été effectué par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton (**Annexe II**) à partir des disques d'antibiotiques selon les normes préconisées par le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Des disques d'antibiotique sont placés et pressés en utilisant une pince bactériologique stérile sur la gélose préalablementensemencée partir d'un inoculum homogène de *Staphylococcus aureus* d'opacité égale à 0.5 MF. Il est préférable de ne pas

mettre plus de 6 disques dans la boîte. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Les zones d'inhibition autour des disques fournissent des informations sur la résistance des microorganismes testés. Ce test permet de classer la souche en trois catégories possibles : sensible, intermédiaire ou résistance (Fritz *et al.*, 2004 ; Ministère de la Santé, 2020).

### 3.3. Sélection des souches de *S.aureus* formatrices du biofilm

#### 3.3.1. Détection de la formation de biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

Cette technique qualitative consiste à l'ensemencement des souches testées pour leurs capacité à produire un biofilm sur milieu Rouge Congo (Annexe II) (Chaieb *et al.*, 2005 ; Hassan *et al.*, 2011 ; Touati *et al.*, 2007). C'est une méthode indirecte qui permet de distinguer entre les souches productrices de slime de celles qui n'en produisent pas, en se basant sur la composition de la couleur de leurs colonies.

Une goutte d'une suspension de souche test (une colonie dans 20 ml d'eau distillée) est ensemencée par stries à l'aide d'une anse stérile en surface du milieu Rouge Congo coulé en boîtes Pétri. La lecture est faite après une nuit d'incubation à 37°C. Les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr *et al.*, 2012).

#### 3.3.2. Détection de la formation de biofilm par la méthode Tissue Culture Plate (TCP)

Le pouvoir de production de biofilm *in vitro* par les isolats de Staphylocoque a été déterminé suivant la méthode de Cucarella *et al.*, (2001), avec des modifications minimales. C'est une technique quantitative décrite par Christensen et son groupe en 1985 permet une détermination quantitatif du biofilm formé en mesurant la densité optique reliée au colorant présent dans le biofilm (Musk *et al.*, 2005 ; Hassan *et al.*, 2011).

Après culture des souches bactériennes dans le Bouillon Tryptone Soja (TSB) supplémenté à 2,5% de glucose (TSBG) (Annexe II) et incubation pendant 18h à 37°C, les puits de deux colonnes (deux essais) d'une plaque de microtitration 96 ont ensuite été remplis

de 0,2 ml de cette dilution et incubés à 37°C. Les puits ont été lavés 3 fois avec de l'eau distillée, séchés en position inversée et colorés avec une solution de cristal violet à 0,2% (**Annexe II**). Les cellules adhérentes ont été remises en suspension dans une solution d'éthanol à 95 % et l'absorbance a été mesurée à 620 nm en utilisant un lecteur automatique ELISA (**Kara Terki et al., 2020**)

- **lecture**

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO du témoin, les souches ont été classées comme suit (**Stepanovic et al., 2000 ; Hola et Ruzicka, 2011**):

$DO \leq DO_t(\text{Témoin})$  : non formatrice du biofilm ;

$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$  : Modérée ;

$DO_t \times 4 \leq DO$  : Fortement formatrice du biofilm (**Christensen et al., 1985**).

### 3.4. Conservation des souches

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose nutritive (**Annexe II**) inclinés à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

### 3.5. Production et extraction des molécules bioactives à partir des souches d'actinomycètes

#### A. Préparation des Pré-cultures

Après revivification des deux souches d'actinomycètes (B18 et Sa 233), 50 ml du bouillon ISP2 (two International Streptomyces Project) (**Annexe II**) ont été préparés dans des Erlenmeyers de 250 ml. Quelques colonies ont été prélevées etensemencées dans chaque Erlenmeyer. Ces derniers ont été ensuite cultivés à 30 ° C pendant 3 jours (72h) dans un agitateur rotatif ou Shaker (250 rpm / min) (**figure 07**) (**Driche et al., 2017**).



**Figure 07 :** Préparation de la Pré-culture des souches S233 et B18.

### **B. Production des métabolites par les souches d'actinomycètes**

Après 3 jours d'incubation, un volume de 1 ml est prélevé à l'aide d'une micropipette et versé dans 4 erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de bouillon ISP2 pour chaque souche. Ces nouvelles cultures sont également incubées pendant 5 jours à 30°C dans un agitateur rotatif (**Figure 08**) (**Driche *et al.*, 2017**).



**Figure 08 :** Production du métabolite par les deux souches d'actinomycètes .

### **C. Extraction des molécules bioactives**

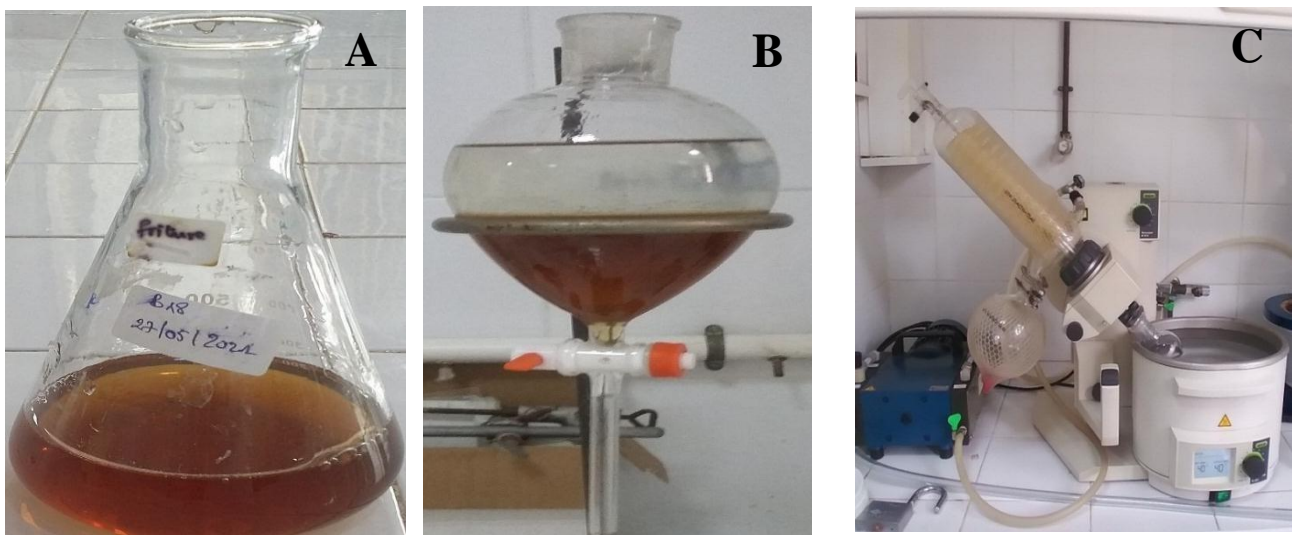
Après 5 jours d'incubation, les cultures sont centrifugées à 5000 rpm pendant 15 min à température ambiante. Le mycélium ou la biomasse présente dans le culot est éliminée. Un volume de 5 ml est prélevé à l'aide d'une seringue stérile et filtré à l'aide d'un filtre de 0.22µM. Le filtrat obtenu est conservé à l'abri de la lumière à une température

de 4°C pour être utilisé ultérieurement afin de tester l'activité antibactérienne et antibiofilm vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées (**figure 09 –A-**).

- **Extraction à partir du surnageant :**

Différents solvants non miscibles à l'eau sont testés afin de déterminer le ou les solvants capables de dissoudre les produits actifs présents dans le surnageant de chaque culture. Les solvants testés sont : l'acétate d'éthyle et le Dichlorométhane (**Annexe II**)

La quantité de surnageant obtenue pour chaque culture est divisée en deux. Le volume du solvant ajouté est le même que celui de la fraction du surnageant. Après séparation des phases dans des ampoules à décanter, les phases organiques obtenues pour chaque souche ont été concentrées par évaporation en utilisant un rotavapeur sous une hotte à température ambiante, jusqu'à l'obtention de 1/4 du volume initiale (**figure 09 –B- et –C-**).



**Figure 09 :** Technique d'extraction des molécules bioactives (**Original**).

A- Récupération du surnageant après la centrifugation B- Dissoute des produits actifs présents dans le surnageant dans l'acétate d'éthyle et le Dichlorométhane C- Extraction des produits actifs à sec en utilisant un Rotavapeur

### **3.6. Effet du méthanol à différentes concentrations sur la croissance des souches de *Staphylococcus aureus***



Pour la solubilisation de l'extrait brut obtenu, le méthanol était le solvant du choix, pour cela un test de l'effet de ce dernier sur le développement et la croissance des souches bactériennes a été effectué. Le principe de la techniques est basé sur l'ajout des concentrations croissantes de ce solvant dans des tubes inoculés et de définir la plus grande concentration qui n'altère pas les souches bactériennes.

➤ **Technique :**

**1-** dans un tube stérile on ajoute 20 ml d'eau physiologique ensuite on introduit des colonies jusqu'à ce que la charge bactérienne est équivalente à 0.5 MFC.

**2-** Préparation des concentrations

- Dans le tube N° 01 on ajoute respectivement 1980 µL de la suspension mère préparée avec 20µl de méthanol.
- Dans le tube N° 02 on ajoute respectivement 1960 µL suspension mère préparée avec 40µl de méthanol.
- Dans le tube N° 03 on ajoute respectivement 1940 µL suspension mère préparée avec 60µl de méthanol.
- Dans le tube N° 04 on ajoute respectivement 1920 µL suspension mère préparée avec 80µl de méthanol.
- Dans le tube N° 05 on ajoute respectivement 1900 µL suspension mère préparée avec 100µl de méthanol.
- Dans le tube N° 06 on ajoute respectivement 1880 µL suspension mère préparée avec 120µl de méthanol.

**3-** Répéter la technique pour toutes les souches avec les mêmes étapes.

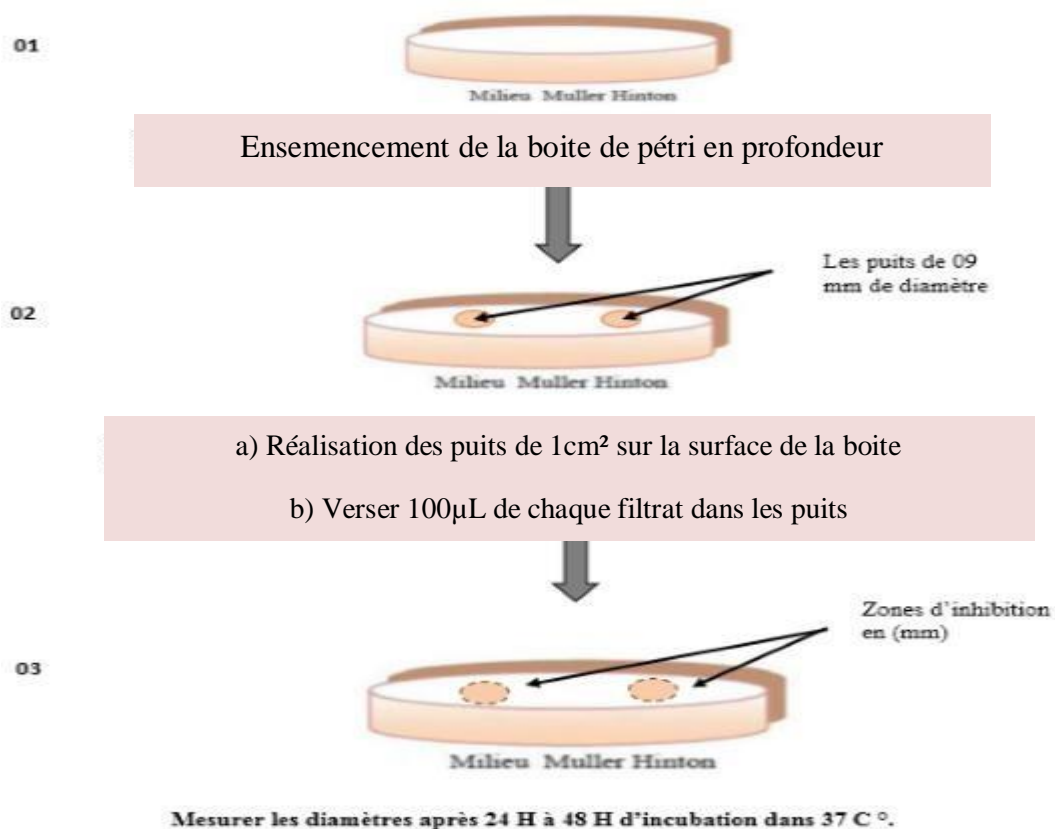
**4-**incuber les tubes pendant 24 H à 37 C°.

**5-** Après incubation, la détection de l'effet du méthanol sur la croissance bactérienne est révélée par l'observation de trouble qui signifie la présence des bactéries vivantes. Une observation microscopique à l'état frais du mélange a été également réalisée pour confirmer le résultat. L'absence de trouble correspond à la mort des bactéries ce qui nous renseigne l'absence de *Staphylococcus aureus* donc il s'agit de la concentration létale du méthanol.

D'après les résultats de cet essai, la concentration de 80  $\mu\text{l}$  a été choisie pour la solubilisation de l'extrait obtenu dans le tube. La préparation de la microplaque vers la suite exige des volumes minimes en raison de son incapacité d'être remplis avec un volume assez élevé, donc le volume de 80  $\mu\text{l}$  était réduit vers 8  $\mu\text{L}$  dans les microplaques.

### 3.7. Evaluation de l'activité antibactérienne du filtrat vis-à-vis des souches de *S.aureus*

Les filtrats obtenus ont fait l'objet d'un test d'antagonisme visant à tester leur activité antibactérienne vis-à-vis de huit souches cibles de *S. aureus* préalablement ensemencés en profondeur sur milieu Mueller Hinton (**Annexe II**) à raison de  $10^7$  UFC /ml en utilisant la méthode des puits (**Figure10**). Un volume de 100  $\mu\text{l}$  de chaque filtrat est introduit dans les puits de 1cm<sup>2</sup> de diamètre. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives puis incubées à 37°C pendant 48 h. La lecture des résultats est faite en mesurant le diamètre des zones d'inhibition exprimées en millimètre autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse (**Meklat et al., 2020**).



**Figure 10** : Etude de l'activité antagoniste des Filtrats par test des puits (**Original**).

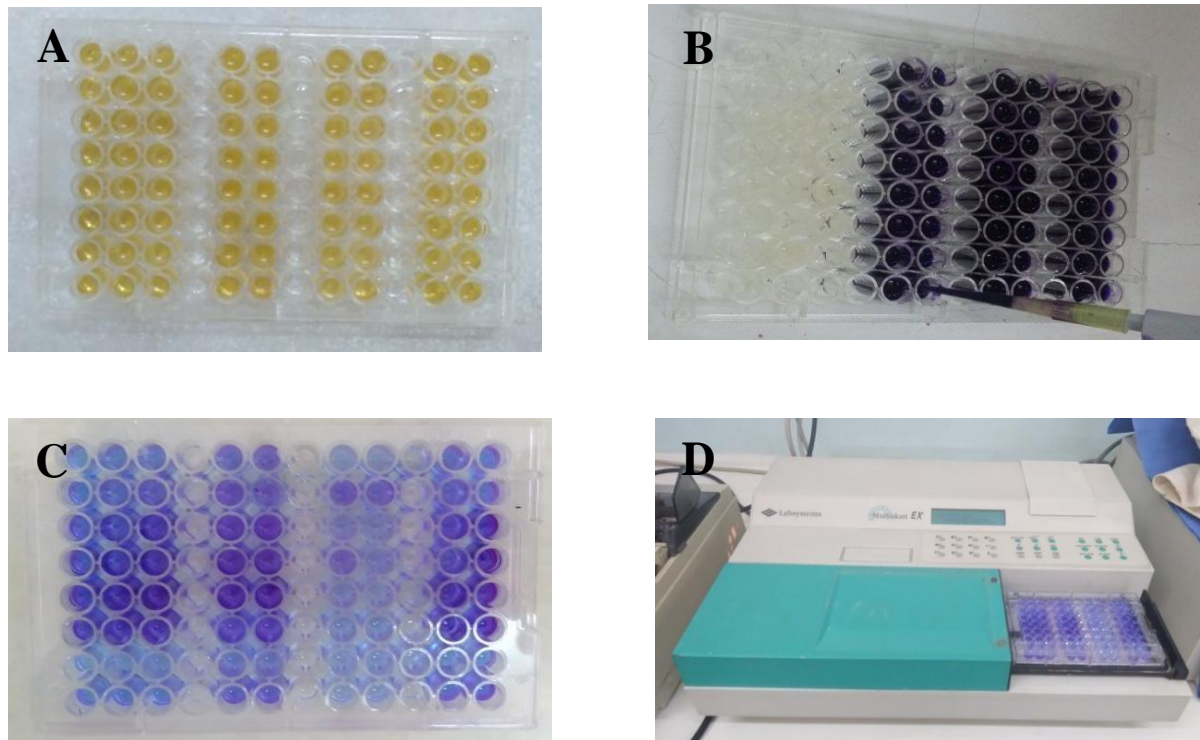
### 3.8. Evaluation de l'activité anti biofilm des deux filtrats des actinomycètes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

La détection de l'activité anti biofilm par le filtrat des 02 souches d' actinomycètes (B18 et Sa 233) a été réalisée en adoptant la Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) en utilisant une microplaque à fond plat contenant 96 puits (**Driche et al .,2017**) . Elle est réalisée comme suit :

**Jour 1 :** Les souches ont été inoculées dans 10 ml de TSB supplémenté à 2,5% de glucose (TSBG) (**Annexe II**) puis les suspensions ont été incubées à 37 °C sous agitation.

