



AVIS DE SOUTENANCE DE THESE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz –Fès – annonce que

Mme (elle) **AIT ASSOU Soumia**
Soutiendra : le **Vendredi 26/05/2023 à 15H00**
Lieu : **FSDM – Centre Visioconférence**

Une thèse intitulée :

**Etude de la diversité et des activités antimicrobiennes des molécules
bioactives des actinomycètes isolées d'un biotope extrême (mines de plomb
de la région de Midelt)**

En vue d'obtenir le **Doctorat**

FD : Molécules Bioactives Santé et Biotechnologie
Spécialité : Microbiologie / Biologie Moléculaire

Devant le jury composé comme suit :

Nom et prénom	Etablissement	Grade	Qualité
Pr MERZOUKI Mohammed	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	PES	Président
Pr ARAKRAK Abdelhay	Faculté des Sciences et Techniques, Tanger	PES	Rapporteur & Examineur
Pr HAJJAJ Hassan	Faculté des Sciences, Meknès	PES	Rapporteur & Examineur
Pr HAGGOUUD Abdellatif	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	PES	Rapporteur & Examineur
Pr BOUIA Abdelhak	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	PES	Examineur
Pr IBN SOUDA KORAICHI Saad	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	PES	Examineur
Pr EL HASSOUNI Mohammed	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	PES	Directeur de thèse



Résumé :

La résistance microbienne face aux antibiotiques disponibles ne cesse d'augmenter. Cette menace inquiétante a incité le comité scientifique de chercher activement de nouvelles substances naturelles de grande valeur thérapeutique. Historiquement, les composés naturels, en particulier ceux dérivés de microorganismes, étaient une source prometteuse de nouvelles classes d'antibiotiques. En outre, l'investigation des microorganismes vivant dans des écosystèmes inexploités ou extrêmes s'est avérée être une approche efficace pour découvrir de nouveaux composés bioactifs. Dans ce contexte, notre recherche vise à étudier la diversité des actinomycètes des mines de plomb de la région de Midelt, et à explorer leur potentiel dans la production d'antibactériens et antifongiques.

L'isolement a permis de constituer une collection bactérienne de 145 isolats, qui ont été soumis à des caractérisations morphologique, chimiotaxonomique, biochimique et moléculaire. Les résultats obtenus montrent une diversité actinomycétale, les différents isolats appartiennent à cinq genres : *Streptomyces*, *Lentzea*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia* et *Actinopolymorpha*. Il est à noter que ce dernier genre est rapporté pour la première fois dans des biotopes riches en métaux lourds. La résistance de certaines souches représentatives aux métaux lourds est déterminée en testant leur tolérance au plomb, au cuivre et au zinc. Les résultats obtenus ont mis en lumière l'existence des souches présentant une remarquable tolérance au plomb (CMI : 500 à 1750 mg/L), au cuivre (CMI : 150 à 700 mg/L) et au zinc (CMI de 100 à 1000 mg/L). Les souches du genre *Amycolatopsis* et *Lentzea* ont fait preuve d'une résistance élevée au cuivre avec une CMI de l'ordre de 450 mg/L, une valeur jamais rapportée dans la littérature. En outre, des souches de *Streptomyces* ont montré un degré de tolérance plus élevé au plomb, avec une CMI de 1750 mg/L, une valeur proche de la valeur maximale de 1800 mg/L rapportée chez *Streptomyces* VITSVK9 sp.

L'étude du potentiel antimicrobien vis-à-vis de souches tests a montré que 51 souches (35.17%) sont dotées d'activité antimicrobienne contre au moins une souche test. Les deux souches *Streptomyces* sp. AS34 et *Streptomyces* sp. DS104, présentant les activités antibactérienne et anti-*Candida* les plus élevées respectivement sont cultivées en milieu liquide pour extraire, fractionner et contribuer à la purification de leurs molécules bioactives. La sous fraction (A2) résultant du processus de purification de l'extrait sec de *Streptomyces* sp. AS34 a montré une activité inhibitrice considérable ciblant spécifiquement les bactéries à Gram⁺ avec une CMI de l'ordre de 0.09 et 0.9 µg/mL contre 2 et 3 µg/mL pour l'ampicilline contre les souches de référence *B. subtilis* et *S. aureus* respectivement. En outre, vis-à-vis la souche de *S. aureus* multirésistante, la sous fraction A2 a une CMI d'environ 1 µg/mL, alors que la CMI de l'ampicilline est plus de 9 µg/mL. La CMB est de l'ordre de 1, 0.9 et 1 µg/mL pour *B. subtilis*, *S. aureus* et *S. aureus* multirésistante, respectivement contre 4, 4 et > 9 µg/mL pour l'ampicilline, ceci démontre le potentiel fort intéressant de cette sous fraction A2.

