*République Algérienne Démocratique et Populaire*
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tebessi –Tebessa-
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de laVie
Département de Biologie Appliquée
Domaine des Sciences de la Nature et de laVie

# Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
En : Sciences biologiques
Option:Microbiologie
Par :

**M$^{elle}$.RAIS Roufaida & M.MOKRANE Med Yanis**

**Intitulé:**

# Screening de souches d'actinomycetes extremophiles Productrices d'antibiotiques et d'antifongiques

**Devantlejury**

| | | | |
|---|---|---|---|
| M.DJABRIBelkacem | Professeur | Université de Tébessa | Président |
| Mme. BENHADJ Mabrouka | MCA | Université de Tébessa | Rapportrice |
| Mme.TOUMINassima | MCB | Université de Tébessa | Examinatrice |

Année universitaire : 2024/2025

**Table des matières** **Pages**

**ملخص**
**Abstract**
**Résumé**
**Dédicace**
**Remerciement**
**Liste d'abréviation**
**Liste des tableaux**
**Liste des figures**
**Introduction**
**Synthèse bibliographique**
**ChapitreI:Généralités sur les actinomycètes**
**1.1 Histoire** **5**
**1.2 Définition** **5**
**1.3Ecologie et distribution dans la nature** **6**
**1.3.1Habitats principaux** **6**
**13.2.Facteurs environnementaux influençant leur distribution** **7**
**1.3.3.Role sécologiques** **7**
**1.4.Taxonomie et classification** **7**
**1.5.Criteres actuels d'identification** **8**
**1.5.1.Caracteres culturaux** **8**
**1.5.2.Caracteres morphologiques** **9**
**1.5.2.1.Streptomyces** **9**
**1.5.2.2.Arthrobacter** **10**
**1.6.L'importance des actinomycètes** **11**
**ChapitreII:Production des antibiotiques et antifongiques**
**II.1.Metabolosime des actinomycètes** **13**
**II.1.1.Metabolisme primaire des actinomycètes** **13**
**II.1.2.Metablisme secondaire des actinomycètes** **13**
**II.2.Production des molécules bioactives** **14**
**II.3.Les antibiotiques** **16**
**II.3.1.Définition** **16**
**II .3.2.Classification** **16**
**II.3.3.Mode d'action** **16**
**II.4.Les antifongiques** **18**
**II.4.1.Définition** **18**
**II .4.2.Classification** **18**
**II.4.3.Mode d'action** **19**
**Partie expérimentale**
**I.Matériels et méthodes** **23**
**I.1.Materiels utilisés** **23**
**I.1.1.Materiels non biologiques** **23**
**I.1.1.1.Grands matériels** **23**
**I.1.1.2.Petits matériels** **23**
**I.1.2.Materiels biologiques** **24**
**I.1.2.1.Les actinomycètes** **24**
**I.1.2.2.Les souches indicatrices** **24**
**I.1.2.3.Les milieux de culture utilisés** **24**
**I.1.2.4.Les solutions et les solvants utilisés** **24**
**I.2.Methodes utilisées** **25**

**I.2.1.Origine des souches** **25**
**I.2.2.Ensemencementet purification des isolats** **25**
**I.2.3.Preparationde l'inoculum** **26**
**I.2.4.Méthode de cylindre d'agar** **26**
**I.2.5.Extraction des molécules actives** **27**
**I.2.5.1.Préparation del'inoculum pour test** **27**
**I.2.6.Recherche de l'activité des extraits** **27**
**I.2.6.1.Méthode des disques** **27**
**II.Résultats et discussion**
**II.1.Méthode de cylindres d'agar** **30**
**II.1.1.Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches** **31**
**II.2.Extraction des molécules bioactives** **44**
**II.2.1.Test d'activité antimicrobienne** **44**
Conclusion **47**
**Références bibliographiques** **49**
**Annexes** **55**

# ملخص


تُعرف الأكتينوميسيتات،و هي بكتيريا خيطية موجبة الغرام،بقدرتها على إنتاج المستقبلات الثانوية النشطة بيولوجياً،وخاصة المضادات الحيوية ومضادات الفطريات.

واستجابةً لظهور سلالات ممرضة مقاومة،يهدف هذا البحث إلى عزل وفحص سلالات أكتينوميسيتية محبة للظروف القاسية،مثلا لبيئات المالحة أو القلوية،من أجل تقييم قدرتها على إنتاج مركبات مضادة للميكروبات.

فعالة جديدة جزيئات على التعرف في الهدف يكمن و

شملت المنهجية عزل وتنقية 25سلالة من الأكتينوميسيتات قُدمت من قبل مختبر علم الأحياء الدقيقة بجامعة تبسة.

وقد تم استخدام تقنيات التخطير(streakوالزراعة على أوساط انتقائيةGYEA)،LB،

.(Sabouraudو تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقة الأسطوانة على وسط الآجار ضدالبكتيريا المستهدفة،وكذلك تقييم تثبيط الخمائر و الفطريات(25سلالة مؤشر).

تم استخلاص المستقبلات باستخدام مذيبات عضوية(الإيثانول،البيوتانول،ثانيكلوروميثان،والأسيتات الإيثيلية)لتحديد المركبات النشطة.

ركزا لتحليل على قياس أقطار مناطق التثبيط في الأيام3،7،10،و14،وتم اختيار أكثر السلالات نشاطا ًلمزيد من الدراسة.

أظهرت عدة سلالات من الأكتينوميسيتات نشاطاً مضاداً واعداً:

أظهرت السلالاتATSP6،ATSP8،وATP50تثبيطاً قوياً لـ.*coliE*،بينما كانت السلالتانATSP13 وATP39فعالتين ضد*Bacillussubtilis*و*Staphylococcusaureus*مع، مناطق تثبيط وصلت إلى30 مم.

أما بالنسبة للفطريات،فقد أظهرت السلالتانATP50وGH65نشاطاًضد*kruseiCandida*،كماأبدت السلالةATSP79فعالية ضدملحوظة.*Talaromycesamestolkiae*

وأظهرت السلالاتATSP15،ATSP25،ATP28،ATP41،وATP46نشاطاً واسعا لطيف وثباتاً في إنتاج المستقبلات.

ختاماً،تؤكد هذه الدراسة على أن الأكتينوميسيتات المحبة للظروف القاسية تُعد مصدراً واعداً لاكتشاف مضاداتحيوية ومضادات فطرية جديدة.

وتستحق السلالات المختارة،خاصةATP50وATSP79،المزيد من التوصيف ،بما فيذلك تحديد المركبات النشطة و الاختبارات في الجسم الحي،لأغراض طبية أو بيوتكنولوجية مستقبلية.



**الكلمات المفتاحية**:الأكتينوميسيتات،المحبة للظروف القاسية،المضادات الحيوية،مضادات الفطريات،مقاومة الميكروبات،الفحص البيولوجي.

## ***Résumé :***

Les actinomycètes, des bactéries filamenteuses à Gram positif, sont reconnus pour leur capacité à produire des métabolites secondaires bioactifs, notamment des antibiotiques et des antifongiques. Face à l'émergence de souches pathogènes résistantes, cette étude vise à isoleret cribler des souches d'actinomycètes extremophiles, adaptées à des milieux hostiles comme les sols salins ou alcalins, pour leur potentiel à produire des composés antimicrobiens. L'objectif est d'identifier de nouvelles molécules actives contre des pathogènes.

La méthodologie a consisté en l'isolement et la purification de 25 souches d'actinomycètes fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Université de Tébessa. Les techniques utilisées incluent l'ensemencement par stries et la culture en milieux sélectifs (GYEA, LB, Sabouraud). Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés par la méthode des cylindres d'agar contre des bactéries cibles et par évaluation de l'inhibition de levureset dechampignons (25 souches indicatrices). Les métabolites ont été extraits à l'aide de solvants organiques (éthanol, butanol, Dichlorométhane (DCM) et Acétat d'ethyle) pour identifier les composés actifs. L'analyse a porté sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition aux jours 3, 7, 10 et 14, avec une sélection des souches les plus actives pour des tests approfondis.

Plusieurs souches d'actinomycètes ont démontré une activité antimicrobienne prometteuse. ATSP6, ATSP8 et ATP50 ont fortement inhibé *E. coli*, tandis qu'ATSP13 et ATP39 étaient efficaces contre *B. subtilis* et *S. aur*eus dont les zones d'inhibition allant jusqu'a 30mm . Contre les champignons, ATP50 et GH65 ont inhibé *Candida krusei*, et ATSP79 s'est révélée particulièrement active contre *Talaromyces amestolkiae*. Les souches ATSP15, ATSP25, ATP28, ATP41 et ATP46 ont présenté un large spectre d'action et une production stable de métabolites.

En conclusion, cette étude confirme le potentiel des actinomycètes extrêmophiles comme réservoir de nouveaux antibiotiques et antifongiques. Les souches sélectionnées, notamment ATP50 et ATSP79, méritent une caractérisation approfondie, incluant l'identification des molécules actives et des tests *in vivo*, pour des applications médicales ou biotechnologiques futures.



**Mots-clés:** Actinomycètes, extrêmophiles, antibiotiques, antifongiques, résistance microbienne, criblage.

## ***Abstract:***

Actinomycetes, filamentous Gram-positive bacteria,are well known for their ability to produce bioactive secondary metabolites, particularly antibiotics and antifungals.

In response to the emergence of resistant pathogenic strains, this study aims to isolate and screen extremophilic actinomycete strains—adapted to harsh environments such as saline or alkaline soils—for their potential to produce antimicrobial compounds. The goal is to identify new molecules active .

The methodology involved the isolation and purification of 25 actinomycete strains provided by the microbiology laboratory at the University of Tébessa.

Techniques used included streak plating and culturing on selective media (GYEA, LB, Sabouraud). Antimicrobial activitywas assessed usingthe agar cylinder method against target bacteria and by evaluating yeast and fungal inhibition (25 indicator strains). Metabolites were extracted using organic solvents (ethanol, butanol, DCM, and ethyl acetate) to identify active compounds. The analysis focused on measuring inhibition zone diameters on days 3, 7, 10, and 14, with the most active strains selected for further testing.

Several actinomycete strains demonstrated promising antimicrobial activity:ATSP6, ATSP8, and ATP50 strongly inhibited *E. coli*, while ATSP13 and ATP39 were effective against *B. subtilis* and *S. aureus* with inhibition zones of up to 30 mm. Against fungi, ATP50 and GH65 inhibited *Candida krusei*, and ATSP79 showed notable activity against *Talaromyces amestolkiae*. Strains ATSP15, ATSP25, ATP28, ATP41, and ATP46 exhibited broad-spectrum activity and stable metabolite production.

In conclusion, this study confirms the potential of extremophilic actinomycetes as a reservoir of new antibiotics and antifungals.

The selected strains, particularly ATP50 and ATSP79, warrant further characterization, including the identification of active molecules and in vivo testing, for future medical or biotechnological applications.



**Keywords**: Actinomycetes, extremophiles, antibiotics, antifungals, microbial resistance, screening.

# Dédicace:

Je dédie ce mémoire à mon cher père et ma chère mère , dont le soutien inconditionnel, l'amouretlessacrifices m'onttoujoursportéedanslesmomentslesplusexigeantsdetoutema vie .

À mes frères ' **Haythem**' et ' **Hamza** ' et ma soeur ' **Hiba** ', pour leur présence, leurs encouragements, leurs conseils et ces moments de complicité qui m'ont souvent redonné le courage de continuer.

À mes amis, pour leur écoute, leur compréhension et leur humour qui m'ont aidé à garder le cap, particulièrement **Rahil** et **Kaouther** : votre amitié a été une véritable lumière dans cette aventure.

À**Maroua**,poursesconseilséclairés,sonécouteattentiveetsagénérositéintellectuellequiont grandement contribué à l'enrichissement de ce travail.

À toute ma famille et à toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin, je vous remercie du fond du cœur.

Et enfin , a moi-même, pour ma persévérance, ma résilience face aux difficultés et ma déterminationàallerjusqu'au bout deceparcours.Cetravailest lefruit denombreuses heures de réflexion, de doute, mais aussi de progrès et de fierté personnelle.

**Roufaida**

# Dédicace:

Jedédiecemémoireàma famille, pourleur amourinconditionnelet leur soutiensans faille. À mes parents, et mes sœurs **Sara** et **Amel** quiont toujours cru enmoiet m'ont encouragé à poursuivre mes rêves avec détermination ainsi qu'une pensée a ma niéce **Lena** qui vient récemment de naitre.

UnremercîmentspécialepourMme**MarouaLimami**quinousaaiderorienterconseillerd'une maniéré fraternelle surtout dans les moments durs de cette période.

Àmesamisetfréresquelaviem'adonner**Abdelmalek,Brahim,Dhia,Soulaimen** et**Chiheb** ,pourleurprésenceréconfortanteetleurmotivationconstantedansleshautsmaissurtoutdans les bas.

Cetravailestaussidédiéàtousceuxqui,parleurexemple,m'ontinspiréàdonnerlemeilleur de moi-même.

MohamedYanis

# Remerciement:

Avant tout, nous rendons grâce à **Allah**, Le Clément, Le Miséricordieux, pour nousavoiraccordélaforce,lapatienceetlapersévérancenécessairespourmener à bien ce travail. Sans Sa volonté et Sa guidance, rien n'aurait été possible.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à **notre encadrante Mme Belhadj** ,poursonaccompagnement attentif, ses conseils avisés, sa disponibilité et la qualité de son encadrement tout au long de ce mémoire.

Nousremercionségalement**lesmembresdujury**pourl'honneurqu'ilsnousfont en acceptant d'évaluer ce travail. Leur temps, leur attention et leurs remarques sont pour nous d'une grande valeur.

