

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر
Université de Saida Dr MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la nature et de la Vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement et évaluation du potentiel antimicrobien des actinomycètes isolés à partir de différents types de sols de l'Ouest algérien

Présenté par :

■ Mr : AFFANI Slimane

Soutenu le : 10/12/2025

Devant le jury composé de :

Président

Examineur

Rapporteur

Co-Rapporteur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

Mme. CHAHROUR Wassila

Mr. BENREGUIEG Mokhtar

Mme. BOURIAH Nacéra

MCA Université UMTS

MCA Université UMTS

Pr Université UMTS

MCB Université UMTS

Année universitaire 2024/2025

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر

Université de Saida Dr MOULAY TAHAR



N° d'Ordre

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement et évaluation du potentiel antimicrobien des actinomycètes isolés à partir de différents types de sols de l'Ouest algérien

Présenté par :

■ Mr : AFFANI Slimane

Soutenu le : 10/12/2025

Devant le jury composé de :

Président

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCA Université UMTS

Examineur

Mme. CHAHROUR Wassila

MCA Université UMTS

Rapporteur

Mr. BENREGUIEG Mokhtar

Pr Université UMTS

Co-Rapporteur

Mme. BOURIAH Nacéra

MCB Université UMTS

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu, Allah, Le Tout-Puissant, Le Généreux et Le Miséricordieux, pour m'avoir accordé la force, la patience, la volonté et le courage nécessaires pour mener à terme ce modeste travail. Je Le remercie également de m'avoir guidé vers la lumière du savoir et de la science, et de m'avoir permis d'avancer sur le chemin de la connaissance.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadrant, **Mr. Benreguieg Mokhtar**, pour m'avoir guidé avec patience, rigueur scientifique et bienveillance tout au long de la réalisation de ce mémoire. Ses conseils éclairés, sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée ont été essentiels à l'aboutissement de ce travail. Je lui témoigne mon profond respect et ma sincère reconnaissance.

J'exprime également mes remerciements à **Mme Bouriah Nacéra**, Co-Rapporteuse de ce mémoire, pour l'attention portée à mon travail et pour ses remarques constructives.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury, qui me font l'honneur d'évaluer ce mémoire et de s'intéresser à mes travaux. Je remercie particulièrement **Mr. Benabbou Taha Ahmed** et **Mme Chahrour Wassila** pour le temps qu'ils consacrent à l'examen de ce travail.

Je remercie chaleureusement l'équipe du laboratoire, les techniciens et toutes les personnes dont l'aide a facilité la réalisation de cette étude.

Mes remerciements particuliers vont à Mme.Belgacem Habiba, Mme.Fatima Zohra Djebbah et Mme. soria Fares et Mr. Gacem Mohamed Amine et Mr. Belil yahia pour leurs conseils, leur accompagnement et leur engagement scientifique

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble des enseignants et du personnel académique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie, Université de Saïda – Dr. Moulay Tahar, pour la qualité de l'enseignement dispensé, leur engagement et leur accompagnement tout au long de ma formation en Master.

J'adresse également mes remerciements à mes camarades de promotion, pour l'ambiance de travail, le partage de connaissances et l'entraide qui ont rendu cette expérience encore plus enrichissante

Dédicace

À mes parents,

Je vous dédie ce mémoire avec tout mon amour et ma profonde gratitude. Vos sacrifices, votre patience et votre soutien inconditionnel ont rendu ce chemin possible.

À mes frères Brahim, Amine et Abdelmadjid, ainsi qu'à vos épouses et vos enfants,

Vous êtes ma famille, ma fierté et ma source de motivation. Même avec vos responsabilités, vous avez trouvé le temps de me soutenir. Merci pour votre amour, votre présence et votre fraternité.

À mes sœurs et à vos familles,

À vous, vos maris et vos enfants que j'aime énormément, merci pour votre douceur, votre affection et vos encouragements. Votre présence dans ma vie est un bonheur précieux.

À mes amis Hamid, Omar, Djamel et Bahaa, Mahmoud , Oussama

Merci pour votre amitié sincère et votre soutien tout au long de ce parcours.

À toutes celles et ceux qui ont cru en moi,

Je vous porte dans mon cœur et je vous rends hommage à travers ce travail.

Affani Slimane

Liste des abréviations

°C: Degré Celsius

70S :70 Svedberg

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ADN 16S: ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomale.

ANI: Average Nucleotide Identity

ATCC: American Type Culture Collection

Bc: *Bacillus cereus*

Bs: *Bacillus subtilis*

CaCO₃: Bicarbonate de calcium

Cas9: associated protein 9

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DDH: DNA–DNA Hybridization

DO: Densité Optique

Ec: *Escherichia coli*

g/L: gramme par litre

GC%: pourcentage de Cytosine Guanine

GlnR: Glutamine Regulator

GN: Gélose nutritive

GPS: Système de Positionnement Global

GYM: Gélose-Yeast-extrait de Malt

IBMC Strasbourg: Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire Strasbourg

ISP: International Streptomyces Project

Kp: *Klebsiella pneumoniae*

LPS: Lipopolysaccharide

MB: million base pairs

Mm: Millimètres

NaCl: Chlorure de sodium

p/v: Poids/Volume

PDA: Potato Dextrose Agar

pH: Potentiel d'Hydrogène

Rpm: Rotation par minute

RZ: Rhizosphère Ziziphus

Sa: *Staphylococcus aureus*

SARP: Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins

SB: Sebkha Bougtob

SCA: Starch Casein Agar

SMk: Sédiments Marins Kristal

TA: Tindouf Acacia

UFC: Unité Formant colonies

WGS: Whole Genome Sequencing

µl: Microlitres

Liste des tableaux

Tableau 01 : Exemples des antibiotiques produits par les actinomycètes.	24
Tableau 02 : Exemples de métabolites antiviraux identifiés chez les Actinomycètes entre 2016 et 2023	25
Tableau 03 : Liste des produits à base de <i>Streptomyces spp.</i> utilisés comme agents de biocontrôle disponibles sur le marché mondial	27
Tableau 04 : Repérage géographique des stations d'échantillonnage par GPS	31
Tableau 05 : Tableau récapitulatif des prétraitements appliqués aux échantillons	35
Tableau 06 : Caractéristiques des souches indicatrices.....	38
Tableau 07 : Résultats du pH des échantillons.....	44
Tableau 08 : Aspect macroscopique des isolats d'actinobactéries isolés à partir des échantillons du sol	50
Tableau 09 : Résultats du criblage primaire de l'activité antimicrobienne (méthode cylindre d'agar)	53
Tableau 10 : Résultats du criblage secondaire des extraits produits par les isolats à l'aide de la méthode de diffusion en puits et méthode de disque	57

Liste des figures

Figure 01: Images au microscope électronique à balayage (MEB).....	7
Figure 02 : Structure filamenteuse caractéristique des actinomycètes montrant le mycélium du substrat et les hyphes aériennes	8
Figure 03 : Les principales voies du catabolisme des glucides	9
Figure 04 : Carte génétique du chromosome de <i>Streptomyces ambofaciens</i> et localisation des différents clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires	10
Figure 05 : Diversité des habitats des actinomycètes	11
Figure 06: Environnements extrêmes pouvant être explorés pour la recherche d'extrêmophiles	13
Figure 07 : Caractéristiques morphologiques des spores chez différents genres d'actinobactéries	14
Figure 08 : Cycle de vie des actinomycètes et les différents types de conidiospores	17
Figure 09 : Morphologie et sporulation des hyphes aériens.....	19
Figure 10 : Dates clés des antibiotiques et contributions du genre <i>Streptomyces</i>	20
Figure 11 : Les différents produits issus des actinomycètes et leurs perspectives (.....	23
Figure 12 : structure chimique des substances antifongiques	25
Figure 13 : Localisation géographique des sites de prélèvement des sols	32
Figure 14 : Photographies des sites de prélèvement des échantillons de sol.....	33
Figure 15 : Site de prélèvement des sédiments marins.....	34
Figure 16 : Méthode des cylindres d'agar	39
Figure 17 : Processus de fermentation en milieu liquide dans des erlenmeyers de 500 mL.	40
Figure 18 : Étapes du processus d'extraction des métabolites secondaires par extraction liquide-liquide et concentration par évaporation sous vide (rotavapor).	41
Figure 19 : Différences de couleurs observées entre les échantillons de sol collectés.....	45
Figure 20 : Boîtes de Pétri montrant l'isolement d'actinobactéries à partir d'un échantillon de sol rhizosphérique (RZ) sur milieu SCA, après ensemencement de la dilution 10^{-3}	45

Figure 21 : contamination par les gram positive <i>Bacillus</i>	46
Figure 22 : Variation du nombre d'isolats selon la dilution d'ensemencement	47
Figure 23 : Nombre des isolats par apport le type d'échantillon de sol	48
Figure 24 : Aspect macroscopique des isolats	51
Figure 25 : Aspect microscopique des isolats	51
Figure 26 : Criblage primaire des isolats (méthode cylindre d'agar)	52
Figure 27 : Résultats visuels de la fermentation des isolats	54
Figure 28 : Criblage secondaire de l'activité antimicrobienne de la phase liquide et du méthanol (contrôle négatif), ainsi que de l'extrait de la souche A8 obtenu à partir de l'extraction en milieu liquide	55
Figure 29 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'extrait en utilisant la méthode de diffusion en puits sur milieu MHA après 24H d'incubation	56
Figure 30 : Résultats du criblage secondaire d'activité antibactérienne d'extrait de l'isolat A8 et A13	58
Figure 31 : Criblage secondaire d'extrait d'isolat A13 par la méthode de disque	59
Figure 32 : Résultats du criblage secondaire d'activité antifongique d'extrait de l'isolat A8 et A13	60

Résumé

Isolement et évaluation du potentiel antimicrobien des actinomycètes isolés à partir de différents types de sols de l'Ouest algérien

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles sources naturelles de biomolécules à activité antimicrobienne. Il vise à isoler et évaluer le potentiel antimicrobien des actinomycètes issus de différents types de sols de l'Ouest algérien. Un total de 38 isolats d'actinobactéries a été obtenu : 16 de Djbarat (Saïda), 4 de Bougtob (El Bayadh), 16 de la rhizosphère d'acacia de Tindouf et 2 du sol marin de Kristel (Oran).

Le criblage primaire, réalisé par la méthode du cylindre d'agar, a révélé que sept isolats présentaient une activité antimicrobienne positive. Ces souches ont ensuite été fermentées, puis les métabolites secondaires ont été extraits à partir des milieux liquide et solide. Cependant, le criblage secondaire, effectué par diffusion sur puits et méthode de disque, a montré que les extraits atteignant des zones jusqu'à 40 mm. Les isolats A8 et A13 ont présenté les activités antimicrobiennes les plus marquées, traduisant leur capacité à produire des métabolites secondaires bioactifs.

Les extraits issus de ces souches ont montré des zones d'inhibition élevées contre les bactéries à Gram positif, atteignant jusqu'à 41 mm contre *Bacillus cereus* ATCC 25921, 33 mm contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et 27 mm contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Une activité antifongique notable a également été observée, avec des zones d'inhibition pouvant atteindre 31 mm contre *Phytophthora infestans*, 27 mm contre *Candida albicans* et 21 mm contre *Rhizoctonia*.

Ces résultats mettent en évidence le potentiel antimicrobien élevé des actinomycètes isolés, en particulier des souches A8 et A13, et suggèrent qu'elles constituent des candidats prometteurs pour la découverte de nouveaux composés antimicrobiens d'origine naturelle.

Mots clés : Actinomycètes – Activité antimicrobienne – Sols de l'Ouest algérien – Métabolites secondaire – Fermentation et extraction des métabolites

ملخص

عزل وتقييم القدرة المضادة للميكروبات للأكتينومييسيتات المعزولة من أنواع مختلفة من التربة في غرب الجزائر

يندرج هذا العمل في إطار البحث عن مصادر طبيعية جديدة للجزيئات الحيوية ذات النشاط المضاد للميكروبات. يهدف إلى عزل وتقييم السلالات الشعاعية (Actinomycetes) المستخلصة من أنواع مختلفة من التربة في الجهة الغربية من الجزائر، بغرض الكشف عن قدرتها على إنتاج مركبات مضادة للجراثيم والفطريات. تم الحصول على ثمان وثلاثين (38) عزلة من البكتيريا الشعاعية (Actinobacteria)، منها: 16 من تربة جبّارات (سعيدة)، و4 من بوعطوب (البيض)، و16 من ريزوسفير الأكاسيا بتندوف، و2 من تربة بحرية من كريستال (وهران).

أظهر التحري الأولي للنشاطات المضادة للميكروبات باستعمال تقنية أسطوانة الأجار (Agar Cylinder) وجود نشاط إيجابي في سبع عزلات. وقد خضعت هذه السلالات بعد ذلك إلى عملية التخمير على أوساط سائلة وصلبة، تلتها عملية استخلاص المستقلبات الثانوية (Secondary Metabolites) باستعمال مذيبات عضوية مناسبة.

أما التحري الثانوي للنشاط المضاد للميكروبات الذي تم تطبيقه بطريقتي الانتشار عبر الأبار

(Well Diffusion Method) والأقراص (Disk Diffusion Method)، فقد بين أن بعض

المستخلصات شكلت مناطق تثبيط (Zones of Inhibition) بلغت حتى 40 مم. وأظهرت العزلتان A8 و A13 نشاطًا مضادًا قويًا، مما يشير إلى قدرتهما العالية على إنتاج مركبات حيوية فعالة.

أثبتت نتائج الاختبارات المضادة للبكتيريا موجبة الغرام (Gram-positive bacteria) أن المستخلصات

سجلت مناطق تثبيط بلغت 41 مم ضد *Bacillus cereus* ATCC 25921، و33 مم ضد

Staphylococcus aureus ATCC 6538، و27 مم ضد *Bacillus subtilis* ATCC 6633. كما أظهرت

اختبارات النشاط المضاد للفطريات (Antifungal Activity) مناطق تثبيط وصلت إلى 31 مم ضد

Phytophthora infestans، و27 مم ضد *Candida albicans*، و21 مم ضد *Rhizoctonia*

تُبرز هذه النتائج الكفاءة العالية للنشاط المضاد للميكروبات لدى السلالات الشعاعية المعزولة، ولا سيما

العزلتين A8 و A13، مما يجعلها مرشحين واعدن لاكتشاف مركبات جديدة ذات أصل طبيعي قد تُسهم في تطوير مضادات حيوية فعالة ضد الكائنات الممرضة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الشعاعية – نشاط مضاد للميكروبات – تراب غرب الجزائر – المستقلبات

الثانوية – التخمير واستخلاص المستقلبات

Abstract

Isolation and evaluation of the antimicrobial potential of actinomycetes isolated from different soil types of Western Algeria

This study is part of the search for new natural sources of bioactive molecules with antimicrobial activity. It aims to isolate and evaluate the antimicrobial potential of actinomycetes obtained from various soil types in western Algeria. A total of 38 actinobacterial isolates were obtained: 16 from Djbarat (Saïda), 04 from Bougtob (El Bayadh), 16 from the rhizosphere of acacia in Tindouf, and 02 from marine soil in Kristel (Oran).

Primary screening, carried out using the agar cylinder method, revealed that seven isolates exhibited positive antimicrobial activity. These strains were then fermented and their secondary metabolites were extracted from both liquid and solid media. Secondary screening, performed using the well diffusion and disk diffusion methods, showed inhibition zones reaching up to 40 mm. Isolates A8 and A13 exhibited the strongest antimicrobial activities, demonstrating their ability to produce bioactive secondary metabolites with a broad spectrum of action.

The extracts from these strains showed high inhibition zones against Gram-positive bacteria, reaching 41 mm against *Bacillus cereus* ATCC 25921, 33 mm against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, and 27 mm against *Bacillus subtilis* ATCC 6633. A significant antifungal activity was also observed, with inhibition zones up to 31 mm against *Phytophthora infestans*, 27 mm against *Candida albicans*, and 21 mm against *Rhizoctonia*.

These findings highlight the high antimicrobial potential of the isolated actinomycetes, particularly strains A8 and A13, suggesting that they are promising candidates for the discovery of new naturally derived antimicrobial compounds.

Keywords: Actinomycetes – Antimicrobial activity – Western Algerian soils – Secondary metabolites – Fermentation and extraction of metabolites

Table des matières

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux	III
Liste des figures.....	IV
Résumé	VI
ملخص	VII
Abstract.....	VIII
Table des matières	IX

PARTIE I. INTRODUCTION 1

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 4

CHAPITRE 1. GENERALITES SUR LES ACTINOBACTERIES.....	5
II.1. GENERALITES SUR ACTINOBACTERIES.....	6
II.1.1. HISTORIQUE	6
II.1.2. DEFINITION DES ACTINOBACTERIES	6
II.1.3. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	7
II.1.3.1. Structure cellulaire.....	7
II.1.3.2. Appartenance au règne des bactéries filamenteuses	8
II.1.4. PHYSIOLOGIE DES ACTINOMYCÈTES	8
II.1.4.1. Métabolisme primaire	8
II.1.4.2. Métabolisme secondaire.....	9
II.1.5. ÉCOLOGIE DES ACTINOMYCÈTES	10
II.1.5.1. Actinomycètes du sol.....	11
II.1.5.2. Actinomycètes marins.....	12
II.1.5.3. Actinomycètes dans habitats extrêmes	12
II.1.6. TAXONOMIE ET CRITERES D'IDENTIFICATION	13
II.1.6.1. Taxonomie phénétique.....	13
II.1.6.2. Taxonomie chimiotaxonomique	14
II.1.6.2.1. Paroi cellulaire	15
II.1.6.2.2. Quinones isoprénoïdes	15
II.1.6.2.3. Phospholipides et acides gras	15

II.1.6.2.4. Acides mycoliques	15
II.1.6.3. Taxonomie génotypique (moléculaire)	15
II.1.6.3.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S	15
II.1.6.3.2. Gènes alternatifs pour l'analyse phylogénétique des actinobactéries	16
II.1.6.3.3. Hybridation ADN-ADN et valeur ANI.....	16
II.1.6.3.4. Séquençage du génome entier (WGS)	16
II.1.6.3.5. Phylogénie des actinobactéries basée sur l'analyse du génome complet	16
II.1.7. CYCLE DE VIE DES ACTINOMYCETES	17
II.1.7.1. Germination des spores.....	17
II.1.7.2. Croissance végétative (mycélium substrat)	18
II.1.7.3. Différenciation morphologique.....	18
II.1.7.4. Formation du mycélium aérien	18
II.1.7.5. Sporulation.....	18
II.1.7.6. Maturation des spores	19
II.1.8. MISE EN EVIDENCE DU GENRE <i>STREPTOMYCES</i>	19
II.1.8.1. Rôle majeur dans production d'antibiotiques	20
II.1.8.2. Importance génétique et industrielle.....	20
II.1.8.3. Particularités morphologiques et génétiques	21
CHAPITRE 2. INTERET BIOTECHNOLOGIQUE DES ACTINOMYCETES.....	22
II.2. INTERET BIOTECHNOLOGIQUE DES ACTINOMYCETES.....	23
II.2.1. PRODUCTEURS DE METABOLITES SECONDAIRES A HAUTE VALEUR AJOUTEE	23
II.2.1.1. Agents antibactériens	23
II.2.1.2. Agents antifongiques	24
II.2.1.3. Agents antiviraux.....	25
II.2.1.4. Agents antiparasitaires	25
II.2.1.5. Agents immunosuppresseurs	26
II.2.1.6. Composés anticancéreux.....	26
II.2.2. AGENTS DE BIOCONTROLE ET BIOFERTILISATION	26
II.2.3. ACTINOMYCÈTES DANS L'INDUSTRIE ENZYMATIQUE	27
II.2.4. APPLICATIONS EN BIOREMEDIATION	28
II.2.5. AVANCEES EN GENOMIQUE ET INGENIERIE GENETIQUE	28
<u>PARTIE III. MATERIELS ET METHODES.....</u>	<u>29</u>

III.1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE SOL	31
III.1.1. SITES D'ECHANTILLONNAGE	31
III.1.2. CARACTERISTIQUES DU SOL	32
III.1.2.1. pH des échantillons.....	32
III.1.2.2. Couleur des échantillons.....	32
III.1.3. METHODOLOGIE DU PRELEVEMENT	33
III.2. PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE SOL.....	34
III.2.1.1. Séchage et Tamisage	34
III.2.1.2. Traitements chimiques et physiques.....	35
III.3. ISOLEMENT DES ACTINOBACTERIES	36
III.3.1.1. Milieux de cultures utilisés.....	36
III.3.1.2. Préparation de suspension-dilution et ensemencement	36
III.3.1.3. Reconnaissance et sélection des actinobactéries	36
III.3.1.4. Purification et conservation des actinobactéries.....	37
III.4. CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ACTINOBACTERIES	37
III.4.1. MICROORGANISMES-CIBLES	37
III.4.2. STANDARDISATION DES INOCULA	38
III.4.3. CRIBLAGE PRIMAIRE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	39
III.4.4. OBSERVATION ET INTERPRETATION DES ZONES D'INHIBITION	39
III.5. FERMENTATION ET EXTRACTION DES METABOLITES.....	40
III.5.1. FERMENTATION DES ISOLATS POUR PRODUCTION DES METABOLITES	40
III.5.2. EXTRACTION DES METABOLITES	41
III.5.2.1. Extraction à partir de milieu liquide	41
III.5.2.2. Extraction à partir de milieu solide	41
III.6. CRIBLAGE SECONDAIRE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	42
<u>PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....</u>	<u>43</u>
IV.1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE SOL	44
IV.1.1. CARACTERISTIQUES DU SOL	44
IV.1.1.1. pH des échantillons	44
IV.1.1.2. Couleur des échantillons	45
IV.2. ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES	45
IV.3. CRIBLAGE PRIMAIRE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	52

IV.4. FERMENTATION ET D'EXTRACTION DES SUBSTANCES ACTIVES	54
IV.5. CRIBLAGE SECONDAIRE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	54
<u>PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>61</u>
<u>PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>64</u>
<u>PARTIE VII. ANNEXES</u>	<u>79</u>
VII.1. MILIEUX DE CULTURES	80
VII.1.1. COMPOSITION DE MILIEU DE CULTURE	80
VII.1.1.1. Milieux d'identification des actinobacteries	80
VII.1.1.2. Milieux utilisés pour l'activité antimicrobienne	81
VII.1.1.3. Milieux De Production d'antibiotiques.....	81
VII.1.1.4. Milieu Pour Les Champignons	82
VII.1.2. LES COLORANTS DE COLORATION DE GRAM :	82
VII.2. .MESURE DU PH	83
VII.3. NOMBRE DES ISOLATS PAR APPORT LE TYPE D'ECHANTILLON DE SOL	83
VII.4. RESULTATS DU CRIBLAGE PRIMAIRE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	84
VII.5. RESULTATS DU CRIBLAGE SECONDAIRE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	85

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

L'Algérie, de par son étendue et sa diversité géographique, présente une grande variété d'écosystèmes comprenant des zones marines, montagneuses, forestières, sub-sahariennes et sahariennes (Meddour et al., 2021). Cette richesse écologique offre un réservoir considérable de microorganismes, parmi lesquels les actinobactéries occupant une place prépondérante. Ces bactéries Gram positives, caractérisées par une teneur élevée en bases guanine et cytosine (G+C) dans leur ADN, représentent l'un des groupes microbiens les plus importants et les plus diversifiés au sein du règne bactérien. Elles sont largement distribuées dans divers habitats terrestres et aquatiques, et jouent un rôle écologique essentiel en participant à la dégradation de la matière organique et au recyclage des nutriments (Ranjani et al., 2016).

