



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

MEMOIRE

Présenté par

SLIMANI leila

et

SENHADJI sabiha

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

En Sciences Biologiques

Option : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des microorganismes marins isolés à
partir de l'éponge *Axinella verrucosa* de la région de Honaine (Tlemcen)**

Soutenu le : 03/07/2025, Devant le jury composé de :

Président :	M^r REBIAHI Sid Ahmed	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice:	M^{me} BOUBLENZ A Nesrine	MCA	Université de Tlemcen
Encadrant :	M^r BELYAGOUBI Larbi	Professeur	Université de Tlemcen
	Mme BENHAMOU BELYAGOUBI Nabila	Professeur	Université de Tlemcen
Invitée d'honneur :	M^{me} BENGUEDDA- RAHAL Wacila	Professeur	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciements

Je rends grâce à Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et la force la patience d'accomplir ce modeste travail, c'est un devoir agréable d'exprimer en quelques lignes la reconnaissance que je dois à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'élaboration de ce travail.

Nous tenons à remercier notre encadrant **Pr. BELYAGOUBI Larbi** qui à assurer la planification de ce travail et de son travaille dur avec nous et de l'encourager à obtenir un résultat.

Et A Madame la Professeure **BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila**, notre co-encadrante pour son soutien accompagnement durant la préparation de nos expériences et pour les souches microbiennes de la référence .

A Monsieur le Professeur **REBIAHI Sid Ahmed** d'avoir accepté de juger ce travail. A madame **BOUBLENZA Nesrine** merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous tiendrons également à remercier chaleureusement **Madame BENGUEDDA RAHAL** Wacila, pour son aide essentielle dans l'identification des échantillons.

Notre profonde reconnaissance va aussi à **Monsieur HASSI Boudjemaa Djamel** pour sa collaboration et son implication dans la collecte des échantillons, une étape cruciale dans la réalisation de ce travail.

Nous remercions chaleureusement les ingénieurs de laboratoire pour leur assistance technique, leur disponibilité et leur soutien tout au long de nos travaux expérimentaux

Merci pour tous les enseignants de notre Université ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN et Département de Biologie pour toutes ces années d'études. Ainsi, à tous les collègues de notre promotion pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribué de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.

Dédicase

Grâce à Dieu qui nous a aidés à arriver ici.

Je dédise ce succès à mon moi ambitieux qui a lutté avec moi tout au long de mon parcours.

À mes chers parents,
qui sont toujours soutenu et encouragé dans chaque étape de ma vie.

À mes frères kadiro anwer et rahimou et mes soeurs Aya et ,Amina,
pour leur amour et leur complicité, qui rendent chaque moment précieux.

À notre petit ange Baraa, Et ma chère tante.

À ma collègue Sabiha,

pour son aide précieuse et son amitié inestimable.

À mes amies Ikram et Rajaa,

pour leur soutien indéfectible et les souvenirs inoubliables.

Merci à chacun de vous pour avoir contribué à mon parcours.

SLIMANI Leila

Dédicase

Je rends grâce à Dieu de m' avoir faite une personne rêveuse avec une grande ambition.

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon père

Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui ma toujours soutenue et motivé dans mes études.

j'espère que, le monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de sa fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le Tout -Puissant, ;l'accueille en sa sainte miséricorde !

A ma chère mère

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour ses innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le plus Haut, lui accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes belles soeurs Zhor , wafaa et Nadjya et mon frère Chafik.

À ma chère collègue Slimani Leila, pour ton accompagnement sincère tout au long de mon mémoire. Un grand merci .

SENHADJI Sabiha

ملخص

تحتضن الجزائر تنوعاً بيولوجياً ملحوظاً من الإسفنجيات البحرية من نوع اكسينيلا فيريكوس ولا سيما الأنواع الحمراء والصفراء، التي تؤوي مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة التكافلية.

وتشكل هذه الأخيرة، خاصة الأكتينومييسيتات والفطريات، مصدراً واعدًا للمركبات المضادة للميكروبات في مواجهة التهديد المتزايد للعوامل الممرضة المقاومة لعدة أدوية. وفي هذا السياق، أجرينا دراسة قمنا خلالها بجمع وتحليل عينات من الإسفنج، مما سمح بعزل 12 سلالة من الفطريات، معظمها من جنس واحد *Penicillium* ، وأربع سلالات من الأكتينومييسيتات. من بين هذه السلالات، أظهرت سلالتان فطريتان وثلاث سلالات من الأكتينومييسيتات نشاطاً مضاداً للميكروبات ملحوظاً، لا سيما ضد *Bacillus subtilis* و *Candida albicans*. وتؤكد هذه النتائج الإمكانات الصيدلانية الحيوية للكائنات الدقيقة البحرية المرتبطة بـ *Axinella verrucosa* كمصدر طبيعي لجزيئات جديدة مضادة للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: إسفنج بحري، كائنات دقيقة بحرية، نشاط مضاد للميكروبات، التكنولوجيا الحيوية البحرية.

Abstract

Algeria harbors a remarkable biodiversity of marine sponges of the genus *Axinella verrucosa*, particularly the red and yellow species, which host a wide range of symbiotic microorganisms. These microorganisms, especially actinomycetes and actinomycetes and molds, represent a promising source of antimicrobial compounds in response to the growing threat of multidrug-resistant pathogens. In this context, we conducted a study during which we collected and analyzed sponge samples, leading to the isolation of 12 fungal strains, mainly from the *Penicillium* genus, and four actinomycete strains. Among these, two fungal strains and three actinomycete strains exhibited remarkable antimicrobial activity, notably against *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. These findings highlight the biopharmaceutical potential of marine microorganisms associated with *Axinella verrucosa* as a natural source of new antimicrobial molecules.

Keywords: Marine sponge, marine microorganisms, antimicrobial activity, marine biotechnology.

Résumé

L'Algérie abrite une biodiversité remarquable d'éponges marines du genre *Axinella verrucosa*, notamment les espèces rouges et jaunes, qui hébergent une large gamme de micro-organismes symbiotiques. Ceux-ci, en particulier les actinomycètes et les moisissures, représentent une source prometteuse de composés antimicrobiens face à la menace croissante des agents pathogènes multirésistants. Dans ce contexte, nous avons mené une étude au cours de laquelle nous avons collecté et analysé des échantillons d'éponges, ce qui a permis d'isoler 12 souches de moisissures, principalement du genre *Penicillium*, et quatre souches d'actinomycètes. Parmi celles-ci, deux souches fongiques et trois souches d'actinomycètes ont montré une activité antimicrobienne remarquable, notamment contre *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Ces résultats soulignent le potentiel biopharmaceutique des micro-organismes marins associés à *A. verrucosa* comme source naturelle de nouvelles molécules antimicrobiennes.

Mots-clés : Éponge marine, Microorganismes marins, Activité antimicrobienne, Biotechnologie Marine .

Liste des figures

Figure 1: Carte géographique d'Algérie (Tlemcen).	5
Figure 2: Souche S5 de type <i>Penicillium</i>	17
Figure 3: Souche S2 de type <i>Alternaria</i>	17
Figure 4: Aspects macroscopiques des souches O13 (A) et O14 (B).	19
Figure 5: Observation microscopique des actinomycètes.	20
Figure 6: Résultats des tests biochimique des actinomycètes (1 : Coagulation du lait écrémé ; 2 : Milieu TSI ; 3 : Citrate de Simmons et 4 : Urée indole).	21
Figure 7: Résultats des tests biochimiques. (A) : Hydrolyse de la caséine ; (B) : Hydrolyse de gélatine ; (C) : Hydrolyse de l'amidon.	22
Figure 8: Photos des résultats de pigment de mélanine ((A): ISP7 ; (B): ISP6).	23
Figure 9: Zones d'inhibition de <i>Penicillium sp.</i> isolés sur <i>C. albicans</i> (A) et <i>B. subtilis</i> (B).	25
Figure 10: Zone d'inhibition de la Nystatine (100 µg/disque) sur <i>C. albicans</i>	25
Figure 11: Zones d'inhibitions des actinomycètes.	27
Figure 12: Zones d'inhibition des souches actinomycétales.	28

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne	12
Tableau 2: Origine et aspects des souches fongiques isolées.....	16
Tableau 3: Résultats des tests physiologiques et biochimiques	20
Tableau 4: Résultats des tests production de pigment mélanoidé	23
Tableau 5: Résultats de l'activité antimicrobien des moisissures :.....	25
Tableau 6: Diametres de zones d'inhibition d'ampiciline pour les moisissures.	26
Tableau 7: Résultats de l'activité antimicrobienne des souches isolées par la méthode de cylindres d'agar des actinomycètes)	26
Tableau 8: Diametres de zones d'inhibition d'ampiciline pour les actinomycets	Erreur !

Signet non défini.

liste des bréviations

ATCC: American Type Culture Collection

CDA: Czapek-Dox Agar

MEA: Malt Extract Agar

PDA : Potato Dextrose Agar

ISP: International Streptomyces Project

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)

O2: Dioxygène

ORP: Potentiel d'Oxydo-Réduction (Oxidation-Reduction Potential)

nm: nanomètre

µg: microgramme

ml: ou mL millilitre

°C: degré Celsius

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

ms: milli second

Table des matières

<i>Remerciements</i>	I
<i>Dédicase</i>	II
<i>Dédicase</i>	III
<i>ملخص</i>	IV
Résumé.....	V
Abstract	V
<i>Premiere partie : Introduction générale</i>	1
<i>Deuxieme partie : Matériel et méthodes</i>	4
1- Échantillonnage :	5
2. Paramètres physico-chimiques :.....	5
2.5. Potentiel redox ou potentiel d'oxydo-réduction (ORP) :.....	6
3. Paramètres de pollution :.....	6
3.1. Test de nitrate	6
4. Isolement :	7
4.1. Isolement des moisissures marines :	7
4.2. Isolement des actinomycètes marines :	8
5. Identification des moisissures et des actinomycètes marines :	8
5.1. Observation macroscopique	8
5.2. Observation microscopique.....	8
5.2.1. Moisissures :.....	8
5.2.2 Actinomycètes:	9
6. Conservation des isolats :	11
7. Etude des caractéristiques biochimiques :.....	9
8. Evaluation de l'activité antimicrobienne :	11
9. Criblage par la technique de cylindres d'agar des actinomycètes :	12

9.1 Test d'activité antibactérienne :	11
9.2. Test d'activité antifongique :	11
9.3 Criblage par la technique des puits des actinomycètes :	12
9.4 Criblage par la technique des cylindres d'agar des moisissures :	13
9.5 Criblage par la technique des puits des moisissures :	13
Résultats et discussion	14
1.Paramètre physico- chimiques :	15
2. Paramètres de pollution :	15
3.Isolement des moisissures :	16
4.Identification macroscopique et microscopique des moisissures :	16
4.2. Identification microscopiques :	17
5.Observation macroscopique et microscopique des actinomycètes :	19
5.1.observation macroscopique	19
5.2:Observation microscopiques :	20
6.Caractérisation biochimique des isolats d'actinomycètes :	20
7. Activité antimicrobienne :	24
7.1- les moisissures :	24
-dans le milieu solide :	24
7.2. actinomycètes :	26
Conclusion	30
Annexes	39
ملخص	43
Résumé	43
Abstract	43

Généralités

La biotechnologie marine constitue aujourd'hui un champ de recherche stratégique, mobilisant les ressources biologiques des écosystèmes marins pour le développement de solutions innovantes dans les domaines de la santé, de l'agroalimentaire et de la protection de l'environnement (**Arrieta et al., 2010**).