# Listedesabréviations

**A.flav**:*Aspergillusflavus*

**A.fumig**:*Aspergillusfumigatus*

**A.nomius**:*Aspergillus nomius*

**A.sclero**:*Aspergillussclerotioniger*

**ATCC**:*American TypeCultureCollection*

**B.cereus**:*Bacilluscereus*

**B.subtilis**:*Bacillussubtilis*

**C.albicans**:*Candida albicans*

**E.coli**:*Escherichiacoli*

**GN**:Gélosenutritive

**GYEA**:*GlucoseYeast Extract Agar*

**ISP2**:*International StreptomycesProjectMedium2*

**LB**:*Luria-Bertani*

**S.aureus**:*Staphylococcusaureus*

**S.epidermidis**:*Staphylococcusepidermidis*

**DCM** : Dichlocométhane

# Liste des tableaux


| Tableaux | Titre | Page |
|---|---|---|
| **Tableau 01** | Classification des actinomycetes | **8** |
| **Tableau 02** | Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes | **15** |
| **Tableau 03** | Les souches d'actinomycetes étudiées | **24** |
| **Tableau 04** | Activité des actinomycetes contres les bactéries | **32** |
| **Tableau 05** | Activité des actinomycetes contres les levures | **36** |
| **Tableau 06** | Activité des actinomycetes contres leschmpignions | **40** |
| **Tableau07** | Extraction des molecules bioactives | **45** |

# Liste des figures


| Figure | Titre | Page |
|---|---|---|
| **Figure01** | Colonie d'actinomycètes se développant sur gélose | 6 |
| **Figure02** | Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides | **10** |
| **Figure03** | Cycle de développement de Streptomyces sur milieu solide | **10** |
| **Figure04** | Origines des antibiotiques | **14** |
| **Figure05** | Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques | **18** |
| **Figure06** | Les cibles des antifongiques | **20** |
| **Figure07** | La methode d'ensemencement en stries serrés. | **25** |
| **Figure08** | Méthode de cylindres d'agar | **27** |
| **Figure 09** | Activité de la souche ATP41 contre B.antra et A.fumig | **43** |
| **Figure 10** | Activité de la soucheATSP25 contre S.Aureus ,A.Flavus Et K.Pneumo 348 | **43** |
| **Figure 11** | Activité de la souche ATSP15 contre K.p348 ,INC4 A.nomia e et E.Coli | **44** |
| **Figure 12** | Activité de la souche ATP46 contreA.flavus; A.fumig et A.nomiae | **44** |
| **Planche 01** | La méthode de cylindres d'agar | **31** |
| **Planche 02** | Extraction des molécules bioactives | **45** |

# Introduction

## Introduction

Les actinomycètes, bactéries filamenteuses à Gram positif, représentent une source majeure de métabolites secondaires bioactifs, notamment des antibiotiques et des antifongiques **(El Karkouri, Ait Assou et El Hassouni, 2019)**. Cesmicroorganismes, largement répandus dans des environnements divers, y compris les milieux extrêmes (sols salins, sources chaudes, déserts, ….etc.), possèdent une capacité remarquable à produire des composés antimicrobiens en réponse à des conditions écologiques hostiles **(Trenozhnikova et Azizan, 2018).**

Ces dernières décennies, l'émergence de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques conventionnels a rendu cruciale la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques. Les actinomycètes extrêmophiles, adaptés à des niches écologiques extrêmes (haute salinité, pH alcalin ou acide, températures élevées), constituent une ressource prometteuse pour la découverte de composés bioactifs innovants **(Bérdy et Klement, 2021).** Parexemple, des études récentes ont isolé des souches d'actinomycètes de sols hypersalins produisant des métabolites actifs contre des bactéries multirésistantes et des champignons pathogènes **(El Karkouri, Ait Assou et El Hassouni, 2019).**

L'objectif de cette étude est d'isoler et de cribler des souches d'actinomycètes extrêmophiles pour leur potentiel à produire des antibiotiques et des antifongiques. Nous nous concentrerons sur des milieux extrêmes tels que les salines, les sols alcalins et les écosystèmes thermophiles, en utilisant des méthodes de culture sélectives et des tests d'activité antimicrobienne contre des souches cibles, ycompris despathogènes résistants comme *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* .

Cette approche permettra d'évaluer la diversité des actinomycètes extrêmophiles et d'identifier des souches productrices de composés bioactifs potentiellement utiles enmédecine et en biotechnologie.

En exploitant ces microorganismes adaptés à des conditions extrêmes,cette étude contribuera à élargir ler épertoire des molécules antimicrobiennes et à répondre aux défis posés par la Résistance aux antibiotiques et aux antifongiques.

# *Synthèse bibliographique*

# *ChapitreI: Généralitéssurles Actinomycètes*

## ChapitreI: Généralités sur les Actinomycètes

### I.1. Histoire

L'histoire des Actinomycètes peut être divisée en 5 grandes périodes. La première période qui vade1877 à1890 environ,aété nommée «Période médicale »du fait que l'intérêt portéà ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait **(Baldacci, 1962)**.

La seconde période (1900-1940) (Mariat et Sebald, 1990) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol,avec les travaux deRossi-Doria(189091),Gasparini(1891- 94), Krainsky (1914), Waksman (1919), Lieske (1921), Orskov (1925), Jensen (1931-33) et Krassinikov (1938). Elle couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes.

L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 194 0et le nom de Waksman lui est indiscutable mentlié avec la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par Streptomyces griseus (Le minor, 1989 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Cette période a résulté en un accroissement brusque du nombre d'espèces décrites **(Baldacci, 1962)**.

Ainsi, la quatrième période (1940-1970) est caractérisée par le développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des Actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries et de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques.

Enfin, depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par Hopwood (Chater,1999 ; Hopwood, 1973) puis de génomique (Hopwood, 2003) a révolutionné la classification des espèces (Ventura, 2007) puis les méthodes de découverte de métabolites secondaires (Donadio, 2002) et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes.

### I.2. Définition

Les actinomycètes sont parmi les groupes les plus dispersés de micro-organismes dans la nature. On les retrouve abondants dans tous types de sols —qu'ils soient cultivés ou vierges,fertiles Ou pauvres ainsi que dans une grande variété d'écosystèmes à travers le globe.

Ces bactéries, appartenant à la classe des actinobactéries, sont des procaryotes à Gram positif qui présentent une morphologie et une croissance particulièrement variées.

bactéries, appartenant à la classe des actinobactéries, sont des procaryotes à Gram positif qui présentent une morphologie et une croissance particulièrement variées.

Elles sont surtout reconnues pour leur remarquable capacité à produire un large éventail de métabolites secondaires bioactifs. Environ 70 à 80 % des composés antimicrobiens isolés à ce jour proviennent d'actinobactéries. Environ 23 000 antibiotiques ont été découverts de microorganismes dont 10 000 d'eux ont été isolés d'actinobacteria, soulignant leur importance majeure dans la recherche pharmaceutique et le développement d'agents antimicrobiens. **(Nouasri, Zitouni et Toumi, 2023)**

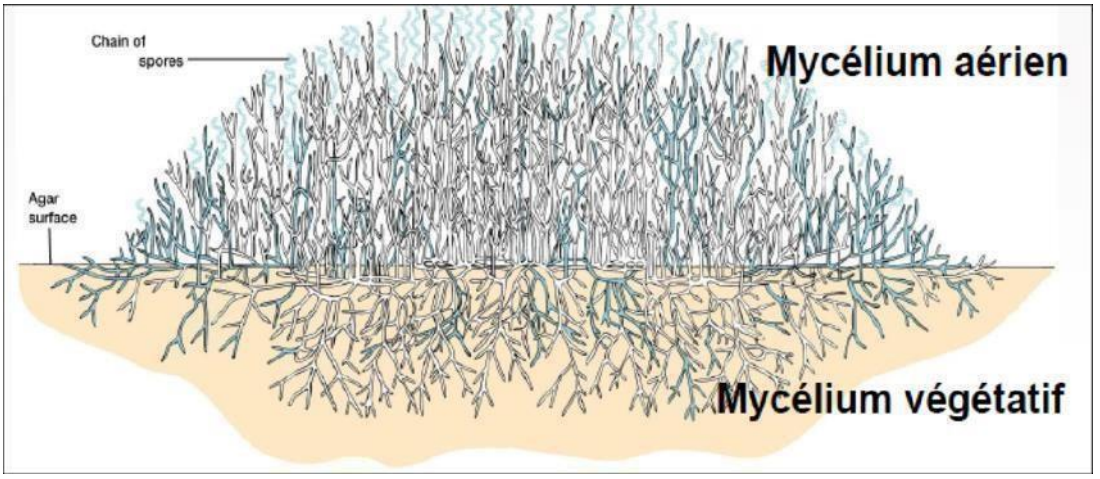



**Figure01**:Colonie d'actinomycètes se développant sur gélose **(Nouasri, Zitouni et Toumi, 2023)**

## I.3. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont des bactéries largement répandues dans divers écosystèmes naturels, notamment les sols, les milieux aquatiques (rivières, lacs, eaux douces) et les environnements marins .. Ils représentent une part importante de la population microbienne du sol, avec des densités dépassant souvent un million d'individus par gramme de sol **(Bawazir et Shantaram, 2023).**

### I.3.1Habitats Principaux

**Sols**: Ils dominent dans les sols riches en matière organique, où ils jouent un rôle clé dans la décomposition de la cellulose, la lignine, la chitine et d'autres polymères complexes.

**Milieux aquatiques**:Présents dans les sédiments marins et les eaux douces,bienq u'endensités plus faibles que dans les sols.

**Environnements extrêmes** : Certaines espèces sont adaptées aux sols acides (pH < 5), aux déserts arides, aux sols salins et aux sources chaudes **(Gopalakrishnanet*Al.*,2021)**

**I.3.2.Facteurs Environnement aux Influençant leur Distribution**

**pH**:Les neutrophiles dominent dans les sols neutres,tandis que les acidophiles (comme Streptomyces acidophilus) prospèrent dans les sols acides

**Température et humidité**:Les actinomycètes mésophiles (25–30°C) sont communs, mais des thermophiles (40°C) existent dans les composts et les sols désertiques

**Teneur en matière organique** : Les sols forestiers et les rhizosphères abritent des communautés diversifiées, notamment des genres rares comme Micromonospora et Actinoplanes **(Meenakshi et Al, 2024).**

**I.3.1. Rôles Écologiques**

**Recyclage de snutriments**:Ils dégradent les matières organiques complexes ,participant aux cycles du carbone et de l'azote .

**Interactions biologiques**:Certains actinomycètes forment des symbioses avec des plantes (fixation d'azote *viaFrankia*)ou des insectes (production d'antibiotiques pour protéger les fourmis champignonnistes contre les pathogènes) .

**Production de métabolites bioactifs** : Antibiotiques, enzymes industrielles et composés antifongiques,essentiels pour la compétition microbienne**(Lewin,Carlos,Chevrette,Horn, McDonald, Stankey, Fox et Currie, 2016).**

**I.1.2.Taxonomie et classification**

Les actinomycètes (ou Actinomycetes) sont un groupe de bactéries filamenteuses à Gram positif, caractérisées par une croissance en filaments semblables à des mycéliums fongiques. Historiquement,leur morphologie a conduit à les classer parmi les champignons,d'où leur nom, dérivé du grec *aktinos* (rayon) et *mykes* (champignon) **(Wikipedia, 2025)**.

Actuellement, les actinomycètes sont classés dans le phylum Actinomycetota, au sein du domaine des Bacteria. Ce groupe est d'une grande importance écologique, économique et médicale. Ils jouent un rôle clé dans la dégradation de la matière organique dans les sols, contribuant ainsi au recyclage des nutriments. De plus, ils sont une source majeure d'antibiotiques naturels ,tels que la streptomycine et la tétracycline,produits principalement par le genre *Streptomyces* **(Wikipedia, 2025)**.

La classification des actinomycètes a évolué au fil du temps, passant d'une approche basée sur descritères morphologiques et chimiques à une taxonomie moléculaire fondée sur l'analyse du gène 16SrRNA et des données génomiques.Cette évolution a permis de mieux comprendre les relations phylogénétiques au sein de ce groupe et de reclasser certaines espèces dans de nouveaux genres, tels que *Schaalia* et *Boudabousia* **(Nouioui et Al., 2018).**

Ainsi,les actinomycètes représentent un groupe bactérien d'une grande diversité,essentiel pour les écosystèmes terrestres et d'une importance considérable pour la santé humaine et l'industrie pharmaceutique.