Les actinobactéries, notamment celles appartenant à l'ordre des Actinomycetales, se distinguent par leur capacité remarquable à produire une grande variété de métabolites secondaires bioactifs. Ces composés présentent des propriétés antibiotiques, antifongiques, antiparasitaires, antivirales, anticancéreuses et immunomodulatrices, faisant des actinobactéries une source majeure de molécules d'intérêt pharmaceutique et biotechnologique (Selim et al., 2021). Le genre *Streptomyces*, en particulier, est reconnu comme le producteur le plus prolifique d'antibiotiques naturels connus à ce jour. Sa présence dans des environnements normaux ou extrêmes témoigne de sa grande adaptabilité et de son potentiel métabolique exceptionnel (Barbuto Ferraiuolo et al., 2021).

Dans un contexte mondial marqué par l'augmentation alarmante de la résistance microbienne aux antibiotiques conventionnels (Christaki et al., 2020), la recherche de nouvelles souches productrices de composés antimicrobiens est devenue une priorité scientifique. L'exploration de nouveaux habitats, encore peu étudiés, tels que les sols extrêmes (salins, arides, ou marins), constitue une approche prometteuse pour la découverte de nouvelles molécules bioactives (Sayed et al., 2020). Ainsi, les sols de l'Ouest algérien, comprenant des écosystèmes variés sédiments marins, sols rhizosphériques, et sebkhas représentent un milieu propice à l'isolement d'actinomycètes potentiellement producteurs de nouvelles substances antimicrobiennes (Sayed et al., 2020).

Le présent travail s'inscrit dans cette perspective. Il vise à isoler et évaluer le potentiel antimicrobien des actinomycètes issus de différents types de sols collectés dans plusieurs régions de l'Ouest de l'Algérie (Saïda, Oran, Bougtoub et Tindouf). L'objectif principal est

de contribuer à la valorisation de la biodiversité microbienne algérienne et de participer à la recherche de nouvelles sources naturelles d'agents antimicrobiens.

Ce mémoire s'articule autour de trois grandes parties :

- La première partie est consacrée à une recherche bibliographique sur les actinomycètes, leur écologie, leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques, ainsi que leur potentiel dans la production de métabolites bioactifs.
- La deuxième partie présente le matériel et les méthodes expérimentales utilisées pour l'isolement, la fermentation et le criblage des activités antimicrobiennes des souches isolées.
- La troisième partie expose les résultats obtenus, suivis d'une discussion mettant en relation les observations expérimentales avec les données de la littérature.

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1.

GENERALITES SUR LES

ACTINOBACTERIES

II.1. GENERALITES SUR ACTINOBACTERIES

II.1.1. Historique

Les actinobactéries existent sur terre depuis environ 2,7 milliards d'années, ce qui signifie qu'elles étaient déjà présentes avant le grand événement d'oxydation, survenu il y a environ 2,3 milliards d'années (**Lewin et al., 2016**).

Cependant, leur découverte scientifique ne remonte qu'à la fin du XIXe siècle. En 1875, le botaniste allemand Ferdinand Cohn observe et décrit pour la première fois des formes filamenteuses ressemblant à des actinomycètes, bien qu'il ne les ait pas encore classées. Peu après, entre 1877 et 1878, le médecin James Israel identifie chez l'humain un agent pathogène filamenteux, qu'il nomme plus tard *Actinomyces israelii*. En 1878, le vétérinaire allemand Otto Bollinger identifie une bactérie similaire chez les bovins, qui sera par la suite nommée *Actinomyces bovis* par Harz (**Barka et al., 2016**).

L'importance médicale des actinobactéries se confirme au XXe siècle, notamment en 1943, lorsque Selman Waksman et Albert Schatz isolent la streptomycine à partir de *Streptomyces griseus*. Cet antibiotique marque une avancée majeure dans le traitement de la tuberculose et inaugure une nouvelle ère de découvertes en microbiologie médicale. (**Hopwood, 2007**).

II.1.2. Définition des actinobactéries

Le terme actinomycète est issu du grec ancien aktis signifiant « rayon », et mykēs signifiant « champignon », en référence à la morphologie filamenteuse de ces micro-organismes, semblable à celle des champignons. (**Meddour et al., 2021**).

Les actinobactéries constituent un vaste groupe de bactéries Gram positives, caractérisées par une teneur élevée en guanine et en cytosine dans leur ADN, généralement comprise entre 60 et 70 %, selon le coefficient de Chargaff (GC%). Elles présentent une structure filamenteuse complexe, souvent ramifiée, qui évoque un réseau mycélien. (**Chan et al., 2012**).

Les actinomycètes appartiennent à l'ordre des Actinomycetales et se distinguent par la formation de filaments fins, cloisonnés, à l'image de ceux des champignons filamenteux (**Kieser et al., 2014**).

II.1.3. Caractéristiques morphologiques

Les actinobactéries présentent une grande diversité morphologique, allant des formes coccoïdes et bacillaires aux filaments ramifiés ou aux mycéliums fragmentés. Cette variabilité, influencée par le genre et les conditions de culture, reflète la complexité de leur cycle de vie (**Wink Joachim, 2017**)

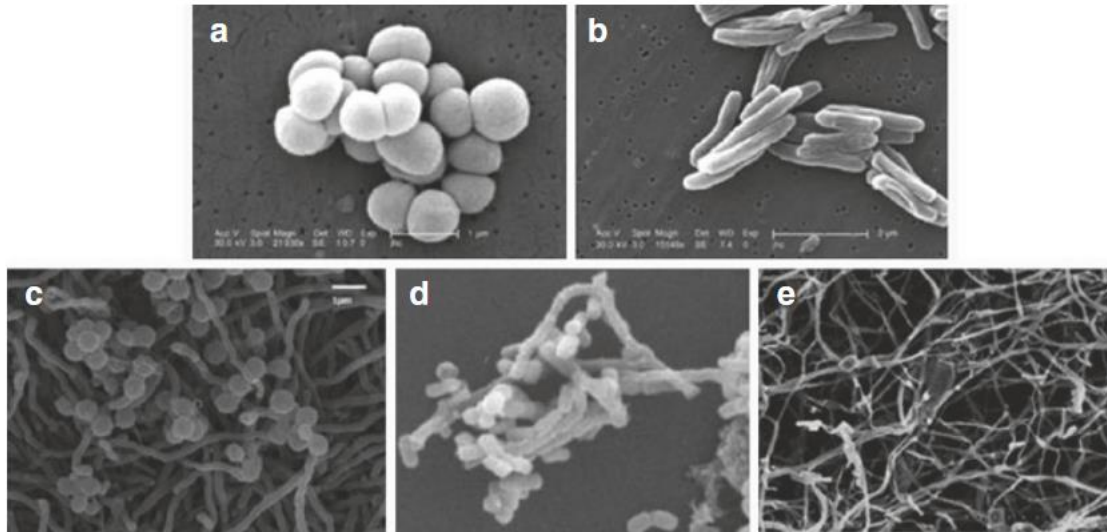


Figure 01: Images au microscope électronique à balayage (MEB)

- (a) coques de *Micrococcus luteus* (**Public Health Image Library (PHIL), ID#:9761**) ;
- (b) bacilles de *Mycobacterium tuberculosis* (**PHIL, ID#:9997**) ;
- (c) hyphes ramifiés de *Micromonospora schwarzwaldensis* (**Gurovic et al., 2013**) ;
- (d) mycéliums fragmentés de *Nocardia asteroides* (**Ribeiro et al., 2008**) ;
- (e) hyphes aériens ramifiés de *Streptomyces mangrovisoli* (**Ser et al., 2015**).

II.1.3.1. Structure cellulaire

Les actinobactéries présentent une structure cellulaire typique des bactéries à Gram positif, caractérisée par une paroi épaisse riche en peptidoglycane et en acides mycoliques chez certaines espèces. Leur cytoplasme contient un seul chromosome circulaire, dépourvu de noyau véritable, mais organisé en un nucléoïde. Ces micro-organismes possèdent également des ribosomes de type 70S, assurant la synthèse des protéines, ainsi que divers granules de réserve tels que le glycogène ou le polyphosphate. Leur paroi complexe confère une résistance élevée aux conditions environnementales défavorables et joue un rôle essentiel dans la morphogenèse filamenteuse (**Wink Joachim, 2017**).

II.1.3.2. Appartenance au règne des bactéries filamenteuses

Les actinobactéries appartiennent au règne des bactéries filamenteuses en raison de leur mode de croissance particulier, formant un réseau de filaments appelé mycélium (**Figure 02**). Cette organisation morphologique les rapproche superficiellement des champignons, bien qu'elles soient des procaryotes dépourvus de noyau et de mitochondries. Le développement de filaments aériens et de spores leur confère un avantage écologique, facilitant leur dispersion et leur survie dans des milieux variés. Cette structure filamenteuse est également liée à leur capacité à produire une grande diversité de métabolites secondaires, dont de nombreux antibiotiques d'intérêt industriel. (**Li et al., 2016**).

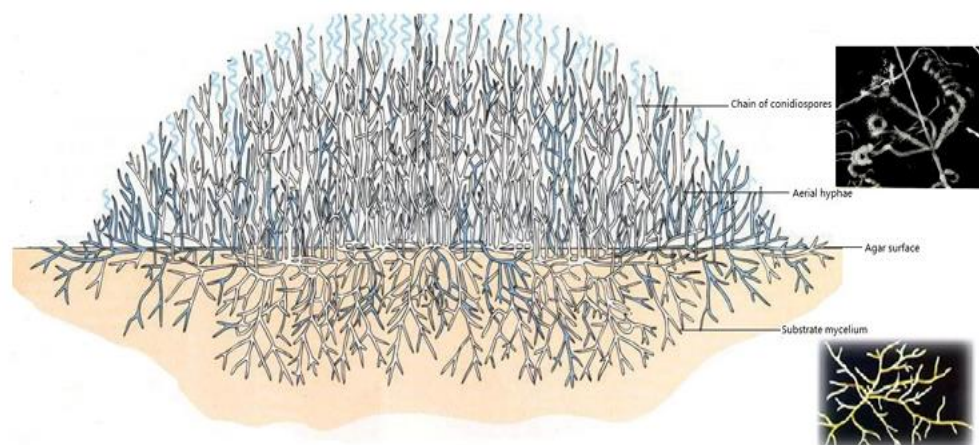


Figure 02 : Structure filamenteuse caractéristique des actinomycètes montrant le mycélium du substrat et les hyphes aériennes (**Li et al., 2016**)

II.1.4. Physiologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes saprophytes filamenteux capables de dégrader la matière organique complexe grâce à des enzymes extracellulaires variées. Ils croissent sur divers substrats, même pauvres en nutriments, et présentent un cycle de vie différencié incluant la formation de mycélium et de spores. Cette différenciation est souvent liée à la production de métabolites secondaires (**Zhang et al., 2022**).

II.1.4.1. Métabolisme primaire

Le métabolisme primaire des actinomycètes regroupe l'ensemble des réactions qui assurent leur croissance et leur survie. Il permet à ces bactéries de produire l'énergie et les molécules nécessaires à la formation de la biomasse. Les actinomycètes vivent souvent dans

des milieux pauvres en nutriments, comme le sol, et possèdent donc des mécanismes très efficaces pour utiliser différentes sources de carbone et d'azote (**Gao et al., 2023**).

Les glucides représentent la principale source d'énergie, le glucose est alors transformé en glucose-6-phosphate par le glucose kinase, puis utilisé dans plusieurs voies métaboliques : La glycolyse (voie Embden-Meyerhof) produit de l'énergie, tandis que la voie des pentoses phosphates fournit des précurseurs pour la synthèse de nouveaux composés. Le cycle de Krebs joue aussi un rôle central dans la production d'énergie et d'intermédiaires nécessaires à la biosynthèse des acides aminés et d'autres molécules (**Moore et al., 2002**).

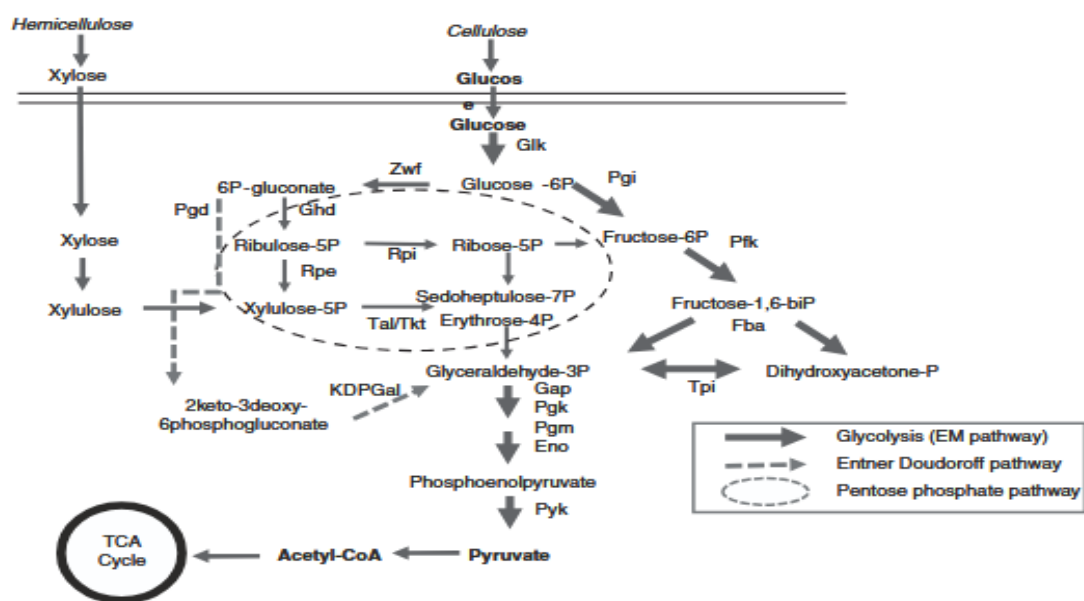


Figure 03 : Les principales voies du catabolisme des glucides (**Wink Joachim, 2017**).

Les actinomycètes ont un métabolisme primaire très complet et flexible, régulé par des facteurs comme GlnR, ce qui leur permet de s'adapter à différents milieux et de produire efficacement de la biomasse (**Gao et al., 2023**). C'est cette base métabolique solide qui soutient ensuite la production de métabolites secondaires (**Zhang et al., 2022**).

II.1.4.2. Métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires, contrairement aux métabolites primaires, ne sont pas indispensables à la croissance cellulaire, mais jouent un rôle essentiel dans l'adaptation et la survie des actinobactéries. (**Selim et al., 2021**). Leur production, étroitement régulée, est coordonnée avec le cycle de développement bactérien et contribue à la communication

microbienne, à la symbiose et à la défense environnementale. Ces composés, synthétisés à partir de précurseurs issus du métabolisme primaire (Yan *et al.*, 2024), sont fortement influencés par les flux métaboliques en carbone et en azote. Des modifications dans les voies glycolytiques ou dans la disponibilité des précurseurs peuvent ainsi stimuler ou inhiber leur biosynthèse (Selim *et al.*, 2021).

Les gènes responsables de la production de métabolites secondaires sont généralement regroupés en clusters, contrôlés par des régulateurs transcriptionnels spécifiques. Parmi eux, les régulateurs de type SARP (Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins) et LAL (LuxR family) jouent un rôle clé dans l'activation ou la répression des gènes de biosynthèse d'antibiotiques tels que l'actinorhodine, la streptomycine ou la nystatine (Zhang *et al.*, 2022).

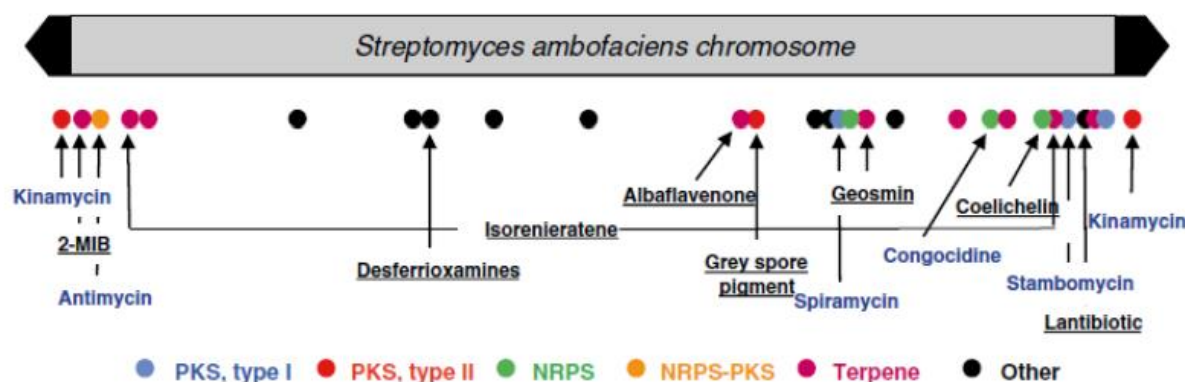


Figure 04 : Carte génétique du chromosome de *Streptomyces ambofaciens* et localisation des différents clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires (Aigle *et al.*, 2014).

II.1.5. Écologie des actinomycètes

Les actinomycètes appartiennent à un groupe bactérien extrêmement diversifié présent dans une grande variété d'habitats. On les retrouve dans les sols terrestres, les environnements marins, les écosystèmes aquatiques et intertidaux, ainsi que dans des milieux extrêmes ou encore en association symbiotique avec différents organismes supérieurs, tels que les éponges marines, les tuniciers, les fourmis et les termites. Grâce à leurs capacités hydrolytiques remarquables, ces micro-organismes jouent un rôle essentiel dans la dégradation de composés organiques complexes et récalcitrants (Ngamcharungchit *et al.*, 2023).

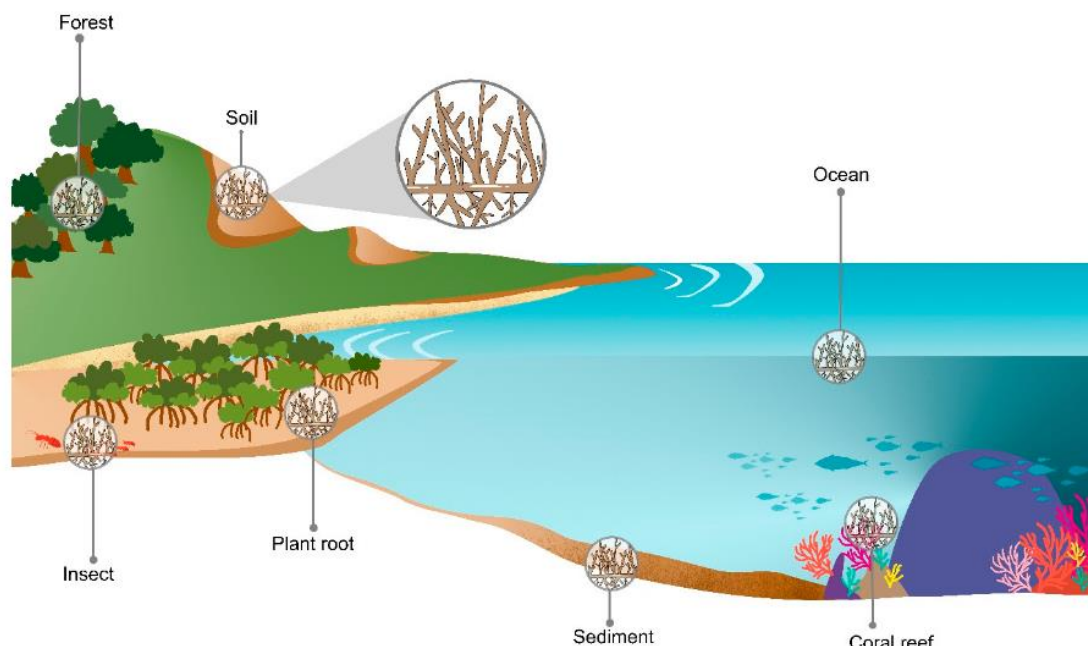


Figure 05 : Diversité des habitats des actinomycètes (Ngamcharungchit *et al.*, 2023).

Les actinomycètes sont principalement présents dans divers habitats écologiques, par exemple les écosystèmes marins (plans d'eau, récifs coralliens, eau de mer, sédiment) et terrestres (sols, plantes et insectes)

II.1.5.1. Actinomycètes du sol

Les actinomycètes croissent sous forme d'hyphes, à la manière des champignons, et sont responsables de l'odeur caractéristique de terre (provient surtout d'un composé appelé géosmine) que dégage un sol sain et fraîchement retourné. Leur population est la plus abondante dans la couche superficielle du sol, puis diminue avec la profondeur en raison de leur besoin en oxygène. Leur concentration est estimée entre 10^4 et 10^8 cellules par gramme de sol. (Zenova *et al.*, 2011).

Ces microorganismes sont sensibles à l'acidité (leur pH optimal se situe entre 6,5 et 8,0) et ne se développent pas bien dans des sols saturés d'eau. Ils sont principalement mésophiles, se développant à des températures comprises entre 25 °C et 30 °C. Les actinomycètes jouent un rôle écologique essentiel en tant que saprophytes, participant activement à divers processus biologiques tels que le recyclage de la matière organique, la bioremédiation et la stimulation de la croissance des plantes. (Bhatti *et al.*, 2017).

Les actinomycètes favorisant la croissance des plantes, agissent par des mécanismes directs comme la production d'hormones végétales et indirects comme l'inhibition des agents

pathogènes des plantes (**Nonthakaew et al., 2022**). Ils influencent également la décomposition de la biomasse végétale et le microbiome de la rhizosphère. (**Goodfellow, 2012**).

Les actinomycètes ont également été identifiés dans les sols salés. Des études portant sur le microbiome de ces environnements ont permis de caractériser leur structure naturelle ainsi que les éléments génétiques associés aux mécanismes d'osmoadaptation (**Ahmed et al., 2018**).

II.1.5.2. Actinomycètes marins

Les habitats marins constituent une source riche en actinomycètes diversifiés, dont la majorité reste encore peu caractérisée. Ces habitats comprennent les zones côtières, les sédiments des grands fonds marins, l'eau de mer (**Jensen et al., 1991**). Des études sur les microbiomes et l'énumération traditionnelle des bactéries ont été menées dans divers écosystèmes marins, notamment dans l'eau de mer, les récifs coralliens et les mangroves et Les sédiments (**Ngamcharungchit et al., 2023**).

Les Streptomyces et Micromonospora d'origine marine sont considérés comme de bons candidats pour l'isolement de composés bioactifs présentant des propriétés antitumorales ou inhibitrices de la croissance. Leurs métabolites secondaires présentent une grande diversité d'activités biologiques, notamment antifongiques, antitumorales et antibactériennes (**Xu et al., 2018**).