**Jour 2 :** Les cultures d'une nuit ont été diluées à une DO (600 nm) de 0,1 ( $\approx 10^8$  UFC/ml) dans le même milieu. Puis un volume de 150 $\mu$ L de suspensions bactériennes a été ajouté à chaque puits d'une plaque de polystyrène à 96 puits. Un volume de 50 $\mu$ L du filtrat est réparti dans une rangée de cupules contenant la suspension bactérienne. Une rangée contenant uniquement du milieu ISP2 est utilisée comme témoin négatif et un autre contenant du TSBG + l'inoculum sans filtrat est utilisé comme témoin positif. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24h.

**Jour 3 :** Après incubation à 37 °C pendant 24 h, le biofilm formé dans les puits a été lavé trois fois avec 350  $\mu$ L d'eau distillée stérile. Les cellules attachées (biofilm) ont été fixées par chauffage à 60°C pendant 45 min, puis séchés, et les puits ont été colorés avec 200  $\mu$ L de cristal violet à 0,2% (CV), et incubé à température ambiante pendant 15 min, par la suite les plaques ont été lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile pour enlever la tache non absorbée. Pour la quantification de l'activité antibiofilm, les cellules adhérentes de bactéries associées au cristal violet ont été solubilisées en ajoutant un volume de 150 $\mu$ l d'une solution d'éthanol à 95% pour libérer le colorant fixé au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé et l'absorbance a été enregistrée à 620 nm en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.



**Figure 11** : Test d'activité antibiofilm des 2 filtrats par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque pour les souches de *S. aureus* (Original)

- a) Lavage de microplaque après incubation de 24 H à 37C° avec 350µl d'eau distille (3 fois).
- b) Remplissage des puits par 200 µl de cristal violet.
- c) Lavage avec l'eau distillée et l'ajout de 150 µL d'éthanol à 95%.
- d) La lecture par lecteur de microplaque (ELISA).

- **Lecture**

La détection de l'effet inhibiteur du biofilms des deux filtrats issus des deux souches actinomycétales Sa233 et B18 a été déterminée en enregistrant la densité optique (DO) à une absorbances à 620 nm chez le biofilm simple (biofilm formé sans la présence du filtrat) puis comparée au absorbances enregistrées chez le biofilm produit en présence du filtrat à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biotek ) en utilisant une microplaque à 96 puits. Toutes les expériences de biofilm ont été répétées deux fois.

Selon **Obeizi et al (2020)**, le taux d'inhibition du biofilm a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'inhibition du biofilm \%} = (DO \text{ control positive} - DO \text{ Concentration test}) / (DO \text{ Control positive}) \times 100$$

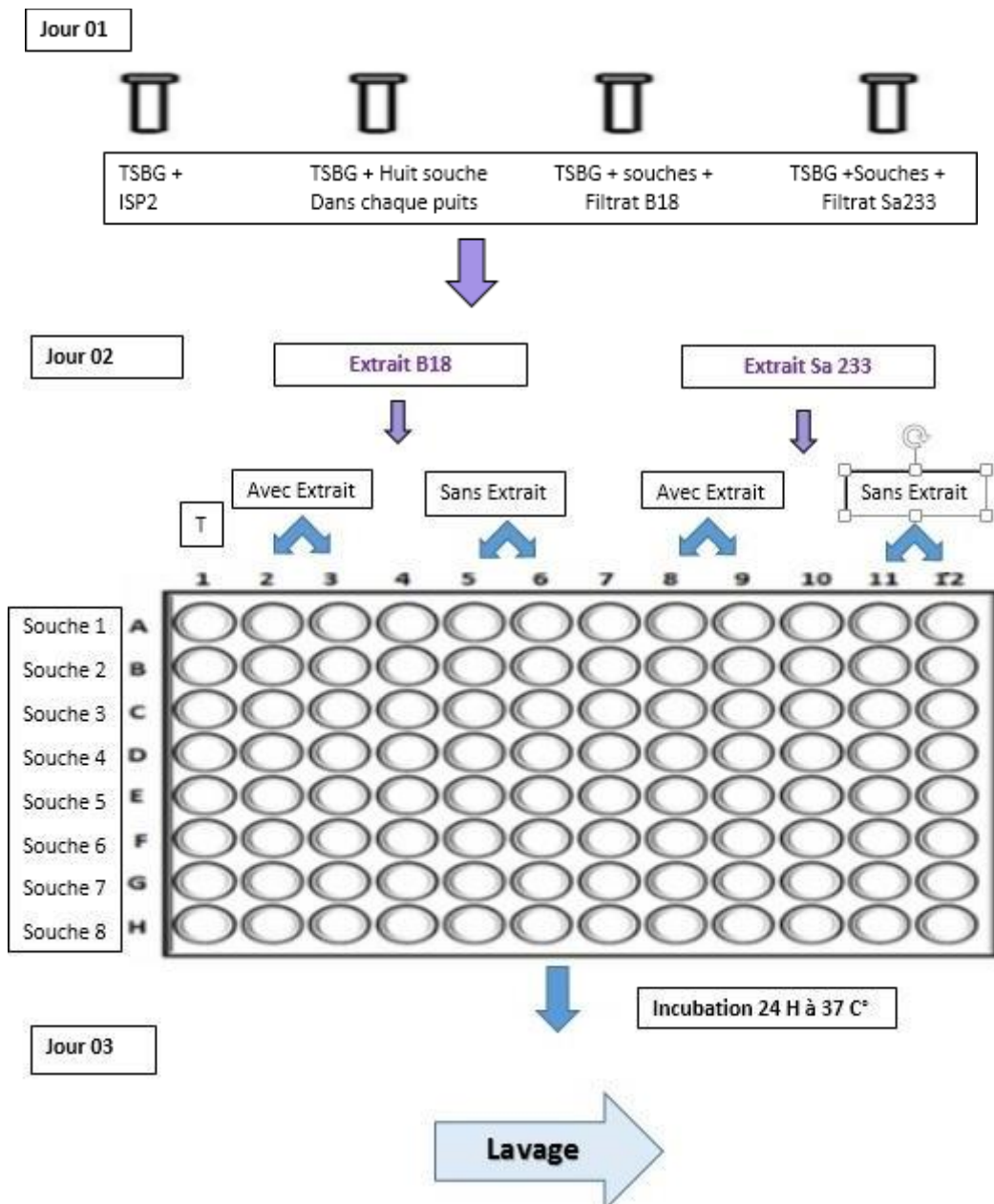
### 3.9. Evaluation de l'activité anti biofilm des deux extraits bruts des actinomycètes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* :

La détection de l'activité antibiofilm est réalisé en plusieurs étapes selon un protocole bien établi en adoptant la Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) en utilisant des microplaques á fond plat contenant 96 puits . Le test utilisé est basé sur la formation de biofilm à l'interface solide-liquide et par l'addition de l'extrait brut à une concentration de 157,5 g/ml pour l'extrait Sa233 et une concentration de 205g/ml pour l'extrait B18 qui pourraient éventuellement avoir un effet antibiofilm (**Driche et al., 2017**).

**Jour 1 :** Les souches ont été inoculées dans 10 ml de TSB supplémenté à 2,5% de glucose (TSBG) puis les suspensions ont été incubées à 37 °C sans agitation.

**Jour 2 :** Les cultures de nuit ont été diluées à DO 600 nm ( $\approx 108 \dots$  UFC/ml) dans le même milieu, puis un volume de 150 $\mu$ L de suspensions bactériennes ont été ajoutés à chaque puits d'une plaque de polystyrène à 96 puits. Les deux extraits dissouts dans le volume de 8  $\mu$ l de méthanol a été préparée et réparties dans une rangée de cupules contenant la suspension bactérienne. Une rangée contenant uniquement du méthanol est utilisée comme contrôle négatif et un autre contenant du TSBG + l'inoculum sans extrait brut est utilisée comme contrôle positif. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24h.

**Jour 3 :** Après incubation à 37 °C pendant 24 h, le biofilm formé dans les puits a été lavé trois fois avec 350  $\mu$ L d'eau distillée stérile. Les cellules attachées (biofilm) ont été fixées par chauffage à 60°C pendant 45 min, puis séchés, et les puits ont été colorés avec 200  $\mu$ L de cristal violet (CV) à 0,2%, et incubé à température ambiante pendant 15 min après quoi, les plaques ont été lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile pour enlever la tache non absorbée. Pour la quantification de l'activité antibiofilm, les cellules adhérentes de bactéries associées au cristal violet ont été solubilisées en ajoutant un volume de 150 $\mu$ l d'une solution d'éthanol à 95% a été ajouté pour libérer le colorant fixé au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé et l'absorbance a été enregistrée à 620 nm en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.



**Figure 12** : Schéma explicatif de l'activité anti biofilm de l'extrait brut des actinomycètes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (Original).

- **Lecture**

La détection de l'effet inhibiteur du biofilms des deux extraits issus des deux souches actinomycétales Sa233 et B18 a été déterminée en enregistrant la densité optique (DO) ou les absorbances à 620 nm chez le biofilm simple (biofilm formé sans la présence d'extrait) puis comparée au absorbances enregistrées chez le biofilm produit en présence d'extrait à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biotek©) en utilisant t une microplaque à 96 puits. Toutes les expériences de biofilm ont été répétées deux fois.

Selon **Obeizi *et al* (2020)**, le taux d'inhibition du biofilm a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'inhibition du biofilm \%} = \frac{(\text{DO control positive} - \text{DO Concentration test})}{(\text{DO Control positive})} \times 100$$

RESULTATS  
ET  
DISCUSSION

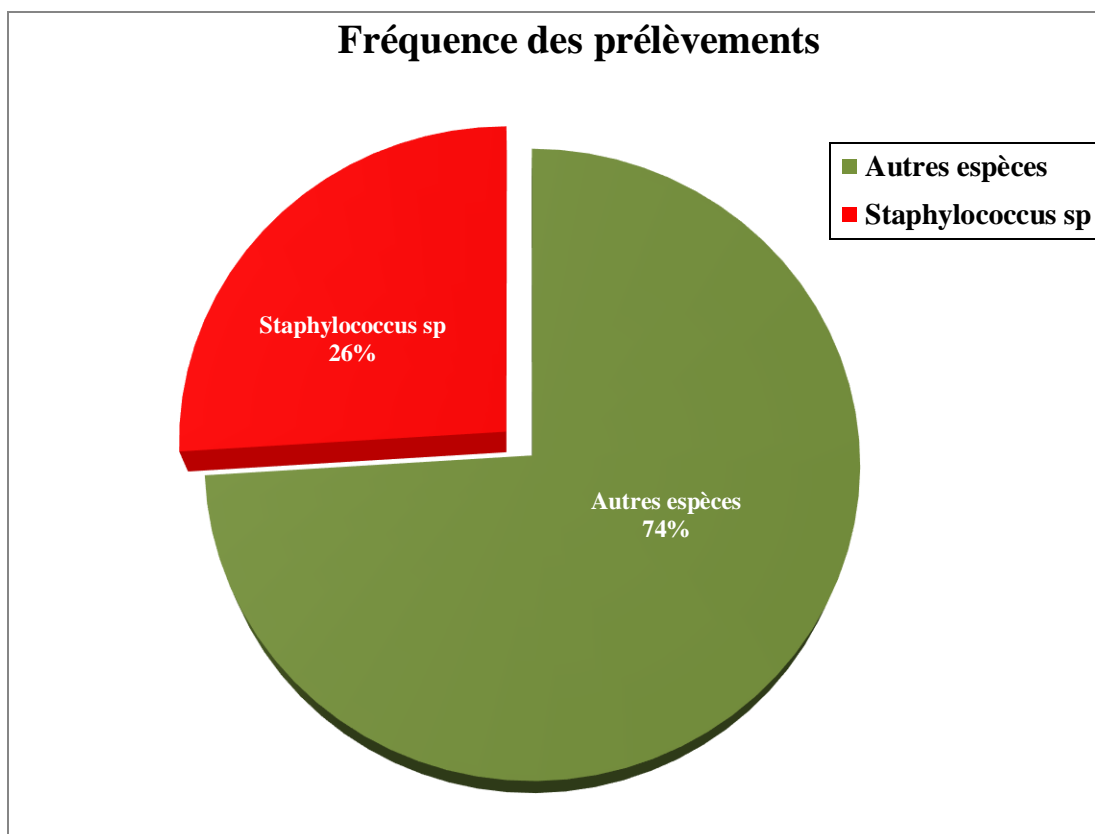


## I. Résultats

### 1.1. Fréquence des prélèvements

Dans total de (100) prélèvements, 98 étaient positifs. Parmi les 98 prélèvements positifs, 25 (26%) souches de *Staphylococcus* sp ont été isolées dont 8 (7%) souches possèdent une coagulase positive et font partie de l'espèce *S.aureus*. Le reste des souches sont tous des Staphylocoque à une coagulase négative.

Bien que 98% des prélèvements ont donné naissance à un trouble visible, ces souches présentant des caractères différents et n'appartiennent pas au genre recherché ont été écartés de notre travail (**figure 13**).



**Figure 13** : Fréquence des prélèvements

### 1.2. Répartition des souches selon le site de prélèvement

Nos prélèvements ont concerné différents sites dans le bloc opératoire, le service post-opératoire et les salles de réveil en trois services :

Service des urgences Medicaux-Chirurgicales (UMC), service de la chirurgie générale et le Centre Anti-Cancer (C.A.C).

Trois souches ont été isolées à partir des différents prélèvements des UMC, alors que cinq souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolées dans le service de la chirurgie générale, dont leurs répartitions sont mentionnées dans le **tableau III**.

Il est à noter que durant notre étude, aucune souche de *Staphylococcus aureus* n'a été isolée dans le service C.A.C, ni Staphylocoque à coagulase négative.

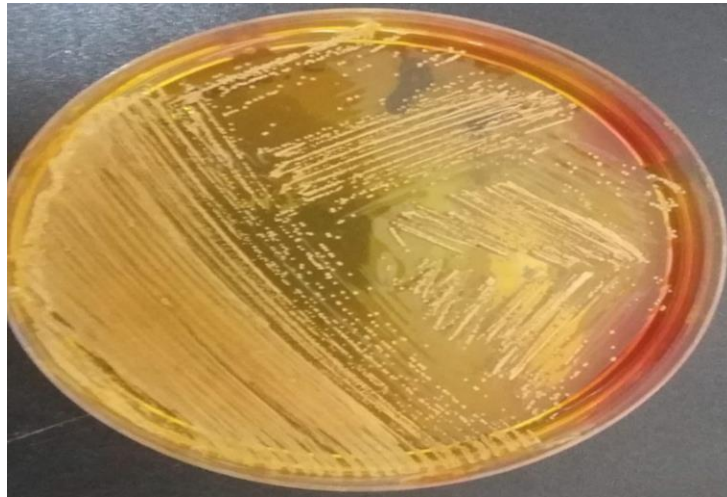
**Tableau III:** Répartition des souches de *S.aureus* selon les sites des prélèvements.

Site de prélèvement	Service des UMC	Service de la Chirurgie générale	Centre Anti-Cancer
Sol	1	1	0
Mur	0	1	0
Porte	1	0	0
Portoir	1	1	0
Lit	0	1	0
Chaise	0	1	0

## 2. Identification des souches isolées

### 2.1. Etude macroscopique

Sur le milieu Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique du genre Staphylocoques et le développement bactérien ne constitue qu'une indication des Staphylocoques, d'autres bactéries (entérocoques) peuvent s'y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus aureus* sont apparues souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune due à la fermentation du Mannitol contenant dans le milieu. Les colonies sont arrondies, à bords réguliers de 1-2mm de diamètre après 18-24h d'incubation à 37°C (**Figure 14**).

