

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

Faculté des Sciences

Département de Chimie

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie des produits naturels et de biomolécules

VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DES SOUCHES
MICROBIENNES ISOLEES DE L'ALGUE ROUGE *ASPARAGOPSIS*
ARMATA : BIOTRANSFORMATION ET PRODUCTION DE
METABOLITES D'INTERETS BIOACTIF ET ENVIRONNEMENTAL

Par

SAIDANI Fatiha

Devant le jury composé de :

Boutoumi Hocine	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Président
Hachama Kamel	Professeur, Université Khemis-Miliana	Examineur
Bensacia Nabila	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Examinatrice
EL Hattab Mohamed	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Directeur de thèse
Badis Abdelmalek	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Codirecteur de thèse

Blida, Juillet 2024

ملخص

يركز هذا العمل على العزل والتوصيف الأولي للمجتمع البكتيري المرتبط بالطحالب الحمراء من نوع *Asparagopsis armata*، التي تم جمعها على مستوى ساحل البحر الأبيض المتوسط الجزائري، وبالتحديد من المجمع السياحي «القرن الذهبي» شرق تيبازة. كما يركز على التقييم التكنولوجي الحيوي للبكتيريا المعزولة في إنتاج المستقلبات ذات الأهمية الحيوية والبيئية، بما في ذلك الطاقة المستحلبة (طابع خافض للتوتر السطحي)، انحلال الدم، انحلال البروتين (البروتياز) وتحديد النشاط المضاد للميكروبات (المضادات الحيوية). سمحت الدراسة باختيار سلالات فعالة لدراسات الإنتاج والاستفادة المثلى من هذه الأنشطة. أجرينا أيضًا دراسة حول التحول البيولوجي للتربينات الأحادية (المنثول، الثيمول، والسيمين) بواسطة السلالة البحرية الجديدة 17R التي تم عزلها من

Asparagopsis armata

أدت الدراسة إلى عزل 25 بكتيريا بحرية باستخدام وسط محدد *Väätänen Nine Salt Solution (VNSS)*. وقد سمح التوصيف الأولي لهذه العزلات بإتباع مقاربة مظهرية مبنية على أساس الدراسات المورفولوجية، البيوكيميائية والأيفية، مما أدى إلى تصنيف العزلات ضمن جنسي *Staphylococcus* (9 عزلات) و *Bacillus* (16 عزلة). فيما يتعلق بالخصائص البيوكيميائية والأيفية، تبين أن جميع السلالات المعزولة إيجابية لإنزيم الكتلاز وقدرة على التنفس الهوائي واللاهوائي الاختياري. بالإضافة إلى ذلك، كانت 16 سلالة إيجابية لإنزيم الأكسيداز، بينما كانت السلالات المتبقية سلبية للأكسيداز. بشكل عام، تم فحص 13 عزلة من أصل 25 للتأكد من قدرتها على إنتاج جزيئات مضادة للميكروبات. وتم اختيار 14 سلالة منتجة لإنزيم البروتيني بناءً على وجود هالات أكبر حول المستعمرات. كما أظهرت 17 سلالة نشاطًا إيجابيًا لانحلال الدم، من بينها 13 عزلة أظهرت إنتاجًا كبيرًا للمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوي.

سمحت دراسة إمكانات السلالات البكتيرية المعزولة في إنتاج المركبات المضادة للميكروبات القابلة للانتشار، بالإضافة إلى إنزيمات الانحلال البروتيني، الانحلال الدموي، والمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوي، باختيار 10 سلالات عالية الأداء، وخاصة السلالة المشفرة 17R التابعة لجنس *Bacillus*، التي أثبتت فعاليتها وكانت الأكثر كفاءة. من جهة أخرى، أثبتت السلالة 17R فعاليتها في التحويل البيولوجي لثلاثة أنواع من التربينات الأحادية: المنثول، الثيمول، والسيمين.

تم إجراء التحول الحيوي للتربينات الأحادية الثلاثة في نفس الوسط *Luria Bertani (LB)* تحت ظروف مثالية، حيث تم ضبط درجة الحموضة عند 8.5 ودرجة حرارة الحضانة عند 30 درجة مئوية، مع فترة حضانة مدتها 7 أيام في محرض دوار بسرعة 150 دورة في الدقيقة. تم استخدام تركيز الركيزة بمقدار 0.1 ملغم/مل للمنثول، و0.25 ملغم/مل للسيمين، و0.5 ملغم/مل للثيمول، مع إضافة مادة توبين 80 بتركيز 1% كمادة خافضة للتوتر السطحي لإذابة الركائز المختلفة.

مكّن التحول البيولوجي لكل من المنثول، الثيمول، والسيمين بواسطة هذه السلالة من الحصول على مركبات هيدروكربونية وأحادية مؤكسجة أخرى، بما في ذلك أحماض وكحوليات مثل: حمض البنزويك، حمض فينيل أسيتيك، كحول فينيثيليك، ب-سيمين، أوكالبتول، بورنيول، كافور، ب-سيمين-8-أول، كارفاكول، 8-هيدروكسي مينثول، 2،1-cis- إيبوكسي ليمونين.....

الكلمات المفتاحية: البكتيريا البحرية؛ *Asparagopsis armata*؛ الأنشطة البيوتكنولوجية؛ التحول البيولوجي؛ التربينات الأحادية.

ABSTRACT

The present work concerns the isolation and preliminary characterization of the bacterial community associated with the red algae *Asparagopsis armata*, collected on the Algerian Mediterranean coast at the « Corne d'Or » tourist complex East of Tipaza. It also focuses on the biotechnological valorization of the isolated bacteria in the production of metabolites of bioactive and environmental interest, in particular, emulsifying power (surfactant character), hemolytic power, proteolytic power (protease) as well as the determination of antimicrobial activity (antibiotic). The study enabled the selection of high-performance strains for the production and optimization studies of these activities. We also studied the biotransformation of monoterpenes (menthol, thymol and cymene) by the new marine strain 17R, isolated in the present work from *Asparagopsis armata*.

The study led to the isolation of twenty-five marine bacteria using a specific medium *Väätänen Nine Salt Solution* (VNSS). The preliminary characterization of these isolates using a phenotypic approach based on morphological, biochemical and metabolic studies allowed to attach the isolates to the two genera *Staphylococcus* (9 isolates) and *Bacillus* (16 isolates). Regarding the biochemical and metabolic characteristics, all the isolated strains are catalase-positive and facultative aero-anaerobes, 16 strains are oxidase-positive while the other strains are oxidase-negative. In total, 13 isolates from 25 bacterial strains screened for their potential to produce antimicrobial molecules. Fourteen strains were selected as protease producers with larger halos. Seventeen strains have hemolytic-positive activity between them 13 isolates showed a considerable biosurfactant production.

Studying the potential of isolated bacterial strains on the production of diffusible antimicrobial compounds, as well as proteolytic enzymes, hemolytic and biosurfactant, led to the selection of 10 high-performance strains, in which the strain coded 17R, affiliated to the *Bacillus* genus, was the best performer. On the other hand, the 17R strain proved to be very efficient in the biotransformation of three types of monoterpenes (menthol, thymol and cymene).

Biotransformation of the three monoterpenes was carried out on the same *Luria Bertani* (LB) medium under the optimized conditions of pH = 8.5, incubation temperature = 30°C, incubation period = 7 days in a rotary shaker at 150 rpm and with a substrate concentration of 0.1; 0.25 and 0.5 mg/mL of menthol, cymene and thymol, respectively with the use of 1% Tween 80 as surfactant to solubilize the different substrates.

The biotransformation of the monoterpenes by this strain allowed obtaining other hydrocarbon and oxygenated monoterpenes, acids and alcohols including: Benzoic acid, Phenylacetic acid, Phenylethyl alcohol, p-Cymene, Eucalyptol, Borneol, Camphor, p-Cymene-8-ol, Carvacrol, 8-hydroxymenthol, Cis-1,2- Epoxy limonene.....

Key words: Marine bacteria; *Asparagopsis armata*; Biotechnological activities; Biotransformation; Monoterpenes.

RÉSUMÉ

Le présent travail porte sur l'isolement et la caractérisation préliminaire de la communauté bactérienne associée à l'algue rouge *Asparagopsis armata*, collectée sur la côte méditerranéenne algérienne, au niveau du complexe touristique la « Corne d'Or » à l'Est de Tipaza. Il porte également sur la valorisation biotechnologique des bactéries isolées dans la production des métabolites d'intérêt bioactif et environnemental, notamment, le pouvoir émulsifiant (caractère tensioactif), hémolytique, protéolytique (protéase) ainsi qu'à la détermination de l'activité antimicrobienne (antibiotique). L'étude a permis la sélection des souches performantes pour des études de production et d'optimisation de ces activités. Nous avons également effectué une étude sur la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la nouvelle souche marine 17R isolée, dans le présent travail, à partir d'*Asparagopsis armata*.

L'étude a mené à l'isolement de vingt-cinq bactéries marines en utilisant un milieu spécifique *Väättänen Nine Salt Solution* (VNSS). La caractérisation préliminaire de ces isolats en utilisant une approche phénotypique basée sur des études morphologiques, biochimiques et métaboliques a permis de rattacher les isolats aux deux genres *Staphylococcus* (9 isolats) et *Bacillus* (16 isolats). En ce qui concerne les caractéristiques biochimiques et métaboliques, toutes les souches isolées sont catalases positives et aéro-anaérobies facultatives, 16 souches sont oxydases positives alors que les autres souches sont oxydases négatives. Au total, 13 isolats de 25 souches bactériennes ont été criblés pour leur potentiel de production de molécules antimicrobiennes. Quatorze souches ont été sélectionnées comme productrices de protéases avec des halos plus importants. Dix-sept souches ont une activité hémolytique positive parmi lesquelles 13 isolats ont montré une production considérable de biosurfactants.

L'étude des potentialités des souches bactériennes isolées dans la production des composés antimicrobiens diffusibles ainsi que des enzymes protéolytiques, hémolytiques et biosurfactants a permis de sélectionner 10 souches performantes, notamment la souche codée 17R, affiliée au genre *Bacillus* qui s'est avérée la plus performante. En revanche, la souche 17R s'est montrée efficace pour biotransformer trois types de monoterpènes (menthol, thymol et cymène).

La biotransformation des trois monoterpènes a été réalisée sur le même milieu *Luria Bertani* (LB) dans les conditions optimisées de pH = 8.5, température d'incubation = 30 °C, période d'incubation = 7 jours dans un agitateur rotatif à 150 rpm et avec une concentration des substrats de 0.1 ; 0.25 et 0.5 mg/mL du menthol, cymène et thymol, respectivement avec l'utilisation de Tween 80 à 1% comme surfactant pour solubiliser les différents substrats.

La biotransformation du menthol, thymol et cymène par cette souche a permis l'obtention des autres monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés, des acides et des alcools notamment : L'acide benzoïque, l'acide phénylacétique, l'alcool phénéthylque, le p-cymène, l'eucalyptol, le bornéol, le camphre, le p-cymène-8-ol, le carvacrol, le 8-hydroxymenthol, le cis-1,2- Epoxy limonène.....

Mots clés : Bactéries marines ; *Asparagopsis armata* ; Activités biotechnologiques ; Biotransformation, Monoterpènes.

REMERCIEMENTS

Il est difficile de commencer à écrire cette page par le nombre et l'importance des personnes qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à l'aboutissement de ce travail de sept enrichissantes et intenses années.

Mes remerciements vont tout d'abord à ALLAH tout puissant de m'avoir donné la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener à bien ce modeste Travail.

Mes plus sincères remerciements vont à mes très chers parents que dieu protège, qui ont su croire en moi et qui ont m'avoir soutenue tout au long de mes études. Merci pour votre amour, votre aide et confiance et surtout pour votre présence dans les moments difficiles. En témoignage de ma profonde affection, qu'ils sachent que ce travail est en grande partie le fruit et résultat de leur soutien ; je leur suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

J'adresse mes sincères remerciements en premier lieu à mon directeur de thèse Monsieur El Hattab Mohamed, professeur et directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) à la Faculté des Sciences, Université Saad Dahlab Blida 1, d'avoir accepté de m'encadrer. Merci pour votre patience inébranlable, votre aide sans limites et votre disponibilité sans relâches sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu voir le jour. De même attention, je remercie également mon co-directeur de thèse Monsieur Badis Abdelmalek, Professeur à l'Université Saad Dahlab Blida 1, pour ses encouragements, sa disponibilité, sa patience avec moi, sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines et pour toutes ses contributions afin de mener à bien ce présent travail. Je tiens à leur remercier vivement de m'avoir confiée ce sujet de thèse pluridisciplinaire entre la chimie et la microbiologie qui est intéressant et d'actualité. Plusieurs années de travail fastidieux, laborieux, parfois douloureux nous ont permis ensemble de finaliser cette thèse et pendant lesquelles vous m'avez appris la rigueur scientifique, l'esprit de l'exactitude et de l'objectivité dans le travail de recherche. Vous m'avez soutenu jusqu'à la dernière minute, un soutien et une attention que je n'oublierais

jamais. Je vous exprime ici toute ma gratitude et ma reconnaissance envers tout ce que vous avez fait pour finaliser ce travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur Boutoumi Hocine, Professeur à l'Université Saad Dahlab Blida 1, pour m'avoir honoré d'accepter de présider le jury de ma thèse et de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs et sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse, merci à Monsieur Hachama Kamel, professeur à l'Université de Khemis-Miliana, et Madame Bensacia Nabila, professeur à l'Université Saad Dahlab Blida 1, qui ont bien voulu juger ce travail en étant examinateurs de cette thèse.

J'adresse mes remerciements particuliers à madame Fatima Zohra Ferradji, maitre de conférences à l'Université de Blida 1, pour son aide, sa gentillesse, sa patience, ses conseils précieux, sa disponibilité qui a donné vie à ce travail malgré ses charges professionnelles à qui j'exprime ici mon profond respectMerci.

Je remercie très chaleureusement Madame Bouzidi Naima, Présidente du Comité de Formation Doctorale à la faculté des Sciences, Université Blida 1, pour les efforts considérables qu'elle a déployés pour assurer un bon cheminement de notre Doctorat. Je la remercie également pour sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils pertinents.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce modeste travail en particulier : M^{me} Hamiche Sonia, M^{elle} Bounaas Karima, M^{me} Touafek, M^{me} Daghbouche, M^{me} Zeffouni, M^{me} Mehdaoui (Rabi yarhamha), Mr Zahi, Mr Edouaouda.

J'exprime en particulier mes chaleureux remerciements et ma profonde gratitude vont tout particulièrement à ma copine, M^{me} Beichi Madjeda, doctorante au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécule (LCSN-BioM) pour sa gentillesse, sa compréhension et son soutien continu ainsi que ses encouragements pendant les moments

*difficiles, qui ont rendu ce parcours inoubliable. Cette thèse et moi vous devons beaucoup.
Merci.*

Un grand merci aux ingénieurs du laboratoire de recherche « Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1, M^{elle} Messaoudi Fatiha, M^{elle} Medjdoub Dallel et M^{me} Boudissa Hafida, pour sa disponibilité et son aide précieux dans la réalisation de mon travail expérimentale.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules, qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail.

De même je remercie infiniment Mr Toufahi Djamel de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire. Avec ses qualités humaines et son expérience, il a su nous faire aimer le monde merveilleux des bactéries.

Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié.

Au risque de me répéter, encore MERCI à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin et pardon à ceux que j'aurais maladroitement oublié.

Merci pour toutes et tous

DEDICACES

Je dédie ce travail à tous les gens qui m'entourent un par un, à ceux qui ont souffert pour moi, ces personnes qui m'entouré et m'entourent, par leur amour, leur sacrifice ; ces gens qui sont la source du bonheur dans ma vie, ces gens qui sont mon refuge dans les moments difficiles, sans eux je ne serais jamais ce que je suis aujourd'hui.

Le premier mérite revient à mes chers parents pour leur grande patience, leur compréhension et leur soutien indéfectible et encouragement durant toute ma vie.

« Mon cher Papa Saidani Brahim qui a mené durement sa vie pour me voir là où j'en suis maintenant et s'est sacrifié toujours à l'effet de me rendre heureuse.

A ma chère mère qui m'a entouré d'affections tout au long de ma vie ; Chère mère je me rappelle toujours de tous les moments où tu m'as poussé à travailler et à réussir »

Merci et j'espère que vous trouvez dans ce travail l'expression de ma gratitude et mon respect.

A mon grand-père qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager : Que le dieu nous le garde.

A Mon cher mari Mansour Billel, j'aimerai bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide, tes conseils, ta présence et surtout ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour. Que dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.

A mon beau père et ma belle-mère pour leur soutien durant la période d'élaboration de ce modeste travail.

A mes très chère sœurs Asmaa, Malek et ma belle-sœur Soumia. A mon cher frère Anes et mon beau-frère Ishak Nazim, pour leur encouragement.

Sans oublier mon Très Cher Petit Poussin Yasser NourEddine : C'est à toi mon adorable ange, ma joie, mon petit trésor que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Je t'aime mon bébé et je te souhaite tout le bonheur du monde.

A toute ma famille

A toutes mes amies

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont cher

A toutes les personnes à qui je réserve une place dans mon cœur et qui ont su être patientes, je leurs dédie ce modeste travail.

Fatiha

TABLE DES MATIERES

ملخص	1
ABSTRACT	2
RESUME	3
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	7
TABLE DES MATIERES	8
Liste des illustrations, graphiques et tableaux	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE	19

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

DIVERSITÉ BACTÉRIENNE DE L'ALGUE ROUGE *ASPARAGOPSIS ARMATA* ET LEUR PROPRIÉTÉS BIOTECHNOLOGIQUES (ANTIMICROBIENNES, PROTEOLYTIQUES, HEMOLYTIQUES ET BIOSURFACTANTS)

1.1. Introduction	24
1.2. Généralité sur les algues marines	24
1.2.1. Définition et structure d'une algue	24
1.2.2. Classification des algues marines	25
1.2.2.1. Algues rouges (<i>Rhodophycées</i>)	26
1.2.2.2. Algues vertes (<i>Chlorophycées</i>)	26
1.2.2.3. Algues brunes (<i>Phéophycées</i>)	27
1.2.2.4. Algues bleues (<i>Cyanobactéries</i>)	27
1.2.3. Répartition géographique des algues marines	27
1.2.4. Reproduction des algues	28
1.2.5. Utilisation et intérêt économique des algues	28
1.3. Etude de l'algue rouge <i>Asparagopsis armata</i>	29
1.3.1. Position systématique, description, biologie et écologie d' <i>Asparagopsis armata</i>	29

1.3.1.1. Systématique	29
1.3.1.2. Description, biologie et écologie	29
1.3.2. Récolte, Utilisation et Impacts économiques	30
1.4. Etude des souches bactériennes d' <i>Asparagopsis armata</i>	30
1.4.1. Généralités sur les microorganismes marins et leur interaction avec les algues	30
1.4.2. Diversité des microorganismes des algues rouges	31
1.4.3. Isolement des microorganismes	34
1.4.3.1. Protocole d'isolement des microorganismes épiphytes	34
1.4.3.2. Protocole d'isolement des microorganismes endophytes	36
1.4.4. Etude du genre <i>Bacillus</i>	37
1.4.4.1. Caractéristiques bactériologiques du genre <i>Bacillus</i>	37
1.4.4.2. Systématique et taxonomie du genre <i>Bacillus</i>	38
1.4.4.3. Ecologie du genre <i>Bacillus</i>	38
1.4.4.4. Potentiel biotechnologique de bactéries du genre <i>Bacillus</i>	39
1.5. Mis en évidence des activités microbiennes d'intérêt biotechnologique des souches microbiennes d'origine marine	39
1.5.1. Métabolites secondaires biologiquement actifs dérivés de microorganismes associés aux algues marines	40
1.5.2. Enzyme protéolytique d'origine microbienne	41
1.5.3. Biosurfactants et applications	42
1.5.4. Procédure générale d'identification des composés biologiquement actifs issus de microorganismes associés aux algues marines	44

CHAPITRE 2

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIOTRANSFORMATION DES MONOTERPENES (MENTHOL, THYMOL ET CYMENE) PAR UNE SOUCHE BACTERIENNE D'*ASPARAGOPSIS ARMATA*

2.1. Introduction	46
2.2. Notion générale sur la biotransformation	46
2.2.1. Définition de la biotransformation	46
2.2.2. Classification des voies de biotransformation	47
2.2.3. Avantages de la biotransformation	47

2.2.4. Inconvénients de la biotransformation	48
2.2.5. Facteurs affectant la biotransformation	49
2.2.6. Biocatalyseurs	49
2.2.7. Optimisation des procédés de biotransformation	50
2.2.8 Agents de biotransformation	50
2.3. Biotransformation des monoterpènes par des espèces du genre <i>Bacillus</i> et d'autres microorganismes	50
2.3.1. Généralités sur les terpènes	51
2.3.1.1. Monoterpènes	52
2.3.1.2. Classification des monoterpènes	52
2.3.2. Travaux antérieurs de la biotransformation des terpènes par <i>Bacillus</i> et différents microorganismes	53
2.4. Etude de la biotransformation des métabolites secondaires : menthol, thymol et cymène	58
2.4.1. Biotransformation du menthol	58
2.4.1.1. Description chimique et utilisation du menthol	58
2.4.1.2. Propriétés physiques et chimiques	59
2.4.1.3. Voies métaboliques du menthol par divers microorganismes	59
2.4.2. Biotransformation du thymol	65
2.4.2.1. Description chimique et utilisation du thymol	65
2.4.2.2. Travaux antérieurs sur la biotransformation du thymol par différents microorganismes	66
2.4.3. Biotransformation du cymène	69
2.4.3.1. Description chimique et utilisation du cymène	69
2.4.3.2. Biotransformation microbienne du cymène par différents microorganismes	69

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

2. MATERIEL ET METHODOLOGIE EXPERIMENTALE	76
2.1. Obtention du matériel biologique	76
2.1.1. Localisation géographiques et présentation du site de prélèvement	76

2.2. Échantillonnage, traitement, isolement, culture, purification et conservation des souches bactériennes	76
2.2.1. Procédure d'échantillonnage et traitement	76
2.2.2. Isolement et culture des souches bactériennes d' <i>Asparagopsis armata</i>	77
2.2.3. Purification et conservation des isolats	78
2.3. Caractérisation préliminaire des souches bactériennes isolées d' <i>Asparagopsis armata</i>	78
2.3.1. Identification phénotypique des isolats sélectionnés	78
2.3.1.1. Etude morphologique, biochimique et métabolique	79
2.3.1.1.1. Caractérisation morphologique des isolats bactériens	79
• Aspect macroscopique	79
• Aspect microscopique	79
2.3.1.1.2. Caractérisation biochimique et métabolique	80
• Test de catalase	80
• Croissance sur le milieu mannitol-mobilité	81
• Étude du type respiratoire	81
• Recherche de l'oxydase	82
• Test de l'indole	82
2.3.1.2. Caractères physiologiques	82
• Croissance a différentes températures	82
• Croissances à différents pH	82
• Tolérance à la salinité	83
2.4. Mise au point d'une méthodologie de criblage des souches bactériennes isolées de l'algue rouge <i>Asparagopsis armata</i> , productrices des substances biologiquement actifs (Antimicrobiennes, Protéolytiques, Hémolytiques et Biosurfactants)	83
2.4.1. Criblage de l'activité antimicrobienne	83
2.4.1.1. Test d'antagonisme par la méthode des Cylindres d'Agar	84
2.4.1.2. Etude de la production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides de la souche 17R	84
2.4.2. Criblage de l'activité protéolytique	85
2.4.3. Recherche de l'activité hémolytique et des substances tensioactives	86
2.4.3.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants	86
2.4.3.1.1. Test de l'activité hémolytique	86

2.4.3.1.2. Test de déplacement d'huile	87
2.5. Contribution à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche bactérienne 17R d' <i>Asparagopsis armata</i>	88
2.5.1. Introduction	88
2.5.2. Analyses préliminaires des trois monoterpènes par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)	88
2.5.3. Etude de l'activité catabolique du menthol, thymol et cymène par une bactérie 17R du genre <i>Bacillus</i>	89
2.5.3.1. Préparation et composition de milieu de culture	89
2.5.3.2. Repiquage de la souche et préparation de préculture	90
2.5.3.3. Préparation de la solution mère de chaque substrat (menthol, thymol et cymène)	90
2.5.4. Etude des facteurs influençant la biotransformation	91
2.5.4.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice du menthol, thymol et cymène pour la biotransformation	91
2.5.4.1.1. Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition en milieu solide	91
2.5.4.1.2. Détermination de la concentration optimale du menthol, thymol et cymène en milieu liquide	93
2.5.4.2. Effet de la température sur la biotransformation	93
2.5.4.3. Effet du pH sur la croissance cellulaire	93
2.5.4.4. Effet des surfactants (Tensioactifs)	94
2.5.5. Etude de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche bactérienne 17R	94
2.5.6. Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne	95
2.5.7. Extraction liquide-liquide du surnageant obtenu	95
2.5.8. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)	95
3. RESULTATS ET DISCUSSION	96
3.1. Isolements et purifications des souches bactériennes d' <i>Asparagopsis armata</i>	96
3.2. Classification préliminaire des souches bactériennes isolées	96
3.2.1. Taxonomie phénotypique des bactéries isolées	96
3.2.2. Etude physiologique des isolats	101

3.3. Criblage de l'activité antimicrobienne	103
3.3.1. Test d'antagonisme par la méthode des Cylindres d'Agar	103
3.3.2. Etude de la production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides de la souche 17R	105
3.4. Criblage de l'activité protéolytique	107
3.5. Criblage de l'activité hémolytique et des substances tensioactives	108
3.6. Contribution à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche bactérienne 17R d' <i>Asparagopsis armata</i>	114
3.6.1. Analyses préliminaires des trois monoterpènes par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)	114
3.6.2. Etude des facteurs influençant la biotransformation	115
3.6.2.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice du menthol, thymol et cymène pour la biotransformation	115
3.6.2.1.1. Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition en milieu solide	115
3.6.2.1.2. Détermination de la concentration optimale du menthol, thymol et cymène en milieu liquide	116
3.6.2.2. Effet de la température sur la biotransformation	117
3.6.2.3. Effet du pH sur la croissance cellulaire	118
3.6.2.4. Effet des surfactants (Tensioactifs)	118
3.6.3. Etude de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par une bactérie 17R du genre <i>Bacillus</i>	120
3.6.4. Analyse chimique des produits de biotransformation par CG/SM	120
3.6.4.1. Biotransformation du menthol par la souche 17R	120
3.6.4.2. Biotransformation du thymol par la souche 17R	123
3.6.4.3. Biotransformation du cymène par la souche 17R	128
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	135
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	139
APPENDICES	141
Appendice A : Liste des symboles et des abréviations	142
Appendice B : Composition des milieux de culture	143
Appendice C : profils chromatographiques des métabolites secondaires obtenus à partir de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche 17R	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1 : Photo personnelle de l'algue rouge « <i>Asparagopsis Armata</i> »	29
Figure 2 : Représentation du genre <i>Bacillus</i> « Photo personnelle »	38
Figure 3 : Procédure générale pour la découverte des composés biologiquement actifs, tels que les agents antimicrobiens, d'origine microbienne	44
Figure 4 : Principe de la biotransformation	47
Figure 5 : Squelettes de base pour les monoterpènes	53
Figure 6 : (1R, 2S, 5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol	58
Figure 7 : Voies métaboliques de (-) menthol par <i>Aspergillus niger</i> et <i>Aspergillus cellulosa</i>	60
Figure 8 : Biotransformation du (-) menthol par <i>Cephalosporium aphidicola</i>	61
Figure 9 : Biotransformation du (-) menthol par <i>Mucor ramannianus</i> (PTCC 5074)	61
Figure 10 : Biotransformation du (-) menthol par <i>Chlorella vulgaris</i>	63
Figure 11 : Voie possible de biotransformation du (-) menthol par <i>Penicillium sp</i> (PTCC 5074)	63
Figure 12 : Biotransformation du (-) menthol par <i>Macrophomina phaseolina</i>	64
Figure 13 : Métabolisme du (-) menthol avec <i>Rhizopus stolonifer</i>	64
Figure 14 : Biotransformation du (-) menthol par <i>Cunninghamella elegans</i>	65
Figure 15 : Biotransformation du (-) -menthol par les cellules de suspension d' <i>Eucalyptus perriniana</i>	65
Figure 16 : Principales voies de biotransformation du thymol par différents microorganismes	68
Figure 17 : Biotransformation du p-cymène en utilisant <i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	70
Figure 18 : Biotransformation du p-cymène en utilisant <i>Penicillium claviforme</i> MR376	70
Figure 19 : Biotransformation du p-cymène par la souche <i>Pseudomonas sp.</i> (PL)	70
Figure 20 : Biotransformation du p-cymène en acide cumique par <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas desmolytica</i> et <i>Nocardia salmonicolor</i>	71

Figure 21 : Biotransformation du p-cymène en thymoquinone et analogues par divers microorganismes	71
Figure 22 : Algue rouge <i>Asparagopsis armata</i> et ses bactéries associées	96
Figure 23 : Spectre d'activité antibactérienne de six isolats	103
Figure 24 : Spectre d'activité antifongique de sept isolats	104
Figure 25 : Cinétique de l'évolution de production de l'activité antimicrobienne de la souche 17R contre <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dans les milieux liquides LB, VNSS, GN, Bennett et 333	106
Figure 26 : Résultats de l'activité protéolytique de certaines bactéries isolées	108
Figure 27 : Apparition des zones claires autour des colonies sur gélose au sang indique une hémolyse des globules	109
Figure 28 : Test de déplacement d'huile de quelques souches (formation du halo clair)	110
Figure 29 : Variation du diamètre de la surface d'halo claire de 25 souches en fonction de temps	110
Figure 30 : Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant (Source de carbone : 1 % v/v, $T_{\text{incub}} = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{incub}} = 48 \text{ heures}$, 150 tr/min)	111
Figure 31 : Profils chromatographiques du menthol (a) , thymol (b) et cymène (c)	114
Figure 32 : Evolution de l'absorbance à 600 nm (a) et la biomasse (mg) (b) en fonction de différentes concentrations des sources de carbone (menthol, thymol, cymène), dans les cultures de 48 heures	116
Figure 33 : Effet de la température sur la croissance cellulaire (l'absorbance (a) et la biomasse (b))	117
Figure 34 : Effet de la variation du pH sur la croissance cellulaire (l'absorbance (a) et la biomasse (b))	118
Figure 35 : Impact de l'utilisation des différents agents de surface (Tween 40, Tween 80 et Triton X) sur la biotransformation (croissance cellulaire : Absorbance (a) et Biomasse (b))	119
Figure 36 : Voies métaboliques de la biotransformation du menthol par la souche 17R	121
Figure 37 : Voie proposée de biotransformation du menthol en 8-hydroxymenthol	123
Figure 38 : Voie proposée de biotransformation du menthol en thymol et carvacrol	123

Figure 39 : Voie proposée de biotransformation du menthol en acide benzoïque	123
Figure 40 : Voie proposée de biotransformation du menthol en acide phénylacétique	123
Figure 41 : Voies métaboliques de la biotransformation du thymol par la souche 17R	125
Figure 42 : Voie proposée de biotransformation du thymol en eucalyptol	126
Figure 43 : Voie proposée de biotransformation du thymol en menthol	126
Figure 44 : Voie proposée de biotransformation du thymol en cis-1,2 epoxylimonène	126
Figure 45 : Voie proposée de biotransformation du thymol en carvacrol, bornéol et camphre	127
Figure 46 : Voie proposée de biotransformation du thymol en p-cymène	127
Figure 47 : Voie proposée de biotransformation du thymol en acide benzoïque	127
Figure 48 : Voie proposée de biotransformation du thymol en alcool phénéthylique et acide phénylacétique	127
Figure 49 : Voies métaboliques de la biotransformation du cymène par la souche 17R	129
Figure 50 : Voie proposée de biotransformation du cymène en alcool phénéthylique et acide phénylacétique	130
Figure 51 : Voie proposée de biotransformation du cymène en cis-1,2- epoxy limonène	130
Figure 52 : Voie proposée de biotransformation du cymène en bornéol et camphre	130
Figure 53 : Voie proposée de biotransformation du cymène acide benzoïque	131
Figure 54 : Voie proposée de biotransformation du cymène en menthol	131
Figure 55 : Voie proposée de biotransformation du cymène en p-cymène-8-ol	131
Figure 56 : Voie proposée de biotransformation du cymène en thymol et carvacrol	131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Bactéries identifiées à partir de diverses espèces des algues rouges	33
Tableau 2 : Champignons identifiés à partir de diverses espèces des algues rouges	34
Tableau 3 : Biotransformation des monoterpènes par divers microorganismes	54
Tableau 4 : Caractérisation macromorphologique des souches bactériennes isolées d' <i>Asparagopsis armata</i>	98

Tableau 5 : Caractérisation micromorphologique des souches bactériennes isolées d' <i>Asparagopsis armata</i>	99
Tableau 6 : Caractérisation biochimique et métaboliques des souches bactériennes isolées d' <i>Asparagopsis armata</i>	100
Tableau 7 : Caractères physiologiques (Salinité, température et pH) de croissance des souches	102
Tableau 8 : Activité protéolytique sur milieu agar au lait écrémé de 25 souches bactériennes nouvellement isolées	108
Tableau 9 : Activité hémolytique sur des plaques de gélose au sang de 25 souches bactériennes nouvellement isolées	109
Tableau 10 : Effet de la concentration du menthol, thymol et cymène sur la croissance de la souche 17R	115
Tableau 11 : Métabolites issus de la biotransformation du menthol par la souche 17R	121
Tableau 12 : Métabolites issus de la biotransformation du thymol par la souche 17R	124
Tableau 13 : Métabolites issus de la biotransformation du cymène par la souche 17R	128

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

Les mers et les océans couvrent près des trois-quarts de la surface terrestre et l'environnement marin est un écosystème unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite. Parmi ces organismes, les algues forment un ensemble d'organismes très variés, avec trois grands types : les algues vertes, brunes et rouges. Ce sont des végétaux inférieurs moins connues que les plantes terrestres et beaucoup plus difficiles à comprendre [1, 2]. Les algues rouges ou *Rhodophycées*, morphologiquement plus diversifiées que tout autre groupe d'algues, ont été les premières à coloniser les fonds marins côtier, puis, elle a ensuite évolué significativement avec d'autres lignées d'algues. Elles ont considéré comme la source la plus importante de nombreux métabolites biologiquement actifs [3]. La valorisation de la biomasse algale est donc considérée comme l'un des programmes internationaux les plus intéressants dans l'exploitation durable du milieu marin [4].