II.1.5.3. Actinomycètes dans habitats extrêmes

Les actinobactéries sont capables de coloniser une grande variété d'environnements extrêmes tels que les zones arides, les déserts, les sources chaudes, les milieux salins ou encore les régions polaires. Leur remarquable capacité d'adaptation repose sur des mécanismes physiologiques et génétiques leur permettant de résister à des conditions de stress intense, notamment la sécheresse, la salinité, la radiation et les variations thermiques. Ces micro-organismes développent des structures de résistance comme les spores et produisent des métabolites secondaires protecteurs. Leur présence dans ces milieux hostiles fait des actinobactéries une source prometteuse de nouvelles enzymes thermostables et de composés bioactifs d'intérêt biotechnologique (**Liu et al., 2014**).

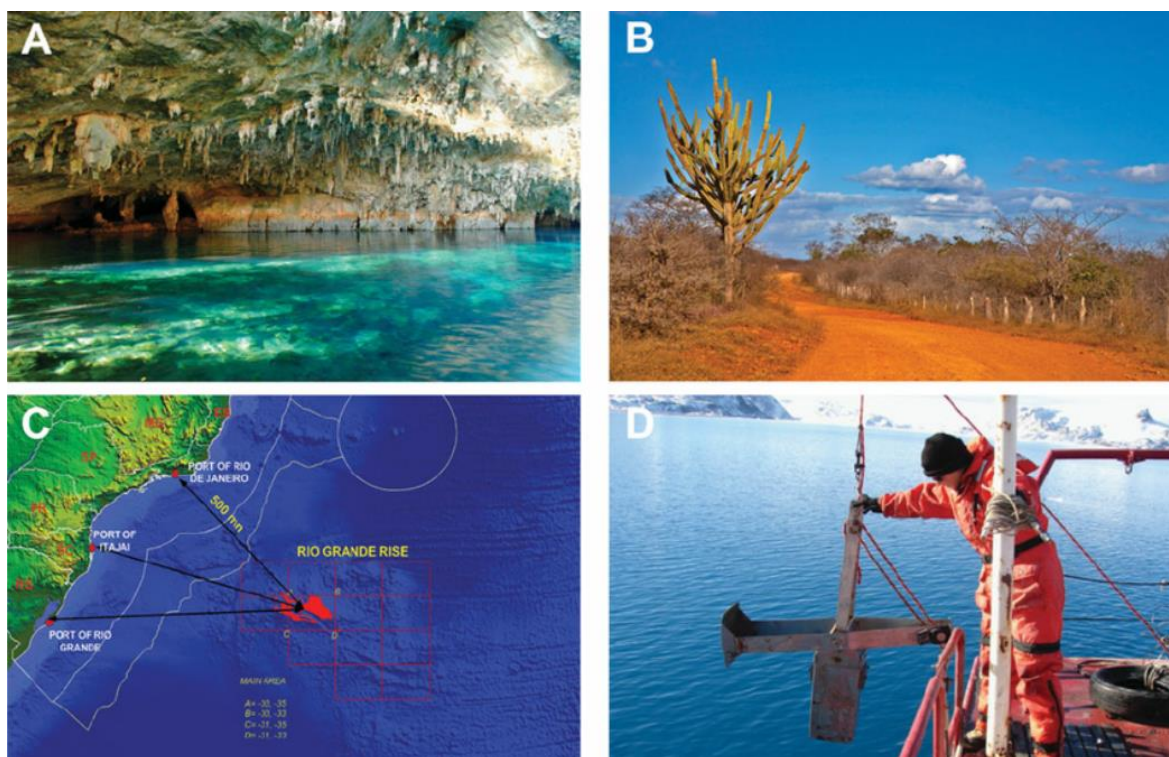


Figure 6: Environnements extrêmes pouvant être explorés pour la recherche d'extrémophiles (Duarte *et al.*, 2012) .

A: grotte de la Chapada Diamantina (Nord-Est du Brésil) ; **B:** paysage typique de la Caatinga ; **C:** carte topographique de la partie sud de la côte brésilienne montrant l'élévation du Rio Grande ; **D:** échantillonnage de sédiments marins en Antarctique

II.1.6. Taxonomie et critères d'identification

II.1.6.1. Taxonomie phénétique

La classification phénétique des actinobactéries repose principalement sur l'observation de leurs caractères morphologiques. Les milieux standards du Projet International Streptomyces (ISP) sont utilisés pour étudier la couleur des colonies, la texture, la production de pigments, ainsi que la formation du mycélium aérien et substrat. Ces caractères permettent de distinguer les genres et les espèces (Shirling *et al.*, 1966).

Sur le plan microscopique, les actinobactéries présentent une grande diversité de formes : coccoïdes, bacilloïdes ou filamenteuses. Certaines espèces, comme *Streptomyces*, développent un mycélium très ramifié et produisent des chaînes de spores caractéristiques. D'autres, comme *Nocardia* ou *Actinomyces*, montrent des hyphes fragmentés ou faiblement ramifiés (Goodfellow, 2012).

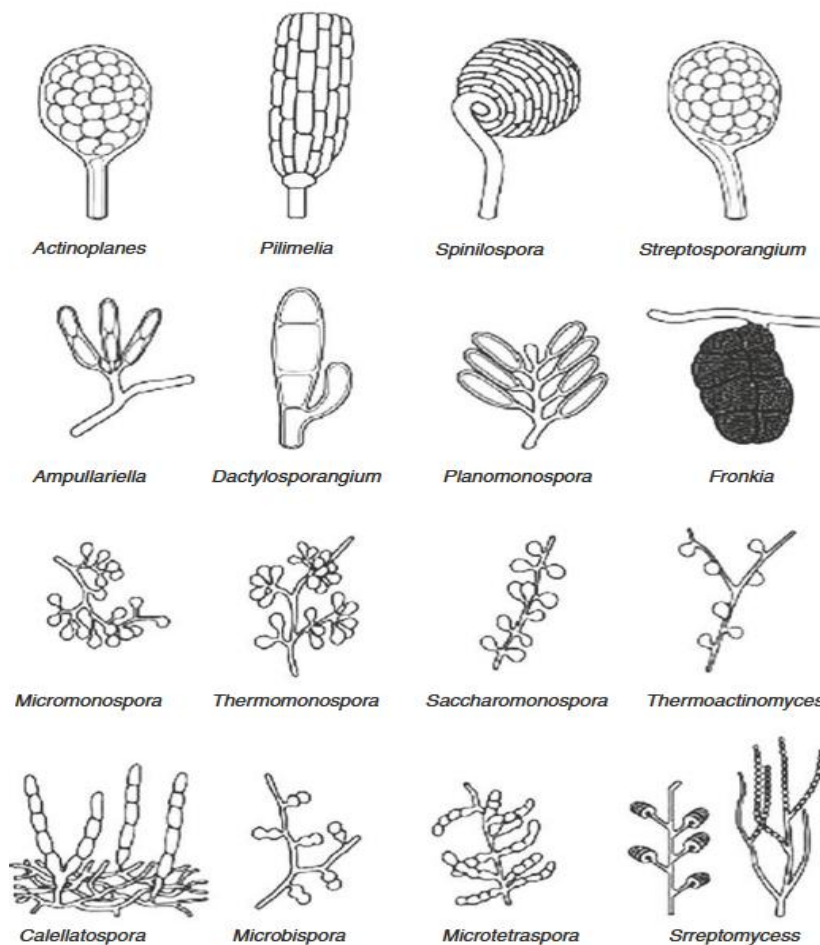


Figure 07 : Caractéristiques morphologiques des spores chez différents genres d'actinobactéries (**Barka *et al.*, 2016**)

La surface, la forme et la disposition des spores constituent également des critères taxonomiques importants. Ces spores peuvent être lisses, épineuses ou velues, disposées seules ou en chaînes (**Figure 07**). Enfin, la production de pigments (rouges, jaunes, bruns, noirs, etc.), notamment la mélanine, représente un autre caractère distinctif utile à la différenciation des genres d'actinobactéries (**Barka *et al.*, 2016**).

II.1.6.2. Taxonomie chimiotauxonomique

La chimiotauxonomie repose sur l'étude des composants chimiques stables de la cellule, tels que la paroi cellulaire, les ménaquinones, les phospholipides, les acides gras et les acides mycoliques. Ces caractères constituent des marqueurs fiables pour la classification et l'identification des actinobactéries au niveau du genre et de l'espèce (**Ramasamy *et al.*, 2022**).

II.1.6.2.1. Paroi cellulaire

La paroi des actinobactéries contient du peptidoglycane dont la composition (type d'acide aminé diamine et sucres spécifiques) permet de définir plusieurs chémotypes. Certains genres comme *Mycobacterium* et *Nocardia* possèdent des acides mycoliques, responsables de leur paroi épaisse et hydrophobe (Alderwick et al., 2015).

II.1.6.2.2. Quinones isoprénoides

Les ménaquinones sont des composés respiratoires présents dans les membranes des bactéries et essentielles à la chaîne de transport des électrons. Chez les Actinobacteria, elles constituent le seul type de quinones isoprénoides et servent de critères taxonomiques grâce à la variation de leur structure (méthylation, longueur, saturation et cyclisation de la chaîne latérale) (Xie et al., 2021).

II.1.6.2.3. Phospholipides et acides gras

Les phospholipides (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine, etc.) et les acides gras (iso-, anteiso-, saturés ou insaturés) présentent des profils caractéristiques selon les genres. Leur analyse, souvent réalisée par chromatographie en phase gazeuse, fournit une empreinte chimique utile à l'identification. (Gago et al., 2011).

II.1.6.2.4. Acides mycoliques

Ils sont présents dans certains genres, ce sont des acides gras à longue chaîne qui confèrent la résistance et l'imperméabilité à la paroi. Leur longueur et leur structure varient selon le genre, servant ainsi de critère taxonomique majeur (Brennan, 2003).

II.1.6.3. Taxonomie génotypique (moléculaire)

II.1.6.3.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Le gène 16S rRNA est un marqueur essentiel utilisé pour identifier et classer les bactéries, car il est présent chez tous les procaryotes et évolue lentement. Son séquençage permet de comparer la parenté entre différentes souches bactériennes. Cependant, ce gène n'est pas toujours suffisant pour distinguer certaines espèces très proches, car il est parfois trop conservé (Ramasamy et al., 2014). Aujourd'hui, une similarité de 98,7 à 99 % est souvent utilisée pour définir une nouvelle espèce. Des outils comme le serveur EzTaxon facilitent ces comparaisons et la construction d'arbres phylogénétiques (Chun et al., 2007)

II.1.6.3.2. Gènes alternatifs pour l'analyse phylogénétique des actinobactéries

Pour mieux comprendre les relations entre actinobactéries, d'autres gènes que le 16S rRNA sont utilisés, comme *rpoB*, *recA*, *gyrB* ou *groEL*. Ces gènes évoluent plus rapidement et offrent une meilleure résolution (**Adékambi *et al.*, 2011**). Par exemple, le gène *rpoB* a permis de mieux classer les espèces de *Frankia*, tandis que *gyrB* a distingué des souches proches de *Kribbella*. L'utilisation combinée de plusieurs gènes donne des arbres phylogénétiques plus précis et fiables (**Verma *et al.*, 2013**).

II.1.6.3.3. Hybridation ADN-ADN et valeur ANI

L'hybridation ADN-ADN (DDH) est une méthode ancienne pour mesurer la similarité génétique entre deux bactéries. Si l'hybridation atteint 70 %, cela signifie qu'il s'agit de la même espèce (**Auch *et al.*, 2010**). Aujourd'hui, cette méthode a été remplacée par des approches génomiques plus modernes, comme l'identité nucléotidique moyenne (ANI), qui compare directement les séquences d'ADN. Une valeur d'ANI de 95 à 96 % correspond généralement au seuil de 70 % du DDH, et sert de référence pour définir une espèce bactérienne (**Chan *et al.*, 2012**).

II.1.6.3.4. Séquençage du génome entier (WGS)

Le séquençage complet du génome est devenu un outil majeur pour la classification des bactéries. Il permet d'étudier toute l'information génétique d'une souche et de comprendre sa phylogénie avec précision. Le premier génome d'actinobactérie entièrement séquencé fut celui de *Mycobacterium tuberculosis* en 1998. Les actinobactéries possèdent soit un génome circulaire, soit un génome linéaire, comme c'est le cas pour le genre *Streptomyces* (**Redenbach *et al.*, 2000**).

II.1.6.3.5. Phylogénie des actinobactéries basée sur l'analyse du génome complet

L'analyse phylogénétique basée sur le génome entier donne une vision beaucoup plus précise de l'évolution des actinobactéries que celle basée sur un seul gène. Elle permet de corriger les incohérences observées dans les arbres phylogénétiques traditionnels et d'obtenir une meilleure résolution, même entre des souches très proches. Des études récentes ont montré que les approches sans alignement « alignment-free » sont les plus efficaces et fiables pour retracer l'évolution des actinobactéries (**Verma *et al.*, 2013**).

II.1.7. Cycle de vie des actinomycètes

Les actinobactéries, en particulier les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora*, présentent un cycle de vie complexe et unique parmi les bactéries. Leur développement morphologique rappelle celui des champignons filamenteux, avec la formation de mycéliums et de spores. Ce cycle comprend plusieurs étapes successives, allant de la germination à la sporulation, qui sont fortement influencées par les conditions environnementales et nutritionnelles (Ngamcharungchit *et al.*, 2023).

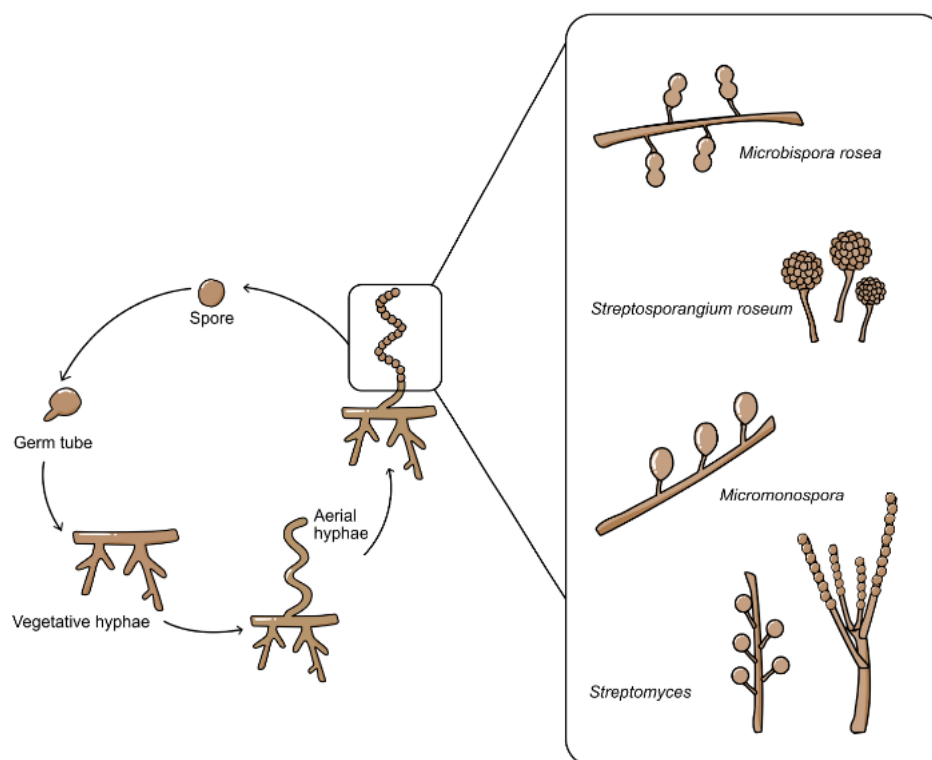


Figure 08 : Cycle de vie des actinomycètes et les différents types de conidiospores (Ngamcharungchit *et al.*, 2023)

II.1.7.1. Germination des spores

La germination marque le début du cycle de vie. Sous des conditions favorables, notamment en présence de sources de carbone, d'azote et d'humidité suffisantes, les spores dormantes reprennent leur activité métabolique. La spore gonfle, rompt sa paroi externe et donne naissance à un filament primaire appelé hyphae végétative. Cette étape dépend de l'hydratation et de la disponibilité en nutriments, qui déclenchent la synthèse des macromolécules nécessaires à la croissance cellulaire (Wink Joachim, 2017).

II.1.7.2. Croissance végétative (mycélium substrat)

Les hyphes issus de la germination s'allongent et forment un réseau de filaments appelé mycélium substrat, ancré dans le milieu de culture ou le sol. Ce mycélium assure l'absorption des nutriments et la croissance active de la bactérie. Durant cette phase, la cellule effectue des divisions incomplètes, formant des compartiments reliés entre eux, sans séparation complète. Cette organisation multicellulaire permet une efficacité métabolique élevée et la production d'enzymes extracellulaires nécessaires à la dégradation des matières organiques (**Wink Joachim, 2017**).

II.1.7.3. Différenciation morphologique

La différenciation débute lorsque les nutriments deviennent limitants, notamment les sources de carbone et d'azote. Cette situation entraîne une réponse physiologique complexe, régulée par des signaux intracellulaires tels que le guanosine tétraphosphate (ppGpp) et des molécules de signalisation appelées γ -butyrolactones. Ces composés, analogues hormonaux, contrôlent la transition du stade végétatif vers la formation du mycélium aérien et la sporulation. De plus, les interactions microbiennes dans l'environnement, comme la compétition ou la prédation, peuvent influencer cette différenciation (**Kieser *et al.*, 2014**).

II.1.7.4. Formation du mycélium aérien

Lorsque le mycélium substrat atteint une densité suffisante, certains hyphes se développent vers la surface pour former le mycélium aérien. Ce dernier joue un rôle clé dans la dispersion et la survie des actinobactéries. La croissance aérienne s'arrête dès qu'un signal intracellulaire est transmis, amorçant alors la phase de sporulation. Ces hyphes aériens se distinguent morphologiquement des hyphes végétatifs par leur structure plus résistante et leur capacité à se segmenter (**Kieser *et al.*, 2014**).

II.1.7.5. Sporulation

La sporulation est un processus de différenciation terminale au cours duquel les hyphes aériens se divisent en cellules indépendantes appelées spores. Cette division, dite spécifique de sporulation, implique la formation de septa symétriques appelés septa de sporulation. Contrairement aux cloisons végétatives, ces septas séparent complètement les cellules, formant des spores distinctes. Cette

étape a pour but principal d'assurer la survie de la bactérie face aux conditions défavorables (Kieser *et al.*, 2014).

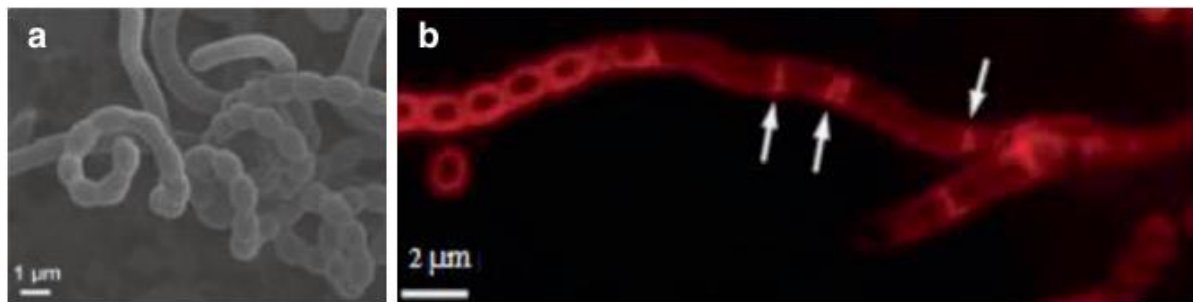


Figure 09 : Morphologie et sporulation des hyphes aériens(Wink Joachim,2017)

(a) Chaîne de spores produite sur les hyphes aériens,
(b) Microscopie à fluorescence des hyphes aériens sporogènes les cloisons végétatives sont visibles dans la partie non sporulée de l'hyphe aérien (Wink Joachim, 2017)

II.1.7.6. Maturation des spores

Après la formation des septas, chaque spore entre en phase de maturation. Une paroi épaisse et résistante se forme à l'intérieur du présore, conférant une grande tolérance aux stress chimiques et physiques. Des protéines associées à l'ADN protègent le matériel génétique contre les dommages oxydatifs et mécaniques. Enfin, la spore acquiert une coloration caractéristique due à la synthèse de pigments, comme la pigmentation grise observée chez *Streptomyces coelicolor*.(Barka *et al.*, 2016).

Le cycle de vie des actinobactéries illustre une remarquable adaptation évolutive. Ce développement complexe leur permet de survivre dans des environnements variables et de produire une grande diversité de métabolites secondaires, dont plusieurs ont un intérêt biotechnologique majeur (antibiotiques, enzymes, pigments, etc.). Comprendre ce cycle est essentiel non seulement pour la taxonomie et la physiologie de ces bactéries, mais aussi pour optimiser leur utilisation dans les procédés industriels et pharmaceutiques (Kieser *et al.*, 2014).

II.1.8. Mise en évidence du genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* représente le groupe le plus étudié et le plus représentatif des actinobactéries. Il regroupe plus de 800 espèces identifiées, largement distribuées dans les sols, les sédiments marins et les environnements extrêmes. Ces bactéries jouent un rôle écologique essentiel dans la décomposition de la matière organique et dans la production de

métabolites secondaires d'un grand intérêt biotechnologique (**Barbuto Ferraiuolo et al., 2021**).

II.1.8.1. Rôle majeur dans production d'antibiotiques

Streptomyces est reconnu comme le producteur naturel le plus important d'antibiotiques connus à ce jour. Environ 70 % des antibiotiques d'origine microbienne proviennent de ce genre. Parmi les plus célèbres, on peut citer la streptomycine, la tétracycline, l'érythromycine, le chloramphénicol et la vancomycine. (**Donald et al., 2022**).



Figure 10 : Dates clés des antibiotiques et contributions du genre *Streptomyces* (de Lima Procópio et al., 2012)

II.1.8.2. Importance génétique et industrielle

Le genre *Streptomyces* possède un génome particulièrement grand et complexe, souvent supérieur à 8 Mb, ce qui est exceptionnel pour une bactérie. Cette richesse génétique confère à ces microorganismes une grande plasticité métabolique, leur permettant de produire une diversité remarquable de composés secondaires. (**Auch et al., 2010**). D'un point de vue industriel, *Streptomyces* constitue une plateforme biotechnologique majeure utilisée

pour la production d'antibiotiques, d'antifongiques, d'anticancéreux, d'enzymes et de pigments naturels (**Donald *et al.*, 2022**).

II.1.8.3. Particularités morphologiques et génétiques

Les *Streptomyces* se distinguent par une morphologie filamenteuse complexe, rappelant celle des champignons. Leur cycle de développement comprend la germination, la formation de mycélium végétatif, le développement du mycélium aérien et la sporulation (**Li *et al.*, 2016**).