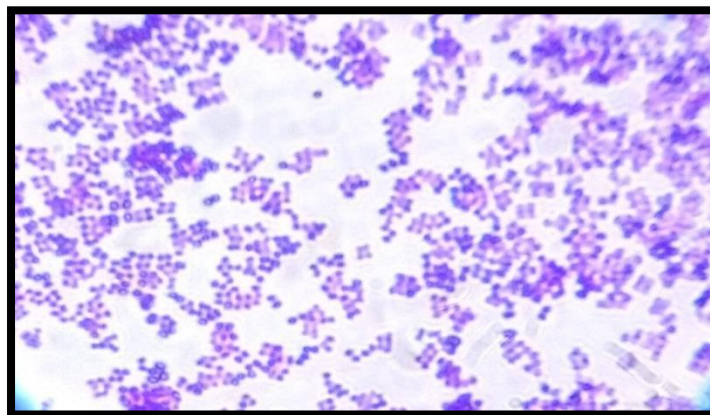


**Figure 14** : Aspect macroscopique de *S.aureus* sur le milieu Chapman (**Original**).

D'après **Chapman (1945)**, la gélose de Chapman ou gélose au sel de mannitol est un milieu de culture sélectif utilisé pour la sélection des bactéries halophiles, et plus particulièrement de celles qui fermentent le mannitol. Il est plus particulièrement utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus*. Il contient une forte concentration (environ 7,5 à 10 %) de sel (NaCl), ce qui le rend sélectif pour la plupart des bactéries Gram-négatives et certaines bactéries Gram-positives. C'est également un milieu différentiel pour les staphylocoques fermentant le mannitol, contenant du mannitol glucidique et du rouge de phénol, un indicateur de pH pour détecter l'acide produit par les staphylocoques fermentant le mannitol.

## 2.2. Etude microscopique

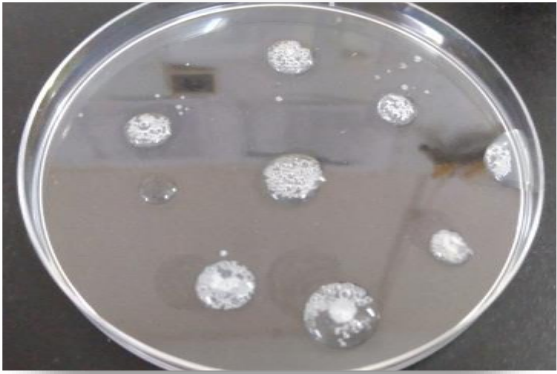

La coloration de GRAM pour les 8 souches isolées a permis de mettre en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, en paires et colorés en violet (**Figure 15**).



**Figure 15** : Coloration de GRAM des cellules Staphylococciques.

### 2.3. Identification biochimique des souches :

**Tableau IV** : Résultats de l'identification biochimiques des souches isolées

Test de catalase	Test de coagulase
<p>Toutes les souches isolées, testées par la production de la Catalase, ont décomposé le substrat (eau oxygéné) en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz.</p>	<p>Pendant les premières heures de l'expérience, la coagulation du plasma sanguin est formée dans le tube qui contient des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i>, indiquant la sécrétion de l'enzyme coagulase par cette dernière alors nous disons coagulase positif.</p>
	

#### ❖ Identification biochimique par le système API

Les résultats de la galerie d'identification des staphylocoques montrent que ces bactéries fermentent la plupart des sucres, en particulier le mannitol, tandis que nous constatons le contraire par rapport au xylitol et à la mélibiose et aussi le raffinose et xylose. Ils réduisent également les nitrates aux nitrites et produisent la phosphatase alcaline et l'acétyle méthyl-carbinol de Vogues Proskauer.

L'identification biochimique par le profile numérique de sept chiffres 6736152 extraite de la galerie représente une similitude de 97.8 % de la somme des pourcentages des tests positifs sur leur nombre total, ce qui indique que la bactérie est *Staphylococcus aureus*. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau V (Annexe III)**.

## Tests négatifs



## Tests positifs



### 3. Etude de la sensibilité des souches de *S.aureus* aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches *S. aureus* montre un taux de résistance important vis-à-vis la plupart des antibiotiques utilisés dont 6 étaient des SARM. Selon le **tableau VI**, nous constatons que 6 souches (S1, S2, S3, S4, S7 et S8) sont résistantes au méthicilline SARM ou MRSA, alors que la S5 et S6 sont sensibles à la méthicilline SASM ou MSSA.

D'après le **ministère de la santé (2020)**, la céfoxitine détecte la résistance à la méthicilline. Actuellement, la céfoxitine et le moxalactam ont prouvé leur supériorité (plus sensibles et plus spécifiques) par rapport à l'oxacilline. Ces deux molécules s'utilisent à 37°C en milieu MH normal avec tous les autres antibiotiques. Elles permettent en plus de bien distinguer les Staphylocoques méti-R des méti-S (absence de zone d'inhibition). Les résultats de l'antibiogramme sont montrés dans le **tableau VI** et la **figure 16**.

Tableau VI : Résultats de l'antibiogramme

	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5	Souche 6	Souche 7	Souche 8
<b>TE (30 µg)</b>	R	R	R	R	S	R	R	R
<b>FA (10 µg)</b>	S	R	R	R	S	S	R	S
<b>GEN (10 µg)</b>	S	R	R	R	S	S	R	S
<b>FOX (30µg)</b>	R	R	R	R	S	S	R	R
<b>AK (30µg)</b>	S	R	R	R	S	S	R	S
<b>P (10µg)</b>	R	R	R	R	S	R	R	R
<b>E (15 µg)</b>	I	S	S	I	S	S	S	R
<b>C (30µg)</b>	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>RIF (30µg)</b>	S	S	S	S	S	S	S	S

RIF : rifampicine / C : Chloramphénicol / E : Erythromycine / FA : Acide Fusidique / P : Pénicilline G

GEN : Gentamicine / FOX : Céfoxitine / TE : Tétracycline/ AK : Amikacine

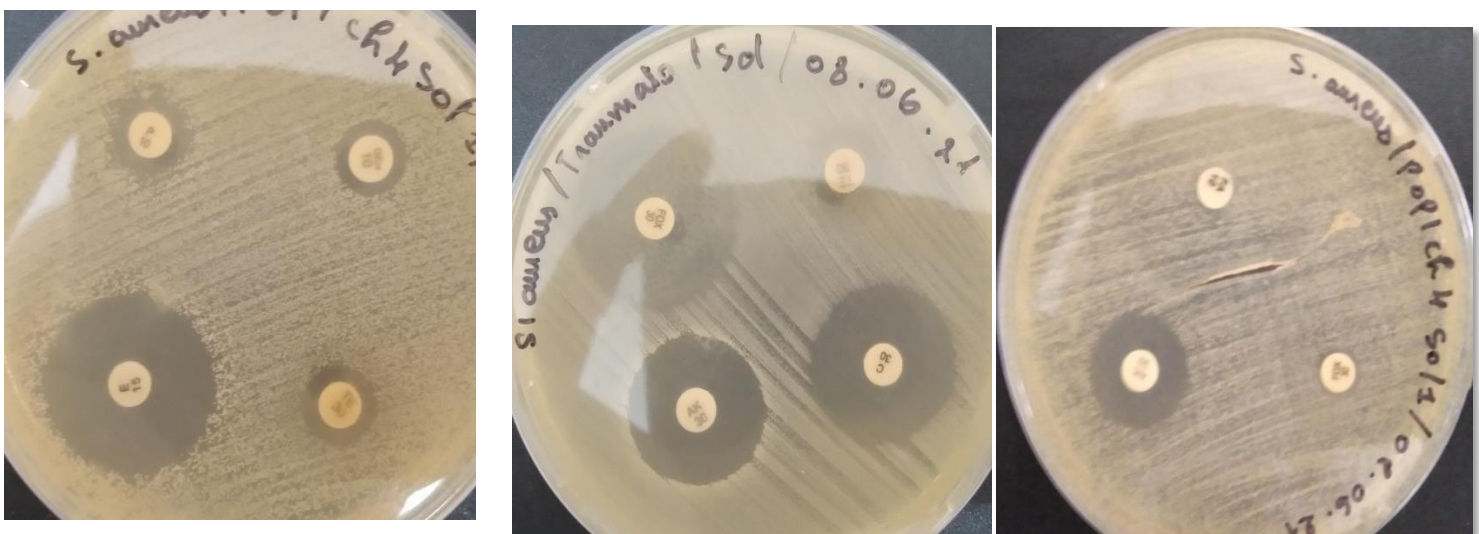


Figure 16 : Antibiogramme des deux souches de *S. aureus*.

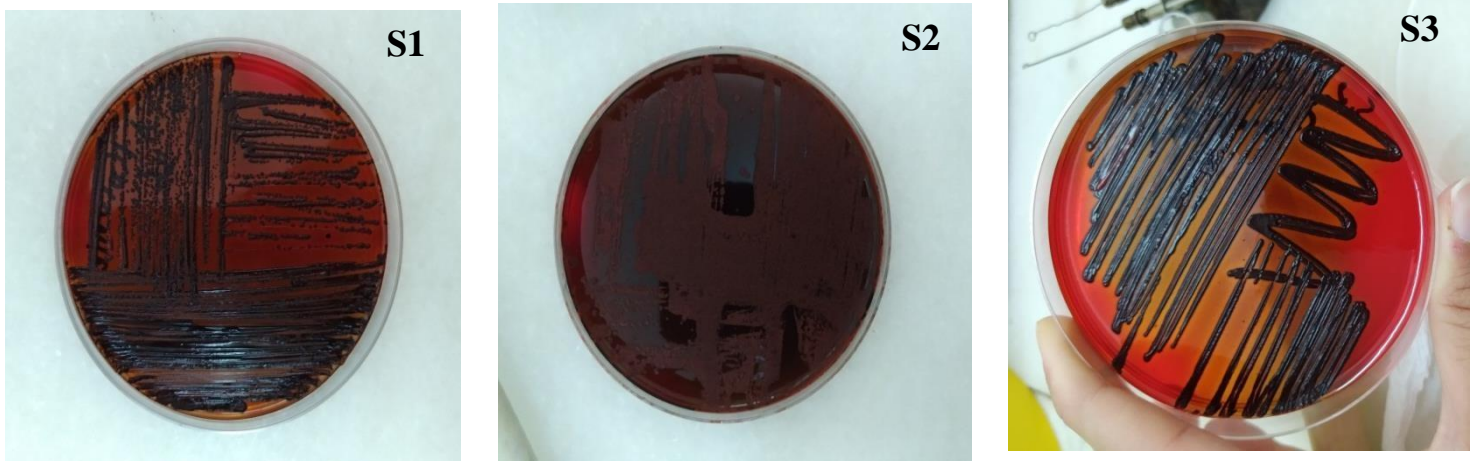
#### 4. Evaluation de la formation de biofilm

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms. Ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou *et al.*, 2009).

Les huit souches de *S.aureus* isolées lors de cette étude ont été testées pour leur capacité à former des biofilms deux techniques, la technique de Rouge Congo Agar (RCA) et la technique de plaque de culture de tissu (TCP).

##### 4.1. Sélection des souches productrices du biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo a révélé que toutes les souches isolées de différentes surface des instruments et appareils ainsi que le sol et les murs à partir des 3 services sont productrices de slime, soit 100% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées. Les souches productrices de slime avaient le même un phénotype où les colonies apparaissent rugueuses avec une couleur très sombre. Les résultats sont montrés dans la **figure 17**.



**Figure 17** : Production de slime chez les souches isolées sur milieu Rouge Congo (**Original**).

#### 4.2. Sélection des souches productrices du biofilm par la technique de plaque de culture de tissu (TCP)

Le protocole d'essai TCP décrit par **Christensen et son groupe en 1985** est le plus largement utilisé et a été considéré comme la norme d'essai pour la détection de la formation de biofilm

La technique de culture sur microplaque (TCP) a révélée que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* possèdent un phénotype de biofilm fort soit 100% des souches isolées.

La technique TCP reste la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm in vitro. Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches Les auteurs ont conclu que la méthode TCP est la méthode de sélection la plus sensible et la plus précise montrant une bonne reproductibilité pour la détection de la formation de biofilms chez les staphylocoques (**Bellifa et al., 2013 ; Kara Terki et al., 2013 ; Racha et al., 2012**).

Les valeurs moyennes de densités optiques (DO) obtenues par un lecteur d'absorbance pour microplaques, ont été calculées .La valeur moyenne des puits de contrôle (éthanol) est égale à 0,15. D'après l'analyse de nos résultats et nos données, et après la comparaison des différentes valeurs de DO pour chacune des souches étudiées, il s'est avéré que les huit souches de *Staphylococcus aureus* isolées sont fortement adhérentes présentant une DO > à 1.839. Selon nos résultats, il est constatée que la souche 05, la souche 06, la souche 03 et la souche 4 ont une densité optique très élevée qui est égale à 2.33, 2.2, 2.02, et 1.92 respectivement. Tandis que les souches 07, 01, 08 et 07 présentent des densités optiques moins faibles égales à 1.7, 1.69, 1.69 et 1.18. Les résultats obtenus sont montrées dans la **figure 18 et le tableau VII**.

**Tableau VII** : Résultat de la détection de la formation du biofilm par les souches isolées par la technique de TCP.

Les souches	Témoin	S1	S2	S3	S4	S4	S6	S7	S8
	<b>négatif</b>								
DO enregistrées à 620nm	0.15	1.695	1.7	2.022	1.929	2.33	2.2	1.18	1.69



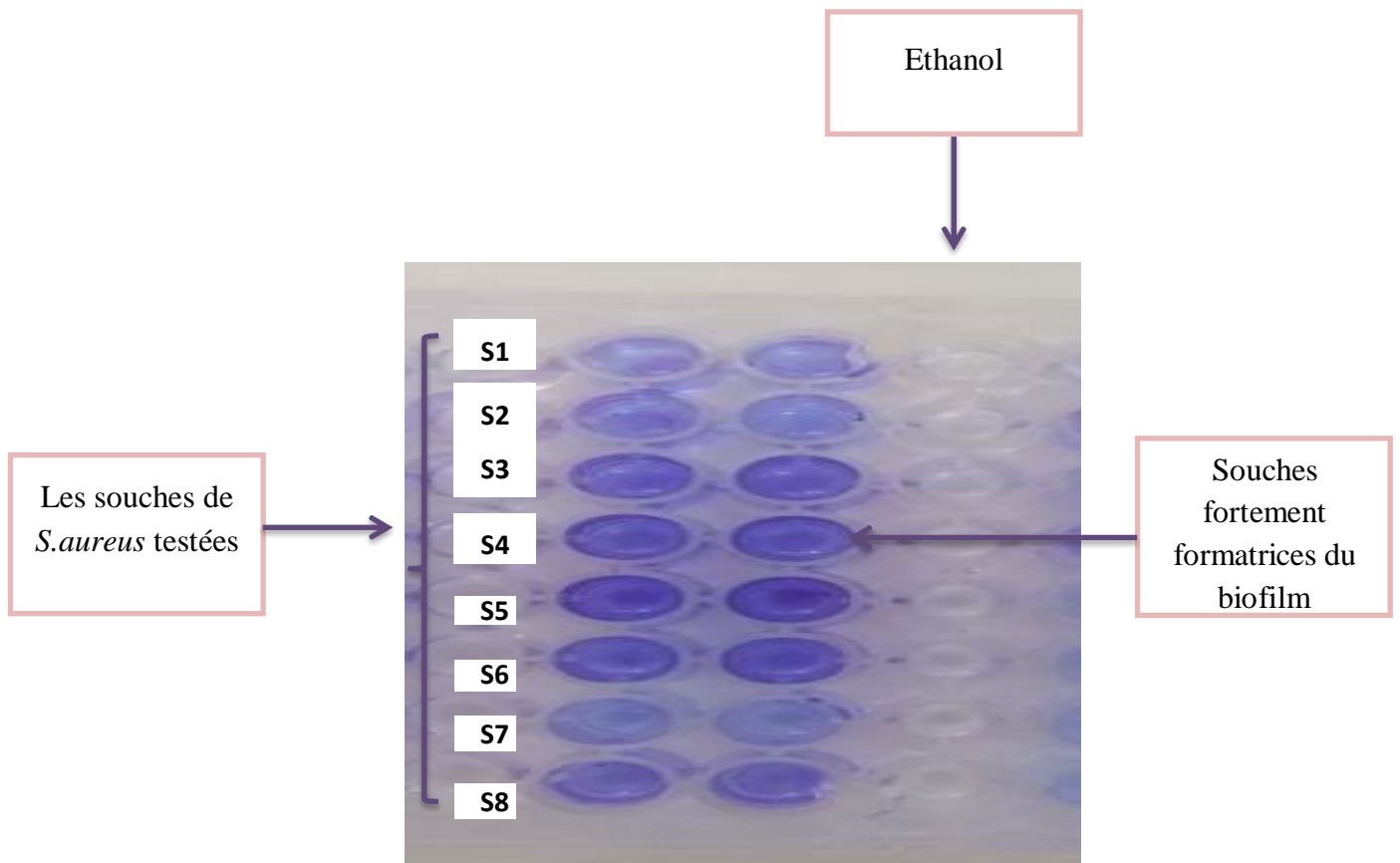


Figure 18 : Résultats de microplaque de biofilm (original).