La concurrence entre les microorganismes vis-à-vis les nutriments pour l'espace dans l'environnement marin est une force sélective puissante qui a conduit à l'évolution, qui incite les microorganismes marins à générer des systèmes enzymatiques variés pour s'adapter à des environnements marins complexes. À cette fin, les biomolécules microbiennes marines peuvent offrir de nouveaux biocatalyseurs aux propriétés extraordinaires [5, 6].

La surface des algues fournit des conditions protégées et riches en nutriments pour la croissance microbienne, elles abritent une grande diversité de microorganismes associés par rapport à d'autres organismes multicellulaires. Ces microorganismes peuvent être bénéfiques ou nuisibles aux algues. Les communautés bactériennes épiphytes sont considérées comme vitales pour le développement morphologique des algues marines, et les bactéries ayant des propriétés antibactériennes sont censées protéger les algues marines contre les pathogènes et les autres organismes concurrents. Certaines espèces bactériennes présentent une spécificité d'hôte et une activité bactéricide contre des pathogènes spécifiques. Cette spécificité entraîne des interactions biochimiques complexes entre les algues et les bactéries [7, 8].

Les interactions entre les algues et les bactéries sont largement étudiées. Cependant, la signification écologique de la plupart de ces associations naturelles reste encore vague. Il est

nécessaire d'étudier les communautés bactériennes vivant sur différentes algues existantes à l'aide de nouvelles technologies, mais aussi d'étudier la production, la localisation et la sécrétion des métabolites biologiquement actifs impliqués dans ces interactions écologiques possibles [9]. Les bactéries et les champignons marins présentent un grand intérêt en tant que sources nouvelles et riches de produits biologiquement actifs [10].

Une attention particulière doit être accordée aux potentialités des microorganismes marins, non seulement pour l'obtention des antibiotiques, mais aussi pour la bio-production des enzymes et la biotransformation technologique (bioconversion) et environnementale (dépollution). Les activités socio-économiques humaines ont un impact significatif sur la dégradation de l'environnement. Ces activités ont considérablement augmenté depuis la révolution industrielle en raison de la croissance démographique, de la fabrication industrielle et des pratiques agricoles. Les industries du monde entier recherchent donc des technologies alternatives capables de consommer moins de ressources et d'avoir un impact moindre sur l'environnement. La biotechnologie industrielle est devenue l'un des principaux fournisseurs de la chimie verte. C'est une technologie alternative qui pourrait remplacer ou compléter les technologies conventionnelles pour passer à des processus de production plus propres [11]. La tendance « chimie verte » et « biotechnologie » recherchent actuellement des alternatives aux solvants nocifs pour l'environnement. C'est dans ce cadre, il y a eu une augmentation récente du nombre d'articles relatant la biotransformation en utilisant des bactéries comme biocatalyseurs.

La biotransformation est un moyen efficace pour la modification structurelle des composés bioactifs, naturels et synthétiques afin d'obtenir de nouveaux composés. La procédure consiste à utiliser des enzymes et des cellules entières comme biocatalyseurs pour la conversion de ces composés organiques. Ce processus peut également être utilisé pour améliorer la productivité d'un produit souhaité, surmonter les problèmes associés à la synthèse chimique et fournir des informations de base qui peuvent être utilisées pour élucider les voies métaboliques [12, 13].

Les biocatalyseurs demeurent les outils clés de la biotechnologie. Parmi ceux-ci, les enzymes, qui sont des protéines extraites à partir de microorganismes naturels. Elles peuvent être utilisées pour catalyser biologiquement des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité. En outre l'utilisation des biocatalyseurs pour la

fonctionnalisation des substances naturelles est une thématique suscitant un grand intérêt. En comparaison aux méthodes de synthèse chimique classiques, les voies de biotransformation présentent l'intérêt de l'utilisation accrue des matières premières renouvelables, de la nécessité de favoriser les procédés éco-compatibles et du respect des contraintes de l'environnement [14].

La synthèse chimique classique présente plusieurs inconvénients : nombreuses étapes, des catalyseurs souvent écotoxiques, rendements faibles, un temps de préparation long et une non-spécificité des certaines réactions [14]. Par conséquent, au cours de ces dernières années, la recherche dans ce domaine ne cesse de croître pour trouver ou inventer de nouveaux procédés, et des processus écologiques plus efficaces en termes de qualité du produit, d'efficacité de production et de réduction du temps et d'énergie.

Par ailleurs, les réactions de biotransformation ont lieu dans des conditions de pH et de température modérées. L'avantage principal des voies de biotransformation par rapport à la synthèse chimique classique est l'obtention d'excès énantiomériques importants. Cet aspect est primordial, vu que l'activité biologique dépend souvent d'un seul énantiomère [15].

La biotransformation a été appliquée à la transformation enzymatique des métabolites secondaires de diverses classes chimiques. Les terpénoïdes sont des hydrocarbures insaturés dérivés d'unités isoprène ont fait l'objet de plusieurs travaux de biotransformation, notamment les monoterpénoïdes. Le menthol, thymol et cymène sont des monoterpènes de grande valeur commerciale, produits majoritaires de plusieurs huiles essentielles ayant fait l'objet de plusieurs travaux de biotransformation. Diverses souches microbiennes ont été utilisées dans ce cadre. Des résultats très intéressants ont été obtenus à travers les voies de biotransformation, notamment en termes de sélectivité et de rendement de réaction.

Le présent travail a pour but d'évaluer les propriétés biotechnologiques chez une collection des souches bactériennes nouvellement isolées à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata* récoltée au niveau de la Corne d'Or à Tipaza. Le criblage est effectué en se basant sur des mesures qualitatives, suivi, d'une étude quantitative de toutes les activités d'intérêt industriel et environnemental, à savoir, le pouvoir émulsifiant (caractère tensioactif), hémolytique, protéolytique (protéase) et l'activité antimicrobienne (antibiotique). Cette étude est complétée par la sélection des souches performantes pour des

études de production et d'optimisation de ces activités. Parallèlement, une partie colossale de l'étude a été consacrée à la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche bactérienne 17R d'*Asparagopsis armata*.

Dans ce sens, les travaux de recherche que nous avons menée au cours de cette thèse se focalisent sur :

- L'isolement et la caractérisation de la communauté bactérienne de l'algue rouge *Asparagopsis armata* ;
- La valorisation des bactéries isolées à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata* dans la production des métabolites primaires et secondaires biologiquement actifs (Antimicrobiennes, Protéolytiques, Hémostatiques et Biosurfactants) d'intérêt bioactif et environnemental ;
- La biotransformation des trois monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la souche bactérienne sélectionnée ;
- Analyse et identification par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) des produits ou métabolites obtenus.

Afin de répondre à ces objectifs, le travail de thèse s'articule autour de trois grandes parties distinctes :

- La première partie constitue une revue des données bibliographiques concernant principalement, les algues en particulier l'algue rouge *Asparagopsis armata*, la diversité bactérienne de cette algue et leur propriétés biotechnologiques (Antimicrobiennes, Protéolytiques, Hémostatiques et Biosurfactants), les concepts et les différents travaux de la biotransformation des terpènes, notamment les monoterpénoïdes (menthol, thymol et cymène) par différents microorganismes en particulier par le genre *Bacillus*.
- La seconde partie de cette thèse est consacrée au travail expérimental et aux résultats et discussions obtenus.
- Enfin, la synthèse de l'ensemble des résultats est donnée en conclusion générale suivie par les principales perspectives envisagées.

PARTIE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

DIVERSITE BACTERIENNE DE L'ALGUE ROUGE *ASPARAGOPSIS ARMATA* ET LEUR PROPRIETES BIOTECHNOLOGIQUES (ANTIMICROBIENNES, PROTEOLYTIQUES, HEMOLYTIQUES ET BIOSURFACTANTS)

1.1. Introduction

Le monde marin occupe plus de 75 % de la surface du globe. Et c'est pourquoi ce monde se caractérise par une grande diversité biologique : Algues, Eponges, Mollusques, Cnidaires, Gorgone..., ces organismes marins notamment les algues jouent un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre chimique et biologique des océans [16, 17]. Les algues forment une masse végétative exclusivement marine. Elles ont été utilisées dans le monde depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives. En effet, elles constituent aujourd'hui un enjeu majeur de développement économique. Elles représentent une source riche de structures nouvelles et de métabolites biologiquement actifs d'intérêts potentiels dans les domaines alimentaire, pharmaceutique, parfum et cosmétique ainsi que dans d'autres secteurs de l'industrie [8, 17].

1.2. Généralités sur les algues marines

1.2.1. Définition et structure d'une algue

Les algues regroupent un ensemble d'organismes qui se trouve dans les environnements aquatiques, bien qu'on en rencontre également dans de nombreux environnements terrestres. Elles vivent sur les sols, les rochers, les arbres et certaines sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes [18]. Les algues sont des végétaux photosynthétiques très divers, typiquement autotrophes, pluri ou unicellulaires et sont considérées comme source de vie dans l'océan puisqu'elles y produisent l'oxygène, ne possédant ni feuilles, ni tiges, ni racines. Leur corps est un thalle, d'où leur nom de thallophytes. La base du thalle contient des structures telles que : rhizoïdes, crampons, disques... permettant l'ancrage de l'algue sur un support : une roche (algues épilithes), ou une plante (algues épiphytes), ou un animal (algues épibiontes) ou parfois même du sable [18, 19, 20].

Les algues se développent sous diverses formes, certaines sont microscopiques, d'autres atteignent plusieurs mètres de longueur. Les espèces unicellulaires microscopiques sont appelées phytoplancton. D'autres de plus grande taille, parfois flottante, mais le plus souvent fixées sur le fond ou sur d'autres organismes, constituent le phytobenthos. Les cellules des algues ont les mêmes éléments structurels que les cellules des plantes supérieures. Elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des plastes pigmentés ou chromatophores [4, 21]. Dans la plupart des cas, ce sont des végétaux chlorophylliens photosynthétiques qui réalisent, en présence de lumière, la synthèse des substances organiques nécessaires à leur vie à partir des substances inorganiques prélevées dans le milieu comme l'eau, les sels minéraux et le dioxyde de carbone [18, 22].

Comme les autres organismes marins, les algues sont soumises à des facteurs physiques (lumière, température...etc), des facteurs chimiques (eau, salinité, substances polluantes...etc), et des facteurs biotiques (bactéries, phytoplancton...etc) [23]. Du fait de leur abondance en nombre dans le domaine aquatique qui recouvre les deux tiers de la surface terrestre, et de leurs propriétés, les algues sont essentielles pour l'équilibre du globe. L'intérêt pour les algues peut s'expliquer en grande partie par la présence de trois grandes catégories de composants (fibres, minéraux et protéines), mais aussi par la présence des métabolites secondaires à haute activité biologique tels que les caroténoïdes, les polyphénols, les vitamines et les acides gras polyinsaturés [24].

1.2.2. Classification des algues marines

Les algues occupent une situation incontournable dans l'arbre du vivant. En effet, c'est le botaniste français Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) [25], qui a réuni les espèces en genres, puis le naturaliste suédois Carl Von Linné (1707-1778), le fondateur de la systématique (taxonomie), qui a classé les organismes en groupes de plus en plus larges : Espèces, genres, familles, ordres, classes, embranchements (ou phylums) et règnes [26]. De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, les caractéristiques structurelles, la présence ou absence de flagelle, le mode de nutrition, l'habitat, ainsi que la nature et la localisation des pigments chlorophylles et caroténoïdes. La nature des polymères de réserve synthétisés lors de la photosynthèse et leur localisation à l'intérieur ou à l'extérieur du plaste est aussi une variable clé utilisée dans le classement ou la taxonomie des algues [4, 27, 28].

En général, ces divers critères permettent de répartir les algues en quatre grands groupes qui sont différenciées par rapport à la couleur (pigmentation). Chaque groupe contient des classes, et chaque classe contient des centaines d'espèces : les algues rouges (6000 espèces avec une pigmentation rouge), les algues vertes (1200 espèces avec une pigmentation verte), les algues brunes (2000 espèces avec une pigmentation jaune) et les algues bleues (2000 espèces), soit respectivement les *Rhodophycées*, les *Chlorophycées*, les *Phéophycées* et les *Cyanophycées* comme les désignent les botanistes [18, 21, 28].

1.2.2.1. Algues rouges (*Rhodophycées*)

Elles sont aussi nommées *Rhodophycées*, ont été les premières algues marines à avoir colonisé les fonds marins côtiers. Elles forment un groupe très diversifié, avec environ 6000 espèces de macroalgues rouges. Ces algues sont colorées en rouge du fait de la présence dans leurs plastes d'un pigment appelé la phycoérythrine. Ce pigment s'associe à plusieurs autres pigments comme les chlorophylles « le centre réactionnel de la photosynthèse », la phycocyanine et l'allophycocyanine [21, 29, 30]. Les *rhodophycées* sont généralement de plus petite taille, leur longueur allant d'habitude de quelques centimètres à environ un mètre [30]. La plupart de ces algues rouges sont de nature pluricellulaires et marines dont le nombre d'espèces en mer est supérieur à celui de tous les autres types d'algues marines réunies, mais il existe aussi quelques formes unicellulaires, dont certains vivent également en eau douce. Elles sont généralement caractérisées par leur cycle de reproduction particulièrement complexe. Les algues rouges sont généralement fixées aux rochers ou à d'autres algues, mais il existe aussi quelques formes flottantes [21, 31].

La division *Rhodophyta* contient deux classes, la classe des *Bangiophyceae* subdivisée en trois ordres et six familles et la classe des *Floridophyceae* comprenant dix ordres et 23 familles [21, 32].

1.2.2.2. Algues vertes (*Chlorophycées*)

Les *Chlorophycées* ont une structure uni-ou pluricellulaires et un cycle de développement très diversifiés. Certaines espèces marines sont grandes, mais beaucoup sont microscopiques. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. Comme chez les végétaux (plantes) supérieures, la photosynthèse permet la formation d'amidon. La plupart des algues vertes vivent dans des environnements d'eau douce ou marins, mais certaines espèces peuvent

également se développer sur terre [33, 34]. En raison de leur équipement photosynthétique, plusieurs espèces d'algues vertes vivent à une profondeur de 5 mètres. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale [34, 35]. Il a été recensé approximativement 1200 espèces de macroalgues vertes.

1.2.2.3. Algues brunes (*Phaeophycées*)

Les *Phéophycées* ou algues brunes forment un groupe très homogène. Il existe environ 2000 espèces de macroalgues brunes. La couleur brune de ces algues est dominée par le pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments (chlorophylle a et c, ainsi que le bêta-carotène). Toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. En fait, les algues brunes sont prépondérantes sur les côtes rocheuses de toutes les régions fraîches du globe [21, 36, 37]. Les *phéophycées* comprennent des espèces benthiques, qui sont principalement fixées sur des substrats durs, et des espèces pélagiques, qui vivent en pleine eau. Les algues brunes se trouvent en général entre la surface et une profondeur de 15 à 30 mètres dans des eaux très turbulentes [37, 38]. Elles sont riches en alginates et en phlorotanins à propriétés antioxydantes.

1.2.2.4. Algues bleues (*Cyanobactéries*)

Les algues bleues sont des organismes unicellulaires sans noyau cellulaire différencié et sont des procaryotes à Gram négatif, également appelés *cyanobactéries* [39]. Elles sont constituées des colonies de tailles, de formes et de couleurs très différentes. Semblables aux algues rouges, elles possèdent de nombreux pigments bleus (Phycocyanines) et rouges (Phycoérythrine) qui masquent la chlorophylle a. Malgré l'ancienne appellation d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés [4, 40].

1.2.3. Répartition géographique des algues marines

La distribution des algues marines est étroitement liée à plusieurs paramètres écologiques tels que le substratum, la température de l'eau, la lumière, l'action des vagues, la salinité et le pH. Les algues sont liées à l'eau et peuvent dès lors s'installer dans tous les types d'habitat suffisamment humides et éclairés. On peut les retrouver en eau douce, en mer, sur sol humide et même sur la neige. Les algues étant photosynthétiques, elles sont dépendantes de la

présence de la lumière. De même, Les algues nécessitent d'être fixées à un substrat, par conséquent, la texture, le degré de cohésion et la nature chimique du substrat ont une importance sur la répartition spatiale des espèces [4, 41].

1.2.4. Reproduction des algues

Chez les algues qui représentent des thallophytes, la reproduction se fait selon deux modes :

La reproduction asexuée assurée par les thalles (sporophytes) : Les algues peuvent se reproduire par multiplication végétative, c'est-à-dire par fragmentation de thalle. Par exemple, une petite partie du thalle d'une algue se détache et, emportée par les courants, donne plus tard un nouvel individu. Dans ce cas, cet individu est génétiquement identique à celui d'origine. C'est le mode de reproduction le plus courant chez les algues. Elles peuvent aussi libérer des spores qui germent et donne naissance à un nouvel individu [21, 42].

La reproduction sexuée assurée par des thalles producteurs de gamètes (gamétophytes) : chez les macroalgues la reproduction sexuée est aléatoire et moins utilisée. L'individu naît cette fois de la fusion de 2 cellules reproductrices mâle et femelle appelées gamètes. Les individus obtenus sont cette fois génétiquement différents [21, 43].

1.2.5. Utilisation et intérêt économique des algues

On estime que sur notre planète, l'activité photosynthétique est à plus de 90 % le fait des algues marines, constituant ainsi notre principale source d'oxygène. Au cours des dernières années, de nombreuses populations des régions côtières notamment les asiatiques utilisent quotidiennement les algues marines pour leur alimentation [8, 21, 27].

La propriété physiologique des algues qui consiste à concentrer dans leurs cellules des oligo-éléments contenus dans l'eau est désormais utilisée à des fins diététiques ou en thalassothérapie.

Mais l'exploitation industrielle des algues est essentiellement liée à l'extraction de leurs phycocolloïdes, polysaccharides constituant la paroi des cellules, aux propriétés texturantes. On distingue ainsi les agars et les carraghénanes, extraits des algues rouges, des alginates,

extraits des algues brunes. Les principales applications de ces phycocolloïdes sont dans le domaine de l'agro-alimentaire, mais également dans des domaines variés tels que celui de la cosmétologie ou encore de l'industrie des peintures [17, 21].

1.3. Etude de l'algue rouge *Asparagopsis armata*

1.3.1. Position systématique, description, biologie et écologie d'*Asparagopsis armata*

1.3.1.1. Systématique

Cette espèce (Figure 1) a pour systématique [21, 44] :

- **Embranchement** : *Rhodophyta* ;
- **Classe** : *Rhodophyceae* ;
- **Sous-classe** : *Florideophyceae* ;
- **Ordre** : *Bonnemaisoniales* ;
- **Famille** : *Bonnemaisoniaceae* ;
- **Genre** : *Asparagopsis* ;
- **Espèce** : *Asparagopsis Armata*.



Figure 1: Photo personnelle de l'algue rouge « *Asparagopsis Armata* »

1.3.1.2. Description, biologie et écologie

L'algue qui nous intéresse ici particulièrement est une algue rouge (*Rhodophycée*) pluricellulaire, sous-classe des *floridéophycées*, ordre des *bonnemaisoniales*. Cette algue a été découverte en Australie par Harvey en 1855 [21, 44], mais était aussi présente en Nouvelle-Zélande et en Tasmanie. Grâce aux coques des nombreux navires de l'époque, qu'elle a dû parasiter, on la retrouve dans le Canal de Suez vers 1920, puis sur les côtes algériennes en 1923 et françaises méditerranéennes en 1927 [45, 46]. Toujours sur la route des navires, l'algue passe Gibraltar et colonise les côtes atlantiques en 1925, pour être découverte à Ouessant dès 1936, puis dans les Iles Britanniques à partir de 1942, jusqu'aux Hébrides dans les années 1973 [45, 47].

Cette migration par les voies maritimes est assez remarquable pour la souligner et démontre clairement la forte capacité d'adaptation de cette algue, notamment dans des eaux de plus en plus froides. Elle se développe naturellement entre la surface de l'eau et 10 mètres de profondeur, dans des zones modérément battues par les vagues. Bien qu'en faible abondance,

elle colonise facilement les substrats artificiels (comme nous l'avons vu avec les coques des navires) [45, 48].

Cette algue se présente sous forme de touffes roses-rouges, de 15 à 30 centimètres de long, souvent accrochées à diverses algues. Son thalle est de type ramifié, dont certains rameaux sont épineux et harponnent les algues environnantes [45].

1.3.2. Récolte, Utilisation et Impacts économiques

Les espèces sont récoltées à la main. Comme les autres *Asparagopsis*, elles présentent une utilisation médicale potentielle (éventuellement liées à l'abondance d'iode dans cette espèce) et des possibilités alimentaires intéressantes (en se référant aux pratiques asiatiques). Des études pharmaceutiques ont mis en lumière les composés pharmaceutiques potentiels chez *Asparagopsis armata* mettant en évidence une forte activité contre les bactéries pathogènes pour les poissons [45, 48].

De plus, c'est l'une des espèces d'algues envahissantes les plus agressives, développent plus rapidement, disputent l'espace et produisent une variété de composés qui sont étudiés pour leur toxicité, ce qui devient un problème économique et écologique en Europe. En même temps, c'est une ressource recherchée par le marché pour ses applications en cosmétique et plus récemment, pour son activité anti-méthanogène potentielle chez les ruminants [48].

1.4. Etude des souches bactériennes d'*Asparagopsis armata*

1.4.1. Généralités sur les microorganismes marins et leur interaction avec les algues

Le milieu marin est un écosystème complexe avec une énorme pluralité de formes de vie qui sont associées entre eux, les associations les plus courantes sont entre les cellules eucaryotes et les microorganismes [49].

Les microorganismes marins sont présents dans toutes les mers et les océans du globe. Ils ont une répartition géographique et spatiale omniprésente. Ils présentent une très grande diversité et une couverture taxonomique très large probablement liée à la diversité des conditions environnementales rencontrées dans les milieux marins, mais qui reste aujourd'hui encore mal connue. Par conséquent, les microorganismes ont une grande

capacité d'adaptation, et vivent dans certaines niches ou peu d'autres types d'organismes sont capables de vivre. Les surfaces d'organismes marins eucaryotes tels que les invertébrés et les algues offrent un habitat riche en nutriments particulièrement bien adapté pour la colonisation des microbes qui vivent adhérents à diverses communautés souvent immergées dans une matrice ou avec formation d'un biofilm défini comme : « *un assemblage de cellules microbiennes qui est irréversiblement associé à une surface, et enfermé dans une matrice de matériau de polysaccharide* » [50].

L'étude des microorganismes a été pendant longtemps négligée car leur taille microscopique était souvent à l'origine d'obstacles techniques. Toutefois, les avancées récentes dans le domaine de la biologie moléculaire et la microbiologie placent désormais l'étude des microorganismes à la pointe de la recherche moderne. Ces techniques ont permis d'ouvrir les portes d'un univers encore peu connu, dévoilant une diversité taxonomique extrêmement riche, de nombreuses interactions entre les microorganismes et des capacités d'adaptation surprenantes acquises au cours de l'évolution. Les microorganismes pourraient donc bien être le principal gisement de nouvelles molécules des prochaines décennies. En fait, la majorité des produits naturels actifs sont à l'heure actuelle produits et isolés de microorganismes. En outre, les microorganismes marins accumulent parfois des métabolites secondaires bioactifs structurellement uniques ne se trouvent pas dans les organismes terrestres [51].

1.4.2. Diversité des microorganismes des algues rouges

Les microorganismes marins vivant sur les surfaces d'organismes (algues) comprennent des levures, des champignons et des protistes, toute fois la littérature montre que la majorité des populations microbiennes associées aux algues sont des bactéries [50]. Plusieurs espèces d'algues marines prélevées de la mer, sont toujours accompagnées des souches bactériennes attachées à leurs cellules, ceci a provoqué la contamination dans la culture d'algues [49].

Les études descriptives des bactéries isolées à partir d'algues ont été signalées dès 1875. Cependant, le nombre et la complexité de ces études ont considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Cette augmentation peut être attribuée à l'utilisation combinée des méthodes améliorées de la culture bactérienne, la microscopie et la biologie moléculaire. Les associations bactéries-algues rouges comprennent un certain nombre de nouvelles

espèces bactériennes, genres et même des ordres, ce qui prouve que les algues rouges représentent une source distincte et riche de nouveaux taxons bactériens [9].

Les bactéries décrites à partir des surfaces d'algues ou des thalles d'algues marines appartiennent aux phylums supérieurs *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* (Groupe BFC), *cyanobactéries*, *Firmicutes*. *Planctomycètes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*. En effet, dans toutes les études examinées, les *Protéobactéries* étaient les clades bactériens les plus fréquemment associés aux algues (37 % d'abondance relative), suivi par le groupe de la BFC (20 %), des *Alphaprotéobactéries* (13 %), des *Firmicutes* (10 %), et *actinobactéries* (9 %) [52].

Sur un niveau taxonomique inférieur, les commandes (ordres) *Flavobacteriales* (14 % d'abondance relative), *Alteromonadales* (12 %), *Vibrionales* (10 %), *Pseudomonadales* (9 %), *Bacillales* (9 %), *Actinomycetales* (8 %), et *Rhodobacterales* (7 %) étaient les plus abondants dans les communautés bactériennes associées aux algues. En comparant l'abondance relative des taxons bactériens sur les macroalgues brunes, vertes et rouges, des représentants bactériens des principaux groupes phylogénétiques mentionnés ci-dessus ont été isolés à partir de chacun des trois groupes d'algues [52].

Malgré cette similarité, les macroalgues vertes sont plus associées avec le groupe de BFC, et les *Alphaprotéobactéries* par rapport aux algues brunes et rouges. D'autre part, les macroalgues brunes et rouges sont plus associées respectivement avec les espèces de *Firmicutes*, d'*Actinobactéries* et de *Planctomycètes* [52].

Les tableaux (1 et 2) regroupent respectivement, des souches bactériennes et des champignons isolés à partir de classes de macroalgues rouges (*Rodophyta*).

