



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ de TLEMCEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers  
(SNV/STU)

**Département de Biologie**

**MEMOIRE**

Présenté par

**AMARA Manel et BOUSMAHA Nabila**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de MASTER**

**En Microbiologie Fondamentale**

**Thème**

**Isolement des bactéries actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes  
à partir de la grotte de Ghorf El Mit (Beni Mathar – Tagma)**

Soutenu le : **23/06/2024**, devant le jury composé de :

Présidente : M <sup>me</sup> AYAD Amel	M.C.A	Université de Tlemcen
Encadrant : M. BELYAGOUBI Larbi	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice : M <sup>me</sup> .BOUBLENZ A Nesrine	M.A.B	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2023/2024**

## Remerciement

*Avant tout, nous tenons à remercier «Dieu» qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier notre encadreur Monsieur **BELYAGOUBI Larbi** professeur à l'Université Aboubekr Belkaid - Tlemcen, qui nous a pris en charge durant cette période, dont le mérite lui revient grâce à son aide à la fois matérielle et morale, ses conseils précieux et sa gratitude.*

*Nos remerciements vont aussi à Madame **AYAD Amel** pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, et aussi d'avoir mis à notre disposition les souches bactériennes de référence.*

*Nous aimerons également adresser nos remerciements à Madame **BOUBLENZA Nesrine**, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Nous sommes honorées par sa participation au jury de cette mémoire.*

*Nous remercions, les membres de la société **Basmat Amal**, Ain Fezza pour les efforts qu'ils nous ont apportés et aussi pour leur aide durant l'échantillonnage.*

## Dédicace

*Je remercie **Dieu** de m'avoir béni avec l'achèvement de cette recherche et de m'avoir accordé la réussite tout au long de mon parcours académique et dans ma vie également.*

*J'adresse mes sincères remerciements et mon appréciation à **ma mère** et à **mon père**, la prunelle de mes yeux, pour m'avoir élevé, m'avoir protégé et m'avoir offert une vie heureuse depuis mon enfance, et pour leur soutien constant. Je vous aime beaucoup.*

*A mes frères **Yacine, Slaheddin et Réda***

*Aussi une dédicace particulière à ma tante bien-aimée **Belhadj Wahiba** pour m'avoir toujours soutenu. Vous êtes le meilleur exemple de femme qui réussit.*

*A ma famille, mes proches et à ceux qui m'apportent du bonheur*

*A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé **Nabila, Fatima, Meriem et Romaiissa** .Et à qui je souhaite encore plus de succès*

*A tous ceux que j'aime*

**Manel**

## Dédicace

*Je souhaite dédier ce modeste travail à...*

*Mes chers **parents**, que je les remercie énormément pour leurs sacrifices, leurs encouragements durant toutes ces années ; Que ALLAH les gardes pour moi.*

*A Ma petite sœurs **Nihel**, que dieu te bénisse, je te souhaite que de la réussite dans ta vie.*

*Les petits enfants **Luqman – Amir et meriem –Wail – Yasmin –Amira –Maria et wissel – Razane– Racim – Yacine-Rayane***

*Mes oncles, mes tantes et mes cousines et toute la famille **Bousmaha et Chekkaf***

*Tonton **Youcef** et mon oncle **Mohammed**, qui nous ont quitté a jamais.  
ALLAH le tout puissant leurs accueillir dans leurs vaste paradis*

*Mes amies qui m'ont toujours encouragé, **Manel – Abdessamed** et tous ma promotion microbiologie fondamentale.*

*Nabila*

## ملخص

إن التطور المستمر لمقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية وظهور أمراض معدية جديدة يفسران الحاجة الملحة لإيجاد جزيئات جديدة مناسبة مضادة للميكروبات. إن الاستخدام غير المسؤول للمضادات الحيوية يزيد بشكل كبير من مقاومة الميكروبات، ومن ناحية أخرى، ارتفع معدل الوفيات المرتبطة بالعدوى. وبهذه الطريقة، من الضروري البحث عن مركبات جديدة ذات تركيبات كيميائية أمر بالغ الأهمية.

تحتوي النظم البيئية الجزائرية على تنوع رائع من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن تشكل مصدرا قيما للجزيئات المضادة للميكروبات ذات التنوع الكبير.

الهدف من هذه الدراسة يندرج في إطار البحث عن الفطريات الشعاعية التي تنتج جزيئات نشطة بيولوجيا تم تحديدها فيعينات التربة من مغارة غرفالميط الواقعة بتاغما بولاية تلمسان.

تم إجراء العزل الانتقائي للفطريات الشعاعية باستخدام طريقة التخفيف. تعد وسائط<sup>2</sup>ISP وBennett أكثر ملائمة لعزل الفطريات الشعاعية. تم عزل 9 سلالات من وسط<sup>2</sup>ISP وتم عزل 4 سلالات شعاعيات من وسطBenett. يتم إجراء فحصالنشاط المضاد للميكروبات من خلال طريقتين لنشر الأجار (طريقة أسطوانة الأجار وطريقة البئر)

يتم إجراء تقييم النشاط المضاد للميكروبات ضد البكتيريا المسببة للأمراض التالية: *Escherichia coli*, *Klebsella pneumonia*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, بالإضافة إلى خميرة *Candida albicans* التي تنمو في مناطق التثبيط بين 08 و 13 ملم. حيث أن السلالة الأكثر حساسية 49 ضد *Candida albicans* وضد *Escherichia coli* بمناطق التثبيط تتراوح بين 11 و 13 ملم .

أظهرت ثلاث من أصل 18 سلالة شعاعية معزولة نشاطاً مضاداً للميكروبات سلالات (A6-A9-A31) .

وفقا لاختبارات التعريف الهوية التي أجريت والملاحظة المجهرية، ومنالمحتملتنتمي السلالات الى جنس *streptomyces*.

تعد الأكتينومييسينات مصدرًا رائعًا لجزيئات مضادة للميكروبات شديدة التنوع. تعد النظم البيئية الجزائرية موطننا لمجموعة متنوعة مثيرة للاهتمام من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن يكون لها أنشطة بيولوجية .

**الكلمات المفتاحية:** كهف غرف الميط; تراب; الشعاعيات; أنشطة مضادات للميكروبات .

## Résumé

L'évolution constante de la résistance des microbes aux antibiotiques et l'apparition de nouvelles maladies infectieuses expliquent l'urgence de trouver des nouvelles molécules antimicrobiennes adéquates. L'usage irresponsable des antibiotiques accroît considérablement la résistance des microbes. En revanche, le taux de décès lié aux infections a augmenté. De cette manière, il est primordial de chercher de nouveaux composés présentant des structures chimiques.

Les écosystèmes algériens renferment une diversité fascinante de microorganismes qui peuvent constituer une source précieuse de molécules antimicrobiennes d'une grande diversité.

L'objectif de cette étude s'inscrit dans le contexte de la recherche des actinomycètes qui produisent des molécules bioactives à partir des échantillons de sol de la grotte de **Ghorf El Mit**, située à la région de Tagma dans la wilaya de Tlemcen.

Des isollements sélectifs des actinomycètes ont été effectués, en utilisant la méthode de suspension dilution. Les milieux ISP<sub>2</sub> et Bennett conviennent mieux à l'isolation des actinomycètes (9 souches ont été isolées à partir du milieu ISP<sub>2</sub> et 4 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir du milieu Bennett)

Le screening de l'activité antimicrobienne est effectué par deux méthodes de diffusion sur gélose (méthode de cylindre d'agar et méthode des puits).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée vis-à-vis des bactéries pathogènes suivantes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'une levure *Candida albicans*.

Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 08 et 13 mm, où la souche la plus sensible est A9 (19) contre *C.albicans* avec une zone d'inhibition comprise entre 12 et 13 mm et contre *E.coli* avec des zones d'inhibition mesurant entre 11 et 13 mm.

Trois souches actinomycétales sur 18 isolats sont présentés une activité antimicrobienne : les souches A6(18) -A9(19)- A31(2)

Selon les tests d'identifications effectués et l'observation microscopique, les souches appartiennent probablement au genre *Streptomyces* qui sont des bactéries filamenteuses Gram positif saprophytes et non pathogènes, sont principalement présentes dans les couches superficielles des sols, se développent et se dispersent grâce à leur croissance mycélienne et leur capacité de sporulation.

Les actinomycètes sont une source prodigieuse de molécules antimicrobiennes d'une grande diversité. Les écosystèmes algériens abritent une variété intéressante de microorganismes qui peuvent avoir des activités biologiques.

**Mots clés:** Grotte Ghorf El Mit; Sol; Actinomycètes; Activité antimicrobienne.

## Abstract

The constant evolution of the resistance of microbes to antibiotics and the appearance of new infectious diseases explain the urgency of finding new suitable antimicrobial molecules. The irresponsible use of antibiotics considerably increases the resistance of microbes. On the other hand, the death rate linked to infections has increased. In this way, it is essential to search for new compounds with chemical structures .

Algerian ecosystems contain a fascinating diversity of microorganisms which can constitute a valuable source of antimicrobial molecules of great diversity

The objective of this study falls within the context of the research of actinomycetes which produce bioactive molecules are identified in soil samples from the Ghorf El Mit cave, located in Tagma in the wilaya of Tlemcen

Selective isolations of Actinomycetes were carried out after soil sampling, using the dilution method. ISP2 and Bennett media are more suitable for the isolation of actinomycetes (9 strains were isolated from ISP<sub>2</sub> medium and 4 actinomycetes strains were isolated from Bennett medium).

The screening of antimicrobial activity is carried out by two agar diffusion methods (agar cylinder method and well method).

The evaluation of the antimicrobial activity test is carried out against the following pathogenic bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, as well as a yeast *Candida albicans*. Or the diameters of the inhibition zones vary between 08 and 13 mm.

The diameters of the inhibition zones vary between 08 and 13 mm, where the most sensitive strain is A9(19) against *C. albicans* with an inhibition zone between 12 and 13 mm and against *E. coli* with inhibition zones measuring between 11 and 13 mm.

Three out of 18 actinomycetals trains were isolated showed antimicrobial activity trains A6 (18)-A9 (19)-A31 (2).

According to the identification tests carried out and microscopic observation the strains are probably those of the *streptomyces* genera.

Actinomycetes are a prodigious source of antimicrobial molecules of a great diversity. Algerian ecosystems are home to an interesting variety of microorganisms that can have biological activities.

**Keywords:** , Cave ghorf El Mit; Soil; Actinomycetes; Antimicrobial activity.

## Table des matières

<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>I</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>II</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>III</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	<b>3</b>
<b>Les grottes</b> .....	<b>5</b>
1- Généralité .....	5
2- Ecologie microbienne des grottes .....	7
3- Les types des grottes .....	8
<b>Les actinomycètes</b> .....	<b>12</b>
1- Introduction .....	12
2- Historique .....	13
3- Diversité des actinomycètes des grottes.....	14
4- Nature et habitat.....	14
5- Caractère morphologique .....	15
6- Cycle de vie .....	16
7- Ecologie et distribution des actinomycètes .....	17
8- Classification et taxonomie des actinomycètes .....	18
8.1.genre <i>streptomyces</i> .....	20
9- Métabolisme des actinomycètes .....	20
9.1. Métabolisme primaire .....	20
9.2. Métabolisme secondaire .....	21
10- Les substances bioactives produites par les actinomycètes .....	21
10.1. Production des antibiotiques.....	21
10.2. Production des enzymes .....	22
10.3. Production des vitamines .....	23
<b>Les microorganismes pathogènes</b> .....	<b>26</b>
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
3. <i>Escherichia coli</i> .....	27
4. <i>Bacillus subtilis</i> .....	28
5. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	29

6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29
7. <i>Candida albicans</i> .....	30
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>32</b>
1- Lieu d'étude .....	32
2- Prélèvement et échantillonnage.....	34
3- pH du sol.....	34
4- Prétraitement des échantillons .....	35
5- Isolement et purification des actinomycètes .....	35
5.1. L'isolement des actinomycètes .....	35
5.2. Préparation des dilutions décimales.....	36
5.3. Ensemencement et incubation .....	36
5.4. Purification des actinomycètes .....	36
6- Conservation des actinomycètes .....	37
7- Criblage primaire de l'activité antimicrobienne .....	37
7.1. Les souches pathogènes testées .....	37
7.2-.Test d'activité antimicrobienne .....	38
7.2.1. Méthode de cylindre d'agar .....	38
7.2.2- Méthode des puits.....	39
8- Criblage secondaire de l'activité antimicrobienne .....	40
8.1. Criblage des antifongiques non polyéniques.....	40
9- Identification de souches actinomycétales actives .....	41
9.1. Critères morphologiques .....	41
9.2. Macromorphologie et caractères cultureux .....	41
9.3 -Etude micro morphologique .....	42
10- Critères physiologiques et biochimiques .....	42
10.1. Critères physiologiques.....	42
10.1.1. Hydrolyse de la gélatine .....	42
10.1.2 .Action sur le lait écrémé.....	43
10.2 .Critères biochimiques .....	43
10.2.1. Utilisation du citrate comme seule source de carbone .....	43
10.2.2 .Recherche de catalase .....	44
10.2.3. Recherche d'oxydase .....	44
<b>Résultats et discussion</b> .....	<b>46</b>
1- pH du sol .....	46

2- Prétraitement du sol .....	46
3- Résultats d'isolement des actinomycètes. ....	47
4- Origine des souches actinomycétales .....	52
5- Résultat de l'activité antimicrobienne .....	53
5.1. Méthode de cylindre d'agar .....	54
5.2. Méthode des puits .....	58
5.3. La sensibilité des souches pathogènes aux antibiotiques .....	58
6- Résultat d'inhibition de l'activité par ergostérol.....	59
7- Résultats d'identification des souches d'actinomycètes.....	61
7.1. Résultat de l'étude macromorphologique .....	61
7.2. Résultat de l'étude microscopique .....	63
7.3. Résultats des critères physiologiques et biochimiques .....	64
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>66</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>69</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>83</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Distribution des actinomycètes dans la nature .....	18
<b>Tableau 2:</b> Liste des dérivés naturels produits par des Actinobacteria .....	21
<b>Tableau 3:</b> Liste des enzymes industriellement viables provenant des actinomycètes Et leurs caractéristiques .....	23
<b>Tableau 4 :</b> Situation géographique de la station d'échantillonnage.....	32
<b>Tableau 5:</b> les souches utilisées dans les différents tests d'activité Antimicrobienne.....	37
<b>Tableau 6 :</b> Le pH de l'échantillon du sol .....	46
<b>Tableau 7 :</b> Origine des souches actinomycétales.....	52
<b>Tableau 8 :</b> Résultat d'activité antimicrobienne des actinomycètes isolés (Diamètre en mm) disques – puits .....	56
<b>Tableau 9 :</b> Résultat de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries tests et aux Antifongiques de la levure (diamètre en mm) .....	58
<b>Tableau 10 :</b> Résultat d'inhibition de l'activité ATF par l'ergostérol.....	60
<b>Tableau 11 :</b> Résultat d'étude d'aspect macroscopique des isolats.....	62
<b>Tableau 12 :</b> Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales .....	64

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Grotte de nichet.....	6
<b>Figure 2 :</b> Grotte ornée.....	6
<b>Figure 3 :</b> Une chauve-souris.....	6
<b>Figure 4 :</b> Les types de grottes.....	10
<b>Figure 5 :</b> Diversité des habitats des actinomycètes .....	15
<b>Figure 6 :</b> Colonie d'actinomycètes poussant sur gélose (morphologie commune des Actinomycètes, coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes montrant le Mycélium substrat et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores) .....	16
<b>Figure 7 :</b> Le cycle de vie des actinomycètes, depuis les conidiospores jusqu'à la Sporulation.les différents types de conidiospores sont présentés dans l'encadré agrandi .....	17
<b>Figure 8 :</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans l'espace .....	26
<b>Figure 9 :</b> Micrographie électronique à balayage de <i>S. aureus</i> .....	27
<b>Figure 10 :</b> La bactérie « <i>Escherichia coli</i> » vue au microscope, image colorisée .....	28
<b>Figure 11 :</b> <i>Bacillus Subtilis</i> .....	28
<b>Figure 12 :</b> <i>Enterococcus faecalis</i> ,microscopie électronique à balayage .....	29
<b>Figure 13 :</b> <i>klebsiella pneumoniae</i> .....	30
<b>Figure 14 :</b> Cellules de <i>Candida albicans</i> analysées par microscopie électronique à Balayage.....	30
<b>Figure 15 :</b> carte de la région de Tagma (wilaya de Tlemcen).....	32
<b>Figure 16:</b> <b>A:</b> Extérieur de la grotte ; <b>B :</b> entrée de la grotte ; <b>C, D:</b> l'intérieur de la grotte.....	33
<b>Figure17:</b> Prélèvement du sol à l'aide d'une spatule stérile .....	34
<b>Figure 18 :</b> étape de séchage des échantillons de sol .....	35
<b>Figure 19:</b> La purification dans le milieu : ISP2 et GNG .....	36
<b>Figure 20 :</b> Méthode des disques (test d'activité antibactérienne et antifongique) .....	39
<b>Figure 21 :</b> Méthode des puits .....	40
<b>Figure 22 :</b> <b>P :</b> Méthode de cylindre d'agar (avec et sans ergostérol), <b>U:</b> méthode des Puits (avec et sans ergostérol).....	41
<b>Figure 23:</b> Lait écrémé.....	43

<b>Figure 24:</b> Citrate de Simmons.....	43
<b>Figure 25:</b> Photo d'isolement des actinomycètes du sol sur le milieu ISP2 .....	48
<b>Figure 26:</b> Pourcentage de souches isolées par milieu de culture à partir D'échantillon E1 du sol.....	48
<b>Figure 27 :</b> Pourcentage de souches isolées par milieu de culture à partir D'échantillon E2 du sol .....	48
<b>Figure 28:</b> Pourcentage de souches isolées par milieu de culture à partir D'échantillon E3 du sol.....	49
<b>Figure 29 :</b> Nombre de souches d'actinomycètes isolées à partir des milieux des Cultures .....	50
<b>Figure 30 :</b> Effet de la souche A6(18) sur <i>candida albicans</i> -A'' : Action de la souche A31(2) sur <i>E.coli</i> et sur <i>S.E</i> - A''' : Action de la souche A9(19) sur <i>E.coli</i> et <i>Candida</i> <i>albicans</i> .....	57
<b>Figure 31 :</b> La sensibilité aux antibiotiques des bactéries tests et aux antifongiques De la levure .....	59
<b>Figure 32 :</b> Inhibition de l'activité ATF avant et après l'ajout de l'ergostérol (Méthode des cylindres et puits).....	61
<b>Figure 33 :</b> Aspect macroscopique des souches "Aspect des mycéliums".....	62
<b>Figure 34 :</b> Observation microscopique de la souche actinomycétale A31(2) (Gx1000) Après coloration de Gram .....	63
<b>Figure 35 :</b> Coagulation du lait écrémé.....	65
<b>Figure 36 :</b> Utilisation du citrate comme une source de carbone .....	65
<b>Figure 37 :</b> Résultat du test catalase.....	65

## Liste des abréviations

**°C** : Degré Celsius

**pH** : Potentiel d'Hydrogène

**UFC** : Unité Formant Colonie

**ATCC** : American Type Culture Collection

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**ARNr** : acide ribonucléique ribosomique

**TSA** : tryptic soja

**ISP** : projet international *Streptomyces*

**GNG** : gélose nutritive gélatine

**CASFM** : comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie

**ATF** : antifongique

**ATB** : antibiotique

**AMP** : ampicilline

**T** : témoin

**Ox** : oxydase

**Redox** : réduction – oxydation

---

# *Introduction*

---

L'Algérie offre un vaste territoire comprenant une diversité d'écosystèmes, notamment marins, forestiers, sahariens, ainsi qu'un réseau de grottes karstiques (**Djebbah ,2022**).