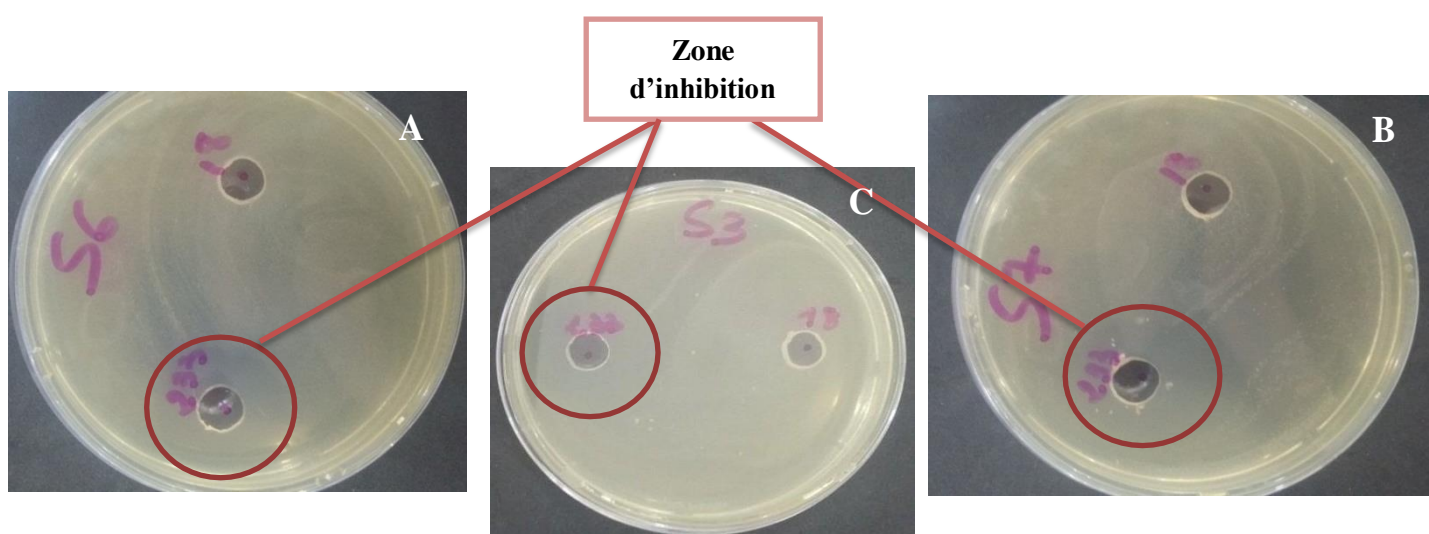
### 5. Activité antibactérienne des deux filtrats

Les résultats de l'activité antibactérienne des 4 souches d'actinomycètes sont illustrés dans le **tableau VIII** et la **figure 19**.

Les résultats ont montré que la souche Sa233 présente un spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis des huit souches isolées de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition qui varie de 24 à 28mm. Nous remarquons que pour la souche B18, aucune activité antibactérienne n'a été détectée contre les souches de *S.aureus* isolées. La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec la souche Sa233 avec un diamètre d'inhibition de 28mm contre la souche 7 de *Staphylococcus aureus*.

**Tableau VIII:** Résultats de l'activité antagoniste des deux filtrats.

Diamètre des zones d'inhibition (mm)	Filtrat	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5	Souche 6	Souche 7	Souche 8
	Sa 233	24	25	24	24	27	25	28	24
	B18	/	/	/	/	/	/	/	/

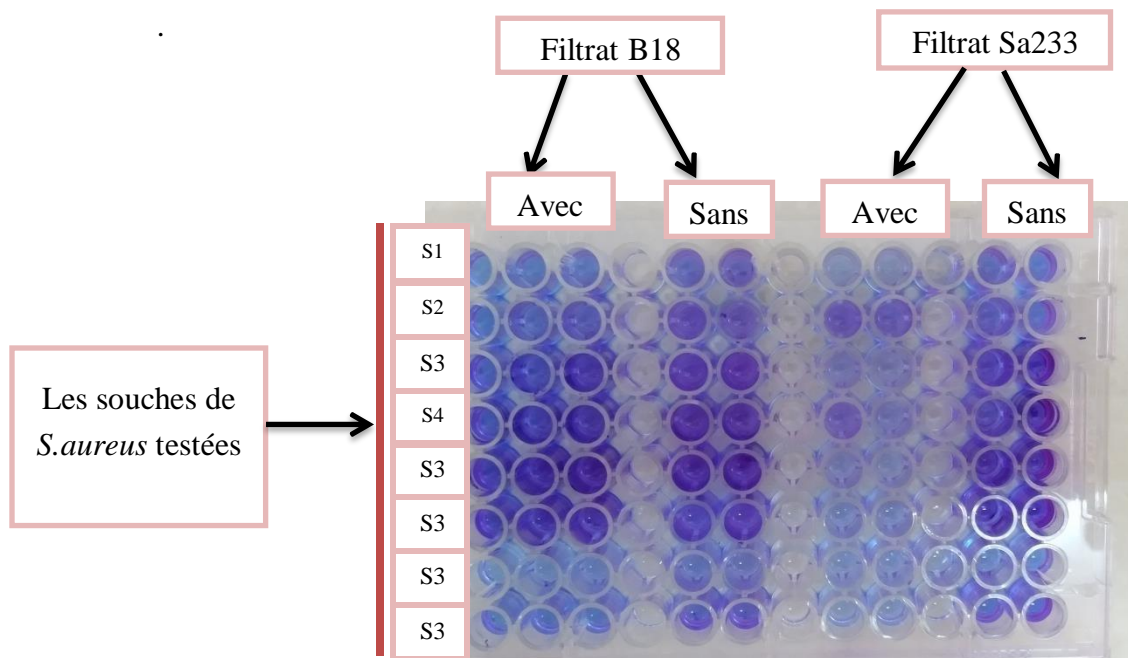
**Figure 19 :** Résultats de l'activité antibactérienne par le test des puits.

A : résultat de l'activité antibactérienne des 2 filtrats à l'égard de la S6 / B : résultat de l'activité antibactérienne des 2 filtrats à l'égard de la S7 / C : résultat de l'activité antibactérienne des 2 filtrats à l'égard de la S3

## 6. Etude de l'activité antibiofilm des filtrats des souches d'actinomycètes

Les résultats de l'effet inhibiteur du biofilm des deux filtrats issus des deux souches actinomycétales Sa233 et B18 montrent qu'il y'a une diminution des densités optique enregistrées à 620nm dans les biofilms formés en présence des filtrats par rapport à celles enregistrées par les témoins.

Les résultats obtenus ont mis en évidence que les deux filtrats avaient la capacité d'inhiber la formation du biofilm et par conséquent le nombre de bactéries de *Staphylococcus aureus* fixées sur la surface des cupules de façon significative (**Figure 20**).



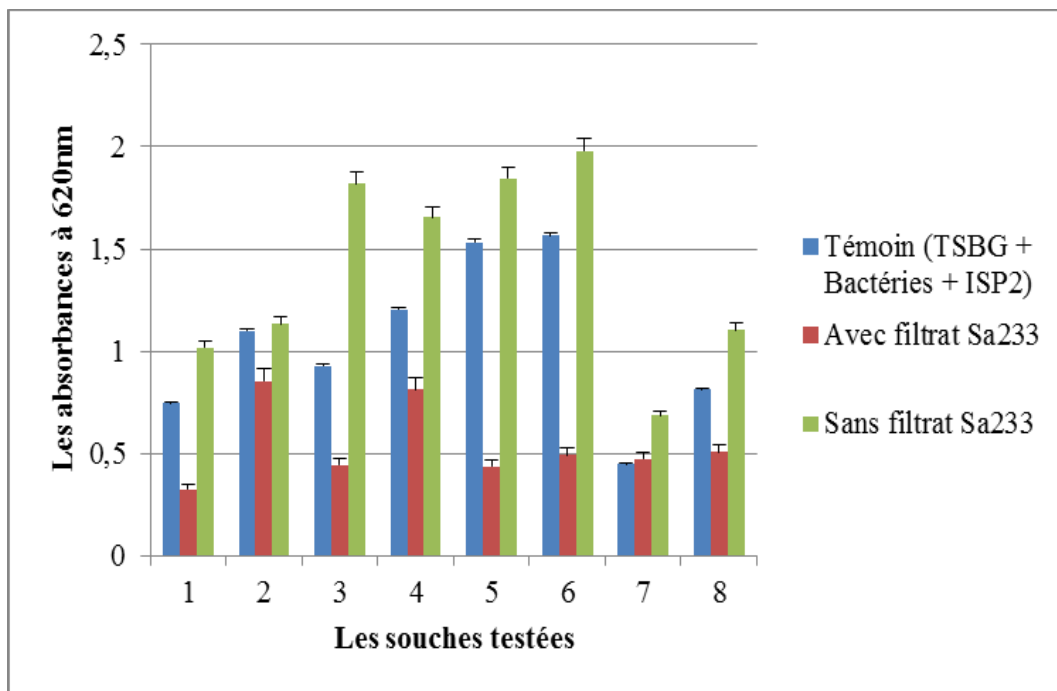
**Figure 20** : Résultats de l'activité antibiofilm des deux filtrats sur microplaque (**original**).

- **Cas de filtrat Sa 233 :**

L'inhibition de la formation du biofilm a été observée pour les huit souches testées. De plus, nous avons mis en évidence que le filtrat de la souche actinomycétale Sa233 est capable d'inhiber de manière significative la formation de biofilm de 75% (6/8) des souches testées.

Le meilleur résultat a été obtenu vis-à-vis de la S5 de *S.aureus* avec une diminution de la DO de 0.435 en comparant avec le témoin (1.847) ce qui correspond à un taux de réduction de 76% ce qui témoigne une très bonne activité anti biofilm.

D'après nos résultats, la plus faible diminution de DO (0.475) a été enregistré vis-à-vis de la souche S7 comparativement au témoin (0.687) ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition du biofilm égal à 24% (**figure 21**).



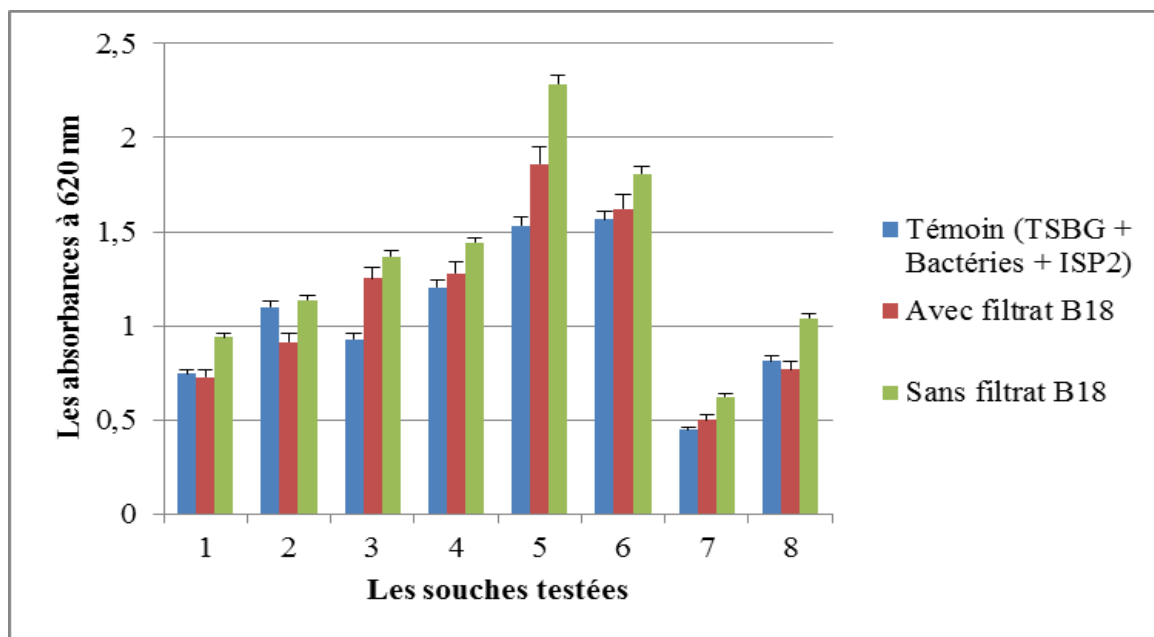
**Figure 21 :** Evaluation de l'activité antibiofilm de filtrat Sa233 vis à vis les huit souches de *Staphylococcus aureus*.

- **Cas de filtrat B18 :**

Selon nos résultats, nous avons constaté que le filtrat de la souche actinomycétale B18 est capable d'inhiber de manière moins significative la formation de biofilm. Cependant, les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour les huit souches.

Une meilleure inhibition est enregistrée vis-à-vis de la S8 qui a présenté une DO de 0.769 enregistrée en présence du filtrat contre une DO égale à 1.042 en absence du filtrat (témoin positif) avec un pourcentage d'inhibition de biofilm de 23%.

Pour la S6, nous avons constaté un faible taux d'inhibition de la formation du biofilm (10%), en raison de la faible diminution de la DO (1.62) comparativement à la DO du témoin (1.809) (**Figure 22**).



**Figure 22** : Evaluation de l'activité antibiofilm de filtrat B18 vis à vis les huit souches de *Staphylococcus aureus*.

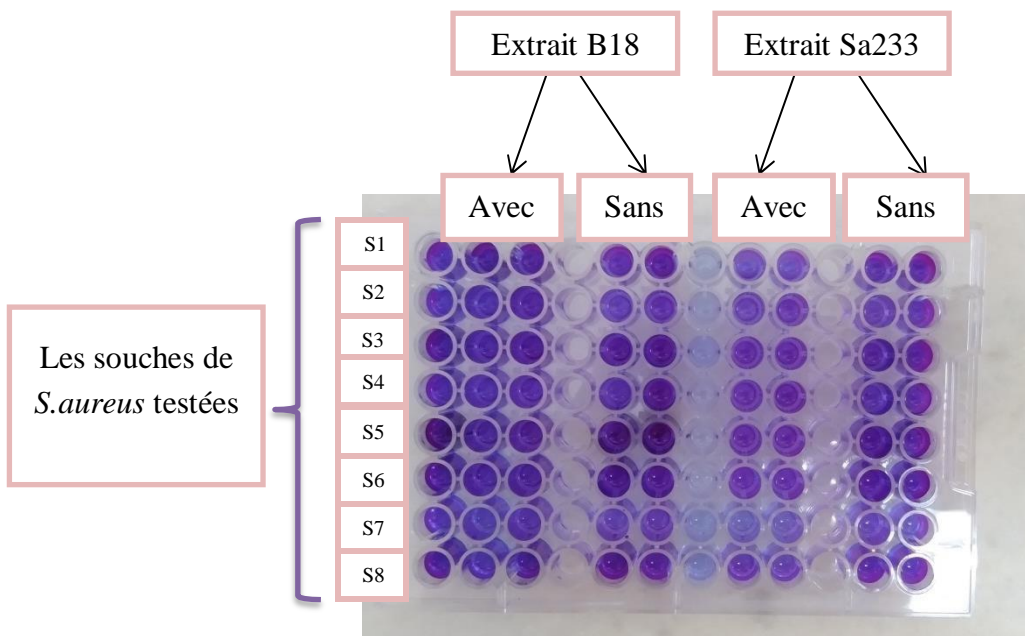
Selon notre étude, les tests d'activité anti-biofilm des deux filtrats par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque à 96 puits a révélé que les souches Sa 233 et B18 avaient la capacité d'inhiber de façon significative la formation de biofilms formés par les souches de *Staphylococcus aureus*.

De manière générale, le filtrat de la souche Actinomycétale Sa233 semble avoir une activité inhibitrice plus importante par rapport au filtrat de la souche B18. De plus, les souches de *S. aureus* semblent être plus sensibles à cet effet inhibiteur.

## 7. Etude de l'activité antibiofilm des extraits bruts des souches d'actinomycète

L'activité anti biofilm des extraits bruts B 18 et Sa233 des souches d'actinomycète a été testée à l'égard des huit souches de *S.aureus* dans un système de formation de biofilms. Après l'ajout de 8  $\mu$ l (0,008 ml) des deux extraits B18 et Sa 233 dans la microplaque à 96 puits, les absorbances indiquant la formation de biofilms et leurs inhibitions ont été mesurées après coloration au cristal violet et par lecture sur spectrophotomètre (DO à 600 nm) puis comparées au témoin et les deux essais (sans ajout de l'extrait brut). Par la suite, des

pourcentages d'inhibitions ont été calculés à partir des Densités Optiques enregistrées en utilisant le lecteur de microplaque (**figure 23**).