Sur le plan génétique, ces bactéries possèdent un chromosome linéaire, fait rare chez les procaryotes, comportant des régions télomériques analogues à celles des eucaryotes. Leur génome contient également de nombreux plasmides linéaires ou circulaires, souvent porteurs de gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires (**Aigle *et al.*, 2014**). Cette organisation génétique particulière favorise l'évolution rapide de nouveaux gènes et de nouveaux clusters biosynthétiques. Ainsi, la diversité métabolique observée chez les *Streptomyces* reflète leur capacité à s'adapter à des environnements variés et à produire une vaste gamme de composés bioactifs (**Ayoib *et al.*, 2024**).

CHAPITRE 2. INTERET BIOTECHNOLOGIQUE DES ACTINOMYCETES

II.2. INTERET BIOTECHNOLOGIQUE DES ACTINOMYCETES

Les actinomycètes représentent un groupe de bactéries filamenteuses du phylum *Actinobacteria*, largement reconnus pour leur extraordinaire potentiel métabolique et biotechnologique. Leur capacité à produire une grande diversité de métabolites secondaires, d'enzymes industrielles et de composés bioactifs a fait des actinomycètes des micro-organismes d'un intérêt majeur dans les domaines pharmaceutique, agricole, environnemental et industriel (Selim *et al.*, 2021).

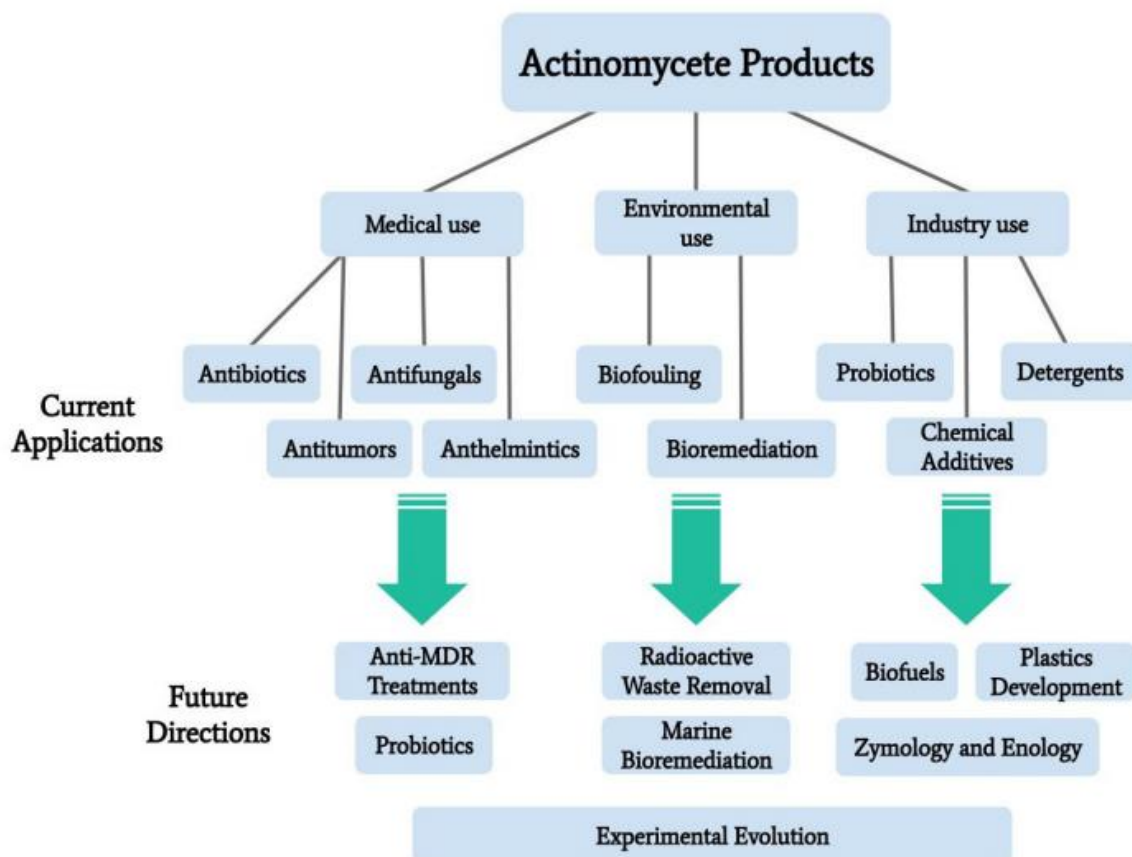


Figure 11 : Les différents produits issus des actinomycètes et leurs perspectives (Selim *et al.*, 2021) .

II.2.1. Producteurs de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée

II.2.1.1. Agents antibactériens

Les actinomycètes, en particulier le genre *Streptomyces*, représentent une ressource biotechnologique majeure grâce à leur capacité exceptionnelle à produire une vaste gamme de métabolites secondaires bioactifs. Ils sont à l'origine de plus de 70 % des antibiotiques

d'origine microbienne connus, tels que la streptomycine, la tétracycline, l'érythromycine et le chloramphénicol (De Simeis *et al.*, 2021).

Tableau 01 : Exemples des antibiotiques produits par les actinomycètes.

<i>Streptomyces</i> sp.	Antibiotique	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibiotique
<i>S. orchidaceus</i>	Cycloserine	<i>S. erythraeus</i>	Erythromycin
<i>S. orientalis</i>	Vancomycin	<i>S. venezuelae</i>	Chloramphenicol
<i>S. fradiae</i>	Neomycin, actinomycin, fosfomycin, dekamycin	<i>S. aureofaciens</i>	Chlortetracycline, Dimethylchlor
<i>S. nodosus</i>	Amphotricin B	<i>S. ambofaciens</i>	Spiramycin
<i>S. noursei</i>	Nistatin	<i>S. avermitilis</i>	Avermectin
<i>S. mediterranei</i>	Rifampin	<i>S. alboniger</i>	Puromycin
<i>S. griseus</i>	Streptomycin	<i>S. niveus</i>	Novobioin
<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamycin	<i>S. platensis</i>	Platenmycin
<i>S. tenebrarius</i>	Tobramycin	<i>S. roseosporus</i>	Daptomycin
<i>S. spectabilis</i>	Spectinomycin	<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamycin
<i>S. viridifaciens</i>	Tetracycline	<i>S. garyphalus</i>	Cycloserine
<i>S. lincolnsis</i>	Lincomycin, clindamycin	<i>S. vinaceus</i>	Viomycin
<i>S. rimosus</i>	Oxytetracyclin	<i>S. clavuligerus</i>	Cephalosporin

Ces composés d'actinomycète ont profondément transformé la médecine moderne en permettant de traiter efficacement un large éventail d'infections bactériennes. De plus, l'émergence de nouvelles molécules comme la daptomycine et la téicoplanine illustre le rôle central des actinomycètes dans le développement de la prochaine génération d'antibiotiques capables de contourner les mécanismes de résistance microbienne (Barbuto Ferraiuolo *et al.*, 2021).

II.2.1.2. Agents antifongiques

Les actinomycètes produisent également des substances antifongiques d'une grande importance thérapeutique et agricole. Des molécules telles que la nystatine, l'amphotéricine B ou la candicidine exercent une action puissante contre divers champignons pathogènes en altérant leur membrane cellulaire. Ces composés trouvent ainsi des applications variées, allant du traitement des mycoses humaines à la protection des cultures contre les maladies fongiques (Georgopapadakou, 1998).

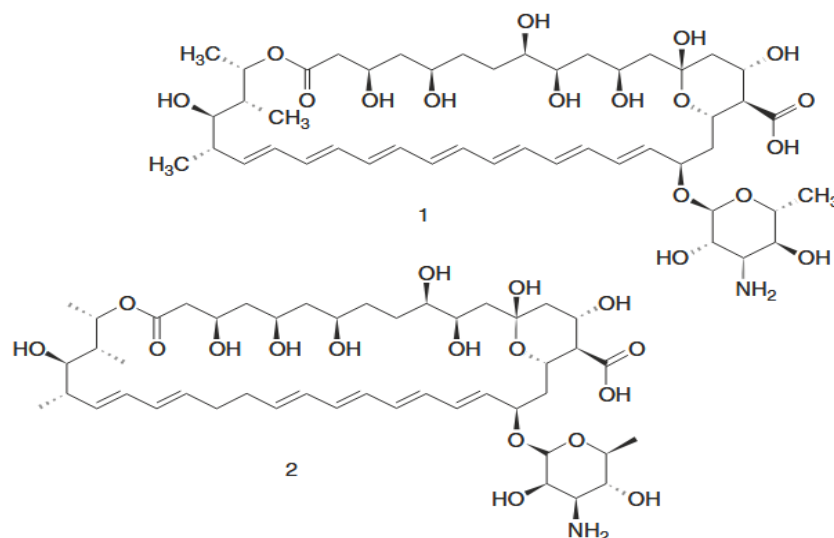


Figure 12 : structure chimique des substances antifongiques (1) amphotericin B (2) nystatin

II.2.1.3. Agents antiviraux

Certaines souches d'actinomycètes synthétisent des métabolites à activité antivirale, comme la rimocidine et la neoviridine, capables d'inhiber la réplication ou l'assemblage viral. Bien que leur nombre reste limité, ces composés suscitent un intérêt croissant pour la mise au point de nouveaux agents antiviraux d'origine naturelle, dans un contexte mondial marqué par la recrudescence des infections virales émergentes. (Raveh *et al.*, 2013).

Tableau 02 : Exemples de métabolites antiviraux identifiés chez les Actinomycètes entre 2016 et 2023 (Ngamcharungchit *et al.*, 2023)

Organism (s)	Compound Name (s)
<i>Actinomadura</i> sp. 2EPS	Decatromicins
<i>Kibdelosporangium persicum</i>	Persicamidines A–E
<i>Kutzneria albida</i> DSM 43870	Huimycin
<i>Streptomyces kebangsaanensis</i> WS-68302	Napyradiomycin A4, A80915 H
<i>Streptomyces jiujiangensis</i> NBERC-24992	Virantmycins D–G
<i>Streptomyces bacillaris</i>	Zelkovamycins F, G
<i>Streptomyces koyangensis</i> SCSIO 5802	Neoabyssomicins F, G
<i>Streptomyces</i> sp. AM-2504	Virantmycins B
<i>Streptomyces</i> sp. CPCC 200267	Geninthiocins E, F
<i>Streptomyces</i> sp. HK18	Xiamycins D
<i>Streptomyces</i> sp. JA74	Dihydromaniwamycin E
<i>Streptomyces</i> sp. SMU 03	dichloromethane extracts (DCME)

Les actinomycètes se distinguent également par la production de molécules antiparasitaires, dont l'exemple emblématique est l'ivermectine, isolée à partir de

Streptomyces avermitilis. Cette molécule et ses dérivés, tels que l'ivermectine, sont largement utilisés pour le traitement des parasitoses humaines et animales, démontrant ainsi le potentiel pharmaceutique et vétérinaire de ces microorganismes (Kim *et al.*, 2002).

II.2.1.5. Agents immunosuppresseurs

Les actinomycètes, notamment les espèces du genre *Streptomyces*, sont largement exploités pour la production d'immunosuppresseurs d'origine naturelle capables d'inhiber la réponse immunitaire. Ils sont utilisés principalement pour prévenir le rejet des greffes d'organes et traiter les maladies auto-immunes. Parmi les exemples les plus importants figurent la cyclosporine A, produite par *Streptomyces hygroscopicus*, et le tacrolimus (FK506), isolé de *Streptomyces tsukubaensis*. Ces molécules agissent en bloquant l'activation et la prolifération des lymphocytes T, réduisant ainsi la réponse immunitaire. Grâce à cette capacité unique, les actinomycètes représentent une source majeure d'immunosuppresseurs à fort potentiel thérapeutique (Ngamcharungchit *et al.*, 2023).

II.2.1.6. Composés anticancéreux

Plusieurs métabolites secondaires issus des actinomycètes possèdent des propriétés anticancéreuses remarquables. Des composés comme la mitomycine C, la doxorubicine et la daunorubicine agissent en intercalant leur structure dans l'ADN, inhibant la prolifération des cellules tumorales. Ces découvertes confirment l'intérêt biotechnologique exceptionnel des actinomycètes, non seulement comme source historique de médicaments essentiels, mais aussi comme plateforme prometteuse pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques innovantes à fort potentiel médical et industriel (Wink Joachim, 2017).

II.2.2. Agents de biocontrôle et biofertilisation

Les actinomycètes jouent également un rôle clé dans la protection des plantes et la promotion de la croissance végétale. Certaines espèces, telles que *Streptomyces griseus* ou *Streptomyces lydicus*, produisent des métabolites antifongiques qui inhibent les pathogènes du sol comme *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* ou *Pythium spp.*. Ce rôle de biocontrôle constitue une alternative écologique aux pesticides chimiques (Vurukonda *et al.*, 2018).

Tableau 03 : Liste des produits à base de *Streptomyces spp.* utilisés comme agents de biocontrôle disponibles sur le marché mondial (Vurukonda *et al.*, 2018).

Commercial Product Name	Organism As Active Substance	Registered As a Microbial Pesticide	Targeted Pest/Pathogen/Disease
Actinovate, Novozymes BioAg Inc., Milwaukee, WI, USA	<i>S. lydicus</i> WYEC 108	Canada, USA	Soilborne diseases, viz. <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , and <i>Verticillium</i> ; foliar diseases such as powdery and downy mildew, <i>Botrytis</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Postia</i> , <i>Geotrichum</i> , and <i>Sclerotinia</i> Damping off caused by <i>Alternaria</i> , <i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> wilt, and root diseases Powdery mildews, grey mold, and brown patch Seed germination diseases
Mycostop, Verdera Oy, Espoo, Finland	<i>Streptomyces</i> K61	EU, Canada, USA	
Mykocide, KIBC Co., Ltd., Yongin, Gyeonggi-do, Republic of Korea	<i>S. colombiensis</i>	Republic of Korea	
Bactophil	<i>Streptomyces albus</i>	Ukraine	

En parallèle, les actinomycètes participent à la biofertilisation grâce à la production de phytohormones (auxines, gibbérellines), à la solubilisation du phosphate et à la fixation indirecte de l'azote. Leur interaction avec la rhizosphère favorise la colonisation racinaire et améliore l'absorption des nutriments, contribuant ainsi à une croissance végétale plus vigoureuse et durable. Ces propriétés font des actinomycètes des partenaires privilégiés dans les programmes d'agriculture durable et de biotechnologie végétale (Vurukonda *et al.*, 2018).

II.2.3. Actinomycètes dans l'industrie enzymatique

Les actinomycètes sont aussi réputés pour leur aptitude à sécréter une large gamme d'enzymes extracellulaires d'intérêt industriel. Parmi celles-ci figurent les cellulases, xylanases, amylases, lipases, protéases et chitinases, essentielles pour la dégradation des polymères naturels comme la cellulose, la chitine et les hémicelluloses. (Mukhtar *et al.*, 2017).

Ces enzymes trouvent de nombreuses applications industrielles :

- Dans l'industrie agroalimentaire, pour l'hydrolyse de l'amidon et l'amélioration de la texture des produits ;
- Dans l'industrie pharmaceutique, pour la synthèse de molécules actives ou la modification de composés naturels ;
- Dans l'industrie textile et papetière, pour le blanchiment écologique et la transformation des fibres végétales. (Mukhtar *et al.*, 2017).

Grâce à leur stabilité thermique et leur large spectre d'activité, les enzymes d'actinomycètes représentent une ressource précieuse pour le développement de procédés biotechnologiques durables (**Prakash et al., 2013**).

II.2.4. Applications en bioremediation

Les actinomycètes contribuent activement à la bioremédiation des environnements pollués. Leur métabolisme complexe leur permet de dégrader les hydrocarbures aromatiques, les pesticides persistants et certains métaux lourds. Des espèces telles que *Rhodococcus erythropolis* et *Streptomyces albidoflavus* sont capables d'utiliser des composés toxiques comme sources de carbone et d'énergie, participant ainsi à la détoxification des sols et des eaux contaminées (**Behera et al., 2023**).

De plus, ces micro-organismes interviennent dans la valorisation des déchets organiques en convertissant la matière organique complexe en composés simples utilisables, contribuant ainsi à la production de composts riches en nutriments. Ces propriétés font des actinomycètes des acteurs clés dans la gestion environnementale et la lutte contre la pollution industrielle (**Behera et al., 2023**).

II.2.5. Avancées en génomique et ingénierie génétique

Les progrès récents en génomique et en biologie synthétique ont profondément élargi les perspectives biotechnologiques des actinomycètes. Le génome des *Streptomyces* est particulièrement grand (6–12 Mb) et contient de nombreux clusters de gènes "silencieux", souvent non exprimés dans les conditions de laboratoire classiques. Ces clusters codent potentiellement pour des métabolites encore inconnus (**Auch et al., 2010**).

Les nouvelles technologies, telles que le système CRISPR-Cas9, permettent aujourd'hui d'activer ces gènes silencieux, d'optimiser la production de métabolites secondaires et de créer de nouvelles molécules hybrides par recombinaison. Par ailleurs, les plateformes de screening métabolique à haut débit facilitent la détection rapide de nouveaux composés bioactifs. Ces avancées ouvrent la voie à la découverte de molécules inédites et renforcent la place des actinomycètes comme outils essentiels en biotechnologie moderne. Mais malgré ces avancées, des défis persistent tels que : toxicité de Cas9, instabilité chromosomique, et difficulté d'accès à certains clusters biosynthétiques (**Auch et al., 2010; Mitousis et al., 2025**).

PARTIE III. MATERIELS ET METHODES

Afin d'explorer le potentiel biotechnologique des actinobactéries issues de différents environnements algériens, ce travail a été conçu dans l'objectif d'isoler et d'évaluer la capacité de ces micro-organismes à produire des métabolites secondaires à activité antimicrobienne. Pour ce faire, une approche méthodologique intégrée a été adoptée, comprenant le prélèvement d'échantillons de sol et de sédiments issus de milieux contrastés, leur prétraitement sélectif, l'isolement sur milieux spécifiques, puis la purification et la conservation des souches actinobactériennes obtenues, permettant de constituer une collection représentative de la diversité microbienne locale.

Par la suite, un criblage primaire et secondaire de l'activité antimicrobienne a été réalisé afin d'identifier les isolats présentant un potentiel bioactif et d'évaluer leur spectre d'inhibition contre différents micro-organismes indicateurs. Enfin, des fermentations en milieu liquide et solide, suivies de procédés d'extraction des métabolites, ont permis d'obtenir des extraits bruts destinés à l'évaluation de leur activité antibactérienne et antifongique, offrant ainsi des indications précieuses sur leur capacité à produire des composés bioactifs.

Cette démarche méthodique vise ainsi à contribuer à la recherche de nouvelles sources naturelles de biomolécules antimicrobiennes d'intérêt thérapeutique ou biotechnologique, tout en enrichissant les connaissances sur la biodiversité des actinobactéries dans les sols algériens et en ouvrant de nouvelles perspectives pour des applications futures dans les domaines médical et industrie

III.1. Prélèvement des échantillons de sol

III.1.1. Sites d'échantillonnage

L'échantillonnage des sols a été effectué en janvier 2025 à partir de quatre échantillons prélevés sur quatre sites distincts situés dans l'ouest de l'Algérie (**Figure 02**) :

- Sebkha de Bougtob (région d'El Bayadh) ;
- Sédiments marins de la zone côtière de Kristal (wilaya d'Oran) ;
- Rhizosphère de Ziziphus (Djebarat, wilaya de Saïda) ;
- Rhizosphère de Acacia (région de Tindouf).

Les prélèvements ont été effectués selon une procédure standardisée de collecte suivant la technique décrite par **Pochon et Tradieux (1962)**, avec conservation immédiate à 4°C avant l'analyse. Le **Tableau 04** décrit les caractéristiques géographiques des échantillons.

Tableau 04 : Repérage géographique des stations d'échantillonnage par GPS

Sites d'échantillonnage	Code	Région	La position géographique	
Sebkha Bougtob	SB	Bougtob, El bayadh	34°03'24.9" N	0°05'20.8"E
Rhizosphère Ziziphus	RZ	Djebarat, Saïda	34°49'12.0"N	0°10'39.6"E
Sédiments Marins Kristal	SMk	Kristal, Oran	35°50'58.8"N	0°28'59.7"W
Tindouf Acacia	TA	Tindouf	7°42'05.7"N	8°05'23.8"W



Figure 13 : Localisation géographique des sites de prélèvement des sols

📍 : Localisation des sites de prélèvement des échantillons de sol.

III.1.2. Caractéristiques du sol

III.1.2.1. pH des échantillons

Pour le pH, 10 g de chaque échantillon préalablement séché ont été mélangés avec 50 ml d'eau distillée, selon un ratio masse/volume de 1 : 5. Le mélange a été agité pendant 2 minutes pour assurer une homogénéisation optimale. Après agitation, le pH a été mesuré directement à partir du surnageant à l'aide d'un pH-mètre équipé d'une électrode (modèle HANNA HI9125) (Mosley *et al.*, 2024).

III.1.2.2. Couleur des échantillons

L'aspect visuel des échantillons de sol a été examiné immédiatement après leur préparation. Les variations de couleurs ont été notées à l'œil nu (Du *et al.*, 2025).

III.1.3. Méthodologie du prélèvement

- **Prélèvement des sols**

Les sols ont été collectés dans la rhizosphère de *Ziziphus*, la rhizosphère d'*Acacia* et dans la sebkha de Bougtob. Après avoir retiré les débris superficiels, le sol a été prélevé à une profondeur de 5 à 10 cm. Pour chaque site, cinq sous-échantillons d'environ 50 à 100 g ont été mélangés pour former un échantillon composite de 250 g (**Pochon et Tradieux ,1962**).