Actuellement, les grottes sont principalement exploitées à des fins touristiques, où les visiteurs peuvent explorer des grottes aménagées pour admirer des peintures paléolithiques ou des formations géologiques fascinantes. ( **KatarzynaKaznik-Kwasnicka et al .,2022**).

Bien que des recherches aient été menées en Algérie sur l'isolement des actinomycètes à partir des écosystèmes sahariens et forestiers, l'étude de l'écologie microbienne des grottes reste largement sous-exploitée à des fins biotechnologiques (**Djebbah, 2022**)

Durant les dernières années, les recherches menées dans les grottes karstiques ont révélé une grande diversité de microorganismes incluant des actinomycètes qui peuplent les parois rocheuses, les formations géologiques et les accumulations de boue ou de sédiments. Ils sont devenus une source d'intérêt pour divers groupes de recherche notamment des chimistes, des écologistes et des géologues (**Kaznik-Kwasnicka et al ., 2022;Djebbah,2022 ; Belyagoubi et al ., 2018 ; Kitouni,2007 ; Belyagoubi,2014 ; Boublenza ,2022**)

Les actinomycètes ont été, une source importante pour la découverte d'antibiotiques, ayant abouti à la création d'un grand nombre de médicaments et de leurs dérivés, qui ont été introduits avec succès sur le marché et sont encore largement utilisés en pratique clinique de nos jours. (**OlgaGenilloud , 2017** ). Ces derniers représentent environ 70% des molécules actives d'origine microbiennes. De plus, chaque souche a le potentiel génétique de produire entre 10 et 20 métabolites différents, ce qui ouvre la voie à des possibilités prometteuses en matière de recherche et de développement.(**Okami et Hotta ,1988**)

L'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) a souligné une grave pénurie de nouveaux antibiotiques pour lutter contre la menace de la résistance aux antimicrobiens, considérée comme une urgence de santé publique mondiale (**Kmietoicz, 2017**). Dans de nombreux cas, ces antibiotiques et d'autres composés bioactifs sont isolés à partir de microorganismes.

Dans cette optique, notre intérêt se porte sur la recherche de nouvelles molécules bioactives ayant des propriétés antimicrobiennes, produites par des actinomycètes isolés de

la grotte de Ghorf El Mit dans la région de Tagma, wilaya de Tlemcen, comme alternative à l'antibiothérapie.

Pour atteindre notre objectif, l'approche expérimentale se concentre sur les étapes suivantes :

- Isoler des actinomycètes à partir des échantillons prélevés de différents endroits de la grotte
- Purifier et identifier les souches isolées.
- Cribler le pouvoir antimicrobien des microorganismes sélectionnés contre des souches pathogènes.

---

*Synthèse*  
*bibliographique*

---

---

*Les grottes*

---

## 1- Généralité

« Une grotte » est définie comme un vide naturel situé dans la cavité souterraine de la terre, présentes dans divers types de roches et résultant de processus géologiques variés, les grottes diffèrent en taille, allant de petites cavités isolées à des réseaux de passages interconnectés s'étendant sur plusieurs kilomètres (Davies, 1977) et en composition des parois (par exemple, gypse, calcaire) (Northup et Lavoie, 2001). Il est suffisant pour permettre l'entrée de l'homme (Davies, 1977). Les grottes naturelles sont étudiées pour mieux comprendre cet écosystème, et les grottes ornées ont un but de conservation. Où l'origine principale des perturbations dans les grottes provient d'activités humaines, telles que les aménagements, les visites touristiques et l'utilisation de traitements chimiques (Urzi et al., 2010).

Ainsi les grottes considérées comme des milieux extrêmes (Tomczyk-Zak et Zielenkiewicz., 2016), car elles sont oligotrophes (Barton et Jurado., 2007). Elles présentent des conditions particulières comme un taux d'humidité élevé, une température stable et l'absence de la lumière (Barton et Jurado., 2007). De nombreux organismes animaux comme des chauves-souris, des araignées, des coléoptères, des collemboles (Gnaspini et Trajano., 2000) et aussi des microorganismes, à savoir bactéries, virus, champignons et protozoaires qui vivent à l'intérieur (Jurado et al., 2010 ; Risse-Buhl et al., 2013 ; Tomczyk-Zak et Zielenkiewicz., 2016). Ces microorganismes ont d'ailleurs un rôle dans certains processus géochimiques (Lian et al., 2011). Les grottes sont hétérogènes et les facteurs engendrant cette hétérogénéité peuvent influencer la communauté microbienne et son fonctionnement (Tomczyk-Zak et Zielenkiewicz., 2016) , Les conditions climatiques extérieures affectent surtout les grottes.

Cette dernière, présentent souvent différentes zones, chacune caractérisée par des conditions environnementales spécifiques :

**1-Zone d'entrée** : cette région marque la transition entre la surface et le sous-sol, où les environnements extérieurs et souterrains se rencontrent.

**2-Zone crépusculaire** : à mesure que l'on s'éloigne de l'entrée, la lumière diminue progressivement, et au-delà de cette zone, aucune plante ne peut se développer en raison du manque de luminosité.

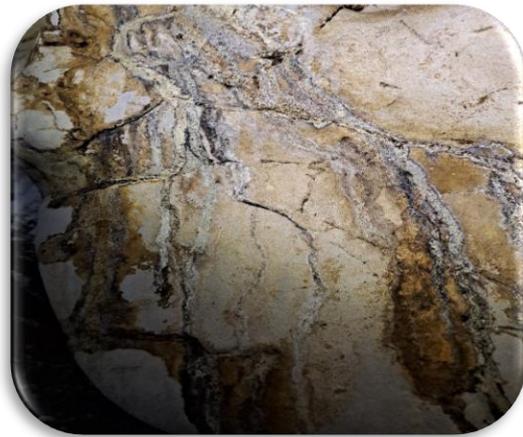
**3-Zone de transition** : dans cette zone sans lumière, les flux environnementaux tels que la température et l'humidité provenant de la surface sont toujours perceptibles, bien que la lumière naturelle soit absente.

**4-Zone profonde** : à une distance significative de l'entrée, cette région est caractérisée par une obscurité totale, une humidité élevée et une température constante (Ghosh et al., 2016).

Où ces écosystèmes offrent des niches écologiques propices au développement de microorganismes hautement spécialisés (Schabereiter-Gurtner et al., 2003)



**Figure 1:**Photo de la grotte de nichet  
([www.valdardennetourisme.com](http://www.valdardennetourisme.com))



**Figure 2 :** Photo d'une grotte ornée  
(Photo personnelle 2024)



**Figure 3:** Photo d'une chauve-souris  
(Photo personnelle 2024)

## 2- Ecologie microbienne des grottes

Un écosystème est le système limité dans l'espace constitué par l'ensemble des communautés d'êtres vivants qui s'y trouvent et par l'ensemble des conditions énergétiques, physiques, chimiques et biologiques qui règnent au voisinage immédiat de ces êtres vivants. L'écologie microbienne a pour objet l'étude des interrelations entre les micro-organismes et les composants de l'écosystème où ils vivent (**Domergue et Mangenot., 1970**). La microbiologie des grottes se concentre sur la vie microscopique présente à l'intérieur de ces formations souterraines (**Whittaker, 1969**). La microflore des grottes est principalement constituée par différents types de microorganismes tels que des bactéries, d'actinomycètes, des champignons, d'algues, plus les virus et d'autres êtres vivants incluent ces microorganismes (**Wild, 1993; Maier et al., 2000**).

La structure des communautés microbiennes de ces grottes est plutôt stable dans le temps (**Tomczyk-Żak et Zielenkiewicz., 2016 ; Alonso et al., 2018**). Cependant, cette stabilité peut être influencée par divers facteurs locaux tels que le type de roches et l'hétérogénéité des éléments minéraux ou organiques présents sur les surfaces (**Jones et Macalady., 2016 Cuezva et al., 2009**). De plus, de nombreux facteurs physico-chimiques spécifiques, comprenant le pH, la disponibilité des nutriments, etc., peuvent également entraîner des variations. (**Engel, 2010 ; DeLeo et al., 2012**).

Les cavernes, caractérisées par des niveaux limités de nutriments, la compétition pour les ressources est substituée par la coopération et des interrelations mutualistes, comme cela est observé dans les biofilms (**Barton et Jurado., 2007 et Tomczyk-Żak et Zielenkiewicz., 2016**), et aussi et comprenant diverses interfaces redox, servent de milieu où les micro-organismes (les bactéries, les algues et les champignons) interagissent avec les environnements minéraux.

Ces interactions peuvent engendrer la dissolution ou la précipitation sur la roche hôte ainsi que sur les spéléothèmes, qui sont des formations minérales secondaires.

L'interaction des micro-organismes avec la surface des grottes, donne les opportunités de croissance et de colonisation microbiennes, structurés en biofilms (**Flemming et Wuertz., 2019; Geesink et al., 2018; Pedersen, 1997**), sont déterminées par le

microclimat spécifique et la disponibilité des ressources sur les surfaces rocheuses (Gorbushina, 2007 ; Cuezva et al., 2009). Cette croissance microbienne et le fonctionnement microbien sur les parois des grottes peuvent avoir des conséquences néfastes sur les peintures et les gravures rupestres (Jurado et al., 2009 ; Wang et al., 2010).

Les microorganismes pourraient utiliser un ou plusieurs de ces processus biologiques. Le carbonate de calcium peut être précipité par les bactéries et les champignons de différentes manières, telles que la photosynthèse, la dénitrification, la réduction des sulfates et l'oxydation anaérobie du soufre (Castanier, Le Métayer-Levrel et Perthuisot., 1999 ; Ehrlich ,1999). (Équitation, 1996 ; Simkiss et Wilbur., 1989). Grâce à ces processus, la concentration de  $\text{HCO}^{-3}$  augmente, ce qui entraîne une augmentation de l'alcalinité et entraîne une accumulation de carbonate de calcium.

Les champignons synthétisent également une variété d'enzymes et de produits métaboliques qui peuvent participer à altérer les minéraux. (Kumar et Kumar., 1999 ; Sterflinger et al., 2000 ; Gorbushina et al., 2007). Les genres fongiques fréquemment observés dans les grottes sont *Aspergillus* ,*Penicillium* (Engel, 2015 ; Mitova et al., 2017) .Ainsi, les taxons bactériens les plus abondants et les plus fréquemment retrouvés dans les cavernes sont *les protéobactéries*, *les nitrospirales*, *les actinobactéries*, *les acidobactéries*, *les bacteroidetes* et *les firmicutes* (Tomczyk-ŻaketZielenkiewicz., 2016). où l'activité métabolique des bactéries qui effectuent l'oxydation du soufre, du fer et du manganèse peut engendrer une acidité significative, entraînant la dissolution des parois et des formations présentes dans les grottes (Northup et al., 2001).

### 3- Les types de grotte

Une classification fondamentale des grottes englobe quatre catégories principales ainsi que plusieurs catégories autres moins importantes.

#### *Les grottes de solution*

Les eaux souterraines se déplaçant lentement créent des grottes de solution dans le carbonate et les roches sulfatées comme le calcaire, la dolomite, le marbre et le gypse, ce qui provoque la dissociation de la roche, créant ainsi des tunnels, des passages

irréguliers et même de vastes cavernes le long des joints et des plans de stratification. Les grottes les plus grandes du monde sont également de ce genre.

***Les grottes de lave***

Se caractérisent par la formation de tunnels ou de tubes dans la lave lorsqu'elle se refroidit et se durcit à l'extérieur, tandis que la lave en fusion continue de couler à l'intérieur et finit par s'écouler par le nouveau tube formé.

***Les grottes glaciaires***

L'eau de fonte crée des tunnels de drainage à travers la glace pour les anciennes grottes glaciaires.

***Dans les régions désertiques :***

Résultent de la fracturation des roches sous l'effet de contraintes tectoniques.les variations extrêmes de température entre le jour et la nuit dans les déserts peuvent provoquer de fissure dans la roche (**Davies, 1977**).

**La figure 4** montre les types des grottes :



**Grotte de solution**



**Grotte de lave**



**Grotte de glace**



**Grotte désertique**

**Figure 4:**Types de grottes

(Simonson, 2014 ; Priscilla, 2022 ; Claire Robinson, 2023 ; photo personnelle, 2024)

---

# *Les Actinomycètes*

---

## 1- Introduction

Les Actinomycètes sont définis comme des Eubactéries Gram positives, formant des spores, aérobies et saprophytes (**Mohseni, 2013**), à structure végétative de type mycélien (**Stanieret coll., 1966**). Avec un caractère majeur est la présence d'environ 70 % de guanine et de cytosine (G+C) dans l'ADN de la majorité des actinobactéries (**Theilleux, 1993**).

Elles peuvent vivre dans une variété de conditions, aérobies et anaérobies et participent à divers processus du sol tels que la fixation de l'ammonium, la décomposition des tissus cellulaires et la synthèse et la décomposition de l'humus. Où La majorité des actinomycètes se nourrissent des matières organiques, qu'elles soient protéiques ou non protéiques (**Bhatti et al., 2017**).

Elles ont un pH neutre ou peu alcalin, sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**).

Les actinomycètes sont les micro-organismes les plus intéressants pour l'économie et la technologie. sont utilisés pour fabriquer de métabolites secondaires qui ont différentes valeurs médicales, comme les antibiotiques, les antifongiques, les antiprotozoaires, les antiviraux et les antiholestérol ,antihelminthe, anti-inflammatoire et anti-immunité...ect.

Le mot « Actinomycète » est issu du mot grec « atkis » (un raie) et « mykes » (champignon) (**Bhatti et al., 2017**) .

À l'origine, ces micro-organismes étaient classés avec les champignons car ils possédaient de véritables hyphes aériens, considérés comme une caractéristique fongique ( **McNeilet Brown, 1994**). Cela est vrai pour un groupe d'organismes aussi grand, hétérogène et variable que celui représenté dans la nature par le genre *Streptomyces*. Ces organismes sont composés de centaines de milliers de spores et de morceaux de mycélium par gramme. On les retrouve également en grande quantité dans le fumier et les composts, dans divers bassins d'eau douce, dans la poussière et sur les aliments (**Waksman, 1957**).

Ces micro-organismes ont des similitudes avec les Eubactéries et les champignons. Les quatre caractères qui correspondent aux Actinomycètes et aux champignons, et plus particulièrement aux Fungi imperfectif, sont d'après **Alexandar,(1961)** les suivants:

- ✓ structure mycélienne présentant des ramifications chez les Actinomycètes typiques, avec cependant cette différence que les filaments ont un diamètre deux fois plus faible (0,5 à 1,2 mm) que ceux des champignons, d'où le terme de pseudo mycélium parfois employé pour désigner cette structure
- ✓ formation répétée d'un mycélium aérien et de conidies.
- ✓ en culture, l'absence de turbidité caractéristique des bactéries unicellulaires et l'apparition d'amas de cellules.
- ✓ La croissance est généralement cubique, comme chez les champignons, et non exponentiel, comme chez les bactéries (**Prévot, 1961**).