Tableau 1 : Bactéries identifiées à partir de diverses espèces des algues rouges

	Espèces d'algues	Bactéries	Réf
Algues rouges	<i>Chondrus ocellatus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[53]
	<i>Gelidium amansii</i>	<i>Bacillus cereus</i>	[53]
	<i>Gracilaria corticata</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	[54]
	<i>Gracilaria salicornia</i>	<i>Vibrio spp.</i>	[54]
	<i>Gracilaria spp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	[55]
	<i>Gracilaria textorii</i>	<i>Halomonas venusta</i>	[56]
	<i>Grateloupia filicina</i>	<i>Bacillus cereus</i>	[53]
	<i>Hormosira banksii</i>	<i>Alkalibacterium subtropicum</i>	[57]
	<i>Laurencia spectabilis</i>	<i>Nocardia sp. ALAA</i>	[58]
	<i>Lomentaria catenata</i>	<i>Bacillus clausii</i>	[53]
		<i>Bacillus pumilus</i>	
		<i>Pseudoalteromonas J010</i>	[59]
	<i>Neogoniolithon fosliei</i>	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	[53]
	<i>Pachymeniopsis lauceolata</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[60]
	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	[53]
	<i>Plocamium telfairiae</i>	<i>Vibrio campbelli</i>	
		<i>Bacillus anthracis</i>	
		<i>Bacillus licheniformis</i>	[60]
		<i>Bacillus pumilus</i>	
	<i>Polysiphonia lanosa</i>	<i>Uncultured Vibrio sp</i>	[56]
	<i>Vibrio tasmaniensis</i>		
	<i>Uncultured Vibrio sp</i>		
	<i>Vibrio splendidus,</i>		
<i>Porphyra leucosticte</i>	<i>Aquimarina agarilytica</i>	[61]	
<i>Porphyra yezoensi</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[53]	

Tableau 2 : Champignons identifiés à partir de diverses espèces des algues rouges

	Espèces d'algues	Champignons	Réf
Algue rouge (Rhodophyta)	<i>Ceramium sp</i>	<i>Phaeosphaeria spartinae</i>	[62]
	<i>Algue non identifiée genre Laurencia</i>	<i>Penicillium chrysogenum QEN-24S</i>	[63]
	<i>Heterosiphonia japonica</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	[64]
	<i>Polysiphonia Urceolata</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	[65]
	<i>Hypnea saidana</i>	<i>Phoma herbarum</i>	[66]
	<i>Acanthophora spicifera</i>	<i>Curvularia sp</i>	[67]

1.4.3. Isolement des microorganismes

L'étape d'isolement peut être influencée par divers paramètres tels que la récolte, le prétraitement d'algues (stockage, refroidissement, transport, tamisage, filtrage, etc), les milieux de culture et les conditions d'incubation utilisées pour cultiver les microorganismes. En effet, la littérature décrit différents protocoles pour l'isolement des microorganismes épiphytes et endophytes, ainsi que les différentes conditions expérimentales utilisées pour le prétraitement d'algues.

1.4.3.1. Protocoles d'isolement des microorganismes épiphytes

- Méthode développée par Manmadhan-Kanagasabhpathy et al. [68, 69]

Les spécimens d'algues ont été soigneusement lavés trois fois avec de l'eau de mer stérile pour éliminer les bactéries faiblement attachées. Pour obtenir des bactéries épibiotiques, la surface des algues a été frottée avec un écouvillon stérile. L'écouvillon a ensuite été utilisé pour inoculer directement les boîtes de gélose marine (Marine Agar 2216) et incubé à 30 °C pendant 7 jours. Les colonies présentant des morphologies différentes sur ce milieu ont été sélectionnées. Les cultures bactériennes pures obtenues ont été maintenues sur des plaques d'agar-agar, puis conservées à 4 °C.

- Méthode développée par T. Lachnit et al. [70]

Les algues ont été placées individuellement dans des sacs Ziploc stériles et transportées au laboratoire dans une glacière (< 10 °C). Dans les 2 heures ayant suivi le prélèvement, les algues ont été lavées 10 fois avec de l'eau de mer filtrée avec un filtre de 0,2 µm, pour éliminer les bactéries faiblement fixées. Les échantillons rincés ont été placés dans des boîtes de pétri vides stériles. 2 cm² de la surface de chacune des algues ont été vigoureusement

frottée avec un écouvillon stérile. Par la suite, les écouvillons ont été transférés dans des flacons stériles de 2 mL et congelés à -20 °C jusqu'à analyse plus approfondie.

➤ Méthode développée par M. Nishijima et al. [71]

L'isolement a été réalisé immédiatement après la collecte des échantillons d'algues. Les surfaces d'algues ont été frottées avec un petit morceau de gaze stérile, qui a ensuite été trempé dans l'eau de mer stérilisée et agité vigoureusement. Des portions (100 mL) de chaque échantillon non dilué et des échantillons dilués 10 fois avec l'eau de mer artificielle ont été étalées sur des plaques (boîtes) de gélose d'isolement (Marine Agar 2216).

➤ Méthode développée par M. T. Jamal et M.S. A. Mudarris [72]

Les échantillons d'algues ont été placés dans des volumes de 10 mL d'eau de mer stérile (121 °C/15 min), dans des bouteilles en plastique, et transportés au laboratoire dans une glacière. Des fragments d'algues (environ 1,0 g) ont été vigoureusement agités pendant 5 minutes dans un volume de 10 mL d'eau de mer stérile pour éliminer les microorganismes faiblement attachés. Des dilutions décimales ont été préparées par la suite, et 10 µL de chaque dilution ont été étalés sur des plaques (boîtes) contenant le milieu d'isolement. Les milieux ont été incubés à température ambiante pendant 14 jours. Ensuite, des colonies représentatives de chaque type de colonie ont étéensemencées et réensemencées sur des milieux frais pour obtenir des cultures pures.

➤ Méthode développée par Y.-K. Lee et al. [73]

Les thalles d'algues ont été lavés avec de l'eau de mer stérile pour éliminer les microorganismes qui sont souvent faiblement attachés à la surface d'algues. Les thalles ont été ensuite découpés en morceaux carrés $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Chaque morceau a été découpé avec une lame stérile et transférée dans des micro-tubes de centrifugation auquel a été ajouté 1 mL d'eau stérilisée. Après agitation au vortex et centrifugation, 50 µL de la phase aqueuse et 1/10, 1/100, 1/1000 des solutions diluées ont été étalées sur le milieu d'isolement. Les boîtes ont été cultivées à 10 °C pendant 7 jours, et les colonies visibles ont été sélectionnées et sous-cultivées jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Les souches obtenues ont été maintenues dans une suspension de glycérol (20 %) à -80 °C.

➤ Méthode développée par S. Salaün et al. [74, 75]

L'isolement des bactéries a été effectué par deux méthodes :

- (i) Sonication pendant 3 minutes des tissus d'algues (2 à 3 cm²) dans l'eau de mer filtrée et stérilisée, suivie par filtrations sous vide. Les filtrats ont été ensuiteensemencées dans des boîtes de pétri contenant un milieu de culture gélosé enrichi ZoBell.
- (ii) Les coupons de diverses portions d'algues fraîches (< 1 cm²) ont été placés directement sur la surface du milieu de culture. Après le développement approprié, les UFC (unité formant une colonie) ont été sélectionnés et chacun a été étalé sur des boîtes stériles individuelles pour obtenir des cultures pures.

1.4.3.2. Protocoles d'isolement des microorganismes endophytes

➤ Méthode développée par A. Abdel-Lateff et al. [76]

Les échantillons d'algues ont été rincées avec de l'eau stérile après stérilisation avec de l'éthanol 70 %, et pressés sur des plaques de gélose pour détecter d'éventuelles les spores fongiques résiduelles sur la surface des algues. Les algues stérilisées ont ensuite été découpées en morceaux et placées sur des plaques de gélose contenant du milieu d'isolement.

➤ Méthode développée par N.-A. Mohammed et al. [77]

Les échantillons d'algues ont été trempés dans de l'eau distillée, essorés, puis rincés dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes, suivie par lavage dans de l'eau stérile ; les tissus ont été coupés en morceaux de 0,5 à 1 cm. Les pièces stériles ont été placées sur la surface du milieu d'isolement et incubées pendant 28 heures à 30 °C. Sur la base des caractéristiques morphologiques, les colonies ont été prélevées, purifiées, et maintenues sur l'agar nutritif (AN). Les levures ont été isolées sur la gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA).

➤ Méthode développée par Y. Li [78]

Les échantillons d'algues ont été lavés dans un premier temps avec de l'eau stérile, par la suite imbibés à l'alcool pendant 5 secondes pour désinfecter les microbes de surface, puis lavés à nouveau avec de l'eau stérile. Les tissus d'algues ont été écrasés et dispersés sur des plaques contenant le milieu d'isolement. Les plaques ont été incubées à 28 °C pendant 10 jours.

➤ Méthode développée par T. Shiba et N. Taga [79]

Les échantillons d'algues ont été rincés avec de l'eau de mer stérile pour éliminer les bactéries provenant de l'eau de mer de l'environnement. Les algues lavées ont été coupées pour donner cinq morceaux de 1 cm. Après avoir été encore lavées avec de l'eau de mer stérile, ces cinq morceaux ont été mélangés pendant 3 minutes avec 30 mL d'eau de mer stérile contenant 1 mg/mL de Tween 80. Les mélanges ont été glacés pour empêcher les bactéries de dommages de la chaleur. Les dilutions décimales d'algues et d'eau de mer ont été étalées sur des milieux d'isolement, et incubées à 20 °C pendant 10 jours.

➤ Méthode développée par M. El-Gendy [80]

Les échantillons d'algues ont été initialement lavés avec de l'eau de mer filtrée et stérilisée jusqu'à élimination totale des débris. Les surfaces d'algues ont été par la suite stérilisées par un lavage rapide à l'Éthanol 70 % et immédiatement immergées dans l'eau de mer stérilisée et filtrée. Un gramme de tissu d'algue a été transféré dans 99 mL de milieu de dissociation de l'éponge (sponge dissociation medium) (2,7 % de NaCl, 0,008 % de KCl, 0,01 % de Na₂SO₄, pH= 8). Les échantillons ont été trempés pendant 20 minutes, puis le tissu et le diluant ont été macérés et l'homogénat a été étalé sur des plaques contenant le milieu d'isolement. Les plaques ont été incubées à température ambiante pendant 14 jours

1.4.4. Etude du genre *Bacillus*

1.4.4.1. Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène des bactéries en forme des bâtonnets droit ou légèrement incurvés, à Gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, d'une longueur de 0.9 à 10.0 µm. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatifs, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation [81, 82].

Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chaînettes. Elles sont catalase positive, capable de croître sur des milieux ordinaires comme exemple la gélose nutritive. La morphologie de leurs colonies est très variable entre et au sein des espèces. La composition

du milieu de culture et les conditions d'incubations influent sur cette morphologie. Mais, malgré cette diversité, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficiles à identifier [81].

Les espèces du genre *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans une large gamme d'habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles [83]. Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes, certaines espèces sont prototrophes et d'autres auxotrophes exigent des facteurs de croissance [81].

1.4.4.2. Systématique et taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient au phylum des *Firmicutes*, a été découvert pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn. Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement divers aux niveaux morphologique et physiologique. La famille des *Bacillaceae* appartenant à ce phylum et est la plus importante avec 21 genres incluant le genre *Bacillus* [84].

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* était auparavant basée sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler [85], alors qu'aujourd'hui, la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARNr 16S [86]. Le genre *Bacillus* (Figure 2) est omniprésent dans la nature, il est classé comme suit :

- **Règne :** Bactéria ;
- **Embranchement :** *Firmicutes* ;
- **Classe :** *Bacilli* ;
- **Ordre :** *Bacillales* ;
- **Famille :** *Bacillaceae* ;
- **Genre :** *Bacillus*.

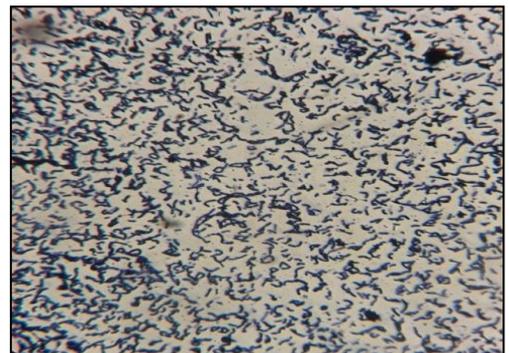


Figure 2: Représentation du genre *Bacillus*
« Photo personnelle »

1.4.4.3. Ecologie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondantes et omniprésentes dans la nature [85], son principal habitat est le sol surtout pour les espèces saprophytes ou elles jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote, le

matériel végétale et les exsudats racinaires représentent des sources importantes de nutriments organiques. Cependant ce genre peut être également isolé à partir des aliments, de l'eau, des organismes eucaryotiques et même à partir des environnements extrêmes comme les déserts, l'antarctique et les habitats hypersalins, dont la caractéristique la plus importante de ce genre et qui lui permet d'héberger plusieurs niches écologiques est la capacité de former des endospores [87, 88].

1.4.4.4. Potentiel biotechnologique de bactéries du genre *Bacillus*

Les bactéries du genre *Bacillus* sont très utilisées pour des applications potentielles dans divers domaines de la biotechnologie. Grâce à son omniprésence dans la nature ainsi que sa diversité métabolique et génétique, il est en tête, de la production de diverses enzymes, substances antimicrobiennes et des insecticides [85], le genre *Bacillus* est fréquemment utilisé dans de nombreuses applications biotechnologiques, dont certaines de leurs substances ont une valeur dans le secteur pharmaceutique et d'autres sont testés in vitro pour contrôler les populations microbiennes des aliments [87].

1.5. Mis en évidence des activités microbiennes d'intérêt biotechnologique des souches microbiennes d'origine marine

Les microorganismes sont utilisés depuis des milliers d'années pour la transformation des produits alimentaires (boissons alcoolisées, pain, fromages, etc.). Plus récemment, et avec la progression de la biotechnologie, des procédés exploitant certaines caractéristiques de microorganismes ont été améliorés et développés, soit pour dégrader de nombreuses molécules organiques ou minérales afin de dépolluer les sols, les eaux ou l'air, soit pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes [17, 89].

Cependant, la découverte de ces nouveaux composés bioactifs à partir de microorganismes marins implique nécessairement diverses études précédentes, car en connaissant les types de microorganismes qui se trouvent dans un certain environnement, il est possible de concevoir des techniques culturelles adaptées pour toutes les communautés microbiennes présentes dans une certaine ambiance. C'est pourquoi il est très important d'identifier les organismes qui produisent des métabolites secondaires bioactifs, et d'être capable de structurer un plan

d'utilisation et de conservation de ces espèces qui représentent une source potentielle de développement de nouveaux médicaments [49, 50].

En effet, les microorganismes associés aux algues marines, par leurs nombreuses et complexes voies interactions avec l'hôte, constituent une immense source de composés biologiquement actifs. Par conséquent, des connaissances sur les interactions microorganisme-algues et les composés bioactifs utiles en biotechnologie produits par des microorganismes d'algues associées sont nécessaire avant de discuter du potentiel biotechnologique des algues et de leurs métabolites [17, 50].

La voie biologique reste donc la voie principale de synthèse de la plupart des composés bioactifs et le milieu naturel demeure la source la plus probable pour découvrir de nouveaux composés bioactifs.

1.5.1. Métabolites secondaires biologiquement actifs dérivés de microorganismes associés aux algues marines

Avec l'apparition des microorganismes multi-résistants aux antibiotiques et de nouveaux aspects de la pathologie microbienne, et au vu de l'éventail restreint des molécules utilisées dans le domaine thérapeutique, plusieurs chercheurs dans le monde se sont intéressés à la recherche et le développement de nouveaux métabolites bioactifs dont l'activité serait plus performante tout en étant moins agressifs pour l'organisme [17, 90].

Les métabolites antimicrobiens désignent une substance naturelle qui a une action d'inhibition ou de destruction spécifique contre les bactéries. Actuellement, cette définition s'est encore élargie pour devenir : toute substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui a le pouvoir d'inhiber ou détruire des microorganismes (bactéries et champignons) et également d'avoir des actions anti-inflammatoires, anti-suppresseurs et anti-tumorales [17, 89].

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très vaste. L'exploration des microorganismes en tant que producteurs d'agents thérapeutiques a commencé seulement au 20^{ème} siècle.

Cependant, malgré cette histoire relativement courte, près de 10 % de tous les produits naturels biologiquement actifs actuellement connus sont d'origine microbienne. Dans ce contexte, les antibiotiques issus du milieu naturel et notamment ceux d'origine microbienne sont les plus recherchés [91].

La recherche de métabolites bioactifs d'origine microbienne peut être envisagée par deux approches distinctes. La première vise la recherche des métabolites bioactifs volatils, connus par les composés organiques volatils microbiens (abrégé en anglais : mVOCs), et la seconde s'intéresse aux métabolites bioactifs non volatils nommés composés organiques non volatils microbiens.

1.5.2. Enzymes protéolytiques d'origine microbienne

La majorité des enzymes industrielles actuellement utilisées sont hydrolytiques, et sont employées pour la dégradation de macromolécules de diverses substances naturelles. Les protéases ou enzymes protéolytiques figurent parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes et les plus largement étudiées depuis l'avènement de l'enzymologie. Elles représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en industrie de détergence, laitier et pharmaceutique, etc. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines et des peptides avec différents degrés de spécificités [92, 93].

Les enzymes protéolytiques sont ubiquitaires, elles sont physiologiquement indispensables à la vie des organismes et essentielles à la croissance et à la différenciation cellulaire. Elles peuvent être d'origine végétale, animale ou microbienne. Cependant, la majorité des protéases commercialisées est produite par des microorganismes du fait de l'incapacité des organismes végétaux et animaux de répondre à la demande actuelle mondiale en protéases. En fait, les microorganismes représentent une excellente source d'enzymes variées, grâce à leur large diversité biochimique et leur susceptibilité aux manipulations génétiques. Elles sont préférées aux enzymes d'origine animale et végétale puisqu'elles possèdent presque toutes les caractéristiques requises pour leurs applications en biotechnologie. En effet beaucoup de protéases microbiennes sont produites à échelle industrielle par fermentation et représentent approximativement 40 % du marché mondial des enzymes [6, 94].

Ces enzymes exercent une activité optimale en présence de NaCl et restent stables sur une large gamme de pH (5 à 10). Elles ont été caractérisées d'enzymes haloalcaliphiles. En outre, elles sont souvent actives à des températures comprises entre 40 et 75 °C [95].

L'activité protéolytique : c'est un test microbiologique qualitatif et préliminaire qui est utilisé comme moyen de criblage, permettant de sélectionner les souches ayant une activité protéolytique, qui a été déterminée à l'aide d'un protocole modifié de la méthode de Peterson utilisant la caséine comme substrat [96].

1.5.3. Biosurfactants et applications

Les surfactants (**Surface Active Agents**) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) [97].

Les tensioactifs (surfactants) sont des molécules capables de réduire la tension interfaciale entre deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau [98, 99]. Ils sont principalement utilisés en tant qu'agents émulsifiants ou dispersants. Les surfactants d'origine chimique présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [100, 101]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants, spécialement les microorganismes (les tensioactifs biologiques ou biosurfactants). Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et sont également efficaces. Les biosurfactants sont également plus économiques et sont moins sensibles aux températures et pH extrêmes et à la salinité [102, 103].

Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles à surfaces actives et produites par des cellules vivantes. Ils s'accumulent aux interfaces et réduisent la tension de surface. Les biosurfactants sont constitués d'une partie hydrophile polaire (soluble dans l'eau et formée par une variété de groupements fonctionnels d'acides aminés, protéines, peptides cycliques, acides carboxyliques, polysaccharides), et d'une partie hydrophobe non polaire (soluble dans l'huile) formée d'une chaîne hydrocarbonée aliphatique saturée ou insaturée [104, 105].

Leurs propriétés permettent de créer des microémulsions : il se forme des micelles dans lesquelles les hydrocarbures peuvent se solubiliser dans l'eau ou inversement. La fonction des biosurfactants est de solubiliser les substances hydrophobes pour améliorer leur assimilation par les microorganismes [97].

Les biosurfactants sont produits par une variété de microorganismes procaryotes et eucaryotes incluant les bactéries, les champignons et les levures. Leur production est généralement associée à la croissance des microorganismes sur des substrats hydrophobes (huile d'olive...). Le type et la quantité de biosurfactants sont influencés par la composition du milieu minéral et par la source de carbone utilisée. Ainsi, la même souche peut produire des biosurfactants différents si la composition du milieu de culture change [105-107].

Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible [108].

Les applications potentielles des biosurfactants sont : l'émulsion, la séparation de phases, la mouillabilité, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la diminution de la viscosité. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, anti-tumeur et anti-mycoplasme [107, 109]. Ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines tels que : cosmétiques, transformation alimentaire, industrie textile, solubilisation des produits agrochimiques, agroalimentaires, nettoyants ménagers, produits de l'agriculture, pharmaceutique, médecine, et d'autres [110].

Les diverses applications de biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour découvrir les bactéries productrices des biosurfactants. La production du biosurfactant est mise en évidence par plusieurs méthodes : test d'hydrophobicité de la surface cellulaire, test de déplacement d'huile, l'activité hémolytique et mesure de la tension de surface [111-114].

Test de déplacement de pétrole (Oil Displacement Test) : Cette technique est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices de biosurfactants. Les

solutions contenant plus de biosurfactant sont incapables de former des gouttes stables et par suite un étalement total est observé sur la surface huileuse, tandis que, les solutions dépourvues de biosurfactant vont conserver la forme déposée sur la surface huileuse. Cette méthode est facile à réaliser, simple, sensible et reproductible. Cependant, cette technique n'est pas corrélée à la réduction de la tension de surface pour confirmer sa fiabilité [114, 115].

Activité hémolytique : L'hémolyse sur gélose au sang a été largement utilisée pour le criblage des bactéries productrices de biosurfactants. Cette technique a été découverte par Bernheimer et Avigad [116], elle a été déjà utilisée pour quantifier la surfactine et les rhamnolipides. Actuellement, de nombreux chercheurs utilisent cette technique pour la sélection de nouveaux isolats producteurs de biosurfactants [114, 117].

1.5.4. Procédure générale d'identification des composés biologiquement actifs issus de microorganismes associés aux algues marines

La procédure générale pour l'isolement des produits naturels à partir des microorganismes associés aux algues marines comprend plusieurs étapes essentielles récapitulées dans la figure suivante :

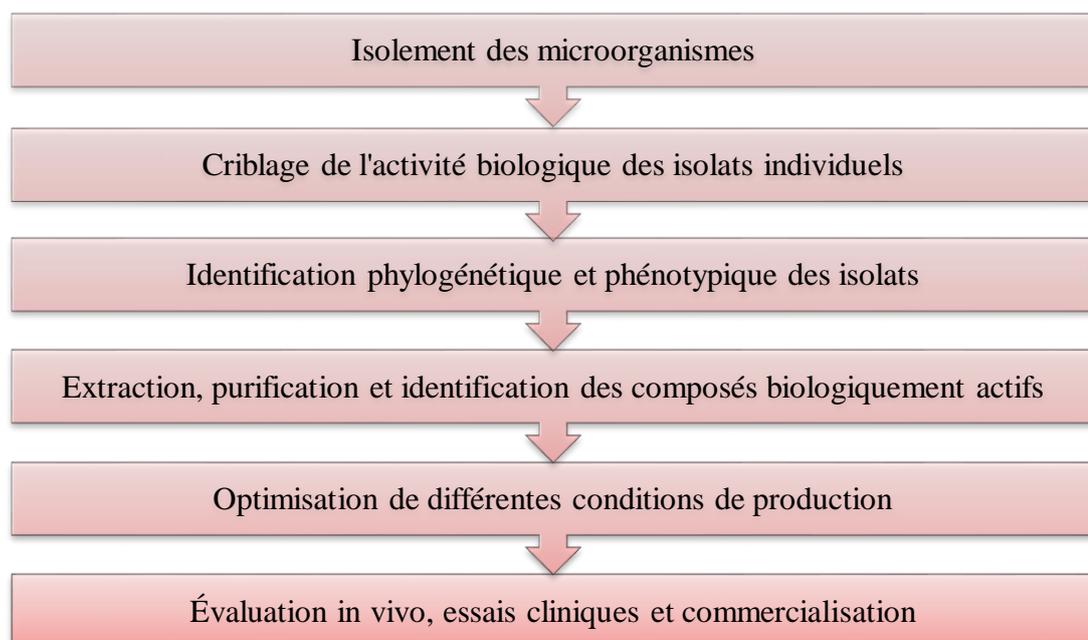


Figure 3 : Procédure générale pour la découverte des composés biologiquement actifs, tels que les agents antimicrobiens, d'origine microbienne [91]

La procédure générale d'isolement des produits naturels à partir des microorganismes épibiotiques marins comprend plusieurs étapes essentielles. Le processus commence par l'isolement des microorganismes provenant de l'environnement, par exemple, à partir des surfaces des eucaryotes marins. Dans le passé, les microorganismes étaient souvent isolés au hasard. Cependant, il est de plus en plus reconnu que la source des échantillons microbiens peut être importante pour augmenter le taux de réussite de la découverte des substances bioactives [91, 118, 119]. En raison des interactions diverses et souvent chimiques qui se produisent entre les microorganismes et leurs hôtes et entre les membres de la communauté épibiotique, l'isolement des microorganismes à partir des surfaces marines vivantes peut augmenter de manière significative les chances d'obtenir des souches productrices de bioactifs.

Après avoir cultivé les microorganismes en laboratoire sur des milieux nutritifs, les isolats individuels sont criblés pour l'activité biologique, par exemple, sur la base de l'inhibition de la croissance des microorganismes autour de l'organisme testé dans le cas des antimicrobiens.

L'identification phylogénétique et phénotypique de l'organisme producteur des substances bioactives est ensuite effectuée comme première dé-réplication pour s'assurer que l'organisme n'a pas été précédemment utilisé pour une activité particulière et par la suite, pour maximiser la possibilité de trouver un nouveau composé bioactif.

L'extraction et la purification des composés biologiquement actifs sont ensuite effectuées, suivies de l'élucidation de la structure chimique. À ce stade, une deuxième dé-réplication peut être effectuée pour exclure ou filtrer les composés déjà connus. Une fois les nouveaux composés identifiés, les différentes conditions de croissance de l'organisme producteur peuvent être évaluées afin d'optimiser leur production (l'optimisation de la production peut être réalisée pour maximiser le rendement du composé désiré).

Enfin, les composés sont évalués pour une utilisation dans le traitement de certaines maladies et dans divers contextes industriels [91, 120, 121].

CHAPITRE 2

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIOTRANSFORMATION DES MONOTERPENES (MENTHOL, THYMOL ET CYMENE) PAR UNE SOUCHE BACTERIENNE D'*ASPARAGOPSIS ARMATA*

2.1. Introduction

La biotransformation des composés bioactifs est une alternative intéressante permettant d'éviter l'utilisation des composés toxiques tels que les solvants organiques dans l'extraction. Dans ces procédés, les composés bioactifs sont obtenus à partir des sources naturelles par des microorganismes à travers leur métabolisme secondaire ou par action enzymatique exogène [122].

L'idée de la biotransformation est ancienne, elle a été appliquée pour la première fois par Nickel en 1951. Elle n'a été développée qu'une quinzaine d'années plus tard. En 1980, deux mises au point sur les voies de biotransformation alors étudiées, ont été réalisées indépendamment par Staba et par Reinhard et Alferman. Depuis 1980, les travaux se sont poursuivis dans différents domaines [123] :

- Biotransformation des terpènes ;
- Biotransformation des alcaloïdes ;
- Biotransformation des composés phénoliques.

La présente revue bibliographique regroupe l'ensemble des connaissances associées aux biotransformation des terpènes (monoterpènes) en particulier ; menthol, thymol et cymène par différents microorganismes notamment le genre *Bacillus*, ainsi que les différents travaux de recherche portant sur les voies métaboliques et les principaux produits formés.

2.2. Notion générale sur la biotransformation

2.2.1. Définition de la biotransformation

La biotransformation également appelée transformation microbienne ou bioconversion, peut être définie comme l'utilisation des systèmes biologiques (biocatalyseur) comme les microorganismes, pour convertir ou produire des modifications chimiques d'un substrat ou

précurseur en un produit donné selon un nombre limité d'étapes enzymatiques [124]. Une certaine molécule est modifiée par la transformation de ses groupes fonctionnels avec ou sans dégradation de son squelette carboné. Ces modifications conduisent à la formation des composés bioactifs nouveaux et utiles qui ne sont pas aisément préparés par des procédés chimiques. Parmi ces produits, beaucoup ont des applications de grande envergure, comprenant les arômes, les produits agrochimiques, des antibiotiques, des antioxydants et des agents anticancéreux [12].

Le principe global du processus de biotransformation est résumé dans la figure 4 :

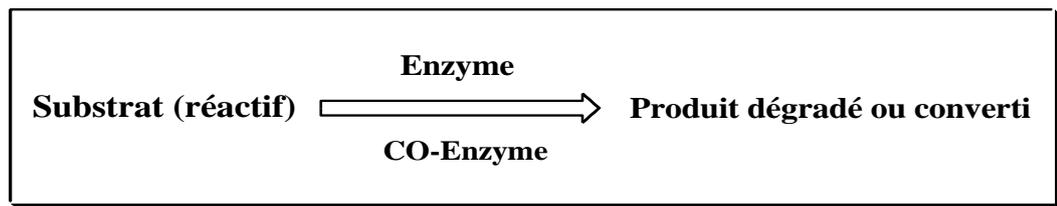


Figure 4 : Principe de la biotransformation [125]

2.2.2. Classification des voies de biotransformation

La biotransformation peut être classée en deux catégories différentes :

- La première concerne la biotransformation des xénobiotiques dans lequel le substrat est complètement étranger aux microorganismes.
- La seconde biotransformation est génétiquement ciblée, également connu comme analogue de la biosynthèse, dans lequel le substrat est un analogue structurel d'un intermédiaire biosynthétique. Cette biotransformation repose sur la flexibilité du substrat de la voie enzymatique existante, responsable de la biosynthèse du métabolisme secondaire [126,127].

2.2.3. Avantages de la biotransformation

Les biotransformations comparées à des réactions chimiques, ont l'avantage d'être régio et stéréo sélectives, ce qui conduit à des produits de forme énantiomérique données permettant la production des produits chiraux à partir de mélanges racémiques dont la demande dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire est importante [126].

Elles sont également très efficaces en termes d'énergie puisqu'elles peuvent avoir lieu à des températures, une pression et un pH modérés. La production des composés est généralement simplifiée par un nombre d'étapes plus restreint [128-130].

Les biotransformations sont plus particulièrement adaptées aux nouvelles normes mondiales relatives au « développement durable » et au label « naturel » actuellement très recherchés par les institutions politiques et les consommateurs [126, 128, 129]. Pour obtenir un arôme naturel, les industries ont donc actuellement le choix entre deux systèmes de production que sont les procédés classiques d'extraction à partir des matières premières naturelles et les biotransformations. La mise en œuvre des réactions de biotransformation permet d'éliminer certaines faiblesses inhérentes aux techniques classiques d'extraction.

Il est en effet possible de s'affranchir des facteurs incontrôlables (climatiques, géographiques) qui agissent sur la quantité et la qualité d'arômes extraits de matières premières. Les biotransformations permettent également une autonomie vis-à-vis de l'approvisionnement en matières premières fortement influencé par les saisons notamment dans le cas des végétaux aromatiques. Elles permettent aussi de diminuer les volumes des résidus d'extraction [128].

Enfin, le nombre de molécules constituant un bouquet aromatique naturel est souvent très important, mais seul un nombre restreint est à l'origine de la sensation olfactive. Or la biotransformation permet d'obtenir spécifiquement ces molécules.