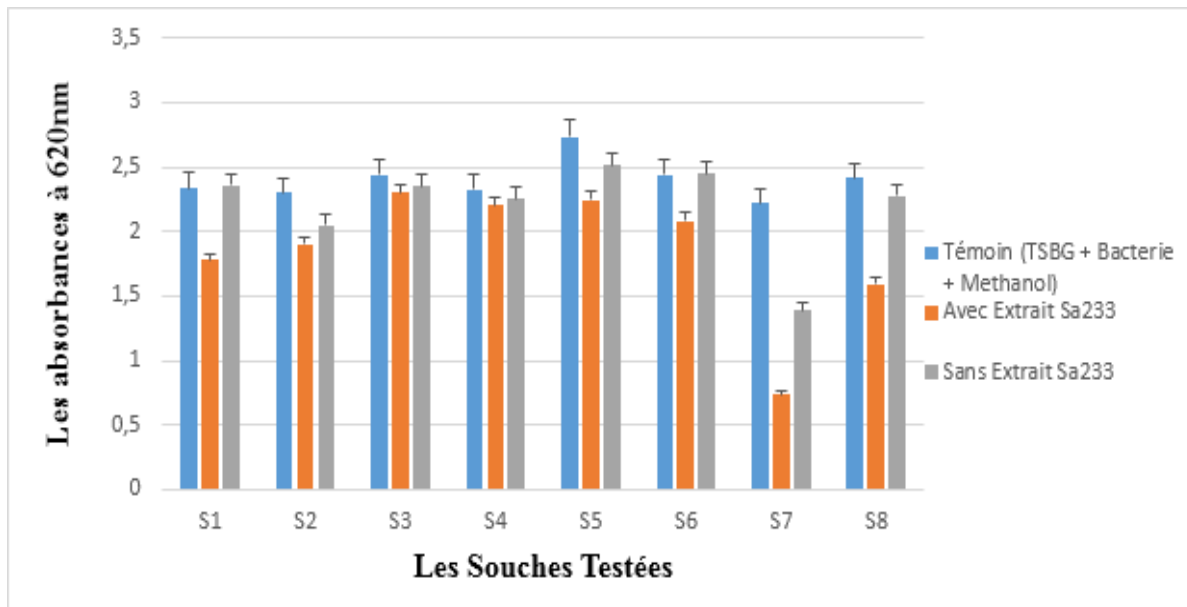
**Figure 23** : Résultats de l'activité antibiofilm des deux extraits bruts sur microplaque.

- **Cas de l'extrait Sa 233**

Les tests d'activité antibiofilm de l'extrait Sa233 menés sur les huit souches de *Staphylococcus aureus* ont permis de montrer une variabilité en terme d'activité anti biofilm.

Il est remarquable qu'il y a une diminution de la formation de biofilm pour la S8 avec une DO de 1,59 en comparant avec le témoin ( 2,28 ) ce qui correspond à un taux d'inhibition de 30%.

Enfin, l'inhibition de la formation du biofilm est plus faible vis-à-vis de la S4 avec une DO de 2,20 en comparant avec celle du témoin (2,25) correspondant à un faible taux d'inhibition du biofilm de 2 % (**Figure 24**).

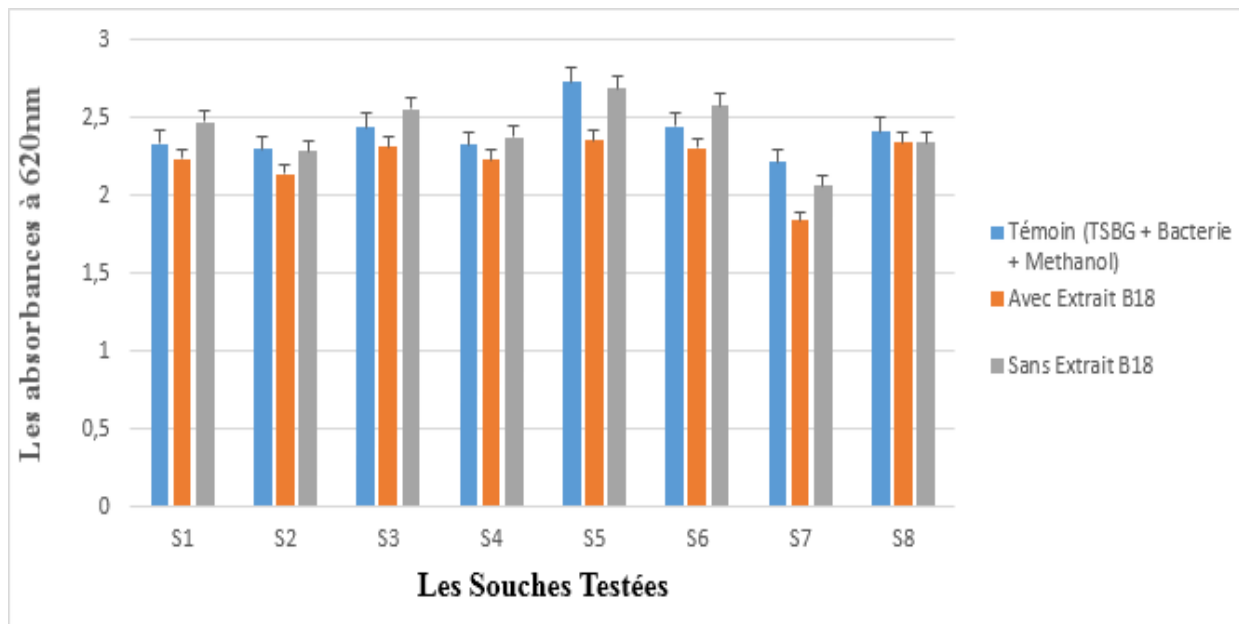


**Figure 24** : Evaluation de l'activité de l'extrait Sa233 vis-à-vis les huit souches de *Staphylococcus aureus*.

- **Cas de l'extrait B18 :**

Les tests d'activité antibiofilm de l'extrait B18 menés sur les huit souches de *Staphylococcus aureus* ont permis de montrer que cet extrait est capable d'inhiber de manière moins importante la formation de biofilm, une variabilité en terme d'activité anti biofilm a été signalée.

D'après nos résultats, nous remarquons que vis-à-vis de la S5 de *S. aureus*, l'extrait B18 a pu donner une meilleure réduction du biofilm avec une DO est égale de 2,35 en comparant avec le biofilm formé en absence d'une DO égale à 2,68. Cette réduction est représentée avec un taux d'inhibition de 12%. La plus faible diminution de biofilm a été observée vis-à-vis de la S8 avec une DO de 2,34 comparativement au témoin (2,35). Cette inhibition est déterminée par un taux de diminution de 0,70% (**Figure 25**).



**Figure 25** : Evaluation de l'activité antibiofilm de l'extrait B18 vis-à-vis les huit souches de *Staphylococcus aureus*.

Selon notre étude, les tests d'activité antibiofilm des deux extraits par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque à 96 puits a révélé que les souches Sa 233 et B18 avaient la capacité d'inhiber la formation de biofilms formés par les huit souches de *Staphylococcus aureus*.

De manière générale, l'extrait de la souche Actinomycétale Sa233 semble avoir une activité antibiofilm plus importante par rapport à l'extrait de la souche B18. De plus, les souches de *S. aureus* semblent être plus sensibles à cet effet inhibiteur.

## II. Discussion

L'étude des microbes à l'intérieur et autour de nous qui ont un effet drastique sur la santé humaine joue un rôle vital en médecine. Les infections bactériennes tuent des millions de personnes dans le monde. La formation structurée de communautés bactériennes, appelées biofilms, est la principale cause d'infections bactériennes. Les infections nosocomiales sont causées par les biofilms en raison de leur nature pathogène. Les biofilms contribuent respectivement à environ 80 % et 65 % aux infections chroniques et microbiennes. L'adhésion des bactéries à la surface de l'implant est à l'origine de la formation de biofilm. Les bactéries responsables sont résistantes aux antibiotiques, aux désinfectants et au système immunitaire humain (Narayana et Srihari, 2019). Les surfaces et dispositifs médicaux sont colonisés par les microorganismes en milieu hospitalier, Ceux-ci peuvent être issus de la flore cutanée du



patient, de la microflore exogène du personnel hospitalier, ou encore de l'environnement contaminé (Donlan, 2002 ; Ango et al., 2020).

Les germes retrouvés sur les surfaces dépendent aussi de la qualité de l'air car les particules en suspension dans l'air vont finir inévitablement par se déposer sur les surfaces et ce d'autant plus rapidement qu'elles sont plus volumineuses, donc les prélèvements des surfaces d'un local vont donc refléter, outre la qualité du bionettoyage, l'efficacité ou les défaillances d'un système de traitement d'air (Echchelh et al., 2014).

La contamination des surfaces dépend, outre de la qualité du bionettoyage, de nombreux facteurs liés au microorganisme : sa durée de vie sur un support inerte (qui varie en fonction de la matière, de la température, de la dessiccation), de son adhérence à la surface, de sa capacité à produire un biofilm et de sa capacité à résister aux conditions défavorables (sporulation). Par exemple, il a été montré que *Staphylococcus aureus* et *Acinobacter baumannii* sont les espèces parmi les plus résistantes à la dessiccation et peuvent survivre plusieurs semaines sur les surfaces sèches, devant *Pseudomonas aeruginosa* (Wendt et al., 1998).

Dans notre étude, à partir de 25 souches de *Staphylococcus* sp isolées, un total de 8 souches possédant une coagulase positive et font partie de l'espèce *S.aureus*, le reste des souches sont tous des Staphylocoque à une coagulase négative

Une étude a été réalisée par Bourneton en (2010), a montré que les micro-organismes les plus souvent en cause dans les bactériémies nosocomiales acquises en hospitalisation complète sont les staphylocoques à coagulase négative.

Les CoNS ne sont pas dangereux pour les personnes dont le système immunitaire fonctionne correctement mais, dans les hôpitaux, ils peuvent constituer une menace, en particulier pour les patients gravement malades, âgés, immunodéprimés. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. hominis* sont les CoNS les plus fréquemment reconnus responsables pour causer des infections cutanées ainsi que de graves infections invasives. *S. aureus*, qui est la principale cause de maladies nosocomiales infections, n'a pas été isolé en grand nombre, ce qui peut être surprenant mais a été confirmé par des études récentes en Europe (Róžańska et al., 2017).

D'après les résultats obtenus, le sol, la porte et les portoirs sont les plus contaminés. En milieu hospitalier, les surfaces sont régulièrement colonisées par des microorganismes. Ces

microorganismes sont d'origines diverses et peuvent être issus de patients, du personnel soignant ou des visiteurs. Ces surfaces constitueraient donc une niche écologique de bactéries multirésistantes pouvant provoquer des infections nosocomiales. Des études épidémiologiques récentes montrent que la place des surfaces dans la survenue des infections nosocomiales reste encore mal documentée, à l'exception des cas sporadiques de légionellose, d'aspergillose ou de mycobactérioses dues à des Mycobactéries atypiques (**Faye-Ketté et Dosso, 2010**).

Selon nos résultats, le test de sensibilité des souches de *S.aureus* isolées dans le Centre Hospitalo-Universitaire de Blida montre un taux de résistance important vis-à-vis la plupart des antibiotiques utilisés dont 6 souches étaient des SARM. On remarque aussi que la majorité des souches isolées sont résistantes à la majorité des antibiotiques testés dont la Pénicilline G (P), l'Acide Fusidique (FA), la Gentamycine (GEN), et la Tétracycline (TE). Toutes les souches isolées sont sensibles à la Rifampicine (RIF) et à la Chloramphénicol (C). Tandis que la souche *S.aureus* S6 révèle une sensibilité vis-à-vis la totalité des antibiotiques testés dont la céfoxitine (méthicilline).

Les souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) ont connu une distribution à l'échelle mondiale en même temps qu'elles évoluaient vers la multi résistance aux antibiotiques, elles ont été identifiées pour la première fois au début des années 1960 (**Minary-Dohen et al., 2007**).

Le *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ou staphylocoque doré) est un type de bactérie qui se trouve couramment sur la peau ou dans le nez des personnes en santé. Les staphylocoques qui sont résistants à l'antibiotique méthicilline sont connus sous le nom de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou SARM. Si elles ne sont pas traitées, les infections à SARM peuvent entraîner de graves complications qui mettent la vie en danger, telles qu'une infection du courant sanguin, des os ou des poumons (par ex., septicémie, pneumonie, etc.). Ces infections peuvent être potentiellement mortelles y compris un choc septique et la mort (**Ressource d'amélioration pour les préjudices à l'Hôpital, 2020**).

Les personnes dont le système immunitaire est affaibli, qui souffrent de maladies chroniques, qui sont hospitalisées et qui subissent des interventions médicales sont plus à risque de contracter une infection. Il a été démontré que le SARM se propage facilement dans les établissements de santé (**Ressource d'amélioration pour les préjudices à l'Hôpital, 2020**).

Le SARM était autrefois considéré comme un problème principalement liés à la transmission dans les établissements de santé en raison de la transmission croisée entre les mains des soignants. L'importance de la colonisation par *S. aureus* comme marqueur de la morbidité infectieuse du site opératoire est bien documentée. *S. aureus* est considéré comme un agent causal dans environ 25 à 50 % de la morbidité infectieuse des plaies (**Hanrahan et al., 2007**).

Les problèmes de santé publique provoqués par les biofilms sont maintenant clairement définis. Pour prévenir et lutter contre ces biofilms, une meilleure compréhension de leurs mécanismes de formation est nécessaire. de nombreuses méthodes d'étude de la formation et du développement des biofilms ont été utilisées au cours des dernières années : des méthodes d'observation par microscopie (microscope à fluorescence, microscope confocal à balayage laser, microscope électronique à balayage) ou des méthodes de numération de bactéries après détachement des biofilms par sonication, frottement ou vortex des surfaces. Ces techniques permettent d'obtenir des informations détaillées mais sont difficiles et longues à réaliser. C'est pourquoi des modèles d'étude in vitro en microplaques ont été développés. Ces tests ont l'avantage d'être relativement rapides et peu coûteux. ils permettent de réaliser de nombreux tests simultanément, notamment pour tester l'effet de plusieurs facteurs influençant la formation de biofilm, comparer la capacité de formation de biofilm de souches sauvages et de souches mutantes, ou encore tester la sensibilité des bactéries au sein du biofilm aux agents antimicrobiens (**Peeters et al.,2008**).

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm in vitro ont été établies, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96 puits, et la méthode qualitative du Rouge Congo (**Mathur et al., 2006**) qui était la méthode du choix pour notre étude. Les huit souches de *S.aureus* isolées lors de cette étude ont été testées pour leur capacité à former des biofilms par la technique de Rouge Congo Agar (RCA).

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo a révélé que toutes les souches isolées de différentes surface des instruments et appareils ainsi que le sol et les murs à partir des 3 services sont productrices de slime, soit 100% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées. Les souches productrices de slime avaient le même un phénotype où les colonies apparaissent rugueuses avec une couleur très sombre.

Nos résultats sont en accord avec celles obtenus par **Bouhadjar et Terbeche en (2017)** et **Chibi en (2015)** et où ils ont trouvés que 100% des souches *Staphylococcus aureus* isolées des différentes surfaces dans le CHU du Tlemcen sont productrice de slime.

*Staphylococcus aureus* est une cause majeure d'infections nosocomiales et sécrète un spectre diversifié des déterminants de la virulence ainsi que des formes biofilm. L'émergence de *S. aureus* résistants aux antibiotiques souligne le besoin de formes thérapeutiques alternatives aux antibiotiques conventionnels (**Kong et al., 2017**).

La recherche des nouvelles stratégies nouvelles pour réduire la formation de biofilm bactérien semble avoir une grande importance alors que la résistance bactérienne aux antibiotiques continue d'émerger. L'utilisation d'agents anti-biofilm pouvant perturber les communautés bactériennes récalcitrantes peut être une alternative avantageuse aux antimicrobiens, car leur utilisation ne conduit pas au développement de mécanismes de résistance (**Bauermeister et al., 2019**).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses Gram-positives, ressemblant à des champignons, qui restent au sommet de la production d'antibiotiques. Les actinomycètes sont le groupe le plus hétérogène des micro-organismes, ils sont largement distribués dans l'habitat naturel (**Sapkota et al., 2020**). Ce sont les organismes les plus abondants qui forment des filaments filiformes dans le sol et sont responsables de l'odeur caractéristique « terreuse » de fraîchement un sol sain (**Bhatti et al., 2017**). Au cours des dernières décennies, les actinomycètes ont été utilisés comme ressource pour la production de composés bioactifs. Les actinomycètes sont également de riches sources de diverses enzymes qui ont une importance industrielle et de nombreux composés bioactifs avec un large éventail de propriétés pharmaceutiques comme les antibiotiques, les antimicrobiens, les antibiotiques, etc... (**Gupta et al., 2019**).

Le test de l'activité antibactérienne des deux filtrats issus des souches SA233 et B18 montrent que toutes les souches de *S. aureus* sont résistantes aux molécules sécrétées par la souche actinomycétale B18. Des résultats similaires sont mentionnés par Meklat **et al., (2020)** où la souche alcalinophile B18 isolée dans la région d'Ouargla à partir du sol saharien était dépourvue complètement de l'activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus*, mais elle a montré une activité antibactérienne et antifongique contre les autres microorganismes ce qui est conforme aux découvertes antérieures. Tandis que l'espèce *Sacharothrix algeriensis* a montré une activité antibactérienne très importante contre les huit souches isolées de

*S.aureus*. Il a déjà été rapporté que cet isolat produisait trois nouveaux antibiotiques dithiolyrrolone (**Zitouni et al., 2004**).