En effet, les milieux marins, encore largement inexplorés, offrent une biodiversité unique permettant l'accès à des composés naturels rarement présents chez les espèces terrestres, ouvrant ainsi la voie à la bioprospection ciblée dans un objectif pharmaceutique (**Penesyan et al., 2010**). Par ailleurs, les approches actuelles intègrent une vision durable, visant la valorisation raisonnée de ces ressources tout en respectant l'équilibre des écosystèmes marins (**Mayer et al., 2013**).

Les organismes marins tels que les bactéries, les micro-algues, et les invertébrés sessiles notamment les éponges, représentent une source précieuse de métabolites secondaires dotés d'activités biologiques variées, ce qui les rend particulièrement intéressants pour la découverte de nouveaux agents thérapeutiques (**Imhoff et al., 2011**). Parmi ces organismes les plus étudiés en biotechnologie, les éponges (phylum *Porifera*) occupent une position clé. Ces animaux pluricellulaires, considérés comme l'un des groupes les plus primitifs du règne animal, sont caractérisés par l'absence de systèmes digestif, nerveux et excréteur. Leur structure corporelle simple mais efficace leur permet de filtrer de grandes quantités d'eau pour se nourrir et respirer (**Taylor et al., 2007**). Présentes depuis le Cambrien inférieur, les éponges colonisent une vaste gamme d'habitats marins, des zones littorales peu profondes jusqu'aux abysses, certaines espèces étant retrouvées à plus de 8000 mètres de profondeur (**Van Soest et al., 2012**). Bien que la majorité des espèces soient marines, quelques-unes vivent en eau douce. Elles sont particulièrement abondantes dans les milieux côtiers riches en particules organiques, entre 5 et 30 mètres de profondeur. En tant qu'organismes benthiques sessiles, elles se fixent exclusivement sur des substrats solides comme les roches ou les structures artificielles immergées (**Webster & Thomas, 2016**).

Leur morphologie asymétrique, leur grande diversité de formes et de couleurs, ainsi que leur capacité de régénération cellulaire les rendent remarquables sur le plan écologique et biomédical.

Un aspect fondamental de leur écologie est leur relation symbiotique avec des communautés microbiennes complexes. Les microorganismes associés peuvent représenter jusqu'à 40 % du volume de l'éponge et jouent des rôles clés dans la nutrition, la défense chimique, et la production de métabolites secondaires bioactifs (**Hentschel et al., 2012; Pita**

et al., 2018). Ces associations symbiotiques sont aujourd'hui considérées comme une source prometteuse de nouvelles molécules d'intérêt biopharmaceutique.

Une espèce en particulier, *Axinella verrucosa*, attire l'attention des chercheurs. Appartenant à la classe des Demospongiae, cette éponge se distingue par sa forme arbustive, avec des colonnes rigides et des verrues (**Doris, 2024**). Elle vit principalement sur des substrats rocheux, à des profondeurs allant de 10 à 80 mètres, dans des zones à faible luminosité. Sa répartition géographique est centrée sur le bassin méditerranéen et les eaux tropicales de l'Atlantique, ce qui en fait un sujet de choix pour l'étude de la biodiversité marine et ses applications biotechnologiques.

Les éponges marines abritent une diversité remarquable de micro-organismes symbiotiques, notamment des actinomycètes et des moisissures, qui jouent un rôle essentiel dans l'écologie des éponges et leur potentiel biotechnologique (**Subramani & Sipkema, 2019**).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses du *phylum Actinobacteria*, bien connues pour leur capacité à produire de nombreux métabolites secondaires bioactifs tels que des antibiotiques ou des agents anticancéreux (**Dhakal et al., 2017**). En milieu marin, ils sont fréquemment isolés à partir d'éponges, où ils participent activement à la défense de l'hôte contre les pathogènes et les prédateurs, en produisant des composés antimicrobiens (**Manivasagan et al., 2014**). De plus, ils contribuent au recyclage de la matière organique, renforçant la stabilité écologique de l'habitat. Parallèlement, les moisissures marines, principalement issues des *phylum Ascomycota* et *Basidiomycota*, établissent également des relations symbiotiques avec les éponges (**Hughes & Kelsey, 2016**). Ces champignons, qui colonisent des substrats organiques, produisent une large gamme de métabolites secondaires tels que des enzymes, mais aussi des composés aux propriétés antimicrobiennes, antifongiques et anticancéreuses (**Rateb & Ebel, 2011**). Leur rôle dans la décomposition de la matière organique contribue efficacement au recyclage des nutriments, essentiel à la santé des communautés benthiques (**Hughes & Kelsey, 2016**).

L'étude de ces symbioses microbiennes s'avère donc essentielle pour comprendre en profondeur les interactions écologiques et exploiter leur potentiel pharmaceutique (**Imhoff, 2020**).

En réponse aux pressions écologiques — prédation, compétition spatiale, infections microbiennes —, les éponges marines produisent une grande diversité de métabolites secondaires aux structures chimiques souvent uniques. Ces composés incluent des alcaloïdes, des terpènes, des polykétides et des peptides cycliques, et jouent à la fois un rôle écologique

de défense et un rôle biotechnologique prometteur **(Pita et al., 2018)**. Ils présentent des activités antimicrobiennes, antitumorales et anti-inflammatoires significatives **(Laport et al., 2019 ; Pita et al., 2018)**. La production de ces composés n'est pas exclusivement attribuée aux cellules de l'éponge elle-même, mais également à son microbiome symbiotique, notamment les actinobactéries, reconnues pour leur capacité à produire des substances pharmacologiquement actives telles que les rifamycines **(Zhang et al., 2019)**. Ainsi, l'étude conjointe des éponges et des micro-organismes qui leur sont associés ouvre des perspectives nouvelles et prometteuses pour le développement de thérapies issues des milieux marins **(Imhoff, 2020 ; Zhang et al., 2019)**.

Dans ce contexte, l'objectif principal de l'étude est d'explorer et de valoriser les métabolites bioactifs d'origine marine en isolant et en caractérisant des micro-organismes marins, notamment des souches d'actinomycètes et de champignons, à partir d'échantillons d'éponges rouges et jaunes collectés dans le port de Honain. Ces micro-organismes seront ensuite évalués pour leur activité antimicrobienne contre des souches pathogènes, répondant ainsi à la problématique croissante de la résistance aux antibiotiques.

Pour atteindre cet objectif, notre travail s'est articulé autour de trois grandes parties : La première partie est consacrée à des généralités sur les molécules bioactives marine et sur les champignons et les actinomycètes des sédiments marins et leurs importance. La deuxième partie concerne, les protocoles expérimentaux et les techniques utilisées tout au long de ce travail. A propos de la troisième partie, elle dévoile l'analyse des résultats obtenus, les interprétations et les discussions pour finaliser par une conclusion et des perspectives de recherche.

Matériel et méthodes

1- Échantillonnage

La récolte des échantillons d'éponges rouge et jaune est réalisée par Monsieur BOUDJAMAA DJAMEL, du profondeur de 7 mètres, à partir du port de Honain dans la région de la willaya de Tlemcen le 15 février 2025 (Figures 1). Les eponges sont conservés dans des sacs en plastiques stériles.

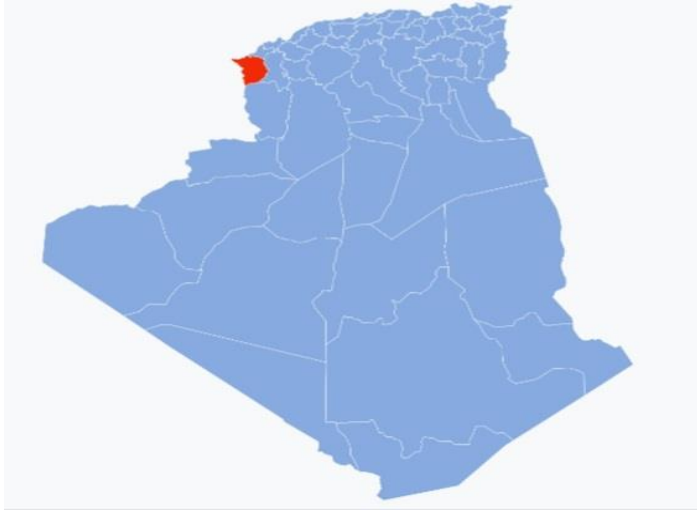


Figure 1: Carte géographique d'Algérie (Tlemcen).

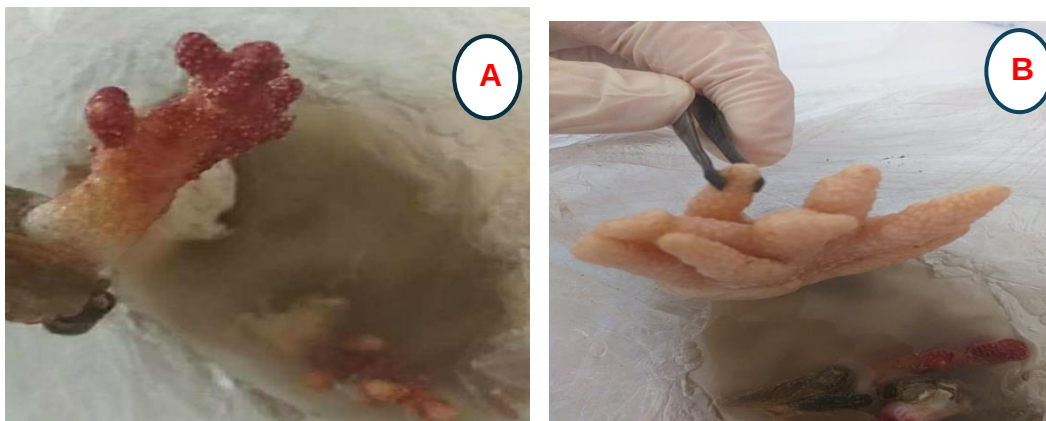


Figure 2: Echantillons d'éponges : (A) : rouge ; (B) : jaune.

2. Mesure les paramètres physico-chimiques

Les paramètres retenus dans notre étude sont le pH, oxygène dissous, conductivité électrique, salinité, et puotential redox.

2.1. pH

Le pH joue un rôle important dans la répartition des organismes aquatiques (**Dajoz, 2000**). Le pH est en relation avec la concentration des ions d'hydrogène présent dans l'eau. La différence de potentiel existant entre une électrode de verre et une électrode de référence plongeant dans la même solution est mesuré par le pH mètre (**Abdesselem, 1999**).

2.2. Oxygène dissous

C'est un élément important dont les teneurs dépendent des phénomènes qui tendent soit à un enrichissement grâce aux échanges avec l'atmosphère (**Lacaze, 1996**). Etant l'un des plus importants indicateurs sur le degré de la pollution des eaux. Il est un facteur écologique essentiel car sa présence permet la respiration des êtres vivants aquatiques. Mesuré également in situ grâce à un oxymètre étalonné de type WTW 3401. Le taux d'O₂: dissous est affiché en mg/L ou en % ou degré de saturation (**Angelier, 2003**).