2.2.4. Inconvénients de la biotransformation

La principale difficulté liée à l'utilisation des transformations microbiennes est associée au faible rendement obtenu dans la réaction, ainsi que la nécessité d'un équipement de laboratoire spécifique et la formation sur les techniques microbiennes [129]. L'utilisation des biocatalyseurs pour réaliser des produits biotransformés est souvent difficile car elle implique les défis de toxicité ou d'inhibition des réactifs ou des produits. En outre, si le substrat utilisé est toxique, il peut tuer le microorganisme empêchant toute la biotransformation de se produire. D'autre part, si le microorganisme utilise le substrat en tant que source d'énergie, aucun produit désiré n'est susceptible d'être récupéré [129].

2.2.5. Facteurs affectant la biotransformation

La biotransformation dépend de divers facteurs comme : aspects physiologiques, biochimiques et les conditions environnementales de la culture cellulaire telle que [131] :

- Composition chimique des milieux de culture ;
- Les régulateurs de croissance ;
- La source de carbone dans le milieu ;
- Température ;
- pH ;
- Le temps d'incubation ;
- Intensité de la lumière.

2.2.6. Biocatalyseurs

La biocatalyse est un grand type de biotransformation qui implique l'action d'enzymes dans la conversion d'un composé à l'autre [125]. Le biocatalyseur employé peut être une cellule entière d'origine animale, végétale ou microbienne. Dans ce dernier cas, il est possible d'utiliser des microorganismes eucaryotes comme les champignons filamenteux et les levures ou des organismes procaryotes comme les bactéries [128,132]. Le biocatalyseur peut également être une enzyme déterminée, présente au sein d'un extrait cellulaire ou sous forme purifiée.

La grande diversité des microorganismes autorise de nombreuses réactions enzymatiques au sein d'une large diversité des voies métaboliques. Leur utilisation simple, leur rapidité de croissance et leur facilité d'adaptation à des conditions imposées par des contraintes techniques et économiques sont des atouts supplémentaires qui favorisent leur emploi dans des procédés de biotransformation. L'utilisation des cellules végétales, même si elle comporte plus d'inconvénients que celle d'enzymes ou des microorganismes, peut néanmoins être avantageuse pour la production des métabolites secondaires complexes. Avec les enzymes, les microorganismes représentent les principaux biocatalyseurs actuellement utilisés et étudiés [128, 133, 134].

D'une façon générale, la sélection initiale des souches est effectuée par rapport à plusieurs critères qui sont à retenir dans toute stratégie de biotransformation : il faut obtenir un haut

rendement de conversion, une réaction rapide, un seul produit obtenu à haute valeur ajoutée accompagné d'un coût relativement bas du substrat. Les souches excréant le produit recherché ou même effectuant la réaction dans le milieu de culture seront plus particulièrement intéressantes [128].

2.2.7. Optimisation des procédés de biotransformation

Les principaux critères permettant d'évaluer la performance d'un procédé de biotransformation sont au nombre de trois. Il s'agit de la productivité en métabolites (ou vitesse de synthèse), de la concentration finale obtenue et du rendement de production. Ces critères vont être optimisés par une démarche comprenant deux grandes étapes :

La première étape consiste à choisir le biocatalyseur le plus adapté à la réalisation de la réaction voulue. Les méthodes employées pour sélectionner les microorganismes ont été décrites dans le paragraphe précédent (2.2.6).

La seconde étape consiste à choisir les paramètres physicochimiques et technologiques permettant de favoriser la réaction de biotransformation. Cette dernière met en jeu trois acteurs principaux, le précurseur ou substrat de biotransformation, le biocatalyseur (enzyme seule ou microorganisme entier) et le produit d'intérêt [128].

2.2.8. Agents de biotransformation

Un grand défi pour une biotransformation spécifique d'un certain substrat est de trouver le microorganisme approprié, donc traditionnellement, l'une des techniques les plus largement utilisées le criblage avec différentes souches microbiennes. De nos jours, la biotransformation des composés est réalisée en utilisant les systèmes suivants [126, 127] :

1. En utilisant des microbes (champignons et bactéries) ;
2. En utilisant des cultures de cellules végétales et animales ;
3. En utilisant des animaux.

2.3. Biotransformation des monoterpènes par des espèces du genre *Bacillus* et d'autres microorganismes

Cette partie est consacrée d'une part à des généralités sur les terpènes, notamment les monoterpènes, puis l'action des microorganismes et la possibilité de conversion

(transformation) ou dégradation de ces composés par différents types des microorganismes dans des conditions d'aérobiose, et d'autre part sur quelques données expérimentales sur les voies métaboliques et les principaux produits formés de la biotransformation des terpènes par ces différents microorganismes.

Des recherches approfondies ont été consacrées aux travaux antérieurs sur la production biotechnologique de saveurs et de parfums en utilisant les terpènes comme substrats. Environ 2/3 des manuscrits publiés sur la production et/ou la biotransformation des terpènes au cours des dernières années décrivent des bactéries ou des champignons comme les principaux biocatalyseurs en raison de leur potentiel élevé en bioprocédés [15].

2.3.1. Généralités sur les terpènes

Les terpénoïdes constituent la famille des produits naturels la plus diverse structurellement, stéréo-chimiquement et fonctionnellement avec plus de 55 000 molécules identifiées à ce jour dans toutes les formes de vie. Leurs structures varient d'une simple chaîne linéaire d'hydrocarbures jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés. Alors que certains terpénoïdes exercent des fonctions métaboliques primaires essentielles pour la croissance et la reproduction chez de nombreux organismes, la majorité fonctionne comme des métabolites secondaires et contribue à l'adaptation des espèces à leur niche écologique [135]. Ils possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques et des activités biologiques très diverses. Plusieurs d'entre eux sont exploités à l'échelle industrielle : pharmaceutique, alimentaire et cosmétique.

Les termes « terpénoïdes », « terpènes » et « isoprénoïdes » sont souvent utilisés de façon interchangeable et proviennent de térébenthine (*lat. balsamum terebinthinae*), une huile essentielle dont les composés majeurs sont des terpénoïdes et qui est obtenue par distillation de la résine de conifères [135, 136]. Cette huile a été découverte en 1818 comme étant un mélange d'hydrocarbures avec un ratio carbone-hydrogène de (5 :8). En 1959, il a été proposé une nomenclature pour les dérivés isopréniques en fonction du nombre d'unités d'isoprène (C₅H₈)_n qui les constitue [137] : hémiterpènes n=1 (C₅), monoterpènes n=2 (C₁₀), sesquiterpènes n=3 (C₁₅), diterpènes n=4 (C₂₀), sesterpènes n=5 (C₂₅), triterpènes et terpénoïdes n=6 (C₃₀) et n=8 caroténoïdes (C₄₀). Ces unités isopréniques se lient entre elles le plus souvent par des liaisons dites régulières de type tête- queue. Ils peuvent se lier

par des liaisons dites irrégulières de type artémésyl (tête-tête ou queue-queue). Selon le nombre d'unités isopréniques fixées, on obtient :

- Par le pyrophosphate de géranyl (PPG), les monoterpènes.
- Par le pyrophosphate de farnésyle (PPF), les sesquiterpènes.
- Par le pyrophosphate de géranylgéranyle (PPGG), les diterpènes.

2.3.1.1. Monoterpènes

Les monoterpènes représentent une famille de molécules naturelles abondantes, de faible coût et présentant des propriétés olfactives et biologiques notables. La valorisation de ces molécules naturelles passe par leur fonctionnalisation, dans le but d'accroître l'activité biologique reconnue de la molécule naturelle ou de découvrir de nouvelles activités [138].

Ces composés sont d'origine naturelle à chaîne ramifiée en C-10 des hydrocarbures formés à partir de 2 unités d'isoprène, constituant des substrats de précurseurs appropriés, qui sont des matières premières idéales pour la production biotechnologique des substances chimiques d'arôme naturel [139]. C'est leur point d'ébullition peu élevé qui détermine le caractère volatil de ces composés. Les monoterpènes sont également très peu solubles dans l'eau mais leur solubilité peut être améliorée par l'ajout de groupes polaires.

Les monoterpènes ont une forte action antibiotique contre diverses flores microbiennes, cependant, certaines bactéries du sol tel que *Pseudomonas* ont la capacité unique de se dégrader et de vivre sur eux. Dans le procédé d'utilisation de ces composés en tant que source de carbone, les bactéries réalisent diverses conversions intéressantes au sein de la molécule avant d'être finalement dégradé en dioxyde de carbone et de l'eau [139].

2.3.1.2. Classification des monoterpènes

Les composés monoterpéniques correspondent le plus souvent à la formule brute $C_{10}H_{16}$, qui contiennent plus de 1500 composés connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles : les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) avec l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées (alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, peroxydes). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène [138].

Des squelettes de base décrivent chacune d'entre-elles : le Diméthyl-2,6-octane pour les monoterpènes acycliques, le para-menthane pour les monoterpènes cycliques, et le Carane, Thujane, Fenchane, Pinane, Camphane (Bornane) pour les monoterpènes bicycliques (Figure 5) [138].

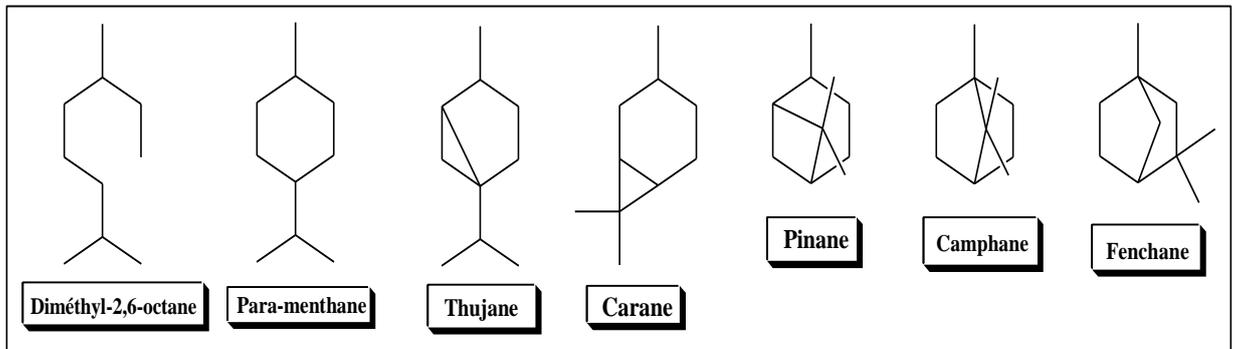


Figure 5 : Squelettes de base pour les monoterpènes

2.3.2. Travaux antérieurs de la biotransformation des terpènes par *Bacillus* et différents microorganismes

Après un rappel bibliographique, la majorité des transformations microbiennes des terpénoïdes ont été effectuées sur les monoterpénoïdes, qui sont les principaux constituants de nombreuses huiles essentielles. Afin d'obtenir des substances beaucoup plus fonctionnalisées à partir de monoterpénoïdes, diverses réactions chimiques et transformations microbiennes de monoterpénoïdes synthétiques disponibles dans le commerce et bon marché ont été réalisées [140].

Par conséquent, les biotransformations des monoterpènes, par différents types de réaction tels que l'époxydation, l'oxydation, l'isomérisation, la déshydrogénation et l'hydroxylation stéréosélective, ont abouti à la production des composés énantiomériques définis, qui peuvent être considérés comme naturels [141].

Les différents travaux sont regroupés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Biotransformation des monoterpènes par divers microorganismes

	Substrat	Microorganisme	Produit	Référence
Travaux sur <i>Bacillus</i>	1,4-Cinéole	<i>Bacillus cereus</i>	2 α -hydroxy-1,4-cinéole (3.8%) 2 β -hydroxy-1,4-cinéole (21.3%).	[140,142]
	α -Pinène et β -Pinène	<i>Bacillus pallidus</i> BR 425.	Formation de nombreux monoterpènes oxydés identifiés comme étant des dérivés du Carveol. <ul style="list-style-type: none"> • Carvone ; • Pinocarvone ; • Myrténal. 	[140,143]
	D-limonène	<i>Bacillus stearothermophilus</i> BR388	<ul style="list-style-type: none"> • Carveol; • Alcool périllique; • Périllaldéhyde; • α-Terpinéol. 	[140,144]
	1,8-Cinéole	<i>Bacillus cereus</i> UI-1477 (Cytochrome P450 monooxygénase)	2R-endo-hydroxy-1,8-cinéole, Où 2R-exo-hydroxy-1,8-cinéole.	[140,145]
	Isoeugénol	<i>Bacillus subtilis</i> HS8 <i>Bacillus pumilus</i> S-1	Vanilline	[146] [147]
	Thymol	<i>Streptomyces humidus</i> Tu-1	(1R, 2S) et (1R, 2R)-2-hydroxy-3-p-menthen-5-one (14 %).	[140,148]

Travaux sur les <i>Streptomyces</i>	1,8-Cinéole	<i>Streptomyces ikutamanensis</i> Ya-2-1	(+) -3 α -hydroxy-1, 8-cinéole (46 %). (+) -3 β -hydroxy-1, 8-cinéole (29 %).	[140,149]
		<i>Streptomyces bottropensis</i> SY-2-1	(+) -2 α -hydroxy-1,8-cinéole	[149,150]
	Cuminaldéhyde [4-isopropylbenzaldéhyde]	<i>Streptomyces ikutamanensis</i>	Acide 4-isopropylbenzoïque (Acide cuminique) Et Cuminol	[140,151]
	<ul style="list-style-type: none"> • Géraniol • Nérol • (+) -, (-) -, et (\pm) -Citronellal 	<i>Streptomyces ikutamanensis</i> Ya-2-1	Géraniol \rightarrow 6,7-époxygéraniol Nérol \rightarrow 6,7-époxynerol (+), (-), et (\pm) -Citronellol \rightarrow 2,3-époxy citronellol	[140,151]
	Linalol racémique	<i>Streptomyces albus</i> NRRL B1865, <i>Streptomyces griseus</i> ATCC 10137	Oxydes de cis- et trans-linalol	[140,152]
(+) ou (-) -Cis-carvéol	<i>Streptomyces bottropensis</i> SY-2-1 Et <i>Streptomyces Ikutamanensis</i> Ya-2-1	(-) ou (+) -bottrospicatol [(4 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 8 <i>R</i>) -(-) ou (+) -6, 8-oxidomenth-1-en-9-ol] Et (-) ou (+) -isobottrospicatol [(4 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 8 <i>S</i>) - (-) ou (+) -6,8-oxidomenth-1-en-9-ol]	[140,153]	

Streptomyces	(-) -Carvone	<i>Streptomyces</i> , A-5-1	(-) Trans-carvéol. (-) Cis- carvéol. (+) Dihydrocarvone, (+) Isodihydrocarvone, (+) Neodihydrocarveol, (+) Isodihydrocarveol (+) Neoisodihydrocarveol	[154]
	1,4-Cinéole	<i>Streptomyces</i> <i>griseus</i>	8-hydroxy-1,4-cinéole	[140,142]
Divers microorganismes	α -Terpinéol	<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomallei</i>	8,9-epoxy-p-menthan-1-ol	[140,155]
	Cis-p-menthane	<i>Pseudomonas</i> <i>mendocina SF</i>	Cis-p-menthan-1-ol	[156]
	Isoeugénol	<i>Pseudomonas sp.</i> ISPC2	Vanilline	[157]
	1,8-Cinéol	<i>Rhodococcus sp.</i>	2-exo-hydroxy-1,8-cinéole 2-endo-hydroxy-1,8-cinéole 2-oxo-1,8-cinéole	[158]
	(4R) - (+) -Limonène	<i>Penicillium</i> <i>digitalum</i>	(4R) - (+) - α -Terpinéol	[159]
Divers	Myrcène	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 1074	Dihydrolinalol (79.5 %) et le 2,6-diméthylactane (9.3 %) pendent 1.5 jour. Tandis qu'une incubation de 3 jours accumulée : 2,6-diméthylactane (90.0 %) et α -Terpinéol (7.7 %).	[160]
	Eugénol/ Acid férulique	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> ATCC 55180	Vanilline	[161]

Divers microorganismes	Thymol (+)-Limonène (+)-Carvone (-)-Menthone (L)Citronellal	<i>Oocystis pusilla</i> (Microalgue) (Période d'incubation de 24h)	Thymoquinone 2 % Trans-Carvéol 10 % Carvone 5 % Oxyde trans-limonène 3 % Trans-Dihydrocarvone 30 % Cis-Dihydrocarvone 6 % Menthol 11 % Citronellol 75 %	[162]
	α -Pinène	<i>Chrysosporium pannorum</i> A-1 (2-3 jours)	Verbénol Verbénone	[163]
	R- (+) -Limonène	<i>Fusarium oxysporum</i> 152b (72 h)	R- (+) - α -Terpinéol	[164]
	Limonène	<i>Pseudomonas putida</i> MTCC 1072 (120h)	Alcool périllylique (36 %) p-menth-1-ène-6,8-diol (44 %)	[165]
	Citronellal	<i>Penicillium digitatum</i>	Menthol	[140]
	(-) β -Pinène	<i>Aspergillus Niger</i> ATCC 9642	α -Terpinéol (4 %)	[166]
	p-Cymène	<i>Pseudomonas putida</i> F1 ATCC 700007	Alcool p-cumique	[167]
	(+) (-) - Camphre	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 29607 <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> ATCC 700278D-5	5-oxo-hydroxy- camphre	[168] [169]

2.4. Etude de la biotransformation des métabolites secondaires : menthol, thymol et cymène

2.4.1. Biotransformation du menthol

2.4.1.1. Description chimique et utilisation du menthol

Le menthol ($C_{10}H_{20}O$) est un alcool terpénique monocyclique constitué d'un cycle de cyclohexane substitué par un groupe méthyle et un groupe isopropyle en position para par rapport à un groupe OH (Figure 6), il est le constituant majeur de l'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha Piperita*) et de l'huile de menthe des champs (*Mentha Arvensis*) [170,171].

Des études plus récentes étaient principalement consacrées à démêler les structures stéréochimiques du menthol. Menthol a trois atomes de carbone asymétriques dans le cycle cyclohexane, et se trouve donc sous forme de huit stéréo-isomères de quatre paires d'énantiomères : (-) et (+) Menthol, (-) et (+) Néomenthol, (-) et (+) Isomenthol, et le (-) et (+) Néoisomenthol. Le (-) menthol (1R, 2S, 5R menthol) est la principale forme du menthol se produisant dans la nature et l'un des plus importants produits aromatisants [172], en raison de son odeur de menthe poivrée et les effets rafraîchissants [140]. La source principale d'origine naturelle du (-) menthol est obtenue par congélation, de l'huile de menthe des champs pour cristalliser le menthol présent [170-173].

Le menthol est largement utilisé dans de nombreux produits commerciaux (produits pharmaceutiques, cosmétiques, dentifrices, la gomme à mâcher, et d'autres produits de toilettes, ainsi que dans les cigarettes) et les aliments [173], et possède plusieurs propriétés biologiques, comme sédatif, anesthésique, antiseptique, antibactérienne et antivirale très efficaces contre les germes microbiens. Ses bienfaits antioxydants ainsi que ses effets antispasmodiques facilitent la digestion [172-174].

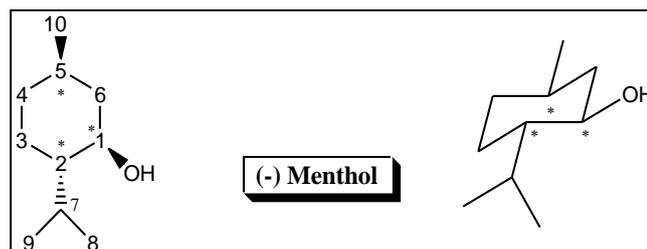


Figure 6: (1R, 2S, 5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol [173]

2.4.1.2. Propriétés physiques et chimiques [172-174]

- L'état physique : Cristaux ou granules à température ambiante, il se trouve sous forme solide, de couleur blanc cireux, Il fond si l'on augmente légèrement la température ;
- Poids moléculaire : 156.27 g /mol ;
- Point de fusion : 41-43 °C (106-109 °F). D, L-menthol existe dans deux polymorphes fondant à 28 °C et 38 °C, respectivement ;
- Point d'ébullition : 216 °C ;
- Densité : 0.890 g / cm³ ;
- Pression de vapeur : 8.5 Pa (0.064 mm Hg) à 25 °C (L-menthol, Isomère non spécifié) ; 30 Pa (0.975 mm Hg) à 55 °C, (D / L menthol) ;
- Solubilités : Légèrement soluble dans l'eau ; très soluble dans l'alcool, le chloroforme, l'éther, l'éther de pétrole, l'acétone et le benzène.

2.4.1.3. Voies métaboliques du menthol par divers microorganismes

La biotransformation du menthol par différents microorganismes conduit à la formation de plusieurs produits intermédiaires et finaux, bien que les voies métaboliques soient relativement similaires pour la plupart des microorganismes.

La littérature fournit plusieurs exemples pour exploiter le potentiel de biotransformation pour la bioconversion sélective des alcools monoterpénique comme le menthol par différents microorganismes sachant que la gamme des microorganismes qui participe à la biotransformation du menthol est large [175]. La plupart de ces microorganismes sont des champignons. Parmi eux on retrouve *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa*, *Penicillium sp*, *Rhizopus stolonifer*, *Macrophomina phaseolina*, *Cunninghamilla elegans*....

La synthèse des différents travaux publiés sur la biotransformation du menthol est décrite dans ce qui suit :

- 1) La biotransformation fongique de (-) et (+) menthol par *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa* a été décrit par Asakawa et al, [176]. *Aspergillus niger* converti (-) menthol en 1-hydroxymenthol (1), 2-hydroxymenthol (2), 4-hydroxymenthol (3), 6-

hydroxymenthol (4), 7-hydroxymenthol (5), enfin en 9-hydroxymenthol (6) et un anti-moustique très actif le 8-hydroxymenthol (7). Tandis que le (+) -menthol a été biotransformé sans problème par le même microorganisme en 7-hydroxymenthol (5). *Aspergillus cellulosa* M-77 a biotransformé le (-) -menthol en 4-hydroxymenthol (3) de manière prédominante. La formation de 4-hydroxymenthol (3) est également observée chez *Aspergillus cellulosa* IFO 4040 et *Aspergillus terreus* IFO 6123, mais son rendement est bien inférieur à celui obtenu à partir de (-) menthol par *Aspergillus cellulosa* M-77 [140,176].

La biotransformation de (+) et (-) néomenthol et (+) isomenthol par *Aspergillus niger* a été étudié ultérieurement. En fait, ils sont même convertis principalement à des produits hydroxylés [140,176]. Un aperçu schématique très détaillée de ces réactions est présenté dans la figure 7.

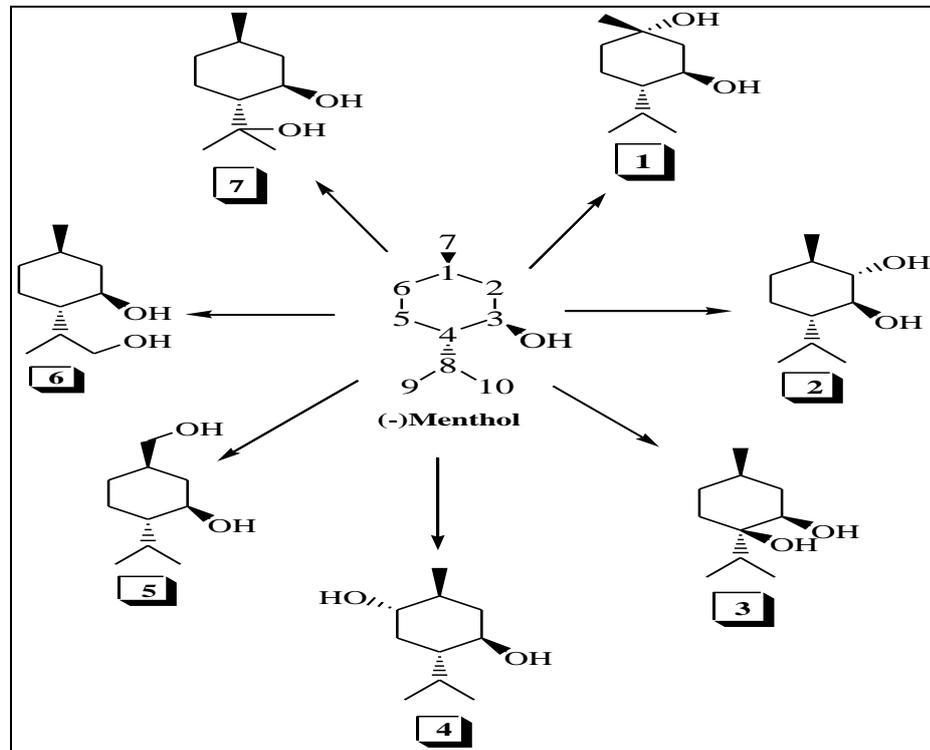


Figure 7 : Voies métaboliques de (-) menthol par *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa* [140,176,]

- 2) Plus récemment, la transformation fongique du (-) menthol par *Cephalosporium aphidicola* a été rapporté par Atta-ur-Rahman et al, [177]. L'incubation du (-) menthol avec ce champignon pendant 12 jours a donné quatre nouveaux métabolites, 10-acétoxymenthol (1), 1α-hydroxymenthol (2), 6α-hydroxymenthol (3) et 10-

hydroxymenthol (4) et deux composés connus identifiés comme 7- hydroxymenthol (5) et 9-hydroxymenthol (6) (Figure 8) [140,177].

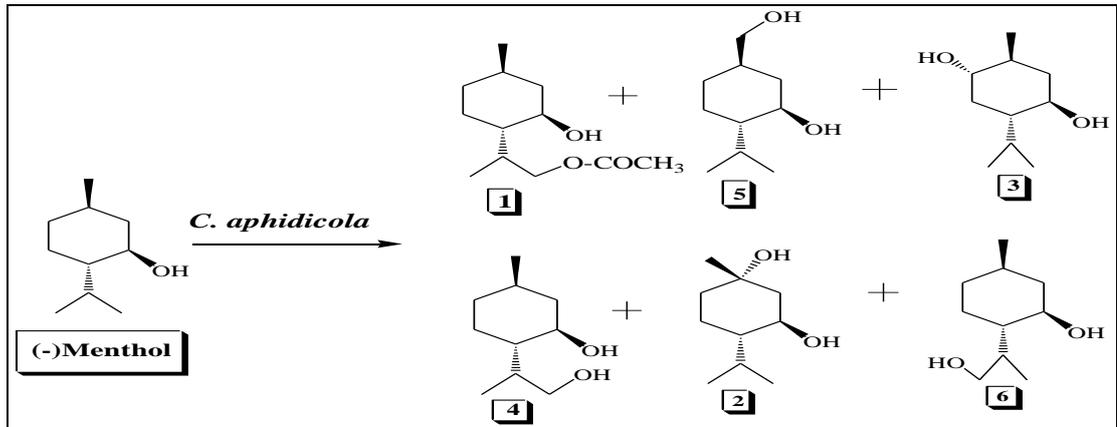


Figure 8 : Biotransformation du (-) menthol par *Cephalosporium aphidicola* [140,177]

- 3) La biotransformation du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC 5074) a été étudiée par Akbar Esmaeili et al, [178]. Elle a été réalisée avec des cultures sporulées de surface de *Mucor ramannianus*. Les principaux produits obtenus (Figure 9) à partir de biotransformation du (-) menthol pendant 7 jours d'incubation sont : trans-p-menthane-8-ol, trans-menth-2-ene-1-ol, sabinène, p-menthane-3,8-diol, l'isomenthol, et le 1,8 cinéole, les rendements obtenus sont élevés [160,178].

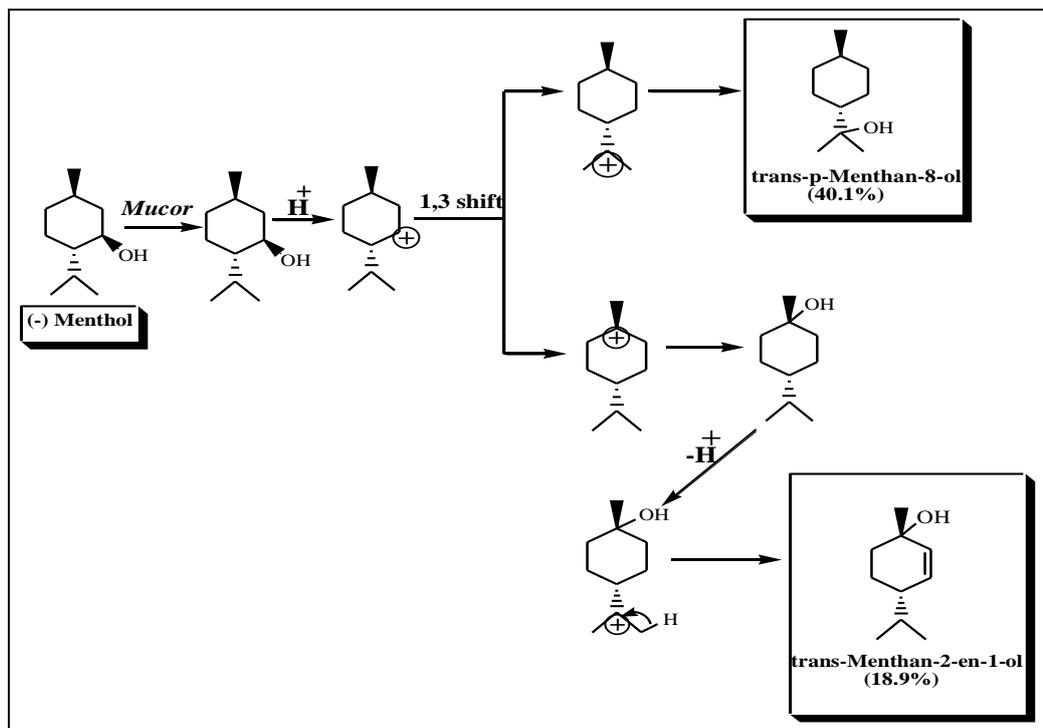


Figure 9 : Biotransformation du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC 5074) [178]

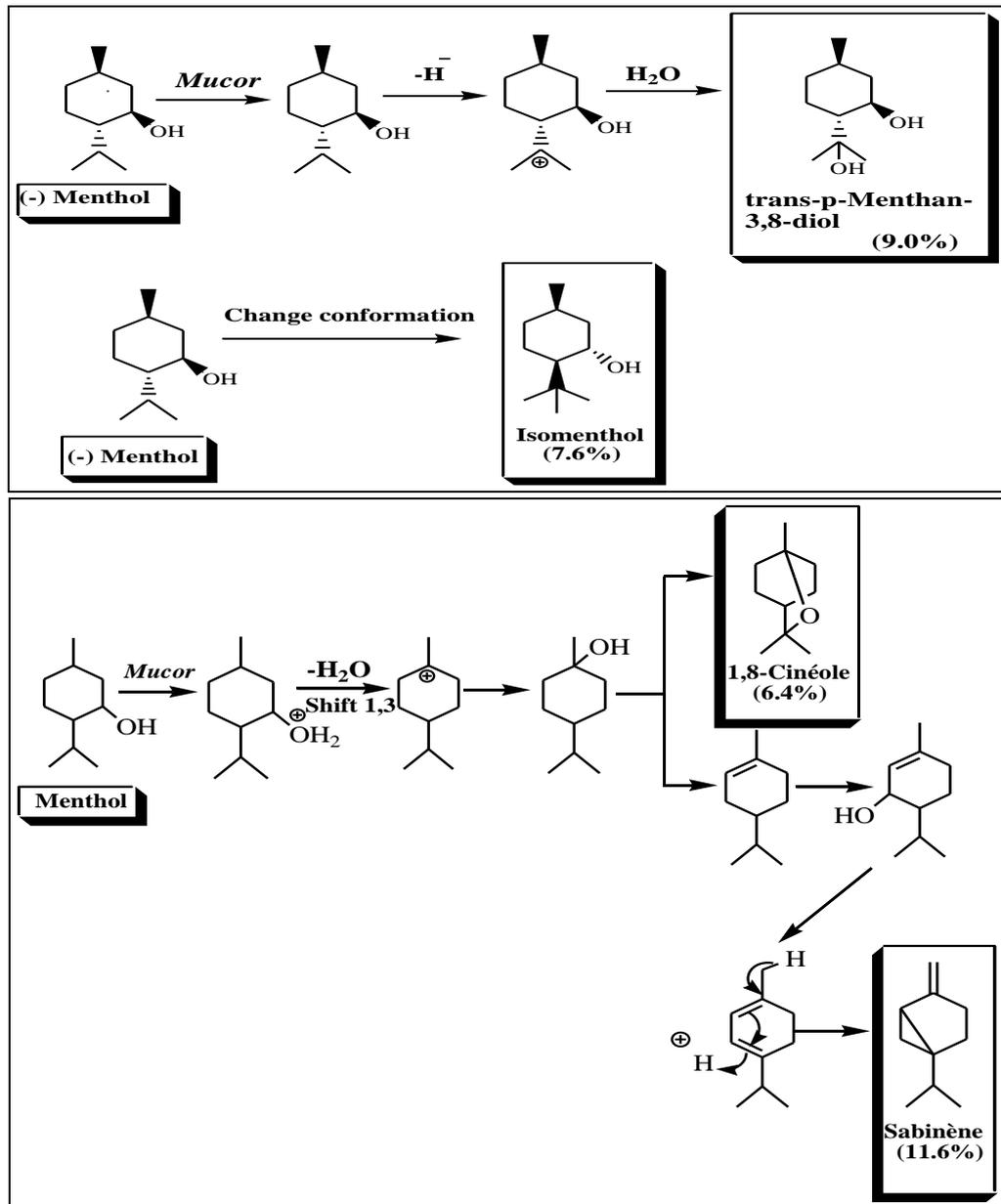


Figure 9 : Biotransformation du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC 5074) [178]

D'autres études de la biotransformation du menthol ont été réalisées en utilisant un autre champignon de type *Chlorella vulgaris* avec l'utilisation des périodes d'incubation de 72, 92 et 120 heures, afin d'étudier l'influence du temps sur le procédé de biotransformation [179].