À ce jour, les espèces qui font parties du genre de *Nocardioopsis* incluant la souche B18 ont été reconnus d'être la source de nouveaux métabolites secondaires, comme montré par la production de 3-tréhalosamine, griseusine D, macrolide W A52-A, thiopeptide, dérivés de la nocapyrone, dicétopipérazine dérivés, 4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3- carboxamide et acide N-acétyl-anthranilique, angucyclinones et autres (**Meklat et al., 2020**).

Ces variations de résultats du test d'activité antibactérienne s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antimicrobiennes qui possède une certaine spécificité (**Singh et al., 2009 ; Valan Arazu et al., 2008**).

Une étude récente menée par **Driche et al (2017)** a montré une activité antibactérienne importante de la souche *Streptomyces* AT37 isolée du sol saharien dans la région d'Adrar à l'égard de souche de *S.aureus* ATCC25923 (32 mm) et de *S.aureus* R2 résistante à la méthicilline (30 mm) par la méthode des stries croisées.

D'autre part, selon **Alliouch-Kerboua et al (2015)**, une souche de *Streptomyces* SM2/2GF isolée de sédiment de la lagune El-Mellah (El-Kala) a été testée contre divers microorganismes pathogènes incluant des *S.aureus* et SARM. Les résultats du test de l'activité antimicrobienne de l'isolat SM2/2GF par la méthode des stries croisées ont montré une meilleure activité contre *S. aureus* SARM ATCC 43300 (20mm) comparé au *S. aureus* ATCC 29213 (11mm).

De même, une étude récente a également démontré que des souches de streptomycètes isolées du Sahara indien étaient productrices de substance douées d'activité antibactérienne (SAS02, SAS09, SAS13..) vis-à-vis d'une souche de SARM et ce par le test des stries croisées avec une distance de 30mm (**Masand et al., 2018**).

Selon notre étude, les tests d'activité anti-biofilm des deux filtrats par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque à 96 puits a révélé que les souches Sa 233 et B18 avaient la capacité d'inhiber de façon significative la formation de biofilms formés par les souches de *Staphylococcus aureus*.

Cette inhibition a été observée pour les huit souches testées. De plus, nous avons mis en évidence que le filtrat de la souche actinomycétale Sa233 est capable d'inhiber de manière

significative la formation de biofilm de 75% (6/8) des souches testées. Avec un pourcentage très élevé de 76%, 75%, 75%, 68% pour les souches 5, 6, 3, 1 respectivement. Et un pourcentage d'inhibition assez important de 54%, 50%, 30% et 24% est enregistré pour les souches 8, 4, 7 et 2 respectivement.

Selon nos résultats, nous avons constaté que le filtrat de la souche actinomycétale B18 est capable d'inhiber de manière moins significative la formation de biofilm cependant, les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour les huit souches. Une meilleure inhibition est enregistrée pour la souche 1 et la souche 08 avec un pourcentage d'inhibition de 22% et 23% respectivement. De même, on a remarqué une inhibition pour les souches 02, 03, 04, 05, 06, 07 avec des pourcentages d'inhibition de 19%, 8%, 11%, 18%, 10%, 19%, 23% respectivement.

De manière générale, le filtrat de la souche Actinomycétale Sa233 semble avoir une activité inhibitrice plus importante par rapport au filtrat de la souche B18. De plus, les souches de *S. aureus* semblent être plus sensibles à cet effet inhibiteur. Nos résultats semblent même mettre en évidence dans certains cas, un effet souche-dépendant. De ce fait, il pourrait s'avérer intéressant d'avoir recours à la génomique comparative entre des souches de staphylocoques dont le biofilm est impacté par cette activité anti biofilm et des souches dont le biofilm ne l'est pas. Cela pourrait peut-être nous permettre de mettre en évidence des cibles génétiques potentielles chez les staphylocoques (*Mannala et al., 2018*).

Selon notre étude, les tests d'activité antibiofilm des deux extrait par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque à 96 puits a révélé que les souches Sa 233 et B18 avaient la capacité d'inhiber la formation de biofilms formés par les huit souches de *Staphylococcus aureus*.

Selon nos résultats, nous avons constaté que l'extrait de la souche actinomycétale B18 est capable d'inhiber de manière plus ou moins significative la formation de biofilm cependant, les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour les huit souches. Il est clairement remarquable qu'il y a une diminution de la formation de biofilm pour les souches 1, Souche 5, Souche 6 et Souche 7 avec des taux de diminution de la formation de biofilms de 10 %, 12 %, 10 % et 11% respectivement . En plus, l'inhibition de la formation de biofilms est légèrement plus faible pour les souches 2, Souche 3, Souche 4, et Souche 8 avec un taux de diminution de 6%,9%,6% et 0,70%.

De manière générale, l'extrait de la souche Actinomycétale Sa233 semble avoir une activité antibiofilm plus importante par rapport à l'extrait de la souche B18. De plus, les souches de *S. aureus* semblent être plus sensibles à cet effet inhibiteur.

Les test d'activité antibiofilm de l'extrait brut Sa233 menés sur les huit souches de *Staphylococcus aureus* ont permis de montrer une variabilité en terme d'activité anti biofilm ,il est remarquable que il y a une diminution de la formation de biofilms des souches 1, 5, 6, 7, 8 avec des taux de diminution de 24%, 11%, 15%, 47%,30%. En plus, la réduction de la formation de biofilms est légèrement plus faible pour la souche 2 avec un pourcentage d'inhibition de 7 % et pour les souches 3 et 4 un taux de diminution de 2 %.

D'après les résultats obtenues afin de mettre en évidence l'activité antibiofilm des deux filtrats et des deux extraits, nous avons constatées que le filtrat des deux souches actinomycétales sont capables d'inhiber la formation du biofilm pour les huit souches de *S.aureus* isolées par rapport aux extraits bruts obtenues. Ce qui signifie que les molécules bioactives présentent dans le milieu de culture des actinomycètes sont beaucoup plus actives contre le biofilm que celles obtenues après extraction dans les solvants.

**Singh et al (2020)**, ont montré que la souche *Streptomyces californicus* Strain ADR1 possède une activité antibactériens contre des agents pathogènes importants incluant le MRSA, ainsi qu'une activité anti biofilm . L'effet des métabolites ADR1 sur l'inhibition de la formation de biofilm ainsi que sur les biofilms produits par les souches de *S. aureus* et de SARM (valeurs de la concentration inhibitrice du biofilm [BIC90] :  $0,74 \pm 0,08$  et  $4,59 \pm 0,71$   $\mu\text{g/ml}$ ) était meilleure (rapportés Une réduction jusqu'à 90 % de la formation de biofilm) que certains extraits de métabolites précédemment. L'inhibition de la formation de biofilm suggérait fortement que les métabolites empêchaient l'adhérence de *S. aureus* et des cellules MRSA à la surface de polystyrène. De plus, leur capacité à perturber les biofilms préformés pourrait limiter la résistance aux médicaments associée au biofilm parmi les agents pathogènes.

Par ailleurs, Une récente étude montre que L'alnumycine D ont été isolés à partir des cultures de recombinants de *Streptomyces albus*, était plus actif contre la croissance des cellules planctoniques et la formation du biofilm de la souche de *S.aureus* ATCC 25923, avec une Concentration Inhibitrice 50. De manière analogue à l'alnumycine D, la granaticine B était presque également active contre le biofilm et les cellules planctoniques. Les résultats indiquent que même les classes connues de produits naturels antimicrobiens peuvent contenir

des composés qui ont spécifiquement évolué contre les biofilms bactériens. À notre connaissance, la bioactivité élevée observée d'un produit de dérivation d'une voie de biosynthèse antibiotique est une découverte rare. Le résultat suggère que la manipulation des voies et d'autres outils de biologie synthétique qui peuvent entraîner une augmentation de la production de produits de dérivation peuvent être utilisée plus largement à des fins de découverte de médicaments (Oja et al., 2015).

D'autre part, l'antibiotique Streptomyces AT37-1 isolée du sol saharienne dans la région d'Adrar produisant des dérivés furanones contre deux souches cibles de *S. aureus* (SASM ATCC 29523 et SARM ATCC 43300) a montré à la fois des activités antistaphylococciques et antibiofilm intéressantes. Cependant, cette activité antibactérienne était inférieure à celle de la vancomycine. La formation de biofilm a été réduite de 50 % à une concentration de 10 à 15 µg/ml. Ces résultats sont intéressants du fait de la formation de biofilm et de la résistance de *S. aureus* à de nombreux antibiotiques utilisés en thérapeutique (Driche et al., 2017).

Une étude récente menée par Rajivgandhi et al en 2018 montre que le composé Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(2-méthylpropyl) extrait à partir de la souche actinomycétale *Nocardiosis sp.* GRG 1 (KT235640) présente un effet antibiofilm contre deux souches uropathogènes *P.mirabilis* et *E. coli* à une concentration de 100 µg/mL. Le composé Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3-(2-méthylpropyl) inhibe la formation de biofilm chez *P.mirabilis* ainsi qu'il réduit la viabilité des biofilms préformés. De plus, les images obtenues par CLSM montrent le rétrécissement cellulaire, la désorganisation de la membrane cellulaire et la perte de la viabilité de la cellule avec des dommages membranaires. Les techniques utilisées montrent également que ce composé provoque la dégradation de la paroi cellulaire contre virulente du biofilm bactérien formé. Le composé identifié PPDHML est un composé potentiel pour traiter les bactéries uropathogènes formant un biofilm et il peut être la source de la synthèse de nouveaux médicaments. D'autres études sont nécessaires pour élucider d'autres voies d'inhibition du biofilm et son efficacité chez l'animal.

Les chercheurs ont mené de nombreuses études sur l'isolement et le dépistage des actinomycètes producteurs d'antimicrobiens. Il a avancé que la plupart des nouveaux antibiotiques ont été trouvés par criblage d'isolats du sol. Cependant, en raison de l'émergence d'agents pathogènes multirésistants, la résistance aux antimicrobiens est en augmentation, ce



qui est pernicieux pour la santé de la grande population de la communauté. En outre, c'est un problème sérieux dans le traitement des maladies infectieuses, il faut donc s'étendre sur ce sujet pour découvrir nouveaux antibiotiques qui aident à contrôler le problème (**Sapkota et al., 2020**).

CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES

Vivant entre le commensalisme et la pathogénicité, les souches pathogènes ont développé des stratégies intéressantes pour transformer l'environnement hospitalier comme une véritable niche écologique. Les résultats de cette étude sont en faveur d'une contamination fréquente de l'environnement hospitalier. Notre travail a permis d'isoler 8 souches de *S.aureus* prélevées sur différents sites de trois services du CHU de Blida.

Les études d'adhésion bactérienne et de formation du biofilm ont été réalisées par les méthodes TCP et rouge Congo montre que toutes les souches isolées de surfaces étaient productrices de biofilm et de slime soit 100% des souches.

Au terme de cette étude, seulement le filtrat de la souche Actinomycétale Sa233 qui possède une activité antibactérienne contre les huit souches cibles de *S. aureus* avec une meilleure activité antibactérienne pour la souche 7 (diamètre d'inhibition de 28mm pour le filtrat Sa233).

D'après les résultats de l'activité antibiofilm des deux extraits et des deux filtras, nous avons mis en évidence que le filtrat de la souche actinomycétale Sa233 est capable d'inhiber de manière significative la formation de biofilm de 75% (6/8) des souches testées. Avec un pourcentage très élevé de 76%, 75%, 75%, 68% pour les souches 5, 6, 3, 1 respectivement. Et un pourcentage d'inhibition assez important de 54%, 50%, 30% et 24% est enregistré pour les souches 8, 4, 7 et 2 respectivement.

Selon nos résultats, nous avons constaté aussi que le filtrat la souche actinomycétale B18 est capable d'inhiber de manière moins significative la formation de biofilm cependant, les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour les huit souches. Une meilleure inhibition est enregistrée pour la souche 1 et la souche 08 avec un pourcentage d'inhibition de 22% et 23% respectivement. De même, on a remarqué une inhibition pour les souches 02, 03, 04, 05, 06, 07 avec des pourcentages d'inhibition de 19%, 8%, 11%, 18%, 10%, 19%, 23% respectivement

De même les tests d'activité antibiofilm de l'extrait brut Sa233 menés sur les huit souches de *Staphylococcus aureus* ont permis de montrer une variabilité en terme d'activité anti biofilm ,il est remarquable que il y a une diminution de la formation de biofilms des souches 1, 5, 6, 7, 8 avec des taux de diminution de 24%, 11%, 15%, 47%,30%. En plus, la réduction de la formation de biofilms est légèrement plus faible pour la souche 2 avec un pourcentage d'inhibition de 7 % et pour les souches 3 et 4 un taux de diminution de 2 %. Durant notre étude, nous avons constaté que l'extrait de la souche actinomycétale B18 est capable d'inhiber de

manière plus ou moins significative la formation de biofilm cependant, les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour les huit souches. il est clairement remarquable qu'il y a une diminution de la formation de biofilm pour les souches 1, Souche 5 ,Souche 6 et Souche 7 avec des taux de diminution de la formation de biofilms de 10 %, 12 %, 10 % et 11% respectivement . En plus, l'inhibition de la formation de biofilms est légèrement plus faible pour les souches 2, Souche 3, Souche 4, et Souche 8 avec un taux de diminution de 6%,9%,6% et 0,70%.

Ainsi, au vue de l'émergence actuelle de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques associés aux gènes de virulence chez les souches de Saures ayant pour conséquence la complication de la prise en charge thérapeutique des patients, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinobactéries est crucial pour la découverte de nouvelles espèces et/ou de nouvelles substances naturelles bioactives non toxiques pour l'hôte douées d'activité antibactérienne et antibiofilm. Les résultats obtenus dans notre étude sont probants et méritent d'être plus approfondies. De là de, nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les principales sont les suivantes :

- ✓ Elargir l'étude a d'autre souches cibles formant le biofilm telle que le germe opportuniste *Staphylococcus epidermidis* isolée du cathéter.
- ✓ Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm.
- ✓ Purification et caractérisation structurale de chacune des molécules bioactives produite par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques.
- ✓ Etude de l'effet des extraits bruts qui ont montré un effet sur la formation de biofilm, sur la viabilité cellulaire et sur des biofilms établi et qui seront confirmés par des tests in vivo pour un intérêt thérapeutique.
- ✓ Des études de structure-activité sont encore nécessaires pour mieux assigner les caractéristiques structurales essentielles responsables de l'activité antibiofilm
- ✓ Rechercher les actinobactéries dans d'autres écosystèmes inexplorés afin d'augmenter les chances de trouver des molécules innovantes qui possèdent un potentiel important, en particulier le Sahara algérien.
- ✓ Recherche de nouvelles substances antimicrobiennes

Références

Bibliographiques

- **Afreenish, H., Javaid, U., Kaleem, F., Omair, M., Khalid A., Iqbal, M.** (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilien. Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305-311.
- **Alain Aka, K.** Synthèse et évaluation biologique des activités anti-biofilm d'analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole. *Bactériologie*. Université de Toulon; Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2019. Français. ffNNT : 2019TOUL0014ff. fftel-02502517
- **Algammal, A. M., Hetta, H. F., Elkelish, A., Alkhalifah, D. H. H., Hozzein, W. N., Batiha, G. E. S., et Mabrok, M. A.** (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*, 13, p. 3255.
- **Amoroso, M. J., Benimeli, C. S. et Cuozzo, S. A.** (2013). Actinobacteria application in bioremediation and production of industrial enzymes. Edition CRC.Press, New York. 298p.
- **Ango, P. D., Konan, K. D., Kouamé, K. A., Sai, S. S., Tchimou, A. Y., Adingra, S. C., ET Boua, N.** (2020). Écologie Microbienne des Surfaces ET Dispositifs Médicaux au Service de Réanimation du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Treichville. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*, 21(1).
- **Aouiche, A., Sabaou, N., Meklat, A., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A.,** (2012). Activité antimicrobienne de *Streptomyces sp.* PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *Journal De Mycologie Médicale*.
- **Archer Nathan, K., Mark J. Mazaitis, Costerton, W., Jeff G. J. L., Powers, M. E., et Mark, E. S.** (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-449.
- **Avril, J. L., Denis, F., Dabernat, H., Monteil, H.** (1992). *Bactériologie Médicale* (éd. 2ème). Paris: ellipses.