2.3. Conductivité électrique

La conductivité d'une eau est sa capacité à conduire plus au moins un courant électrique (**Rodier et al., 1996**). Elle est déterminée in situ par la méthode électrique à l'aide d'un conductimètre.

2.4. Salinité

La salinité d'une eau est sa concentration en électrolyte, c'est-à-dire les anions et les cations dissous dans l'eau, elle permet donc d'apprécier la qualité des ions dans l'eau (**Leveque, 1996**).

2.5. Potentiel redox ou potentiel d'oxydo-réduction (ORP)

Le potentiel d'oxydoréduction (ORP) est une mesure électronique empirique en volts (et notée Eh) réalisée à l'aide d'un appareil spécifique pour exprimer la réactivité entre eux des éléments et substances chimiques, soit oxydants, soit réducteurs, présents dans l'eau. En rivière ou plan d'eau de bonne qualité l'ORP doit s'élever de 300 et 500 mv. Une faible valeur d'ORP témoigne d'une insuffisance de décomposition d'éléments présents dans l'eau et de leur accumulation nocive à la vie aquatique.

3. Mesure les paramètres de pollution

3.1. Test de nitrate

La procédure de test du nitrate commence par le remplissage du tube Nitrate avec l'échantillon jusqu'au trait de 20 mL. Ensuite, une cuillère de poudre Nitratest est ajoutée sans refermer le tube, puis le mélange est agité pendant une minute. Après une minute de repos, le tube est légèrement secoué trois à quatre fois pour favoriser la floculation, puis laissé

au repos pendant deux minutes supplémentaires ou jusqu'à clarification de la solution. Le capuchon est ensuite retiré et le haut du tube nettoyé avec un papier propre. La solution claire est transférée dans une éprouvette ronde jusqu'au trait de 10 mL. Une pastille Nitricol est ajoutée, écrasée, puis bien mélangée jusqu'à dissolution complète. Après un temps d'attente de 10 minutes pour permettre le développement complet de la couleur, la lecture est effectuée à l'aide d'un photomètre réglé sur une longueur d'onde de 570 nm. Le résultat est exprimé en pourcentage de transmission (%T).

3.2. Test de nitrite

La procédure de test du nitrite consiste à remplir le tube avec l'échantillon jusqu'au trait de 10 mL. Une pastille Nitricol est ensuite ajoutée, écrasée, puis mélangée soigneusement jusqu'à dissolution complète. Il faut ensuite attendre 10 minutes pour permettre le développement de la couleur. Enfin, la lecture du résultat est effectuée conformément au mode d'emploi de l'instrument utilisé.

4. Isolement des moisissures et des actinomycètes

4.1. Isolement des moisissures marines :

Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspension-dilutions nous avons découpé les éponges en petits morceaux à l'aide de ciseaux stérile.

On met en suspension 10 g d'éponge rouge ou jaune frais dans 90 ml et on a broyé dans un robot avec l'eau de mer stérile, ce qui représente la dilution 10. Après homogénéisation au vortex, on réalise des dilutions décimales dans l'eau de mer stérile jusqu'à 10%, puis on a étalé 1000 µl. de chaque dilution à la surface des milieux de culture CDA, PDAac. et MEA (voir Annexe). Après ensemencement, les boîtes de Pétri ont été incubées à 25±1°C pendant 5 à 7 jours. Les colonies sont repiquées et purifiées sur les milieux PDAac.

L'ajout de l'acide lactique, ou du rose bengal à raison de 1 à 1,5ml par flacon (200ml) empêche le développement des bactéries. De plus, le rose bengal ralentit la croissance des

moisissures à croissance rapide et donne plus de chance d'isoler les moisissures à croissance lente

4.2. Isolement des actinomycètes marines :

Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspension-dilutions. On met en suspension 10 g de éponge rouge ou jaune dans 90 mL d'eau mer stérile, ce qui représente la dilution 10^{-1} . Après homogénéisation au vortex, on réalise des dilutions décimales dans l'eau de mer stérile jusqu'à 10^{-6} (**Boublenza, 2023**), puis on étale 100 μ L de chaque dilution à la surface des milieux de culture (voir annex) :

- ✓ Milieu de Bennett (**Jones, 1949; Wakisaka, 1982 in Bastide, 1986**).
- ✓ Milieu ISP2 (**International Streptomyces Medium 2**) .
- ✓ Gélose Trypticase de Soja (T.S.A) (**Krishnamurthi et Chakrabarti, 2013**);
- ✓ M2 (**Amidon casein Agar**) .
- ✓ Gélose Nutritive (G.N) (**Kim et al., 2013**).
- ✓ GNG (**Belyagoubi, 2025**)
- ✓ Gélose de gause (**Boublenza, 2023**).

Tous les milieux utilisés dans cette étude contiennent des antifongiques le cycloheximide (50 μ g/mL) et l'acide nalidixique (10 μ g/mL.) (**Williams et Davies, 1965 in Bastide, 1986**).

Les solutions d'antifongiques sont préparées extemporanément en acétone (cycloheximide) et en eau (nystatine). Elles sont ajoutées aseptiquement aux différents milieux après stérilisation de ceux-ci.

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 2 à 4 semaines et examinées régulièrement.

Les colonies présentant les critères des actinomycètes sont repiquées et purifiées sur les milieux Bennett ou T.S.A (**Bastide, 1986**).

5. Identification des moisissures et des actinomycètes marines

5.1. Critères macroscopiques

L'identification des espèces fongiques repose sur l'examen de critères de culture à l'oeil nu tels que le taux de croissance ; l'apparence de la colonie, la couleur et la forme, ainsi que sur les caractéristiques morphologique.

5.2. Critères microscopiques

5.2.1. Moisissures

On effectue une identification microscopique en utilisant la méthode de scotch. Afin d'effectuer la méthode suivante, il est nécessaire d'appliquer une goutte à deux gouttes de bleu de coton sur une lame de verre (annexe). Ensuite, en utilisant un ruban adhésif (scotch), il est nécessaire de découper un morceau, de l'appliquer sur la colonie de moisissure et de le déposer sur la lame.

Après, l'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique avec des grossissements allant de x10 à x40 (**Zerriouh & Lahouati, 2024**).

5.2..2 Actinomycètes

On a effectué la coloration de Gram selon les étapes suivantes :

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal, il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 15 à 30 secondes. seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau distillée. À ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 10 à 30 secondes à la fushine (ou safranine) pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage à l'eau distillée, on sèche le frottis au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen et on l'examine à l'objectif (X 100) à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**).

7. Critères biochimiques

La présence des activités enzymatiques chez les isolats d'actinomycètes a été déterminée par l'utilisation de plusieurs substrats :

● Hydrolyse de l'amidon :

Les souches d'actinomycètes ont été ensemencées en stries serrées sur la gélose de gause contenant l'amidon (voir annexes). Après 14 jours d'incubation à 30°C, la culture a été recouverte d'une solution de lugol.

Cette solution permet de colorer en brun les zones de la culture contenant l'amidon. Les parties de la culture dont l'amidon a été dégradé restent non colorées (**Gordon & Smith, 1953**).

● Hydrolyse de la caséine

La présence d'une activité enzymatique de la caséinase a été étudiée sur le milieu Bennett (voir annexes) additionné de 5 % (P/V) de lait écrémé.

L'apparition d'une zone claire autour des colonies après 7 à 14 jours témoigne l'hydrolyse de la caséine (**Géraldine et al., 1981**).

• Hydrolyse de la gélatine

Ce test a été réalisé selon la méthode de **Pickett et al. (1991)**.

Dans des tubes à essai stériles contenant 5 ml d'eau physiologique stérile, des bandelettes de film photographique ont été transférées dans des conditions d'asepsie. Sur ce même tube une suspension dense d'actinomycète à tester a été ajoutée.

Les tubes ont été incubés à 30°C et des observations régulières des tubes ont été réalisées pendant 7, 14, et 21 jours afin de noter la liquéfaction de la gélatine qui se traduit par le décollement de la surface superficielle du film photographique.

• Coagulation et la peptonisation du lait écrémé

Certains actinomycètes sont capables de synthétiser des enzymes utilisées pour coaguler le lait. Pour vérifier la présence de cette activité enzymatique dans nos isolats, des tubes contenant 5 ml de lait écrémé ont étéensemencés avec la suspension d'actinomycètes à tester. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 14 jours. Des observations régulières ont permis de noter la coagulation du lait par les souches testées.

La peptonisation qui est la digestion complète du lait a été également vérifiée dans les mêmes conditions que la coagulation (**Williams & Cross, 1971**).

• Utilisation des différents substrats carbonés sur milieu TSI

Le milieu TSI (triple sugar iron) contient trois glucides : le glucose, le saccharose et le lactose dont leurs fermentations par la bactérie à tester se manifeste par le changement de couleur de l'indicateur du pH (le rouge de phénol) présent dans ce milieu.

Des tubes à essai ont été coulés par le milieu gélosé de TSI et inclinés de façon à obtenir un culot et une pente. La fermentation du glucose se manifeste par le changement de couleur du culot qui vire vers le jaune, dans ce cas la bactérie est dite "glucose positif".

La fermentation du saccharose et le lactose se manifeste par une pente virant en jaune, dans ce cas la bactérie est dite "lactose-saccharose positif". Si les deux parties de tubes (culot et/ou pente) restent rouges ou inchangés cela veut dire que la bactérie est négative pour les trois glucides présents dans ce milieu. Ce même test permet de détecter la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) qui se manifeste par la présence d'un précipité noir au niveau du culot (**Marchal et al., 1991**).

• Utilisation de citrate comme seul source de carbone

Ce test a été réalisé sur le milieu de citrate de Simmons. Le principe du milieu repose sur l'aptitude de certains microorganismes à pouvoir se développer avec le citrate comme seule source de carbone.

Le métabolisme du citrate est visualisé par le virage de l'indicateur du pH (bleu de bromothymol) au bleu (**Marchal et al., 1991**).

● Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée H_2O_2 en molécule d'eau H_2O et de dioxygène O_2 . La présence d'une catalase dans nos isolats a été déterminée en utilisant quelques gouttes d'une solution fraîche de H_2O_2 sur une lame stérile en présence de la culture bactérienne. Un dégagement gazeux se traduit par la décomposition de l' H_2O_2 et la libération de dioxygène, dans ce cas la bactérie est dite "catalase positive".

Dans le cas opposé la bactérie est dite "catalase négative" (**Delarras, 2007**).

● Recherche de l'uréase

La présence d'une activité enzymatique de l'uréase a été appréciée par l'ajout de quelques gouttes de milieu liquide de l'urée-indole sur un tube à essai qui contient 4,5 ml d'eau physiologique stérile. Après 48 h d'incubation à 30°C, et si la solution vire vers le rouge la bactérie est dite "uréase positive". Si la solution reste inchangée dans ce cas la bactérie est dite "uréase négative" (**Marchal et al., 1991**).

● Production de pigments mélanoïdes

La mise en évidence de la production de ce pigment (pigment brun diffusible) est réalisée par la culture de la souche sur milieu gélosé ISP6. Les boîtes sont ensemencées en stries serrées et la production est appréciée après 2 et 4 jours d'incubation à 30±1°C. La pigmentation des milieux ensemencés est comparée avec celle du milieu stérile incubé dans les mêmes conditions (**Shirling et Gottlieb, 1966; Margalith, 1991**).