Pendant 72 heures, *Chlorella vulgaris* transforme le menthol (1) en dihydroterpinéol (3) à (48.8%) et en isomenthol (4) à (20.2 %). Lorsqu'on utilise un temps d'incubation de 92 h, le produit principal est l'isomenthol (4) à (92.3 %). À 120 heures d'incubation, on obtient le cis-p menth-1-en-3-ol (2) à (46.0 %) et le dihydroterpinéol (3) à (49.2 %) (Figure 10) [179].

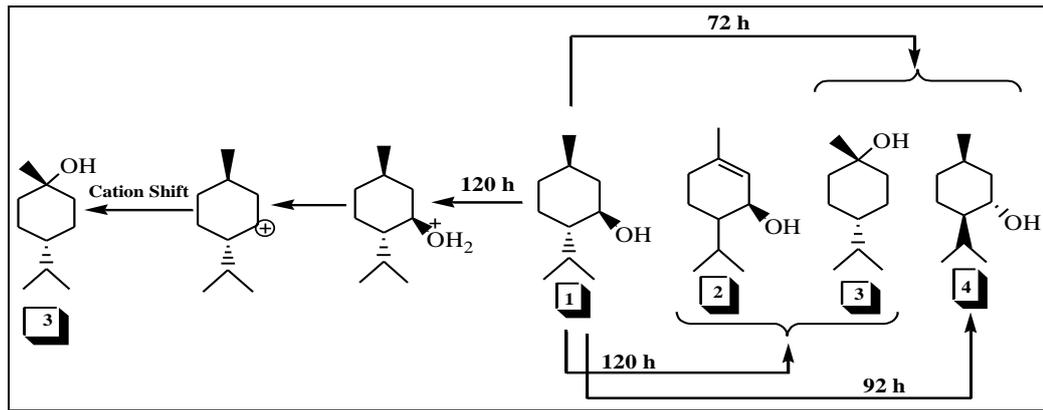


Figure 10 : Biotransformation du (-) menthol par *Chlorella vulgaris* [179]

Un troisième schéma métabolique est mis en évidence avec l'utilisation de la culture de surface sporulés de *Penicillium sp* (PTCC 5074) isolée à partir du sol. Les principaux produits obtenus à partir de la biotransformation du menthol après 7 jours sont : α -pinène (18.0 %), sabinène (11.6 %), trans-p-menthane-1-ol (10.6 %), p-menth-1-ène (5.8 %), 1,8-cinéole (6.4 %) et limonène (3.2 %) (Figure 11) [180].

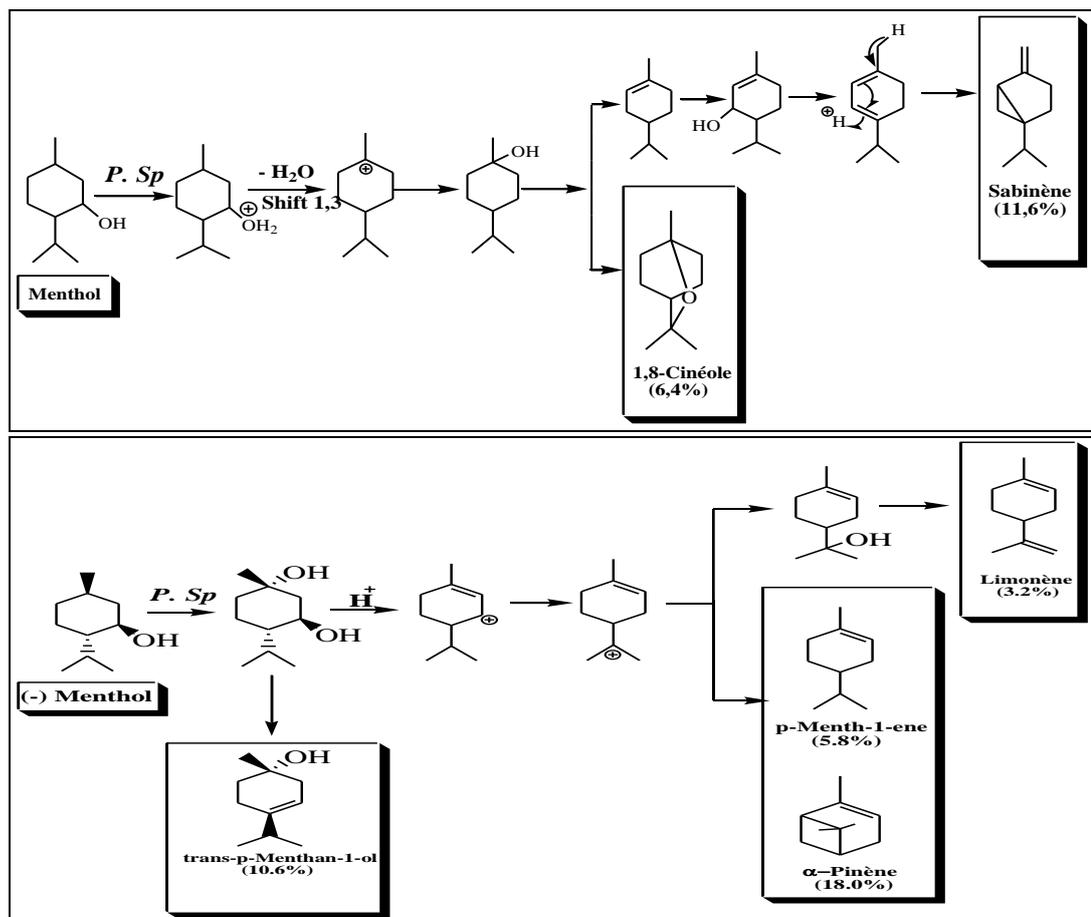


Figure 11 : Voies possibles de biotransformation du (-) menthol par *Penicillium sp* (PTCC 5074) [180]

- 4) La transformation microbienne d'un monoterpène (-) -menthol, en utilisant diverses souches fongiques a été reportée dans la littérature [126]. La conversion enzymatique microbienne du (-) menthol par *Macrohomina phaseolina* a produit cinq métabolites connus : 8-hydroxymenthol, 6 α -hydroxymenthol, (8R) -9-hydroxymenthol, 1 α -hydroxymenthol et 8,9-dihydroxymenthol (Figure 12).

Le (8R) -9-hydroxymenthol a été rapporté comme produit de transformation de (-) -menthol par *Rhizopus stolonifer* (Figure 13). D'autre part, l'incubation du (-) menthol avec *Cunninghamella elegans* a produit un métabolite le 1 α -hydroxymenthol (Figure 14) [126].

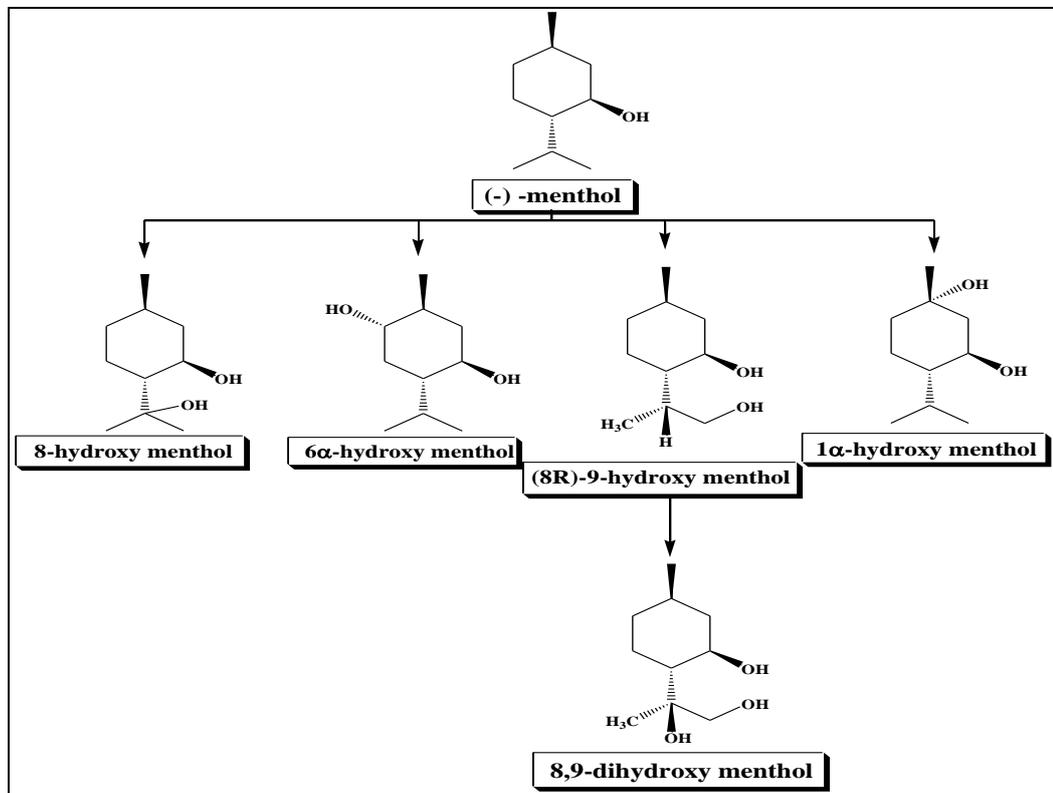


Figure 12 : Biotransformation du (-) menthol par *Macrohomina phaseolina* [126]

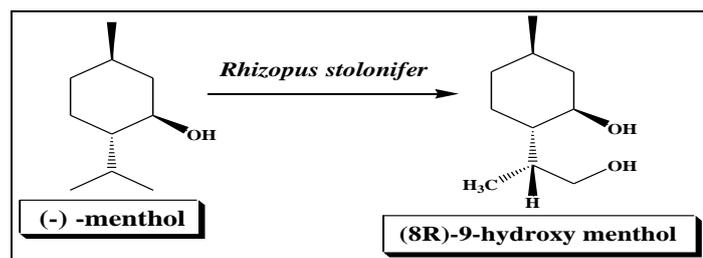


Figure 13 : Métabolisme du (-) menthol avec *Rhizopus stolonifer* [126]

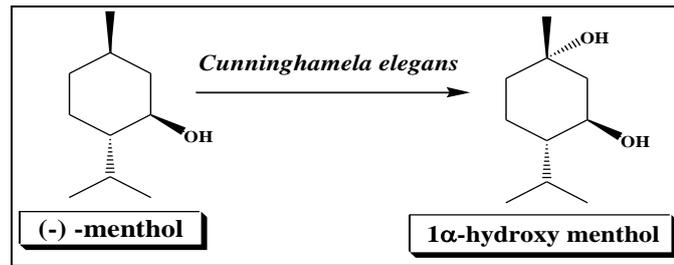


Figure 14 : Biotransformation du (-) menthol par *Cunninghamella elegans* [126]

- 5) Le (-) -menthol a été glycosylé par les cellules de suspension d'*Eucalyptus perriniana* en (-) -menthol diglucoside et un autre glycoside de menthol (Figure 15) [140].

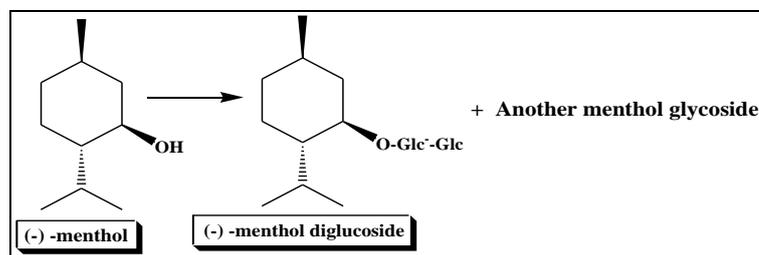


Figure 15 : Biotransformation du (-) -menthol par les cellules de suspension d'*Eucalyptus perriniana* [140]

2.4.2. Biotransformation du thymol

2.4.2.1. Description chimique et utilisation du thymol

Le thymol (2-isopropyl-5-méthylphénol) de la formule brute $C_{10}H_{14}O$ et une masse moléculaire de 150.22 g/mol [181] est une molécule naturelle extraite de l'huile essentielle de plantes, notamment le thym (*Thymus vulgaris*) avec des concentrations allant jusqu'à 70 % [140]. C'est un terpène qui fait partie de la famille des monoterpènes, lipophile et volatil (soluble dans les alcools, le gras, l'huile et peu soluble dans l'eau). Il est vendu sous forme de cristaux incolores avec une odeur aromatique caractéristique [140,181].

Le thymol est naturellement synthétisé dans les plantes avec deux unités d'isopréniques qui elles-mêmes sont obtenues par la voie de l'acide mévalonique à partir du coenzyme A. Il peut aussi être synthétisé de manière chimique par une alkylation du m-crésol avec de l'isopropanol et du propylène [181].

Le thymol est utilisé pour conserver les momies depuis l'Antiquité Egyptienne, mais aussi pour ses qualités aromatiques (brûlé au sein des temples sacrés). Depuis toujours, le thym est un symbole de courage et d'admiration. Aujourd'hui, le thymol entre dans la composition des différents médicaments grâce à ses propriétés antibactériennes, antiseptiques et antifongiques [181].

2.4.2.2. Travaux antérieurs sur la biotransformation du thymol par différents microorganismes

Comme le menthol, la biotransformation du thymol par différents microorganismes conduit également à la formation de plusieurs produits intermédiaires et finaux bien que les voies métaboliques soient relativement similaires pour la plupart des microorganismes. La gamme des microorganismes qui participe à la biotransformation du thymol est large. En effet, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence leur biotransformation en terpénoïdes par différents microorganismes.

- 1) La biotransformation fongique du thymol par *Aspergillus niger* a été décrit par Akbar Esmaeili et al, [182]. Quinze composants représentant 80.1 % de la biotransformation du thymol pendant 10 jours ont été identifiés, dont le toluène (43.4 %), le 3-méthylcyclohexanol (9.0 %), le p-xylène (6.3 %) et le menthol (4.8 %) se sont avérés être les principaux constituants. Ainsi la biotransformation du thymol donne six hydrocarbures aromatiques (57.5 %), sept monoterpènes oxygénés (12.6 %) et deux hydrocarbures oxygénés (9.8 %). Deux composants ont été identifiés dans les 5 jours suivant la conversion du thymol, représentant 36.7 % de la composition totale. Le 3-méthylcyclohexanol et le pentanol étaient les principaux composants de cette bioconversion. Ainsi, le 3-méthylcyclohexanol (89.0 %) a été identifié dans la biotransformation (10 jours). Par conséquent, le composant principal dans cette transformation à 5, 10 et 15 jours était le 3-méthylcyclohexanol (2.9 % ; 9.0 % et 89.0 % respectivement). Comme on peut le voir à partir des informations ci-dessus, la biotransformation du thymol était une réaction d'oxydation [182].

- 2) La biotransformation du thymol décrit par L. Balcerzak et al, [141] a été effectuée par *Synechococcus Sp.* MCCS 034, mais avec une efficacité très faible (rendement de 1.5 %), et dans ce cas la thymoquinone a été rapportée comme produit d'oxydation. Cette

biotransformation a été largement étudiée par Rasoul-Amini et al, [183] qui ont supposé que le thymol fût toxique pour *Synechococcus Sp.* ou qu'il était difficilement converti en produits correspondants (similaires).

- 3) Une étude réalisée par Manuel A. Numpaque et al, [184] montre que le thymol a été métabolisé en faible proportion par les champignons phytopathogènes *Colletotrichum acutatum* et *Botryodiplodia theobromae* en plusieurs composés, dont la thymoquinone, la thymohydroquinone, l'acétate de thymyle et l'éther méthylique de thymyle. Cette transformation affecte les exigences structurales du thymol liées à son activité antimicrobienne et à son mode (mécanisme) d'action.
- 4) Le thymol a été transformé avec un taux de 14 % par *Streptomyces humidus* Tu-1 pour donner le (1R,2S) et le (1R,2R) -2-hydroxy-3-p-menthen-5-one comme produits principaux [140, 148]. D'autre part, chez *Pseudomonas*, le thymol a été biotransformé en 6-hydroxy-, 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 7,9-dihydroxythymol, acide thymol-7-oïque et acide thymol-9-oïque [140, 185].
- 5) Le thymol a également été glucosylé par la glycosyl-transférase des cellules cultivées d'*Eucalyptus perriniana* en glucoside (3 %) et en gentiobioside (87 %) [140, 186].

La figure 16 regroupe les principales voies de biotransformation du thymol par ces différents microorganismes.

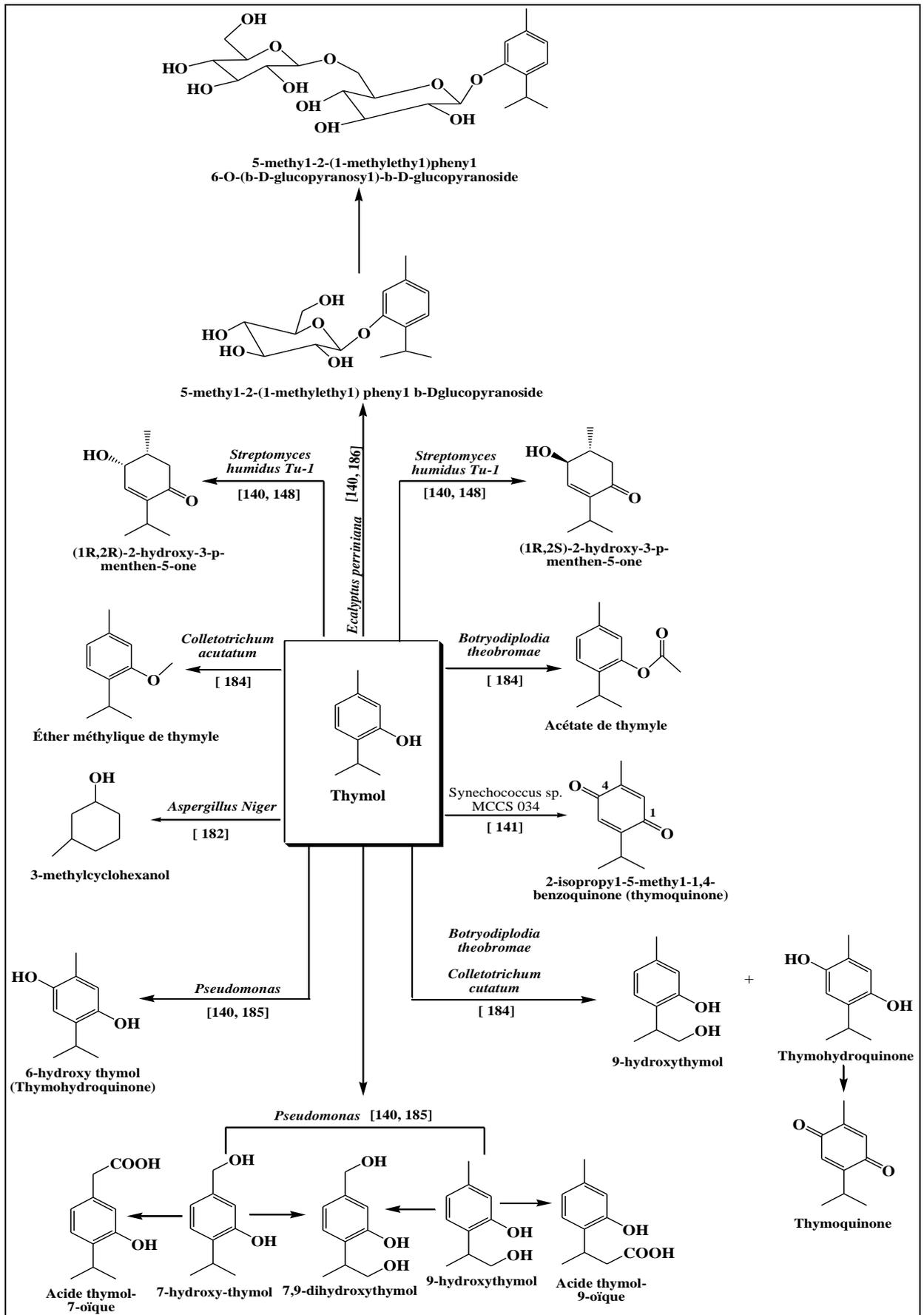


Figure 16 : Principales voies de biotransformation du thymol par différents microorganismes

2.4.3. Biotransformation du cymène

2.4.3.1. Description chimique et utilisation du cymène

Le p-cymène (1-méthyl-4-(1-méthyléthyl) benzène C₁₀H₁₄) est abondant dans la nature, c'est un composant organique aromatique naturellement présent dans nombreuses huiles essentielles telles que celles obtenues à partir de l'origan ou du cumin noir (*Nigella sativa*). De la famille des monoterpènes, sa structure est celle d'un cycle benzénique *para*-substitué par un groupe méthyle et un groupe isopropyle. Le p-cymène est l'analogue aromatique du p-menthane. Il est inaltérable à l'air, insoluble dans l'eau, mais miscible en toutes proportions dans l'éthanol et l'éther [187, 188].

Le p-cymène existe aussi sous deux autres formes, o-cymène lorsque les groupes alkyle sont en position ortho sur le cycle benzénique, et m-cymène lorsqu'ils sont en position méta, mais seul l'isomère *para* est présent dans la nature.

2.4.3.2. Biotransformation microbienne du cymène par différents microorganismes

Plusieurs études de transformation microbienne avec le p-cymène comme substrat ont été réalisées précédemment en utilisant *E.coli* et *Pseudomonas spp.* Plusieurs métabolites ont été produits, notamment l'alcool cumique, l'acide cumique, l'acide 3-hydroxycumique, l'acide 2,3 dihydroxycumique, l'acide 2-oxo-4-méthylpentanoïque, le 9- hydroxy-p cymène et l'acide p-cymène-9-oïque [189].

1) Plus de 30 bactéries, champignons et levures ont été évalués pour leur capacité de biotransformation du p-cymène afin d'obtenir de nouveaux métabolites [189]. Au cours de la période de biotransformation microbienne de 14 jours, 16 métabolites différents ont été détectés par les méthodes CCM et CG/SM. Le p-cymène-8-ol et l'alcool cumique ont été caractérisés comme les métabolites initiaux par *Phanerochaete chrysosporium* (Figure 17).

Les métabolites de *Penicillium claviforme* ont été identifiés comme étant le 3-méthyl phénol, le 2-méthyl phénol, l'alcool phényléthylique, le 3-hydroxybenzaldéhyde, le 4-hydroxybenzaldéhyde, l'alcool 3-hydroxybenzyle (Figure 18) [189].

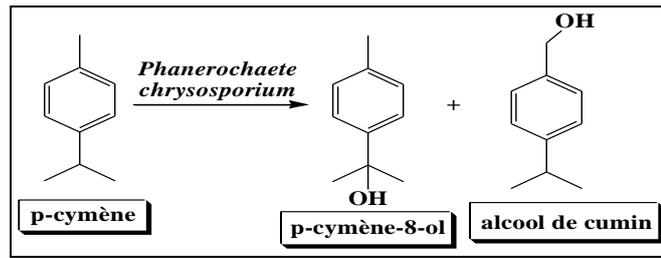


Figure 17 : Biotransformation du p-cymène en utilisant *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 [189]

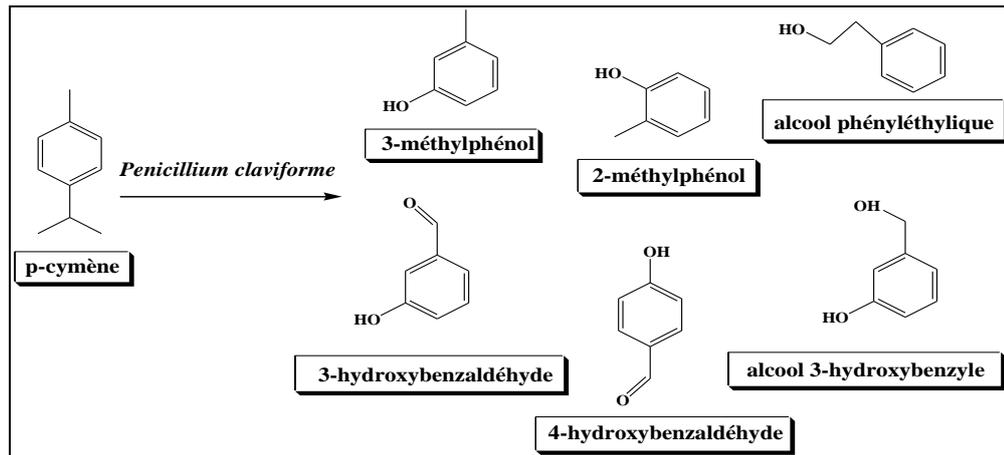


Figure 18 : Biotransformation du p-cymène en utilisant *Penicillium claviforme* MR376[189]

- 2) La souche *Pseudomonas sp.* (PL) a été cultivée avec du p-cymène comme seule source de carbone pour donner l'alcool cumylique, l'acide cumylique, l'acide 3-hydroxycumylique, l'acide 2,3-dihydroxycumylique, l'acide 2-oxo-4-méthylpentanoïque, 9-hydroxy-p-cymène et l'acide p-cymène-9-oïque, comme le montre la figure 19 [140, 190].

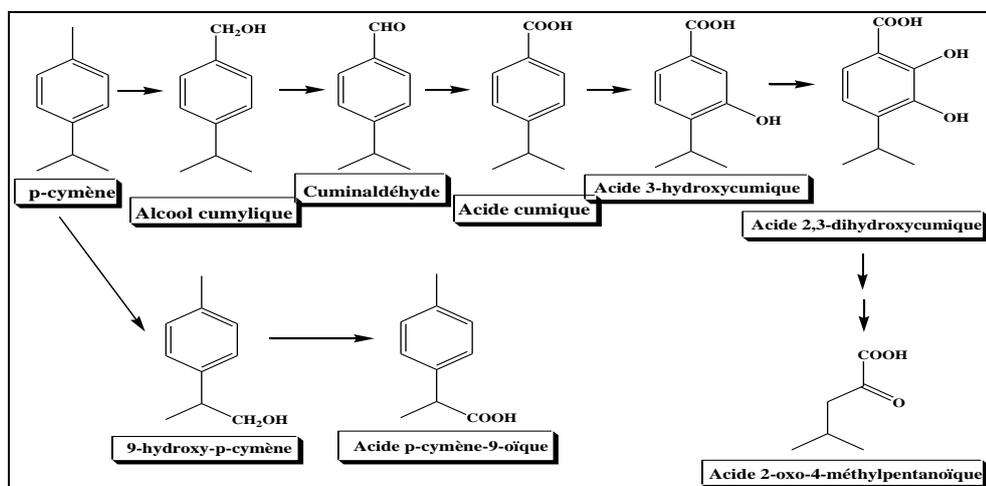


Figure 19 : Biotransformation du p-cymène par la souche *Pseudomonas sp.* (PL) [140, 190]

- 3) Récemment, il a été décrit une souche de *Pseudomonas* du sol, *Pseudomonas sp.*, capable de métaboliser le p-cymène, L'acide cumique peut également être produit [191]. D'autre part, le p-cymène a été converti de manière régiospécifique en acide cumique par *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas desmolytica*, et *Nocardia salmonicolor* (Figure 20) [140, 190].

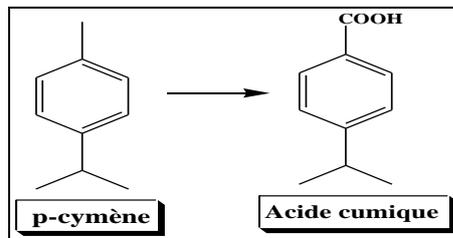


Figure 20 : Biotransformation du p-cymène en acide cumique par *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas desmolytica* et *Nocardia salmonicolor* [140, 190, 191].

- 4) Le p-cymène a été converti en thymoquinone et en analogues, thymol et 6-hydroxythymol, par divers types de microorganismes (Figure 21) [140, 192].