## **2- Historique**

- En 1877, le biologiste allemand Heinrich Anton de Bary a décrit pour la première fois les actinomycètes (**Bary, 1877**).
- En 1890, le scientifique russe Sergei Nikolaevich Winogradsky a isolé et caractérisé pour la première fois des actinomycètes du sol (**Winogradsky, 1890**)
- En 1923, le chercheur américain Salman Waksman a introduit le terme "actinomycète" pour décrire un groupe distinct de bactéries à filament. (**Waksman, 1923**).
- En 1940, Waksman et son équipe ont découvert la streptomycine, le premier antibiotique efficace contre la tuberculose, isolé à partir d'actinomycètes du genre *Streptomyces* (**Waksman et al., 1944**)

### 3- La diversité des actinomycètes des grottes

La diversité des actinomycètes dans les grottes est grande en raison des stress environnementaux qui influencent le microbiote et permettent le développement de nouvelles espèces. Les écosystèmes présents dans les grottes sont responsables de facteurs de stress évolutifs spécifiques, et la faible disponibilité d'énergie entraîne des interactions complexes entre divers micro-organismes.

Les grottes sont donc des endroits captivants et prometteurs, en particulier pour l'étude de nouveaux actinomycètes. On peut observer la majorité des actinomycètes, qui adhèrent à la surface rocheuse des roches du plafond et des parois, formant des colonies de 1 à 10 mm de diamètre.

Plusieurs études ont été consacrées à l'isolement des actinomycètes des communautés cultivables dans les cavernes, ce qui a permis de découvrir de nouvelles espèces avec des caractéristiques biologiques intéressantes. Le genre *Streptomyces* constitue principalement la microflore cultivable. Outre les *Streptomyces*, les autres genres les plus fréquents sont *Micromonospora* et *Nocardiopsis*. Selon le caractère biologique étudié. (Beatrice et al., 2022)

### 4- Nature et habitat

Les actinomycètes sont présents principalement dans le sol, le limon, les plans d'eau, l'air et les restes végétaux. Ces sont les meilleurs organismes abondants qui forment des filaments filiformes dans le sol. (Figure 5).

Ils sont développés sous forme d'hyphes, comme des champignons responsables des caractéristiques. Une odeur « terreuse » de sol sain fraîchement retourné. Les actinomycètes sont présents dans divers habitats naturels et représentent un groupe omniprésent de microbes largement répartis dans les écosystèmes naturels du monde entier. Ce sont principalement des habitants du sol mais ont été largement distribués dans une gamme diversifiée d'écosystème aquatique, y compris les sédiments obtenus des profondeurs marines, même de la plus grande profondeur de la fosse des Mariannes. Ils peuvent se trouver dans des environnements extrêmes, notamment dans la région cryophile de l'Antarctique et même dans les sols désertiques (Bhatti et al., 2017).

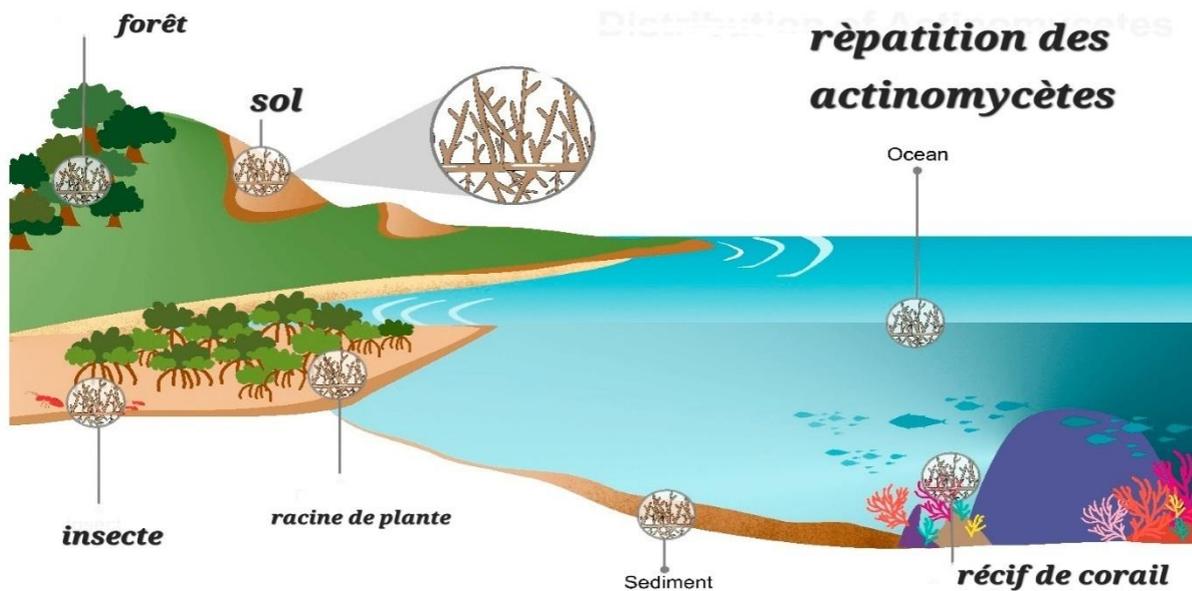


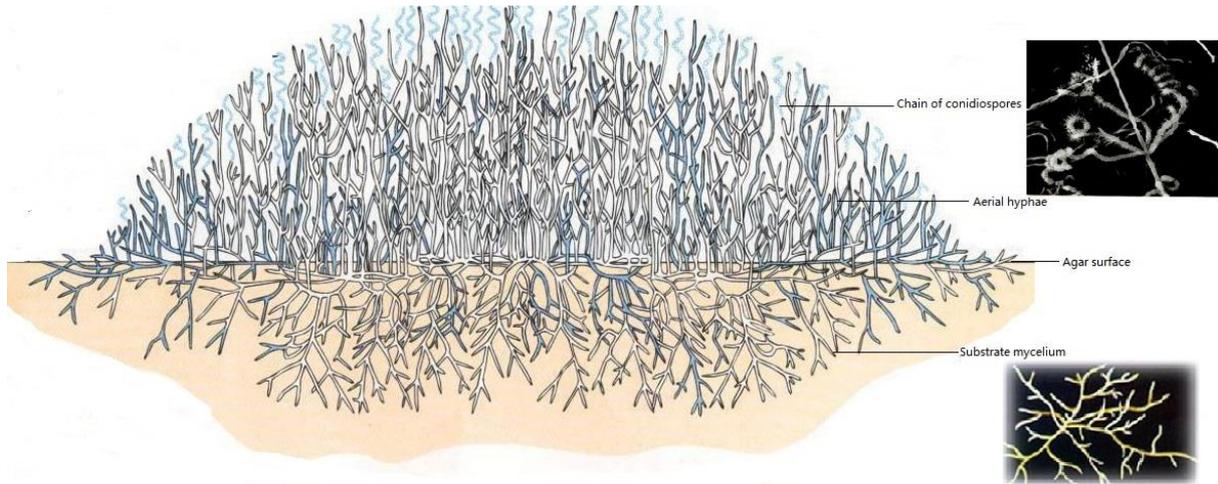
Figure 5 : Diversité des habitats des actinomycètes (Ngamcharungchitet *al.*, 2023)

## 5- Caractère morphologique

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être divisés en deux catégories. Le premier type : comprend des organismes qui forment un grand nombre de filaments ramifiés (mycélium). Le deuxième type : comprend des organismes morphologiquement plus complexes que le premier type (Lechevalier, 1985), en plus des filaments ramifiés, on peut également rencontrer des bacilles et des coccobacilles, comme les *Rhodococcus* et les mycobactéries (Prescott, 2003)

Les colonies formées sur les milieux solides présentent divers aspects macroscopiques qui peuvent être regroupées en trois types :

- Les colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachées au milieu.
- Les colonies pâteuses peuvent être facilement détachées des milieux solides.
- des colonies exemptes de mycélium de substrat et composées d'hyphes aériens attachées au milieu par des crampons (Kalakoutskii, 1976)

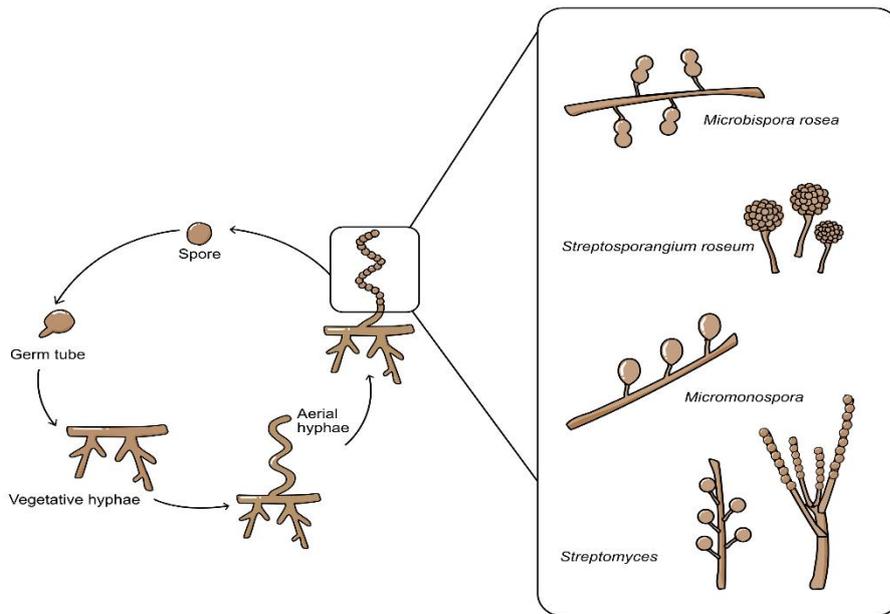


**Figure 6** : Colonie d'actinomycètes poussant sur gélose (morphologie commune des actinomycètes, coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes montrant le mycélium substrat et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores). (Qinyuan Li et al., 2015)

## 6- Cycle de vie

Les actinomycètes, caractérisées par un cycle de vie complexe (**figure 7**) appartenant au phylum Actinobacteria, représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les 18 principales lignées actuellement reconnues dans le domaine des bactéries (Ventura et al., 2007).

Au cours de leur cycle de vie, le mycélium radial bien développé des actinomycètes se divise en substrat et en mycélium aérien. Le mycélium substrat se développe dans le milieu pour consommer les nutriments, suivi du mycélium aérien. Cependant, l'hyphes s'enroule et développe un septum lorsque les actinomycètes se développent dans un environnement pauvre. Des conidiospores se forment dans les hyphes une fois que le septum est développé. D'autres genres, tels que *Micromonospora* (une seule spore non mobile), *Microbispora* (deux spores dans une chaîne) et *Streptosporagium* (portant une spore comme vésicule de spore), sont différents des *Streptomyces* avec leurs spores à longue chaîne. Lorsque des conditions favorables seront atteintes, les spores seront libérées dans l'environnement et germeront. La spore dépassera les tubes germinatifs au cours de l'étape de germination, puis les tubes germinatifs atteindront le stade de croissance végétative et le cycle se répétera. (Ngmcharunghit, et al., 2023).



**Figure 7:** le cycle de vie des actinomycètes, depuis les conidiospores jusqu'à la sporulation. les différents types de conidiospores sont présentés dans l'encadré agrandi (Ngamcharungchit, C et al., 2023) .

## 7- Ecologie et distribution des actinomycètes

Les actinomycètes sont répartis largement dans divers écosystèmes et habitats (**tableau 1**) (Ngamcharungchit et al., 2023). Les actinobactéries sont largement distribuées dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, principalement dans les sols, où ils jouent un rôle essentiel dans le recyclage des biomatériaux réfractaires en se décomposant mélanges complexes de polymères dans les morts plantes, animaux et matières fongiques.

Ils sont également importants pour la biodégradation des sols et la formation d'humus en recyclant les nutriments associés aux récalcitrants polymères, tels que la chitine, la kératine et lignocelluloses (Goodfellow et Williams., 1983 ; McCarthy et Williams., 1992 ; Stach et Bull., 2005), elles produisent plusieurs substances volatiles comme la géosmine, responsables de « l'odeur de terre humide » caractéristique (Wilkins, 1996) et présentent diverses. La production d'enzymes extracellulaires (McCarthy et Williams., 1992; Schrempf, 2001).

Le **tableau 1** suivant montre l'écologie et la distribution des actinomycètes.

**Tableau 1:** Distribution des actinomycètes dans la nature (**Goodfellow, 1983**)

<i>Genre</i>	<i>Habitats</i>
<i>Actinomadura</i> <i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Streptomyces</i> <i>actinoplanes</i>	Sol, eau, Sol, eau, litière
<i>Saccharomonospora</i> <i>Nocardia</i>	Sol ,eau
<i>Streptosporangium</i>	Matière en fermentation et décomposition
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, matière en décomposition
<i>Frankia</i>	Nodules des racines

## 8- Classification et taxonomie des actinomycètes

Les actinomycètes sont classés du règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et de la classe des *Thalobacteria*, qui comprend l'ordre des Actinomycetales (**Larpen, 2000**).

Selon **Euzéby (2015)**, les actinobactéries font partie du domaine des bactéries ou *Eubacteria*, du phylum *des actinobactéries*, de la classe *des actinobactéries* et de la sous-classe *des actinobacteridae*. Cinq classes, 21 ordres et de nombreuses familles constituent aujourd'hui le phylum *des actinobactéries*. Cet Ordre est défini dans le Manuel de

Systématique de **Bergey de 1994 et 2010** comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en guanine et cytosine (G+C) supérieur.

Il comprend des genres d'une grande diversité morphologique, allant du cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Nocardiosis*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium bien différencié et persistant (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, etc..)

Il existe 425 genres du phylum « *Actinobacteria* », avec les dénominations officiellement publiées présentes actuellement dans six classes, 46 ordres et 79 familles, dont 16 nouveaux ordres et 10 nouvelles familles .Il convient de noter que la famille des *Actinomyceteceae* est maintenant intégrée à l'ordre des *Actinomycetales*.(**Salam et al., 2020**).

Par ailleurs, en **2021**, le nom du phylum *Actinobacteria* a de nouveau été modifié en *Actinomycetota*. En bref, le phylum *Actinomycetota* est l'ancien phylum *Actinobacteria*. La classe proposée *Actinomycetia* est l'ancienne classe *Actinobacteria* (**Oren et Garrity ., 2021**). On a récemment rapporté une taxonomie mise à jour *des Actinobacteria* qui repose sur des arbres d'ARNr 16S.

La taxonomie des actinomycètes repose sur divers critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Les études morphologiques et chimiques facilitent l'identification des genres, tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (**Badji, 2006**).

### 8.1. Genre *Streptomyces*

Chez cette famille, la structure mycélienne se développe complètement et devient permanente. Le processus de reproduction implique l'utilisation de conidies. C'est pourquoi le cycle de développement ressemble à celui des Champignons.

Le genre *Streptomyces* est abondamment présent dans le sol et représente souvent 70 à 90 % des Actinomycètes. Il se différencie du genre *Nocardia* en ayant un mycélium végétatif persistant quelle que soit la phase de développement et en se reproduisant via des conidies en chaîne. En examinant les colonies de *Streptomyces*, on peut distinguer :

- ✓ Le mycélium végétatif est étroitement implanté dans le milieu auquel il adhère et ses colonies sont difficiles à extraire à l'aide d'un fil de platine.
- ✓ Le mycélium aérien, qui est beaucoup plus lâche et ressemble à du poudre, est constitué d'hyphes souvent un peu plus épaisses et plus réfringentes, portant des conidies en chaînes à leurs extrémités (Omar et al.,2015)

## 9-Métabolisme des actinomycètes

Pendant leur développement, les actinomycètes peuvent évoluer d'un métabolisme primaire (trophophases) à un métabolisme secondaire (idiophases).

### 9.1. Métabolite primaire

Les substances produites par les microorganismes en période de croissance active sont appelées métabolites primaires. Lorsqu'ils sont cultivés, ils sont en phase de maturation. Pendant cette dernière, des réactions enzymatiques produisent les substances nécessaires à leur développement. Les métabolites primaires en générale comprennent les alcools, les enzymes (telles que les hydrolases et les protéases) et les acides organiques, entre autres (Bill, 2007).

## 9.2. Métabolite secondaire

Ces substances sont généralement créées plus tard dans le cycle de vie, lorsque les micro-organismes vieillissent. Ils sont généralement fabriqués pendant la phase stationnaire (Horinouchi, 2002 ;Ginolhac, 2006).

## 10-les substances bioactives produite par les actinomycètes

### 10.1. Production des antibiotiques

La production d'antibiotiques est une caractéristique des actinomycètes, pour un grand nombre d'entre eux. Des centaines d'antibiotiques ont été isolés des actinomycètes, notamment de *Streptomyces* (tableau 2), depuis la découverte de la *streptomycine* par Waksman en 1943. En effet, ce genre d'est de loin, le plus producteur.

Le tableau 2 montre la liste des antibiotiques produits par diverses *Actinobactéries* et leur action antimicrobienne.

**Tableau 2:**Liste des dérivés naturels produits par des *Actinobacteria* (Loucif, 2010 ; Prescott et al .,2018).

Application	Produit naturel	Productive
Antibiotique	Tétracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>
	Clostrymicine	<i>Micromonosporasp</i>
	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Antifongique	Amphotéricine	<i>Streptomyces nodosis</i>
	Nystatine	<i>Streptomyces noursei</i>
	Bléomycine	<i>Streptomyces verticillus</i>

## **10.2. Production des enzymes**

Les actinomycètes ont été mis en vente. Principalement utilisé dans la fabrication de produits pharmaceutiques, d'enzymes, d'anti tumoraux, d'inhibiteurs d'enzymes. Les actinomycètes sont fréquemment criblés pour la production de nouveaux composés bioactifs en raison de leur grande valeur commerciale.