6. Conservation des isolats

Les isolats sont ensemencés dans des tubes à essai sur milieu gélosé incliné puis incubés à 28 °C pendant 14 à 21 jours. Les cultures obtenues sont conservées à une température de 4°C .

8. Evaluation de l'activité antimicrobienne

1. Souches testées

Dans le but de tester l'effet antimicrobien *in vitro* des extraits, des éponges marines on a utilisé des souches de références qui sont mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

	Microorganismes	Gram	Code
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 29213
	<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
	<i>Escherichia coli</i> TEM		ATCC 35218
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 700603
Levure	<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231

ATCC : American Type Culture Collection.

9.Méthode de cylindres d'agar pour les actinomycètes

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés en strie serrée à la surface du milieu Bennett (**Aouiche et al., 2012**) et incubés à la température de 28 °C pendant 14 jours.

Des cylindres de 6 mm de diamètre sont alors prélevés à l'emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries tests. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 4 °C pendant 02 heures pour permettre une diffusion des substances (**Kitouni, 2007**) et après elles sont incubées à la température de 37 °C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition formées autour des cylindres sont alors mesurées (**Pazhanimurugan et al., 2012**).

Des disques des antibiotiques ont été utilisés: Ampicilline (10µg) (Biomaxima S.A) et de Chloramphenicol (30 µg) (Sigma) sont utilisés comme des molécules de référence.

Remarque: Pour chaque bactérie-test, un inoculum a été réalisé à partir d'une culture de 24 heures, mis en suspension dans le milieu Muller-Hinton stérile de telle manière à obtenir une densité optique entre $\approx 0,08$ à 0,1 pour une longueur d'onde de 625 nm (**CLSI, 2012; 2014**).

Pour l'activité antifongique, la même démarche suivie dans le test d'activité antibactérienne, est appliquée pour *C. albicans* sauf que la pré-culture est réalisée sur le bouillon Sabouraud et la gélose est celle de Sabouraud au lieu de Muller-Hinton, et l'incubation des levures se fait à 48 heures à 37°C.

La nystatine (100 µg) (Sigma) et l'amphotéricine B (100 µg) (Sigma) sont utilisées comme control positif (**Belyagoubi, 2025**)

9.3 Méthode des puits pour les actinomycètes

Les souches d'actinomycètes sont mises en culture dans 5 ml du bouillon Bennett (**Lechevalier et al., 1986; Hulya et al., 2006**), puis incubées 14 jours à $28 \pm 1^\circ$. Des puits de 6

mm de diamètre sont creusés dans les milieux tests préalablement ensemencés avec un germe cible (Muller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure). 100µL de la culture d'actinomycète est déposé dans chaque puits sur les milieux Mueller Hinton et Sabouraud. Après 2 heures d'incubation à 4°C, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37±1°C pendant 24 h pour les bactéries et pendant 48 h pour *C. albicans*. Les diamètres de la zone d'inhibition sont alors mesurés (Lemriss et al., 2003; Valanarasu et al., 2010).

9.4 Méthode de cylindres d'agar pour les moisissures

Le test de criblage de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) par la technique des cylindres d'agar est réalisé avec la même méthodologie suivi pour les actinomycètes sauf que le milieu utilisé pour la culture des moisissures est PDA.

9.5 Méthode des puits pour les moisissures

La même démarche suivie dans le test d'activité antibactérienne et antifongique des Actinomycètes est appliquée pour les moisissures sauf que la culture en milieu liquide a été réalisée sur un bouillon PDAAc (Bosco, 2016)), et l'incubation se fait à 25°C pendant 14 jours.

Résultats et discussion

1. Mesure les paramètres physico- chimiques

La valeur du **pH** mesurée à $7,99 \pm 0,07$ indique une eau légèrement basique, ce qui est typique des milieux marins bien oxygénés (**Chapman, 1996**). Selon **Chapman (1996)**, le pH des eaux de mer se situe généralement entre 7,5 et 8,4, et une valeur proche de 8 favorise la solubilité de l'oxygène et le bon fonctionnement des processus biologiques marins. D'après (**Millero, 2006**), un pH stable et légèrement basique est favorable à la croissance des organismes marins, notamment les espèces calcifiantes.

La valeur du potentiel d'oxydoréduction (Redox) de $54 \pm 0,84$ mV suggère un milieu modérément oxydant (**Rodier et al, 2009**). **Rodier et ses collaborateurs (2009)** considèrent qu'un redox entre +50 et +100 mV reflète un bon équilibre entre matière organique et oxygène dissous, indiquant une eau ni trop réduite ni trop oxydée. Selon **García et al. (2017)**, un tel potentiel est typique des zones côtières à activité biologique modérée, non polluées.

La salinité mesurée à $37,75 \pm 0,07$ PSU est caractéristique des eaux marines méditerranéennes, où la moyenne varie généralement entre 36 et 39 PSU (**Millero, 2006**). Selon **Tait (2011)**, cette stabilité dans les valeurs de salinité indique une absence d'influence significative des apports en eau douce ou d'événements de dilution. D'après **UNESCO (1983)**, une telle salinité est idéale pour le maintien de la biodiversité marine.

La conductivité enregistrée de $57,35 \pm 0,07$ mS/cm est directement proportionnelle à la salinité, ce qui confirme les résultats précédents (**UNESCO, 1983**). Selon **Grasshoff et al. (1999)**, la conductivité dans les milieux marins oscille entre 50 et 60 mS/cm, ce qui rend la valeur mesurée ici parfaitement représentative d'un environnement marin sain. **Millero (2006)** souligne que de faibles écarts dans la conductivité traduisent une homogénéité chimique de la masse d'eau.

2. Mesure les paramètres de pollution

2.1. Nitrite

L'échantillon testé ne présente pas de coloration rose, ce qui indique une absence de nitrites. Cela signifie que l'eau n'est pas récemment polluée par des matières organiques et que le cycle de l'azote est équilibré. Ce résultat reflète une bonne qualité de l'eau sur le plan chimique.

2.2. Nitrate

L'échantillon testé a une quantité plus importante (20,56 mg/L), ce qui montre une pollution modérée, sûrement à cause d'activités humaines (engrais, eaux usées...).

3. Isolement des moisissures

Toutes les souches ont été isolées sur PDAac., CDA, MEA et Bennett. Nous avons extrait 12 souches de moisissures pures à partir des éponges marines rouges et jaunes. Parmi eux (7) *Penicillium*, (1) *Aspergillus*, (1) *Ulocladium*, (1) *Cladosporium*, (1) *Alternaria* et une souche non identifiée.

4. Identification macroscopique et microscopique des moisissures

4.1. Identification macroscopique

Le nombre de souches isolées après la purification des échantillons des éponges marines de couleur rouge et jaune de port de Honain dans différents milieux est illustré dans le **tableau 02**. Nous observons un nombre important de souches fongiques dans le milieu PDAac., suivi par d'autres milieux (CDA, MEA et Bennett).

Tableau 2: Origine et aspects des souches fongiques isolées.

Code	Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
S1	Pda	Taille :Grande Couleur :Verte claire entourée en blanc	<i>Penicillium</i>
S1'	Pda	Taille : moyens Couleur :Verte entourée en blanc	<i>Aspergillus</i>
S2	PDA	Taille :Petite Couleur : Noire	<i>Alternaria</i>
S3	PDA	Taille : Petite Couleur :Verte claire entourée en blanc	<i>Penicillium</i>
S3'	PDA	Taille :Petite Couleur :jaune entourée en blanc	<i>Penicillium</i>
S3''	PDAac.	Taille : Petite Couleur :blanche	<i>Penicillium</i>
S4	PDA ac.	Taille : Grande Couleur :Verte	<i>Penicillium</i>
S5	CDA	Taille :Petit Couleur :Verte entourée en gris (comme une fleur)	<i>Penicillium</i>
S5'	CDA	Taille : Petite	<i>Penicillium</i>

		Couleur :Verte claire entourée en blanc	
S6	Benette	Taille: Grande Couleur : Noire avec petite tache blanche	<i>Ulocladium</i>
S7	Pda ac.	Taille :Grande Couleur :Verte fonc�e	<i>Cladosporium</i>
S8	MEA	Taille : Grande Couleur : Noire entourée en jaune	<i>Non identifi�e</i>



Figure 2: Souche S5 de type *Penicillium*.



Figure 3: Souche S2 de type *Alternaria*.

4 .2. Identification microscopiques

Notre recherche, ayant conduit à l'isolation de 12 souches fongiques pures provenant d'éponges marines du genre *A. verrucosa* (rouge et jaune), révèle une domination du genre *Penicillium* (7 souches), suivi par *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *alternaria* et une souche non identifi e. Cette répartition est en totale adéquation avec les recherches de **Höller et al. (2000)**, qui ont signalé une forte occurrence de ces types de champignons dans les échantillons d'*Axinella* spp. **Miriam et al. (2023)**, on également isolé des souches de *Penicillium* d'*A. corrugata*, attestant ainsi de leur forte affinité écologique avec cette éponge. De plus, **Amirhahim et al. (2010)**, ont isolé *Aspergillus versicolor* de divers types d'éponges marines, prouvant ainsi la présence g n ralis e de ce genre dans le milieu marin.

Finalement, **Handayani et ses collaborateurs (2020)**, ont identifié un nombre comparable d'isolats fongiques (12 souches)   partir d'éponges du genre *Chelonaplysilla*, en se servant aussi de milieux sélectifs tels que le PDA, ce qui valide l'efficacité des techniques d'isolement employ es dans notre recherche. Ces similitudes indiquent que les éponges

marines, notamment celles appartenant au genre *Axinella*, hébergent une variété fongique abondante et comparable à celle mentionnée dans d'autres recherches internationales.

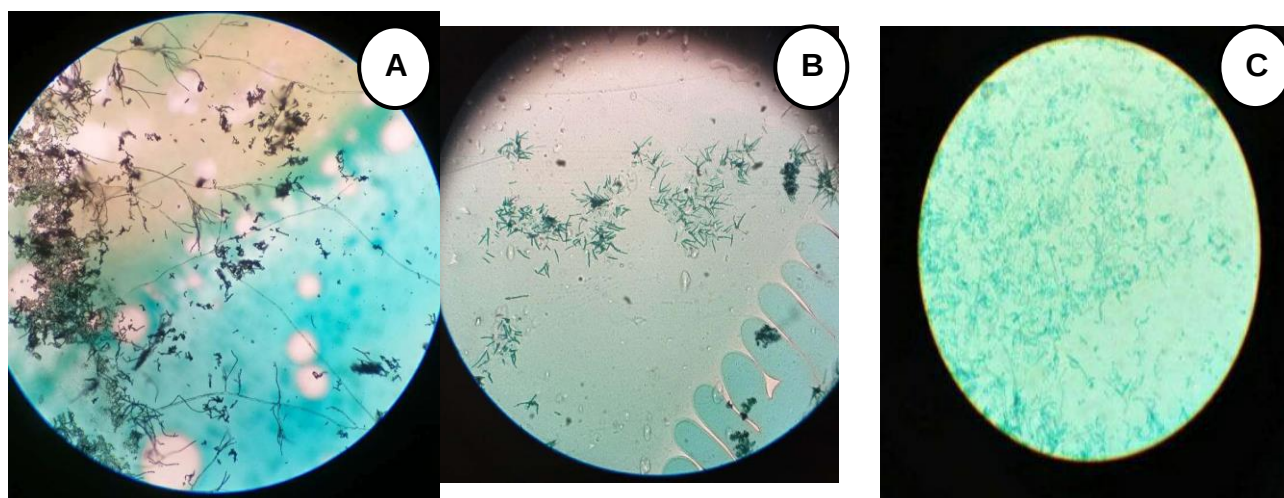


Figure 12 : Observation microscopiques des souches *Cladosporium* (A), *Alternaria* (B), et *Penicilium* (C).