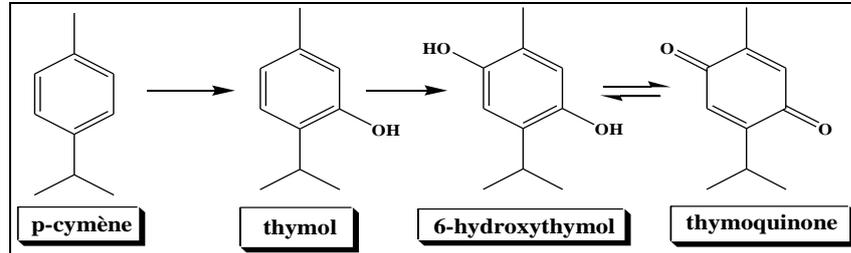


Figure 21 : Biotransformation du p-cymène en thymoquinone et analogues par divers microorganismes [140, 192].

PARTIE II

ETUDE

EXPERIMENTALE

Notre travail de recherche a été réalisé au niveau du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Blida 1.

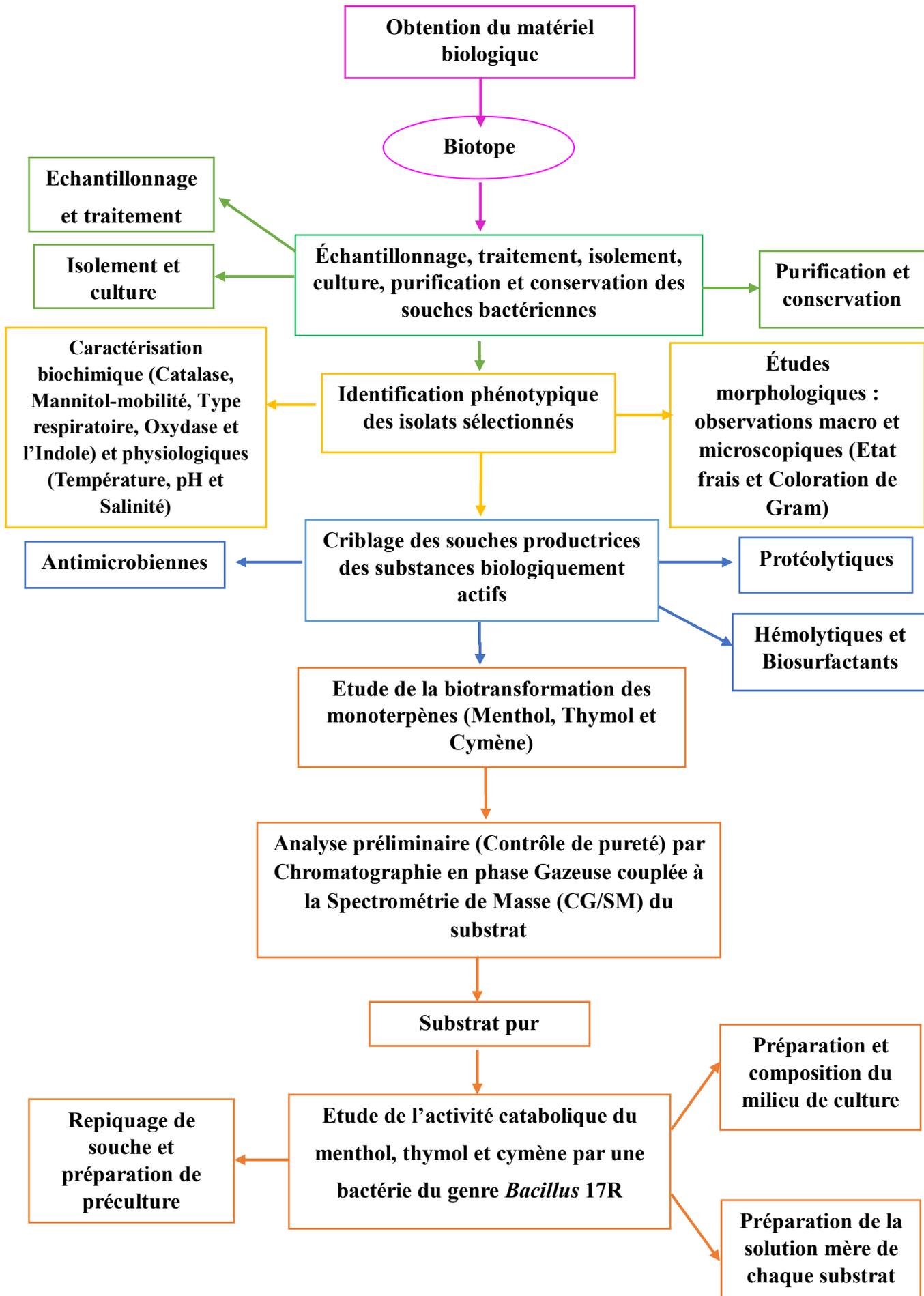
L'étude expérimentale est consacrée au screening bactérien et la valorisation biotechnologique des souches microbiennes isolées de l'algue rouge *Asparagopsis armata* : biotransformation et production de métabolites d'intérêts bioactif et environnemental.

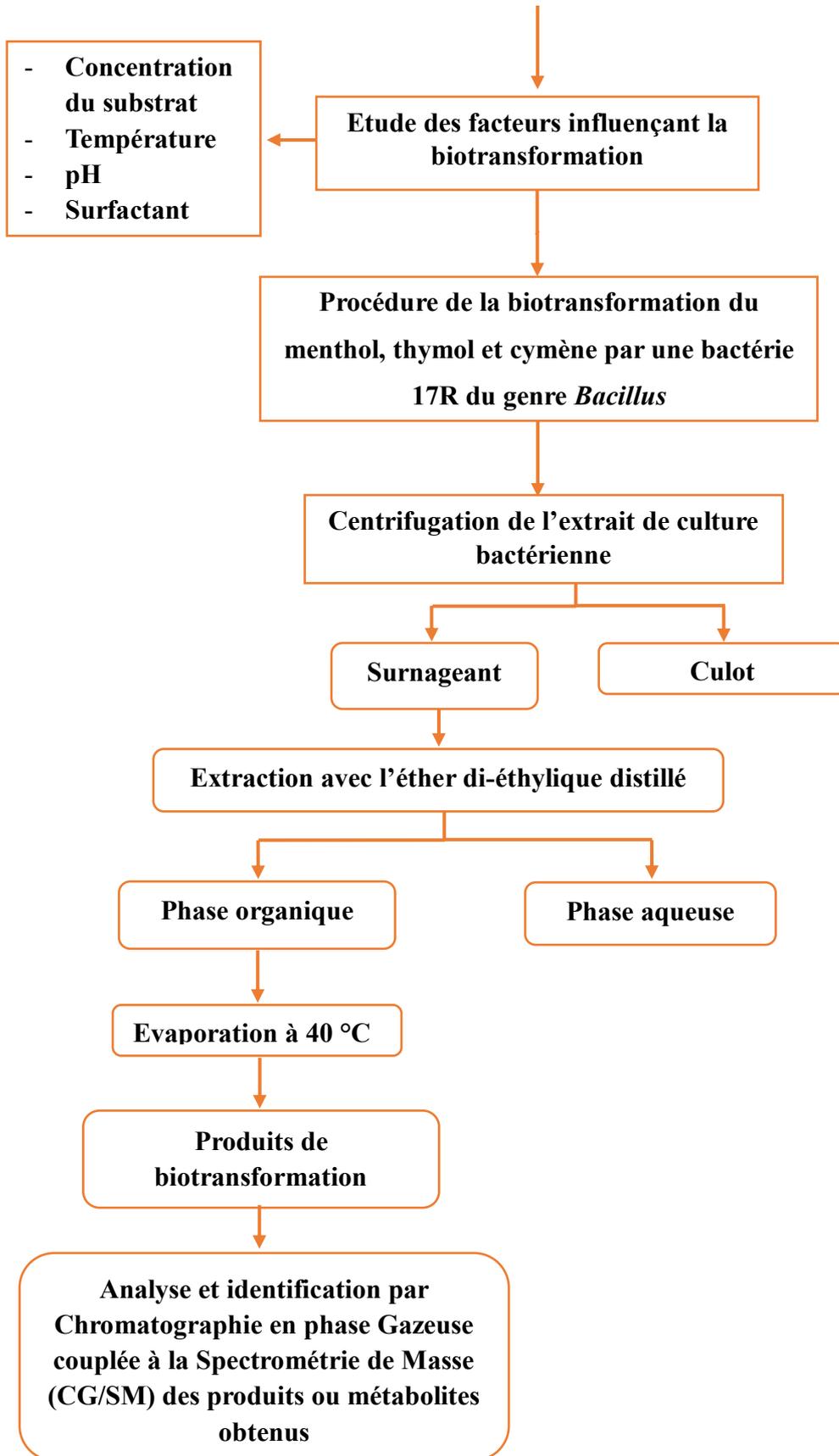
La partie matériels et méthodes explique la méthodologie du travail expérimental, elle comprend les trois grandes sections suivantes et dont le plan expérimental est détaillé ci-dessous.

- La première a été consacrée à l'isolement et la caractérisation de la communauté bactérienne de l'algue rouge *Asparagopsis armata* ;
- La deuxième a été réservée à la valorisation des bactéries isolées à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata* dans la production des métabolites primaires et secondaires (Antimicrobiennes, Protéolytiques, Hémolytiques et Biosurfactants) d'intérêt bioactif et environnemental ;
- La troisième a été focalisée sur l'étude de la biotransformation des monoterpènes (Menthol, Thymol et Cymène) par une souche bactérienne d'*Asparagopsis armata*, 17R du genre *Bacillus*.

Les différentes sections expérimentales permettent être schématisés par l'organigramme ci-dessous.

Organigramme des expériences





2. MATERIEL ET METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

2.1. Obtention du matériel biologique

2.1.1. Localisation géographique et présentation du site de prélèvement

Les souches microbiennes (bactéries) ont été isolées le 14 mai 2017, à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata*, collectée sur la côte méditerranéenne algériennes, au niveau du complexe touristique la « Corne d'Or » à l'Est de Tipaza (coordonnées GPS : 2°39' 00 " Est, 36°37' 12 " Nord).

2.2. Échantillonnage, traitement, isolement, culture, purification et conservation des souches bactériennes

2.2.1. Procédure d'échantillonnage et traitement

Les échantillons d'algues récoltés sont obligatoirement transférés dans des bouteilles ou des flacons stériles, hermétiquement fermés, contenant de l'eau de mer et stockés dans l'obscurité à la température ambiante de l'eau de mer dans une glacière (2 à 16 °C selon le mois d'échantillonnage). Les échantillons ont été transportés au laboratoire et traités immédiatement après leur prélèvement [193, 194].

Dans les 3 heures qui ont suivi le prélèvement, les spécimens d'algues ont été traités par deux méthodes afin de mieux différencier entre les souches bactériennes épiphytes et endophytes. Afin d'isoler les souches bactériennes épiphytes, les échantillons d'algues ont été initialement lavés 3 fois avec de l'eau de mer stérilisée avec un filtre de 0.22 µm pour éliminer les microorganismes faiblement attachés à la surface d'algue, puis rincés une fois avec la solution tampon phosphate salin afin de faciliter l'élimination de l'eau de mer avant l'étape d'isolement. De même, pour les souches bactériennes endophytes, les thalles pré-rincés avec l'eau de mer ont été soumis à une stérilisation de surface avec 70 % éthanol pendant 15 secondes, puis lavés à nouveau avec l'eau de mer stérile et rincés avec une solution de tampon phosphate salin [193-195].

Pour préparer 1 L de la solution tampon phosphate salin, il faut dissoudre NaCl (8 g), KCl (0.2 g), Na₂HPO₄ (1.44 g), KH₂PO₄ (0.24 g) dans 800 mL d'eau distillée ensuite ajuster le pH à 7.2 et compléter le volume à 1L avec l'eau distillée [26].

2.2.2. Isolement et culture des souches bactériennes d'*Asparagopsis armata*

Plusieurs protocoles d'isolement de microorganismes à partir d'algues marines ont été réalisés en utilisant le VNSS comme milieu sélectif aux bactéries marines. Ce milieu a été utilisé exclusivement pour l'isolement et la purification des souches bactériennes d'*Asparagopsis armata*. Avant l'autoclavage (121 °C pendant 20 min), le pH du milieu a été ajusté à 7.2 en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (1N) [196, 197, 198].

- **Milieu VNSS**

Le milieu VNSS (*Väätänen Nine Salt Solution*) est considéré comme un milieu relativement pauvre par rapport à d'autres milieux couramment utilisés pour la culture des bactéries marines. Il est composé de NSS (*Nine-Salt Solution*), neuf sels solubilisés dans 1 L d'eau distillée : NaCl (17.60 g), Na₂SO₄ (1.47 g), NaHCO₃ (0.08 g), KCl (0.25 g), KBr (0.04 g), MgCl₂.6H₂O (1.87 g), CaCl₂.2H₂O (0.41 g), SrCl₂.6H₂O (0.01 g) et H₃BO₃ (0.01 g). D'autres ingrédients sont ajoutés au NSS avant stérilisation, il s'agit de : peptone (1.00 g), extrait de levure (0.50 g), glucose (0.50 g), amidon soluble (0.50 g), FeSO₄.7H₂O (0.01 g) et Na₂HPO₄ (0.01 g). Le milieu VNSS agar est constitué à partir du milieu VNSS liquide auquel est ajouté 1.5 % (p/v) d'agar bactériologique [26].

Trois méthodes d'isolement ont été utilisées afin de récupérer le maximum d'espèces ou flore bactérienne associées à l'algue :

- La première méthode, principalement destinée à l'isolement des bactéries épiphytes, consiste à frotter vigoureusement la surface de quelques thalles, pré-rincés une fois avec la solution tampon phosphate salin, à l'aide d'un écouvillon stérile. Ce dernier a été ensuite utilisé pour inoculer directement les boîtes de Petri contenant le milieu de culture solide de VNSS et incubé à 30 °C [195].
- La deuxième méthode consiste à découper des morceaux carrés d'environ 1 cm² des thalles d'algues et à les déposer directement sur la surface du milieu d'isolement VNSS et incubées à 30 °C [196, 199].
- La troisième méthode, repose sur le découpage des thalles d'algues en petits morceaux carrés, puis placés dans des tubes à essai contenant de l'eau de mer filtrée

et stérilisée. Ils ont ensuite été soumis à une agitation vigoureuse par vortex, pour permettre de récupérer le maximum de souches bactériennes. 100 µL de la suspension de l'algue obtenue après filtration, ainsi que les dilutions décimales préalablement préparées (10^{-1} à 10^{-5}) ont été étalées, à l'aide d'un râteau, sur les milieux de culture solide VNSS. Les boîtes ainsiensemencées ont été mises en incubation à 30 °C jusqu'à ce que des colonies bactériennes soient visibles [196, 200, 201].

2.2.3. Purification et conservation des isolats

Les Unités Formant Colonies (UFC) ont été discriminées et sélectionnées à partir d'une étude macromorphologique (forme, taille, couleur, opacité, aspect de surface et de contour), au fur et à mesure de leur apparition, pour êtreensemencées individuellement sur VNSS-agar afin d'obtenir des cultures bactériennes bien séparées. Les colonies ainsi isolées ont ensuite fait l'objet de repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à purification. Tous les isolats bactériens purs ont été codés puis conservés à court et à long terme.

Conservation à court terme : La conservation à courte durée consiste àensemencer les souches bactériennes marines isolées sur le milieu VNSS coulé en pente (incliné) dans des tubes à essais. Ces derniers sont incubés à 30 °C pendant 24 heures puis conservés à +4 °C.

Conservation à long terme : Une suspension bactérienne en phase exponentielle est mélangée au glycérol stérile à raison de 30 % afin d'empêcher la rupture des membranes cellulaires. Le mélange (glycérol/suspensions bactériennes) est homogénéisé au vortex. Ensuite, il est conservé dans des cryotubes à une température de -80 °C [202].

2.3. Caractérisation préliminaire des souches bactériennes isolées d'*Asparagopsis armata*

2.3.1. Identification phénotypique des isolats sélectionnés

L'identification des isolats bactériens a été réalisée par des études morphologiques et physiologiques basées sur des observations macro et microscopiques et des tests biochimiques [203, 204].

2.3.1.1. Etude morphologique, biochimique et métabolique

2.3.1.1.1. Caractérisation morphologique des isolats bactériens

L'étude morphologique des bactéries est toujours une étape importante qui permet une orientation préliminaire pour l'identification. Elle est basée sur des observations macro et microscopiques.

- **Aspect macroscopique**

L'observation des colonies peut présenter un grand intérêt taxonomique lorsque les cultures sont réalisées sur des milieux spécifiques révélant certains caractères propres aux espèces. La forme, la taille, l'élévation, l'opacité, la surface et la couleur de la colonie ont été observées dans des boîtes de culture incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures avec la gélose *Luria-Bertani* (LB) utilisée comme milieu nutritif [205, 206]. C'est une description directe faite sur boîtes d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres afin de les purifier.

- **Aspect microscopique**

L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques des bactéries (leur mode d'association et aussi leur mobilité). Elle repose sur une observation globale intégrant à la fois : l'observation à l'état frais et l'observation après fixation (coloration de GRAM).

- **Examen à l'état frais**

L'observation microscopique à l'état frais a été réalisée sur des cultures jeunes des isolats sélectionnés qui permet de déterminer la morphologie des bactéries (forme, mode de regroupement, densité et mobilité). Cette préparation consiste à examiner les microorganismes vivants entre lame et lamelle. A partir des cultures bactériennes en milieux liquides ou des suspensions réalisées dans de l'eau distillée à partir des colonies ayant poussées sur des milieux solides, un prélèvement de 10 µL de chaque suspension bactérienne est déposée au centre de la lame, puis déposer une lamelle au-dessous en évitant de créer les bulles d'air. L'observation se fait directement par microscope optique avec un grossissement ($\times 40$ et $\times 100$) [203, 206].

- **Coloration de Gram (Réaction de Gram)**

La coloration de Gram a été nommée d'après le bactériologiste Danois Hans Christian Gram qui a développé le protocole en 1884 [203, 207]. Elle a été réalisée selon le protocole standard couramment utilisé en microbiologie, en respectant les étapes avec des cultures fraîches. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer [207, 208]. On a pris des lames de verre propres et sèches sur lesquelles on a fait des frottis de suspensions bactériennes diluées. Ces lames étalées ont été fixées par la chaleur. Une fois refroidi, chaque lame a été traitée avec une solution de cristal violet (violet de gentiane) et maintenue pendant 1 minute. Ensuite, les lames ont été lavées avec de l'eau distillée. Les lames ont ensuite été inondées avec la solution d'iode de Gram (Lugol), maintenues pendant 1 minute, puis lavées à nouveau avec de l'eau distillée. Ensuite, 1 à 2 gouttes de décolorant de Gram (Alcool 95 %) ont été déposées sur les frottis et maintenues pendant 30 secondes, puis lavées correctement avec de l'eau distillée. Ensuite, la contre-coloration, c'est-à-dire la safranine (fuchsine) a été appliquée sur les frottis et maintenue pendant 1 minute, puis lavée à nouveau avec de l'eau distillée. Les lames ont ensuite été séchées à l'air et observées au microscope optique avec un objectif ($\times 40$ et $\times 100$). Les cellules ont été identifiées comme étant Gram-positives si elles conservaient la couleur violette du cristal violet de gentiane après le lavage à l'alcool ou Gram-négatives si elles apparaissaient roses en conservant la couleur de la safranine (fuchsine) [203, 205, 209]. La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif.

2.3.1.1.2. Caractérisation biochimique et métabolique

L'étude biochimique nous oriente vers le processus métabolique suivi par les microorganismes étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. L'étude de la catalase, l'oxydase, l'indole, la mobilité et le type respiratoire a été réalisée selon des protocoles standards appliqués sur des cultures bactériennes préparées.

• **Test de catalase**

L'enzyme catalase assure la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et

en eau selon la réaction suivante : $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$

La présence de l'enzyme dans un isolat bactérien est évidente lorsqu'une petite quantité d'inoculum est introduit dans le peroxyde d'hydrogène, et que l'élaboration rapide de bulles d'oxygène se produit. L'absence de catalase est mise en évidence par une absence ou une faible production de bulles. La culture ne doit pas avoir plus de 24 heures. La recherche de cette enzyme a été effectuée en mettant en contact une colonie bactérienne avec une goutte de 10 volumes de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) [203, 206].

- **Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

Ce test permet à la fois d'étudier la dégradation du mannitol qui est un produit de l'hydrolyse du mannose et de déterminer la mobilité. Des cultures fraîches ont été prélevées et inoculées dans le milieu semi-solide mannitol-mobilité (rouge) par piqure centrale à l'aide d'un fil droit ou pipette pasteur, puis incubé à 30 °C pendant 24 heures. Après incubation, la mobilité des cultures a été vérifiée. Si les cultures ont montré une croissance le long de la ligne d'inoculation, alors les souches sont non mobiles et si elles se répandent sur tout le milieu, alors les souches sont mobiles [203, 205]. La fermentation du mannitol produit de l'acidité dans le milieu. Le rouge de phénol est un indicateur de pH qui détecte l'acidité en présentant un changement de couleur visible du rouge au jaune puis à l'orange [203].

- **Étude du type respiratoire**

La mise en évidence du type respiratoire des souches est réalisée selon le protocole de Guiraud (1998) [210], sur un milieu gélosé viande-foie (VF) coulés dans des tubes fins et profonds dans lesquels l'oxygène n'est présent qu'en surface et sur une zone étroite de 1 cm. L'ensemencement de la souche est effectué à l'aide d'une pipette pasteur qui est plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemercer uniformément le milieu. Après incubation des milieux à 30 °C pendant 24 heures, 4 types respiratoires peuvent être distingués :

- Croissance en surface : bactéries aérobies strictes.
- Croissance en profondeur : bactéries anaérobies strictes.
- Croissance le long du tube : bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- Croissance dans la partie supérieure proche de la surface : bactéries microaérophiles.

- **Recherche de l'oxydase**

Le test de l'oxydase est utilisé pour identifier les bactéries qui produisent la cytochrome C oxydase ou la phénylène-diamine-oxydase, une enzyme de la chaîne de transport des électrons bactérienne entrant dans divers couples d'oxydo-réduction. Pour réaliser le test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-diméthyl para nitro phénylène-diamine, préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile, a été déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. Le changement de couleur a été observé après 10 secondes. Si la couleur passait du blanc au violet, le résultat était considéré comme positif et s'il n'y avait pas de changement de couleur, le résultat était considéré comme négatif [205, 206].

- **Test de l'indole**

La production de l'indole est mise en évidence sur une eau peptonée, après ensemencement et incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Quelques gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu, après agitation, la présence d'indole se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge en surface [203].

2.3.1.2. Caractères physiologiques

La croissance de tous les isolats a été étudiée pour les trois paramètres suivants (Salinité, Température et pH), l'état frais a été utilisé pour le suivi des croissances (Croissance +, Croissance -).

- **Croissance a différentes températures**

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des isolats a été effectuée par incubation à différentes température (25, 30, 37 et 45 °C) des souches ensemencées sur gélose nutritive *Luria-Bertani* (LB) à 10 g/L (p/v) de NaCl et à pH= 7.2 pendant 48 heures [211].

- **Croissances à différents pH**

L'évaluation de la croissance des souches en fonctions du pH a été déterminée par la culture des souches sur gélose nutritive *Luria-Bertani* (LB) à 10 g/L (p/v) de NaCl ajusté à des pH (5 ; 5.5 ; 6 ; 6.5 ; 7 ; 7.5 ; 8 ; 8.5 ; 9, 9.5 et 10), l'incubation a été effectuée à 30 °C pendant 48 heures [211].

- **Tolérance à la salinité**

L'évaluation de la croissance des souches en fonction de la salinité a été déterminée par la culture des souches sur gélose nutritive *Luria-Bertani* (LB) à un pH = 7.2, contenant des concentrations en NaCl de (0, 1, 5, 7, 10, 15 et 20 g/L) (p/v) après incubation à 30 °C pendant 48 heures [211].

2.4. Mise au point d'une méthodologie de criblage des souches bactériennes isolées de l'algue rouge *Asparagopsis armata*, productrices des substances biologiquement actifs (Antimicrobiennes, Protéolytiques, Hémolytiques et Biosurfactants)

2.4.1. Criblage de l'activité antimicrobienne

Ce thème vise à rechercher de nouvelles activités antimicrobiennes chez des bactéries marines originales. La résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques augmente et le nombre de souches multirésistantes s'accroît, ce qui représente un grave problème de santé publique. La découverte de nouveaux antimicrobiens est donc primordiale. En criblant des bactéries particulières non encore explorées sur ces activités, nous espérons découvrir de nouveaux antimicrobiens avec des structures et des activités spécifiques.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles souches bactériennes productrices de métabolites antimicrobiens diffusibles [212], un criblage de vingt-cinq souches bactériennes isolées à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata* a été effectué. En s'inspirant des protocoles décrits dans la littérature, nous avons testé l'action des isolats bactériens ayant des cibles biologiques différentes sur un panel de microorganismes cibles, provenant du laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), comprenant neuf bactéries, cinq à Gram positif, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 49594), *Micrococcus luteus* (ATCC 14110) et *Bacillus cereus* (ATCC 14975), et quatre à Gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 23308), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25843) et *Salmonella enterica* (ATCC 14028), deux levures, *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) et un champignon *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

2.4.1.1. Test d'antagonisme par la méthode des Cylindres d'Agar

La mise en évidence des activités antimicrobiennes de vingt-cinq isolats bactériens a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar recommandée par Patel et Brown [213]. La méthode consiste à ensemencer un tapis bactérien de toutes les souches sur le milieu de criblage LB ou VNSS, coulés en boîte de Pétri puis incubés à 30 °C pendant 24 à 48 heures. Des cylindres d'agar de 9 mm de diamètre ont été ensuite prélevés quotidiennement et déposés à la surface des milieux de culture (*Mueller Hinton* pour les bactéries et les levures et *Sabouraud* pour les champignons) préalablement ensemencés avec les germes cibles [214, 215]. Des cylindres de milieu non ensemencés par les bactéries tests ont été utilisés en tant que témoins négatifs. Les boîtes ont été ensuite maintenues à 4 °C pendant 4 heures pour permettre une bonne diffusion des substances antimicrobiennes, puis elles ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C pour les bactéries et les levures, et 72 heures à 28 °C pour les champignons [215, 216]. Les zones d'inhibition claires formées autour des cylindres d'agar ont été considérées comme une indication de l'activité antimicrobienne. La lecture des résultats est effectuée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques [195, 204, 215].

2.4.1.2. Etude de la production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides de la souche 17R

Dans le but de déterminer le milieu de culture qui donne une meilleure production des métabolites antimicrobiens en un temps optimal, nous avons comparé cinq milieux de cultures différents à savoir LB, VNSS, GN, 333 et Bennett.

Les différents milieux de culture ont été préparés dans des erlenmeyers de volume 500 mL contenant chacun 100 mL de chaque milieu, le pH a été ajusté à 7,2. Une préculture de la souche bactérienne 17R a été préparée dans un erlenmeyer de 100 mL contenant 30 mL du milieu LB et incubée à 30 °C pendant 24 à 48 heures, sous une agitation de 150 rpm. Un volume de 3 mL de la préculture a été utilisé pour inoculer 100 mL des différents milieux de cultures (LB, VNSS, GN, 333 et Bennett). Les cultures ont été ensuite incubées dans un incubateur agitateur de 150 rpm à 30 °C pendant 7 jours. Des prélèvements ont été effectués en cours de fermentation toutes les 24 heures afin de réaliser la cinétique de production [213, 215].

Les cultures prélevées ont été centrifugées à l'aide d'une centrifugeuse de type Sigma 3-16 KL à 4500 tour/min pendant 30 minutes afin de récupérer le surnageant de culture nécessaire pour la réalisation des activités antimicrobiennes. L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la méthode des puits contre *Listeria monocytogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* qui consiste à déposer 50 µL du surnageant de culture par puits sur des boîtes du milieu *Mueller-Hinton* préalablement ensemencées par les souches indicatrices, les boîtes ont été maintenues à 4 °C pendant 4 heures pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles, après diffusion, les boîtes ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. La lecture des résultats a été faite par mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques (puits).

2.4.2. Criblage de l'activité protéolytique

Les protéases représentent plus de 60 % de toutes les enzymes industrielles dans le monde. Dans la société moderne, les protéases sont largement utilisées dans l'industrie des détergents, l'industrie du cuir, et pourraient également être utilisées pour des applications pharmaceutiques, comme les médicaments digestifs et les anti-inflammatoires [217, 218].

L'évaluation de l'activité protéolytique en milieu solide de vingt-cinq souches bactériennes nouvellement isolées à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata* a été effectuée en utilisant une méthode simple et pratique, largement utilisée dans les programmes de criblage des souches microbiennes productrices d'enzymes. Elle repose sur l'ensemencement des souches bactériennes sur gélose nutritive au lait écrémé (GNL). Le GNL est un milieu solide contenant un substrat protéique, notamment la caséine utilisée pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches bactériennes en hydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu [219, 220, 221], il se compose de 5 g peptone ; 3 g extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7.2 avec du NaOH ou HCL. Après stérilisation et refroidissement jusqu'à une température de 60 °C, 250 mL du lait écrémé sont ajoutés [221]. Après homogénéisation du milieu, il est coulé dans des boîtes de Pétri, utilisées pour détecter les activités protéolytiques extracellulaires. Après incubation à 30 °C, les boîtes de Pétri ensemencées sont examinées toutes les 24 heures. Ce test qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases sécrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les caséines du lait ce qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie

[203, 220, 221]. Le diamètre d'halo est proportionnel à la quantité d'enzymes libérées par la bactérie. Les rapports des diamètres du halo par rapport aux diamètres des colonies (dh/dc) permettent un classement préliminaire des souches isolées [203]. L'étalement sur GNL a permis de sélectionner les bactéries productrices des protéases.

2.4.3. Recherche de l'activité hémolytique et des substances tensioactives

2.4.3.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants

Les isolats obtenus ont été criblés en utilisant le milieu minéral MM complété par des sources de carbone et d'énergie (substrat hydrophobe induisant la production de biosurfactant.). Ce milieu est à base des sels minéraux, sa composition (g/L) : NH₄Cl (0.4), K₂HPO₄ (0.3), KH₂PO₄ (0.3), NaCl (10), MgCl₂ (0.33), CaCl₂ (0.05), extrait de levure (0.1) et 1 mL d'une solution contenant des oligo-éléments préparés dans 1L d'eau distillée (0.64 g CuSO₄.5H₂O, 0.11 g FeSO₄.7H₂O, 0.79 g MnCl₂.4H₂O et 0.15 g ZnSO₄.7H₂O). Le pH du milieu a été ajusté à 7.2 et le milieu stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes [222, 223].

Quatre sources de carbone (1 %, v : v) ont été utilisées après leur stérilisation sur un filtre de 0,22 µm : l'huile d'olive, l'huile de table, la margine et le pétrole brut.