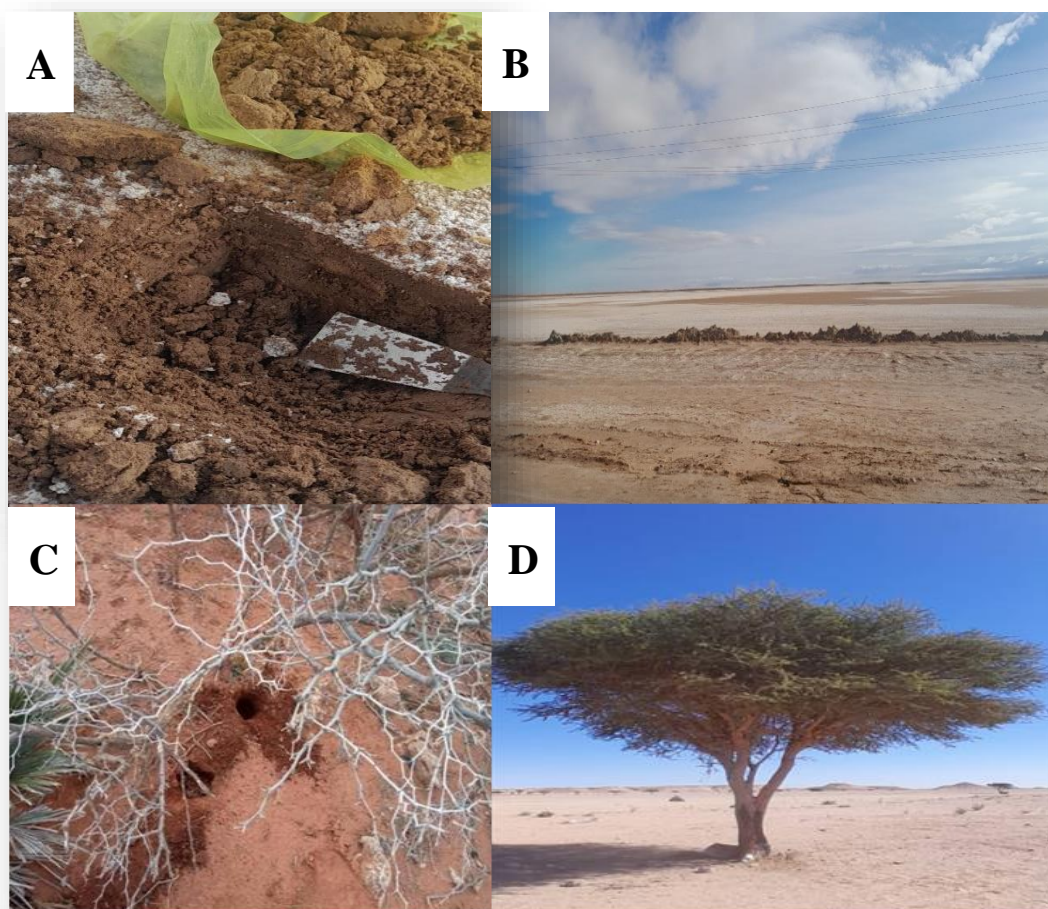


Figure 14 : Photographies des sites de prélèvement des échantillons de sol

(A) Site d'échantillonnage situé dans la sebkha de Bougtob ;

(B) Vue générale de la sebkha de Bougtob ;

(C) Site d'échantillonnage dans la rhizosphère de *Ziziphus* (Djebarat, Saïda) ;

(D) Site d'échantillonnage dans la rhizosphère d'*Acacia* (région de Tindouf).

- **Prélèvement des sédiments marins**

Les sédiments marins ont été collectés dans la zone côtière de Kristal, Oran. Une fine couche superficielle (environ 1 à 3 mm) déposée sur la surface de roches en zone intertidale a été délicatement grattée. Environ 50 à 100 g de sédiment sec ont été prélevés (Abdel-Razik et al., 2025).

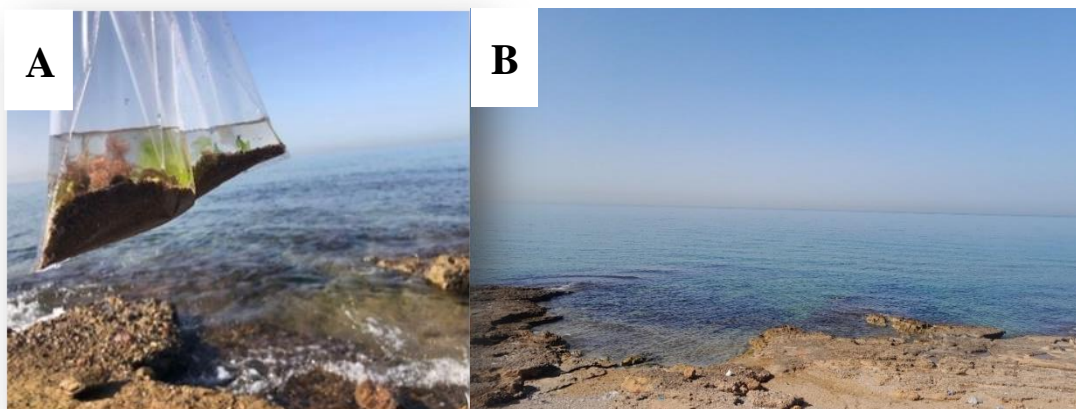


Figure 15 : Site de prélèvement des sédiments marins

(A) Site d'échantillonnage dans la zone côtière de Kristal (Oran)

(B) Vue générale de Site de prélèvement Kristal (Oran)

III.2. Prétraitement des échantillons de sol

Le prétraitement est réalisé afin de réduire la flore microbienne compétitive et ainsi favoriser l'isolement des actinobactéries, plus résistantes à certaines conditions sélectives (Balagurunathan *et al.*, 2020).

III.2.1.1. Séchage et Tamisage

Les échantillons ont d'abord été tamisés à l'aide d'un tamis 2 mm afin d'éliminer les débris grossiers (Valli *et al.*, 2012). Par la suite, ils ont été soumis à un prétraitement consistant en un séchage à l'air libre pendant sept jours à température ambiante. Cette étape permet de réduire la viabilité des bactéries et des champignons non sporulés sensibles à la dessiccation, tout en favorisant la survie des actinomycètes sporulés, plus résistants à ces conditions (Messaoudi *et al.*, 2015).

III.2.1.2. Traitements chimiques et physiques

- **Traitements chimiques**

10 g d'échantillon de sol ont été mélangés avec 1 g de carbonate de calcium L'ajout de CaCO_3 permet de neutraliser l'acidité du sol et de maintenir un pH légèrement alcalin, une condition favorable à la croissance et à la germination des spores d'actinomycètes. Ce prétraitement contribue également à réduire la croissance de nombreuses bactéries et champignons concurrents, généralement sensibles à des conditions alcalines. (Tiwari *et al.*, 2021)

- **Traitements physiques**

Un prétraitement thermique à sec 110 °C pendant 10 min a été appliqué aux échantillons de sol de Rhizosphère de Acacia (région de Tindouf) afin d'éliminer les bactéries non sporulées, réduire la charge microbienne totale et sélectionner préférentiellement les actinobactéries sporulées résistantes à la chaleur (Suzuki, 2000)

Tableau 05 : Tableau récapitulatif des prétraitements appliqués aux échantillons

Code de L'échantillon	Prétraitement des échantillons de sol			
	Séchage	Tamissage	Traitements chimiques	Traitements physiques
SB	●	●	●	
RZ	●	●	●	
SMk	●	●	●	
TA	●	●	●	●

● Signe qui montre que le traitement a été effectué



Signe montrant que le traitement n'a pas été effectué

III.3. Isolement des actinobactéries

III.3.1.1. Milieux de cultures utilisés

Les milieux de culture utilisés (**annexe 01**) pour l'isolement des actinomycètes sont :

1. Milieu **GYM** (gélose–extrait de levure–extrait de malt) (**Smaoui et al., 2018**)
2. Milieu **SCA** (Starch Casein Agar) (**KÜSTER et al., 1964**)
3. Milieu **ISP2** (International Streptomyces Project) (**Zakari et al., 2025**)

Après stérilisation par autoclavage, les milieux sont refroidis à environ 45 °C. Ils sont ensuite supplémentés, de manière aseptique, avec 5 µg/ml d'actidione (le cycloheximide) (**Ayoib et al., 2024**). L'incorporation de ce composé a pour objectif de limiter la croissance des champignons et de favoriser ainsi l'isolement sélectif des actinomycètes.

III.3.1.2. Préparation de suspension-dilution et ensemencement

L'isolement des actinobactéries a été effectué selon la méthode des suspensions-dilutions. Pour ce faire, 5 g de chaque échantillon sec, préalablement traité comme décrit ci-dessus, ont été mis en suspension dans 45 mL d'une solution physiologique stérile (NaCl 9 g/L). Cette étape a permis d'obtenir, pour chaque échantillon, une solution mère distincte (**Budhathoki et al., 2020**). À partir de chaque suspension mère, une série de dilutions décimales successives a été réalisée, allant de 10^{-1} à 10^{-5} . Par la suite, 100 µL des trois dernières dilutions (10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) ont été prélevés et étalés en surface sur le milieu de culture, avec trois répétitions indépendantes pour chaque dilution. (**Balagurunathan et al., 2020**)

Les boîtes ainsi ensemencées ont été incubées dans une étuve à 28 ± 2 °C pendant une durée de 7 à 21 jours avec atmosphère saturée d'humidité afin de permettre la croissance et le développement des colonies d'actinobactéries (**Ribeiro et al., 2025**).

III.3.1.3. Reconnaissance et sélection des actinobactéries

Pendant la période d'incubation, les boîtes de Pétri inoculées ont été inspectées périodiquement à l'œil nu afin de suivre l'évolution et la morphologie des colonies d'actinomycètes. Les observations ont porté sur des critères macroscopiques caractéristiques, tels que l'aspect poudreux ou crayeux des colonies, leur implantation parfois en profondeur dans le milieu (colonies incrustées dans la gélose avec une texture sèche), ainsi que la présence d'un centre proéminent et de bords frangés. Ces caractères morphologiques ont permis

de distinguer les isolats bactériens présentant un profil compatible avec celui des actinobactéries (Li *et al.*, 2016).

Les colonies bactériennes répondant aux caractéristiques décrites ci-dessus ont été soigneusement sélectionnées pour une étude plus approfondie. Afin de confirmer leur appartenance au groupe des actinobactéries, une coloration de Gram a été réalisée (Coico, 1997). Les résultats ont montré des bactéries Gram positives, filamenteuses, confirmant leur nature d'actinomycètes et validant ainsi la pertinence de la sélection.

III.3.1.4. Purification et conservation des actinobactéries

Les colonies sélectionnées ont été prélevées avec précaution à l'aide d'une anse stérile, puis ensemencées sur les milieux GYM ou ISP2 en vue d'obtenir des cultures pures. Les isolats ainsi obtenus ont été numérotés.

Les isolats purifiés ont été conservés sur tubes de milieu GYM inclinés à 4 °C, ainsi qu'en suspension dans du glycérol (20 %, v/v) à -20 °C (Franco Correa *et al.*, 2016).

III.4. Criblage de l'activité antimicrobienne des actinobactéries

Le criblage de l'activité antimicrobienne permet d'évaluer la capacité des actinobactéries isolées à inhiber la croissance de micro-organismes cibles. Cette étape est essentielle pour identifier les souches présentant un potentiel producteur de métabolites bioactifs, notamment à visée antibactérienne (Balouiri *et al.*, 2016)

III.4.1. Microorganismes-cibles

D'une part, les souches bactériennes cibles utilisés dans cette étude proviennent de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, dont plusieurs souches sont cataloguées et déposées dans les collections internationales de référence (ATCC). Pour leur purification et la préparation de jeunes cultures, les bactéries ont été cultivées sur milieu gélosé nutritif. Elles ont ensuite été réactivées dans 9 mL de bouillon nutritif et incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des cultures fraîches et actives (Qureshi *et al.*, 2021). D'autre part, les souches fongiques ont été isolées puis purifiées sur le milieu PDA avant d'être observées au microscope afin de vérifier leurs caractéristiques microscopiques (GAUTAM *et al.*, 2025).

Les souches bactériennes cibles ont été sélectionnées en raison de leur importance pathologique et alimentaire, afin d'évaluer le spectre d'activité des actinobactéries isolées. De même, les souches fongiques indicatrices ont été choisies en fonction de leur pathogénicité chez l'homme et les plantes (**Belt *et al.*, 2025**).

Tableau 06 : Caractéristiques des souches indicatrices

Les souches indicatrices			Intérêt du choix
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Pathogène / Alimentaire
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IBMC Strasbourg	Pathogène
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Pathogène / Alimentaire
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 25921	Alimentaire/ Pathogène
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Alimentaire
Levures	<i>Candida albicans</i>	Opportuniste humaine	
Champignons	<i>Phytophthora infestans</i>	Champignons phytopathogènes Agent du mildiou	
	<i>Rhizoctonia</i>	Phytopathogène	

ATCC: American Type Culture Collection

IBMC Strasbourg : Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire Strasbourg

III.4.2. Standardisation des inocula

Afin d'assurer une charge identique chez tous les micro-organismes cibles et de garantir une évaluation fiable de l'activité antimicrobienne, les inocula ont été standardisés en ajustant les suspensions bactériennes à l'étalon 0,5 McFarland, correspondant à une concentration d'environ 10^6 UFC/mL (**Loffredo *et al.*, 2020**). Les suspensions de spores ont

été préparées puis ajustées à une turbidité équivalente à l'étalon 0,5 de McFarland, correspondant à une concentration estimée de $(1-5) \times 10^6$ spores/mL (**Belt *et al.*, 2025**)

III.4.3. Criblage primaire de l'activité antimicrobienne

- **Méthode des cylindres d'agar**

Les souches d'actinobactéries isolées sont ensemencées en stries serrées sur le milieu ISP-2 et incubées pendant 7 jours à 28 °C. La recherche des métabolites antibactériens est effectuée par la technique des cylindres d'agar qui consiste à prélever à l'aide d'un emporte-pièce des cylindres de 6 mm de diamètre de cultures et de les déposer sur la surface du milieu Mueller-Hinton gélosé, préalablement ensemencé par écouvillonnage par les bactéries tests (**Balouiri *et al.*, 2016**).

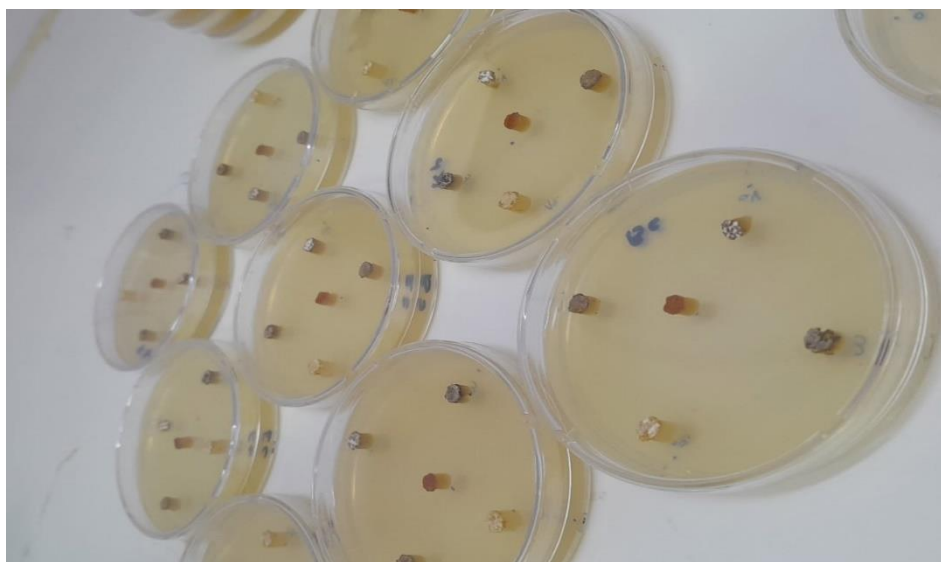


Figure 16 : Méthode des cylindres d'agar

Les boîtes de Pétri sont ensuite maintenues à 4 °C pendant 4 heures pour permettre une diffusion des substances antimicrobiennes actives dans le milieu de culture avant d'être incubées à 37 °C (**Pongtharangkul *et al.*, 2004**)

III.4.4. Observation et interprétation des zones d'inhibition

Après incubation, la présence des zones d'inhibition indique un résultat positif. Cette zone est observée autour des disques d'actinomycètes ce qui signifie que ces bactéries produisent des molécules antimicrobiennes capables de stopper la croissance des bactéries (**Yadav *et al.*, 2024**).

III.5. Fermentation et extraction des métabolites

III.5.1. Fermentation des isolats pour production des métabolites

Afin de maximiser la production de métabolites secondaires, les isolats identifiés ont été soumis à un processus de fermentation en milieu submergé. Chaque isolat a été cultivé dans un erlenmeyer 500 ml (**Figure 17**) contenant 100 mL de milieu GYM liquide (pH : 7,2), puis incubé à 28 °C sous agitation constante à 180 rpm pendant une durée de 7 à 10 jours. Ces conditions de température et d'aération ont été optimisées afin de favoriser une croissance optimale (*Al-ghazali et al., 2017*)

Par la suite, 10 mL de cette culture ont été transférés dans le milieu 5294 pour l'induction de la production de métabolites (*Khodja et al., 2023*). Le succès de la fermentation a été confirmé par des signes visibles tels que la formation de pellets, l'agrégation cellulaire ou encore une augmentation notable de la turbidité (*Yadav et al., 2024*).



Figure 17 : Processus de fermentation en milieu liquide dans des erlenmeyers de 500 mL.

III.5.2. Extraction des métabolites

III.5.2.1. Extraction à partir de milieu liquide

Un volume de 20 mL de chaque culture, préalablement filtrée sur papier filtre, a été mélangé à 20 mL d'acétate d'éthyle puis soumis à une agitation pendant 12 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 6 000 rpm pendant 10 minutes et la phase organique (supérieure) a été recueillie dans un flacon de 50 mL. L'acétate d'éthyle a ensuite été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 40 °C. Le résidu sec obtenu a finalement été dissous dans 1 mL de méthanol (Teklemichael *et al.*, 2024)



Figure 18 : Étapes du processus d'extraction des métabolites secondaires par extraction liquide-liquide et concentration par évaporation sous vide (rotavapor).

III.5.2.2. Extraction à partir de milieu solide

Les extraits ont été obtenus à partir de la biomasse cellulaire de l'actinobactérie, par une extraction solide-liquide au méthanol dans un rapport de 1:5 (p/v), sous agitation lente pendant 30 minutes. La phase méthanolique a ensuite été séparée des cellules par centrifugation à 6000 rpm, 22 °C, pendant 15 minutes, puis concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 40 °C (Rakhmawatie *et al.*, 2024)

III.6. Criblage secondaire de l'activité antimicrobienne

- **Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits**

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion en puits sur gélose. Les extraits bruts ont été déposés dans des cavités creusées des puits de 06 mm de diamètre à la surface des milieux préalablement ensemencés avec les suspensions bactériennes. Les boîtes ont ensuite été maintenues à 4 °C pendant 4 heures afin de favoriser la diffusion des métabolites antibactériens, puis incubées à 28 °C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition ont ensuite été observées et mesurées. **(Singh *et al.*, 2016)**

Pour l'évaluation de l'activité antifongique, des disques stériles imprégnés des extraits bruts des souches A13 et A8 ont été déposés sur les milieux gélosés. Les boîtes ont été maintenues à 4 °C pendant 4 heures pour permettre une diffusion optimale des métabolites antifongiques, puis incubées à 28 °C. Après une incubation de 3 à 7 jours, les zones d'inhibition ont été observées et mesurées. **(Yadav *et al.*, 2024)**

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Prélèvement des échantillons de sol

IV.1.1. Caractéristiques du sol

IV.1.1.1. pH des échantillons

Les valeurs de pH mesurées dans les différents échantillons analysés sont mentionnés dans le **Tableau 07**. Les résultats révèlent une variation notable en fonction de leur origine géographique et écologique. Le sol rhizosphérique de Tindouf présente un pH légèrement acide (pH 5,33), tandis que celui de Djébarat (Saïda) est proche de la neutralité (pH 6,0). Le sol de Bougtob (El Bayadh) montre également une tendance faiblement acide (pH 6,06). En revanche, le sol marin de Kristel (Oran) se caractérise par un pH alcalin (pH 7,88), ce qui est en accord avec la nature des environnements marins généralement riches en sels minéraux (**Wang et al., 2019**)

Tableau 07 : Résultats du pH des échantillons

Echantillon	Site de prélèvement	Type de sol	H
SB	Bougtob, Elbayadh	Sol de sebkha	6.06
RZ	Djébarat, Saïda	Sol rhizosphérique	6
SMk	Kristal, Oran	Sol de Sédiments	7.88
TA	Tindouf	Sol rhizosphérique	5.33

Cette variabilité du pH est importante, car elle influence directement la structure et la densité des communautés microbiennes, notamment les actinobactéries. Les sols légèrement acides à neutres, comme ceux de Saïda, Tindouf et Bougtob, sont généralement favorables à la croissance et à la diversité des actinobactéries (**Wan et al., 2020**).

IV.1.1.2. Couleur des échantillons

Sur le plan visuel, une variation nette de la couleur a été observée entre les échantillons, allant du brun foncé au beige clair, traduisant potentiellement des différences en matière organique, en teneur en argiles, ou en composition minérale (Du *et al.*, 2025). **Figure 19** montre la variation des couleurs observée entre les différents échantillons de sol collectés.



Figure 19 : Différences de couleurs observées entre les échantillons de sol collectés

IV.2. Isolement des actinomycètes

Après une incubation de 7 à 21 jours à 28 °C sur les milieux d'isolement SCA et GYM supplémentés en actidione, des colonies d'actinomycètes mycéliens ont été observées. Celles-ci présentaient un aspect sec, rugueux, parfois pigmenté, avec un diamètre variant de 1 à 10 mm. Elles étaient généralement compactes, bien incrustées dans la gélose, et caractérisées par la présence simultanée d'un mycélium aérien et d'un mycélium végétatif. Les colonies isolées ont ensuite été purifiées par repiquages successifs sur les milieux ISP2 ou GYM, puis incubées à 28 °C pendant 14 jours. **Figure 20** montre le résultat de l'isolement d'actinobactéries à partir de l'échantillon de sol rhizosphérique (RZ) sur le milieu SCA, après ensemencement de la dilution 10^{-3} . Les boîtes de Pétri montrent l'apparition de colonies mycéliennes caractéristiques.

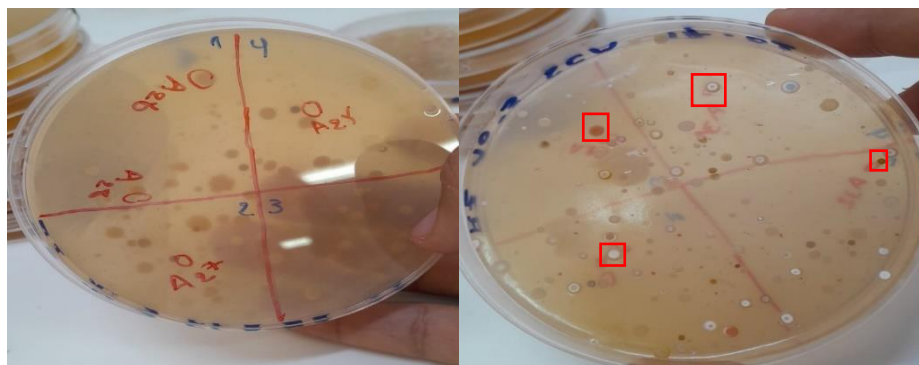


Figure 20 : Boîtes de Pétri montrant l'isolement d'actinobactéries à partir d'un échantillon de sol rhizosphérique (RZ) sur milieu SCA, après ensemencement de la dilution 10^{-3}

Lors de l'isolement, une difficulté majeure a été rencontrée c'est la présence des bactéries à Gram positif, principalement du genre *Bacillus*. Ces bactéries, caractérisées par une croissance rapide et envahissante (**Koech et al., 2025**), forment des plages qui compliquent l'observation et entravent le processus de purification.

Étant elles-mêmes à Gram positif, leur élimination par des antibiotiques ciblant ce groupe bactérien s'avère impossible, car ces derniers affecteraient également les actinobactéries recherchées. De ce fait, l'utilisation de tels antibiotiques dans nos milieux de culture ne pouvait pas être envisagée (**Schneider et al., 2022**).