5. Isolement des actinomycètes

L'isolement d'actinomycètes provenant de l'éponge *A. verrucosa* sur la côte ouest de l'Algérie (port de Honain) s'aligne avec notre initiative visant à mettre en valeur la biodiversité marine en Méditerranée, une région que les auteurs jugent insuffisamment explorée. On a minutieusement choisi les conditions d'isolement, en employant trois types de milieux de culture (gélose amidon-caséine, gélose pathogène et ISP2) enrichis en antimicrobiens et antifongiques afin de privilégier la prolifération des actinomycètes. Toutefois, seulement deux colonies ont été isolées, toutes provenant d'ISP2, ce qui témoigne d'une efficacité nettement supérieure pour l'isolement des actinomycètes dans ce contexte particulier.

Ces conclusions sont en accord avec celles de **Boublenza (2021-2022)**, qui a aussi réussi à isoler des actinomycètes marins dans les sédiments de l'île Rachgoun grâce à l'utilisation d'ISP2. Toutefois, ils ont généré un plus grand nombre de souches, possiblement dû à la diversité accrue des milieux employés (ISP2, Gause, TSA, etc.), au pré-enrichissement et aux diverses conditions environnementales. Cela indique que la variété des environnements et des sites d'échantillonnage influence considérablement l'efficacité de l'isolement. **Massahli et Soltani (2016)**, qui ont également mené des recherches sur des éponges marines de la côte

d'Aïn Turk (Oran), ont constaté une plus grande quantité d'isolats d'actinomycètes dotés d'une activité antimicrobienne.

Leur procédure intégrait des phases de traitement thermique et différents milieux sélectifs, ce qui a pu optimiser l'efficacité de l'isolement. Ce décalage avec leurs résultats pourrait être attribué à des divergences dans les espèces d'éponges, **Weravan et al. (2025)** les micro-habitats, les saisons d'échantillonnage ou encore la richesse microbienne associés.

Par ailleurs, ont mis l'accent sur l'importance de la diversité des échantillons et d'un calibrage précis des conditions d'isolement (comme le temps d'incubation et le pH) pour optimiser l'isolement des actinomycètes. Leur recherche plus vaste, comprenant le séquençage du microbiome, a également démontré que beaucoup de souches ne prospèrent pas dans les milieux standards et requièrent des conditions spécifiques ; Cela pourrait justifier le faible taux d'isolement observé. Pour finir, les approches suggérées par **Hameş-Kocabaş et Özel (2012)** mettent en avant l'importance d'un traitement chimique et physique préalable des échantillons, ainsi que l'emploi de sédiments en plus des éponges, dans le but d'optimiser la variété des isolats. Malgré la rigueur de notre méthodologie, ces méthodes pourraient servir à augmenter davantage la diversité biologique des isolats.

6. Identification macroscopique et microscopique des actinomycètes

6.1. Identification macroscopique

Dans notre étude, deux isolats d'actinomycètes ont été obtenus à partir de l'éponge *A. verrucosa*, collectée sur la côte ouest algérienne (**Figure 13**). L'isolement a été réalisé à l'aide de trois milieux de culture enrichis (Amidon caséine, gélose de cause, et ISP2) et supplémentés en antibiotiques. Seul le milieu ISP2 s'est révélé efficace, permettant l'apparition de deux colonies après 14 jours d'incubation. Ces isolats se distinguent par un aspect macroscopique solide et un réseau filamenteux typique au microscope, confirmant leur appartenance au genre des actinomycètes.

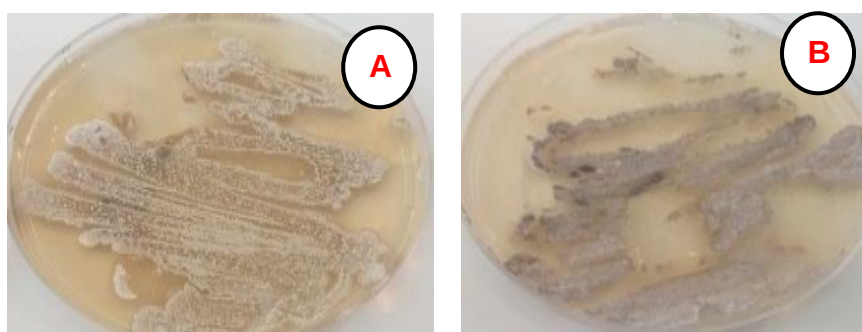


Figure 4: Aspects macroscopiques des souches O13 (A) et O14 (B).

6.2 Identification microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram révéla l'appartenance de ces espèces aux bactéries Gram +. Elles présentent un aspect filamenteux, chez certains isolats le filament est constitué de spores qui forment des chainettes plus ou moins longues, ayant également de spores dispersées ou rassemblées en amas, ce qui les rapprochent de manière générale aux Actinomycètes filamenteux (**Figure 14**).

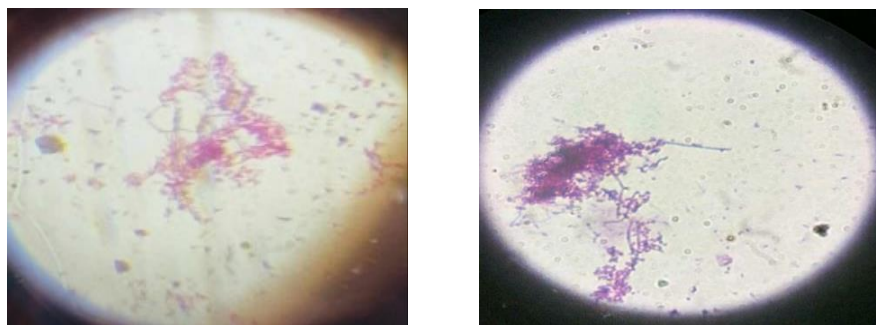


Figure 5: Observation microscopique des actinomycètes.

6.3. Caractérisation biochimique des isolats d'actinomycètes

Les résultats des différents tests biochimiques appliqués sur les deux isolats actifs sont résumés dans le **tableau 03** et la **figure 15**:

Tableau 3: Résultats des tests physiologiques et biochimiques.

Caractère	Souches	
	O13	O14
/		
Coagulation et la peptonisation du lait écrémé	+	+
Utilisation de citrate comme seule source de carbone	-	-
Utilisation des différents substrats carbonés sur milieu TSI	-	+
Recherche de l'uréase	-	-
Hydrolyse de la gélatine	+	+
Hydrolyse de la caseine	+	+
Hydrolyse d'amidon	+	+

- : Résultat négatif ; + : Résultat positif

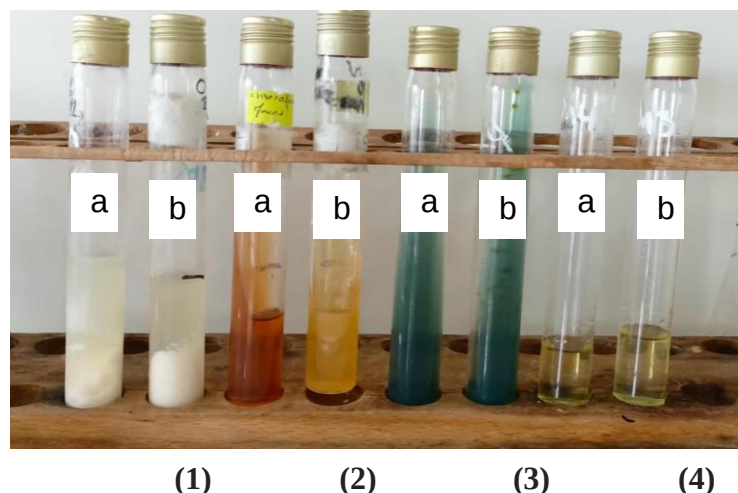


Figure 6: Résultats des tests biochimiques des actinomycètes (1 : Coagulation du lait écrémé ; 2 : Milieu TSI ; 3 : Citrate de Simmons et 4 : Urée indole).

Le test de coagulation et de péptonisation du lait donne des résultats positifs (**Figure 15, a et b**), ce qui indique que les souches possèdent des enzymes capables de coaguler les protéines du lait, traduisant une activité protéolytique et fermentaire, souvent associée à des bactéries lactiques ou à certaines actinomycètes.

Le test TSI (**Figure 15, 2**) montre une variabilité dans la capacité à utiliser différents substrats carbonés, avec une souche positive (**b**) (capable de fermenter certains sucres) et une autre négative (**a**), ce qui reflète une différence métabolique importante entre les deux.

L'utilisation du Citrate comme unique source de carbone est négative (**Figure 15, 3**) pour les deux souches (**a et b**), suggérant qu'elles ne possèdent pas les enzymes nécessaires (comme la citrase) pour métaboliser le citrate, ce qui limite leur capacité à survivre dans des milieux pauvres en carbone.

Enfin, la recherche de l'uréase s'avère négative (**Figure 15, 4**), indiquant l'absence de cette enzyme chez les deux souches (**a et b**), et donc une incapacité à hydrolyser l'urée pour produire de l'ammoniac. Ces résultats suggèrent des profils métaboliques distincts et permettent de mieux orienter l'identification et la classification des souches en question (**Figure 15**).

Le test de la catalase s'est révélé positif pour les souches O13 et O14, ce qui indique que ces actinomycètes produisent l'enzyme catalase, capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Cette activité est mise en évidence par

l'effervescence (formation de bulles) lors de l'ajout de H_2O_2 . Cela suggère que ces souches possèdent un système antioxydant actif, leur permettant de survivre dans des environnements aérobies ou soumis à un stress oxydatif (Kämpfer, 2012).

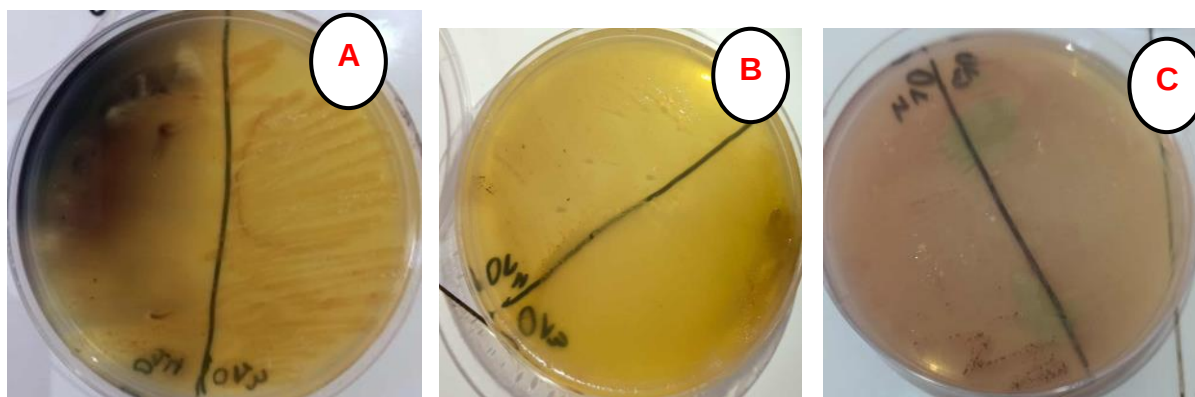


Figure 7: Résultats des tests biochimiques. (A) : Hydrolyse de la caséine ; (B) : Hydrolyse de gélatine ; (C) : Hydrolyse de l'amidon.