## Références bibliographiques

---

- **Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Van Wezel, G. P.** (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43.
- **Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y et Van Wezel, G. P.** (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology Molecular Biology Revue*, 80,1–43
- **Bauermeister, A., Pereira, F., Grilo, I. R., Godinho, C. C., Paulino, M., Almeida, V., Gaudêncio, S. P., Paulino, M., Almeida, V., Gobbo –Neto,L., Prieto-Davo,A., Sobral,R .G., Lopes , N.P., Gaudêncio, S. P.** (2019). Intra-clade metabolomic profiling of MAR4 *Streptomyces* from the Macaronesia Atlantic region reveals a source of anti-biofilm metabolites. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.14529
- **Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., et Ahmane, Z.** (2018). Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University - Science*. doi:10.1016/j.jksus.2018.03.008
- **Bhatti, A. A., Haq, S., Bhat, R. A.** (2017). *Actinomycetes* benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, 111, pp. 458-467.
- **Bischoff, E., Vonhugo, H., Scheer, M., Schroeder, T. et Schaefer, D.** (1981). - Growth promoting active substance mixture from *Streptosporangium* species SS-48. German Patent 30, 05, 696.
- **Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H. P., et Sabaou, N.,** (2013). *Saccharothrix hoggarensis* sp. Nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 549-553.
- **Bouhadjar, A. A., Terbeche, M.** (2017). Mémoire de master. Evaluation de la formation du biofilm par *Staphylococcus aureus* isolées du cathéter veineux périphérique -CHU Tlemcen-
- **Boukhatem, M. N., Ferhat, M.A., Hadj Mohamed, R., Lalaoui, N.** (2015). Prevalence and Antibiotic Resistance Of *Staphylococcus* Isolated From Kolea Hospital (ALGERIA). *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 7(2), 260-270.

## Références bibliographiques

---

- **Boulahouat, M., et Aliziane, Md. O.** (2020, Janvier 01). Le Coût Économique et Social des Infections Nosocomiales en Algérie. *Revue Nouvelle Economie*, 11(01), pp. 411-430.
- **Bourneton, O., Mutel, T., Heranney, D., Hernandez, C., Lavigne, T., Waller, J., Jaulhac, B., et Foegle, J.** (2010). Incidence des bactériémies et fongémies aux hôpitaux universitaires de Strasbourg de 2005 à 2007. *Pathologie Biologie*, 58, 29–34.
- **Brook, I. et Randolph, J.G.** (1981). Aerobic and anaerobic bacterial flora of burns in children. *J Trauma*, 21(4), 313-318.
- **Brun-Buisson, C., et Girou, E.** (2000). Les infections nosocomiales : bilan et perspectives. *médecine/sciences*, 16, 292-299.
- **Bukasa, J. C., Muteba, P., Kazadi, A., Lepelletier, D., Ilunga, F., Mutombo, A., ... & Stany, W.** (2021). Etude de l' incidence des infections nosocomiales et facteurs de risque dans les maternités de la ville de Mbuji mayi, République Démocratique du Congo. *The Pan African Medical Journal*, 38.
- **Chapman, G. H.** (1945). The Significative Of Sodium Chloride In Studies Of *Staphylococcus aureus*. *BACTERIOLOGY*, 50, 201-203.
- **Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., et Shrivastava, S.** (2013). Diversity and versatility of *actinomycetes* and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, S 3 ( 8 SUPPL) page S83-S94.
- **Chibi, A.** (2015). MEMOIRE DE MASTER. Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen.
- **Christensen, GD., Simpson, W. A., Bisno, A. L., Beachy, E. H.** (1985). Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37: 318-326
- **Clutterbuck. A.L., Woods .EJ., Knottenbelt .D.C ., Clegg .P.D., Cochrane .C.A., Percival. S.L,** (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* .121 (1), p.p. 1-17.
- **Couture, B.** (1990). Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical. pp. 15-32.



- **Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., Penadés, J.R.,** (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology* 183, 2888-2896.
- **Del Pozo, J. L.** (2018). Biofilm-related disease. *EXPERT REVIEW OF ANTI-INFECTIVE THERAPY*, 16(1), pp. 51-65.
- **Demain, A. L.** (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Mini-review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 455-463.
- **DENIS, F.** (2011). Bactériologie médicale Techniques usuelles. ELSEVIER-MASSON.
- **Donlan, R. M.** (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), p. 881.
- **Driche, E. H., Sabaou, N., Bijani, C., Zitouni, A., Pont, F., Mathieu, F., et Badji, B.** (2017). *Streptomyces sp.* AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6) page 1-13
- **Dunne.W. M.Jr,** (2002).Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? , *Clin Microbiol Rev* 15, n°2, p.p. 155-166.
- **Echchelh, A., Saouide el ayne, N., Chaouch, A., Auajjar, N., et Hamama.** (2014). Rôle de l'environnement hospitalier dans la prevention des infections nosocomiales: surveillance de la flore des surfaces a l'hôpital el idrissi de kenitra – MAROC. *European Scientific Journal*, 10(9).
- **Fauchere, J., et Avril, J.** (2002). Principales analyses pratiquées en biologie médicale. *Bactériologie générale et médicale*. Paris: Ellipses, 210.
- **Faye-Ketté, H., Dosso, H.** (2010). Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire: exemple du chu de Yopougon, Abidjan, Cote d'ivoire. *J. science*, 11(1), 73-81.
- **Fetsch, A.** (2018). *Staphylococcus aureus*. London: ELSEVIER.
- **Fritz, H. K., Kurt A. B., Eckert, J. S, Zinkernagel, R. M.** (2004). *Color Atlas of Medical Microbiology*. New York: Thieme.

## Références bibliographiques

---

- **Gnanamani, A., Hariharan, P., et Paul-Satyaseela, M.** (2018). *Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus*, 4, p. 28.
- **Goodfellow, M. et Williams, S. T.** (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review Microbiology.*, 37 (1) page 189-216.
- **Goodfellow, M., Whitman, W. B., Kämpfer, P., Busse, H. J. Ludwig, W., Trujillo, M.E. ET Suzuki, K.,** (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, seconde edition, Vol. 5, part 2, Goodfellow et al. (Eds.), Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2083 p.
- **Goodfellow, M., Williams, S.T. ET Mordarski, M.** (1984). - Introduction to and importance of the actinomycetes. In *The biology of the actinomycetes.* (Eds.). Academic Press, London, page.512 (1-6).
- **Graves, N.** (2004). Economics and preventing hospital-acquired infection. *Emerg Infect*, 10, 561-566.
- **Guertarni, N., Zouagui, S., Besbes, F., Derkaoui, A., Hanba, M., Ahmed Fouatih, Z.** (2016). Infections Nosocomiales (IN) : Enquête de prévalence et d'identification des facteurs de risque dans un centre hospitalier universitaire de la région ouest d'Algérie, 2016. *LA REVUE MÉDICALE DE L'HMRUO*, 4(2), 584-590.
- **Gupta, A., Singh, D., Singh, SK, Singh, VK, Singh, AV et Kumar, A..** (2019). Rôle des actinomycètes dans la synthèse bioactive et nanoparticulaire. In *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology*, pp. 163-182.
- **Hanrahan, R., et Beigi1, J.** (2007). *Staphylococcus aureus* and MRSA Colonization Rates among Gravidas Admitted to Labor and Delivery: A Pilot Study. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, pp. 1-5.
- **Heidari, H., Hadadi, M., Sedigh Ebrahim-Saraiea, H., Mirzaei, A., Taji, A., Hosseini, S.R., Motamedifar, M.** (2018). Characterization of virulence factors, antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus spp.* strains isolated from corneal infection. *Journal francais d'ophtalmologie*, 41(9), 823-829.
- **HENRICI, A.T.** (1933). Studies of freshwater bacteria. A direct microscopic technique. *J. Bacteriol.*, 25, 277-287.

- **Hola, V., ET Ruzicka, F.** (2011). The Formation of Poly-Microbial Biofilm on UrinaryCatheters, *Urinary Tract Infections*, 153- 172.
- **Hopwood, D.A., Lydiate, D.J., Malpartida, F. ET Wright, H. M.** (1985). Conjugative sex plasmids of *Streptomyces*. *Plasmids in Bacteria* page 615-634.
- **Horswill, J., Lister, L., et Alexander, R.** (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection Microbiology* , 1-6.
- **Houdt R. V., et Michiels, C.** (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia*. *Res. Microbiol*, 156, 626-633.
- **Irie, Y., Parsek, M. R.** (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top.Microbiol. Immunol.*, 322, 67- 84.
- **Iung, B.** (2019). Endocardite infectieuse. *Épidémiologie, physiopathologie et anatomopathologie.* (Elsevier, Éd.) *La Presse Médicale*, 48, 513-521.
- **Jenkins D.R.** Nosocomial infections and infection control *Medicine*, 45 (2017), pp. 629-633
- **Jenul, C., ET Horswill, A. R.** (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology Spectrum*, 6(1). doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018
- **Jhalka, K., Smith, T. C., et Thapaliya, D.** (2014, Avril 1). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. p. 2.
- **Kaali, P., Strömberg, E., et Karlsson, S.** (2011, Janvier 08). Prevention of Biofilm Associated Infections and Degradation of Polymeric Materials Used in Biomedical Applications. (M. A. Laskovski, Éd.) *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, pp. 513-540.
- **Kara Terki , I., Hassaine, H., Kara Terki, A., Nadira, B., Kara Terki, N., Bellifa, S., Mhamedi, I., et Iachachi, M.** *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology.* 2020 volume 21 (4)page 304 – 310
- **Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., et Thurnheer, T.** (2020). Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), pp. 668-681.

- **Kavanaugh, N. L., ET Ribbeck, K.** (2012). Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas spp.* And *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057-4061
- **Kayser, F., Bienz, K., Eckert, J., et Zinkernagel, R.** (2004). *Color Atlas of Medical Microbiology*. London: Thieme.
- **Kelly, K. L. ET Judd, D. B.** (1976). *Color. Universal Language and Dictionary of Names* (National Bureau of Standards Special Publication 440). Washington, DC: US Department of Commerce.
- **Kerboua -Alliouch, C., Kirane, D. G., et La Scola, B.** (2015). Activité antimicrobienne d'une *Actinomycétale* isolée d'une lagune en Algérie. *Annales de Biologie Clinique*, 73(2), pp. 176-180.
- **Khatoun, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., et Alarcon, E. I.** (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12), pp. 1-36.
- **Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., Chun, J.** (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64:346–351
- **Kim, Y.G., Lee, J.H., Kim, C.J., Lee, J.C., Ju, Y.J., Cho, M.H. ET Lee, J.** (2012) Antibiofilm activity of *Streptomyces sp.* BFI 230 and *Kribbella sp.* BFI 1562 against *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 1607-17.
- **Kloos, M., et Veron W.E.** (1990). *Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus»*. J.Fleurette 2ème édition, 773-794.
- **Kolenda, C., Josse, J., Medina, M., Fevre, C., Lustig, S., Ferry, T., Laurent, F.** (2019). Évaluation de l'efficacité d'un assemblage de trois bactériophages anti *Staphylococcus aureus* contre les bactéries au sein du biofilm ou internalisées dans les ostéoblastes. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(9), pp. 84-85.
- **Kong, C., Chee, C. F., Richter, K., Thomas, N., Rahman, N. A., ET Nathan, S.** (2018). Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. *Scientific reports*, 8(1), pp. 1-16.
- **Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J. G, Nijland, R.** Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbial Biotechnology.* , (2010), vol 86, p.813–823.

## Références bibliographiques

---

- **Larquey, M., et Mahé, E.** (2018). Infections cutanées à staphylocoque et streptocoque chez l'enfant. *Perfectionnement en Pédiatrie*, 1(1), pp. 25-31.
- **Lasa, J., Del Pozo, L., Penadés, J. R., Leiva, J.** (2005). Biofilms bacterianos e infección. *COLABORACIÓN ESPECIAL*, 28, 163-175.
- **Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G et Marinelli, F.** (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(3/4), 399–405. doi:10.1023/a:1010287600557.
- **Le loir, Y., et Gautier, M.** (2010). *Staphylococcus aureus*. Paris: LAVOISIER.
- **Lebeaux, D., Ghigo, J. M.** (2012). Infections associées au Biofilm Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *médecine/sciences*, 28, 727-739.
- **Lechevalier, M. P.** (1981). – Ecological associations involving actinomycetes. In: *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. Suppl.*, 11, 159-166
- **Lechevalier, M. P., De Bievre, C., Lechevalier, H.** (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, volume 5 (4) . Page 249-260.
- **Lecuire, F., Gontier , D., Carrere, J., Basso, M., Benareau I., et Rubini, J.** (2007). Infections à *Staphylocoque lugdunensis* sur prothèses articulaires. *chirurgie orthopédique*, 93, 88-92.
- **Lee, A.S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A., Harbarth S** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers* vol 4, 18033 (2018).
- **Lee, J. H., Kim, Y. G., Kim, C. J., Lee, J. C., Cho, M. H. ET Lee, J.** (2012) Indole-3-acetaldehyde from *Rhodococcus sp.* BFI 332 inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, page1071-1079.
- **Lee, J. H., Kim, Y. G., Lee, K., Kim, C. J., Park, D. J., Ju, Y., Et Lee, J. C., Thomas K ., Lee, J et W.** (2016). *Streptomyces*-derived actinomycin D inhibits biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and its hemolytic activity. *Biofouling*, 32(1), 45–56. doi:10.1080/08927014.2015.1125888
- **Lene, K. V., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L. L.** (2020). Bacterial biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 9(2), p. 59.

## Références bibliographiques

---

- **Lombardi, P. ET Crisanti, A.** (1997). Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacology and Therapeutics*, vol 76 , page 125-133.
- **Loqman, S.** (2009). Isolement, caractérisation de souches de bactéries *Actinomycétales* antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc : Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie. Pp: 253.
- **Lowy.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The new england journal of medicine*, 339, 520–532.
- **Maalej, S. M., Toumi, S., Chakroun, A., Trabelssi, J. J., Haddar, M., Hmida, M., et Hammami, E.** (2020). Dépistage Du Portage Nasal De *Staphylococcus aureus* Chez Les Patients Hémodialysés Chroniques – Screening For *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage In Chronic Hemodialysis Patients. *Journal de l'Information Médicale de Sfax*, 24-30.
- **Mann, E. E., ET Wozniak, D. J.** (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, vol 36(4), page 893–916.
- **Mannala, GK, Koettnitz, J., Mohamed, W., Sommer, U., Lips, KS, Spröer, C., ... et Alt, V.** (2018). Comparaison du génome entier d'isolats de *Staphylococcus aureus* hautement et faiblement virulents induisant des infections osseuses associées aux implants. *Journal international de microbiologie médicale* , 308 (5), 505-513.
- **Margot, P., et Chantal, G.** (2009). Les infections nosocomiales s - Agir ensemble pour des milieux. *La gestion des risques 1re partie*, pp. 1-19.
- **Masand, M., Sivakala, K. K., Menghani, E., Thinesh, T., Anandham, R., Sharma, G., et Jose, P. A.** (2018). Biosynthetic potential of bioactive *Streptomyces* isolated from arid region of the Thar desert, Rajasthan (India). *Frontiers in microbiology*, 9, p. 687.
- **Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, DJ., Fatma, T., Rattan, A.** (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24, 25-29.
- **Mehnaz, S., Abdulla, M. K., Aiysha, D., Zaheer, A., ET Mukhtar, S.** (2017). *Actinomycetes*: a source of industrially important enzymes. *J Proteomics Bioinform*, an open access journal. Volume 10(12) page 316-319.

## Références bibliographiques

---

- **Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A.** (2011) - Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic *Actinomycetes* in Saharan Soils of Algeria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 page 6710-6714.
- **Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H., Sabaou, N.** (2013) . *Actinopolyspora mzabensis sp. nov.*, a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Volume 63 page 3787–3792.
- **Meklat, A., Bourasa, N., Mokrane, S., Zitounia, A., Djemouaia, N., Klenk, H. P., Sabaou, N., et Mathieu, F.** (2020). Isolation, Classification and Antagonistic Properties of Alkalitolerant Actinobacteria from Algerian Saharan Soils. *Geomicrobiology Journal*, 37(9), 826-836.
- **Meneses, M. L., et Landoni, M. F.** (2011). Biofilms Bacterianos. *Analecta Vet*, 31(2), 44-49.
- **Minary-Dohen, P., Floret, N., Bailly, P., Dohen, R., Bertrand, X., et Talon, D.** (2007). Le staphylocoque doré résistant à la méticilline dans les services et établissements de moyen séjour : quelle stratégie proposer ? *Pathologie Biologie*, 53, pp. 105-110.
- **Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme hospitalière; Réseau algérien de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.** (2020). Standardisation Des Tests De Sensibilité Aux Antibiotiques A L'échelle Nationale. Alger: La collaboration de l'OMS.
- **Mobolaji Felicia, A., et Olubukola Oluranti , B.** (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *african journal of agricultural research*, 7(15). doi:10.5897/ajarx11.071
- **Moormeier, D. E., et Bayles, K. W.** (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology*, 104(3), pp. 365-376.
- **Morris, J., Kelly, N., Elliott, L., Grant, A., Wilkinson, M., Hazratwala, K., et McEwen, P.** (2019). Evaluation of bacteriophage anti-biofilm activity for potential control of orthopedic implant-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Surgical infections*, 20(1), pp. 16-24.
- **Muhsin, J., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Asif Nawaz, M., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Atif Kamil, M.** (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11.