**Tableau01**:Classification des actinomycetes**(ParteetAl.,2020)**

| Niveau taxonomique | Classificationactuelle |
|---|---|
| Règne | *Bacteria* |
| Phylum | *Actinomycetota(*anciennement *Actinobacteria)* |
| Classe | *Actinomycetia(*anciennement *Actinobacteria)* |
| Ordre | *Actinomycetales(*ordre validé parBuchananen1917*)* |
| Familles principales | *Actinomycetaceae,Nocardiaceae,Micromonosporaceae, Streptomycetaceae,Frankiaceae,Dermatophilaceae,*etc. |
| Genres représentatifs | *Streptomyces,Nocardia,Mycobacterium,Corynebacterium,Frankia, Micromonospora,Actinoplanes,Kitasatospora,Saccharothrix, Amycolatopsis, Rhodococcus, Tsukamurella*, etc. |

## I.4. Critères actuels d'identification

### I.4.1. Caractères culturaux

Avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heurs, les actinomycètes ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries **(Kitouni , 2007).** Au laboratoire, les colonies visibles apparaissent au bout de 3à4jours,le mycélium aérien mature,portant les spores,peut prendre 7 à

14 jours pour se développer, d'autres actinomycètes plus lentes exigent plus d'un mois d'incubation **(Kulkarni, 2003).**

Lorsqu'ils croissent sur un substrat solide comme le sol ou la gélose, les actinomycètes développent un réseau ramifié d'hyphes poussant à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat pour former un tapis dense d'hyphes qu'on l'appelle mycélium végétatif. Chez beaucoup d'actinomycètes, les hyphes végétatifs se différencient en hyphes poussent vers le haut et forment un mycélium aérien qui s'élève au-dessus du substrat. C'est à ce moment-là, où les composés médicalement utilisés sont synthétisées **(Prescoott et Al, 2010 ).**

En culture liquide sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores mentent en surface pour croitre en contacte de l'air. Cependant en milieu liquide avec agitation et /ou par injection d'air ou d'oxygène. Les Streptomyces croissent par élongation des filaments et peuvent présenter trois types de morphologies : des hyphes ramifiés forment des enchevêtrements ; ou encore des pelotes dont la taille peut varier de 0.1µm à plusieurs millimètres **(Figure 02) (Saffroy, 2006).**

### I.4.2. Caractères morphologiques

Les membres des Actinobacteria sont deux types : unicellulaires tels que les genres *Micrococcus* (coques) et *Arthrobacter* (bâtonnets irréguliers) et d'autresgenres qui produisent des filaments multicellulaires quise développent sur et dans le milieu (mycélium végétatif) ou à la surface, au dessus du substrat (mycélium aérien) tels que le genre *Streptomyces***(Aouar, 2006).**

#### *I.5.2.1.Streptomyces*

Le terme Streptomyces provient du grec *Strepto*(courbé,tordu) et *Myces*(champignon) **(PresscottetAl.,2010)**.

La structure complexe des colonies de Streptomyces **(Figure 03)** montre le degré de différenciation d'un tel organisme.Sur milieu solide,débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium végétatif formé d'hyphes multi-nucléoïde, ramifiés et ancrés dans le milieu. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium végétatif, en utilisant ce dernier comme substrat.En effet,le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien **(Miguélez et Al., 1999)**. La croissance des hyphes est apicale**(Flärdh, 2003)**,et s'accompagne de la formation de septa ,Les cellules se différencient ensuite pour former des spores. Cela se traduit par l'épaississement des parois cellulaires (qui rend les spores plusrésistantes à la dessiccation).En milieu liquide,les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium végétatif, même si certains Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement **(Hodgson, 1992).**

#### *I.5.2.2.Arthrobacter*

Le genre *Arthrobacter* contient des bâtonnets aérobies. Le caractère le plus distinctif de ce

genre est un cycle de développement bâtonnet-coque.En phase de croissance exponentielle,les Arthrobacters ont des bâtonnets irréguliers ramifiés et peuvent se diviser par un processus qu'on appelle division par cassure. Lorsqu'elles entrent en phase stationnaire, les cellules prennent une forme coccoides **(Figure 02)(Presscott et Al., 2010).**

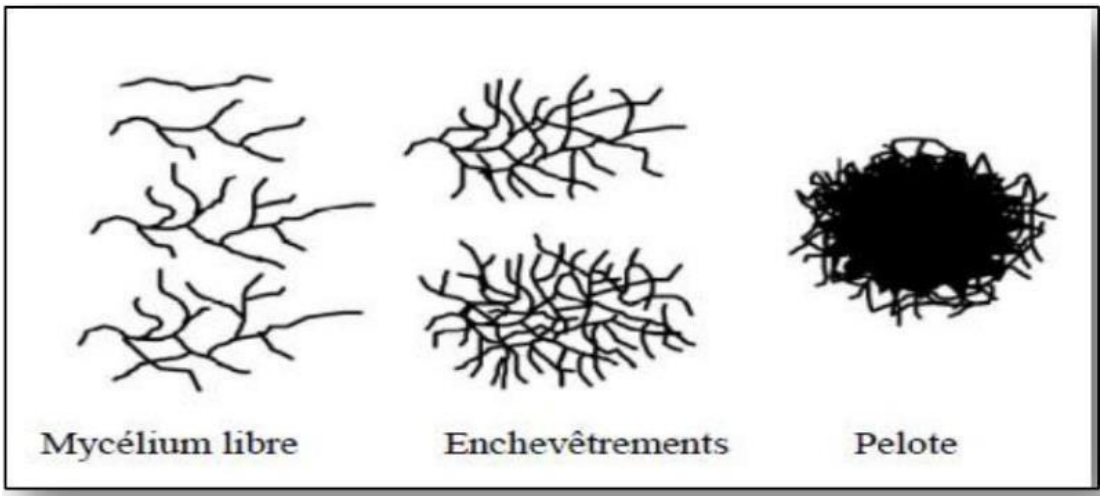



**Figure02**:Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides**(Amanullah etAl.,2000)**.

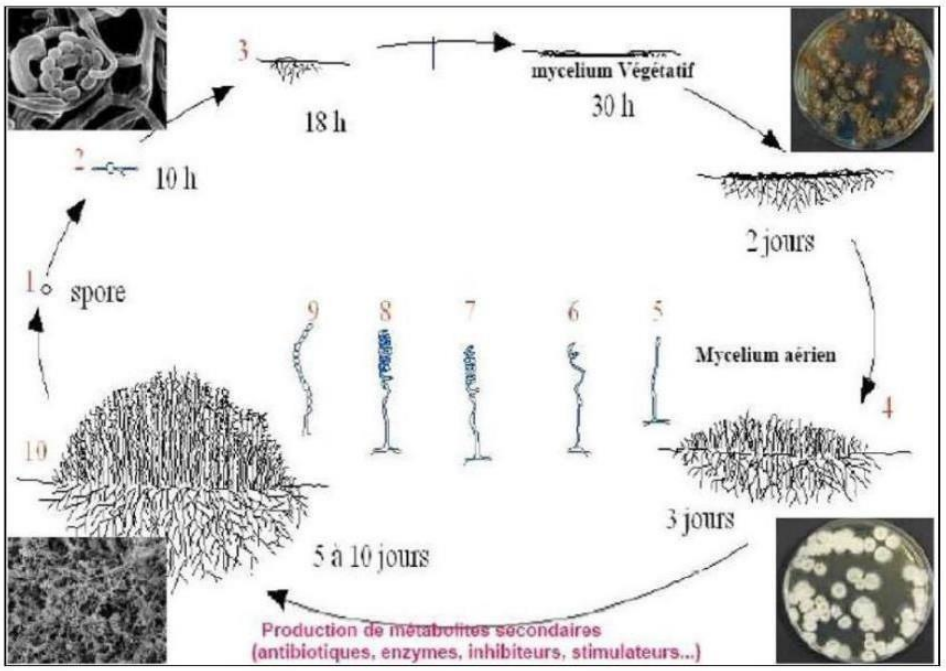



**Figure03**:Cycle de développement de Streptomyces sur milieu solide **(HopwoodetAl., 1985).**

## I.5. L'importance des actinomycétes

Les actinomycètes sont largement reconnus pour leur capacité à produire une diversité exceptionnellede métabolites primaireset secondaires d'intérêt médical, agricoleet industriel. Parmi ces métabolites figurent des antibiotiques, des antifongiques, des antis tumoraux et des enzymes industrielles **(Bérdy, 2012)**. Le genre *Streptomyces*, à lui seul, est responsable de la production de plus des deux tiers des antibiotiques d'origine naturelle actuellement utilisés en médecine humaine et vétérinaire **(Hopwood, 2007)**. Outre leur potentiel biotechnologique, les actinomycètes jouent un rôle écologique crucial dans la dégradation de la matière organique et la transformation de composés complexes comme les hydrocarbures et les pesticides, contribuant ainsi au maintien de la fertilité des sols et à la dépollution environnementale **(Goodfellow et Williams, 1983 ; Hamedi et Al., 2011)**. Leur présence dans des environnements extrêmes,tels que les zones arides et salines,atteste de leur grande adaptabilité et en fait une source prometteuse de nouvelles souches aux activités bioactives encore méconnues **(Okoro et Al., 2009 ; Boubetra et Al., 2013)**.

# CHAPITREII

## *Production des Antibiotiques et des Antifongiques par les Actinomycètes.*

Les actinomycètes, notamment les *Streptomyces*, sont des bactéries filamenteuses présentes principalement dans le sol. Ils sont responsables de la production de nombreux antibiotiques et antifongiques naturels, représentant environ 75 % des antibiotiques microbiens connus. Parmi les plus célèbres, on trouve la streptomycine, l'érythromycine, la rifamycine, la nystatine et l'amphotéricine B**.**

Ces composés sont essentiels dans le traitement des infections bactériennes et fongiques,et leur production par fermentation est une activité industrielle majeure. Les actinomycètes sont également une source importante de métabolites secondaires bioactifs,utilisés en médecine,en agriculture et dans l'industrie **(Antibiot Tokyo,2005).**

**II.1-Métabolismes des actinomycètes**

**II.1.1.Metabolisme primaire des actinomycetes**

Le métabolisme primaire des actinomycètes regroupe l'ensemble des réactions biochimiques indispensables à leur croissance, à leur survie et à la production de biomasse. Il englobe les processus cataboliques et anaboliques qui permettent la transformation des nutriments en énergie et en composants cellulaires essentiels**( Bensefia Kharfiya, 2015).**

Concrètement, ce métabolisme assure la dégradation des substrats organiques tels que les sucres, les acides aminés ou les lipides, afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP ainsi que des molécules porteuses d'électrons nécessaires aux réactions de biosynthèse.Cette énergie et ces précurseurs servent ensuite à assembler les monomères - acides aminés, nucléotides, sucres simples - en macromolécules structurales et fonctionnelles comme les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides.

Chez les actinomycètes, ces processus métaboliques sont particulièrement efficaces pour dégrader des substances complexes telles que la cellulose ou la chitine, ce qui leur permet de prospérer dans des environnements variés,notamment dans les sols riches en matière organique.

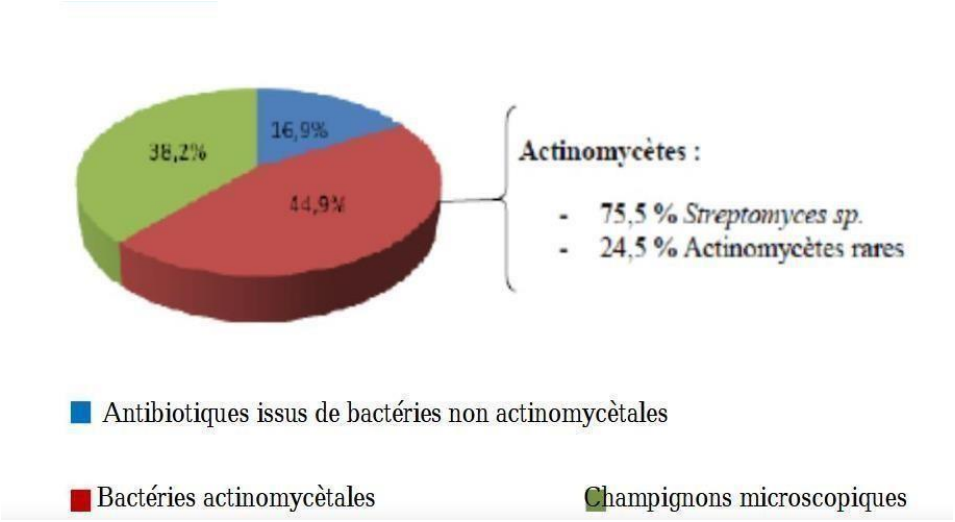
Ce métabolisme primaire constitue la base essentielle avant que les actinomycètes n'entrent en phase de production de métabolites secondaires, tels que les antibiotiques et antifongiques, qui font leur renommée **(Kieser et Al,2000).**

**II.1.2-Metabolisme secondaire des actinomycetes**

Le métabolisme secondaire des actinomycètes correspond à l'ensemble des voies biochimiques impliquées dans la synthèse de composés organiques à faible poids moléculaire, qui ne sont pas directement nécessaires à la croissance ou à la survie immédiate des cellules. Ces métabolites secondaires sont généralement produits lors de la phase stationnaire du cycle

De vie bactérien,période durant laquelle la division ellulaire ralentit et les ressources nutritives deviennent limitées **( Mohamed Mahmoud Abdou ;2016).**

Ces molécules jouent un rôle crucial dans les interactions écologiques des actinomycètes, notamment en tant qu'agents de défense contre d'autres microorganismes ou en tant que médiateurs de la communication intercellulaire. Chez les actinomycètes, particulièrement au sein du genre Streptomyces, le métabolisme secondaire est d'une grande richesse et diversité, englobant laproduction d'antibiotiques, d'antifongiques, d'enzymes, depolysaccharides, ainsi que d'autres composés bioactifs tels que des alcools,des acides aminés modifiés,des composés aromatiques et des antioxydants,dont beaucoup présentent un intérêt industriel et thérapeutique majeur **(Mohamed Mahmoud Abdou ;2016).**




Les gènes responsables de la biosynthèse de ces métabolites sont souvent regroupés en clusters génétiques spécifiques, dont l'expression est finement régulée par des facteurs environnementaux,dessignaux moléculairesinternesetdesmécanismesdecontrôlegénétique complexes.Par exemple,la production d'antibiotiques peut être déclenchée ou modulée par des molécules de signalisation comme l'A-factor,ou par des conditions de culture particulières **( Chater, K. F. 2016).**

**II.1.Production des molécules bioactives**

Depuis 1940, les actinomycètes, spécialement les *Streptomyces* retiennent l'attention des scientifiques par la production des antibiotiques et de différents métabolites. Le **tableau 02** illustre les différents métabolites produits par les actinomycètes.