Figure 21 : contamination par les gram positive *Bacillus*

Dans notre étude, les dilutions sur le milieu GYM (10^{-4} à 10^{-6}) n'ont pas permis de détecter de colonies d'actinobactéries, probablement en raison d'une concentration bactérienne faible et de l'absence d'une étape d'enrichissement préalable. D'autres études ont montré qu'un enrichissement du sol permet d'obtenir des colonies même à ces dilutions (10^{-4} à 10^{-6}), confirmant l'importance de cette étape pour la récupération d'actinobactéries rares (**Dwiyani *et al.*, 2025**).

En revanche, l'utilisation du milieu SCA avec des dilutions plus faibles (10^{-2} et 10^{-3}) a conduit à l'isolement d'un nombre plus élevé de colonies, ce qui est cohérent avec les résultats rapportés dans la littérature, où ce milieu favorise la croissance d'actinobactéries à des dilutions relativement élevées (**Yadav *et al.*, 2024**). Le graphique de la **figure 22** illustre la variation du nombre d'isolats en fonction des dilutions d'ensemencement

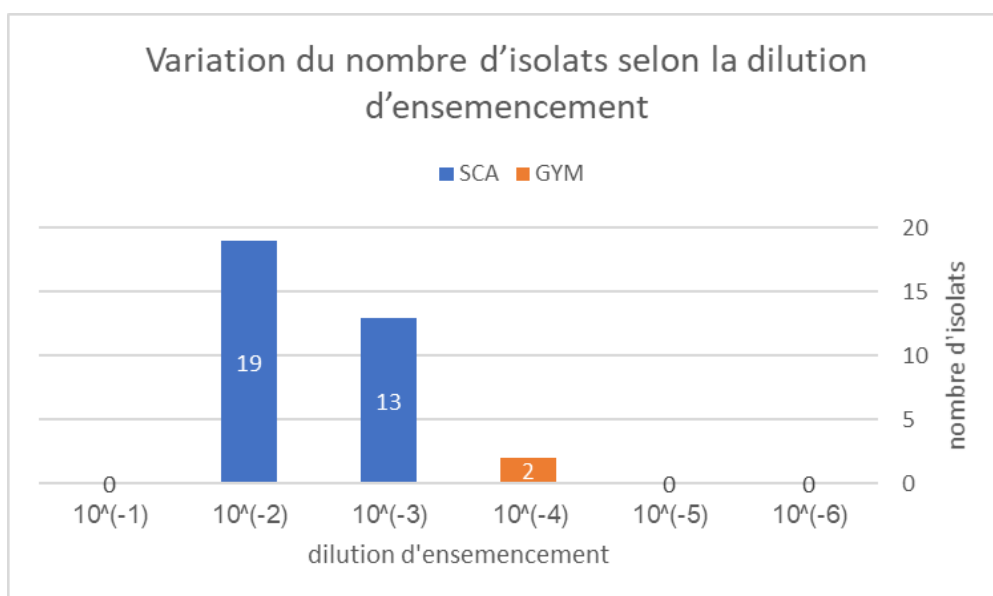


Figure 22 : Variation du nombre d'isolats selon la dilution d'ensemencement

L'utilisation du milieu Starch Casein Agar (SCA) s'est révélée particulièrement efficace pour l'isolement des actinobactéries à partir des échantillons de sol étudiés. Ce milieu, enrichi en substrats complexes tels que l'amidon et la caséine, a favorisé la croissance sélective des actinobactéries tout en limitant celle des bactéries à croissance rapide et des champignons filamenteux. (**Dwiyani *et al.*, 2025**).

Un total de 38 isolats d'actinobactéries a été obtenu à partir des différents échantillons de sol analysés. Parmi eux, 16 provenaient d'échantillons collectés dans la région de Djbarat (Saïda), 4 de la région de Bougtob (wilaya d'El Bayadh), 16 de la rhizosphère d'acacia de Tindouf, et 2 du sol sédimentaire marin de la région de Kristel (Oran).

La **figure 23** montre, à travers un graphique, la variation du nombre d'isolats selon le type d'échantillon de sol. Il a été constaté que les sols rhizosphériques présentaient une plus grande capacité à favoriser l'isolement de ces micro-organismes par rapport à d'autres types de sols, notamment les sols salins ou marins (**Islam et al., 2022**).

Cette différence peut être attribuée à la richesse en matière organique et à la forte activité microbienne caractéristique de la rhizosphère.

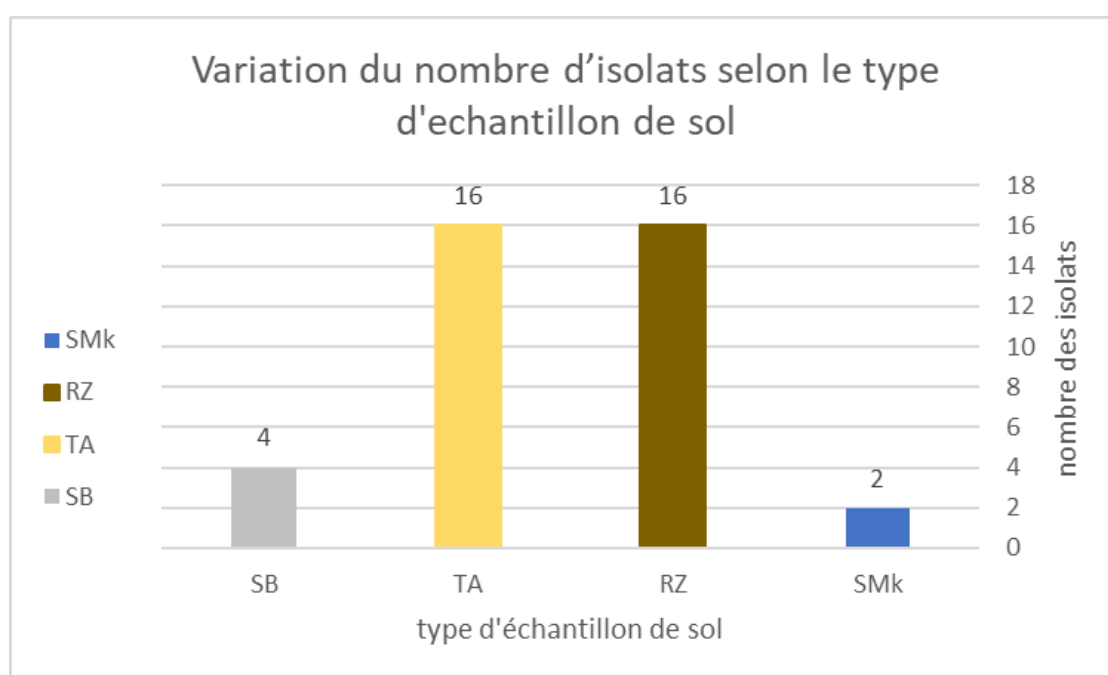


Figure 23 : Nombre des isolats par rapport le type d'échantillon de sol

Le nombre total d'isolats obtenus (38) peut sembler inférieur à celui rapporté dans d'autres travaux (**Islam et al., 2022**) , mais cela s'explique par plusieurs facteurs méthodologiques.

D'une part, le nombre d'échantillons de sol collectés dans certaines zones, notamment les milieux extrêmes tels que les sols salins ou marins, était limité (seulement deux échantillons), ce qui réduit naturellement la probabilité d'obtenir un nombre élevé d'actinobactéries. (**Yadav et al., 2024**).

D'autre part, afin d'éviter la sur-représentation de souches similaires, toutes les colonies actinobactériennes n'ont pas été systématiquement purifiées. Seules les colonies présentant des morphotypes macroscopiques distincts (**Yadav et al., 2024**), ont été sélectionnées pour la purification, dans le but d'augmenter les chances d'obtenir une diversité maximale en termes d'espèces et de genres. Cette stratégie, privilégiant la représentativité plutôt que la quantité, explique également le nombre réduit mais scientifiquement pertinent d'isolats retenus pour l'étude

L'échantillon prélevé dans les sédiments marins SMk avait déjà un pH basique, de 7,98. Pour les autres échantillons, nous avons ajouté du CaCO_3 afin de neutraliser le pH et favoriser la germination des spores d'actinobactéries (**Guo et al., 2019**). Cependant, pour l'échantillon des sédiments marins, cet ajout était inutile et a probablement influencé négativement les résultats (**Fang et al., 2017**).

Une diversité morphologique marquée a été observée parmi les isolats d'actinobactéries obtenus **Figure 24**. Cette variation se manifeste par des différences de forme, de texture, de couleur et de structure des colonies. Elle s'explique principalement par des différences génétiques entre les souches, mais également par l'influence des conditions de culture, telles que la composition du milieu, la température et le pH. Ces facteurs peuvent moduler la croissance, la sporulation et la production de pigments, entraînant ainsi une large variabilité d'aspects morphologiques. (**Li et al., 2016**) .

Cette diversité traduit la capacité d'adaptation élevée des actinobactéries aux conditions environnementales (**Li et al., 2016**) .

	CODE DE L'ECHANTILLON	ISOLATS	TAILLE DES COLONIES (MM)	ASPECT DES COLONIES
Sol rhizosphérique	RZ	A ₁₇ - A ₃₂	Moyenne 2-8 Petit 1-5	Colonies cotonneuses, irrégulières, de couleur blanche, grise, noire, verdâtre, avec mycélium aérien
	TA	A ₁ - A ₁₆	Moyenne 2-8 Petit 1-5	Colonies de taille moyenne à petite, incrustées dans la gélose, de couleur noire, beige ou rouge, à aspect poudreux ou granuleux
Sol de Sédiments	SMk	A ₃₃ A ₃₄	Petit 1-5	Petite colonie jaune verdâtre A ₃₃ , entourée d'une colonie blanche A ₃₄
Sol de sebkha	SB	A ₃₅ - A ₃₈	Moyenne 2-8 Petit 1-5	Colonies de taille moyenne à petite de couleur blanche

Tableau 08 : Aspect macroscopique des isolats d'actinobactéries isolés à partir des échantillons du sol

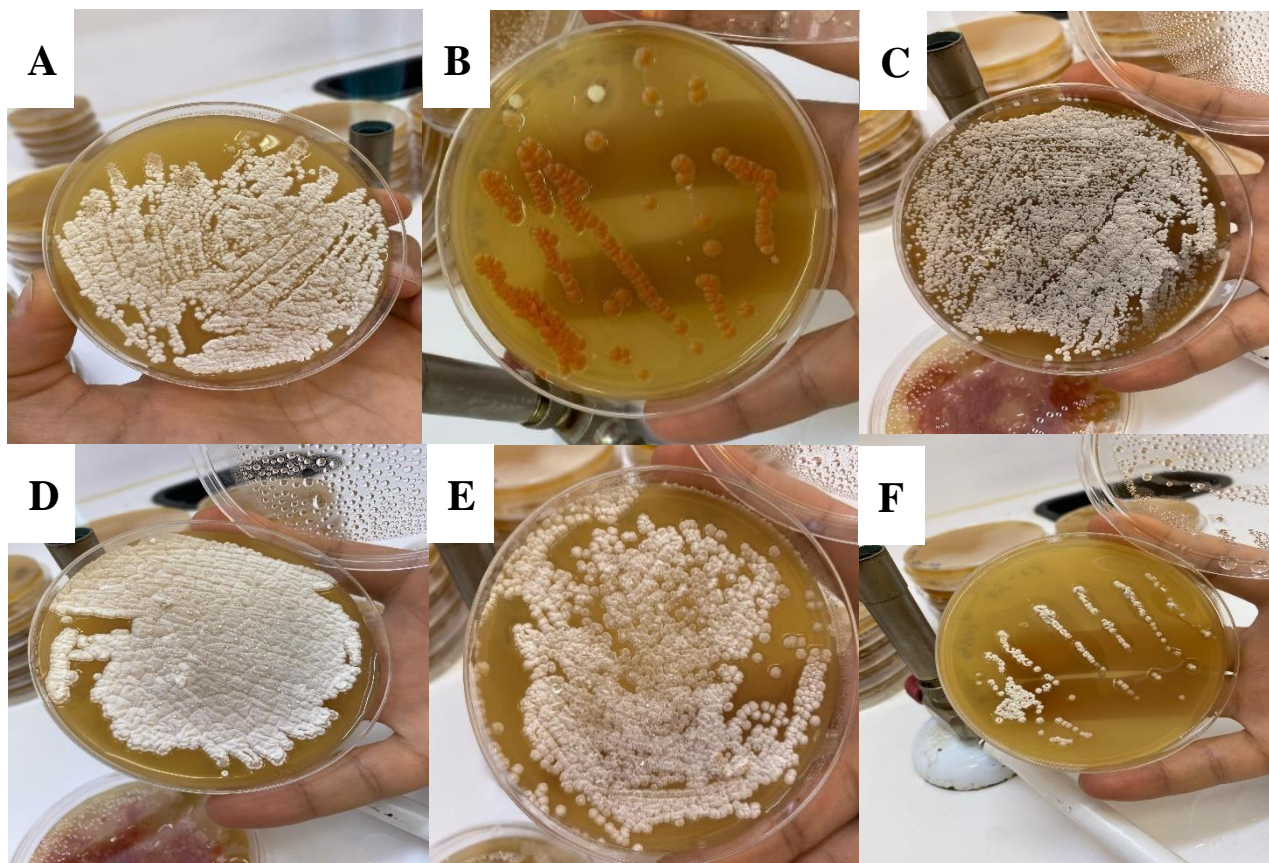


Figure 24 : Aspect macroscopique des isolats

(A) isolat A12

(B) isolat A6

(C) isolat A7

(D) isolat A8

(E) isolat A13

(F) isolat A15

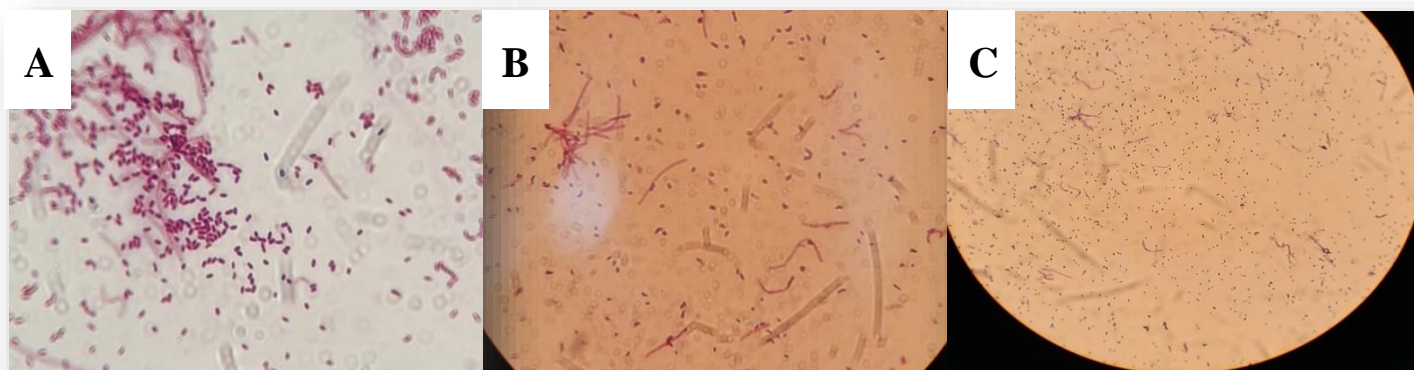


Figure 25 : Aspect microscopique des isolats

(A) Observation de l'isolat A8 après coloration de Gram au microscope optique à un grossissement de $\times 100$; (B) Observation de l'isolat A13 après coloration de Gram au microscope optique à un grossissement de $\times 100$; (C) Observation de l'isolat A13 après coloration de Gram au microscope optique à un grossissement de $\times 60$

Les résultats obtenus à la suite des observations macroscopiques et microscopiques confirment l'appartenance des isolats étudiés au groupe des actinomycètes. En effet, sur milieu

solide, les colonies présentent des caractéristiques typiques de ce groupe, telles qu'un aspect poudreux ou crayeux, une morphologie compacte et souvent colorée, témoignant de la formation d'un mycélium aérien (**Kim et al., 2002**). L'examen microscopique, réalisé après coloration de Gram, a révélé la présence de cellules filamenteuses ramifiées à Gram positif, confirmant la nature actinobactérienne des isolats (**Li et al., 2016**).

IV.3. Criblage primaire de l'activité antimicrobienne

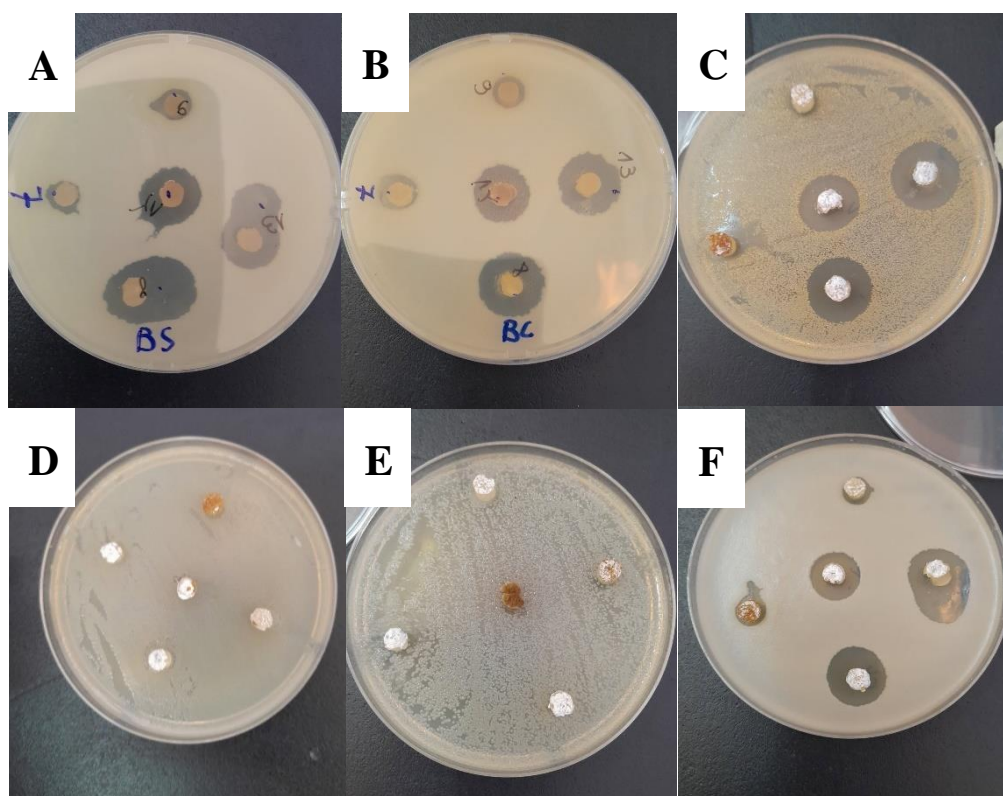


Figure 26 : Criblage primaire des isolats (méthode cylindre d'agar) contre:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| (A) <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | (B) <i>Bacillus cereus</i> ATCC25921 |
| (C) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | (D) <i>Escherichia coli</i> ATCC8739 |
| (E) <i>Klebsiella pneumoniae</i> IBMC Strasbourg | (F) <i>Bacillus cereus</i> ATCC25921 |

Nos résultats (**Tableau 09**) concordent avec ceux rapportés par d'autres auteurs (**Ruppé et al., 2015; Barar et al., 2025**), qui ont montré que les bactéries à Gram négatif présentent une résistance plus élevée aux métabolites produits par les actinomycètes que les bactéries à Gram positif. Cette résistance peut s'expliquer par la présence, chez les bactéries à Gram négatif, d'une couche de lipopolysaccharides (LPS) qui agit comme une barrière protectrice,

L'absence d'activité antibactérienne chez certains isolats d'actinomycètes contre les souches testées pourrait s'expliquer par le développement d'une résistance à ces composés.

En effet, la résistance bactérienne aux antibiotiques d'origine actinomycétale peut résulter soit d'une inactivation enzymatique de ces molécules, soit d'une diminution de la perméabilité de la membrane bactérienne (**Ruppé *et al.*, 2015**).

Tableau 09 : Résultats du criblage primaire de l'activité antimicrobienne (méthode cylindre d'agar)

Les micro-organismes cibles			Zone d'inhibition en mm						
			A13	A7	A9	A8	A15	A12	A6
Bactérie Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	20	10	10	20	15	13	12
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC25921	17	10	10	17	15	11	8
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	17.5	10	9	22.5	17	12	7
Bactérie Gram-négative	<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IBMC Strasbourg	0	0	0	0	0	0	0

IV.4. Fermentation et d'extraction des substances actives

Au terme de la période d'incubation, les cultures des différents isolats ont présenté des modifications macroscopiques notables, témoignant du bon déroulement du processus de fermentation. Une formation de pellets et une agrégation cellulaire dense ont été observées. De plus, un changement marqué de la couleur du milieu de culture a été constaté selon l'isolat (Yadav *et al.*, 2024) certains milieux ont viré au noir, d'autres ont pris des teintes vertes ou brunâtres (**Figure 27**). Ces variations chromatiques sont généralement associées à la production de pigments diffusibles et de métabolites secondaires spécifiques à chaque souche (Selim *et al.*, 2021)



Figure 27 : Résultats visuels de la fermentation des isolats

Les différences de couleurs observées entre les milieux traduisent la diversité des métabolites secondaires produits par les isolats. Les teintes noires ou brunes indiquent souvent la formation de mélanines (Tang *et al.*, 2025). Le milieu 5294 a été choisi en raison de sa richesse nutritive favorable à la production de métabolites secondaires. Il contient des sources azotées complexes (extrait de levure, peptone, corn steep liquor) fournissant les éléments essentiels à la biosynthèse des métabolites. La présence de CaCO_3 contribue au maintien du pH, condition indispensable pour une production optimale d'antibiotiques (Pan *et al.*, 2019).

IV.5. Criblage secondaire de l'activité antimicrobienne

Après l'extraction des métabolites secondaires à partir du milieu liquide, l'extrait méthanolique obtenu a été testé afin de réaliser le criblage secondaire de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur puits contre les différents micro-organismes cibles. Les résultats obtenus ne correspondaient pas aux attentes, car

l'extrait a présenté des zones d'inhibition très faibles, généralement inférieures à 10 mm. Ces observations indiquent une faible activité antimicrobienne de l'extrait issu du milieu liquide (**Figure 28**).