Streptomyces sp. DS104 est dotée d'une forte activité contre *C. albicans* avec une CMI des extraits secs qui s'élève à seulement 4 µg/mL contre 2 µg/mL de l'amphotéricine B (anti-fongique de référence). L'analyse GC-MS des fractions préliminaires bioactives révèle l'existence de divers composés bioactifs appartenant à différents groupes chimiques ; acides gras et d'autres acides carboxyliques, isocoumarines, pyrrolizidines et composés phénoliques. Trois composés, à savoir le 2-hydrazino-8-hydroxy-4-phénylquinoline, l'acide hydroxyphénylacétique et le 3-carboxaldéhyde-1H-indole, sont rapportés pour la première fois chez le genre *Streptomyces*.

Streptomyces sp. AS34 et *Streptomyces* sp. DS104 sont deux souches intéressantes pour lesquelles des études plus approfondies sont nécessaires afin de mettre en évidence toutes les molécules bioactives responsables des activités antimicrobiennes. Ces deux souches constituent des candidats potentiels dans le développement de nouveaux antimicrobiens.

Mots clés : Actinomycètes, mines des métaux lourds, résistance aux métaux lourds, molécules bioactives, potentiel antimicrobien.



DIVERSITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF BIOACTIVE MOLECULES OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM AN EXTREME BIOTOPE: LEAD MINES OF MIDELT REGION

Abstract:

The level of antibiotic resistance among microbes is on the rise. The concerning threat has prompted the scientific committee to actively seek out new natural products that can be developed into high-value drugs. Historically, natural compounds, particularly those derived from microorganisms, have been a promising source of novel classes of antibiotics. Furthermore, exploring microorganisms residing in unexplored and extreme ecosystems has proven to be an effective strategy for discovering new bioactive compounds. In this context, our research aims to isolate actinomycetes from lead mines in the Midelt region, and to explore their potential in the production of antimicrobials.

Through isolation, we were able to create a bacterial collection consisting of 145 isolates, which underwent morphological, chemotaxonomic, biochemical, and molecular characterizations. The findings indicate a diverse range of actinomycetes present within the mining sites, with the different isolates belonging to five major genera: *Streptomyces*, *Lentzea*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia* and *Actinopolymorpha*. It worth noting that this is the first report to the *Actinopolymorpha* genus in biotopes that are rich in heavy metals. To determine the resistance of some representative strains to heavy metals, their tolerance to lead, copper, and zinc was tested. The results revealed the presence of strains with remarkable tolerance to lead (MIC: 500 to 1750 mg/L), copper (MIC: 150 to 700 mg/L) and zinc (MIC: 100 to 1000 mg/L). It is worth noting that strains belonging to the *Streptomyces* genus displayed a high resistance to copper, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of about 450 µg/mL, a value that has never been reported in the literature before. Furthermore, strains belonging to the *Streptomyces* genus exhibited a higher degree of tolerance to lead, with a MIC of 1750 µg/mL, a value close to the maximum value of 1800 mg/L reported in *Streptomyces* VITSVK9 sp.

The study of the antimicrobial potential against test strains showed that 51 strains (35.17%) have antimicrobial activity against at least one test strain. The two strains *Streptomyces* sp. AS34 and *Streptomyces* sp. DS104, with the highest antibacterial and anti-*Candida* activities respectively, were grown in liquid medium to extract, fractionate and contribute to the purification of their bioactive molecules. The sub-fraction (A2) resulting from the purification process of the *Streptomyces* sp. AS34 dry extract showed considerable inhibitory activity specifically targeting Gram+ bacteria with MICs in the range of 0.09 and 0.9 µg/mL versus 2 and 3 µg/mL for ampicillin against the reference strains *B. subtilis* and *S. aureus* respectively. Furthermore, against the multi-resistant *S. aureus* strain, the A2 subfraction has an MIC of approximately 1 µg/mL, while the MIC of ampicillin is more than 9 µg/mL. The MBC is of the order of 1, 0.9 and 1 µg/mL for *B. subtilis*, *S. aureus* and multidrug resistant *S. aureus*, respectively, compared to 4, 4 and > 9 µg/mL for ampicillin, which demonstrates the very interesting potential of this A2 subfraction.

Streptomyces sp. DS104 also has strong activity against *C. albicans* with a MIC of dry extracts of only 4 µg/mL compared to 2 µg/mL of the positive control (amphotericin B). GC-MS analysis of the preliminary bioactive fractions reveals the existence of various bioactive compounds belonging to different chemical groups; fatty acids and other carboxylic acids, isocoumarins, pyrrolizidines and phenolic compounds, which have already been shown to have antimicrobial activity. Three compounds, namely 2-hydrazino-8-hydroxy-4-phenylquinoline, hydroxyphenylacetic acid and 3-carboxaldehyde-1H-indole, are reported for the first time in the genus *Streptomyces*.

Streptomyces sp. AS34 and *Streptomyces* sp. DS104 are two interesting strains for which further studies will be necessary to identify all the bioactive molecules responsible for their antimicrobial activities. These two strains are potential candidates for the development of new antimicrobial drugs.

Keywords: Actinomycetes, heavy metal mining, heavy metal resistance, bioactive molecules, antimicrobial potential.