Les actinomycètes ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques, En fait, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre Streptomyces **(Figure 04) (Sibanda et Al.,2010)**. Parmi les antibiotiques qui ont des applications thérapeutiques on peut citer: les

aminoglycosides, les anthracyclines, les glycopepetides, les beta-lactamines, les tetracyclines, les macrolides,...etc.

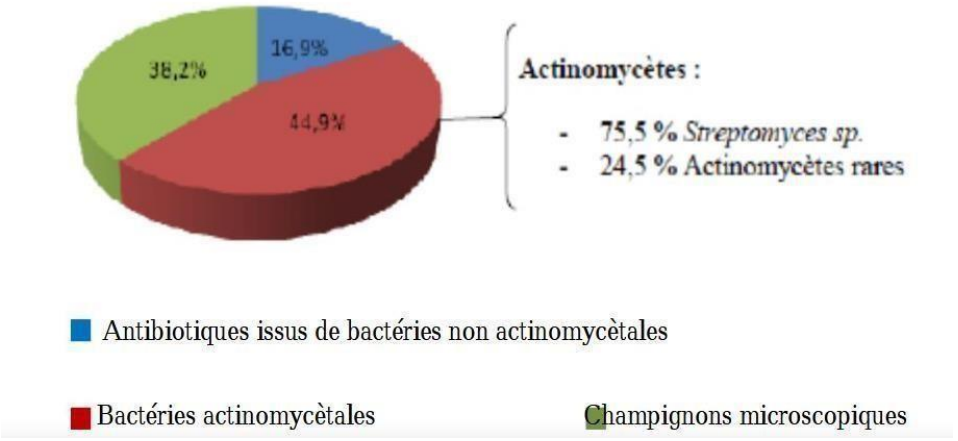



**Figure 04 :** Originesdesantibiotiques**(Berdy,2005)**

**Tableau02**:Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes **(Loucif, 2011)**

| **Actinomycètes producteurs** | **Antibiotiques** | **Références** |
|---|---|---|
| **1/Les agents antibactériens** | | |
| Micromonospora sp. | Clostomycine | **Takahashi et al., 2003** |
| Streptomyces griseus | Candicidine | **Jinenez et al., 2009** |
| Streptomyces lydicus | Streptolydigine | **Liuet al., 2007** |
| Streptomyce lindensis | Rêtamycine | **Inoue et al., 2007** |
| Marinispora sp. | Marinomycine | **Sturdikovà et Sturdik, 2009** |
| Verrucosispora sp. | Abyssomycine | **Sturdikovà et Sturdik, 2009** |
| **2/ Les agents antifongiques** | | |
| Streptomyces griseochromogenes | Blasticidine | **Fukunaga et al., 2008** |
| Streptomyces humidus | Phenylacêtate | **Hwang et al., 2001** |
| Nocardia transvalensis | Transvalencine | **Mukai et al., 2006** |
| Streptomyces nodosus | Amphotéricine B | **Carle et al., 2003** |
| **3/Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes** | | |
| Saccharopolyspora spinosa | Spinosad. Insecticide neurotoxique | **Williamson et al., 2006** |
| Actinomadura sp | Herbicides. **Exemple 1.** 2,4-Dihydro-4-(β-Dribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one | **Schmitzer et al., 2000** |
| Streptomyces hygroscopicus | **Exemple 2.** Herbimycine | **Omura et al., 2006** |

## II.3.Les antibiotiques

### II.3.1.Définition

Les antibiotiques produites par les actinomycetes sont des substances naturelles biosynthétisées par ces bactéries filamenteuses,principalement du genre *streptomyces.*Ces composés présentent une activité antimicrobienne ,inhibant ou tuant d'autres micro-organismes,et sont utilisés pour traiter les infections bactériennes chez l'homme , les animaux et les plantes.Les actinomycetes sont une source prolifique d'antibiotiques, produisant environ les deux tiers des antibtioiques connus.

### II.3.2.Classification

Les antibiotiques d'actinomycètes peuvent être classés en fonction de leur structure chimique et de leur mécanisme d'action, voici quelques classes principales :

**Aminoglycosides:**Streptomycine,néomycine,gentamicine

**Macrolides:** Érythromycine

**Ansamycines:**Rifamycine

**Bêta-lactamines:**Thiénamycine

**Peptides:** Viomycine, actinomycine

**Tétracyclines:**Chlortétracycline,oxytétracycline

**Nucléosides:** Puromycine

**Polyènes:**Nystatine,amphotéricineB

### II.3.3. Moded'action

Les antibiotiques des actinomycètes, en particulier les *Streptomyces*, produisent une grande variété d'antibiotiques aux modes d'action divers, ciblant des processus essentiels des microorganismes pathogènes.

#### II.3.3.1. Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire

**Cibles**:Précurseurs du peptidoglycane(acétylmuramique, D-alanine).

**Exemples**:

**β-lactames**(ex.céphalosporines):Inhibent les transpeptidases(PBP),bloquant la réticulation du peptidoglycane .

**Glycopeptides**(vancomycine):SelientauD-alanyl-D-alanine,empêchant la polymérisation

Des chaînes peptidoglycanes**(Chater,2021).**

#### II.3.3.2. Inhibition de la synthèse protéique

**Cibles**:Ribosomes bactériens(70S,sous-unités30S/50S).

**Exemples** :

Aminosides(streptomycine):Se fixent à la sous-unité30S,induisant des erreurs de lecture de l'ARNm

Macrolides(érythromycine):Bloquent le tunnel de sortie des peptides naissants sur la50S

Tétracyclines:Inhibent la fixation de l'ARNt à la sous-unité30S**(Adamek,Spohn,Stegmann et Ziemert, 2019)**

#### II.3.3.3. Altération de la membrane cellulaire

**Cibles** : Lipides membranaires (phospholipides).

**Exemples** :

Polyènes(amphotéricineB):Se lient à l'ergostérol des membranes fongiques,créant des pores

Polymyxines:Détruisent la membrane des Gram-négatifs en interagissant avec les lipopolysaccharides (LPS) (Adamek, Spohn, Stegmann et Ziemert, 2019).

#### II.3.3.4. Inhibition de la synthèse d'ADN/ARN

Cible:Topoisomérases,ARNpolymérase.

Exemples :

Rifamycines:Inhibent l'ARN polymérase bactérienne

Quinolones (dérivés synthétiques inspirés des métabolites naturels) : Ciblent les topoisomérases II (gyrase) et IV **(Adamek, Spohn, Stegmann et Ziemert, 2019;Chater, 2021)**

#### II.3.3.5. Résistanceauxantibiotiquesetadaptations

Les actinomycètes produisent aussi des molécules pour contourner les résistances,comme:

Modification enzymatique (ex. β-lactamases).

Pompes à efflux(ex.tétracyclines)**(Adamek,Spohn,StegmannetZiemert,2019;Chater, 2021)**

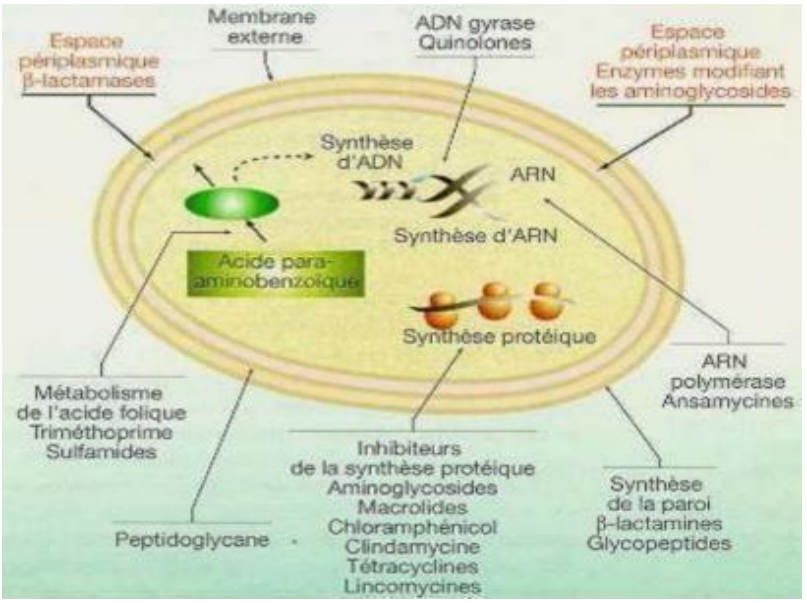



**Figure05**:Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques**(Davieset Mazel,1997)**

## II.4. Les antifongiques

### II.4.1. Définition:

Les antifongiques des actinomycètes sont des métabolites secondaires spécialisés, synthétisés principalementpar des bactéries filamenteuses de l'ordre des *Actinomycetales* (notamment *Streptomyces, Micromonospora et Amycolatopsis*), qui inhibent sélectivement la croissance ou la viabilité des champignons pathogènes. **(Hopwood, 2007).**

### II.4.2. Classification:

Les agents antifongiques sont classés selon leur structure moléculaire et leur mode d'action. Il faut noter les inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol (azolés, polyènes), inhibiteurs de la squalène-époxidase (terbinafine), inhibiteurs de la glucane-synthase (Echinocandines) Ils peuvent également être classés en fonction de leur spectre antifongique et de leur mode d'administration **(Bouaziz, 2018)** :

Lespolyènes(L'amphotéricineB+Lanystatine) Les nikkomycines

La Piramicine

Cycloheximide

### II.4.3.Mode d'action

Les modes d'action des antifongiques sont diversifiés et ciblent principalement lesstructures essentielles des champignons pathogènes. Voici les principaux mécanismes :

#### II.4.3.1.Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire fongique

Certaines actinobactéries produisent des composés similaires aux échinocandines, qui inhibent la β-(1,3)-glucane synthétase, une enzyme clé pour la biosynthèse de la paroi cellulaire fongique. Cela entraîne une perturbation de l'intégrité structurale et une lyse cellulaire( **Vanreppelen et Al.,2023) .**

Exemple: Les souches de *Streptomyces* isolées du sol rhizosphérique produisent des métabolites capables de détruire la structure cellulaire de *Fusarium oxysporum*, agent responsable de la fusariose du bananier**(Qi et Al., 2021)**

#### II.4.3.2. Altération de la membrane cellulaire

Les polyènes (ex. : amphotéricine B) produits par *Streptomyces* se lient à l'ergostérol, principal stérol des membranes fongiques, formant des pores et provoquant une fuite des ions et des molécules essentiels. Ce mécanisme est fongicide**(Ghannoum et Rice, 1999 ; Santos et Al., 2012).**

#### II.4.3.3. Inhibition de la synthèse des stérols

Certains métabolites d'actinobactéries ciblent des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, comme la lanostérol 14α-déméthylase (ciblée par les azoles) ou la squalène époxydase (ciblée par les allylamines) **(Ghannoum et Rice, 1999).**

Ces inhibitions entraînent une accumulation de stérols toxiques et une carence en ergostérol, perturbant la fluidité membranaire **(Santos et Al., 2012)**

#### II.4.3.4. Interférence avec la synthèse des macromolécules

Certaines actinobactéries produisent des analogues de pyrimidines (ex. : 5-fluorocytosine), quisontin corporés dans l'ARN fongique ou inhibent la synthèse del'ADN via l'inhibition de la thymidylate synthase, Ce mécanisme est souvent fongistatique et peut être synergique avec d'autres antifongiques comme les polyènes **(Ghannoum et Rice, 1999 ; Santos et Al., 2012)**

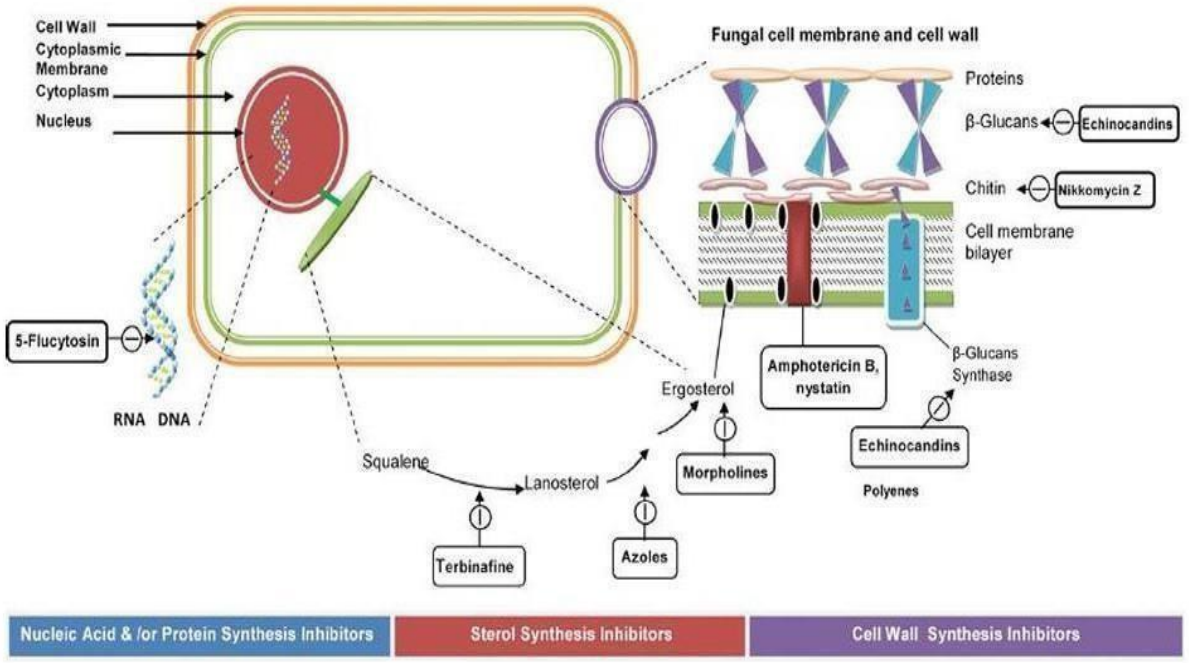



**Figure06**:Les cibles des antifongiques**(Kathiravan et Al.,2012).**

# *Partie expérimentale*

# *Matériel et Méthode*

Cette étude a été faite afin d'isoler et de sélectionner des souches d'actinomycètes extrêmophiles capables de produire des composés à activité antibiotique et antifongique. Ce travail a été réalisé au sien du laboratoire de Microbiologie de l'université Tebessa, sous la direction de Mme BENHADJ et la doctorante Mme LIMAMI , pendant la période allant du 01/03/2025 au 10/06/2025.