## Références bibliographiques

---

- **Musk, D.J., Banko, D.A., Hergenrother, P.J.,** (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & biology* 12, 789-796.
- **Naeem Khwen, N., Faraj AL-Marjani, M., Hassan Authman, S.** (2021). Purification and characterization of thermo stable DNase of *Staphylococcus gallinarum* isolated from burns. *Materials Today*, 42, 2334-2339.
- **Naik, D.N., Wahidullah, S., ET Meena, R.M.** (2013) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by marine invertebrate-derived *Streptomyces sp.* *Lett Appl Microbiol* 56, 197-207.
- **Narayana, P. S. V. V. S., ET Srihari, P. S. V. V.** (2019). Biofilm resistant surfaces and coatings on implants: A review. *Materials Today: Proceedings*, 18, 4847-4853.
- **Obeizi, Z., Benbouzid, H., et Djahoudi, A.** (2020,). Évaluation de l'activité antibactérienne et anti-biofilm des nanoparticules de dioxyde d'étain (SnO<sub>2</sub>). *Journal of Advanced Research in Science and Technology*. 7(2),page 22-34. ISSN: 2352-9989
- **Oja, T., San Martin Galindo, P., Taguchi, T., Manner. S., Vuorela, P.M., Ichinose, K., Metsä-Ketelä, M. ET Fallarero, A.** (2015) Effective Antibiofilm polyketides against *Staphylococcus aureus* from the pyranonaphthoquinone biosynthetic pathways of *Streptomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 6046-52.
- **Oliveira, W.F., Silva, P.M.S., Silva, R.C.S., Silva, G.M.M., Machado, G.** (2017). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, 1-7.
- **Otto, M.** (2018). Staphylococcal biofilms. *Microbiology spectrum*, 6(4), pp. 6-4.
- **Pace, J., Mark, L., Rupp, E., Roger G. F.** (2006). *Biofilms infection, and antimicrobial therapy*. Boca Raton: Taylor and Francis Groupe.
- **Pais-Correia, A. M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., et Thoulouze, M. I.** (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *nature medicine*, 16(1), 83-90.
- **Palla, M. S., Guntuku, G. S., Muthyala, M. K. K., Pingali, S., ET Sahu, P. K.** (2018). Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing



- actinomycete from mangrove soil. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 7(2), page 250–256. doi:10.1016/j.bjbas.2018.02.006
- **Palmer .J., Flint .S., Brooks .J,** (2007 ). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology n°34,p. p.577-588.
  - **Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., et Cheng, Z.** (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, 37(1), pp. 177-192.
  - **Pinto, R. M., Lopes-de-Campos, D., Martins, M. C. L., Van Dijck, P., Nunes, C., et Reis, S.** (2019). Impact of nanosystems in *Staphylococcus aureus* biofilms treatment. FEMS microbiology reviews, 46(6), pp. 622-641.
  - **Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., ET Kapadnis, B.** (2013). Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource. BioMed Research International, 2013, 1–8. doi:10.1155/2013/264020
  - **Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., et Kapadnis, B.** (2013). *Actinomycetes*: A Repertory of Green Catalysts with a Potential. BioMed Research Internationa, 1-8.
  - **Prescott, Willey, J., Sherwood L. M., Woolverton, C.,** (2013). Microbiologie. 4<sup>ème</sup> édition, de boeck, Paris, 1070p.
  - **Prokopenko, V.V., Zenova, G.M. ET Manucharova, N.A.** Ecophysiological Characteristics of Psychrotolerant *Actinomycetes* in Tundra and Forest Landscapes. Eurasian Soil Sc. 52, 682–689 (2019).
  - **Pronovost, P., Needham, D., Berenholtz, S., Sinopoli, D., Chu, H., Cosgrove, S., ... & Goeschel, C.** (2006). Une intervention visant à réduire les infections sanguines liées aux cathéters dans les soins intensifs. Journal de médecine de la Nouvelle-Angleterre , 355 (26), 2725-2732.
  - **Rajivgandhi, G., Vijayan, R., Maruthupandy, M., Vaseeharan, B., et Manoharan, N.** (2018). Antibiofilm effect of *Nocardiosis sp.* GRG 1 (KT235640) compound against biofilm forming Gram negative bacteria on UTIs. Microbial Pathogenesis, 118, pp. 190-198.

- **Ranjani, A., dhanasekaran, D., ET Gopinath, P.** (2016). an introduction to actinobacteria, open access peer-reviewed chapter, DOI : 10.5772/62329
- **Rapuoli, R.** (2017). *Staphylococcus aureus* Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis (Vol. 409). Cham, Switzerland: SPRINGER.
- **Ressource d'amélioration pour les préjudices à l'Hôpital.** (2020, Avril). Infections à *Clostridium difficile*, à SARM ou aux ERV. Canada.
- **Roux, A., et Chigo, J. M.** (2006). Les biofilms bactériens Bactériel biofilms . Paris, France: Bull. Acad. Vét. France.
- **Rumbaugh, K. P., ET Sauer, K.** (2020). Biofilm dispersion. Nature Reviews Microbiology. doi:10.1038/s41579-020-0385-0.
- **Rumbaugh, K. P., et Sauer, K.** (2020). Biofilm dispersion. Nature Reviews Microbiology, 18(10), pp. 571-586.
- **Saitou, K., Furuhashi, K., Kawakami, Y., et Fukuyama, M.** (2009). Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. Biocontrol science, 14(2), pp. 65-68.
- **Sakly, H., Tilouch, L., Ben Azaiez, M., Boughattas, S., Ketata, S., et Bouallégue, O.** (2020). Étude de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant chez les brûlés. Médecine et maladies infectieuses, 50(6), 38.
- **Sanglier, J. J., Wellington, E. M. H., Behal, V., Fiedler, H. P., Ellouz Ghorbel, R., Finance, C., Hacene, M., Kamoun, A., Kelly, C., Mercer, D.K., Prinzis, S., Trigo, C.** (1993). Novel bioactive compounds from *actinomycetes*. Research in Microbiology, 144(8), 661–663.

- **Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P.a, et Aryal, S.** (2020). Isolation, Characterization, and Screening of Antimicrobial-Producing Actinomycetes from Soil Samples. *International Journal of Microbiology*, 1-7.
- **Schwarz, S., Kehrenberg, C. et Walsh, T.R.** (2001) – Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6) , 431-437.
- **Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Sari-Belkharroubi, L., ET Boucherit, K.** (2017). Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (Candida – bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(1), 20–27. doi:10.1016/j.mycmed.2016.10.005
- **Selim, M.S. M., Abdelrazek ,A.S., Mohamed, S.S.** (2021). Secondary metabolites and biodiversity of *actinomycetes*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.volume 19(1) ,page 1-13.
- **Sharma, D., Misba, L., et Khan, A. U.** (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), pp. 1-10.
- **Simon, P., Meunier, R.** (1970). *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. 452p.
- **Singh, L. S., Mazumder, S., Bora, T. C.** (2009). Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by salt- tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Mycol*, 19, pp. 225-233.
- **Singh, R., et Dubey, A. K.** (2020). Isolement et caractérisation d'une nouvelle souche d'Actinobactérie endophyte *Streptomyces californicus* ADR1 en tant que source prometteuse de métabolites antibactériens, anti-biofilms et antioxydants. *Microorganismes*, 8(6), 929. doi:10.3390/microorganisms8060929
- **Sousa, C., Henriques, M., et Oliveira, R.** (2011, juillet 01). Antimicrobial central venous catheters – recent advances and strategies. *Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27(6), 609-620.
- **Stapley, E. O., Woodruff, H.B.** (1982). Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan. *International Trends in Antibiotic Research : Genetics Biosyntheses ,action and new substances* (Eds; Umezawa, H., Demain, AL., Hata, T., & Hutchinson, CR.) JARA., Tokyo, 154-170.

- **Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B.S., Vabic-Vlahovic, M.** (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40: 175–179.
- **Stewart, P. S., ET Costerton, J.W.** (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135–138
- **Subhashini, D. V.** (2018) Rapid technique for selective isolation of actinomycetes from soil. *Advances Plants Agriculture Research*. vol 8(6) page 569–571
- **Suzuki, N., Ohtaguro, N. and Yoshida Y., Hirai M., Matsuo H., Yamada ., Nobutaka I., Tomofusa T.** (2015) A compound inhibits biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from *Streptomyces*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 38(6) ,page 889-92.
- **Takahashi, E., Kimura, T., Nakamura, K., Arahira, M., et Iida, M.** (1995). – Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix sp.* ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, 48 (10), 1124-1129.
- **Tam, K., et Torres, V. J.** (2019). *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiology spectrum*, 7(2), pp. 2-7.
- **Tanvir, R., Sheikh, A. A., ET Javeed, A.** (2018). Endophytic Actinomycetes in the Biosynthesis of Bioactive Metabolites: Chemical Diversity and the Role of Medicinal Plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 399–424. doi:10.1016/b978-0-444-64181-6.00011-5
- **Thomas, A., Jan Verhaegen, Willy E. Peetermans, Marc F. Hoylaerts, et Peter Verhamme.** (2010). Dabigatran Inhibits *Staphylococcus aureus* Coagulase Activity. *CLINICAL MICROBIOLOGY*, 48(11), 248–4250.

- **Tomlin, R. G. M.** (2005). Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208- 5218.
- **Touati, A., Achour, W., et Abbassi, A. B. H.** (2007). Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques. *Pathologie Biologie*, 55, 277-288.
- **Touchon, M., Perrin, A., De Sousa, J. A. M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C. L., et Rocha, E. P.** (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS genetics*, 16(6), p. e1008866.
- **Trifi, A., Abdellatif, S., Oueslati, M., Zribi, M., Daly, F., Nasri, R et Lakhal, S. B.** (2017). infections nosocomiales: état des lieux dans un service de réanimation nosocomial infections: current situation in a resuscitation-unit. *La Tunisie medicale*, 95(3), pp. 179-184.
- **Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., et Inamori, Y.** (2003). Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardioopsis prasina* OPC-131. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2), 894–900
- **Vainshtein, B. K., Melik-Adamyany, W. R., Barynin, V. V., Vagin, A. A.** (1981). Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature* 293 , pp. 411-412.
- **Valan Arazu, M., Duraipandiyani, V., Agastian, P., Ignacimuth, U.** (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces spp.* ERI-26 recovered from. *J. de Myco. Med*, 18, 147-153.
- **Vallet. I., Oison. J. W., Lory. S., Lazdunski .A., Filloux A,** (2001). The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gen clusters (cup) and their involvement in biofilm formation, *Processing* , the National Academy of Science of USA n°98 (12),p.p. 6911-6916.
- **Van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P.** (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392–416.
- **Vandecandelaere, I., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Coenye, T.** (2017, March 6). Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*, pp. 1-19.

## Références bibliographiques

---

- **Vincenot, F., Maher, S., Gilles, P.** (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone Des Laboratoires*, pp. 62-69.
- **Von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Habich, D.** (2006). Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival? *Volume 45(31)*, 5072-5201.
- **Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. ET Bhole, B.D.** (2001). - How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, volume 176 (5), 386-390.
- **Wendt, C., Wiesenthal, B., Dietz, E., Ruden, H.** (1998). Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *Journal of clinical microbiology*, 36(12), 3734-3736.
- **Xie, T. T., Zeng, H., Ren, X.P., Wang, N., Chen, Z.J., Zhang, Y. et Chen, W.** (2019). Activité antibiofilm de trois souches d'Actinomycètes contre *Staphylococcus epidermidis*. *Lettres en microbiologie appliquée*, 68(1), page 73-80.
- **Yang L, Liu Y, Wu H, Song Z, Hoiby N, Molin S, Givskov M.** Combating biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2012), vol 65 (02), page 146–157.
- **Zimmerli, W., et Moser, C.** 2012- Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* n° 65(2), p.p.158–168.
- **Zitouni, A, Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., ET Labeda, D. P.** (2004). *Saccharothrix algeriensis* sp. Nov, isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), page 1377–1381.

# Annexes

## Annexe 01 : Matériel non biologique

### • Matériel du laboratoire

- Ecouvillons stériles
- Lame et lamelles
- Seringue
- Pipettes pasteur
- Boîtes de pétri
- Anse de platine
- Etuve
- Bec benzène
- Micropipettes
- Rotavapor
- Agitateur
- Tubes stériles
- Shaker
- Centrifugeuse
- Ampoules stériles
- Bain marie
- Autoclave

## Annexe 02 : Les Milieux de cultures et les solutions utilisées

### ❖ Milieux de cultures liquides

- **Bouillon nutritif** : est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Composition :

- Chlorure de potassium.....0,425g/l
- Chlorure de calcium.....0,125g/l
- Sulfate de magnésium.....0,125g/l
- Chlorure ferrique.....0,0025g/l
- Peptones .....10g/l



- Hydrolysate de caséine .....5g/l

Préparation : Dissoudre 60,2 g de poudre dans un litre d'eau distillée.

- **Bouillon Cœur-cerveau (B.H.I.B)** : Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements pauci microbiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant le développement d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes (**DENIS, 2011**).

Composition :

- Infusion de cervelle de veau.....12.5g
- Infusion de cœur de bœuf..... 5g
- Peptone.....10g
- Glucose.....2g
- Chlorure de sodium.....2g
- Phosphate di sodique.....5g
- pH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

- **ISP2 : The International streptomyces Project 2**

Préparation Par litre :

- Extrait de levure .....4 g
- Extrait de malt .....10 g
- Glucose .....4 g
- Eau distillés q.s.q .....1000 ml
- pH .....7,2
- **TSBG : Trypticase Soja Bouillon Glucosé**
- Hydrolysate tryptique de caséine.....17g
- Peptone de soja.....3g
- Chlorure de sodium.....5g
- Phosphate dipotassique.....2,5g
- Glucose.....2,5g
- pH 7,3 ± 0,2 à 25°C

### ❖ Milieux de cultures solides

- **La gélose nutritive** : appelée aussi le milieu ordinaire, elle est utilisée pour la conservation des souches bactériennes à court terme.

Composition :

- Extrait de viande.....1,0 g/L
- Extrait de levure.....2,0 g/L
- Peptone.....5,0 g/L
- Chlorure de sodium..... 5,0 g/L
- Agar-agar..... 15,0 g/L
- pH = 7,0

Préparation : 28g de poudre de GN dans 1L (Stérilisation à l'autoclave)

- **Le milieu Chapman** : Pour l'isolement des staphylocoques, Le milieu de Chapman est un milieu au mannitol, hyper salé (75 g/l de chlorure de sodium), qui est sélectif pour les staphylocoques à l'exception de quelques espèces halophiles appartenant à d'autres genres bactériens (**DENIS, 2011**).

Composition : La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

- Extrait de viande (bovin ou porcine).....1g
- Peptone de caséine et de viande (bovin et porcine).....10g
- Chlorure de sodium.....75g
- Mannitol.....10g
- Agar.....15g
- Rouge de phénol.....25g
- pH=7,6

Préparation : 111g par litre d'eau distillée, stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

- **Le milieu Mueller Hinton** : C'est la gélose la plus communément utilisée.

L'utilisation de ce dernier est recommandée par le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Cette gélose MH peut être supplémentée en sang frais ou en sang cuit lorsque les bactéries testées nécessitent ces milieux enrichis (**DENIS, 2011**).

Composition :

- Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17,5 g
- Extrait de viande.....2 g
- Amidon soluble.....1,5 g
- Calcium.....20 à 25 mg
- Magnésium.....10 à 12,5 mg
- Agar.....17,0 g
- pH = 7,4 +/- 0,2

Préparation :

Mettre en suspension 35g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée, puis autoclaver le mélange à 120°C pendant 20 minutes.

### - Milieu Rouge Congo Agar

- BHIB ..... (37 g/L)
- Saccharose..... (50 g/L)
- Agar agar..... (10 g/L)
- Rouge Congo..... (0,8 g/L)

Préparation : Le rouge Congo a été préparé sous forme de solution aqueuse concentrée autoclavé à 121°C pendant 15 minutes, séparément des autres constituants du milieu et ensuite ajouté lorsque la gélose est refroidie à 55°C

### ❖ Les solvants utilisés pour l'extraction des molécules bioactives :

- Dichlorométhane
- Acétate d'éthyle

### ❖ Les solutions utilisées

- Eau physiologique stérile (composition en g/l)
  - Chlorure de sodium (NaCl).....9 g.
  - Eau distillée.....1000 ml.
  - pH = 7
- Cristal Violet 0.2%
  - 200 mg Cristal Violet
  - 25ml Méthanol

- 75ml Eau distillée
- Conservé à une température ambiante

❖ **Les antibiotiques utilisés pour la réalisation de l'antibiogramme**

- Rifampicine (30µg)
- Tétracycline (30µg)
- Chloramphénicol (30µg)
- Gentamycine (10µg)
- Céfoxitine (30µg)
- Acide Fusidique (10µg)
- Erythromycine (15µg)
- Pénicilline G (10µg)
- Amikacine (30µg)

**Annexe 03 : Les tableaux**

**Tableau V** : Résultats de l'identification biochimique des souches isolées par la galerie ApiStaph.

Tests	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	UREE	LSTR
6736152	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-