Les expériences ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant un volume final de 50 mL renfermant un milieu MM et 1 % (v : v) de la source de carbone. Le milieu a été inoculé avec 2 % (v : v) d'une préculture de 24 heures et incubé à 30 °C sous une agitation de 150 rpm [222, 223].

Le bouillon de culture a ensuite été testé pour la production de biosurfactants extracellulaires par les tests de l'activité hémolytique et de détermination du déplacement d'huile [224]. Les résultats permettront de sélectionner la source de carbone et la souche performante pour une production optimale de biosurfactants.

Les protocoles appliqués sont détaillés comme suit :

2.4.3.1.1. Test de l'activité hémolytique

L'activité hémolytique a été déterminée sur milieu LB ou GN solide additionné de sang humain (5 %) selon le protocole décrit par Arimi et al [223, 225]. Les souches ont été

repiquées sur ce milieu. Le milieu de culture a été incubé à 30 °C pendant 24 heures. Ensuite, Il a été examiné par l'apparition d'une zone transparente autour des colonies (test visuel) [205, 223].

2.4.3.1.2. Test de déplacement d'huile

La méthode décrite ci-dessous a été basée sur celle déjà donnée par Morikawa et al. [226] avec quelques modifications. Dans une boîte de Pétri (90 mm de diamètre) contenant 10 mL d'eau distillée, un volume de 100 µL de pétrole brut est étalé sur toute la surface de l'eau distillée, une fine couche d'huile se forme immédiatement. Par la suite, 10 µL du surnageant de culture ont été légèrement déposés au centre du film de pétrole (la couche d'huile), entraînant la formation d'un halo clair. Le diamètre ou l'aire du cercle ainsi formé a été mesuré en cm après 30 secondes. Plus le diamètre est large, plus la production en biosurfactant est importante [205, 222, 226].

2.5. Contribution à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche bactérienne 17R d'*Asparagopsis armata*

2.5.1. Introduction

Une attention particulière doit être accordée aux potentialités des microorganismes marins, non seulement pour l'obtention des substances biologiquement actifs (Antimicrobiennes, Protéolytiques, Hémolytiques et Biosurfactants), mais aussi pour la biotransformation technologique (Bioconversion).

L'objectif principal de cette section était d'étudier la biotransformation du menthol, thymol et cymène en d'autres métabolites secondaires en utilisant une souche bactérienne 17R du genre *Bacillus*, nouvellement isolée des niches écologiques de l'Algérie à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata*.

La méthodologie adoptée s'articule autour des cinq grandes parties suivantes :

- Analyses préliminaires des trois monoterpènes (Menthol, Thymol et Cymène) par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) ;
- Etude de l'activité catabolique du menthol, thymol et cymène par une bactérie 17R du genre *Bacillus* ;
- Etude des facteurs influençant la biotransformation (Concentration de substrat, Température, pH et Surfactant chimique) ;
- Etude de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche bactérienne 17R ;
- Analyse et identification par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) des produits ou métabolites obtenus.

2.5.2. Analyses préliminaires des trois monoterpènes par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

L'analyse qualitative des substrats a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » afin d'évaluer la pureté chimique des métabolites étudiés.

L'analyse CG/SM a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse SHIMADZU Nexis GC- 2030 couplé à un spectromètre de masse GCMS-QP2020 NX avec une colonne capillaire en silice fondue (Rxi-5MS 30 m x 0,25 mmID x 0,25 µm). La température du four du chromatographe en phase gazeuse a été maintenue à 100 °C, suivie d'une augmentation progressive de la température à la vitesse de 5 °C/min jusqu'à atteindre une température de 220 °C. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient fixées à 250 °C. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur et a été ajusté à une vitesse d'écoulement linéaire de 5 ml/min, avec un rapport de division de 1/90. Le détecteur sélectif de masse a fonctionné en mode ionisation électronique (EI), avec une température de la source d'ions de 230 °C, une énergie d'ionisation de 70 eV et une gamme de masse de m/z 40-500 [227-229]. Un volume d'échantillon dilué dans l'acétate d'éthyle a été injecté. Les composés ont été identifiés en se basant sur les banques de données spectrales (W11N17 (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, USA) ; Nist 02 ; FFNSC et Mass Finder 3 (D.H. Hochmuth, www.massfinder.com), ainsi que sur les données de la littérature [230, 231].

2.5.3. Etude de l'activité catabolique du menthol, thymol et cymène par une bactérie 17R du genre *Bacillus*

2.5.3.1. Préparation et composition du milieu de culture

Le milieu de culture est un support qui permet la croissance des bactéries, champignons et levures. Il se compose d'un mélange de substances qui favorisent la multiplication des microorganismes. Il peut se présenter sous forme liquide ou solide, par addition d'agar (solidifiant). Le milieu doit assurer les conditions optimales pour le métabolisme bactérien :

- Contenir tous les aliments nécessaires en quantité suffisante et en proportion relative convenable, le milieu doit être nutritif et équilibré.
- Avoir des caractéristiques physicochimiques (pH, Température...) compatibles avec la vie microbienne.

Le choix de tels milieux repose sur la connaissance de l'habitat naturel et de la physiologie alimentaire du groupe de germes que l'on désire cultiver.

Le milieu LB (*Luria-Bertani*) est considéré comme un milieu nutritif utilisé pour la culture des bactéries et pour les procédés de biotransformation. Il est composé de : 5 g d'extrait de

levure, 10 g de peptone et 10 g de chlorure de sodium (NaCl). Concernant le LB solide, on ajoute 20 g Agar dans 1 L d'eau distillée.

Les constituants du milieu ont été pesés et dissous dans de l'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,2 avant autoclavage avec de la soude NaOH à (1N) et le HCl (1N). Le milieu a été réparti dans des erlenmeyer de 250 mL de volume total. Le volume utile sera toujours de 50 mL. La stérilisation du milieu a été effectuée par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

2.5.3.2. Repiquage de souche et préparation de préculture

a. Repiquage de souche

Le milieu de culture solide *Luria-Bertani* (LB) a été coulé aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 mL par boîte, puis laissés refroidir et solidifier sous la hotte. La souche bactérienne 17R a été ensemencé à l'aide d'une pipette pasteur sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB solide. Ces boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 48h. Le repiquage de la souche a été effectué régulièrement 24 h avant chaque préculture.

b. Préparation de préculture

Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture bactérienne de 24 heures et les introduire dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL du milieu LB liquide stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 min. L'incubation a été réalisée à 30 °C pendant 24 à 48 heures dans un agitateur rotatif à 150 rpm [229, 232].

2.5.3.3. Préparation de la solution mère de chaque substrat (menthol, thymol et cymène)

L'opération s'est effectuée dans des conditions aseptiques. Dans un flacon stérile contenant un volume bien déterminé d'eau distillée stérile, nous avons ajouté une quantité bien définie du substrat (Menthol, Thymol et Cymène) de façon à avoir une concentration égale à 20 mg /mL. Etant donné que les trois substrats sont non miscibles avec l'eau, nous avons ajouté une quantité de 1 % (v/v) de tween 80 à la solution mère en vue d'obtenir un mélange homogène

et pour faciliter la miscibilité [233]. La solution mère a été filtrée sous flamme, sur des microfiltres stériles de 0,22 µm de diamètre de pores.

2.5.4. Etude des facteurs influençant la biotransformation

2.5.4.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice du menthol, thymol et cymène pour la biotransformation

L'un des plus grands défis des processus de biotransformation consiste en une cytotoxicité élevée et une grande volatilité du substrat et du produit. L'optimisation des concentrations se fait dans le but de déterminer la gamme de concentration assimilable non inhibitrice du substrat utilisé dans la biotransformation, et par conséquent vérifier la tolérance de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'effet toxique du substrat.

2.5.4.1.1. Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition en milieu solide

Ce test consiste à déterminer l'effet inhibiteur des différentes concentrations du menthol, thymol et cymène à savoir 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 10, et 20 mg/mL préparées à partir de solution mère sur la souche bactérienne 17R.

Le principe de cette méthode consiste à déposer un disque de papier buvard (de 9 mm de diamètre) préalablement imprégné de l'échantillon sur un milieu solideensemencé avec l'inoculum bactérien. Les molécules actives diffusent à partir des disques formant une zone d'inhibition dans laquelle il n'y a pas eu de croissance, indique l'effet toxique du substrat à l'égard de la bactérie testée. Plus la zone d'inhibition est grande, plus la souche bactérienne est sensible au substrat. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [234].

La procédure générale de la détermination de la gamme des concentrations par le test d'inhibition comprend les étapes suivantes :

- **Préparation de l'inoculum (préculture)**

Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture bactérienne de 24-48 heures et les introduire dans des tubes à essais de 9 mL d'eau physiologique (9 g de NaCl dans 100 mL d'eau distillée)

stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, puis agiter au vortex pendant quelques secondes. L'eau physiologique sert comme un diluant des suspensions bactériennes.

- **Préparation du milieu de culture**

- Faire fondre le milieu solide LB dans un bain marie, régler à 95 °C ou dans un four microonde.
- Couler aseptiquement le milieu de culture dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 mL par boite.
- Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse.

- **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface du milieu solide, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie du milieu, pour s'assurer que toute la boite est bien ensemencée.

- **Séchage**

- Laisser sécher les boites de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante. Les couvercles des boites doivent être fermés.

- **Déposition des disques**

- Une fois les milieux sont solidifiés, prélever aseptiquement à l'aide d'une pince un disque buvard imprégné dans différentes concentrations du substrat, ensuite le déposer à la surface des milieux de culture préalablement coulés. Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- Laisser les boites pendant 4 heures à 4 °C pour permettre une bonne diffusion des produits étudiés.

- **Incubation**

- Incuber les boîtes de Pétri à 30 °C pendant 24-48 heures.

- **Lecture des résultats**

- La lecture des résultats a été faite à l'aide d'un lecteur de diamètre des zones d'inhibitions, plus le diamètre de zone d'inhibition est grand, plus la souche bactérienne est sensible au substrat et plus le diamètre de la zone est petit plus la souche est résistante.

2.5.4.1.2. Détermination de la concentration optimale du menthol, thymol et cymène en milieu liquide

Dans le test de dilution, une série de dilution du substrat a été introduite aseptiquement, ainsi que les contrôles de croissance positive et négative, dans différents tubes à essai. Chaque tube à essai a été ensuite inoculé avec une suspension bactérienne préalablement calibré à 10^7 UFC.mL⁻¹. Les tubes à essai ont été incubés à 30 °C pendant 48 heures dans un agitateur rotatif à 150 rpm.

La croissance de souche a été détectée par la biomasse et la densité optique à 600 nm et la CMI a été déterminée à l'œil nu après incubation en considérant la concentration minimale qui inhibe totalement la croissance de germe. Lorsque les substrats sont testés, la principale difficulté est due à leur faible solubilité dans l'eau. L'ajout de détergents (Tween 80) au milieu de croissance est inévitable.

2.5.4.2. Effet de la température sur la biotransformation

On sait que la température du milieu influe directement sur les réactions biologiques. L'influence de la température sur la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche bactérienne 17R, a été étudiée en incubant les cultures à différentes températures, avec une augmentation de 5 °C, entre 20 et 40 °C [235, 236, 237].

2.5.4.3. Effet du pH sur la croissance cellulaire

Pour déterminer l'influence du pH au cours de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche 17R, nous avons étudié la biotransformation dans le domaine de pH = 5 ; 5.5 ; 6 ; 6.5 ; 7 ; 7.5 ; 8 ; 8.5 ; 9 et 9.5 [235, 236].

2.5.4.4. Effet des surfactants (Tensioactifs)

Les tensioactifs ou agents de surface sont des composés qui modifient la tension superficielle entre deux surfaces.

Les effets du Tween 40, Tween 80 et Triton X, sur la biotransformation des monoterpènes étudiés ont été testés. Les détergents sont dissouts dans de l'eau distillée à raison de 1 % (v/v) [237, 238].

Les différents paramètres de la biotransformation ont été suivi par la croissance de la souche bactérienne 17R. La croissance a été contrôlée en mesurant la biomasse bactérienne et l'absorbance (densité optique à 600 nm).

2.5.5. Etude de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche bactérienne 17R

Pour ces expériences, une quantité bien définie (2 mL) de la suspension bactérienne de 24 à 48 heures a été inoculée et ajoutée à l'aide d'une pipette stérile ou micropipette à 50 mL du milieu de culture *Luria-Bertani* (LB) à pH= 8.5 et introduit dans un flacon de 250 mL. L'incubation a été réalisée à 30 °C pendant 2 jours dans un agitateur rotatif à 150 rpm. Après une courte incubation de 2 jours, une bonne croissance bactérienne de la souche 17R a eu lieu (Libération des enzymes). A cet effet, un volume connu d'une solution mère du substrat à une concentration de 20 mg/mL (préparée par dissolution d'une quantité bien définie de substrat dans un mélange Tween 80/eau à 1 %) a été ajouté dans des conditions stériles, pour obtenir un volume final de 50 mL à une concentration de 0,1 mg/mL de menthol ; 0,5 mg/mL de thymol et 0,25 mg/mL de cymène et la réaction de biotransformation a commencé. La solution mère a été stérilisée par filtration sur des filtres poreux stériles de 0,22 µm de diamètre. La culture est incubée de nouveau dans les mêmes conditions pendant 7 jours, une période au cours de laquelle la transformation a eu lieu. Le suivi de la cinétique de biotransformation est assuré en deux points (1^{ère} et 7^{ème} jours) [229, 239, 240].

Simultanément, une expérience de témoin chimique a été réalisée sans microorganismes en ajoutant le substrat directement dans le bouillon stérile à pH= 8.5 ; et un témoin biologique a été réalisée en ajoutant la souche avec le milieu de culture stérile à pH= 8.5 sans substrat et placés dans un agitateur rotatif à 30 °C/150 rpm pendant 7 jours [227, 228, 232].

2.5.6. Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne

La centrifugation de l'extrait de culture bactérienne obtenu après chaque jour d'incubation a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse de type Sigma 3-16 KL à 4500 tour/min pendant 45 min. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot sont obtenus [240].

2.5.7. Extraction liquide-liquide du surnageant obtenu

Le surnageant de culture a été récupéré par pipetage et extrait avec l'éther diéthylique (1:1 ; v/v par rapport au volume du surnageant). Deux phases sont obtenues : une phase organique et une phase aqueuse. La phase organique a ensuite été séchée sur du sulfate de sodium et concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif, et ainsi la masse de l'extrait brut obtenu a été déterminée pour chaque procédé. Cette opération a été répétée deux fois afin d'épuiser complètement les composés désirés [227, 232, 240].

2.5.8. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

L'analyse des produits obtenus a été effectuée en utilisant le même appareil (chromatographe en phase gazeuse SHIMADZU Nexis GC- 2030 couplé à un spectromètre de masse GCMS-QP2020 NX) et dans les mêmes conditions opératoires utilisé lors de l'analyse préliminaire du menthol, thymol et cymène [228, 229, 232, 240].

La caractérisation des différents composés ou métabolites issus de la biotransformation a été réalisée à partir des bases (banques) de données suivantes : W11N17 (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, USA) ; Nist 02 ; FFNSC et Mass Finder 3 (DB3) (D.H. Hochmuth, www.massfinder.com). L'identification a été réalisée en appliquant deux filtres, à savoir une correspondance de similarité spectrale supérieure à 85 % et une correspondance d'indice de rétention linéaire calculée à l'aide d'une série d'homologues de n-alcane saturés C7-C30 (1000 g/mL) fournie par Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne) avec une fenêtre de filtre de ± 10 unités d'IRL. Les valeurs de l'indice de rétention linéaire calculé ($L_{R\text{Ical}}$) ont été comparées à celles fournies par la littérature ($L_{R\text{ILit}}$). Une identification supplémentaire a été réalisée sur la base des spectres de masse rapportés dans la littérature spécialisée [230, 231].

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Isolements et purifications des souches bactériennes d'*Asparagopsis armata*

Des colonies à différents aspects morphologiques (macroscopique et microscopique) sont apparues (Figure 22), après une étape de purification, vingt-cinq souches de bactéries marines ont été obtenues, elles comprennent 9 souches du genre *Staphylococcus* et 16 souches du genre *Bacillus*.

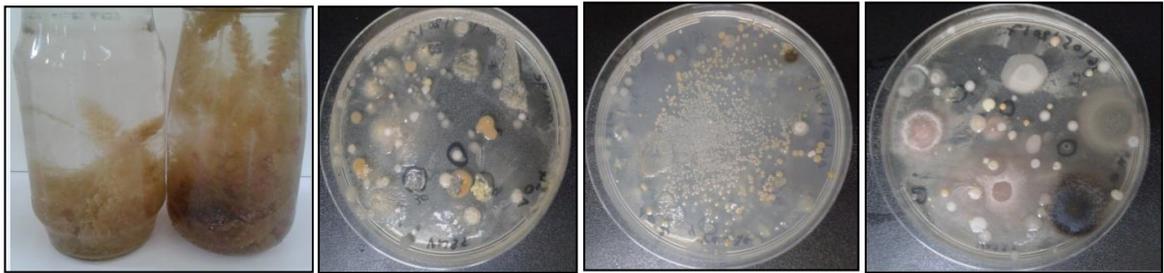


Figure 22 : Algue rouge *Asparagopsis armata* et ses bactéries associées

3.2. Classification préliminaire des souches bactériennes isolées

Afin de mettre en place une collection des souches bactériennes marines à fort potentiel biotechnologique, nous avons adopté une approche proposée dans cette partie de thèse. Elle permet d'offrir les informations d'orientation pour une étude taxonomique préliminaire des souches bactériennes isolées à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata* en utilisant des méthodes conventionnelles qui font appel aux caractères d'identification classique.

3.2.1. Taxonomie phénotypique des bactéries isolées

L'approche qui est proposée dans cette partie permet une étude taxonomique de plus en plus complète des souches bactériennes isolées de l'algue rouge *Asparagopsis armata* à l'aide des méthodes classiques qui utilisent des caractères d'identification classiques, ce qui permet une orientation préliminaire pour la caractérisation. Elle est réalisée sur la base d'observations macroscopiques via la détermination des caractéristiques morphologiques des souches.

L'analyse discriminante des différents caractères morphologiques observés est présentée dans le tableau 4. D'une manière générale, les colonies obtenues sont généralement rondes, rhizoïdes avec une couleur crème, jaune, orange, rouge et crevette. Leur consistance est

généralement crémeuse, visqueuse d'opacité translucide à opaque. Les constatations obtenues permettent de regrouper les différentes souches en quatre types :

- Le premier type présente des colonies crémeuses, de couleur blanc-crème : isolats 3R, 7R, 9R, 13R, 14R, 16R, 17R, 18R, 23R et 25R.
- Le deuxième type comprend des colonies blanc-crème, mais d'aspect visqueux : isolats 8R, 10R et 15R.
- Le troisième type montre des colonies opaques colorées en crevette, rouge, jaune et orange : isolats 1R, 2R, 6R, 20R, 21R et 22R (Aspect crémeux).
- Dans le quatrième type, se classent des souches de couleur crevette, jaune et orange plus ou moins transparentes (opacité translucide). C'est le cas des souches 4R, 5R, 11R, 12R, 19R et 24R (Aspect visqueux).

Cette étude macromorphologique primaire a été suivie par des analyses microscopiques qui ont permis une caractérisation complémentaire des différentes souches. L'ensemble des résultats obtenus (Tableau 5) nous ont permis de classer les isolats dans trois groupes micromorphologiques différents :

- ✓ Le premier rassemble les bactéries Gram positif, Coccis, Asporulés, Immobiles : isolats 1R, 2R, 4R, 5R, 6R, 12R, 20R, 21R et 22R.
- ✓ Le deuxième regroupe les bactéries Gram positif, *Bacilles*, Sporulés, Mobiles : isolats 3R, 7R, 8R, 9R, 13R, 14R, 15R, 16R, 17R, 18R, 23R et 25R.
- ✓ Le troisième comprend les bactéries Gram positif, *Bacilles*, Asporulés, Mobiles : isolats 10R, 11R, 19R et 24R.

En ce qui concerne les caractéristiques biochimiques et métaboliques, toutes les souches isolées sont catalases positives. Les souches 3R, 7R, 8R, 9R, 10R, 11R, 13R, 14R, 15R, 16R, 17R, 18R, 19R, 23R, 24R, 25R sont oxydases positives en changeant la couleur des disques du blanc au violet tandis que les autres souches sont oxydases négatives. L'étude du type respiratoire sur la gélose viande-foie a permis de révéler que toutes les souches sont des aéro-anaérobies facultatives. L'analyse des différents caractères morphologiques observés est présentée dans le tableau 6.

Tableau 4 : Caractérisation macromorphologique des souches bactériennes isolées d'*Asparagopsis armata*

Caractères Macroscopiques	1R	2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R	10R	11R	12R	
	Forme	Ronde	Ronde	Rhizoïde	Ronde	Ronde	Ronde	Rhizoïde	Ronde	Rhizoïde	Ronde	Ronde	Ronde
Couleur	Rouge	Orange	Crème	Orange	Crevette	Jaune	Crème	Crème	Crème	Crème	Jaune	Orange	
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Translucide	Translucide	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Translucide	Translucide	
Surface	Lisse	Lisse	Rugueuse	Lisse	Lisse	Lisse	Rugueuse	Lisse	Rugueuse	Lisse	Lisse	Lisse	
Contour	Régulier	Régulier	Irrégulier	Régulier	Régulier	Régulier	Irrégulier	Régulier	Irrégulier	Régulier	Régulier	Régulier	
Élévation	Bombée	Bombée	Semi bombée	Bombée	Bombée	Semi bombée	Semi bombée	Semi bombée	Semi bombée	Plate	Semi bombée	Bombée	
Consistance	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse	Visqueuse	Visqueuse	Crémeuse	Crémeuse	Visqueuse	Crémeuse	Visqueuse	Visqueuse	Visqueuse	
Caractères Macroscopiques	13R	14R	15R	16R	17R	18R	19R	20R	21R	22R	23R	24R	25R
	Rhizoïde	Rhizoïde	Ronde	Rhizoïde	Rhizoïde	Rhizoïde	Ronde	Ronde	Ronde	Ronde	Rhizoïde	Ronde	Rhizoïde
Couleur	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème	Crevette	Jaune	Crevette	Orange	Crème	Crevette	Crème
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Translucide	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Translucide	Opaque
Surface	Rugueuse	Rugueuse	Lisse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse	Rugueuse	Lisse	Rugueuse
Contour	Irrégulier	Irrégulier	Régulier	Irrégulier	Irrégulier	Irrégulier	Régulier	Régulier	Régulier	Régulier	Irrégulier	Régulier	Irrégulier
Élévation	Plate	Semi bombée	Plate	Semi bombée	Semi bombée	Semi bombée	Semi bombée	Plate	Plate	Semi bombée	Semi bombée	Semi bombée	Semi bombée
Consistance	Crémeuse	Crémeuse	Visqueuse	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse	Visqueuse	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse	Visqueuse	Crémeuse

Tableau 5 : Caractérisation micromorphologique des souches bactériennes isolées d'*Asparagopsis armata*

Caractères Microscopiques	1R	2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R	10R	11R	12R	
	Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forme	Cocci	Cocci	Bacille	Cocci	Cocci	Cocci	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Cocci	
Mobilité	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	
Sporulation	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
Arrangement	Amas	Amas	Isolés	Amas	Amas	Amas	Isolés	Isolés	Isolés	Isolés	Isolés	Amas	
Caractères Microscopiques	13R	14R	15R	16R	17R	18R	19R	20R	21R	22R	23R	24R	25R
	Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forme	Bacille	Cocci	Cocci	Cocci	Bacille	Bacille	Bacille						
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Sporulation	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
Arrangement	Isolés	Amas	Amas	Amas	Isolés	Isolés	Isolés						

+ : Représente un résultat positif. - : Représente un résultat négatif.

Tableau 6 : Caractérisation biochimique et métaboliques des souches bactériennes isolées d'*Asparagopsis armata*

Tests biochimiques	1R	2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R	10R	11R	12R	
	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	
Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	
Indole	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
Type respiratoire	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	
Tests biochimiques	13R	14R	15R	16R	17R	18R	19R	20R	21R	22R	23R	24R	25R
	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Mannitol	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Type respiratoire	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF

+ : Représente une réaction positive ; - : Représente une réaction négative ; **AAF** : Représente un type respiratoire aéro-anaérobie facultatif.

3.2.2. Etude physiologique des isolats

Le but de cette étude est de déterminer la température, le pH et la concentration en NaCl qui permettent une croissance optimale pour chaque souche. Les résultats de la caractérisation physiologique des isolats sont rassemblés dans le tableau 7.

La croissance à différentes températures a été suivie sur milieu *Luria-Bertani* (LB), après incubation pendant 48 heures à 25 °C, 30 °C, 37 °C et 45 °C. L'habilité à croître en présence de 0, 1, 5, 7, 10, 15 et 20 g/L de NaCl et à pH de 5 ; 5.5 ; 6 ; 6.5 ; 7 ; 7.5 ; 8 ; 8.5 ; 9, 9.5 et 10 a été observé sur le même milieu LB pendant 48 heures d'incubation.

A partir du tableau 7, on constate que dans la gamme de température explorée de 25 °C à 45 °C, 14 isolats tolèrent des variations de températures de 25 à 45 °C, par contre la majorité des souches en une croissance à 30 °C se sont des mésophiles. Ces souches présentent des croissances à une salinité intermédiaire allant de 7 à 15 g/L, tandis que l'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 5,0 et 10, ce sont des acido-alcalinophiles. Le pH optimal de croissance de beaucoup de bactéries est proche de la neutralité (pH= 7).

Tableau 7 : Caractères physiologiques (Salinité, Température et pH) de croissance des souches

	Isolats																								
	1R	2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R	10R	11R	12R													
Température	25-30 °C	+	-	++	+	+	-	+	+	+	+	+	+												
	30-37 °C	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++												
	37-45 °C	-	-	+	-	+	-	++	+	++	-	-	-												
pH	5-7	-	+	++	+	+	-	+	+	+	-	+	+												
	7-8	+	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++												
	8-10	-	-	+	-	-	+	++	+	++	-	-	+												
NaCl	0-7 g/L	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+												
	7-15 g/L	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++												
	15-20 g/L	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+												
	Isolats												13R	14R	15R	16R	17R	18R	19R	20R	21R	22R	23R	24R	25R
	Température	25-30 °C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30-37 °C		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
37-45 °C		-	+	-	+	++	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	
pH	5-7	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	
	7-8	+	++	+	++	++	++	-	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
	8-10	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	
NaCl	0-7 g/L	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	7-15 g/L	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	15-20 g/L	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

+ : bonne croissance, ++ : très bonne croissance, - : aucune croissance

3.3. Criblage de l'activité antimicrobienne

3.3.1. Test d'antagonisme par la méthode des Cylindres d'Agar

Vingt-cinq isolats bactériens de l'algue rouge *Asparagopsis armata* ont été testés par la méthode des cylindres d'agar pour leur capacité à inhiber la croissance des microorganismes cibles.

Au total sur les vingt-cinq (25) souches bactériennes criblées pour leur potentialité de production de molécules antimicrobiennes, treize (13) isolats se sont révélés actifs contre au moins un germe-cible, tandis que les autres bactéries (1R, 4R, 5R, 6R, 10R, 11R, 12R, 13R, 15R, 20R, 22R, 24R) ont montré une absence d'activité.

D'une part, les souches 3R, 7R, 8R, 9R, 17R, et 25R ont montré un spectre d'action relativement large, qui s'étend aussi bien sur les bactéries à Gram positif, Gram négatif et les levures que sur les champignons. Principalement, contre *Listeria monocytogenes* (20 mm), *Bacillus subtilis* (15 mm), *Staphylococcus aureus* (12 mm), *Micrococcus luteus* (11 mm), (bactéries Gram positives), *Agrobacterium tumefaciens* (19 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (14 mm), *Escherichia coli* (13 mm), (bactéries Gram-négatives), et contre deux levures *Saccharomyces cerevisiae* (21 mm) et *Candida albicans* (21 mm), tandis que les deux bactéries *Salmonella enterica* et *Bacillus cereus* étaient les plus résistantes (Figure 23).

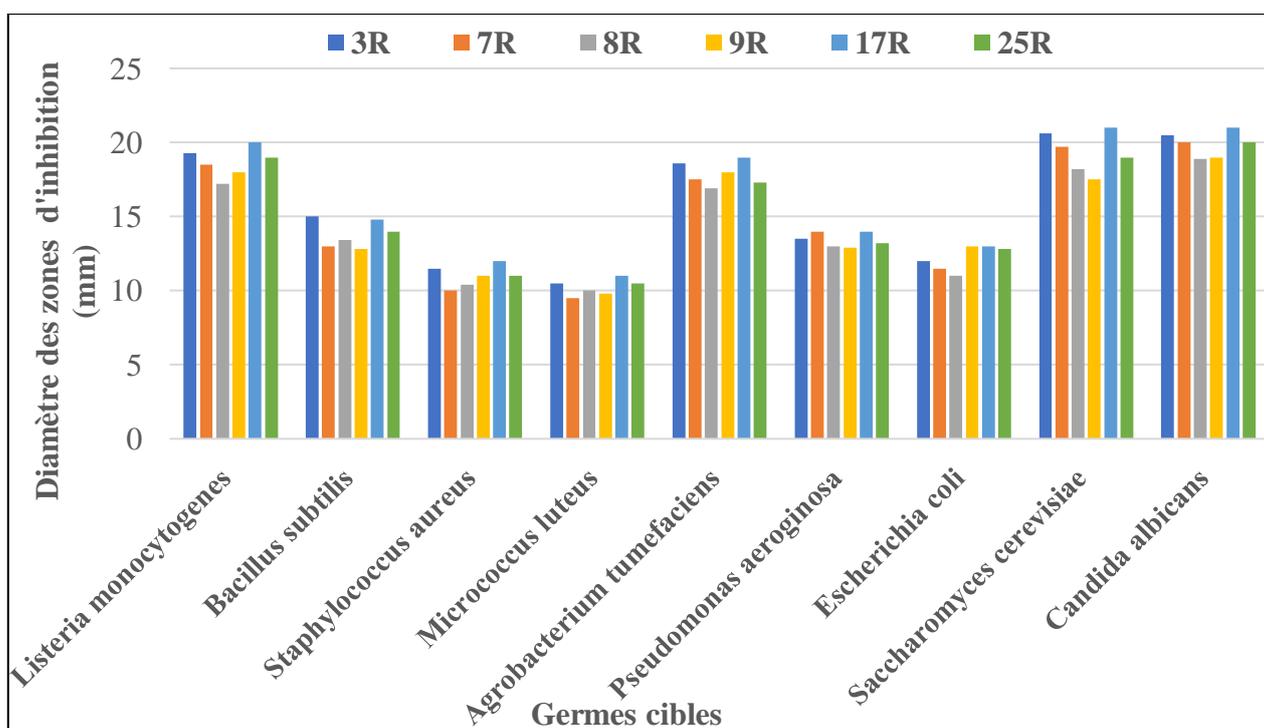


Figure 23 : Spectre d'activité antibactérienne de six isolats

D'autre part, il a été démontré que les souches 2R, 14R, 16R, 18R, 19R, 21R et 23R inhibent la croissance d'un seul germe cible, le champignon filamenteux *Aspergillus brasiliensis* (15 mm) (Figure 24).