## I.1 Matériels utilisée

### I.1.1 Matériels non-biologique

#### I.1.1.1 Grands matériels

Piedàcoulisse
Agitateur
LoupeBinoculaire
Etuve
Plaquechauffante
Autoclave
Balancedeprécision
Bain marie
VortexRéfrigérateur
Haute
Evaporateur rotatoir

#### I.1.1.2 Petitsmatériels

Anse de platine
Barreaux magnétique
Bec bunsen
Boites de Pétri(grands et minies boites).
Portoirs
Entonnoir
Micropipette
Eppendorf Papier parafilm
Pipettes Pasteur
Cure dents
Spatule

Pied a coulisse

Verreries:béchers gradués,éprouvettes graduées,tubes à essai stériles,les flacons et Verre à pied

**I.1.2-Matériels biologiques**

**I.1.2.1Les actinomycètes**

Les 25 isolats d'actinomycètes étudiés ont été fournis par notre encadrante Mme Benhadj M .**(Tableau 03 )**

Les suivantes

**Tableau03**:les souches d'actinomycetes étudiées

| | | |
|---|---|---|
| ATSP6 | ATSP24 | ATP40 |
| ATSP8 | ATSP25 | ATP41 |
| ATSP11 | ATSP26 | ATP46 |
| ATSP12 | ATP28 | ATP48 |
| ATSP13 | ATP36 | ATP49 |
| ATSP15 | ATP37 | ATP50 |
| ATSP18 | ATP39 | GH57 |
| GH65 | OS 66 | ATSP78 |
| ATSP79 | | |

**II.1.2.1.Les souches indicatrices**

Lesbacteries:*E.coli,K.Pneumo348,K.Pneumo899 , Pseudo ATCC , B.Antra , L.Monocytogenes , B.Subtilis , S.Epidermidis , S.Aureus , B.Cereus , Micrococcoccus*

Leschamingions:*C.Albicans, CNC4,C.Krusei,CreptoLCR,ICF44,Rabdoturella*

Leslevures:*A.Sclero,A.FlavATCC,A.Nomiae,A.Fumig,T.Rubrum,Talo.aml*

**II.1.2.2 :Les milieux de culture utilisés**

Le milieuGYEA(Glucose Yeast Extract Agar)

Le milieu LB molle (Luria-Bertani)

Le milieu ISP2 molle(International Streptomyces Project2)

Le milieu chapman

Le milieu Sabouraud

La gélose nutritive(GN)

Le milieu ISP 2 liquide

Le milieu de Mackconkey

**NB**:La composition de chaque milieu est présentée dans la partie annexe.

**II.1.2.3 :Les solutions et les solvants utilisés:**

L'eau distillée stérile

L'eau physiologique stérile

Ethanol

Buthanol Dichlorométhane

Acetate d'ethyle

## II.2.Méthode du travail

### II.2.1-Origines des souches

Les 25 isolats d'actinomycètes étudiés ont été fournis par notre encadrante MmeBenhadj.

### II.2.1. Ensemencement et purification des isolats d'actinomycètes

La première étape de notre étude consiste à purifier les souches d'actinomycètes sélectionnées.Cette phase est cruciale,car elle permet d'obtenir des cultures pures,nécessaires pour la suite du travail. La purification se fait par repiquage successif sur un milieu frais, en l'occurrence le milieu ISP2, solidifié en boîtes de Pétri. Pour l'ensemencement, nous utilisons la méthode des stries d'épuisement: a l'aide d'une anse de platine, un fragment de mycélium ou quelques spores sont prélevés à partir de la colonie à purifier,puis ensemencés sur le nouveau milieu. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C pendant 7 jours. Ce temps d'incubation relativement long s'explique par la croissance lente des actinomycètes, comparée à celle d'autres bactéries.

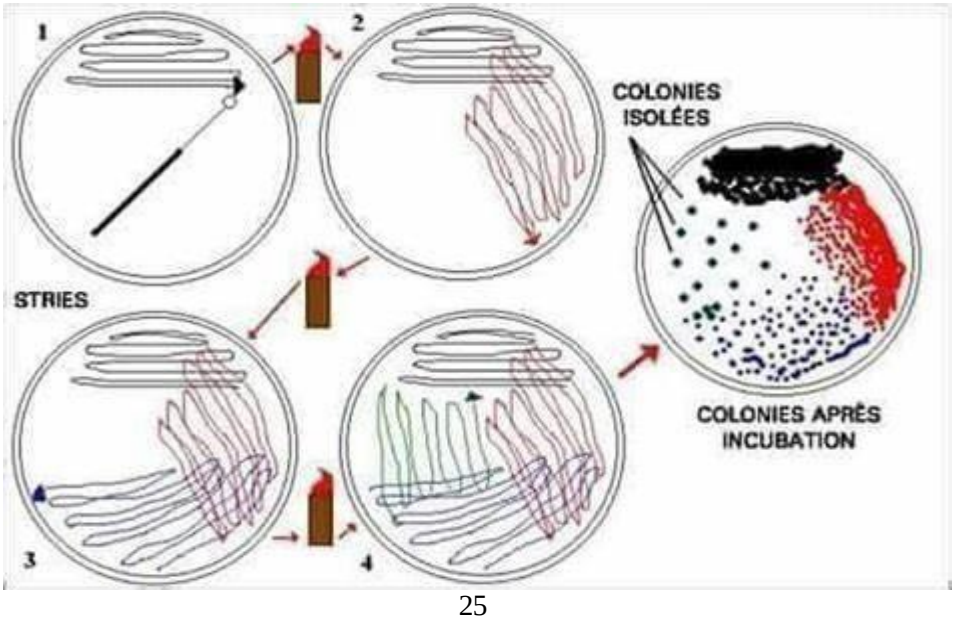


**Figure07**:La méthode d'ensemencement en stries serrés.

### II.2.2.Préparation de l'inoculum

La méthode recommandée pour la standardisation des germes cibles repose sur la technique Des suspensions diluées ,accompagnée de la mesure de la densité optique(DO)de la suspension bactérienne. Cette mesure doit être effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (modèle Shimadzu UV mini 1240), à une longueur d'onde de 625 nm, correspondant à la plage spécifique aux germes cibles,où la densité optique doit se situer entre0,48 et 0,49.L'inoculum à utiliser doit présenter une concentration de $10^7$ UFC/ml.

**Préparation des champignons/Levures**

Les levures et les champignons sont ensemencés sur un milieu solide de Sabouraud, un milieu sélectif et légèrement acide,riche en glucose,qui favorise la croissance des champignons tout en inhibant celle des bactéries.Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 heures, une température optimale pour permettre le développement des levures (colonies crémeuses et lisses) et le début de croissance des champignons filamenteux.

**Préparation des bactéries**

Les bactéries sont ensemencées sur des milieux solides sélectifs et différentiels adaptés à leur genre : le milieu Chapman pour l'isolement des *Staphylococcus* ., le milieu MacConkey pour les entérobactéries,et de GN pour les autres bactéries.Les boîtes sont ensuite incubées à 35 ± 2 °C pendant 24 heures afin de favoriser la croissance bactérienne.

**Méthode des cylindres d'agar**

Cette méthode consiste à ensemencer les isolats d'actinobactéries par stries très serrées à l'aide d'une anse de platine, de manière homogène, à la surface du milieu GYEA (Glucose Yeast Extract Agar). Les boîtes sont ensuite incubées à **30°C** pendant une période appropriée (généralement 5à7jours,selon la croissance).Une fois l'incubation terminée,des cylindres de gélose contenant la culture d'actinobactéries sont découpés d'une manière aseptique. Ces cylindres sont ensuite déposés à la surface d'un milieu ISP2 molle préalablement ensemencé par levures et champignons et à l asurface d'un milieu LB molle ensemencé par bactéries,afin d'évaluer l'activité antimicrobienne potentielle des isolats.

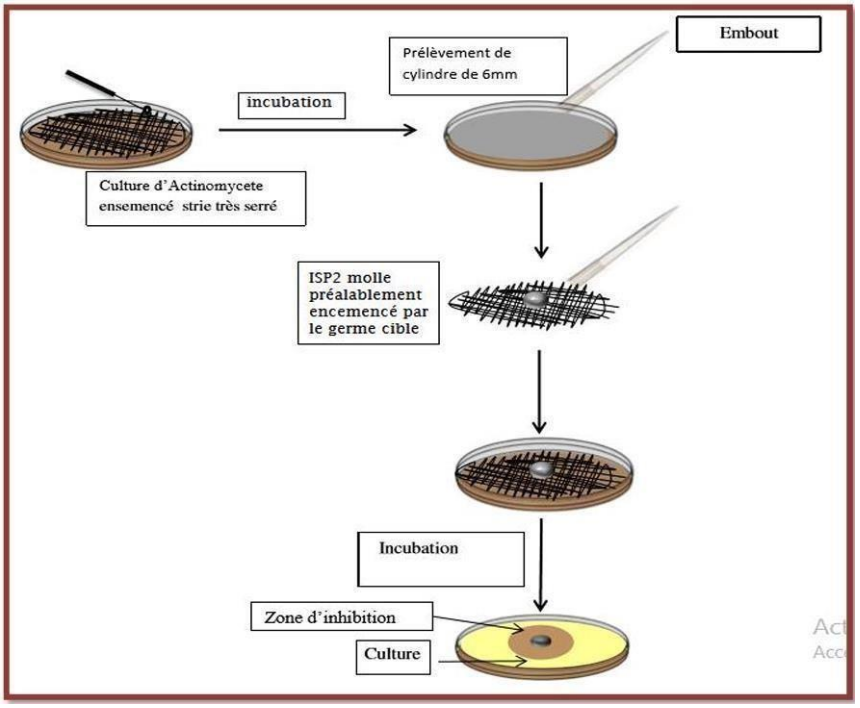



**Figure08**:Méthode de cylindres d'agar

### II.2.3. Extraction des molécules bioactives

Pour réaliser l'étape d'extraction, nous avons choisi des solvants de polarités variées afin d'optimiser la récupération d'un large éventail de molécules bioactives produites par les actinomycètes.Cette diversité de solvants permet de maximiser l'extraction decomposés aux propriétés chimiques différentes.

Les solvants utilisés sont:l'éthanol,lebutanol,le dichloro méthaneetl'acétated'éthyle. Avant l'extraction, nous avons sélectionné :

Les souches les plus actives

Le meilleur jour de production

Les différentes souches d'actinomycètes sélectionnées ont été ensemencées en stries très serrées à la surface du milieu GYEA , coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Après une incubation de 10 jours à 30 °C, le contenu de chaque boîte a été découpé en petits cubes et transféré dans des fioles Erlenmeyer contenant 20 mL d'un solvant organique. L'extraction a été réalisée sous agitation pendant 2 heures à température ambiante.

Les phases organiques ont ensuite été filtrées puis évaporées sous vide à 39 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif.Les résidus secs (extraits bruts) ont été récupérés à l'aide d'une micropipette et resuspendus dans 2 mL du solvant correspondant.

Les extraits obtenus ont été conservés dans des tubes Falcon stériles,à4°C,en vue de leur utilisation dans les tests d'activité antimicrobienne.

### II.2.3.1. Préparation des inocula pour test

#### II.2.3.1.1.Préparation des bactéries

Les bactéries indicatrices ont été repiquées chacune dans le milieu favorable pour sa croissance et ensuite incubées à 35 ± 2 °C pendant 24 heures

#### II.2.3.1.2. Préparation des champignons et levures

Les champignons et levures ont été repiqués dans le milieu sabouraud solide et incubé en25°C pendant 3jours .

### II.2.4. Recherche de l'activité des extraits

#### II.2.4.1. Méthode des disques

L'activité antimicrobienne des extraits organiques issus des différents solvants a étéévaluée par la méthode des disques. Des disques stériles de papier Whatman n°1 (6 mm de diamètre) ont été déposés sur la surface de gélose ISP2 molle.

Chaque disque a été imprégné de 30 µL d'extrait organique correspondant. Des disques témoins, imprégnés uniquement des solvants, ont également été utilisés afin de vérifier l'absence d'effet inhibiteur du solvant seul.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à30°C,et la lecture des diamètres des zones d'inhibition a été réalisée entre 24 et 48 heures après incubation.