Divers genres d'actinomycètes contiennent un large éventail d'enzymes et de leurs produits utilisés dans les industries biotechnologiques et biomédicaux. Depuis l'avènement du génome et les données de séquençage des protéines, les actinomycètes ont été utilisés pour la production de protéases, de cellulases, de chitinases, d'amylases, de xylanases et d'autres. (**Tableau 3**)

Le **tableau 3** présent des exemples d'enzymes industriellement importantes provenant d'actinomycètes, ainsi que leurs propriétés enzymatiques (**Prakash et al., 2013**).

**Tableau 3** : Liste des enzymes industriellement viables provenant des actinomycètes et leurs caractéristiques (**Prakash et al., 2013**).

<i>Enzyme</i>	<i>Production de souche</i>	<i>Stabilité du pH</i>	<i>Stabilité thermique</i>
<i>Cellulase</i>	<i>Thermobifidahalotolerans</i>	5.0-12.0	40-50°C
	<i>Recombinant Streptomyces sp.</i>	6.0-8.0	40-50°C
	<i>Thermomonospora sp.</i>	7.0-10.0	50°C
	<i>Streptomyces ruber</i>	5.5-7.0	35-40°C
<i>Xylanase</i>	<i>Actinomadura sp.</i>	4.0	70°C
	<i>Recombinant strain</i>	5.0-7.0	70-80°C
	<i>Streptomyces spp.</i>	8.0-10.0	45-60°C
<i>Pectinase</i>	<i>Streptomyces lydicus</i>	4.0-7.0	45°C
<i>Amylase</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	5.0-7.0	45-45°C
	<i>Nocardiosis sp.</i>	8.6	40-50°C
	<i>Thermobifidafusca</i>	5.0-7.0	60°C
<i>Protease</i>	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	4.0	50°C
	<i>Streptomyces pactum</i>	7.5	40°C
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6.5	65°C
<i>Chitinase</i>	<i>Microbispora sp.</i>	3.0-11.0	30-35°C
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6.0	60°C

### 10.3 Production des vitamines

La flore intestinale est riche en vitamines naturelles, en aliments d'origine végétale et en micro-organismes, tout en jouant un rôle important dans la synthèse chimique de nombreuses vitamines présentes dans divers produits alimentaires.

La vitamine B12, également connue sous le nom de cobalamine, est essentielle à la formation des globules rouges et une carence en elle entraîne une anémie dangereuse. Il

s'agit d'une vitamine essentielle (hydrosoluble) largement utilisée dans les industries médicales et alimentaires (**Sumathy et al., 2020**). Différents types d'actinomycètes sont responsables de sa synthèse, dont les principaux sont ( *Streptomyceschromogenws,S.griseus et S. antibioticus* )

---

*Les microorganismes  
pathogènes*

---

### **1-*Pseudomonas aeruginosa***

Sont des bacilles à Gram négatif, qui se caractérise par son métabolisme aérobie strict et son utilisation du processus métabolique oxydatif, ubiquitaire dans l'environnement. (N.Floret et al., 2009), en forme de tige, elle ne produit pas de spores et possède un seul flagelle. Cette dernière, pousse bien à 25 °C-37 °C, et sa capacité à croître à 42 °C. (Shouguang Jin, 2024).

Ces dernières décennies, *Pseudomonas aeruginosa* est devenu un pathogène opportuniste majeur dans les milieux hospitaliers, fréquemment responsable d'infections nosocomiales (N.Cabrolier et al., 2014) .

Les toxines produites par *P.aeruginosa*, telles que l'exotoxine A, l'exoenzyme S, l'exoenzyme T, l'exoenzyme U et la pyocyanine, jouent un rôle crucial dans sa virulence en endommageant les cellules hôtes et en modulant la réponse immunitaire.(N.Floret et al., 2009 )



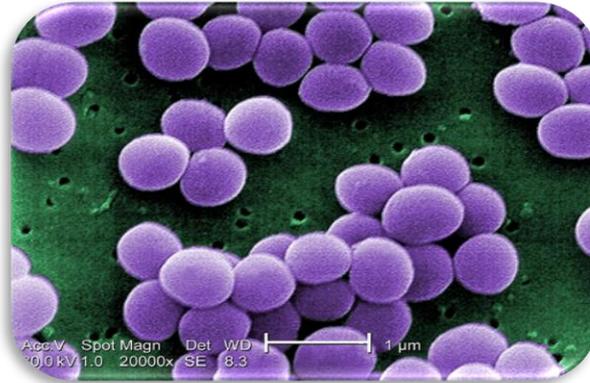
**Figure 08:**Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa*(Kamer, 2013).

### **2 -*Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est une bactérie aérobie facultative. Cette bactérie se développe mieux à une température de 37 °C, halophile, neutrophile. Elle se présente sous forme de cocci en amas. ( Amirbouhila et al., 2020 )

*S. aureus* est un agent pathogène qui peut causer diverses infections chez l'homme, allant des infections cutanées mineures aux infections tissulaires graves et à la septicémie ( **Nourahmad-Mansour et al ., 2021** ) .

Il produit de nombreuses exotoxines, telles que les entérotoxines (SES), toxines exfoliatives A et B (ETA et ETB). (**Dinges et al., 2000**).

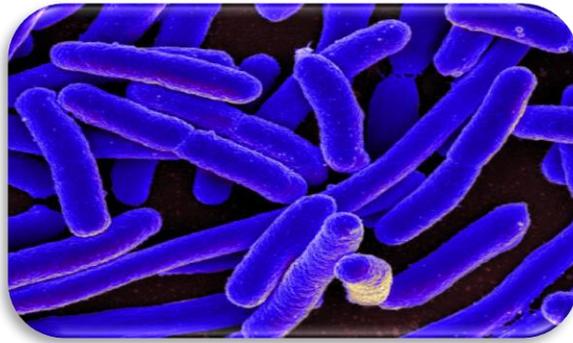


**Figure 09** : Micrographie électronique à balayage de *S. aureus* (**Rosenbach ,1884**)

### **3 -*Escherichia coli***

*Escherichia coli* est une bactérie gram négatif sous forme de bâtonnet, appartient à la famille des *enterobacteriaceae*( **J.Jang et coll., 2017** ). Elles sont capables de se multiplier dans des gammes de températures allant de 4 °C à 46 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C et à un pH compris entre 4,6 et 9,5. (**Brisaboiset al., 1997**).

C'est un agent pathogène d'origine alimentaire, responsable de maladies graves chez les êtres humains à l'échelle mondiale. (**MyhammadNurAfnanUda , 2024** ) .



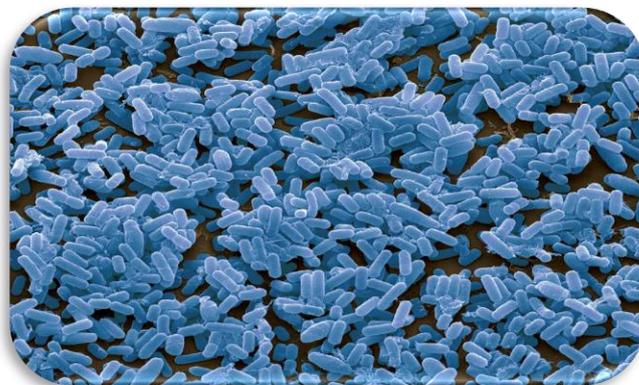
**Figure 10** : La bactérie « *Escherichia coli* » vue au microscope, image colorisée  
(Priam, 2022)

#### **4-*Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis*, (Sonenshein et al., 2001), est largement utilisée depuis de nombreuses décennies pour des études génétiques et biochimiques. Elle est souvent citée comme l'exemple type des bactéries à Gram positif capable de former des endospores (Moszer et al., 2002 ). Dans l'industrie agroalimentaire, elle est employée pour la production d'enzymes de type amylase, qui est utilisées dans la fabrication du pain.

Cette bactérie est également présente dans la composition de certains produits détergents. (Bornert, 2000).

Parmi les toxines produites par cette bactérie : la subtilisine, hémolysine, surfactine, bacillomycine D (Moszer et al ., 2002).

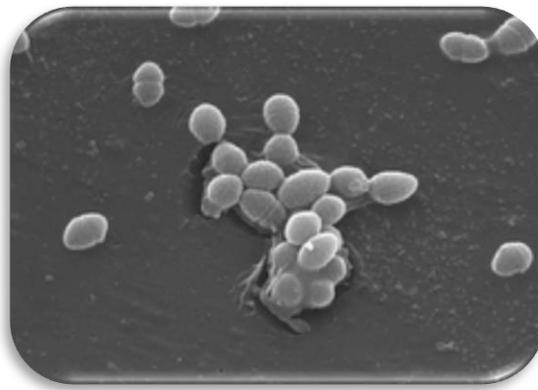


**Figure 11** : Observation microscopique de *Bacillus subtilis* (Gschmeissner, 2013)

### **5-*Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale anaérobie facultative que l'on retrouve naturellement dans la cavité buccale et le tractus gastro-intestinal (Li Zhang,2024).

Cependant, chez les individus sensibles, cette bactérie peut entraîner des infections des voies urinaires, une endocardite infectieuse ou des infections de greffe (Mingxia Deng ,2024) .



**Figure 12 :** *Enterococcusfaecalis*, microscopie électronique à balayage (Schleifer et Kilpper-Bälz., 1984).

### **6-*Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, est une bactérie en forme de bâtonnet, Gram-négatif, fermentant le lactose et possédant une capsule proéminente.

Cette bactérie est typiquement considérée comme un pathogène opportuniste, largement présente dans la bouche, la peau, les intestins, ainsi que sur les dispositifs médicaux en milieu hospitalier.(Bei Li,2014) .

Elle peut produire plusieurs toxines et facteurs de virulence qui contribuent à sa pathogénicité comme les toxines cytotoxiques, les endotoxines, les toxines protéiques. (Bei Li, 2014)

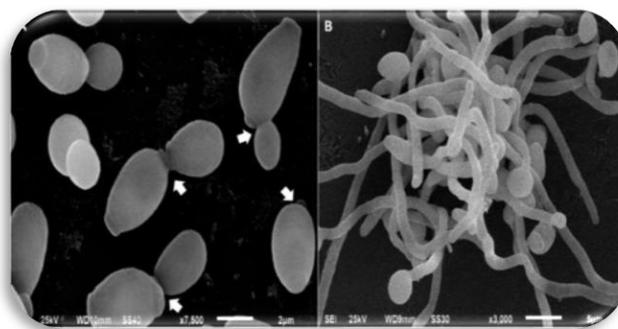


**Figure 13 :** Observation microscopique de *Klebsiella pneumoniae* (Lise, 2022)

### **7 -*Candida albicans***

*Candida albicans*, un champignon diploïde, peut devenir pathogène lorsqu'il passe d'un état commensal à un état pathogène, ce qui se produit généralement lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies.

Dans de nombreux cas, chez les personnes en bonne santé, *C. albicans* se trouve sur la peau ou colonise la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal et urogénital (Yandan Wu and Aimei Sun, 2024).



**Figure 14 :** Cellules de *Candida albicans* observées par microscopie électronique à balayage (Macias-Paz et al., 2023)

---

# *Matériel et méthodes*

---

## 1- Lieu d'étude

Notre lieu d'étude est la grotte de Ghorf El Mit de la région Beni Matharà Tagma (**Figure 15**) qui se trouve à 20 km d'Ain Fezza (Wilaya de Tlemcen), d'une longueur plus que 200 mètres.

La situation géographique de la zone d'échantillonnage et dans **le tableau 4**

**Tableau 4** : Situation géographique de la station d'échantillonnage

Région	Altitude (Mètres )	Latitude ( N)	Longitude	Etage bioclimatique
<b>Tlemcen</b>	<b>800</b>	<b>34° 55'</b>	<b>1° 20' Ouest</b>	<b>Semi-aride</b>



**Figure 15** : carte de la région de Tagma (wilaya de Tlemcen)



**A**



**B**



**C**



**D**

**Figure 16 : Photos de la grotte (A : extérieur de la grotte ; B : entrée de la grotte ; C, D : l'intérieur de la grotte (photo personnelle, 2024))**

## 2- Prélèvement et échantillonnage

A l'aide d'une spatule stérile trois échantillons du sol ont été prélevés à partir de différents endroits de la grotte et enlevés d'une couche superficielle de 4 à 5 cm (**figure 17**) pendant le mois de février ( 13/02/2024) , ensuite ils ont été placés dans des sacs en plastiques stériles et fermés hermétiquement, et conservées au laboratoire à 4°C avant les analyses.

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de recherche LAPRONA (Faculté SNV/STU, Université de Tlemcen) pour étudier les micro-organismes (Actinomycètes) productrices de substances antimicrobiennes isolés à partir du sol.



**Figure 17** : Prélèvement du sol à l'aide d'une spatule stérile (**photo personnelle, 2024**)

### 3-pH du sol

20 g d'échantillon séché ont été mis en suspension dans 50ml d'eau distillée, puis mélangés pour garantir l'uniformité. Après quelques minutes, le surnageant a été utilisé pour mesurer le pH à l'aide d'un pH-mètre numérique (HANNA Inst. pH 209) où l'électrode a été insérée directement dans le surnageant, trois répétitions ont été réalisées.

#### 4-Prétraitement des échantillons de sol

Les échantillons de sol ont été réparti dans des boîtes de Pétri stériles (**figure 18**). Le traitement préliminaire des échantillons de sol est une étape initiale qui permet de choisir les Actinomycètes présents dans les échantillons. Il est nécessaire de les sécher à l'air libre pendant une période de sept jours (**Belyagoubi et al., 2018**)



**Figure 18** : étape de séchage des échantillons du sol  
(Photo personnelle ,2024)

#### 5-Isolement et purification

##### 5.1. Isolement des actinomycètes

Quatre milieux différents sont utilisés pour isoler les actinomycètes, tels que la gélose Bennett, la gélose Tryptic soja (TSA) et projet international *Streptomyces* (ISP2), gélose nutritive gélatine (GNG.) Dans cette étude, chaque milieu contient un antifongique : la nystatine pour inhiber le développement de champignon antagonistes et d'autres microorganismes eucaryotes (**williams etdavis., 1965 ; ouhdouch et al .,2001 ; Badji et al .,2005**) à une concentration de (30 $\mu$ g/mL) ,ainsi que l'acide nalidixique afin de prévenir les bactéries Gram négatif (10  $\mu$ g/mL) . (**Belyagoubi, 2014 et Belyagoubi et al., 2018 ; Djebbah et al., 2021**)

## 5.2. Préparation des dilutions décimales

Pour chaque échantillon, les cultures sont réalisées en utilisant la technique de suspension-dilution. 10 g de sol sec sont dilués dans 90 ml d'eau physiologique stérile ( $\text{NaCl } 9 \text{ g.L}^{-1}$ ), ce qui correspond à une dilution de  $10^{-1}$ . Cette suspension est perçue comme la solution mère. Suite à l'homogénéisation au vortex, une série de dilutions décimales est effectuée dans les tubes contenant l'eau physiologique stérile jusqu'à une dilution de  $10^{-3}$ . ((Belyagoubi et al., 2018 ;Djebbah et al., 2021)

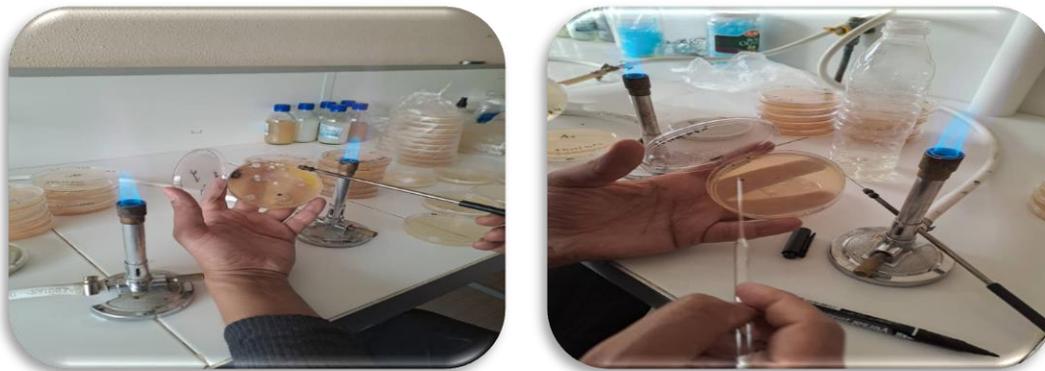
## 5.3. Ensemencement et incubation

Après dilutions,  $1000\mu\text{L}$  de chaque dilution est étalé à la surface des milieux de culture suivants : Bennett, ISP2, gélose nutritive gélatine et TSA.

Ensuite, les boîtes sont incubées à une température de  $28^{\circ}\text{C}$  pendant 28 jours et suivies quotidiennement.

## 5.4. Purification des actinomycètes

Les colonies qui présentent des critères d'actinomycètes (colonies incrustées dans la gélose avec une texture sèche) sont prélevées à nouveau, puis purifiées dans les milieux ISP2 et GNG (figure 19).(Belyagoubi et al.,2018) .



**Figure 19:** la purification dans le milieu : ISP2 et GNG  
(Photo personnelle, 2024)

## 6-Conservation

Les souches ont été conservées de deux manières différentes :

- ✓ en utilisant une gélose inclinée (GNG et ISP2), puis incubé 7 jours à 30°C. les tubes sont ensuite conservés à une température de 4°C pendant deux à trois mois.
- ✓ et pour une conservation de longue durée en utilisant du glycérol (20%) stérile dans des tubes d'ependorf à une température de – 20° à -80°C (V/V) . **(Belyagoubi et al., 2018 ; Bouaziz ,2018 ; Kitouni, 2007).**

## 7-Criblage primaire de l'activité antimicrobienne

### 7.1. Les souches pathogènes testées

Les tests de l'activité antimicrobienne ont été effectués sur des souches de référence citées dans le **tableau 5**.