La coagulation et la peptonisation du lait observées pour les deux souches sont des caractères typiquement associés aux *Streptomyces*, notamment chez les espèces produisant des protéases (Williams et al., 1983)

L'incapacité des deux souches à utiliser le Citrate comme unique source de carbone est également compatible avec certaines espèces du genre, qui ne présentent pas toutes cette capacité (Locci, 1989).

La réponse différenciée sur le milieu TSI (O13 négatif, O14 positif) révèle une diversité métabolique typique des *Streptomyces*, dont les profils fermentatifs et enzymatiques sont très variés (Kämpfer, 2012).

La présence d'uréase, l'hydrolyse de la gélatine et de l'amidon, ainsi que la positivité au test de catalase sont des critères phénotypiques majeurs du genre, reflétant sa nature saprophyte et sa capacité à dégrader des substrats complexes (Shirling & Gottlieb, 1966).

Les résultats obtenus aux tests d'hydrolyse montrent que les deux micro-organismes possèdent une activité enzymatique marquée. Leur capacité à hydrolyser la gélatine, la caséine et l'amidon indique qu'ils sécrètent des enzymes spécifiques (gélatinase, protéase et amylase) leur permettant de dégrader respectivement les protéines animales, les protéines lactées et les polysaccharides. Cette aptitude traduit un pouvoir métabolique élevé et suggère que ces micro-organismes peuvent jouer un rôle important dans la décomposition de la

matière organique, ce qui peut être exploité dans les domaines de l'industrie agroalimentaire, de l'environnement ou de la bioconversion (**Figure 16**).

Test de production de pigment mélanoidé

Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 4 et la figure 17.

Tableau 4: Résultats des tests production de pigment mélanoidé .

Test	Souches	
	O13	O14
Production de pigment mélanoidé sur le milieu ISP6	Brunâtre	Blanchette
Production de pigment mélanoidé sur le milieu ISP7	Noire	Coleur foncé

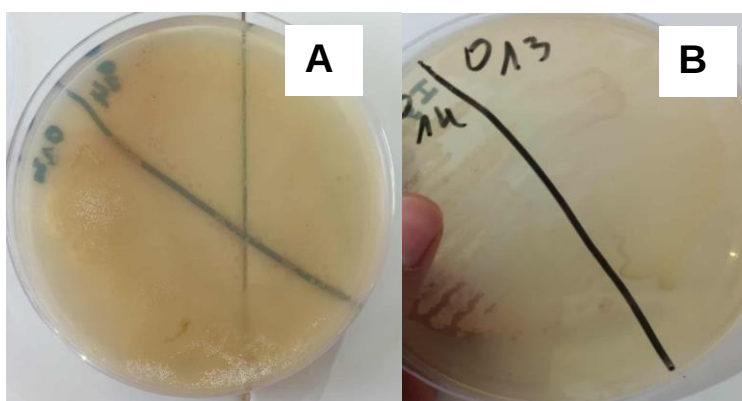


Figure 8: Photos des résultats de pigment de mélanoidé ((A): ISP7 ; (B): ISP6).

Les souches O13 et O14 ont été cultivées sur le milieu ISP6 (**Figure 17**) afin d'évaluer leur capacité à produire des pigments mélanoides. Les observations macroscopiques montrent que la souche O13 présente une pigmentation brunâtre diffuse autour de la zone de croissance, indiquant une production positive de pigments mélanoides. Ses colonies sont étalées, de texture veloutée, avec un pigment diffusible dans le milieu, caractéristique des actinomycètes producteurs de pigments secondaires. En revanche, la souche O14 ne montre aucune pigmentation foncée visible, ni dans les colonies ni dans le milieu environnant, ce qui traduit un résultat négatif pour la production de pigments mélanoides. Ses colonies apparaissent pâles, sans diffusion de pigment, suggérant l'absence de cette activité métabolique.

Le test de production de pigments mélanoides réalisé sur le milieu ISP7 (**Figure 17**) permet d'évaluer la capacité des souches actinomycètes à synthétiser des pigments sombres, indicateurs d'une activité métabolique secondaire. Dans cette expérience, la souche O13 présente un noircissement diffus du milieu, ce qui révèle une production positive de pigments mélanoides, traduisant une activité métabolique typique des espèces de *Streptomyces*. En revanche, la souche O14 n'induit aucune coloration foncée du milieu, indiquant une absence de production de ces pigments, donc un test négatif (**Tableau 4**).

Les résultats biochimiques obtenus suggèrent fortement que les souches O13 et O14 appartiennent au genre *Streptomyces*, bien que certaines variations interspécifiques aient été observées.. Ce résultat n'exclut cependant pas leur appartenance au genre, car la production de pigments mélanoides est un caractère variable, qui peut être influencé par les conditions de culture ou l'expression différentielle de gènes pigmentaires (**Takahashi et al., 1996**). En effet, plusieurs espèces du genre, comme *Streptomyces coelicolor* ou *S. lividans*, peuvent ne pas produire de pigments dans certains milieux ou conditions, malgré une affiliation taxonomique confirmée. L'ensemble de ces résultats catalase positive, hydrolyse de l'amidon et de la gélatine, uréase positive, test du lait positif reste globalement en faveur d'une identification au genre *Streptomyces*. Toutefois, pour confirmer avec certitude l'appartenance générique et éventuellement déterminer l'espèce, une analyse moléculaire basée sur la séquence du gène 16S rRNA serait indispensable.

7. Activité antimicrobienne

7.1- Les moisissures sur le milieu solide

le test d'activité antibactérienne des isolats à révéler que 2 souches présentent une activité antibactérienne sur au moins une des bactéries tests. La souche 6 (**Figure 19**) développée activités contre *E. coli*, et la souche 7 développée une activité antifongique contre *C. albicans*.

On connaît que les souches de *Penicillium* produisent antibactérienne (**Figure 19**). Il est également connu que les espèces *Penicillium* sont les principaux réservoirs de ces substances (**Tableau 5**).

Tableau 5: Résultats de l'activité antimicrobienne des moisissures exprimés en zone d'inhibition (en mm).

Les isolats	Souches fongiques	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
S1	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-
S3	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-
S3'	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-
S3''	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-
S4	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-
S5	<i>Penicillium</i>	-	12	-	-	-	-
S5'	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	12
Antibiotique		-	-	-	-	31	22

Figure 9: Zones d'inhibition de *Penicillium* sp. isolés sur *C. albicans* (A) et *B. subtilis* (B).



Figure 10: Zone d'inhibition de la Nustatine (100 µg/disque) sur *C. albicans*

Une recherche réalisée par **Xu et al (2015)**, a démontré que les champignons marins constituent une ressource de métabolites secondaires dotés de caractéristiques antibactériennes et antifongiques précieuses.

Le genre *Penicillium*, souvent récupéré dans les milieux marins, est surtout apprécié pour sa faculté de synthétiser des composés bioactifs. C'est ce qu'ont démontré **Sabdaningseh et al. (2020)** grâce à l'identification d'un nouveau dérivé de citrinine provenant de *Penicillium* critérium en lien avec une éponge marine. Cela appuie l'idée que les espèces appartenant au genre *Penicillium*, que nous avons aussi repérées, sont des générateurs significatifs de composés antimicrobiens. De plus, **Subramani et al. (2013)** ont démontré l'activité

antibactérienne et cytotoxique de la citrinine, un métabolite secondaire synthétisé par des souches de *Penicillium* prélevées sur des éponges marines, mettant en lumière leur potentiel dans la bataille contre les agents pathogènes résistant à plusieurs médicaments. Bien que nos résultats ne détaillent pas les types de métabolites générés, ils laissent supposer que les souches actives pourraient faire partie des mêmes catégories de producteurs.

Pour finir, l'étude de **Riyanti et al. (2020)** met aussi l'accent sur le rôle crucial des microorganismes symbiotiques liés aux éponges dans la génération de composés antibactériens.

Les organismes microbiens isolés de ces hôtes marins, qu'il s'agisse de bactéries ou de champignons, affichent une grande diversité métabolique, comme le montre leur potentiel bioactif. Par conséquent, nos conclusions s'alignent sur cette tendance, soulignant que même un nombre restreint de souches peut démontrer un potentiel thérapeutique significatif.

Pour résumer, bien que l'activité antimicrobienne constatée ne s'applique qu'à certaines souches isolées, elle est conforme à l'hypothèse largement acceptée que les champignons marins, en particulier ceux du genre *Penicillium*, sont une source prometteuse de composés bioactifs.

Ces conclusions justifient la mise en place de recherches plus détaillées sur les souches isolées pour déterminer et caractériser les métabolites à l'origine de ces actions.

7.1- Les moisissures dans le milieu liquide

Toutes les résultats sont négatif, donc absence de l'activité antimicrobienne.

7.2. Les actinomycètes sur le milieu solide

L'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes a été testée par la technique des cylindres d'agar sur 6 bactéries dont deux sont à Gram positif et sur une levure (**Tableau 7**), afin de sélectionner les colonies les plus productrices de substances antimicrobiennes.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant.

Tableau 6: Résultats de l'activité antimicrobienne des souches isolées par la méthode de cylindres d'agar des actinomycètes.

Diamètre de la zone d'inhibition (mm) sur les bactéries test							
N°	Code	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
4	O ₁₃	-	-	-	-	-	6
5	O ₁₄	-	-	-	-	9	-
antibiotique		-	-	-	-	11	24

(-) : pas d'activité

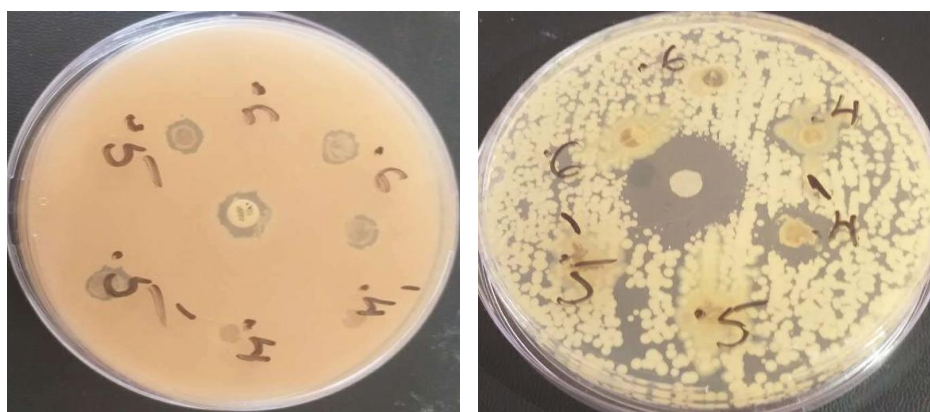


Figure 11: Zones d'inhibitions des actinomycètes.