# *Résultats et discussion*

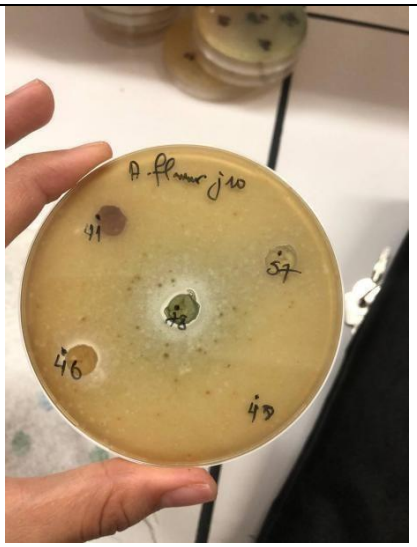
## I. Méthode de cylindres d'agar

L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé, elle permet une meilleure visualisation des zones d'inhibition. C'est aussi une méthode où l'inoculum des germes cibles est standardisé contrairement à celle de sstries croisées.Cependant,cette dernière a été adoptée par plusieurs laboratoires de recherche mais la tendance actuelle donne une orientation pharmacologique ou phytopathologique au screening en utilisant dès le début des tests plus spécifiques dirigés contre une cible bien déterminée : agent pathogène ou une enzyme **(Badji, 2006).**

Ce test est réalisé sur milieu LB Mol et ISP 2 Mol vis-à-vis des cultures jeunes de cellules bactériennes, de Levures et de champignons. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition est faite en J3 , J7 , J10 et J14 a l'aide du pied de coulisse **(Planche.1)**







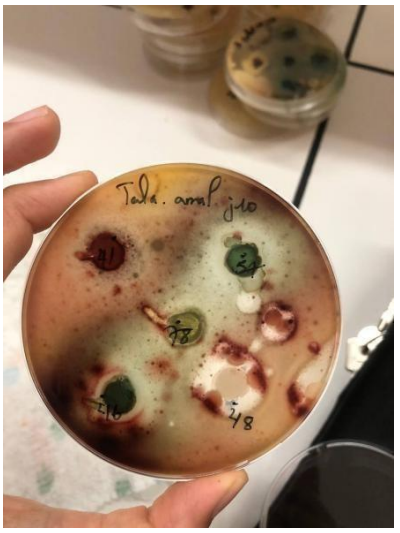


**Planche01**:La méthode de cylindres d'agar

### I.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches étudiées

Les résultats de l'activité antimicrobienne des 25 isolats d'actinomycètes vis-à-vis des 25 souches indicatrices testées en j03, j07, J10 et J14 sont présentés dans **les tableaux (4, 5 et 6) .**

**Tableau04**:activité antibiotiques des actinomycetes en j3

| | J3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36 | ATP40 | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| ***K.Pnemo nie*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 | - | 6 | - | - | - | - | - | - | 6 | 6 |
| ***B.antra*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | - | - | - | - | - |
| ***L.monocyt*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 | - | 7.6 | 6 | 7 | 9 | - | 7 | - | 6 | - |
| ***E.Colie*** | - | - | - | 7 | - | - | 15 | - | - | 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***B.subtilis e*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***Pseudo Atcc*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***S.aureus*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 16 | - | - | - | - | 6 | - | 7 | - | - | - | 6 | - | - | | - |
| ***K.Pnemo 8*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6.5 | - | 6 | - | - | - | - | 7 | - | - |
| ***B.cerus*** | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | | - | - | - | 11. | 7.3 |
| ***INC4*** | - | - | - | - | - | - | 15 | - | - | 13. | - | - | 13 | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***S.Epiderm*** | - | - | - | - | | - | - | - | - | 11. | - | - | - | - | 6 | - | 7 | - | - | - | - | 7 | - | 9 | - |

**Tableau04(suite01)**:activité antibiotiques des actinomycetes en j7

| Les25 souches d'actinos mycetes | J7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | ATP40 | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| *K.Pnemo* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 | - | - | 7 | 6 | - | - | - | 6 |
| *B.antra* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *L.monoc* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | - | - | 9 | 7 | 7 | 7 | - | - | - |
| *E.Coli* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | - | - | - | - | - | - | 11. | 8. | - | - |
| *B.subtilis* | 10 | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Pseudo* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *S.aur* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 | - | 6 | | | 7 | - | - | - |
| *K.Pnemo* | - | | - | - | | | | - | | | | - | - | - | 6 | 7 | 8 | - | 8 | 6 | 7 | - | - | | |
| *B.cerus* | - | - | - | - | | - | - | - | - | 12 | - | - | - | - | 8 | - | | - | - | | - | - | - | - | - |
| *INC4* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 8 | - | - | - | - | - | - | 6 | - | - |
| *S.Epi* | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 8 | - | 9 | | - | | - | - | - |

**Tableau04(suite02)** :Activité antibiotique des actinomycètes en j10

| Les25 souches d'actinos mycetes | J10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | ATP40 | ATP41 | ATP46 | | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| ***K.Pnem*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 1 | 8 | 9 | | | 1 | - | | | - | - |
| ***B.antra*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 1 | - | 7 | | | 1 | - | | | - | - |
| ***L.monoc*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | 6 | - | | | - | - | | | - | - |
| ***E.Coli*** | 30 | 28 | - | - | 13 | - | - | - | - | - | - | 27 | - | | 6 | - | 6 | | 6 | 6 | - | - | | - | 7 |
| ***B.subtili*** | - | - | - | - | - | - | 8 | - | - | - | - | 1 | - | | - | | | | | - | - | | | - | - |
| ***Pseudo*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | | | - | | | | - | - |
| ***S.aur*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | 9 | | | - | - | - | | - | - |
| ***K.Pne8*** | - | | - | - | | | | - | | | | - | - | | | | | | 11 | | | | | | |
| ***B.cerus*** | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | - | - | | 8 | | | | | 7 | - | 6 | | - | - |
| ***INC4*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 28 | - | 30 | 6 | | - | | | 7 | | - | | - | 10 |
| ***S.Epide*** | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | | | | 7 | | | - | - |

**Tableau04(suite03)**:activité antibiotique des actinomycètes en j14

| Les25 souches d'actino mycetes | J14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | ATP40 | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| ***K.Pnem*** | - | | - | - | - | - | 13 | - | 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 11 | - | - | - | - |
| ***B.antr*** | - | - | - | 6 | - | - | 17 | - | - | - | - | 13 | | - | - | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - |
| ***L.mono*** | - | - | - | - | - | - | 7 | - | - | - | - | 15 | 15 | - | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***E.Coli*** | - | - | - | - | - | - | 14 | - | - | - | - | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***B.subt*** | - | - | 8 | 7 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***Pseudo*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | - | - | - | - | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***S.aureus*** | - | - | - | - | - | - | 15 | - | - | - | - | 10 | 9 | - | - | - | - | - | 13 | - | - | - | - | - | - |
| ***K.P 8*** | - | | - | - | | 7 | 8 | - | 15 | | | - | - | - | 8 | | | 8 | - | | | | - | | |
| ***B.cerus*** | - | - | - | - | 8 | - | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | | - | - | | - | - | - | - | - |
| ***INC4*** | - | - | 18 | - | - | - | 8 | - | 13 | - | - | - | - | - | 8 | - | - | 7 | 8 | - | - | - | - | - | - |
| ***S.Epid*** | - | - | - | - | | 7 | 9 | - | 7 | 7 | - | 15 | - | 8 | 14 | - | - | 7 | 7 | | - | | - | - | - |

**Les tableaux 04 , suite 01 , 02 et 03**montrent une variabilité importante de l'activité antibactérienne selon la souche testée et la bactérie cible. Certaines souches d'actinomycètes présentent une activité particulièrement élevée contre certains pathogènes, tandis que d'autres n'expriment aucune activité détectable.

Par exemple, la soucheATSP6 a montré une forte activité contr e*E. Coli* dans l'essai J10 avec une zone d'inhibition de 30mm,ce qui indique un potentiel antimicrobien significatif.De même, ATSP8 et ATSP11 ont montré respectivement 28 mm et 27 mm de zone d'inhibition contre *E. coli*, renforçant l'idée que certaines souches produisent des composés actifs contre des bactéries Gram négatif.

Des souches comme ATSP6, ATSP8, ATP50 etATSP13ont montré unebonne activité contre les bactéries a gram négatif surtout *E. coli*, tandis que peu de souches ont été actives contre *K. pneumonie.*

L'activité contre des bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*ou *S. aureus* a été moins fréquente,mais certaines souches commeATSP12,ATSP13,ATP50etATSP18ont montré des zones d'inhibition significatives. La souche ATSP13,par exemple, présente une activité contre

*B.subtilis*et*B.cereus.*

Les souches ATSP6,ATSP8,ATP50etATSP13 se démarquent clairement par leur spectre large et leur puissance d'inhibition, en particulier contre *E. coli, B. subtilis, et B. cereus.*

**Tableau05**:Activité antifongique des actinomycètes contre les levures en j03

| | J3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP | ATSP8 | ATSP1 | ATSP | ATSP | ATSP | ATSP26 | ATSP | ATP3 | ATP39 | ATP4 | ATP5 | GH65 | ATSP7 | ATSP | ATS | ATSP | ATSP | ATP4 | ATP4 | ATP4 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP7 |
| ***M.fa*** | | | | | - | - | - | | - | - | - | | | - | | - | - | | | | - | - | | - | - |
| ***C.Krus*** | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | | - | - | | | | - | - | | - | - |
| ***ICF44*** | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | | - | 1 | | | | - | - | | - | - |
| ***C.Para*** | - | - | - | - | - | - | - | | - | 12 | - | - | - | - | | - | - | | | | - | - | | - | - |
| ***Crepto*** | - | - | - | - | - | - | - | | - | 1 | - | - | - | - | | | | | | | - | - | | - | - |
| ***C.al*** | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | | - | - | | | | - | - | | - | - |

**Tableau05(suite01)**:Activité antifongique des actinomycètes contre les levures en j07

| **Les25 souches d'actino mycetes** | J7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | ATP40 | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| ***M.facie*** | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 25 | - | - | - | - | - | | - | - |
| ***C.Krus*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - |
| ***ICF44*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - |
| ***C.Para*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 13 | - | - | - | - | 8 | - | - | | - | - |
| ***Crepto*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | 8 | 13 | - | - | - | - | - | | - | - |
| ***C.AL*** | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - |

**Tableau05(suite02)**:Activité antifongique des actinomycètes contre les levures en j10

| Les 25 souches d'actinomycetes | J10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | ATP40 | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| *M.facien* | - | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 9 |
| *C.Krus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *ICF44* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 | - | 23 | 9 | 10 | - | - | - | - | 7 | - | 8 | - | 9 |
| *C.Parap* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 9 | - | - | - | - | - | - |
| *Crepto* | - | - | - | - | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | | - | 8 | - | 10 | - | - | - | 7 |
| *C.Al* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**Tableau05(suite03)**:Activité antifongique des actinomycètes contre les levures enj14

| Les 2 souches d'actinomycetes | J14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | ATP40 | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| *M.facien* | | - | - | - | | - | - | - | - | - | 1 | 14 | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - | - | - |
| *C.Kruse* | - | 10 | 10 | 10 | | 20 | - | - | - | - | 20 | - | - | 15 | - | 8 | 14 | 15 | - | 25 | - | 22 | - | - |
| *ICF44* | - | - | - | - | 13 | 20 | - | - | - | - | 20 | 21 | - | 10 | - | - | 9 | 12 | - | - | - | - | - | - |
| *C.Parap* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - |
| *Crepto* | - | - | - | - | - | - | - | 11 | - | - | - | - | - | 14 | | | 11 | 12 | - | - | - | - | - | - |
| *C.al* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 11 | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - |

Les résultats présentés dans **le tableau 05 et suite 01 , 02 et 03**mettent en évidence l'activité inhibitrice variable des souches d'actinomycètes contre différentes espèces de levures. Certaines souches, comme ATP50, GH65 et ATSP15, démontrent une activité significative, notamment contre *Candida krusei*, avec des zones d'inhibition atteignant jusqu'à 25 mm. En revanche, d'autres souches, telles que ATSP6 ou ATSP28, montrent peu ou pas d'effet, suggérant une spécificité d'action selon les métabolites produits. Les levures présentent également des sensibilités différentes :*C. krusei* est particulièrement sensible à plusieurs souches, tandis que *Candida albicans* reste peu affectée, hormis par quelques exceptions comme ATP50 ou GH57.

L'évolution temporelle de l'activité révèle des dynamiques distinctes.Par exemple, ATSP25 inhibefortement *M.facience* àJ7(25mm),mais cette activité disparaît aux autres jours,ce qui pourrait indiquer une production transitoire decomposés actifs. Àl'inverse,
Des souches comme ATP50 maintiennent une inhibition constante contre *C.krusei* entreJ10 et J14, suggérant une stabilité de leur effet antifongique.

Ces observations démontrent bien le potentiel des actinomycètes comme source de molécules antifongiques, en particulier contre des levures résistantes.