**Tableau 5:** Les souches utilisées dans les différents tests d'activité Antimicrobienne.

Les microorganisms	Type	Code
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram Negative	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC700603
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram Positive	ATCC 29213
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633

## 7.2. Test d'activité antimicrobienne

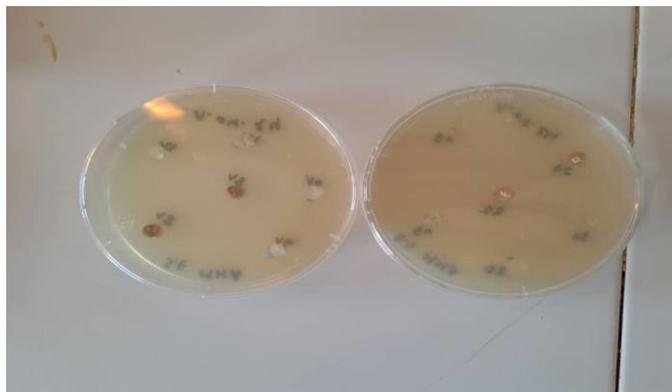
### 7.2.1. Méthode de cylindre d'agar

Le pré-criblage de l'activité des souches a été réalisé en utilisant la technique des cylindres d'agar. On ensemence les souches isolées sur les milieux Bennett, puis on les incube à une température de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  14 jours.

Après incubation, des cylindres de 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile et placés à la surface de la gélose Mueller-Hinton qui a été préalablement ensemencées par les bactéries de référence avec une charge finale de  $10^8$  UFC/mL, tandis que Sabouraud a été ensemencé par la levure (*C.albicans*) pour obtenir une phase de croissance exponentielle avec une charge finale de  $10^6$  UFC/mL (Clsi, 2017). Afin de favoriser une diffusion efficace des substances bioactives présentes dans les cylindres, les boîtes ont été placés à une température de  $4^{\circ}\text{C}$  environ 2 heures. Ensuite, l'incubation se fait à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures pour les bactéries et 48h pour la levure. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés autour des cylindres d'agar (Shomura et al., 1979 ; Saadoun et al moumani., 1997 ; Petrosyan et al., 2003 ; Boudjelal et al., 2011).

Selon CASFM (2022), les résultats de l'antibiogramme sont comparés aux valeurs critiques en fonction du diamètre d'inhibition, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories suivantes : *Sensible*, *Intermédiaire* ou *Résistante*.

Des disques d'ampicilline (10  $\mu\text{g}$ ) ont été employés comme des tests positifs pour les bactéries, tandis que des disques de nystatine (100  $\mu\text{g}$ ) ont été utilisés pour la levure *Candida albicans* .



**Figure 20:** Méthode des cylindres (test d'activité antibactérienne et antifongique)  
(Photo personnelle, 2024)

### 7.2.2. Méthode des puits

Les souches d'actinomycètes sont cultivées dans 5 ml de bouillon Bennett (Belyagoubi , 2014), puis elles sont incubées pendant 14 jours à une température de  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  et agitées tous les 2 heures. On creuse des puits de 9 mm de diamètre dans les milieux tests préalablement ensemencés avec un germe cible. (gélose Muller Hinton pour les bactéries et gélose Sabouraud pour *Candida albicans*).

Chaque puits a été rempli de 200  $\mu\text{L}$  de la culture d'actinomycète (figure 21). Après 30 minutes d'incubation à la température ambiante, les boîtes de Pétri sont incubées à une température de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour *C. albicans*. On mesure donc les diamètres de la zone d'inhibition (Lemriss et al., 2003 ; Valanarasu et al., 2010).



**Figure 21:** méthode des puits  
(Photo personnelle, 2024)

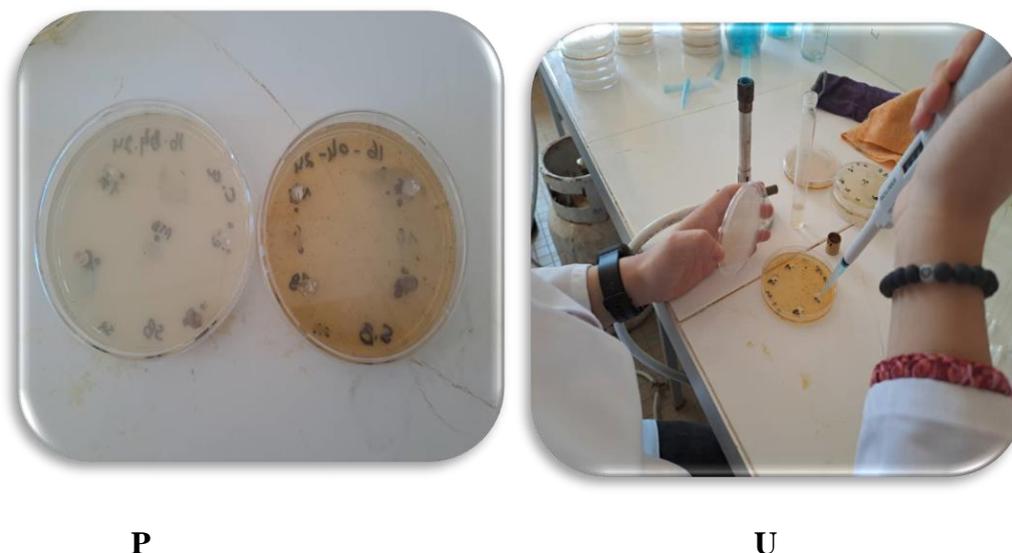
## 8-Criblage secondaire de l'activité antifongique

### 8.1. Criblage des antifongiques non polyéniques

Premièrement les isolats d'actinomycètes possédant une activité antifongique ont été ensemencés sur le milieu Bennett, puis incubées pendant 14 jours à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Après incubation des disques de 6mm de diamètre de la culture des actinomycètes ont été déposés à la surface de deux types de boîtes. Le même criblage a été répété par la méthode des puits :

- Des boîtes contenant le milieu Sabouraud ensemencés par *Candida albicans*
- Des boîtes contenant le milieu Sabouraud additionné d'ergostérol à raison de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puis ensemencés par *Candida albicans*.

Les boîtes ont été placées à  $4^\circ\text{C}$  pendant 2heurs pour faciliter la diffusion des substances bioactives. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés après incubation à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 48 heures pour *C.albicans* (Boudemagh, 2007).



**Figure 22:** P: méthode cylindre d'agar (avec et sans ergostérol), U: méthode des puits (avec et sans ergostérol)  
(Photo personnelle, 2024)

## 9-Identification de souches actinomycétales actives

### 9.1. Critères morphologiques

Les caractéristiques culturelles (croissance, couleur des mycélia aériens et du substrat, ainsi que celle des pigments diffusibles) et micro morphologiques (sporulation, agencement des spores, fragmentation ou non des mycélia) des isolats d'actinobactéries choisis ont été étudiées sur les milieux recommandés lors de projet international *Streptomyces* (ISP), à savoir l'ISP2 et Bennett (Shirling et Gottlieb., 1966), ainsi que sur la gélose nutritive gélatine (GNG) (Waksman, 1961).

### 9.2. Etude macromorphologie

Cette étude vise à observer la croissance de la souche lors des 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours d'incubation à 28°C, ainsi que l'aspect et la couleur des mycéliums aériens et du substrat, ainsi que la production et la couleur des pigments diffusibles dans les milieux (s'ils sont sécrétés). On détermine les couleurs des mycéliums aériens et du substrat en utilisant la

charte de couleurs (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC -NBS) développée par (Kelly et Judd ., 1976).

### **9.3. Etude micro morphologique**

- **Mode de fonctionnement 'Coloration de Gram '**
  - ✓ Préparer et fixer un frottis bactérien sur une lame devant un bec benzène.
  - ✓ Ensuite, recouvrir avec du violet de Gentiane pendant une minute. Rincer avec de l'eau distillée Pendant une minute,
  - ✓ Ajoutez du Lugol, puis rincez avec de l'eau distillée.
  - ✓ Utilisez de l'alcool pendant 30 secondes, puis rincez-le à l'eau.
  - ✓ Recolez avec de la Fuschine pendant 1 minute, puis rincez-le à l'eau.

Le mode bactérien se divise principalement en deux groupes (gram + et gram -) en raison d'une variation de la structure chimique des parois cellulaires des bactéries. Grâce à cette coloration, les bactéries peuvent être classées en fonction de leur aptitude à fixer le violet de Gentiane. Les enveloppes externes sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), tandis que celles qui n'ont pas sont protégées par le colorant (Gram+) (Camille, 2007)

Le microscope optique a été utilisé pour observer les mycéliums et les spores, Après coloration à Gram (Gx1000) (Djebahh, 2022).

## **10-Critères physiologiques et biochimiques**

### **10.1. Critères physiologiques**

#### **10.1.1. Hydrolyse de gélatine**

Les souches sont ensemencées sur gélose nutritive contenant 0,4% de gélatine, puis incubées pendant 14 jours à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est accompagnée. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine. (Williams et Cross., 1971)

### 10.1.2. Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de lait écrémé (Candia silhouette) à 10% sont ensemencés et incubés de 30° à 37°C. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation ou la peptonisation du lait provoquée par les souches (Gordon et Smith., 1953 ; Williams et Cross., 1971)



Figure 23: Photo du lait écrémé (photo personnelle, 2024)

## 10.2. Critères biochimique

### 10.2.1. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

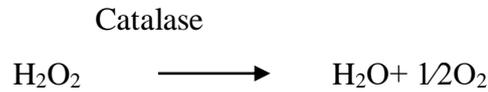
La pente du milieu de citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse de platine avec l'inoculum de souche. L'incubation s'effectue de 30° à 37° C. La croissance est observée quotidiennement pendant une période de deux semaines.(wauters et al.,2005)



Figure 24: Photo du citrate de Simmons  
(Photo personnelle, 2024)

### 10.2.2. Recherche de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Cette enzyme permet la dégradation du  $H_2O_2$  qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air:



Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîche de  $H_2O_2$  à 10 volumes : une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousseau de bulle traduit la décomposition de dioxygène: le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles: le test catalase est négatif (**Delarras, 2007**).

### 10.2.3 .Recherche d'oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. Le test est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet, l'idophénol.

On dépose sur une lame porte-objet propre, un disque Ox et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile, ensuite, on enlève un morceau de la souche à étudier à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir : test oxydase +. (**Delarras, 2007**).

---

# *Résultats et discussion*

---

## 1-pH du sol

Le **tableau 6** récapitule la moyenne de pH des échantillons prélevés.

On constate que l'endroit des prélèvements représente des écosystèmes riches en débris végétaux et matières organiques, ils se caractérisent par des pH proche à la neutralité.

Le pH est un facteur crucial dans la production de métabolites secondaires par divers mycètes (**Dumenil et Sanglier, 1989**). De faibles variations de pH peuvent avoir des effets particuliers sur la productivité d'une souche (**Hata et al., 1971**).

**Tableau 6** : Le pH de l'échantillon du sol.

Échantillon	pH
E1	7.3
E2	7.56
E3	7.3

## 2-Prétraitement du sol

L'isolement des bactéries actinomycétales productrices de substances bioactives dans des écosystèmes extrêmes nécessite une méthode performante (**Kitouni , 2007**) afin de faciliter leur sélection, et pour évaluer l'activité des souches antibactériennes et antifongiques.

Pour augmenter le rapport entre les actinomycètes et le taux de microorganismes dans un échantillon, on met en œuvre trois stratégies :

- ❖ En utilisant des prétraitements chimiques tels que le carbonate de sodium et le phénol, ou des méthodes physiques comme la centrifugation différentielle des échantillons (**Cavalla et Eberlin., 1994**).

- ❖ En utilisant certaines sources de carbone et d'azote dans le milieu de culture telles que l'amidon, la chitine, le glycérol, la caséine, l'arginine et l'asparagine, afin de favoriser la

croissance des bactéries et de rendre le milieu plus sélectif pour l'isolement des actinomycètes (**Cavalla et Eberlin., 1994**).

❖ Ou en utilisant des antibiotiques pour inhiber la croissance des bactéries, des champignons (**Larpent et Larpent-Gourgaud., 1990**)

Les actinomycètes ont une croissance lente, en raison de leurs nécessités d'un temps d'incubation prolongé. (**Lee et Hwang., 2002**).

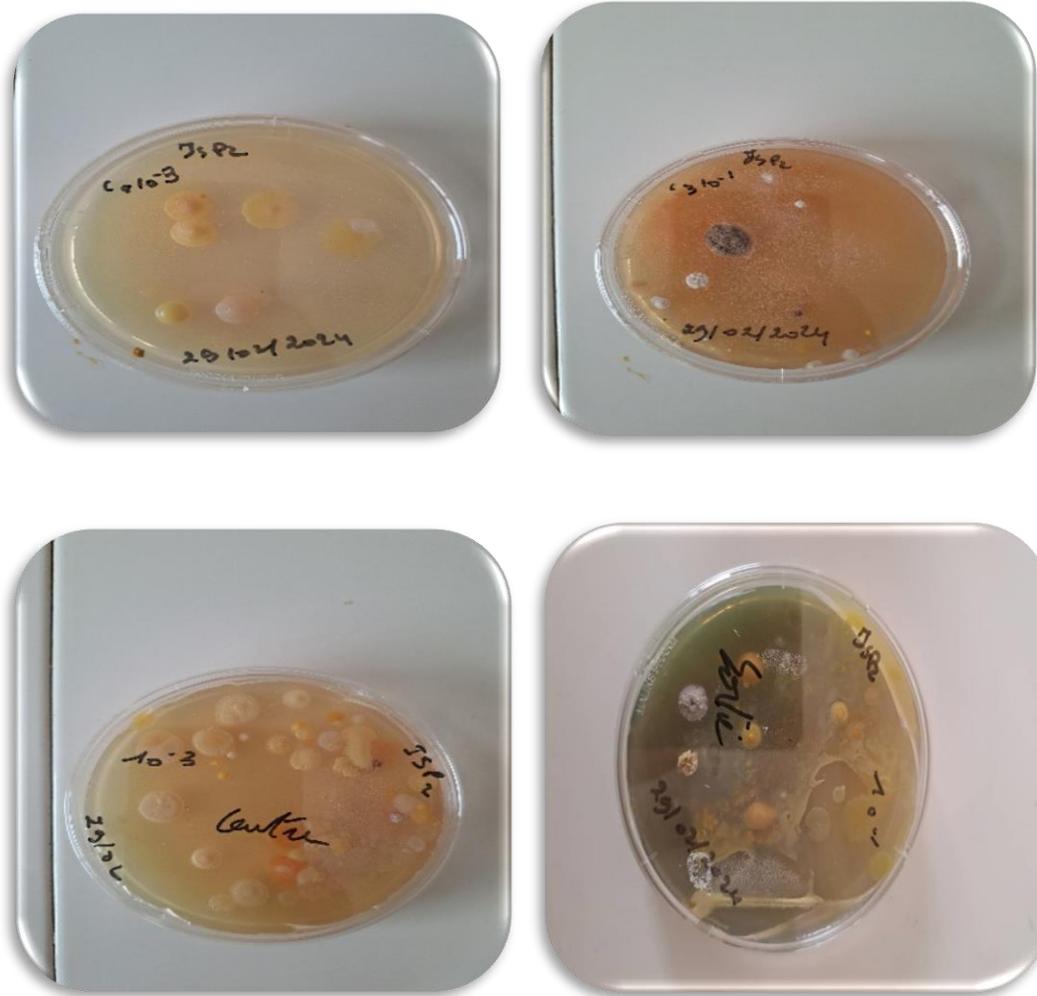
Dans cette étude, on a utilisé un prétraitement physique, c'est le séchage à l'air libre.

Le séchage des échantillons de sol à l'air libre pendant sept jours vise à réduire la présence de la flore bactérienne. Les conidiospores des actinomycètes résistent mieux à la dessiccation que les autres bactéries, qui sont plus sensibles à ce traitement (**Khanna et al., 2011**). Les recherches de (**Fan et al., 2010**) ont montré qu'un séchage des échantillons de sol pendant 7 à 21 jours réduisait considérablement le nombre de champignons et de bactéries. De plus, l'utilisation de milieux sélectifs avec l'ajout d'antibiotiques était nécessaire.

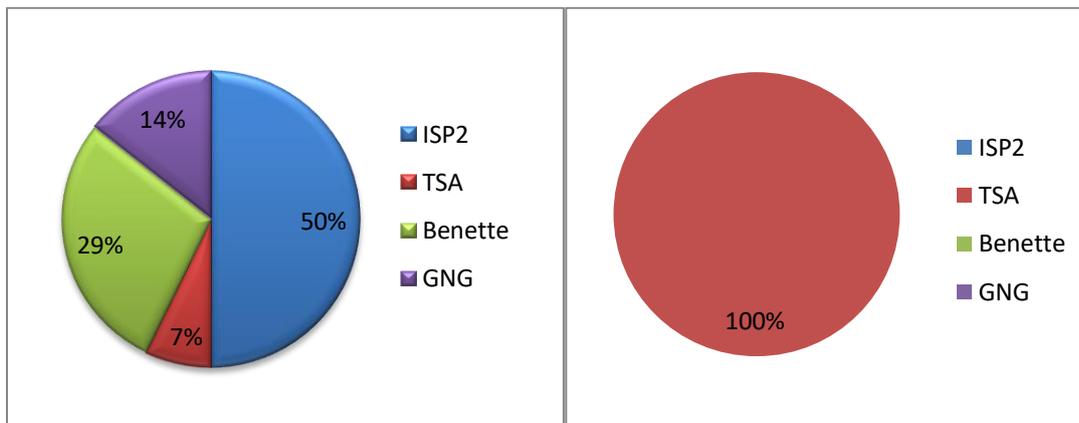
### **3-Résultats d'isolement des actinomycètes**

Les actinomycètes, des bactéries mycéliennes à Gram positif présentent une grande activité en raison de leur capacité à produire des métabolites secondaires avec une variété de structures chimiques. Les antibiotiques antibactériens et antifongiques sont principalement produits par eux même, 70% des molécules actives sont commercialisés. (**Aouiche et al., 2012**).