Les 2 isolats ont montré une activité antibactérienne contre au moins un microorganisme testé (bactérie ou levure), l'isolat n°4 été actif uniquement sur la levure *C. albicans* (activité antifongique), alors que isolat n°5 est exclusivement actif sur la bactérie *B. subtilis* (**Figure 21**).

On peut donc résumer les résultats du tableau précédent comme suit :

- 1 isolat sur 2 présente une activité antifongique.
- 1 isolat sur 2 présente contre les bactéries à coloration de Gram positif.

La plus grande zone d'inhibition est obtenue par l'isolat n°5 avec une zone d'ihibition de 9 mm de diamètre contre la bactérie *B sibtilus*.



Figure 12: Zones d'inhibition des souches actinomycétales et de la nustatine sur *Candida albicans*

Nos observations indiquent que pour les deux isolats d'actinomycètes testés, il y a apparence une action antimicrobienne. Les 5 souches sont actives sur *B. subtilis*, tandis qu'un autre, le 4, a montré son efficacité contre *C. albicans*.

Ces données corroborent le potentiel clairement identifié des actinomycètes marins en tant que générateurs de métabolites bioactifs, en accord avec plusieurs recherches précédentes. Par exemple, la recherche de **Weeraphan & al. (2025)**, qui a isolé des actinomycètes à partir d'éponges marines tropicales, a révélé l'existence de souches capables de générer une variété de composés antimicrobiens. De façon similaire, **Mahyudin (2008)** a signalé que diverses espèces d'actinomycètes et de champignons marins liés aux invertébrés démontraient des capacités cytotoxiques et antimicrobiennes, mettant en évidence la valeur de ces milieux comme sources potentielles de nouvelles substances bioactives.

De même, **Sathish Kumar & Rao (2012)** ont mis en évidence l'activité notable de souches marines d'actinobactéries contre des agents pathogènes multirésistants comme le *S. aureus*, renforçant ainsi la pertinence de nos recherches de face à l'essor de la résistance antimicrobienne. En ce qui concerne **Boublenza & al. (2021)**, leur étude sur un isolat de *Streptomyces* provenant de l'île de Rachgoun a mené à la découverte de composés actifs, indiquant une diversité métabolique qui pourrait également être visible dans les isolats locaux examinés par nous.

Pour conclure, l'étude de **Messahli & Soltani (2016)**, également menée en Algérie, a démontré l'action antimicrobienne de divers isolats d'actinomycètes marins à l'encontre de plusieurs souches pathogènes. Nos résultats, mettant en évidence une action particulière

contre les bactéries Gram positif et une levure, s'alignent ainsi sur une tendance globale constatée dans les études locales et internationales.

Pour conclure, malgré le nombre restreint d'isolats actifs étudiés par nous, leur potentiel antimicrobien ciblé est notable et incite à poursuivre les recherches sur la purification et la caractérisation des substances actives.

Ces conclusions confirment l'importance vitale des actinomycètes marins dans la quête de nouveaux agents antimicrobiens, surtout face à l'augmentation actuelle de la résistance bactérienne.

Pour les résultats de l'activité antimicrobienne des actinomycètes cultivées sur milieu liquide, nous avons remarqué une absence d'activité sur toutes les souches pathogènes testées.

Conclusion

L'activité antimicrobienne des champignons et des actinomycètes isolés à partir des éponges marines jaunes et rouges du genre *A. verrucosa* révèle un potentiel biologique remarquable. Ces organismes présentent une diversité significative, avec des espèces encore peu explorées en milieu marin, soulignant leur capacité d'adaptation à des environnements spécifiques. Plusieurs isolats ont montré une action inhibitrice notable contre des agents pathogènes humains courants, tels que *B. subtilis* et *C. albicans*, ce qui indique un intérêt particulier pour leurs métabolites dans le développement de nouveaux traitements antimicrobiens.

Aucune souche n'a toutefois montré d'effet inhibiteur contre *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* ou *K. pneumoniae* dans les essais fongiques, ce qui souligne une limite face à certains pathogènes multirésistants.

L'analyse des mécanismes d'action de ces composés pourrait permettre d'élaborer des dérivés plus efficaces. Par ailleurs, les éponges marines jouent un rôle écologique essentiel dans la régulation des écosystèmes marins, d'où l'importance de leur préservation.

L'exploration d'autres espèces et habitats marins représente une piste prometteuse pour découvrir de nouvelles molécules actives, particulièrement utiles face à la montée des résistances aux médicaments actuels. Ainsi, ces organismes marins apparaissent comme une ressource précieuse pour la recherche en santé et en biotechnologie.

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

- Poursuivre l'identification moléculaire des différentes souches isolées à partir d'éponge, afin de mieux caractériser leur diversité génétique et phylogénétique (séquençage du gène 16S rRNA, PCR,...).
- Identification des molécules bioactives par des techniques chromatographies et spectrales (RMN, HPLC,...).
- Mettre en place des études complémentaires *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer l'efficacité, la toxicité et le mécanisme d'action des composés bioactifs produits.

Références bibliographiques

- Amirhamzah, M., Mudianta, I. W., & Tjahjono, D. H. (2010). *Aspergillus versicolor*, a marine-derived fungus from sponge producing biologically active secondary metabolites. *Marine Drugs*, 8(2), 335–348. <https://doi.org/10.3390/md8020335>
- Aouiche A. Sabaou V, Meklat A, x Zitouni A, Mathieu F. Lebrihi A. (2012). Antimicrobial activity of a Saharan *Streptomyces* spp. PAL111 strain against various clinical and toxinogenic microorganisms resistant to antibiotics. *Journal de Mycologie Médicale*, 22, 42-51.
- Arrieta, J. M., Arnaud-Haond, S., & Duarte, C. M. (2010). What lies underneath: Conserving the oceans' genetic resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18318–18324. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911897107>
- Ballav S., Kerkar S., Thomas S., Augustine N. (2015). Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (3): 323-330
- Boublenza, N., Boudjlal Dergal, N., Belyagoubi, L., Gabed, N., Abdelouahid, D.-E., Redissi, A., Cherif, A., Mosbah, A., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., & Abi-Ayad, S.-M. E.-A. (2021). Identification of Potential Antimicrobial Compounds from a Marine *Streptomyces* sp. SM2.4 Strain (MH752437) Isolated from Rachgoun Island in Western Algeria. *Current Bioactive Compounds*, 17(0), 1–14. <https://doi.org/10.2174/1573407217666210223104350>.
- Boublenza, N., Boudjlal Dergal, N., Belyagoubi, L., Gabed, N., Abdelouahid, D.-E., Redissi, A., Cherif, A., Mosbah, A., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., & Abi-Ayad, S.-M. E.-A. (2021). Identification of Potential Antimicrobial Compounds from a Marine *Streptomyces* sp. SM2.4 Strain (MH752437) Isolated from Rachgoun Island in Western Algeria. *Current Bioactive Compounds*, 17(0), 1–14. <https://doi.org/10.2174/1573407217666210223104350>
- Chapman, D. (1996). *Water Quality Assessments: A Guide to the Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring*. 2nd edition. WHO/UNEP.
- CPEPESC (Commission de Protection des Eaux, du Patrimoine, de l'Environnement, du Sous-sol et des Chiroptères). (2022, 16 septembre). Paramètres physiques et chimiques des eaux et substances. Consulté le 1er juin 2025, à l'adresse : <https://cpepesc.org/6-nature-et-pollutions/2-eaux-et-milieux-aquatiques-sources-de-pollutions-et-atteintes/2-qualite-des-eaux-pollutions-etat-des-cours-deau/2-bonne-qualite-ou-pollution-des->

[eaux/parametres-physiques-et-chimiques-de-leau-indicateurs-des-pollutions/les-differents-parametres-physiques-et-chimiques-des-eaux-et-commentaires/](#)

- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Editions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p
- Dhakal, D., Pokhrel, A. R., Shrestha, B., Sohng, J. K. (2017). Marine rare actinomycetes: isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106>
- DORIS. (2024). *Axinella verrucosa*. <https://doris.ffesm.fr>
- Düren, Germany. Disponible via: <https://www.mn-net.com> (Consultation du mode d'emploi original pour le test colorimétrique de nitrite par comparateur ou photomètre).nitricole
- García, H. E., Boyer, T. P., Locarnini, R. A., et al. (2017). *World Ocean Atlas 2013*. NOAA Atlas NESDIS 75. 8. Stumm, W., & Morgan, J. J. (1996). *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. 3rd edition. Wiley.
- Géraldine et al., 1981 : Géraldine, M., Schofield, M., Schaal, K.P. (1981). A numerical taxonomic study of members. In: *Afr. J. Microbiol. Res.*.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>.
- Gordon & Smith, 1953 Gordon, R.E. and Smith, M.M. (1953). Rapidly growing acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.* 66, 41–48.
- Grasshoff, K., Kremling, K., & Ehrhardt, M. (1999). *Methods of Seawater Analysis*. 3rd edition. Wiley-VCH.
- Hames-Kocabaş, E. E., & Özel, M. Z. (2012). Isolation strategies of marine-derived actinomycetes and the impact of pre-treatments on their recovery. *African Journal of Biotechnology*, 11(8), 1864–1872. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2462>.
- Handayani, N., Saputri, I., Wibowo, D., & Wahyudi, A. (2020). Diversity of marine sponge-derived fungi and their potential bioactivity from *Chelonaplysilla* sp. *Biodiversitas Journal of Biological Dive*.
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M., & Taylor, M. W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 641–654. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2839>
- Höller, U., König, G. M., & Wright, A. D. (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 104(11), 1354–1365. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002971>.