**Tableau06**:activité des actinomycètes contre les champignons j3

| **Les 2 souches d'actinos mycetes** | **J3** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ATSP6** | **ATSP8** | **ATSP11** | **ATSP12** | **ATSP13** | **ATSP24** | **ATSP26** | **ATSP28** | | **ATP39** | **ATP49** | **ATP50** | **GH65** | **ATSP79** | **ATSP15** | **ATSP18** | **ATSP25** | **ATSP36A** | **ATP40** | **ATP41** | **ATP46** | **ATP48** | **GH57** | **OS66** | **ATSP78** |
| ***Asp.scler*** | **16** | | - | | - | - | **9** | **85** | - | **1** | **10** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***A.flav*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***A.nomia*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ***A.fumgi*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **9** | **8** | - | **12** | - | - | - | - |

**Tableau06(suite01)**:activité des actinomycètes contre les champignons j7

| | J7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | ATSP8 | ATSP11 | ATSP12 | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | ATSP28 | ATP37 | ATP39 | ATP49 | ATP50 | GH65 | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | ATP40 | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| ***A.nomia*** | - | | - | - | - | - | - | | - | - | 12 | | 1 | - | | - | 9 | | | | - | - | | - | - |
| ***A.Scler*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | | - | 12 | | | | 8 | - | | - | - |
| ***A.fumig*** | 1 | 10 | - | - | - | - | 9 | - | - | - | - | | - | - | | - | 12 | | | | 7 | | | | 8 |
| ***Talo.am*** | - | - | - | 2 | - | 17 | - | - | - | 1 | 11 | 1 | - | 1 | 8 | 8 | | | | | - | 8 | | - | 9 |
| ***T.rubum*** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | - | - | | - | - |

**Tableau06(suite02)**:activité des actinomycètes contre les champignons j10

| Les 25 souches d'actino smycete | J10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATSP6 | | | | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | | ATP37 | ATP39 | ATP49 | | | ATSP79 | ATSP15 | ATSP18 | ATSP25 | ATSP36A | | ATP41 | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| ***A.nomic*** | - | | | | - | - | - | | - | - | - | | | - | | 1 | - | | 15 | | 10 | - | | - | 8 |
| ***A.scle*** | - | - | | - | - | - | - | | - | - | - | | - | - | | - | - | | | | - | - | | - | - |
| ***A.fumig*** | - | - | | - | - | - | - | | - | - | - | | - | - | | 9 | - | 11 | | | 8 | 9 | | - | 10 |
| ***T.rubru*** | - | - | | - | - | - | - | | - | - | - | | - | - | | 6 | - | | | | - | - | | - | - |
| ***Talo.am*** | - | - | | - | - | 18 | 7 | 19 | - | 2 | - | | - | - | | | | | | | - | - | | - | - |
| ***A.flav*** | - | 12 | | 11 | - | 7 | - | 12 | - | - | - | 12 | 6 | 7 | | - | - | | | | 7 | - | | - | 8 |

**Tableau06(suite03)**:activité des actinomycètes contre les champignons j14

| Les25 souches d'actinomycetes | J14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ATSP13 | ATSP24 | ATSP26 | | ATP37 | ATP39 | ATP49 | | | ATSP79 | | ATSP18 | ATSP25 | | | | ATP46 | ATP48 | GH57 | OS66 | ATSP78 |
| *A.nomi* | 10 | 8 | 1 | | 7 | 10 | 8 | | 12 | - | - | | | 16 | | 16 | - | | | | 23 | - | | - | |
| *A.scler* | - | - | - | - | 11 | - | - | 11 | 10 | - | - | 16 | | 1 | | - | - | | | | - | - | | - | - |
| *A.fumig* | - | - | - | - | - | - | 16 | | 11 | - | - | | | - | | | - | | | | 13 | - | | - | - |
| *T.rubru* | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | | | - | | - | - | | | | 20 | | | - | 20 |
| *Talo.am* | - | - | - | - | - | - | - | | - | - | - | 28 | 17 | 3 | | | | | | | - | - | | - | - |
| *A.flav* | | | | | | | | | | | | | | | | | 7 | | | | 17 | | | | 11 |

**Le tableau 06 et suite (01 , 02 et 03 )** démontrent une variabilité significative de l'activité antifongique des 25 souches d'actinomycètes testées contre divers champignons pathogènes (*Aspergillus nomiae*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Talaromyces amestolkiae*),avec des profils d'inhibition distincts selon les souches et les espèces cibles, ainsi qu'une dynamique temporelle marquée(J3àJ14).Certaines souches, comme ATP39, exhibent une activité sélective, inhibant fortement *A. nomiae* (15mmàJ10)et *T. amestolkiae* (26mmà J7),tandis queATP50 cible préférentiellement *A.flavus* (12mmàJ10)et *A.nomiae*(14 mmà J14). D'autres, telles que ATSP18 et ATSP25, agissent de manière plus ciblée contre *A. fumigatus* (9–12 mm) et *T. rubrum* (6–9 mm), respectivement.

La dynamique temporelle révèle des comportements contrastés:l'activité de ATP46 contre *A. nomiae* s'intensifie entre J10 (10 mm) et J14 (23 mm), suggérant une production accrue de métabolites antifongiques, tandis que ATSP26 n'exerce qu'un effet transitoiresur *A. fumigatus* (9 mm à J7),disparaissantà J14.Parmiles souches à large spectre, ATP37 et ATP40 se distinguent par leur inhibition simultanée de *A. nomiae* (12 mm) et *A.fumigatus*(11–15mm)àJ14,alorsque GH57et OS66 maintiennent une activité modérée
Mais constante contre*T.rubrum*(10–20mm)et*A.flavus*(8–11mm).

Les tests mettent également en lumière des résistances fongiques, comme celles d'*Aspergillus sclerotiorum* et d'*A. flavus* ATCC, insensibles à la majorité des souches. À l'inverse, *T.amestolkiae* se montre particulièrement sensibleàATP39(26mm)et ATSP79(35 mm à J14), potentiellement en raison de mécanismes d'action spécifiques (ex. production de polykétides ou peptides ciblant la paroi fongique).

Parmi les 25 souches étudiées, cinq souches se distinguent par leur forte activité

antimicrobienne globale : **ATSP 15, ATSP 25, ATP 28, ATP 41 et ATP 46**. Ces souches pourraient constituer des candidats prometteurs pour l'isolement et la caractérisation de nouveaux antibiotiques ou antifongiques. (Étape de l'extraction)

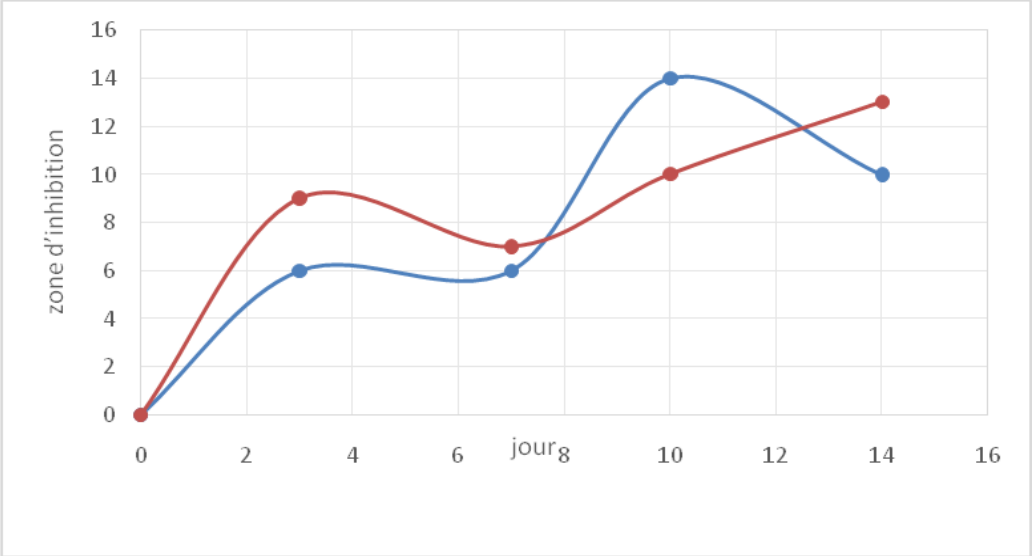



**Figure09**:Activitédelasouche**ATP41**contre*B.antra* et *A.fumig*

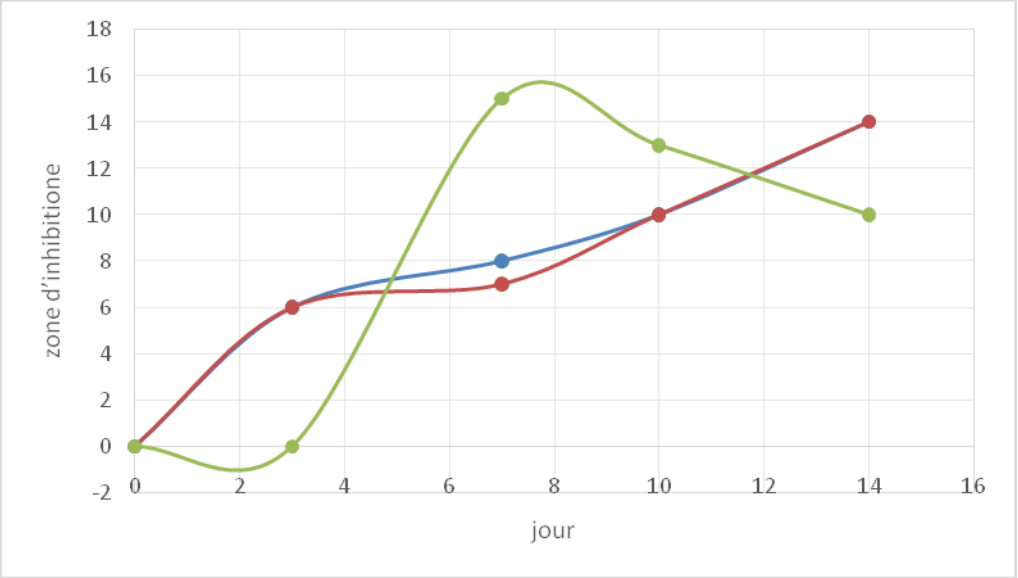



**Figure10**:Activitédelasouche**ATSP25**contre*S.Aureus,A.Flavus Et K.Pneumo 348*

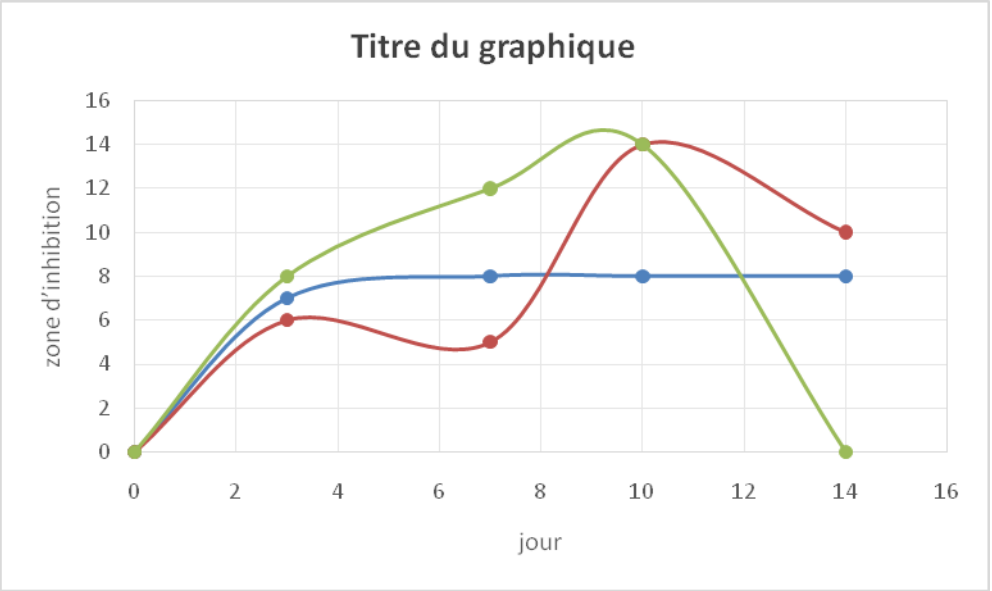
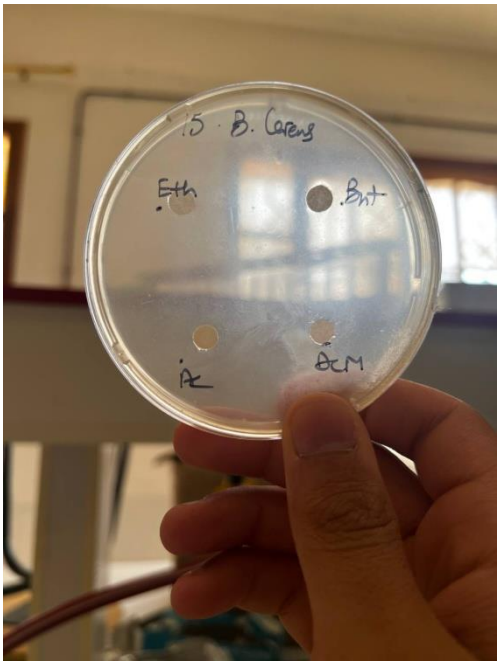



**Figure 11**: Activité de la souche **ATSP15** contre *K.p348 ,INC4 ,A.nomiae et E.Coli*

## Ⅱ. Extraction des molécules bioactives

### II.1. Tests d'activité antimicrobienne

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits des souches ATSP15, ATSP18, ATSP25, ATP41 et ATP46 a été réalisée par la méthode des disques de diffusion contre un panel de bactéries,champignons et levures pathogènes.Les résultats révèlent une activité antimicrobienne variable, dépendante à la fois de la souche cible et du solvant d'extraction utilisé (éthanol, butanol, dichlorométhane, acétate d'éthyle), suggérant que chaque isolat produit un spectre distinct de métabolites antifongiques. Les résultats de l'activité antifongique des extraits des isolats par rapport aux souches cibles sont donnés dans le **Tableau 07**.