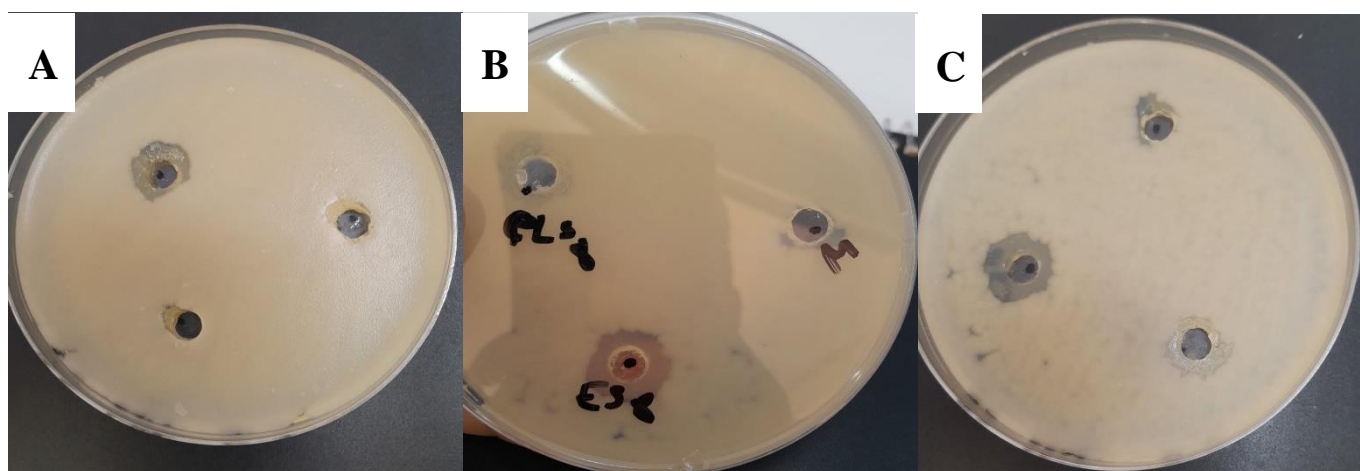


Figure 28 : Criblage secondaire de l'activité antimicrobienne de la phase liquide et du méthanol (contrôle négatif), ainsi que de l'extrait de la souche A8 obtenu à partir de l'extraction en milieu liquide, testés contre:

- (A) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B) *Bacillus cereus* ATCC25921
(C) *Bacillus cereus* ATCC25921

La faible activité antimicrobienne observée pourrait être liée à plusieurs facteurs. En premier lieu, une dégradation partielle de certains composés bioactifs pourrait être produite au cours du processus d'extraction, entraînant une diminution de leur stabilité et de leur pouvoir inhibiteur. Il est également possible qu'une partie des métabolites intracellulaires ait été éliminée lors de la phase de filtration, destinée à séparer la biomasse du surnageant. Cette étape pourrait avoir conduit à la perte de composés intracellulaires présentant une activité complémentaire à celle des métabolites extracellulaires, alors que l'effet antimicrobien global résulte souvent d'une synergie entre ces deux fractions (**Barar et al., 2025**).

En second lieu, la faible concentration des métabolites actifs dans le milieu liquide pourrait également expliquer les zones d'inhibition réduites observées. Cette limitation peut être attribuée aux conditions de culture, notamment au type de milieu utilisé, qui influence directement la production, la composition et la nature des métabolites secondaires synthétisés par les actinobactéries (**RIZKY et al., 2025**).

L'extraction des métabolites secondaires à partir du milieu solide a permis d'obtenir des extraits présentant une activité antimicrobienne nettement plus marquée. Les zones d'inhibition

enregistrées étaient significativement plus importantes, atteignant jusqu'à 40 mm selon les isolats testés et micro-organisme ciblé. Le **Tableau 10** montre les résultats du criblage secondaire. Ces résultats indiquent une production accrue et une meilleure concentration des composés bioactifs dans les conditions de culture en milieu solide.

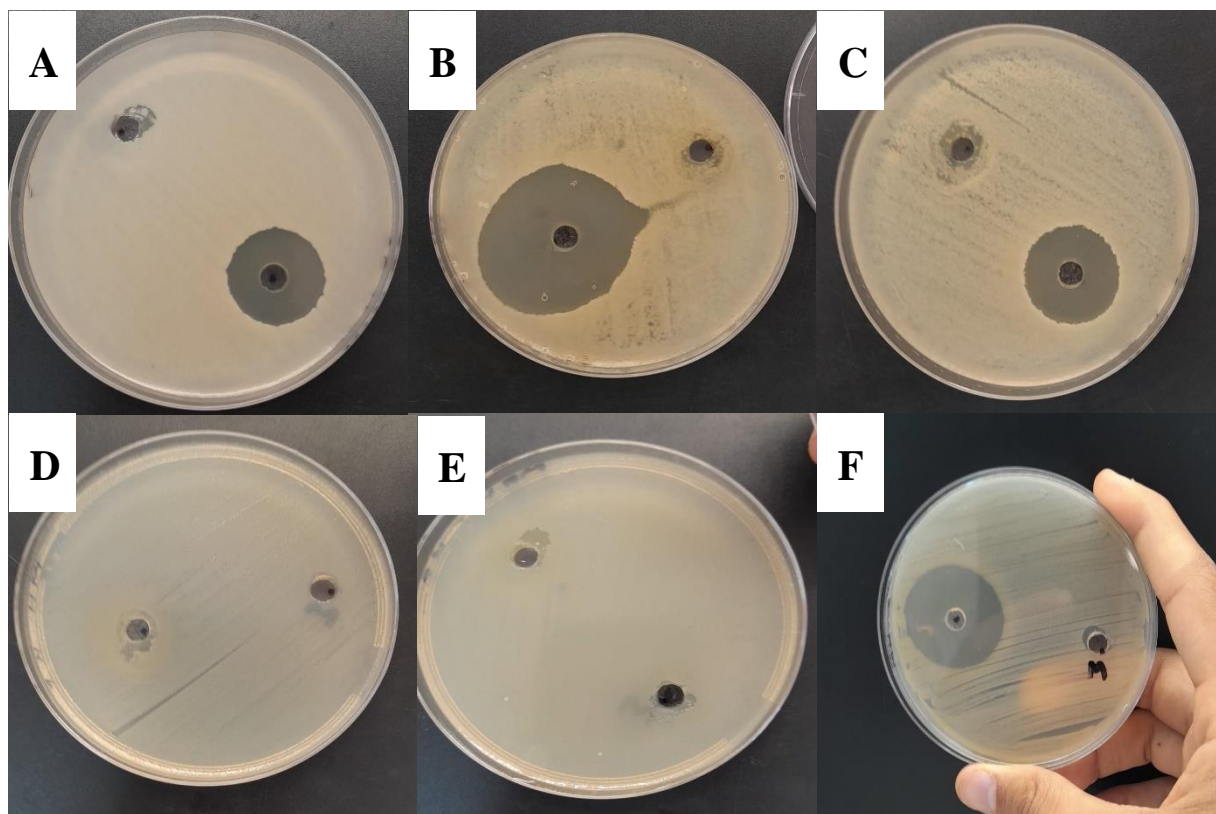


Figure 29 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'extrait en utilisant la méthode de diffusion en puits sur milieu MHA après 24H d'incubation contre :

(A) *Bacillus subtilis* ATCC 6633

(B) *Bacillus cereus* ATCC25921

(C) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

(D) *Escherichia coli* ATCC8739

(E) *Klebsiella pneumoniae* IBMC Strasbourg

(F) *Bacillus cereus* ATCC25921

Ces observations montrent que le milieu solide conduit généralement à des concentrations plus élevées de métabolites antimicrobiens et à une activité biologique plus marquée que celles obtenues en milieu liquide (Waithaka *et al.*, 2019). Cela confirme qu'il s'agit d'une condition favorable pour maximiser la production et l'efficacité des métabolites secondaires d'origine actinobactérienne.

Tableau 10 : Résultats du criblage secondaire des extraits produits par les isolats à l'aide de la méthode de diffusion en puits et méthode de disque

	Les micro-organismes cibles		Zone d'inhibition en (mm)	
			A8	A13
Bactérie Gram-négative	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	25	33
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC25921	25	41
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	27	26
Bactérie Gram-négative	<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IBMC Strasbourg	0	0
Levure	<i>Candida albicans</i>		22	27
Champignon	<i>Phytophthora infestans</i>		24	31
	<i>Rhizoctonia</i>		20	21

Les extraits issus des souches **A8** et **A13** présentent une activité variable selon la nature du micro-organisme cible. Les deux extraits se sont révélés efficaces principalement contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*), avec des zones d'inhibition allant de 25 à 41 mm, tandis qu'aucune activité n'a été observée contre les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*). Cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par la structure particulière de la paroi des bactéries à Gram négatif, dont la membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS) limite la diffusion des composés antimicrobiens (Paracini *et al.*, 2022). En revanche, la paroi plus perméable des bactéries à Gram positif facilite l'action des métabolites produits. Notamment, isolat **A13** a montré une activité plus marquée, suggérant une production plus élevée ou plus puissante de métabolites antibactériens.

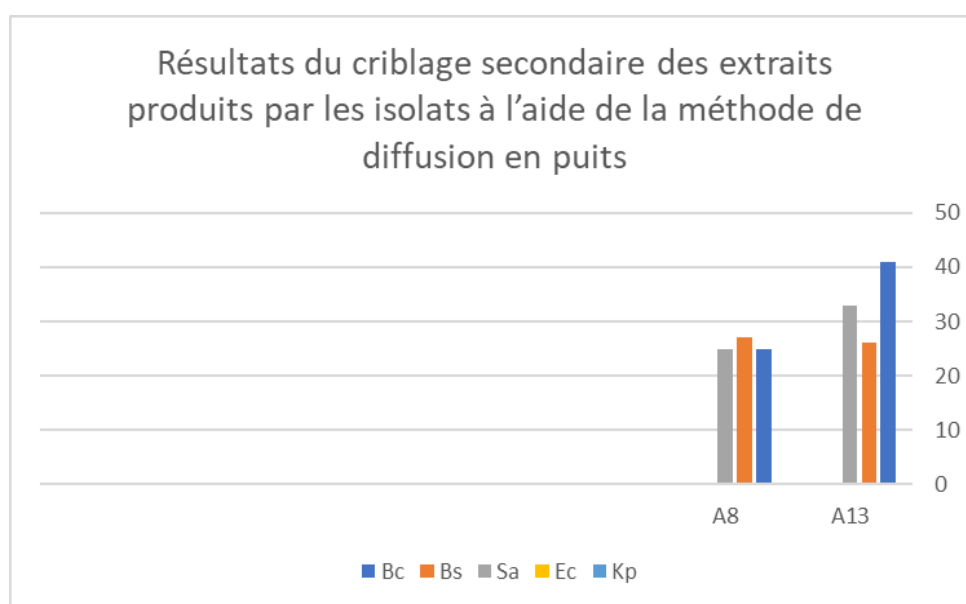


Figure 30 : Résultats du criblage secondaire d'activité antibactérienne d'extrait de l'isolat A8 et A13

L'absence d'activité observée contre les bactéries à Gram négatif pourrait également être liée à leur capacité à développer divers mécanismes de résistance face aux composés antimicrobiens. Ces micro-organismes produisent fréquemment des enzymes capables de dégrader ou de modifier les molécules bioactives (**Ruppé et al., 2015**)

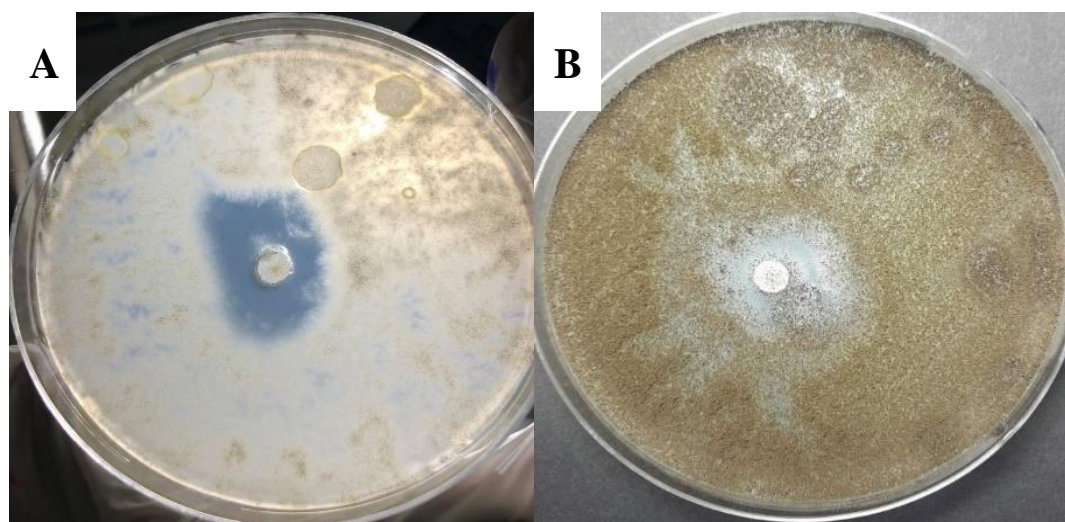


Figure 31 : Criblage secondaire d'extract d'isolat **A13** par la méthode de disque contre
(A) *Phytophthora infestans* (b) *Rhizoctonia*

Actuellement, les antifongiques de nature polyénique utilisés dans le traitement des infections fongiques, notamment des mycoses profondes, ne présentent pas toutes les caractéristiques souhaitées d'un antibiotique idéal. En raison de leur toxicité élevée, leur utilisation demeure limitée, malgré leur intérêt thérapeutique avéré. Ainsi, la recherche de nouveaux antifongiques non toxiques et non polyéniques s'avère essentielle afin de développer des alternatives plus sûres et plus efficaces (**Cavassin et al., 2021**). Dans ce contexte, les extraits issus des souches A8 et A13 ont montré une activité antifongique notable vis-à-vis des champignons testés. En effet, les deux extraits se sont révélés efficaces contre *Candida albicans*, *Phytophthora infestans* et *Rhizoctonia sp.*, avec des zones d'inhibition comprises entre 20 et 31 mm. Ces résultats suggèrent que les métabolites produits par ces souches possèdent des composés bioactifs prometteurs, susceptibles de constituer une nouvelle source d'antifongiques naturels présentant une toxicité réduite. L'efficacité observée, variable selon les espèces fongiques,

pourrait être attribuée à la composition chimique spécifique des extraits ou à la différence de sensibilité des microorganismes cibles. (Singh *et al.*, 2016)

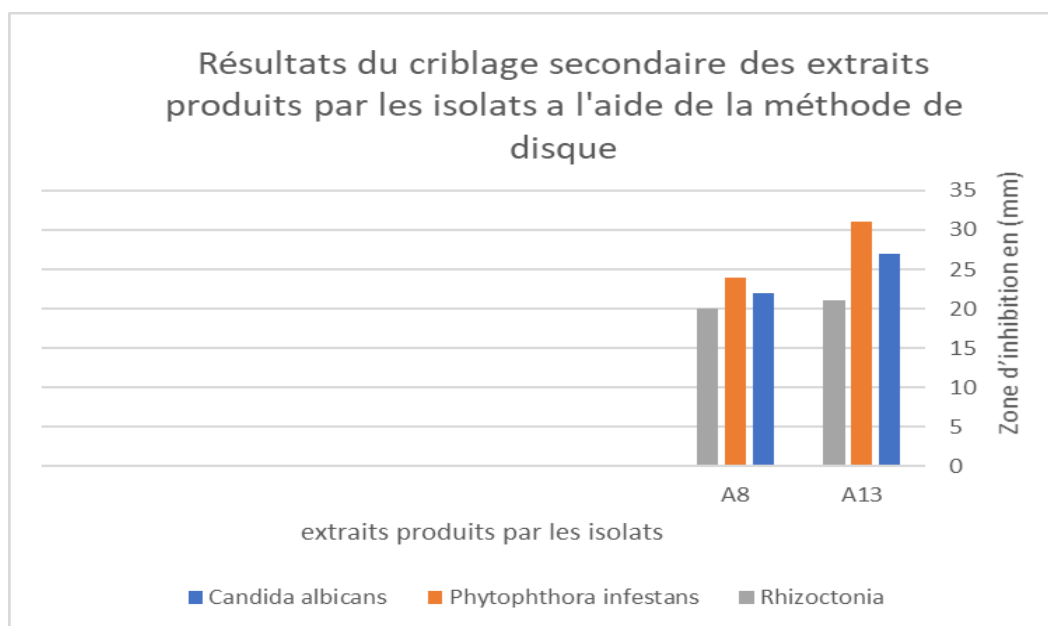


Figure 32 : Résultats du criblage secondaire d'activité antifongique d'extrait de l'isolat A8 et A13

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles sources naturelles de biomolécules à activité antimicrobienne. Dans cette optique, l'étude a porté sur l'isolement et l'évaluation du potentiel antimicrobien d'actinomycètes issus de divers types de sols de l'Ouest algérien, une région reconnue pour sa richesse écologique et sa diversité édaphique.

L'analyse des échantillons prélevés dans quatre zones géographiques distinctes : Djbarat (Saïda), Bougtob (El Bayadh), la rhizosphère d'acacia (Tindouf) et le sol marin de Kristel (Oran) a permis d'obtenir 38 isolats d'actinobactéries présentant des morphologies typiques du genre *Streptomyces*. Ces isolats se distinguent par la présence de mycélium aérien et de substrat, une pigmentation variable, et une croissance adaptée à différents milieux sélectifs, confirmant leur appartenance au groupe des actinomycètes filamenteux.

Le criblage primaire, effectué par la méthode du cylindre d'agar, a mis en évidence la capacité antimicrobienne de sept isolats parmi les 38 testés. Ce résultat témoigne de la spécificité métabolique de certaines souches, dont la biosynthèse de métabolites secondaires est influencée par les conditions environnementales et la composition du sol. Ces sept isolats ont ensuite été sélectionnés pour une fermentation à plus grande échelle en erlenmeyers de 500 mL, permettant la production et l'extraction des métabolites secondaires à partir des fractions liquide et solide.

Les tests de criblage secondaire, réalisés par les méthodes de diffusion sur disque et sur puits, ont permis de mesurer l'efficacité des extraits bruts contre un large spectre de microorganismes de référence. Les résultats ont révélé que deux isolats, désignés A8 et A13, se distinguent par des zones d'inhibition particulièrement importantes, atteignant jusqu'à 41 mm contre *Bacillus cereus* ATCC 25921, 33 mm contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et 27 mm contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

De plus, une activité antifongique marquée a été observée, notamment contre *Phytophthora infestans* (31 mm), *Candida albicans* (27 mm) et *Rhizoctonia* (21 mm). Ces valeurs traduisent un potentiel biosynthétique élevé et

la capacité de ces souches à produire des composés antifongiques et antibactériens efficaces.

Ces observations confirment que les sols algériens, notamment ceux des zones semi-arides et marines, constituent un réservoir microbiologique encore peu exploité mais prometteur pour la découverte de nouvelles molécules bioactives. Les souches A8 et A13, par leur profil antimicrobien élargi, pourraient appartenir à des espèces rares ou nouvelles d'actinomycètes, capables de synthétiser des métabolites d'intérêt pharmaceutique et biotechnologique.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance d'explorer systématiquement les écosystèmes locaux et extrêmes pour enrichir la biodiversité microbienne exploitée en biotechnologie. Ce travail contribue ainsi à la valorisation du patrimoine microbien algérien, tout en apportant une base expérimentale solide pour la recherche de nouveaux agents antimicrobiens naturels.

Perspectives

Le travail réalisé constitue une première étape dans la recherche de nouvelles sources naturelles de biomolécules à activité antimicrobienne. Les résultats obtenus ouvrent plusieurs perspectives de recherche complémentaires qui seront approfondies dans le cadre de la bourse que j'ai obtenue pour poursuivre mes travaux de recherche au Instituto Politécnico de Bragança (IPB) au Portugal:

- Identification moléculaire précise des souches actives (A8 et A13) par séquençage du gène 16S rRNA et analyse phylogénétique, afin de déterminer leur position taxonomique exacte et d'évaluer leur originalité génétique.
- Purification et caractérisation structurale des composés bioactifs par chromatographie (CCM, HPLC, CPG) et spectrométrie (UV, IR, RMN, MS) afin d'élucider leur nature chimique et leur structure moléculaire.
- Évaluation d'autres activités biologiques potentielles des extraits purifiés, notamment les effets antioxydants, cytotoxiques, antitumoraux ou immunomodulateurs, dans une approche multidisciplinaire.
- Exploration du génome et des clusters biosynthétiques responsables de la production de ces métabolites, à travers des approches de génomique et de métabolomique comparatives.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Abdel-Razik, M. A., Azmy, A. F., Dishisha, T., El-Gendy, A. O., Afzan, A., Kamal, N., Tawfike, A., & Sebak, M. (2025). Screening of Red Sea- and Mediterranean Sea-derived Actinomycetes for Antimicrobial and Antitumor activities: LC-ESI-HRMS-based Metabolomics Study. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 136. doi: 10.1186/s12934-025-02759-0
- Adékambi, T., Butler, R. W., Hanrahan, F., Delcher, A. L., Drancourt, M., & Shinnick, T. M. (2011). Core Gene Set As the Basis of Multilocus Sequence Analysis of the Subclass Actinobacteridae. *PLoS ONE*, 6(3), e14792. doi: 10.1371/journal.pone.0014792
- Ahmed, V., Verma, M. K., Gupta, S., Mandhan, V., & Chauhan, N. S. (2018). Metagenomic Profiling of Soil Microbes to Mine Salt Stress Tolerance Genes. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00159
- Aigle, B., Lautru, S., Spiteller, D., Dickschat, J. S., Challis, G. L., Leblond, P., & Pernodet, J.-L. (2014). Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 251–263. doi: 10.1007/s10295-013-1379-y
- Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(8), a021113. doi: 10.1101/cshperspect.a021113
- Al-ghazali, L. H., & Omran, R. (2017). OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR ANTIBACTERIAL METABOLITE PRODUCTION FROM STREPTOMYCES SP. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(9), 381. doi: 10.22159/ajpcr.2017.v10i9.19813
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2(1), 117–134. doi: 10.4056/sigs.531120

- Ayoib, A., Gopinath, S. C. B., Zambry, N. S., & Yahya, A. R. M. (2024). Screening biosurfactant-producing actinomycetes: Identification of *Streptomyces* sp. RP1 as a potent species for bioremediation. *Journal of Basic Microbiology*, 64(4). doi: 10.1002/jobm.202300585

B

- Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., & Jerrine, J. (2020). *Protocols in Actinobacterial Research*. New York, NY: Springer US. doi: 10.1007/978-1-0716-0728-2
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Barar, A., & Bensebia, O. (2025). Optimization of bioactive compounds recovery from thuya solid residues using ultrasound and nonionic surfactants assisted extraction: A response surface methodology study. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 43, 101878. doi: 10.1016/j.scp.2024.101878
- Barbuto Ferraiuolo, S., Cammarota, M., Schiraldi, C., & Restaino, O. F. (2021). Streptomyces as platform for biotechnological production processes of drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2), 551–568. doi: 10.1007/s00253-020-11064-2
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15
- Behera, S., & Das, S. (2023). Potential and prospects of Actinobacteria in the bioremediation of environmental pollutants: Cellular mechanisms and genetic regulations. *Microbiological Research*, 273, 127399. doi: 10.1016/j.micres.2023.127399