Après 28 jours d'incubation à 28° C, les actinomycètes croissent progressivement. Les colonies d'actinomycètes sont identifiées par leur aspect morphologique distinctif. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou incolores, adhérent à la gélose et présentent à la fois un mycélium végétatif et aérien. Certaines colonies ne montrent que le mycélium du substrat (**Boudemagh, 2007**). Après elles ont été dénombrées et purifiées dans les milieux ISP2 et GNG, afin d'obtenir des souches pures pour la conservation. (**Ktouni Mahmoud,2007**).

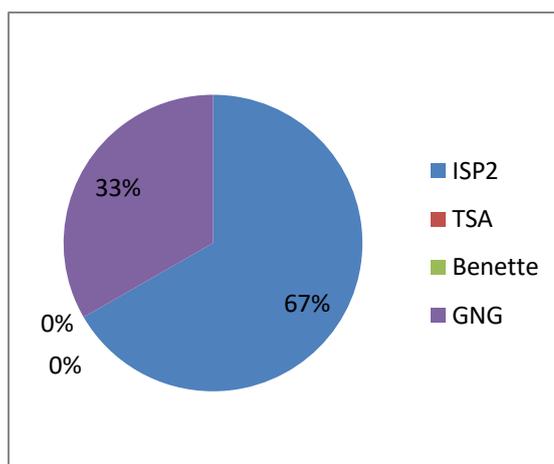


**Figure 25:** Photo d'isolement des actinomycètes du sol sur le milieu ISP2  
(Photo personnelle, 2024)



**Figure 26 :** Pourcentage des souches  
Isolées par milieu de culture  
À partir d'échantillon E1 du sol.

**Figure 27 :** Pourcentage des souches  
Isolées par milieu de culture  
À partir d'échantillon E2 du sol.



**Figure 28 :** Pourcentage des souches isolées par milieu de culture à partir d'échantillon E3 du sol.

Les résultats des **figures 26 et 28** montrent que les échantillons (**1 et 3**) du sol présentent un nombre élevé des souches isolées respectivement (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A21, A26, A27) à partir des milieux ISP2 et GNG, bien que, aucune souche n'a été isolée sur l'échantillon (**2**) du sol sur ces milieux de cultures. (**Figure 27**). Aussi, on observe que, dans l'échantillon (**1**) du sol (**figure 26**), le milieu Bennett est le plus favorable à l'isolement des souches actinomycétales A30, A31(2), A32, A33 par rapport aux échantillons (**2 et 3**) du sol (**figure 27 et 28**) et pour le milieu de culture TSA, on constate que les résultats obtenus dans la (**figure 27**) montrent une très bonne croissance de la souche A6(18) sur l'échantillon (**2**) que celle A9(19) sur l'échantillon (**1**). Selon **Laiz et al (1999)** cette différence de communauté est probablement due aux conditions environnementales spécifiques de la grotte, telles que sa température relativement basse et stable, sa teneur en matière organique et son taux d'humidité élevé.

Dix huit isolats d'actinomycètes ont été obtenus à partir d'échantillons de sol (**figure 29**) prélevés dans la grotte de Tagema avec quatre milieux de cultures sélectives additionnées d'antifongique (nystatine) ont été utilisées, plusieurs colonies ont été repérées d'après leur aspect macroscopique (colonies dures incrustées dans la gélose), et leur aspect microscopique (aspect filamenteux à coloration de Gram positive).

Le meilleur milieu qui a permis l'isolement des actinomycètes de cette zone extrême était le milieu ISP2. Les résultats sont mentionnés dans la (figure 31) ci-dessous.

Passari et al., (2018) ont montré qu'ISP2 a été efficacement utilisé comme milieu d'isolement des actinomycètes. De plus, ce milieu a été utilisé pour isoler certaines espèces nouvelles en particulier *Amycolatopsis xuchangensis* et *Amycolatopsis jiguanensis*,

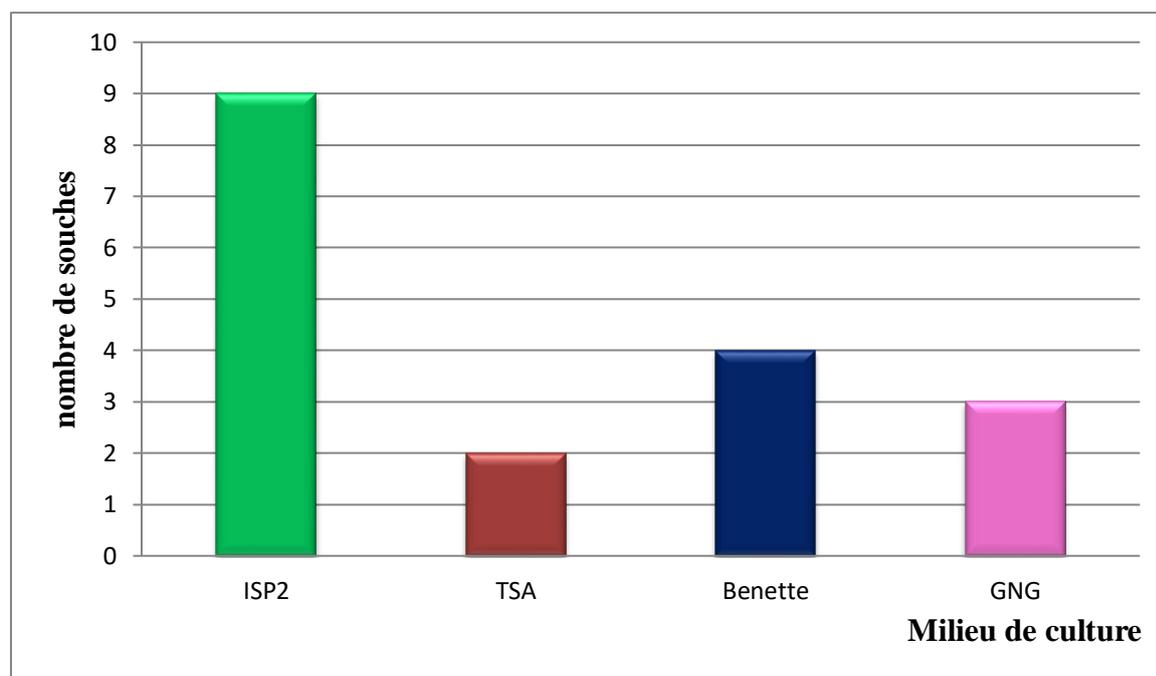


Figure 29 : Nombre de souches d'actinomycètes isolées à partir des milieux des cultures

L'usage d'antibiotiques pour isoler les actinomycètes est un sujet controversé. Selon Porter et al (1960) la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, Dulaney et al (1955) ainsi que Williams et Davies (1965) suggèrent l'utilisation d'un mélange d'antifongiques et d'antibactériens pour isoler les actinomycètes.

La nystatine et l'acide nalidixique ajoutées au milieu ont respectivement inhibées la croissance des champignons et les bactéries à gram négatif,

D'après les travaux de Boudemagh et al (2013), dans les milieux où la nystatine a été ajoutée, le nombre d'actinomycètes isolés augmente en présence de l'acide nalidixique de  $18,10^4$  cfu.g<sup>-1</sup> colonies à  $21,10^4$  cfu.g<sup>-1</sup> sans traitement d'échantillons avec chaleur et  $4,10^4$ cfu.g<sup>-1</sup> colonies à  $8,10^4$  cfu.g<sup>-1</sup> lorsque les échantillons sont traités thermiquement.

Les résultats obtenus par **Belyagoubi et al (2018)**, à partir de la grotte de Chaabe Montrent que 28 souches d'actinomycètes ont été isolées, cela peut s'expliquer par sa forte teneur en matière organique .Ceci est confirmée par plusieurs études qui montrent que le nombre d'actinomycètes est positivement corrélé avec le pourcentage de matière Organique. (**Lee et Hwang., 2002 ; George et al., 2010**).

Le screening ciblé est une stratégie largement utilisée dans de nombreux laboratoires, car elle permet d'isoler de manière sélective des genres spécifiques. Il est également utile pour évaluer la biodiversité microbienne d'un échantillon donné. Par exemple, les zones rhizosphériques sont environ dix fois plus riches en actinomycètes que les zones non rhizosphériques et profondes (**Chelli, 2010**).

Dans nos travaux, nous avons opté pour un criblage ciblé en utilisant quatre milieux d'isolement différents afin de détecter la présence ou l'absence de genres rares d'actinomycètes dans le sol des grottes. Selon (**Cross ,1982**), pour isoler certains genres d'actinomycètes, il est recommandé de varier les stratégies et les milieux d'isolement au sein du même screening. Cela permet d'augmenter les chances d'isoler la plupart des actinomycètes présents dans l'échantillon.

**Tableau 7** : origine des souches actinomycétales

Code de la souche	Origine	Milieu	Dilution	Aspect des colonies
<b>A1</b>	Centre Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Grise-contour bleu
<b>A2</b>	Centre Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Noir – grandetaille
<b>A3</b>	Centre Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Grise-taillemoyenne
<b>A4</b>	Centre Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Grise-centre bleu
<b>A5</b>	Centre Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Noire-petite taille
<b>A6</b>	Entrée Tagma	TSA	10 <sup>-3</sup>	Blanche-grandetaille
<b>A7</b>	Sortie Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Jaune-taillemoyenne
<b>A8</b>	Sortie Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Grise
<b>A9</b>	Centre Tagma	TSA	10 <sup>-1</sup>	Blanche-grande-centremarron
<b>A10</b>	Centre Tagma	ISP2	10 <sup>-3</sup>	Grise –petite
<b>A21</b>	Sortie Tagma	GNG	10 <sup>-1</sup>	Blanche petite
<b>A26</b>	Centre Tagma	GNG	10 <sup>-1</sup>	Bleu transparente-petite
<b>A27</b>	Centre Tagma	GNG	10 <sup>-1</sup>	Bleu-petite
<b>A30</b>	Centre Tagma	Benett	10 <sup>-1</sup>	Petite-grisefoncée
<b>A31</b>	Centre Tagma	Benett	10 <sup>-1</sup>	Petite-griseclaire
<b>A32</b>	Centre Tagma	Benett	10 <sup>-1</sup>	Bleu
<b>A33</b>	Centre Tagma	Benett	10 <sup>-1</sup>	Marron
<b>A35</b>	Centre Tagma	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Blanche –grande

## 5-Tests d'activité antimicrobienne

L'objectif de ce travail qui consistait à isoler à partir d'un écosystème extrême des souches d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes a été en grande partie atteint.

Depuis, la découverte de la streptomycine par l'équipe de **Waksman en 1943** à partir de bactéries du sol du genre *Streptomyces* et l'isolement de la nystatine, le premier antibiotique antifongique, par **Hazen et Brown en 1951** à partir de *Streptomyces noursei*, également provenant du sol, de nombreuses études ont été menées sur des souches d'actinomycètes d'origine terrestre. Plusieurs types de sol (forêts, boue, lac), voire des milieux extrêmes (désert), ont été étudiés dans l'espoir de trouver de nouvelles souches produisant de nouveaux produits (**Oswald et al., 1968 ; Hacène et al., 1994 ; Chiba et al., 1999 ; Hwang et al., 2001 ; Lee et Hwang., 2002 ; Meklat et al., 2011, Suela Silva, 2013**).

On a démontré l'activité antibactérienne et antifongique des souches actinomycétales isolées et purifiées en utilisant la technique des cylindres d'agar et la technique des puits. Les deux techniques sont utilisées pour diffuser dans un environnement gélosé.

Seule la première méthode nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches testées contre des bactéries-tests et la levure-test (**kitouni, 2005**)

L'activité antimicrobienne de ces souches actinomycétales doit être testée vis-à-vis d'autres bactéries pathogènes et sur d'autres milieux de culture. En effet, il est maintenant bien établi que la composition du milieu de culture peut affecter la production d'antibiotiques par les actinomycètes (**Singh et al., 2009**).

Selon certains auteurs, il existe une corrélation étroite entre l'activité antimicrobienne des actinomycètes et leur environnement naturel (facteurs physico-chimiques et biologiques) (**Boughachiche et al.,2005** )

### 5.1. Méthode de Cylindre d'agar

D'après les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 8** les souches A6(18).A9(19) et A31(2) ont une variété d'activité antibactérienne contre les bactéries- tests et antifongique contre le champignon-test.

- En Algérie, de nombreuses souches de *Streptomyces* ont été isolées à partir de sols, d'eau et d'écorces d'arbres, démontrant des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes contre différents microorganismes pathogènes (**Aouich, 2012**).

Selon les résultats de l'antibiogramme des souches pathogènes, il est démontré que toutes les souches pathogènes à coloration de Gram positive et négative, présentent une résistance importante contre la souche actinomycétale A6(18). par contre A6(18) possède une activité antifongique, elle inhibe uniquement *Candida Albicans* avec une zone d'inhibition comprise entre 8 et 9 mm.

Aussi la souche A9(19) présente une activité antifongique plus forte contre *C.albicans* avec une zone d'inhibition comprise entre 12 et 13 mm. On observe les mêmes résultats de **Aouiche (2012)** ou les études phénotypiques et moléculaires ont montré que l'isolat PAL111 est étroitement apparenté à la souche type de *Streptomyces ambofaciens* . Il a montré une forte activité contre *Candida albicans* , les champignons filamenteux et les bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

- ❖ D'un autre côté, les souches actinomycétales A9(19) et A31(2) présentent une activité antibactérienne plus forte contre *E.coli* (gram-), avec des zones d'inhibition mesurant entre 11 et 13 mm pour A9(19) et 10-11 mm pour A31(2). . On observe les mêmes résultats dans les recherches menées par **Oskay et al (2004)**, où sur 17 souches d'actinomycètes isolées du sol de Turquie, seules deux souches étaient actives sur *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition allant de 15 à 26 mm.

De plus, la souche A31(2) présente une activité contre la bactérie à gram + *Staphylococcus aureus*, avec des zones d'inhibition mesurant entre 11 et 13 mm. D'après les résultats de **Denizci(1996)**, parmi les 356 espèces de *Streptomyces* isolées, 36% des isolats présentent des propriétés antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* (20,78%) et *E. coli* (2,52%).

Effectivement, la membrane extérieure des bactéries Gram négatif est composée de polysaccharides, ce qui rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles. Cependant, les bactéries Gram positif ne possèdent qu'une couche de peptidoglycane externe, ce qui ne constitue pas une barrière de perméabilité efficace (**Omar Messaoudi et al., 2015**).

❖ Il est intéressant de noter l'absence de corrélation entre la résistance des microorganismes- cibles aux antibiotiques et leur sensibilité à l'action de l'isolat, Il est possible que l'isolat d'actinomycète produise des antibiotiques différents de ceux auxquels les germes-cibles sont résistants(**Aouiche,2012**) . sont en accord avec nos résultats.

Les souches actinomycétales A6(18) et A9(19) ont un spectre d'activité antifongique plus forte contre *Candida Albicans*, avec des zones d'inhibition allant de 8 à 13 mm de diamètre. Cependant, la souche *C.albicans* présente également une résistance à la souche actinomycétale A31(2).

❖ Selon **Duraipandiyan et al (2010)**, la présence de *Bacillus sp.* dans le sol himalayan fabrique également des antibiotiques vis-à-vis les souches pathogènes. L'isolat de *Bacillus* produit des métabolites et possède des activités antimicrobiennes contre diverses bactéries. *Bacille sp.*est généralement considéré comme un micro-organisme saprophyte aérobie du sol.

❖ D'après les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne, *P. aeruginosa* était la plus résistante. Les résultats menés par **Şahin et Uçur (2003)** sont en accord avec nos résultats.

❖ Selon les résultats obtenus par **Belyagoubi et al (2018)**, ils ont démontré que les actinomycètes prélevés dans la grotte de Chaabe étaient actifs au moins contre l'un des microorganismes testés, avec une faible activité contre les bactéries Gram négatives. Toutefois, ils ont observé l'absence d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui concorde avec les résultats obtenus dans cette étude aussi.

❖ Par ailleurs, les résultats de cette évaluation indiquent également que l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes examinées dépend en fonction de la méthode employée (Lemriss et al., 2003). De cette manière, nos résultats révèlent également une variété des résultats en fonction de la méthode utilisée. La méthode des cylindres d'agar est plus adaptée que la méthode des puits (tableau 8) pour évaluer la sensibilité des souches microbiennes aux molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes testées.