- Hughes, C. C., & Kelsey, J. E. (2016). Fungal–sponge symbioses. In *Fungal Associations* (pp. 331–346). Springer.
- Imhoff, J. F. (2020). Natural products from marine fungi—Still an underrepresented resource. *Marine Drugs*, 18(9), 459. <https://doi.org/10.3390/md18090459>
- Imhoff, J. F., Labes, A., & Wiese, J. (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances*, 29(5), 468–482. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.001>
- Kämpfer, P. (2012). The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. In M. Goodfellow, D. E. Brown & J. Chun (Eds.), ---Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 5, pp. 1455–1767).
- 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. Th doctorat :Microbiologie: Université Mentouri-Constantine.
- Laport, M. S., Santos, O. C. S., & Muricy, G. (2019). Marine sponges as a resource for microbial-associated natural products. *Microbial Ecology*, 77, 612–632.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. (1967). Biology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*. 21:71-100.
- Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J. M., Saintpierre-Bonaccio, D., Rifai, S., Fassouane, A., Boiron, P. (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49(11): 669-674
- Macherey-Nagel GmbH & Co. KG.Test Instructions - NITRITE (NITRITOCOL), REF 90724.
- Mahyudin, Nor Ainy. (Janvier 2008). Actinomycetes and fungi associated with marine invertebrates: A potential source of bioactive compounds. Thèse de doctorat en microbiologie, University of Canterbury, Christchurch, Nouvelle-Zélande.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2014). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 169(4), 262–278. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.003>
- Mayer, A. M. S., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D., ... & Shuster, D. E. (2013). The odyssey of marine pharmaceuticals: A current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(6), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.04.001>

- Messahli, I & Soltani, S.(2020). Isolement des actinomycètes à partir des éponges marines et mise en évidence de leur pouvoir antimicrobien. Mémoire de Master en Microbiologie Environnementale et Infectieuse. Université Amar Telidji – Laghouat.
- Millero, F. J. (2006). Chemical Oceanography. 3rd edition. CRC Press.
- Miriam, A. T., Scopel, M., & Porto, A. L. M. (2023). Marine-derived fungi: Diversity and biotechnological potential from sponges. In A. M. Abdel-Azeem (Ed.), Marine Fungi: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications (Chapter). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108028>.
- Palintest Ltd. (s.d.). Nitratest - WAG PHOT.
- Palintest Ltd. (s.d.). Nitratest - WAG PHOT.23 Test Instructions for Nitrate Determination (Méthode photométrique). Wagtech WTD, a division of Palintest Ltd. Royaume-Uni
- Pazhanimurugan. R., Gopikrishnan. V. Shanmuga. S. T. Radhakrishnan. M and R. Balagurunathan. R.(2012). Bioactive potential of actinobacteria against drug resistant pathogens. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2(5), 167-173.
- Penesyan, A., Kjelleberg, S., & Egan, S. (2010). Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. Marine Drugs, 8(3), 438–459. <https://doi.org/10.3390/md8030438>
- Pickett et al., 1991 :Pickett, M.J., et al. (1991). Méthode d'hydrolyse de la gélatine .
- Pita, L., Fraune, S., & Hentschel, U. (2018). Emerging sponge models of animal-microbe symbioses. Frontiers in Microbiology, 9, 743. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00743>
- Pita, L., Rix, L., Slaby, B. M., Franke, A., & Hentschel, U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: From microbes to ecosystems. Microbiome, 6(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0428-1>
- Rateb, M. E., & Ebel, R. (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. Natural Product Reports, 28(2), 290–344. <https://doi.org/10.1039/C0NP00058H>
- Riyanti, Balansa, W., Liu, Y., Sharma, A., Mihajlovic, S., Hartwig, C., Leis, B., Rieuwpassa, F. J., Ijong, F. G., Wägele, H., König, G. M., & Schäberle, T. F. (2020).
- Rodier, J., Legube, B., & Merlet, N. (2009). L'analyse de l'eau – 9e édition. Dunod.
- Sabdaningsih, A., Liu, Y., Mettal, U., Heep, J., Riyanti, Wang, L., Cristianawati, O., Nuryadi, H., Sibero, M. T., Marner, M., Radjasa, O. K., Sabdono, A., Trianto, A., & Schäberle, T. F. (2020). A New Citrinin Derivative from the Indonesian Marine Sponge-Associated Fungus *Penicillium citrinum*. Marine Drugs, 18(4), 227. <https://doi.org/10.3390/md18040227>.

- Sathish Kumar SR, Kokati Venkata Bhaskara Rao. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012 Oct;2(10):787-792. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60230-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60230-5).
- Selection of sponge-associated bacteria with high potential for the production of antibacterial compounds. *Scientific Reports*, 10(1), 19614.
- Shirling, E.B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4_10 Locci, R. (1989). *Streptomyces* and related genera. In S. T.
- Subramani, R., & Sipkema, D. (2019). Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine Drugs*, 17(5), 249. <https://doi.org/10.3390/md17050249>
- Tait, R. V. (2011). *Elements of Marine Ecology*. 4th edition. Butterworth-Heinemann.
- Takahashi, Y., Nonomura, H., & Seino, A. (1996). Diversity of melanin production in *Streptomyces* species and taxonomic significance. *Actinomycetologica*, 10(2), 36–42. <https://doi.org/10.3209/saj.SAJ100204>.
- Tami, A., & Youcef Khoudja, F. (2019). Analyse physico-chimique comparée des eaux de deux écosystèmes lacustres : barrage de Djorf Torba (Béchar) et barrage de Brézina (El Bayadh) [Mémoire de Master, Université Saad Dahleb de Blida 1.
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 295–347. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06>
- Trinset Weeraphan, Chollabuppha Chou, Naphatson Chanthathamrongsiri, Thanchanok Sirirak, Sumaitt Putchakarn, Supakarn Chamni & Wongsakorn Phongsopitanun. (2025). Microbiome profiling and Actinomycetes isolation from tropical marine sponges. *AIMS Microbiology*, 11 (1), 182–205. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2025010>.
- UNESCO. (1983). *Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring*. Intergovernmental Oceanographic Commission.
- Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Hooper, J. N. A., Rützler, K., & de Voogd, N. J. (2012). Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS ONE*, 7(4), e35105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035105>

- Webster, N. S., & Thomas, T. (2016). The sponge hologenome. *mBio*, 7(2), e00135-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00135-16>
- Weravan, P., Dupont, L., & Saidi, M. (2025). Divergences microbiennes associées aux espèces d'éponges marines : Influence des micro-habitats et des protocoles d'isolement. *Marine Microbial Ecology*, 34(2), 112–127.
- Williams & Wilkins. Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>.
- Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 4, pp. 2451–2508).
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., & Sackin, M. J. (1983). Numerical classification of General Microbiology, 129(6), 1743–1813. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-6-1743>.
- Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W., & Wang, Q. (2015). Antibacterial and Antifungal Compounds from Marine Fungi. *Marine Drugs*, 13(6), 3479-3513.
- Zerriouh Alaa et Lahouati Souheyla, Isolement des moisissures productrices de substances antimicrobiennes à partir de la grotte de Tagma (Gherf El Mit-Tlemcen), Mémoire de Master en Microbiologie et contrôle de qualité, Université de Tlemcen, Faculté des Sciences de la nature et de la Vie et Sciences de Terre et de l'Univers, Département de Biologie, Année universitaire 2023/2024.
- Zhang, H., Lee, Y. K., & Zhang, W. (2019). Marine sponge-associated actinomycetes: a source of novel anticancer compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 622. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00622>.

Annexe

La composition des milieux de culture

❖ Dextrose Agar (PDA) :

Pomme de terre.....	200g
Saccharose.....	10 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée+ Eau de mer.....	1 L

❖ Czapek Dox Agar (CDA) :

Saccharose.....	3 g
NaNO ₃	30 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄	0,5 g
KCl.....	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée+ Eau de mer.....	1 L

❖ Malt Extract Agar (MEA) :

Extrait de malt.....	20 g
Peptone.....	1 g
Glucose.....	20 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée+ Eau de mer	1 L

❖ Potato Dextrose Broth (PDB) :

Pomme de terre.....	200g
Saccharose.....	20g
Peptone.....	1g
Eau distillée.....	1L

❖ Amidon Caséine Agar (M2) :

Amidon.....	10 g
Caséine.....	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl.....	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,05 g

CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄	0,01 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée+ Eau de mer.....	1 L
pH	7,4

❖ **Gélose de Gause :**

Amidon.....	20 g
KNO ₃	1 g
NaCl.....	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée+ Eau de mer.....	1 L
pH	7,4

❖ **International Streptomyces Project medium 2 (ISP2) :**

Extrait de levure.....	4 g
Extrait de malt.....	10 g
Glucose.....	4 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée+ Eau de mer.....	1 L
pH	7,3

❖ **Tryptic Soy Agar (TSA) :**

Peptone de caséine trypsinée.....	15 g
Peptone de soja.....	5 g
NaCl.....	5 g
Glucose	
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée+ Eau de mer.....	1 L

❖ **Bouillon Mueller Hinton :**

Poudre de Mueller Hinton.....	6,9 g
Eau distillée.....	300 ml
pH	7,4

❖ **Bouillon Sabouraud :**

Peptone de gélatine.....1 g
Glucose.....4 g
Eau distillée.....100 ml
pH..... 5,6

❖ **Gélose Mueller Hinton :**

Poudre de Mueller Hinton..... 69 g
Agar-agar.....51 g
Eau distillée.....3 L
PH..... 7,4

❖ **Gélose Sabouraud :**

Poudre de Sabouraud 65 g
Eau distillée.....1 L
pH5,6

ملخص

تحتضن الجزائر تنوعًا بيولوجيًا ملحوظًا من الإسفنجيات البحرية من نوع أكسينيلا فيريكوس ولا سيما الأنواع الحمراء والصفراء، التي تؤوي مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة التكافلية. وتشكل هذه الأخيرة، خاصة الأكتينوميستات والفطريات، مصدرًا واعدًا للمركبات المضادة للميكروبات في مواجهة التهديد المتزايد للعوامل الممرضة المقاومة لعدة أدوية. وفي هذا السياق، أجرينا دراسة قمنا خلالها بجمع وتحليل عينات من الإسفنج، مما سمح بعزل 12 سلالة من الفطريات، معظمها من جنس واحد *Penicillium*، وأربع سلالات من الأكتينوميستات. من بين هذه السلالات، أظهرت سلالتان فطريتان وثلاث سلالات من الأكتينوميستات نشاطًا مضادًا للميكروبات ملحوظًا، لا سيما ضد *Bacillus subtilis* و *Candida albicans*. وتؤكد هذه النتائج الإمكانيات الصيدلانية الحيوية للكائنات الدقيقة البحرية المرتبطة بـ *Axinella verrucosa* كمصدر طبيعي لجزيئات جديدة مضادة للميكروبات. **الكلمات المفتاحية:** إسفنج بحري، كائنات دقيقة بحرية، نشاط مضاد للميكروبات، التكنولوجيا الحيوية البحرية.

Résumé

L'Algérie abrite une biodiversité remarquable d'éponges marines du genre *Axinella verrucosa*, notamment les espèces rouges et jaunes, qui hébergent une large gamme de micro-organismes symbiotiques. Ceux-ci, en particulier les actinomycètes et les moisissures, représentent une source prometteuse de composés antimicrobiens face à la menace croissante des agents pathogènes multirésistants. Dans ce contexte, nous avons mené une étude au cours de laquelle nous avons collecté et analysé des échantillons d'éponges, ce qui a permis d'isoler 12 souches de moisissures, principalement du genre *Penicillium*, et quatre souches d'actinomycètes. Parmi celles-ci, deux souches fongiques et trois souches d'actinomycètes ont montré une activité antimicrobienne remarquable, notamment contre *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Ces résultats soulignent le potentiel biopharmaceutique des micro-organismes marins associés à *Axinella verrucosa* comme source naturelle de nouvelles molécules antimicrobiennes.

Mots-clés : Éponge Marine, microorganismes marins, activité antimicrobienne, biotechnologie Marin .

Abstract

Algeria harbors a remarkable biodiversity of marine sponges of the genus *Axinella verrucosa*, particularly the red and yellow species, which host a wide range of symbiotic microorganisms. These microorganisms, especially actinomycetes and molds, represent a promising source of antimicrobial compounds in response to the growing threat of multidrug-resistant pathogens. In this context, we conducted a study during which we collected and analyzed sponge samples, leading to the isolation of 12 fungal strains, mainly from the *Penicillium* genus, and four actinomycete strains. Among these, two fungal strains and three actinomycete strains exhibited remarkable antimicrobial activity, notably against *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. These findings highlight the biopharmaceutical potential of marine microorganisms associated with *Axinella verrucosa* as a natural source of new antimicrobial molecules.

Keywords: Marine sponge, marine microorganisms, antimicrobial activity, marine biotechnology.