- Belt, K., Flematti, G. R., Bohman, B., Chooi, H., Roper, M. M., Dow, L., Truman, A. W., Wilkinson, B., Singh, K. B., & Thatcher, L. F. (2025). Actinobacteria Warfare Against the Plant Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*: 2,4,6-Trimethylpyridine Identified as a Bacterial Derived Volatile With Antifungal Activity. *Microbial Biotechnology*, 18(3). doi: 10.1111/1751-7915.70082
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, 111, 458–467. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.036
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(1–3), 91–97. doi: 10.1016/S1472-9792(02)00089-6
- Budhathoki, S., & Shrestha, A. (2020). Screening of Actinomycetes from Soil for Antibacterial Activity. *Nepal Journal of Biotechnology*, 8(3), 102–110. doi: 10.3126/njb.v8i3.33664

C

- Cavassin, F. B., Baú-Carneiro, J. L., Vilas-Boas, R. R., & Queiroz-Telles, F. (2021). Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infectious Diseases and Therapy*, 10(1), 115–147. doi: 10.1007/s40121-020-00382-7
- Chan, J. Z.-M., Halachev, M. R., Loman, N. J., Constantinidou, C., & Pallen, M. J. (2012). Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiology*, 12(1), 302. doi: 10.1186/1471-2180-12-302
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. doi: 10.1007/s00239-019-09914-3
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., & Lim, Y.-W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(10), 2259–2261. doi: 10.1099/ijs.0.64915-0

- Coico, R. (1997). Gram Staining. *Current Protocols in Immunology*, 23(1). doi: 10.1002/0471142735.ima03os23

D

- de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.014
- De Simeis, D., & Serra, S. (2021). Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production. *Antibiotics*, 10(5), 483. doi: 10.3390/antibiotics10050483
- Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R. A., & Taufan, T. (2022). Streptomyces: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. *Microbiology Research*, 13(3), 418–465. doi: 10.3390/microbiolres13030031
- Du, Y., Kang, F., Huang, Z., Wang, L., Zhang, Y., Li, D., Zheng, G., & Zeng, R. (2025). A comparative study of four color measurement methods for soil color identification and related properties prediction. *Computers and Electronics in Agriculture*, 230, 109801. doi: 10.1016/j.compag.2024.109801
- Duarte, R. T. D., Nóbrega, F., Nakayama, C. R., & Pellizari, V. H. (2012). Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. *International Journal of Astrobiology*, 11(4), 325–333. doi: 10.1017/S1473550412000249
- Dwiyani, A., Retnowati, Y., Sidik, A., Kandowanko, N. Y., & Uno, W. D. (2025). Isolation and Characterisation of Actinomycetes in the Rhizosphere Pandanus amaryllifolius Plants in Gorontalo. *MIKHAYLA: Journal of Advanced Research*, 2(1), 19–28. doi: 10.61579/mikhayla.v2i1.285

F

- Fang, B.-Z., Salam, N., Han, M.-X., Jiao, J.-Y., Cheng, J., Wei, D.-Q., Xiao, M., & Li, W.-J. (2017). Insights on the Effects of Heat

Pretreatment, pH, and Calcium Salts on Isolation of Rare Actinobacteria from Karstic Caves. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01535

- Franco Correa, M., Prada Salcedo, L. D., Ortiz Martinez, L. T., & Ocampo Murillo, V. (2016). Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 32. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.47683

G

- Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, S.-C., & Gramajo, H. (2011). Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(3), 475–497. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00259.x
- Gao, B., Li, G., Gu, D., & Wang, J. (2023). Research progress on GlnR-mediated regulation in Actinomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 14. doi: 10.3389/fmicb.2023.1282523
- GAUTAM, S., VERMA, N., & MISHRA, D. (2025). ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND INDUSTRIAL POTENTIAL OF PROTEASE-PRODUCING FUNGAL STRAINS FROM FRUIT WASTE ECOSYSTEMS. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*, 27(01–02), 88–92. doi: 10.53550/AJMBES.2025.v27i01-02.013
- Georgopapadakou, N. H. (1998). Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, 1(5), 547–557. doi: 10.1016/S1369-5274(98)80087-8
- Goodfellow, M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 33–2028). New York, NY: Springer New York. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4_3
- Guo, A., Ding, L., Tang, Z., Zhao, Z., & Duan, G. (2019). Microbial response to CaCO₃ application in an acid soil in southern China. *Journal of Environmental Sciences*, 79, 321–329. doi: 10.1016/j.jes.2018.12.007
- Gurovic, M. S. V., Müller, S., Domin, N., Seccareccia, I., Nietzsche, S., Martin, K., & Nett, M. (2013). *Micromonospora schwarzwaldensis*

sp. nov., a producer of telomycin, isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_10), 3812–3817. doi: 10.1099/ij.s.0.051623-0

H

- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*.

I

- Islam, M. M., Bhattacharya, R., Sarkar, B., Maiti, P. K., Mahanty, S., Chaudhuri, P., Biswas, S. R., & Mandal, S. (2022). Different soil salinity imparts clear alteration in rhizospheric bacterial community dynamics in rice and peanut. *Archives of Microbiology*, 204(1), 36. doi: 10.1007/s00203-021-02695-8

J

- Jensen, P. R., Dwight, R., & Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1102–1108. doi: 10.1128/aem.57.4.1102-1108.1991

K

- Kieser, K. J., & Rubin, E. J. (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology*, 12(8), 550–562. doi: 10.1038/nrmicro3299
- Kim, S. B., & Goodfellow, M. (2002). *Streptomyces avermitilis* sp. nov., nom. rev., a taxonomic home for the avermectin-producing streptomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2011–2014. doi: 10.1099/00207713-52-6-2011
- Koech, S. C., Plechatá, M., Pathom-aree, W., Kamenik, Z., & Jaisi, A. (2025). Strategies for Actinobacteria Isolation, Cultivation, and Metabolite Production that Are Biologically Important. *ACS Omega*, 10(16), 15923–15934. doi: 10.1021/acsomega.5c01344
- KÜSTER, E., & WILLIAMS, S. T. (1964). Selection of Media for Isolation of Streptomycetes. *Nature*, 202(4935), 928–929. doi: 10.1038/202928a0

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(1), 235–254. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095748
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016a). Morphological Identification of *Actinobacteria*. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech. doi: 10.5772/61461
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016b). Morphological Identification of *Actinobacteria*. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech. doi: 10.5772/61461
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016c). Morphological Identification of *Actinobacteria*. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech. doi: 10.5772/61461
- Liu, J., Hua, Z.-S., Chen, L.-X., Kuang, J.-L., Li, S.-J., Shu, W.-S., & Huang, L.-N. (2014). Correlating Microbial Diversity Patterns with Geochemistry in an Extreme and Heterogeneous Environment of Mine Tailings. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), 3677–3686. doi: 10.1128/AEM.00294-14
- Loffredo, M. R., Savini, F., Bobone, S., Casciaro, B., Franzyk, H., Mangoni, M. L., & Stella, L. (2020). *Inoculum effect of antimicrobial peptides*. doi: 10.1101/2020.08.21.260620

M

-
- Meddour, R., Sahar, O., & Médail, F. (2021). Checklist of the native tree flora of Algeria: diversity, distribution, and conservation. *Plant Ecology and Evolution*, 154(3), 405–418. doi: 10.5091/plecevo.2021.1868
 - Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I., & Abdelwouhid, D.-E. (2015). Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6), 438–445. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.04.002
-

-
- Mitousis, L., Musiol-Kroll, E., & Wohlleben, W. (2025). CRISPR-Cas in actinomycetes: still a lot to be discovered. *MicroLife*, 6. doi: 10.1093/femsml/uqaf010
 - Moore, S. A., Ronimus, R. S., Roberson, R. S., & Morgan, H. W. (2002). The Structure of a Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase from the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Structure*, 10(5), 659–671. doi: 10.1016/S0969-2126(02)00760-8
 - Mosley, L. M., Rengasamy, P., & Fitzpatrick, R. (2024). Soil <sep>pH</sep>: Techniques, challenges and insights from a global dataset. *European Journal of Soil Science*, 75(6). doi: 10.1111/ejss.70021
 - Mukhtar, S., Zaheer, A., Aiysha, D., Abdulla Malik, K., & Mehnaz, S. (2017). Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 10(12). doi: 10.4172/jpb.1000456

N

-
- Ngamcharungchit, C., Chaimusik, N., Panbangred, W., Euanorasetr, J., & Intra, B. (2023). Bioactive Metabolites from Terrestrial and Marine Actinomycetes. *Molecules*, 28(15), 5915. doi: 10.3390/molecules28155915
 - Nonthakaew, N., Panbangred, W., Songnuan, W., & Intra, B. (2022). Plant growth-promoting properties of *Streptomyces* spp. isolates and their impact on mung bean plantlets' rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.967415

P

-
- Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2019). Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00294
 - Paracini, N., Schneck, E., Imberty, A., & Micciulla, S. (2022). Lipopolysaccharides at Solid and Liquid Interfaces: Models for Biophysical Studies of the Gram-negative Bacterial Outer Membrane.
-

Advances in Colloid and Interface Science, 301, 102603. doi: 10.1016/j.cis.2022.102603

- Pongtharankul, T., & Demirci, A. (2004). Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(3). doi: 10.1007/s00253-004-1579-5
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., & 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

Q

- Qureshi, K. A., Bholay, A. D., Rai, P. K., Mohammed, H. A., Khan, R. A., Azam, F., Jaremko, M., Emwas, A.-H., Stefanowicz, P., Waliczek, M., Kijewska, M., Ragab, E. A., Rehan, M., Elhassan, G. O., Anwar, M. J., & Prajapati, D. K. (2021). Isolation, characterization, anti-MRSA evaluation, and in-silico multi-target anti-microbial validations of actinomycin X2 and actinomycin D produced by novel *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ_23. *Scientific Reports*, 11(1), 14539. doi: 10.1038/s41598-021-93285-7

R

- Rakhmawatie, M. D., Mustofa, M., Lisdiyanti, P., Wibawa, T., Ratnaningrum, K., Umam, M. M. C., Alfi, M. H., & Chariri, L. (2024). Antimicrobial compounds from intracellular and extracellular secondary metabolites of Actinobacteria InaCC A759. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 29(4), 221. doi: 10.22146/ijbiotech.82376
- Ramasamy, D., Mishra, A. K., Lagier, J.-C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., Raoult, D., & Fournier, P.-E. (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_2), 384–391. doi: 10.1099/ijs.0.057091-0
- Ramasamy, V., & Sudalaimuthu, R. S. S. (2022). *Chemotaxonomical Characterization of Actinobacteria* (pp. 181–186). doi: 10.1007/978-1-0716-1728-1_26

- Ranjani, A., Dhanasekaran, D., & Gopinath, P. M. (2016). An Introduction to Actinobacteria. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech. doi: 10.5772/62329
- Raveh, A., Delekta, P. C., Dobry, C. J., Peng, W., Schultz, P. J., Blakely, P. K., Tai, A. W., Matainaho, T., Irani, D. N., Sherman, D. H., & Miller, D. J. (2013). Discovery of Potent Broad Spectrum Antivirals Derived from Marine Actinobacteria. *PLoS ONE*, 8(12), e82318. doi: 10.1371/journal.pone.0082318
- Redenbach, M., Scheel, J., & Schmidt, U. (2000). Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(3–4), 227–235. doi: 10.1023/A:1010289326752
- Ribeiro, E. C., Araújo, E. K. N., Penha, M. S. C., Nascimento, A. S. do, da Silva, D. F., & Miranda, R. de C. M. de. (2025). Optimisation of Potato Dextrose Agar Culture Medium for Actinobacteria Growth. *Microorganisms*, 13(3), 654. doi: 10.3390/microorganisms13030654
- Ribeiro, M. G., Salerno, T., Mattos-Guaraldi, A. L. de, Camello, T. C. F., Langoni, H., Siqueira, A. K., Paes, A. C., Fernandes, M. C., & Lara, G. H. B. (2008). Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(3), 177–185. doi: 10.1590/S0036-46652008005000004
- RIZKY, R., NOFIANI, R., RUDIYANSYAH, R., PUTRI, C. D., SETIAWAN, A., WIBOWO, D. S., & SETIYONINGRUM, F. (2025). Effects of different media and solvents on biological activities and secondary metabolites profiles of a coral-derived *Streptomyces* sp. RC4. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 26(2). doi: 10.13057/biodiv/d260222
- Ruppé, É., Woerther, P.-L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care*, 5(1), 21. doi: 10.1186/s13613-015-0061-0

S

- Sayed, A. M., Hassan, M. H. A., Alhadrami, H. A., Hassan, H. M., Goodfellow, M., & Rateb, M. E. (2020). Extreme environments:

microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3), 630–657. doi: 10.1111/jam.14386

- Schneider, Y. K., Hagestad, O. C., Li, C., Hansen, E. H., & Andersen, J. H. (2022). Selective isolation of Arctic marine actinobacteria and a down-scaled fermentation and extraction strategy for identifying bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.1005625
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021a). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 72. doi: 10.1186/s43141-021-00156-9
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021b). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 72. doi: 10.1186/s43141-021-00156-9
- Ser, H.-L., Palanisamy, U. D., Yin, W.-F., Abd Malek, S. N., Chan, K.-G., Goh, B.-H., & Lee, L.-H. (2015). Presence of antioxidative agent, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00854
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340. doi: 10.1099/00207713-16-3-313
- Singh, V., Haque, S., Singh, H., Verma, J., Vibha, K., Singh, R., Jawed, A., & Tripathi, C. K. M. (2016). Isolation, Screening, and Identification of Novel Isolates of Actinomycetes from India for Antimicrobial Applications. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01921
- Smaoui, S., Ennouri, K., Chakchouk-Mtibaa, A., Sellem, I., Bouchaala, K., Karray-Rebai, I., Ben Ayed, R., Mathieu, F., & Mellouli, L. (2018). Modeling-based optimization approaches for the development of Anti- *Agrobacterium tumefaciens* activity using *Streptomyces* sp TN71. *Microbial Pathogenesis*, 119, 19–27. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.006

- Suzuki, S. I. , Y. K. , O. T. , N. M. , N. N. , & K. S. (2000). Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. *Actinomycetologica*, 14(2), 27-33.

T

- Tang, Q., Li, Z., Chen, N., Luo, X., & Zhao, Q. (2025). Natural pigments derived from plants and microorganisms: classification, biosynthesis, and applications. *Plant Biotechnology Journal*, 23(2), 592–614. doi: 10.1111/pbi.14522
- Teklemichael, A. A., Teshima, A., Hirata, A., Akimoto, M., Taniguchi, M., Khodakaramian, G., Fujimura, T., Tokumasu, F., Arakawa, K., & Mizukami, S. (2024). Discovery of antimalarial drugs from secondary metabolites in actinomycetes culture library. *Tropical Medicine and Health*, 52(1), 47. doi: 10.1186/s41182-024-00608-1
- Tiwari, D., Shouche, S., Bhati, P., & Das, P. (2021). A Consolidated Method for Selective Isolation of Actinomycetes Based on Choice of Substrate. *International Annals of Science*, 11(1), 10–21. doi: 10.21467/ias.11.1.10-21

V

- Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O., Nirmala, P., Vinoth, K. P., & Reena, A. (2012). Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 469–473. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60078-1
- Verma, M., Lal, D., Kaur, J., Saxena, A., Kaur, J., Anand, S., & Lal, R. (2013). Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. *Research in Microbiology*, 164(7), 718–728. doi: 10.1016/j.resmic.2013.04.002
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 952. doi: 10.3390/ijms19040952

W

- Waithaka, P. N., Wagacha, J. M., Mwaura, F. B., Gathuru, E. M., & Githaiga, B. M. (2019). Purification and cytotoxic assays of four

antimicrobial metabolites extracted from Actinomycetes of the soils of Menengai Crater, Kenya. *Novel Research in Microbiology Journal*, 3(3), 351–365. doi: 10.21608/nrmj.2019.37208

- Wan, W., Tan, J., Wang, Y., Qin, Y., He, H., Wu, H., Zuo, W., & He, D. (2020). Responses of the rhizosphere bacterial community in acidic crop soil to pH: Changes in diversity, composition, interaction, and function. *Science of The Total Environment*, 700, 134418. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134418
- Wang, C., Zhou, X., Guo, D., Zhao, J., Yan, L., Feng, G., Gao, Q., Yu, H., & Zhao, L. (2019). Soil pH is the primary factor driving the distribution and function of microorganisms in farmland soils in northeastern China. *Annals of Microbiology*, 69(13), 1461–1473. doi: 10.1007/s13213-019-01529-9
- Wink Joachim. (2017). *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (J. Wink, F. Mohammadipanah, & J. Hamed, Eds.). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-60339-1

X

- Xie, F., Pei, S., Lin, X., Tian, Y., & Zhang, G. (2021). A rapid and efficient method for the extraction and identification of menaquinones from Actinomycetes in wet biomass. *BMC Microbiology*, 21(1), 175. doi: 10.1186/s12866-021-02240-z
- Xu, D., Han, L., Li, C., Cao, Q., Zhu, D., Barrett, N. H., Harmody, D., Chen, J., Zhu, H., McCarthy, P. J., Sun, X., & Wang, G. (2018). Bioprospecting Deep-Sea Actinobacteria for Novel Anti-infective Natural Products. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00787

Y

- Yadav, R. P., Huo, C., Budhathoki, R., Budthapa, P., Bhattarai, B. R., Rana, M., Kim, K. H., & Parajuli, N. (2024). Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Effects of Endophytic Streptomyces Species Isolated from the Himalayan Regions of Nepal and Their Metabolite Study. *Biomedicines*, 12(10), 2192. doi: 10.3390/biomedicines12102192

- Yan, X., Dong, Y., Gu, Y., & Cui, H. (2024). Effect of Precursors and Their Regulators on the Biosynthesis of Antibiotics in Actinomycetes. *Molecules*, 29(5), 1132. doi: 10.3390/molecules29051132

Z

- Zakari, D. A., Kareem, S. O., Obuotor, T. M., Akinloye, O. A., Bello K.E., Adefila, A. M., & Audu, A. G. (2025). Thermal Optimization, pH Sensitivity, Growth Dynamics and Bioactivity of Streptomyces Isolates from soil samples in Anyigba, Kogi state. *Nigerian Journal of Pure and Applied Sciences*, 5236–5248. doi: 10.48198/NJPAS/25.A09
- Zenova, G. M., Manucharova, N. A., & Zvyagintsev, D. G. (2011). Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Science*, 44(4), 417–436. doi: 10.1134/S1064229311040132
- Zhang, H., Chen, Y., Li, Y., Song, Y., Ma, J., & Ju, J. (2022). Secondary Metabolites and Biosynthetic Gene Clusters Analysis of Deep-Sea Hydrothermal Vent-Derived Streptomyces sp. SCSIO ZS0520. *Marine Drugs*, 20(6), 393. doi: 10.3390/md20060393

PARTIE VII. ANNEXES

VII.1. Milieux de cultures

VII.1.1. Composition de milieu de culture

VII.1.1.1. Milieux d'identification des actinobacteries

Milieu GYM – Yeast – Malt extract Agar

Glucose : 4,0 g

Extrait de levure : 4,0 g

Extrait de malt : 10,0 g

CaCO₃ : 2,0 g

Agar : 20,0 g

Eau distillée : 1000 ml

Ajuster le pH à 7,2 avant l'ajout de l'agar

Milieu SCA – Starch Casein Agar

Amidon soluble : 10,0 g

Caséine (hydrolysate) : 0,3 g

NaCl : 2,0 g

KNO₃ : 2,0 g

K₂HPO₄ : 2,0 g

MgSO₄·7H₂O : 0,05 g

CaCO₃ : 0,02 g

FeSO₄·7H₂O : 0,01 g

Agar : 20,0 g

Eau distillée : 1000 ml

Ajuster le pH à 7,0 avant stérilisation.

ISP2 – International Streptomyces Project

Glucose : 4 g

Extrait de levure : 4 g

Ajuster le pH à 7,2 avant stérilisation.

Extrait de malt : 10 g

Agar : 20 g.

Eau distillée : 1000 ml

Eau physiologique :

NaCl..... 9g

Eau distillée..... 1000 ml

Autoclavage 20 min à 120 °C

VII.1.1.2. Milieux utilisés pour l'activité antimicrobienne

Milieu Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf : 300,0 ml,

Peptone de caséine : 17,5 g

amidon: 1,5 g

Agar :17,0g

pH : 7,4

Milieu Sabouraud

Peptone:10g;

Glucose : 40g ;

Agar : 15g

Eau distillée : 1000ml

VII.1.1.3. Milieux De Production d'antibiotiques

Milieu 5294

Composition (g/l).

Starch (soluble): 10,0

Yeast extract: 2,0

Glucose :10,0

Glycerol: 10,0

Corn steep liquor: 2,5

Peptone: 2,0

NaCl : 1,0.

Milieu ISP2

Glucose: 4 g

Extrait de levure: 4 g;

Extrait de malt: 10 g

Eau distillée: 1000ml

pH : 7, 2

VII.1.1.4. Milieu Pour Les Champignons

Milieu PDA

Filtrat de pomme de terre: 500 ml

glucose: 20 g

agar: 20 g

Eau distillée: 500 ml.

pH : 5,6.

Le filtrat est préparé en mettant à bouillir 200 à 250 g de pomme de terre épluchée dans 500 ml d'eau distillée.

Milieu Sabouraud

Peptone:10g

Glucose : 40g

Agar : 15g

Eau distillée : 1000ml

VII.1.2. Les colorants de coloration de gram :

Lugol :

Iode : 1g ; Iode de potassium : 2g ; Eau distillée : 300 ml.

Violet de gentian:

Violet de gentiane : 1g ; Ethanol à 90 : 10g Violet de gentian : 1g

Fuchsine:

Fuchsine basique : 02g ; Acide phénique : 10g ; Alcool absolu : 20ml.

Phénol : 2g

Eau distillée

VII.2. .Mesure du Ph

Echantillon	Site de prélèvement	Type de sol	pH
SB	Bougtob, Elbayadh	Sol de sebkha	6.06
RZ	Djebarat, Saïda	Sol rhizosphérique	6
SMk	Kristal, Oran	Sol de Sédiments	7.88
TA	Tindouf	Sol rhizosphérique	5.33

VII.3. Nombre des isolats par apport le type d'échantillon de sol

Echantillon	Site de prélèvement	Type de sol	Nombre d'isolats
SB	Bougtob, Elbayadh	Sol de sebkha	4
RZ	Djebarat, Saïda	Sol rhizosphérique	16
SMk	Kristal, Oran	Sol de Sédiments	2
TA	Tindouf	Sol rhizosphérique	16

VII.4. Résultats du criblage primaire de l'activité antimicrobienne

Les micro-organismes cibles			Zone d'inhibition en mm						
			A13	A7	A9	A8	A15	A12	A6
Bactérie Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	20	10	10	20	15	13	12
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC25921	17	10	10	17	15	11	8
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	17.5	10	9	22.5	17	12	7
Bactérie Gram-négative	<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IBMC Strasbourg	0	0	0	0	0	0	0

VII.5. Résultats du criblage secondaire de l'activité antimicrobienne

Les micro-organismes cibles			Zone d'inhibition en (mm)	
			A8	A13
Bactérie Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	25	33
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC25921	25	41
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	27	26
Bactérie Gram-négative	<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IBMC Strasbourg	0	0
Levure	<i>Candida albicans</i>		22	27
Champignon	<i>Phytophthora infestans</i>		24	31
	<i>Rhizoctonia</i>		20	21