Le tableau 8 présent les résultats d'activité antibactérienne des actinomycètes isolés

**Tableau8:** résultats d'activité antibactérienne des actinomycètes isolés (diamètre en mm) cylindres –puits

	Souches	<i>E.faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.Coli</i>	<i>K.Pneumonia</i>	<i>C.albicans</i>
Cylindres	A6 (18)	0±0 R	0±0 R	0±0 R	0±0 R	0±0 R	0±0 R	8.5±0.7 S
	A9 (19)	0±0 R	0±0 R	0±0 R	0±0 R	12±1.4 S	0±0 R	12.5±0.7 S
	A31 (2)	0±0 R	12±1.4 S	0±0 R	0±0 R	10.5±0.7 S	0±0 R	0±0 R
Puits	A6 (18)	0	0	0	0	0	0	0
	A9 (19)	0	0	0	0	0	0	0
	A31 (2)	0	0	0	0	0	0	0



A'



A''



A'''

**Figure 30:**A': effet de la souche A6 (18) sur *candida albicans* -A'' : Action de la souche A31(2) sur *E.coli* et sur *S.E*- A''' : Action de la souche A9(19) sur *E.coli* et *Candida albicans* (photo personnelle, 2024)

## 5.2. Méthode des puits

Concernant la méthode des puits aucune zone d'inhibition n'a été observée contre des germes cibles.

## 5.3. La sensibilité des souches pathogènes aux antibiotiques

Le tableau 9 montre les résultats de la sensibilité des souches pathogènes aux antibiotiques

**Tableau 9:** Résultats de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries tests et aux antifongiques de la levure (diamètre en mm)

	ATB/ATF	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>B.s</i>	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>K.p</i>	<i>C.a</i>
<i>Disques</i>	Amp (ATB)	0±0 R	13±0 S	0±0 R	0±0 R	0±0 R	0±0 R	0
	Nys (ATF)	0	0	0	0	0	0	10.5±0.7

Selon les résultats de l'antibiogramme des souches pathogènes, il est démontré que Toutes les souches pathogènes présentent une résistance importante contre l'ampicilline. A l'exception de *E.coli* pathogène est sensible à AMP (active) avec des zones d'inhibition mesurant de 13 à 13 mm de diamètre. Aussi il ressort que la souche *Candida albicans* est sensible à la nystatine, ce qui en fait un témoin positif de choix.



**Figure 31:** Sensibilité aux antibiotiques des bactéries tests et aux antifongiques de la levure (photo personnelle, 2024)

## 6-Test d'inhibition d'activité ATF par l'ergostérol

Bien que la communauté scientifique soit constamment à la recherche de nouvelles molécules à activité antifongique, le nombre de cibles cellulaires utilisables est limité pour satisfaire aux critères de toxicité chez le patient. de cette manière, le traitement des infections fongiques repose à l'heure actuelle sur l'emploi de quatre types de molécules Patrick (Vandeputte , 2008).

Les polyènes sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. Plus de 200 composés chimiques de la classe des polyènes, que l'on trouve principalement chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une action antifongique.

Mais seulement trois molécules polyéniques présentent une toxicité assez faible pour être utilisées en clinique : Amphotéricine B (AmB), nystatine et natamycine.

- **Leur mode d'action**

Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal constituant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en créant des pores. Les données de résonance magnétique nucléaire indiquent que 8 molécules d'AmB s'associent à 8

molécules d'ergostérol par leur partie polyénique tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central de 70 à 100 nm de diamètre. La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite de composants intracellulaires, et notamment d'ions K<sup>+</sup>, à l'origine de la lyse cellulaire (Lemke et al., 2005).

- ✓ L'ajout de l'ergostérol dans le milieu va inhiber l'activité antifongique en interférant avec les substances polyéniques produites par les isolats, ce qui réduit les diamètres d'inhibition ou inhibe complètement l'activité. Cependant, si les isolats ne fabriquent aucune molécule polyénique, donc aucune d'interaction et les diamètres des zones d'inhibition restent les mêmes (Hamilton-Miller, 1974).

- Les résultats du tableau 10 montrent que les isolats A6(18) et A9(19) qui présentent une activité antifongique lors du screening primaire ont subi un criblage des antifongiques de nature non polyénique. Leur activité antifongique a disparue en présence de l'ergostérol.

**Tableau 10:** Résultats d'inhibition d'activité ATF par l'ergostérol

Les souches	Sans ergostérol		Avec ergostérol	
	A6 (18)	A9 (19)	A6 (18)	A9 (19)
Cylindres	8.5±0.7	12.5±0.7	00±00	00±00
Puits	0	0	0	0



**Figure 32** : inhibition de l'activité ATF avant et après l'ajout de l'ergostérol  
(Méthode des cylindres + puits)  
(Photo personnelle, 2024)

## 7-Résultats d'identification des souches d'actinomycètes

On a procédé à l'identification morphologique, physiologique et biochimique des souches d'actinomycètes les plus actives sur les microorganismes pathogènes testés, ainsi que sur les représentants de chaque groupe d'actinomycètes de forme similaire.

### 7.1. Caractères morphologiques

#### 7.1.1. Etude macromorphologique

Les colonies des souches actinomycètes actives (décrites précédemment) apparaissent après 28 jours d'incubation à 28°C après l'ensemencement sur les milieux gélosés Bennett et TSA. Les premiers signes de croissance sont la formation de colonies pâteuses. La plupart des souches produisent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes couleurs de mycélium aérien (blanc, marron, gris) au 14<sup>ème</sup> jour. La taille moyenne des colonies varie généralement de 1 à 5 mm.

- ✓ La description des souches repose sur les caractéristiques morphologiques présentées dans le tableau suivant

Le tableau 11 montre les résultats de l'étude d'aspect macroscopique (couleur, taille) des souches isolées.

Tableau 11: Résultats de l'étude d'aspect macroscopique des isolats

Code de la souche	Source	Aspect macroscopique
A9 (19)	Centre TSA10 <sup>-1</sup>	Colonie Blanche avec un centre marron de grande taille incrusté dans la gélose
A 6 (18)	Entrée TSA10 <sup>-3</sup>	Colonie Blanche de grande taille incrustée dans la gélose
A 31 (2)	Centre Benett10 <sup>-1</sup>	Colonie gris claire de petite taille incrustée dans la gélose

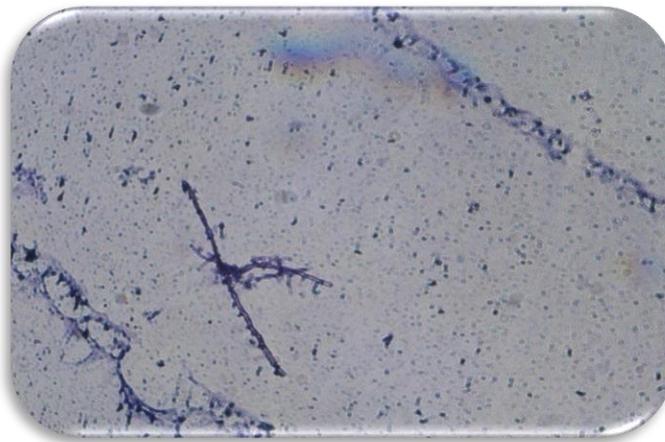


Figure 33: Aspect macroscopique des souches "Aspect des mycéliums"(photo personnelle, 2024)

## 7.1.2. Etude microscopique

### 7.1.2.1. Résultats de coloration de Gram

Les résultats de l'observation microscopique après une coloration de Gram indiquent que toutes les souches actinomycétales sont probablement du genre *streptomyces*, et des Gram positifs, et tout ça montrer dans **la figure 34** la souche A31(2) les mycéliums et les spores ont été observés au microscope optique (**G x 1000**).



**Figure 34:** Observation microscopique de la souche actinomycétale A31(2) (G× 1000) après coloration de Gram. (photo personnelle , 2024 )

**Remarque :** les souches A6(18) et A9(19) non pas réalisées

## 7.2. Critères physiologiques et biochimiques

Les souches isolées ont subi des tests pour leur activité antimicrobienne, puis elles ont également été caractérisées sur le plan physiologique et biochimique.

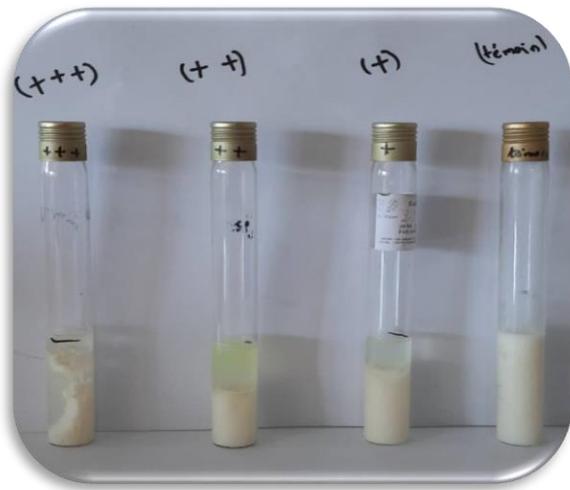
Les résultats de l'identification sont indiqués dans le **tableau 12** ci-dessous

**Tableau 12** : Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales

<i>Caractéristiques</i>	<i>T</i>	<i>Souches</i>		
		A6 (18)	A9 (19)	A31 (2)
Source de Carbone Citrate	-	-	-	+
Coagulation du lait	-	+	+	+
Hydrolyse de gélatine	-	0	0	0
Recherche du catalase	-	+	+	+
Recherche d'oxydase	-	+	+	+

(-) : Test négatif, (+) : Test positif, (T) : Témoin, / : Test non réalisé

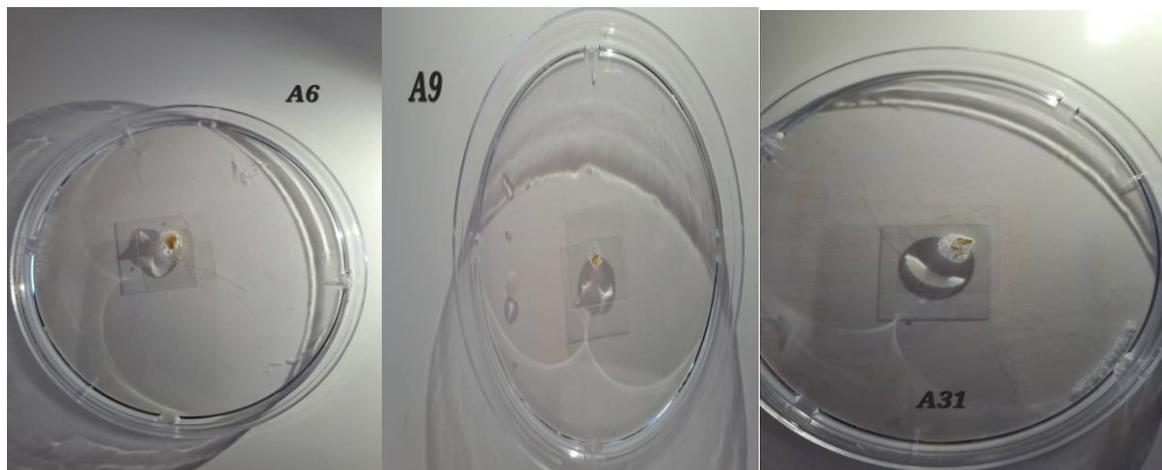
Selon les résultats, la souche actinomycétale A31(2) cultivée utilise le citrate comme source de carbone, à l'exception des souches A6(18) et A9(19) qui n'ont pas pu utiliser le citrate. De plus, toutes les souches elles ont également une action sur le lait écrémé en provoquant la coagulation (enzyme la présure), car toutes les souches hydrolysent la caséine. Avec une catalase et une oxydase positives. Concernant la recherche d'hydrolyse de la gélatine, le test est non réalisé.



**Figure 35** : coagulation du lait écrémé  
(Photo personnelle ,2024)



**Figure 36** : utilisation du citrate comme  
Une source de carbone (photo  
Personnelle, 2024)



**Figure 37**: résultat du test catalase (photo personnelle, 2024)

---

*Conclusion et  
perspectives*

---

La résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeute pour lequel il est normalement sensible; la propagation de ses bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure.

L'exploration de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'hôte semble toujours indispensable.

Les actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres secondaires métabolites. Les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés sont produits par les actinomycètes.

L'objectif de ce travail a été le criblage de souches d'actinomycètes à activité antibactérienne et antifongique à partir du sol de grotte **Ghorf El Mit** de la région de **Tagema Tlemcen**. Nous avons procédé à l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité biologique des souches sur des microorganismes pathogènes par deux méthodes de diffusion sur agar.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée contre les bactéries pathogènes suivantes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'une levure, *Candida albicans*.

Trois souches actinomycétales sur 18 isolats sont présentés une activité antimicrobienne : les souches A6(18) -A9(19)- A31(2).

Les résultats des examens morphologiques, physiologiques et biochimiques des Bactéries étudiées indiquent que les actinomycètes isolées du sol font partie probablement au genre *Streptomyces* qui désigne des bactéries filamenteuses Gram positif saprophyte non pathogène abondant sont principalement retrouvées dans les couches superficielles des sols où leur développement et leur dispersion sont facilités par leur croissance mycélienne et leur capacité de sporulation.

L'identification est effectuée essentiellement, en se basant sur des critères morphologiques et physiologiques sur des milieux spécifiques.

Cette étude préliminaire mérite d'être approfondie en ce qui concerne :

- Identification moléculaire des diverses souches d'actinomycètes
- Isolement et sélection des souches d'actinomycètes de grotte, selon leur profil d'activité antimicrobienne.
- Les compétences acquises dans ce domaine peuvent être utilisées pour étudier la biodiversité des bactéries actinomycétales et leurs métabolites secondaires à activité biologique

---

*Références*  
*Bibliographiques*

---

- 1- Abbott, RC, Chomel, BB, Kasten, RW, Floyd-Hawkins, KA, Kikuchi, Y., Koehler, JE et Pedersen, NC (1997). Infection expérimentale et naturelle à *Bartonella henselae* chez le chat domestique. *Immunologie comparée, Microbiologie et maladies infectieuses*, 20 (1), 41-51.
- 2- Abdelkhalek M. (2017) . Isolement des microorganismes (actinomycètes et mycètes) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte kaws – Honaine . Mémoire de master, Spécialité en Microbiologie .Université ABOU BAKR BELKAID-tlemcen,Département de biologie . p 10 -34 -56-57
- 3- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J. P., Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*, 13(10), 677.p1
- 4- Alonso, L. (2018). Hétérogénéité spatio-temporelle du microbiote de la grotte de Lascaux (Thèse de doctorat, Université de Lyon). p1-9-12-13-14
- 5- Amara,S et Benchikh M (2023). Isolement des moisissures productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Grotte d'Ighzer – Timimoun. Mémoire de master, Spécialité en Microbiologie .Université ABOU BAKR BELKAID-tlemcen,Département de biologie . p15 -19
- 6- Andrewes et Horder, (1906) Schleifer et Kilpper-Bälz, (1984).*Enterococcus faecalis*.  
[https://fr.wikipedia.org/wiki/Enterococcus\\_faecalis](https://fr.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis)
- 7- Bakdi K ,2016. Evaluation de l'activité antimicrobienne et de la capacité de production enzymatique des Actinomycètes.mémoire de master.Spécialité: Biotechnologie Microbienne. Spécialité en Biotechnologie Microbienne. Département de Biochimie – Microbiologie .P54
- 8- Bary, A. (1866). Morphologie und physiologie der pilze,flechtenundmyxomyceten (Vol. 1). W. Engelmann.

- 9- Barton, H. A.,; Jurado, V. (2007). What's up down there? Microbial diversity in caves
- 10- Benaissa S (2016). Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagema). Mémoire de master, Spécialité en Microbiologie .Université ABOU BAKR BELKAID-tlemcen, Département de biologie .p2-53
- 11- Bell, J. (1993). Sols et environnement. Par Alan Wild. 1993. Cambridge University Press, 40 West 20th Street, New York, NY 10011-4211. 24,95, papier. 287 pages. American Journal of Alternative Agriculture , 8 (4), 192-192.
- 12- Belyagoubi, L.(2014) Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et Bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Th. doctorat : Biologie : Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen p 70-76
- 13- Belyagoubi, L., Belyagoubi- Benhammou, N., Jurado, V., Dupont, J., Lacoste, S., Djebbah, F., ...;Saiz-Jimenez, C. (2018). Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria.international journal of speleology .47(2). P2-191
- 14- Bhatti, AA, Haq, S. et Bhat, RA (2017). Rôle bénéfique des actinomycètes dans la Santé des sols et des plantes. Pathogenèse microbienne, 111, P459
- 15- Bontemps, Z. (2022). Dynamique de la diversité microbienne dans la grotte de Lascaux (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I). p 1-45-46.
- 16- Boublenza N. (2022). Isolement et caractérisation de souches d'actinomycètes marines productrices de biomolécules antimicrobiennes à partir de l'île de rachgoun, l (ouest algérien (Doctoral dissertation).