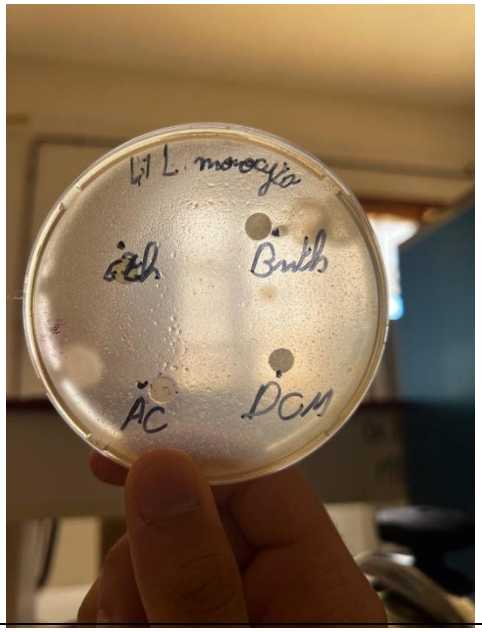






**Planche 02 :** Extraction des molécules bioactives

**Tableau07**:Extraction des molécules bioactives

| souche | | Eth | But | AE | DCM |
|---|---|---|---|---|---|
| ATSP15 | L,monocyt | - | - | - | - |
| | E.coli | - | - | - | - |
| | Parapsi | - | - | - | - |
| | Crepto | - | 14 | - | 19 |
| | A.Nomiae | - | - | - | - |
| | B.antra | - | - | - | - |
| | C.Krusei | - | - | - | - |
| | S.epi | - | 15 | - | 18 |
| | B.cereus | - | 27 | - | - |
| ATSP25 | S.aureus | - | - | - | - |
| | M.faciens | 25 | 47 | 14 | - |
| | A.flavus | - | - | 46 | 28 |
| | Crepto | 25 | - | - | - |
| | A.sclero | 14 | - | 14 | 19 |
| ATP41 | B.Cereus | 48 | - | 14 | 30 |
| | L.Monocyt | 14 | - | 30 | - |
| | A.fumig | - | - | - | - |
| | E.coli | - | - | - | - |
| | A.flavus | - | - | - | 18 |
| ATP46 | A.fumig | 13 | - | - | - |
| | A.Nomiae | - | 20 | - | - |
| ATSP28 | A.Nomiae | - | 16 | - | - |
| | A. Flav | - | - | 20 | - |

Les résultats montrés dans le **Tableau 07**mettent en évidence l'impact majeur du choix du solvant d'extraction sur l'efficacité antimicrobienne des métabolites produits par les actinomycètes. Chaque solvant testé – éthanol (Eth), butanol (But), acétate d'éthyle (AE) et dichlorométhane (DCM) – présente un profil d'activité distinct, reflétant sa capacité à extraire sélectivement certaines classes de molécules bioactives. Ces différences soulignent l'importance d'adapter les protocoles d'extraction en fonction des cibles microbiennes visées.

Le butanol s'est révélé particulièrement efficace contre certaines bactéries Gram-positives, comme en témoigne son inhibition marquée de *Bacillus cereus* (27 mm avec ATSP15) et de *Staphylococcus epidermidis* (15 mm avec la même souche). Cette performance peut s'expliquer par sa polarité intermédiaire, qui lui permet d'extraire des métabolites amphiphiles, tels que des peptides ou des glycosides, actifs contre ces pathogènes. Cependant, son inefficacité contre d'autres cibles, comme *Staphylococcus aureus* ou les bactéries Gram-négatives, indique que son spectre d'action reste limité à certaines familles de composés.

Le dichlorométhane, en revanche, a montré une excellente activité contre les champignons, notamment *Aspergillus flavus* (28 mm avec ATSP25) et *Cryptococcus spp*. (19 mm avec ATSP15). Son caractère fortement apolaire suggère qu'il extrait préférentiellement des molécules hydrophobes, telles que des terpènes ou des polycétides, connus pour leur action antifongique. Par ailleurs, son inhibition de certaines bactéries Gram-positives, comme *B. cereus* (30 mm avec ATP41), confirme sa polyvalence, bien qu'il reste inefficace contre les microorganismes à membrane externe complexe, tels que *E. coli*.

L'éthanol, bien que moins systématiquement efficace, a démontré une activité remarquable dans certains cas, comme l'inhibition de *Micrococcus faciens* (25 mm avec ATSP25) et de *B. cereus* (48 mm avec ATP41). Ces résultats suggèrent qu'il est particulièrement adapté à l'extraction de métabolites polaires ou modérément polaires, tels que des alcaloïdes ou des composés phénoliques, qui peuvent présenter une activité antibactérienne ciblée. Cependant, son inefficacité contre la majorité des autres souches testées limite son utilisation comme solvant universel.

L'acétate d'éthyle, quant à lui, s'est distingué par son action antifongique prononcée, notamment

contre *A. flavus* (46 mm avec ATSP25), ainsi que par son activité antibactérienne contre *Listeria*

*monocytogenes* (30 mm avec ATP41). Sa polarité modérée en fait un solvant idéal pour l'extraction de composés semi-polaires, tels que des lactones ou des dérivés aromatiques, qui pourraient expliquer ces effets inhibiteurs. Toutefois, comme pour les autres solvants, son spectre d'activité reste incomplet, avec une absence d'action contre les levures et les bactéries Gram-négatives.

Ces résultats ouvrent plusieurs perspectives de recherche. La variabilité inter-souches suggère qu'une exploration plus approfondie de la biodiversité des actinomycètes pourrait permettre d'identifier des souches encore plus performantes. La différence d'efficacité selonles solvants indique qu'une optimisation des protocoles d'extraction,peut-être par combinaison des olvants ou utilisation de méthodes alternatives (extraction supercritique, etc.), pourrait améliorer le rendement en composés actifs.

# *Conclusion*

# Conclusion

Ce mémoire a exploré le potentiel des actinomycètes extrêmophiles comme source de nouveaux antibiotiques et antifongiques, en réponse à l'émergence croissante de souches pathogènes résistantes. Les résultats obtenus démontrent que plusieurs souches, notamment ATSP6, ATSP8, ATP50, ATSP13, et ATSP79, présentent une activité antimicrobienne significative contre des bactéries et champignons pathogènes, y compris des souches résistantes comme Staphylococcus aureus et Candida albicans. Les méthodes utilisées, telles que la technique des cylindres d'agar et l'extraction par solvants organiques, ont permis d'identifier des souches prometteuses, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 35 mm pour certaines cibles fongiques.

Les actinomycètes étudiés,isolés à partir de milieux extrêmes,confirment leur capacité à produire des métabolites secondaires bioactifs, ouvrant ainsi des perspectives pour la découverte de molécules innovantes. Les souches sélectionnées, telles queATP50et ATSP79, se distinguent par leur large spectre d'action et leur stabilité de production, ce qui en fait des candidates idéales pour des études approfondies.

**Perspectives:**

Pour poursuivre cette recherche,plusieurs axes pourraient être explorés:

- Identification des molécules actives : Une caractérisation chimique des métabolites produits par les souches les plus actives(par chromatographie, spectrométrie de masse, etc.) permettrait d'isoler et d'identifier les composés responsables des activités antibiotiques et antifongiques observées.
- Tests in vivo : Évaluer l'efficacité et la toxicité des extraits bruts ou des molécules purifiées sur des modèles animaux serait une étape cruciale pour valider leur potentiel thérapeutique.
- Optimisation des conditions de culture : Des études pourraient être menées pour améliorer le rendement de production des métabolites en ajustant les paramètres de croissance (pH, température, milieu de culture).
- Exploration de la diversité génétique : Le séquençage génomique des souches prometteuses pourrait révéler des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse de

Composés bioactifs,offrant des pistes pour l'ingénierie métabolique.

- Applications biotechnologiques : Les souches productrices pourraient être exploitées dans des domaines tels que l'agriculture (biocontrôle) ou l'industrie pharmaceutique (développement de nouveaux médicaments).

En conclusion, ce travail souligne l'importance des actinomycètes extrêmophiles comme réservoir de molécules antimicrobiennes et appelle à des recherches multidisciplinaires pour transformer ces découvertes en solutions concrètes face à la résistance microbienne.

# *References bibliographiques*

# *A*

**Aouar, L. (2006)**.Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturales des souches isolées et purifiées. Thèse de magistère. Option : Biochimie et Microbiologie appliquée. Université Mentouri, Constantine – Algérie. 3p.

# *B*

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

**Baldacci, E. (1962)**.Tendances actuelles de la classification des actinomycètes.*AnnSocBelge MédTrop*, 4, 633–646.

**Bawazir, A. M. A., & Shantaram, M. (2023)**. Actinomycetes: A never-ending source of bioactive compounds—An overview on antibiotics production. *Antibiotics*, 10(5), 483.

**Bawazir, A. M. A., & Shantaram, M. (2023).** Ecology and distribution of actinomycetes in nature – A review. *International Journal of Current Research*, 10(7), 71664–71668.

**Berdy, J. (2012)**. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385–395.

**Bérdy, J., & Klement, Z. (2021)**. The extremophilic actinobacteria: From microbes to medicine. *Antibiotics*, *10*(6), 682.

**Boubetra, D., Zitouni,A.,Bouras, N.,Mathieu,F., Lebrihi, A.,Schumann,P.,Spröer, C., Klenk, H.-P., & Sabaou, N. (2013).** Novel bioactive compounds from Saharan soil actinomycetes. *Journal of Antibiotics*, 66(6), 345–350.

# *D*

**Dar, M. S., & Ahmad, I. (2024)**. Screening and evaluation of antibacterial active strains of Actinomycetes isolated from Northern Indian soil for biofilm inhibition against selected ESKAPE pathogens. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, *11*(1), 340–355.

**Donadio, S., Sosio, M., & Lancini, G. (2002).** Impact of the first Streptomyces genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), 377–380.

## *E*

**El Karkouri, A., Ait Assou, S., & El Hassouni, M. (2019)**. Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances froman extreme Moroccanbiotope.*ThePan African Medical Journal, 34*, 179.

## *F*

**Flärdh,K. (2003).**Growth polarity and cell division in Streptomyces.*CurrentOpinionin Microbiology*, 6, 564–571.

## *G*

**Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999)**. Antifungal agents: Modeof action, mechanisms of resistance,and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.*Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.

**Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983)**. Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216.

**Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B. K., Sandeep, D., Vidya,M.S.,Deepthi,K.,&Rupela,O.(2021)**.Actinomycetes as an environmental scrubber. In *Actinomycetes: Diversity, Characterization and Applications* (Chap. 23).

## *H*

**Hamedi, J., Mohammadipanah, F., & Ventosa, A. (2011).** Isolation and characterization of bioactive actinomycetes from extreme environments.*Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 893–902.

**Hodgson, D. A. (1992)**. Differentiation in actinomycetes. In: *Prokaryotic Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge.

**Hopwood, D. A. (2007)**.*Streptomycesin nature and medicine: Theantibiotic makers*. Oxford University Press.

## *K*

Kieser,T., Bibb,M. J., Buttner,M. J.,Chater,K. F., &Hopwood,D.A.(2000).*Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation.

## *L*

Lewin,G.R.,Carlos,C.,Chevrette,M.G.,Horn,H.A.,McDonald,B.R.,Stankey,R.J.,Fox, B.G.,&Currie,C.R.(2016).Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual Review of Microbiology*, 70, 235–254.

## *M*

**Mariat,F.,&Sebald,M.(1990).**Les actinomycetes .Dans:Bactériologie médicale.Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.

**Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M. H., & Shivaveerakumar, S. (2024).** Actinomycetes: Isolation,cultivation and its active biomolecules. *Journal of Pureand Applied Microbiology*, 18(1), 118–143.

**Mesbah, A., & Mansouri, A. (2015)**. Étude de l'activité antibactérienne de quatre souches actinomycétales d'origine saharienne. Université des Frères Mentouri Constantine.

**Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999)**. Hyphal death during colony development in Streptomyces antibioticus: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *Journal of Cell Biology*, 145, 515–525.

## ***N***

**Nouasri, A., Zitouni, A., & Toumi, M. (2023).** Étude taxonomique de deux genres d'actinobactéries isolés de sols sahariens algériens. *Revue Agrobiologia*.

**Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C.,Pukall,R.,Klenk,H.-P.,Goodfellow,M.,&Göker,M.(2018).**Genome-basedtaxonomic classification of the phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2007.

## ***O***

**Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Bull, A. T. (2009).** Diversity and biotechnological potential of actinobacteria from arid soils. *Environmental Microbiology*, 11(8), 2026–2035.

## ***P***

Prescott,L.M.,Harley,J.P.,&Klein,D.A.(2010).*Microbiologie*(2eéd.).DeBoeck, Bruxelles.

## ***R***

**Robertsen, H. L., & Musiol-Kroll, E. M. (2019).** Actinomycete-derived polyketides as a source of antibiotics and lead structures for the development of new antimicrobial drugs. *Antibiotics*, 8(4), 157.

## ***T***

**Trenozhnikova, L., & Azizan, A. (2018)**. Discovery of actinomycetes from extreme environments with potential to produce novel antibiotics. *Central Asian Journal of Global Health, 7*(1), 337.

## ***V***

**Ventura,M.,Canchaya,C.,Tauch,A.,Chandra,G.,Fitzgerald,G.F.,Chater,K.F.,&van Sinderen,D.(2007)**.Genomics of Actinobacteria:tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548.

**Vergidis,P.(2023,septembre).**Médicaments antifongiques.*ManuelMSD–Édition professionnelle.*

## ***W***

**Wikipedia. (2025).** Actinomycètes. Consulté le 16 mai 2025, sur https://fr.wikipedia.org/wiki/Actinomycetes

# *Annexes*

# Composition des milieux des cultures

## ISP2:

| | |
|---|---|
| Extrait de levure | 4g |
| Extrait de malt | 10g |
| Glucose | 4g |
| Agar | 20g |
| H2O distilleé | 1000ml |

PH:7.2

## GYEA:

| | |
|---|---|
| Extrait de levure | 10g |
| Glucose… | 10g |
| Agar | 18g |
| Eau distilleé | 1000ml |

PH:6,8

## ISP2 molle:

| | |
|---|---|
| Glucose | 4g |
| Extrait de levure | 4g |
| Extrait de malt | 10g |
| Agar | 10g |
| Eau distillée | 1000ml |

PH:7,2

## ISP2liquide:

| | |
|---|---|
| Glucose | 4g |
| Extrait de levure | 4g |
| Extrait de malt | 10g |
| Eau distillée | 1000ml |