- 17- Bouaziz, S. (2018).recherche de souches bactériennes locales productrices de Substances antimicrobines:isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives. Thèse de Doctorat .spécialité des sciences en biologie. Université kasdi Merbah-Ouagla . département des sciences biologiques. P37
- 18- Boudemagh, A. (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de doctorat .spécialité en En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine Département de sciences de la Nature et de la Vie .p103
- 19- Boudemagh, A., Bensouici, K. (2014). The effect of thermic pretreatment and antibiotics on the selective isolation of the culturable actinomycetes from the Algerian desert soil. Sciences Technologie. C, Biotechnologies, p28.
- 20- Boudejelal-Bencheikh, F. (2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par Actinoalloteichussp. AH97 .thèse de doctorat. spécialité en Sciences Agronomiques. école nationale supérieure agronomique el-harrachalger
- 21- Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M.,Boudemagh, A., et Boulahrouf, A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha d'Aïn Mlila. Sciences Technologie. C, Biotechnologies, P 8.
- 22- Bouhila, A., Boussid, D. (2020). *Staphylococcus aureus* . p7
- 23- Bouterfa D et IbessaineN. (2022). Activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir du sol (à Boghni). Mémoire de master .spécialité en microbiologie appliquée. Département de Biochimie-Microbiologie. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. p13

- 24- Bouziane, M., Bertoldi, A. E. M., Lee, D., Milova, P., Hendrick, P., Lefebvre, M. (2017, May). Design and experimental evaluation of liquid oxidizer injection system for hybrid rocket motors. In 7th European Conference for Aeronautics and Space Sciences (EUCASS), Milan, Italy.
- 25- Cabrolier, N., Lafolie, J., & Bertrand, X. (2014). Épidémiologie et facteurs de risques des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa*. Journal des Anti-infectieux, 16(1), p8
- 26- Camille, D. E. L. A. R. R. A. S. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier. p111/113/114
- 27- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G ;Perthuisot, J. P. (1999). Ca-carbonates Precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. Sedimentarygeology, 126(1-4), 13
- 28- Claire R (2023) . 10 grottes et tunnels de lave (en Islande) – photos et conseils
- 29- Cumpston, BH, Ananthavel, SP, Barlow, S., Dyer, DL, Ehrlich, JE, Erskine, LL, ... et Perry, JW (1999). Initiateurs de polymérisation à deux photons pour le Stockage de données optiques
- 30- Darghout S et Metheni A (2016) .Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la région de Constantine.Thèse de doctorat .spécialité en génétique moléculaire. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.département de biologie animale p14
- 31- Davies, W. E. (1977). Geology of caves. Department of the Interior, Geological Survey.p 1-3-4-5

- 32- DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., & Chambers, H. F. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet, 375(9725), 1557-1568.
- 33- Denizci A-A. (1996). Study on the detection and production of antibacterial antibiotics from actinomycetes which isolated from the soils of Aegean Eastern blacksea regions of Turkey. Ph D. Thesis. Ege University. Institute of Science. Izmir. De substances antifongiques. Science Lib Editions Mersenne: Volume4, N°120801
- 34- Djebbah F (2022). Isolement et caractérisation d'actinomyètes producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte Gueldaman 1(GLD1) (Akbou, Algérie).thèse de doctorat, Spécialité en Microbiologie appliqué .Université Abou bakr belakid -tlemcen,Département de biologie p1-2 -31-32-55
- 35- Djebbah, F. Z., Belyagoubi, L., Abdelouahid, D. E., Kherbouche, F., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M.V.,Ravindran, B. (2021). Isolation and characterization of novel Streptomyces strain from Algeria and its in-vitro antimicrobial properties against microbial pathogens. Journal Of Infection And Public Health, 14(11), p16-72
- 36- Djebbah F 2016 Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de tlemcen (Tagma) Mémoire de master, Spécialité en Microbiologie .Université ABOU BAKR BELKAID-tlemcen, Département de biologie . p52 -54-32
- 37- Domergue, C. (1970). Introduction à l'étude des mines d'or du nordouest de la péninsule ibérique dans l'Antiquité. Dans Legio VII Gemina (pp. 253-286).Députation provinciale de León.
- 38- Dommergues, Y., et Mangenot, F. (1970). Ecologie microbienne du sol (No. 631.461 DOM). Paris: Masson. p1 -23 -25-26-27

- 39- Duraipandiyan, V., Sasi, A. H., Islam, V. I. H., Valanarasu, M., Ignacimuthu, S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale*, 20(1), p15-20
- 40- Engel, P. (2010). Introduction à la philosophie de l'esprit . La Découverte.
- 41- Engel, P., Boumsell, L., Balderas, R., Bensussan, A., Gattei, V., Horejsi, V., ET Clark, G. (2015). Nomenclature CD 2015 : ateliers sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains comme moteur en immunologie. *Le Journal d'Immunologie*, 195 (10), 4555-4563.
- 42- E. Northup, Kathleen H. Lavoie, D. (2001). Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology journal*, 18(3), p199 -205
- 43- En ligne Badji, B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres actinomadura et nonomuraea (Thèse de doctorat, Tizi-ouzou).
- 44- Émile, C. (2022). Évolution de l'antibiogramme. *Option/Bio*, 32 (649-650), 29-30.
- 45- Euzeby JP. (2015). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>
- 46- Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural product reports*, 34(10), 1203–1232.
- 47- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, TK et Ahn, Y. (2016). État actuel des Connaissances sur la dégradation microbienne des hydrocarbures aromatiques Polycycliques (HAP) : une revue. *Frontières en microbiologie*, 7, 1369.

- 48- Groult, B. (2022). Les processus écologiques impliqués dans l'assemblage des Communautés Archées, Bacéries, et eucaryotes varient dans l'eau souterraine des Aquifères des Laurentides à un niveau régional. P04
- 49- Gschmeissner S (2013) .*Bacillus Subtilis* Bacteria, Sem.<https://sciencephotogallery.com/featured/bacillus-subtilis-bacteria-sem-steve-gschmeissner.html>
- 50- Hachana Meriem et HalilouIkram (2023). Isolement et caractérisation des Actinomycètes des sols arides (Touggourt, Illizi et Tendouf).Mémoire de Master. Spécialité en Microbiologie Appliquée.Université Mohamed Khider de Biskra. Département des sciences de la nature et de la vie. P23
- 51- Hamilton-Miller, JMT (1974). Stérois fongiques et mode d'action des antibiotiques polyéniques. Progrès en microbiologie appliquée , 17 , 109-134.
- 52- Hirsch, CF et Christensen, DL (1983). Nouvelle méthode d'isolement sélectif des actinomycètes. Microbiologie appliquée et environnementale, 46 (4), 925-929.
- 53- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. Journal of appliedmicrobiology, 123(3), 570-581.
- 54- Jiang, Y. (2009). Systematic research on actinomycetes selected according to biological activities (Doctoral dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel).P13
- 55- Jin, S. (2024). *Pseudomonas aeruginosa*. In Molecular Medical Microbiology , p811. Academic Press
- 56- Jurado, V., Fernandez-Cortes, A., Cuezva, S., Laiz, L., Cañaveras, J. C., Sanchez-Moral, S.et ;Saiz-Jimenez, C. (2009). The fungal colonisation of rock-art caves: experimental evidence. Naturwissenschaften, 96, 1027-1034.

- 57- Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat .spécialité en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie .département des sciences de ma nature et de la vie .P-66-76-78
- 58- Kocarev, L. et Lian, S. (éd.). (2011). Cryptographie basée sur le chaos : Théorie, algorithmes et applications (Vol. 354). Médias scientifiques et Commerciaux Springer.
- 59- Kosznik-Kwaśnicka, K., Golec, P., Jaroszewicz, W., Lubomska, D., Piechowicz, L. (2022). Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *Microorganisms*, 10(2), p1
- 60- LARPENT, J. P. (2000). Microbiologie et aliments. Industries alimentaires et agricoles, 117(5), 21-34.
- 61- Lemke, A., Kiderlen, AF et Kayser, O. (2005). Amphotéricine B. *Microbiologie appliquée et biotechnologie* , 68 , 151-162.
- 62- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, 9(9), 1071-1081. P1
- 63- Lise L (2022) .*Klebsiella pneumoniae* : symptômes, transmission, traitements. [https://www.doctissimo.fr/sante/maladies/maladies-infectieuses/klebsiella-pneumoniae-symptomes-transmission-traitements/106062\\_ar.html](https://www.doctissimo.fr/sante/maladies/maladies-infectieuses/klebsiella-pneumoniae-symptomes-transmission-traitements/106062_ar.html)
- 64- Loret, N., Bertrand, X., Thouverez, M., & Talon, D. (2009). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*: origine exogène ou endogène de la bactérie responsable? *Pathologie Biologie*, 57(1), p9.

- 65- Macias-Paz, I. U., Pérez-Hernández, S., Tavera-Tapia, A., Luna-Arias, J. P., Guerra-Cárdenas, J. E., Reyna-Beltrán, E. (2023). *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(2), p3
- 66- McNeil, M. M., & Brown, J. M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 7(3), P353.
- 67- Medjemadj, M., Boudemagh, A. (2021). Etude de la biodiversité des actinobactéries dans quelques eaux thermales de la région Est de l'Algérie (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1). P 44 photo
- 68- Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I. et Abdelwouhid, DE (2015). Identification et caractérisation préliminaire d'antibiotiques non polyéniques sécrétés par une nouvelle souche d'actinomycète isolée de la sebkha de Kenadsa, Algérie. *Journal asiatique-pacifique de biomédecine tropicale*, 5 (6), P433.
- 69- Muhammad NurAfnan Uda, Alaa Kamal YousifDafhalla, Thikra S. Dhahi, Tijjani Adam, Subash Chandra Bose Gopinath, AsralBahariambek, Muhammad Nur Aiman Uda, Mohammed Mohammed, NorAzizahParmin, NurHulwani Ibrahim, Uda Hashim, (2024 ) Conductometric immunosensor for specific *Escherichia coli* O157:H7 detection on chemically functionalized interdigitated aptasensor, *Heliyon*, (10), Issue 5, p1.
- 70- Ngamcharunghit, C., Chaimusik, N., Panbangred, W., Euanorasetr, J. et Intra, B. (2023). Métabolites bioactifs des actinomycètes terrestres et marins. *Molécules*, 28 (15), 5915. P1-2-3
- 71- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M. et Kapadnis, B. (2013). Actinomycètes : un répertoire de catalyseurs verts avec une source potentielle de revenus. *BioMed recherche internationale*, 2013 .p3/4

- 72- Prévot, AR (1961). Traité de systématique bactérienne. (*Pas de titre*) .
- 73- Priam A (2022) . Bactérie « E. coli » : la marque Malo rappelle des yaourts vendus en supermarché dans toute la France [https://www.lemonde.fr/societe/article/2022/06/14/bacterie-e-coli-la-marque-malo-rappelle-des-yaourts-vendus-en-supermarche-dans-toute-la-france\\_6130187\\_3224.html](https://www.lemonde.fr/societe/article/2022/06/14/bacterie-e-coli-la-marque-malo-rappelle-des-yaourts-vendus-en-supermarche-dans-toute-la-france_6130187_3224.html)
- 74- Priscilla (2022) , I take you to discover the mysterious cave of Nichet in Fromelennes in the Ardennes. A marvelous and strange site at the same time.
- 75- Rafa, F Z, (2019) .Caractérisation phénotypique des actinomycètes du sol des régions arides.Mémoire de master, Spéciatité en Microbiologie Fondamentale et Appliquée .Université Mohamed Khider de Biskra, Département des sciences de la nature et de la vie. P 4-5-6
- 76- Rahmouni , N (2017) . Isolement des microorganismes (actinomycètes et mycètes) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte kaws –Honaine . Mémoire de master, Spéciatité en Microbiologie .Université ABOU BAKR BELKAId tlemcen,Département de biologie .p6-12
- 77- Rosenbach (1884).*Staphylococcus aureus*.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus\\_aureus](https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)
- 78- Salam, N., Jiao, J. Y., Zhang, X. T. Li, W. J. (2020). Update on the Classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. International Journal ofsystematic and evolutionary microbiology, 70(2), 1331-1355.
- 79- Schabereiter-Gurtner et al., 2003. Rahmouni , N (2017) . Isolement des microorganismes (actinomycètes et mycètes) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte kaws –Honaine . Mémoire de master,

Spécialité en Microbiologie .Université ABOU BAKR BELKAID-  
tlemcen,Département de biologie . p6

- 80- Schatz, A., Bugle, E. et Waksman, SA (1944). Streptomycine, une substance présentant une activité antibiotique contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives.\*. Actes de la Société de biologie expérimentale et de médecine , 55 (1), 66-69.
- 81-Segouat Amira et Boukhalfa A Rayhan Katar Ennada (2018). Isolement d'actinomycètes à partir de deux échantillons de sol et la mise en évidence de quelques activités enzymatiques.Mémoire de Master. Spécialité en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des microorganismes. Département de générale Microbiologie. P11/13
- 82- Sharma, M ;Dangi, P ;Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(2), P802
- 83- Simonson.M(2014) .Lake Superior Sea Caves Open For First Time In 5 Years.
- 84- Singh L-S., Mazumder S., Bora T-C. (2009).Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by salt- tolerant and alkaliphilicactinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. Journal de Mycologie Médicale(2009) 19: 225- 233.
- 85- Stein T. (2005). Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific ifunctions. Molecular microbiology, 56(4), 845–857. P1
- 86- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., ..ET Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 406(6799), 959-964

- 87- Tiwari, K., Gupta, R. K. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), P281.
- 88- Trajano, E. et Bichuette, ME (2010). Diversité des invertébrés souterrains brésiliens, avec une liste de taxons troglomorphes. *Biologie souterraine*, 7 (août), 1-16.
- 89- Urzì, C., De Leo, F., Bruno, L. et Albertano, P. (2010). Diversité microbiennedans les grottes paléolithiques : un cas d'étude sur les biofilms phototrophes dela Grotte des Chauves-souris (Zuheros, Espagne). *Écologie microbienne*, 60 ,116-129.
- 90- Vandeputte, P. (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata* (Doctoral dissertation, Université d'Angers).p3/19
- 91- Waksman, S. A. (1957). Species concept among the actinomycetes with special reference to the genus *Streptomyces*. *Bacteriological Reviews*, 21(1), P2.
- 92- Wauters, G., Avesani, V., Charlier, J., Janssens, M., Vaneechoutte, M., ;Delmée, M. (2005). Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 43(6), 2624-2628
- 93- White, PL et Barnes, RA (2008). *Aspergillus* PCR. *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillose*, 373-388.
- 94- Whittaker, RH (1969). Nouveaux concepts de règnes d'organismes : Les relations évolutives sont mieux représentées par de nouvelles classifications que par les deux règnes traditionnels. *Sciences*, 163 (3863), 150-160.
- 95- Winogradsky, S. (1892). Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification.

- 96- Wu, Y., Sun, A., Chen, F., Zhao, Y., Zhu, X., Zhang, T., ... & Wang, R. (2024). Synthesis, structure–activity relationship and biological evaluation of indole derivatives as anti-*Candida albicans* agents. *Bioorganic Chemistry*, 107293. P1
- 97- Zakri, A (2017) .Isolement des microorganismes (actinomycètes et mycètes) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte kaws –Honaine .Mémoire de master, Spécialité en Microbiologie .Université ABOU BAKR BELKAID-tlemcen ,Département de biologie. P11-62
- 98- Zermane, F. (2008). Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques, et des composés organiques de synthèse. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Constantine: Université Mentouri Constantine. P70
- 99- Zhang, L., Deng, M., Liu, J., Zhang, J., Wang, F., & Yu, W. (2024). The pathogenicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* to colon cancer cells. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 230 p1 .

**Webographie :**

- 1- <https://www.wpr.org/culture/lake-superior-sea-caves-open-first-time-5-years>
- 2- <https://www.valdardennetourisme.com/en/the-nest-cave/>
- 3- <https://zigzagvoyages.fr/grotte-tunnel-lave-islande>

**Annexes 01****Composition des milieux de culture****Bennett**

Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Peptone pancréatique de caséine	2g
Glucose	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

**Bouillon Sabouraud**

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Eau distillée	1000mL
pH	5,6

**Gélose Sabouraud**

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Agar	17g
Eau distillée	1000 mL
pH	7.2

**ISP<sub>2</sub>**

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	4g
Agar	20g
Eau distillée	1000mL
pH	7.2

**TSA (Gélose Trypticase de soja)**

Trypticase	17 g
Soytone	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000ml
pH	7,2

**Muller Hinton**

Extrait de viande	2g
Hydrolysât acide de caséine	17.5g
Amidon	1.5g
Agar	10g
Eau distillée	1000ml
pH	7.4

**ISP<sub>7</sub>**

Glycerol	15g
L-asparagine	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .	5g
NaCl.	5g
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.01g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

**Bouillon Muller Hinton**

Extrait de viande	2g
Hydrolysât acide de caséine	17.5g
Amidon	1.5g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

**Bouillon Bennett**

Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Peptone pancréatique de caséine	2g
Glucose	10g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

**Gélose nutritive gélatine**

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15-20 g
Gélatine	4g
Eau	1000 mL
pH	7,2

## Annexes 02

**Tableau 8:** résultats d'activité antibactérienne des actinomycètes isolés (diamètre en mm)  
cylindres –puits

	Souches	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. Subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. Coli</i>	<i>K. Pneumonia</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Cylinders</i>	<b>A6</b> <b>(18)</b>	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	8-9 S
	<b>A9</b> <b>(19)</b>	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	113- 11 S	00- 00 R	13-12 S
	<b>A31</b> <b>(2)</b>	00- 00 R	11- 13 S	00- 00 R	00- 00 R	11- 10 S	00- 00 R	00-00 R
<i>Puits</i>	<b>A6</b> <b>(18)</b>	0	0	0	0	0	0	0
	<b>A9</b> <b>(19)</b>	0	0	0	0	0	0	0
	<b>A31</b> <b>(2)</b>	0	0	0	0	0	0	0

## Annexes 03

**Tableau 9:** Résultats de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries tests et aux antifongiques de la levure (diamètre en mm)

	ATB/ATF	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>B.s</i>	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>K.p</i>	<i>C.a</i>
<i>Disques</i>	Amp (ATB)	00- 00 R	13- 13 S	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	00- 00 R	0
	Nys (ATF)	0	0	0	0	0	0	11- 10

## Annexes 04

**Tableau10:** Résultats d'inhibition de l'activité ATF par l'ergostérol

	Sans l'ergostérol		Avec l'ergostérol	
Les souches	A6 (18)	A9 (19)	A6 (18)	A9 (19)
Cylindres	8 -9	12-13	00-00	00-00
Puits	0	0	0	0