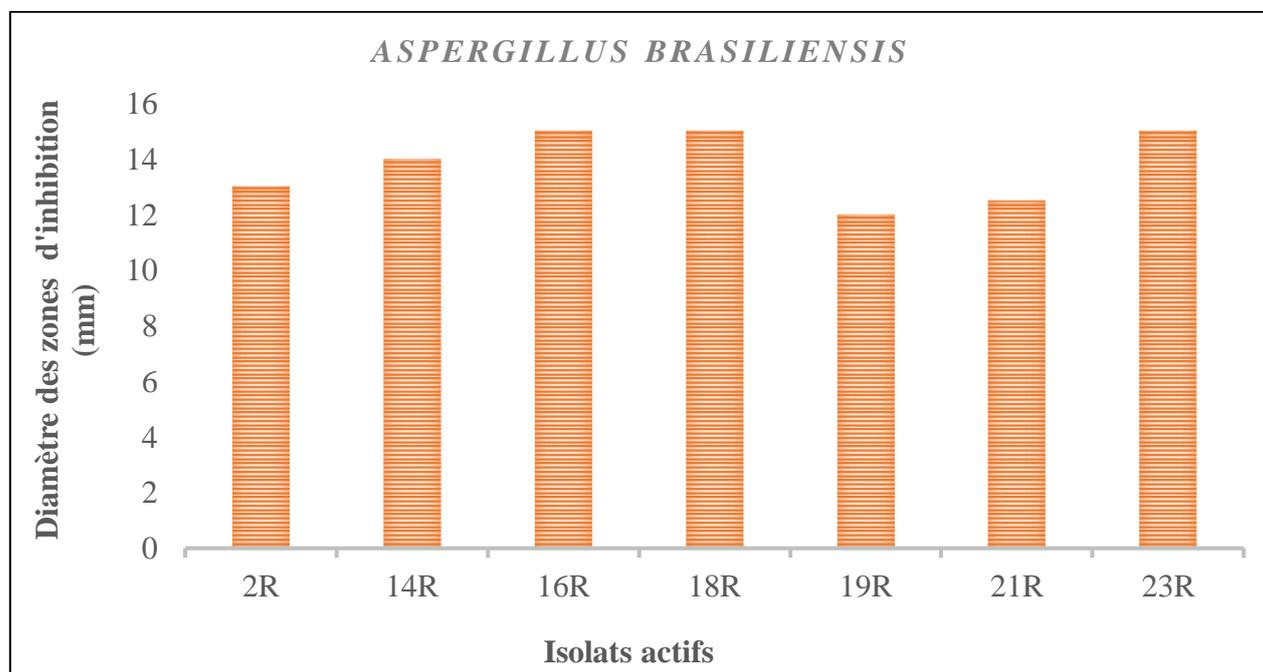


Figure 24 : Spectre d'activité antifongique de sept isolats

Les résultats obtenus nous ont permis de classer les isolats en deux groupes, le groupe d'activité antibactérienne comprenant les isolats : 3R, 7R, 8R, 9R, 17R, et 25R et le groupe d'activité antifongique regroupant les isolats : 2R, 14R, 16R, 18R, 19R, 21R, et 23R.

Cependant, l'apparition et les valeurs des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à un autre (LB, VNSS, GN, 333, Bennett) et varient sur le même milieu de culture, d'un microorganisme test à un autre.

Des variations ont également pu être observées selon les milieux de culture. Les deux milieux LB et VNSS ont permis l'obtention des plus importants halos d'inhibition pour la majorité des isolats. Il faut signaler que les activités obtenues lors de ce criblage sont faibles ou parfois modérées, à l'exception des souches 3R, 17R et 25R qui ont montré des activités particulièrement fortes. Ces isolats ont été présélectionnés, au regard de leur fort potentiel de production de molécules antimicrobiennes contre *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Saccharomyces cerevisiae*.

3.3.2. Etude de la production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides de la souche 17R

L'optimisation de la production de biomolécules nécessite le choix d'un milieu de culture adéquat. En effet, plusieurs travaux ont prouvé que l'activité antimicrobienne est étroitement liée à la nature et à la composition du milieu de culture.

Les résultats obtenus d'après le test antagonisme montrent que la souche 17R s'est avérée très intéressante en termes de capacité à inhiber la croissance des bactéries cibles, grâce à la production des composés ou métabolites antimicrobiens diffusibles. Cependant, les autres isolats ne présentent pas le même comportement de production de molécules actives en fonction du milieu, par conséquent, nous allons donc poursuivre le travail par l'étude et l'optimisation de la production des molécules responsables des inhibitions afin de sélectionner le milieu convenable à la production d'antimicrobiens de la souche 17R.

Des cultures de la souche 17R ont été réalisées sur cinq milieux liquides complexes à savoir : VNSS, GN, LB, Bennett et 333. A partir des résultats de ce test, nous retenons également les souches cibles à utiliser pour la cinétique de production. Il s'agit de quatre souches, une bactérie à Gram positif *Listeria monocytogenes* et une à Gram négatif *Agrobacterium tumefaciens* et deux levures *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*, les plus sensibles à l'activité antimicrobienne de la souche 17R. Nous les utiliserons donc comme germes cibles, lors de la cinétique de production en milieux de culture agités (LB, VNSS, GN, 333, Bennett).

Au cours de la fermentation, la production des métabolites antimicrobiens a été mesurée quotidiennement par la méthode de diffusion des puits pendant 5 jours. Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 25.

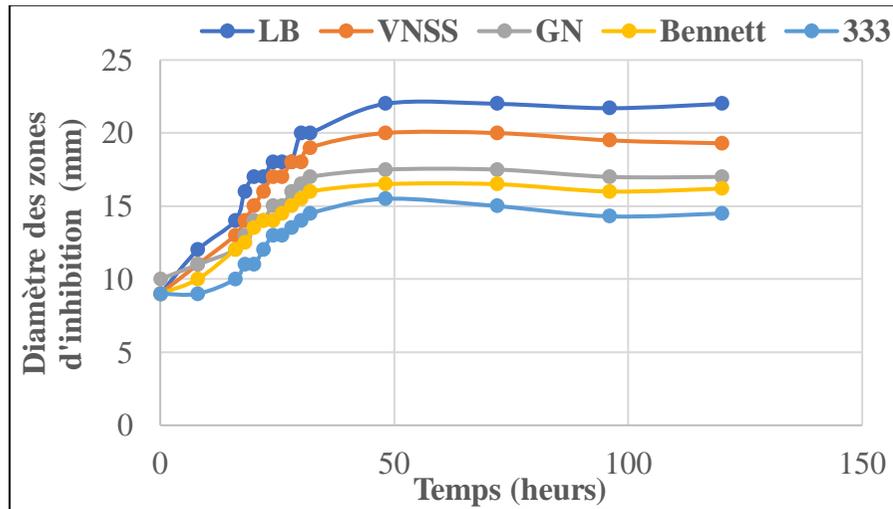
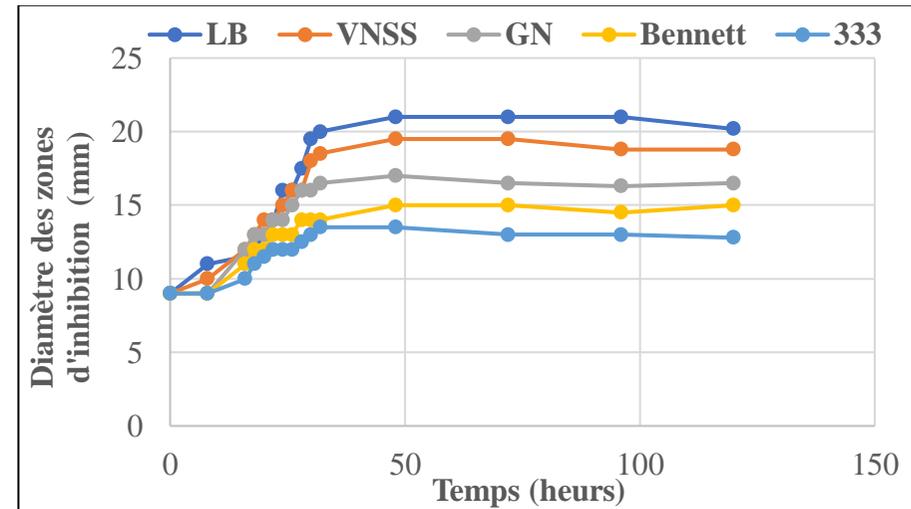
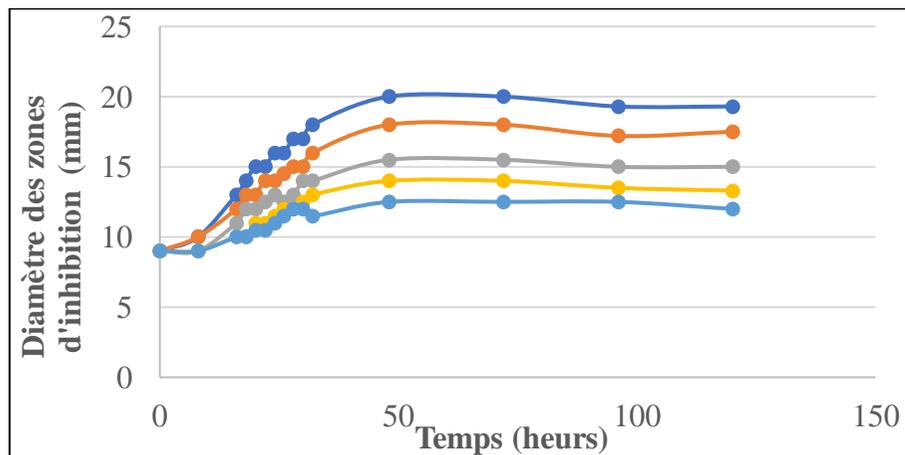
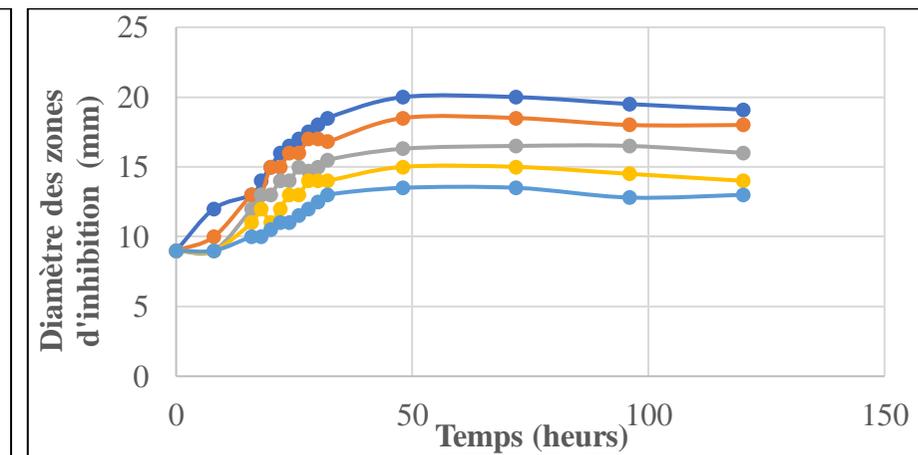
*Candida albicans**Saccharomyces cerevisiae**Listeria monocytogenes**Agrobacterium tumefaciens*

Figure 25 : Cinétique de l'évolution de production de l'activité antimicrobienne de la souche 17R contre *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Listeria monocytogenes* et *Agrobacterium tumefaciens* dans les milieux liquides LB, VNSS, GN, Bennett et 333

A travers l'examen des résultats obtenus (Figure 25), nous avons constaté que, indépendamment des cinq milieux utilisés (LB, VNSS, GN, 333, Bennett), la production des métabolites antimicrobiens de la souche 17R, contre les quatre germes-cible *Listeria monocytogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*, débute après une phase de latence de 6 heures à 20 heures puis elle augmente progressivement de 36 heures à 48 heures, où la production atteint son maximum, s'en suit un pallier où l'activité reste relativement constante.

Toutefois, nous avons constaté que le milieu LB est le meilleur milieu de production de métabolites antimicrobiens par rapport aux autres milieux de culture en se référant aux inhibitions maximales observées chez *Listeria monocytogenes* (20 mm), *Agrobacterium tumefaciens* (20 mm), *Candida albicans* (22 mm) et *Saccharomyces cerevisiae* (21 mm), suivi par le milieu VNSS. Cependant, Il y'a lieu de relever que les trois milieux GN, Bennet et 333 ont mené à des activités relativement proches pour les quatre germes-cibles avec des diamètres d'inhibition compris entre 13 et 19 mm.

A travers ces résultats, nous constatons que la souche 17R a présenté les meilleures activités sur le milieu LB quel que soit les germes-cibles, par conséquent, ce milieu (LB) va être utilisé pour la suite du travail. Également, nous avons retenu un temps de 48 heures pour la production.

3.4. Criblage de l'activité protéolytique

L'isolement a conduit à la sélection de 25 nouvelles souches. Les souches sont nommées 1R à 25R. Au cours des expériences de criblage ultérieures, nous avons observé divers types de colonies microbiennes formant des halos larges et clairs sur gélose nutritive au lait écrémé (GNL) (Figure 26). En se basant sur le rapport entre le diamètre d'halo (mm) et le diamètre de la colonie (mm) (dh/dc) (Tableau 8), nous avons montré que parmi les 25 souches testées, 11 souches, à savoir : 1R, 4R, 5R, 6R, 10R, 12R, 13R, 15R, 19R, 20R, 21R ne présentent pas d'activité protéasique, alors que 14 souches produisent des protéases avec des halos plus grands, il s'agit des souches : 2R, 3R, 7R, 8R, 9R, 11R, 14R, 16R, 17R, 18R, 22R, 23R, 24R, et 25R, ces dernières se sont révélées plus intéressantes avec des résultats très appréciables en comparaison avec les résultats de plusieurs études rapportant le potentiel de production d'enzymes des souches bactériennes. Parmi elles, les isolats bactériens 3, 7, 9,

14, 16, 17, 18, 23 et 25 ont montré la plus grande activité protéasique avec un rapport dh/dc variant entre 1.50 et 1.71 (Figure 26). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Activité protéolytique sur milieu agar au lait écrémé de 25 souches bactériennes nouvellement isolées

Souches	dh/dc			Souches	dh/dc			Souches	dh/dc		
	24h	48h	72h		24h	48h	72h		24h	48h	72h
1R	-	-	-	10R	-	-	-	19R	-	-	-
2R	1.20	1.18	1.18	11R	1.02	1.12	1.21	20R	-	-	-
3R	1.52	1.58	1.56	12R	-	-	-	21R	-	-	-
4R	-	-	-	13R	-	-	-	22R	1.06	1.15	1.25
5R	-	-	-	14R	1.54	1.57	1.60	23R	1.50	1.56	1.59
6R	-	-	-	15R	-	-	-	24R	1.08	1.25	1.31
7R	1.51	1.57	1.61	16R	1.54	1.60	1.71	25R	1.43	1.56	1.59
8R	1.34	1.30	1.41	17R	1.50	1.59	1.69				
9R	1.49	1.56	1.59	18R	1.49	1.58	1.64				



Figure 26 : Résultats de l'activité protéolytique de certaines bactéries isolées

3.5. Criblage de l'activité hémolytique et des substances tensioactives

Les diverses applications des biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour la sélection des bactéries productrices de biosurfactants. Plusieurs travaux ont signalé que la production de biosurfactants dépend de microorganismes producteurs mais aussi que cette production est affectée par les sources de carbone utilisées. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la sélection des souches performantes, le temps optimum et le choix de la source de carbone pour une production optimale de biosurfactants. Le criblage a été examiné par les tests de l'activité hémolytique et de déplacement d'huile (DDP). Ces deux tests ont montré une production du biosurfactants chez toutes les souches.

Un total de 25 isolats a été testés d'une part pour leur activité hémolytique sur des plaques de gélose au sang, une zone claire a été observée autour de la colonie (Figure 27), cette zone confirme le test positif pour l'activité hémolytique, parmi les 25 souches testées, 17 souches ont montré des résultats positifs à savoir : 2R, 3R, 4R, 7R, 8R, 9R, 10R, 13R, 14R, 16R, 17R, 18R, 19R, 21R, 22R, 23R, et 25R. Les souches positives à l'hémolyse sanguine ont été testées pour leur production des substances tensioactives par le biais du test de déplacement d'huile produite par les isolats sélectionnés.

Les résultats obtenus de l'activité hémolytique sont donnés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Activité hémolytique sur des plaques de gélose au sang de 25 souches bactériennes nouvellement isolées

Souches	Diamètre de la zone claire (mm)	Souches	Diamètre de la zone claire (mm)	Souches	Diamètre de la zone claire (mm)
1R	-	10R	12	19R	13
2R	15	11R	-	20R	-
3R	18	12R	-	21R	12
4R	14	13R	11	22R	13
5R	-	14R	16	23R	15
6R	-	15R	-	24R	-
7R	19	16R	17	25R	19
8R	18	17R	20		
9R	20	18R	17		



Figure 27 : Apparition des zones claires autour des colonies sur gélose au sang indique une hémolyse des globules

D'autre part, l'étude de la capacité productrice de biosurfactants par les souches bactériennes isolées est basée sur la mesure du diamètre de la surface d'halo claire (test de déplacement de pétrole figure 28). Les résultats expérimentaux (Figure 29) montrent clairement que les souches 2R, 3R, 4R, 7R, 8R, 9R, 14R, 16R, 17R, 18R, 19R, 21R, et 25R ont un potentiel de

production de biosurfactants important. Les autres souches : 1R, 5R, 6R, 10R, 11R, 12R, 13R, 15R, 20R, 22R, 23R et 24R, ne sont pas capables de produire des biosurfactants à cause de leur faible ou bien absence de déplacement d'huile. La valeur la plus élevée de la zone de halo a été remarquée entre 48 et 72 heures d'incubation dans chaque souche avec une variante de diamètre entre 6 et 8.5 cm.

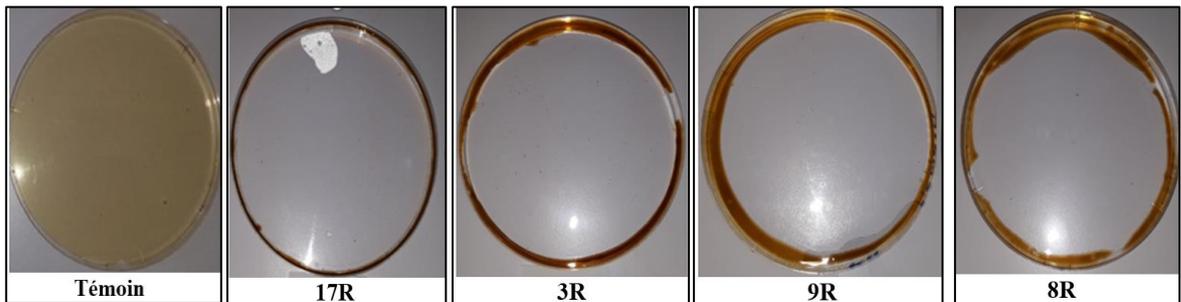


Figure 28 : Test de déplacement d'huile de quelques souches (formation du halo clair)

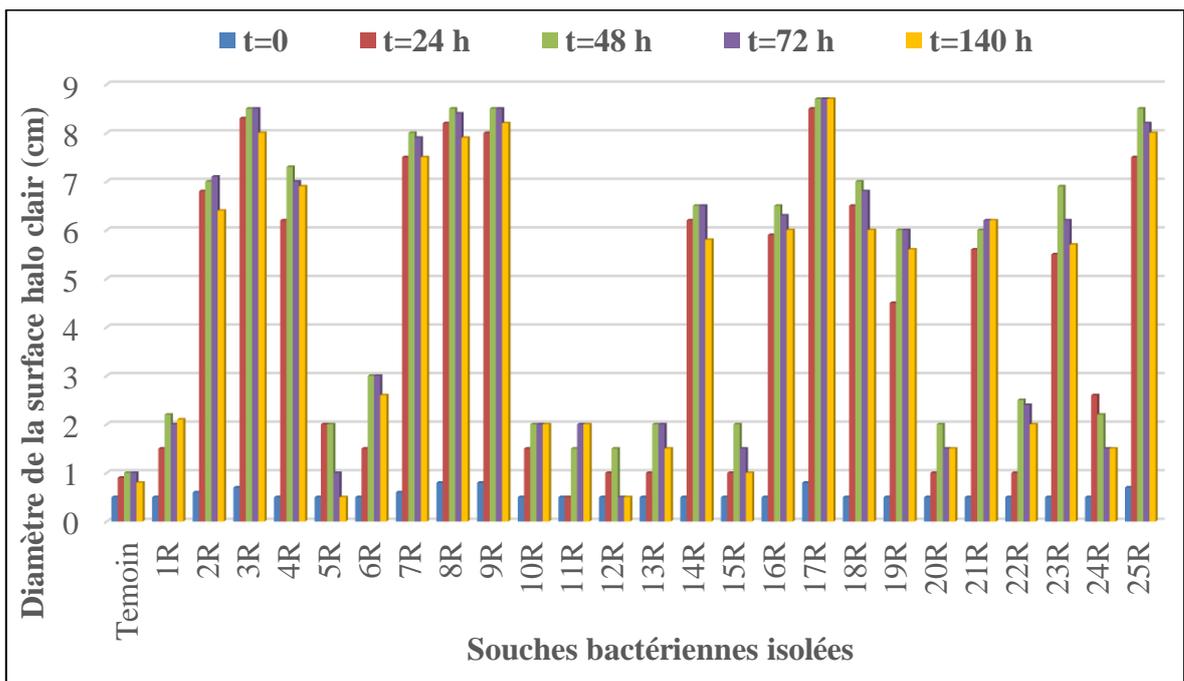


Figure 29 : Variation du diamètre de la surface d'halo claire de 25 souches en fonction de temps

Afin d'évaluer l'effet de la nature de la source de carbone sur la production du biosurfactant par la collection des souches bactériennes isolés, quatre types de substrats (liquides hydrophobes insolubles dans l'eau) ont été utilisés : huile d'olive, huile de table, margine et pétrole brut. La concentration utilisée est de 1 % (v/v).

Toutes les études portant sur la production de biosurfactants montrent, après la sélection du microorganisme producteur, l'importance du choix de la source de carbone que ce soit un hydrocarbure, un glucide, une huile, etc. Cette source joue un rôle déterminant dans le taux de production et la nature de biosurfactant synthétisé. Plusieurs travaux ont sélectionné une variété des sources de carbone pour une meilleure production de biosurfactant, le gasoil et le pétrole [241], l'hexadécane [242], l'huile de tournesol résiduelle de friture [105], l'huile d'olive [114, 243], le pétrole et l'huile d'olive.

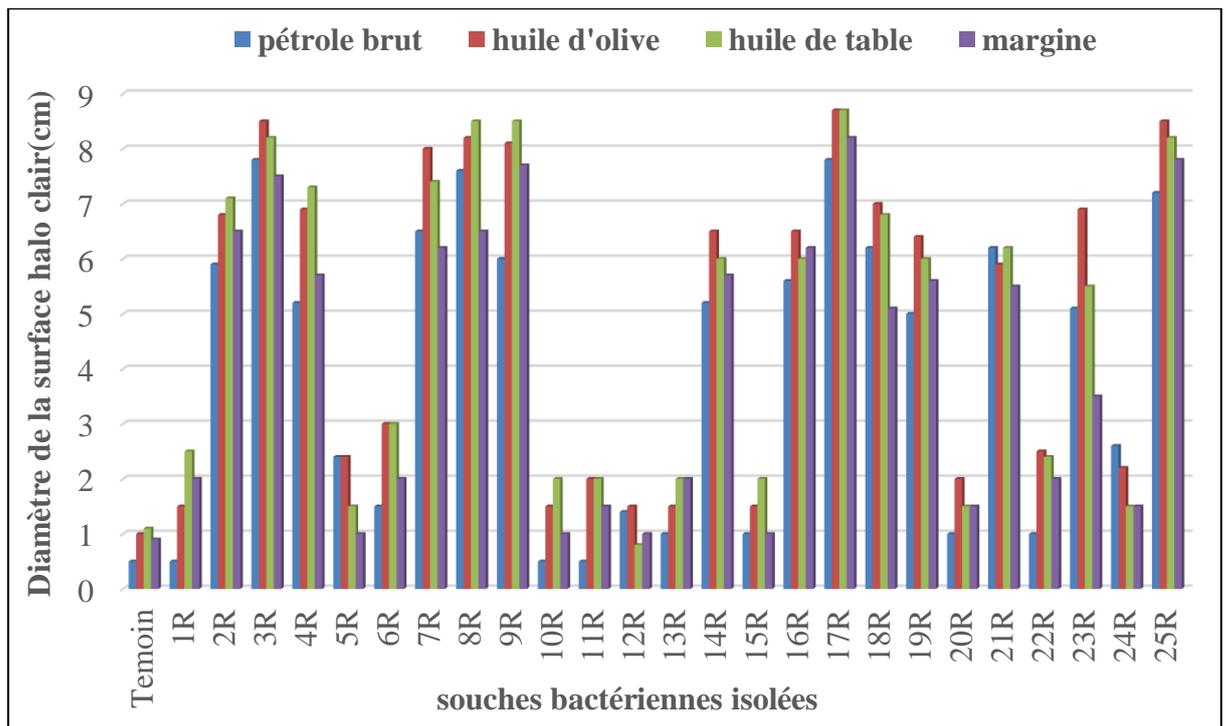


Figure 30 : Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant
(Source de carbone : 1 % v/v, $T_{\text{incub}} = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{incub}} = 48 \text{ heures}$, 150 tr/min)

D'après les valeurs du diamètre de la surface d'halo claire (Figure 30), l'huile de table et l'huile d'olive constituent les deux meilleures sources de carbone pour la production de biosurfactants, ce qui est démontré par un diamètre maximum de déplacement d'huile brute pour la plupart des souches. Les souches 2R, 4R, 8R, 9R, 17R, et 21R ont un potentiel de production de biosurfactants très intéressant avec l'huile de table comme source de carbone, il est traduit par une valeur maximale de déplacement du pétrole brut variant entre 8.5 et 6.2 cm. Cependant, l'huile d'olive représente la meilleure source de carbone chez les souches 3R, 7R, 14R, 16R, 17R, 18R, 19R, et 25R dont le déplacement du pétrole brut DDP était autour de 8.5 et 6.5 cm.

En référence à notre synthèse bibliographique, la présente étude est le premier rapport sur la composition taxonomique et l'activité biologique des bactéries cultivables associées à l'algue marine *Asparagopsis armata* collectée sur la côte méditerranéenne de l'Algérie à l'Est de Tipaza. Il a été constaté que les spécimens d'algues sont colonisés par une communauté de divers microorganismes cultivables. Vingt-cinq souches ont été isolées et étudiées phénotypiquement. La prédominance des isolats appartenant aux deux groupes ; le premier groupe comprend 9 souches du genre *Staphylococcus*, le second groupe rassemble 16 souches du genre *Bacillus*. Les bactéries des genres *Bacillus* et *Staphylococcus* sont largement distribuées dans les environnements marins, en particulier dans les algues. En appliquant une méthode basée sur la culture, nous avons pu étudier une partie des groupes bactériens cultivables et non pas la communauté microbienne dans son ensemble. En même temps, la méthode dépendante de la culture, pourrait être utile pour mieux explorer les particularités physiologiques des isolats puisque la présente étude visait à cribler les bactéries pour leur production des composés bioactifs (Antimicrobienne, Protéolytique, Hémolytique et Biosurfactant). Au total, 13 isolats de 25 souches bactériennes ont été criblés pour leur potentiel de production de molécules antimicrobiennes comme suit : Les plus sensibles sont *Saccharomyces cerevisiae* (21 mm), *Candida albicans* (21 mm), *Listeria monocytogenes* (20 mm) et *Agrobacterium tumefaciens* (19 mm), avec un degré moindre *Bacillus subtilis* (15 mm), *Aspergillus brasiliensis* (15 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (14 mm) et *Escherichia coli* (13 mm) et les plus petits diamètres avec *Staphylococcus aureus* (12 mm) et *Micrococcus luteus* (11 mm). Quatorze souches ont été sélectionnées comme productrices de protéases avec des halos plus importants (rapport dh/dc variant entre 1.02 et 1.71). Dix-sept souches ont une activité hémolytique positive parmi lesquelles 13 isolats ont montré une production considérable de biosurfactant (6 à 8,5 cm de DDP ont été observés après 48 à 72 heures d'incubation).

A travers l'examen des résultats obtenus, nous avons sélectionné 10 performantes souches bactériennes (isolats) ayant montré des activités de surface, hémolytiques, protéolytiques et antimicrobiennes, qui résultaient manifestement de la production des substances de faible poids moléculaire. Quelques travaux ont été mentionnés sur l'isolement et le criblage des bactéries marines pour leurs activités antimicrobiennes, protéolytiques, hémolytiques et de surface. Une étude a été menée par *Lyudmila A. Romanenko* [197] avec l'objectif de caractériser les bactéries hétérotrophes cultivables récupérées de *Anadara broughtoni* et

d'évaluer le potentiel des isolats à produire des métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes, hémolytiques ou de surface. Le criblage de ces microorganismes ouvre la perspective de découvrir de nouveaux produits naturels qui peuvent être développés comme ressources biotechnologiques.

Il est concevable que les microorganismes associés puissent fournir à leurs bivalves hôtes des métabolites bioactifs qui assurent des fonctions vitales ou une protection chimique contre la colonisation par des microorganismes opportunistes. L'étude des bactéries marines associées à l'algue rouge *Asparagopsis armata* est importante pour notre compréhension de leur rôle écologique dans l'interaction avec les animaux et entre elles-mêmes, ainsi que pour leur application biotechnologique en tant que producteurs des composés bioactifs.

Notre investigation a été réalisée suite à la demande des secteurs producteurs d'investir dans le domaine de la biotechnologie en utilisant nos souches locales, notamment celles isolées des milieux marins. Pour ce faire, notre étude actuelle fait partie des objectifs de notre laboratoire sur les biomolécules d'origine microbienne pour lequel nous souhaitons constituer une collection des souches marines associées aux algues.

3.6. Contribution à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche bactérienne 17R d'*Asparagopsis armata*

3.6. 1. Analyses préliminaires des trois monoterpènes par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

Les profils chromatographiques (Figure 31), obtenus dans les conditions opératoires décrits précédemment, montre la présence d'un seul pic élué à un temps de rétention de 10.5 ; 20.0 et 4.4 min correspondant respectivement au menthol, thymol et cymène, ce qui indique la pureté des trois monoterpènes utilisés dans la biotransformation.

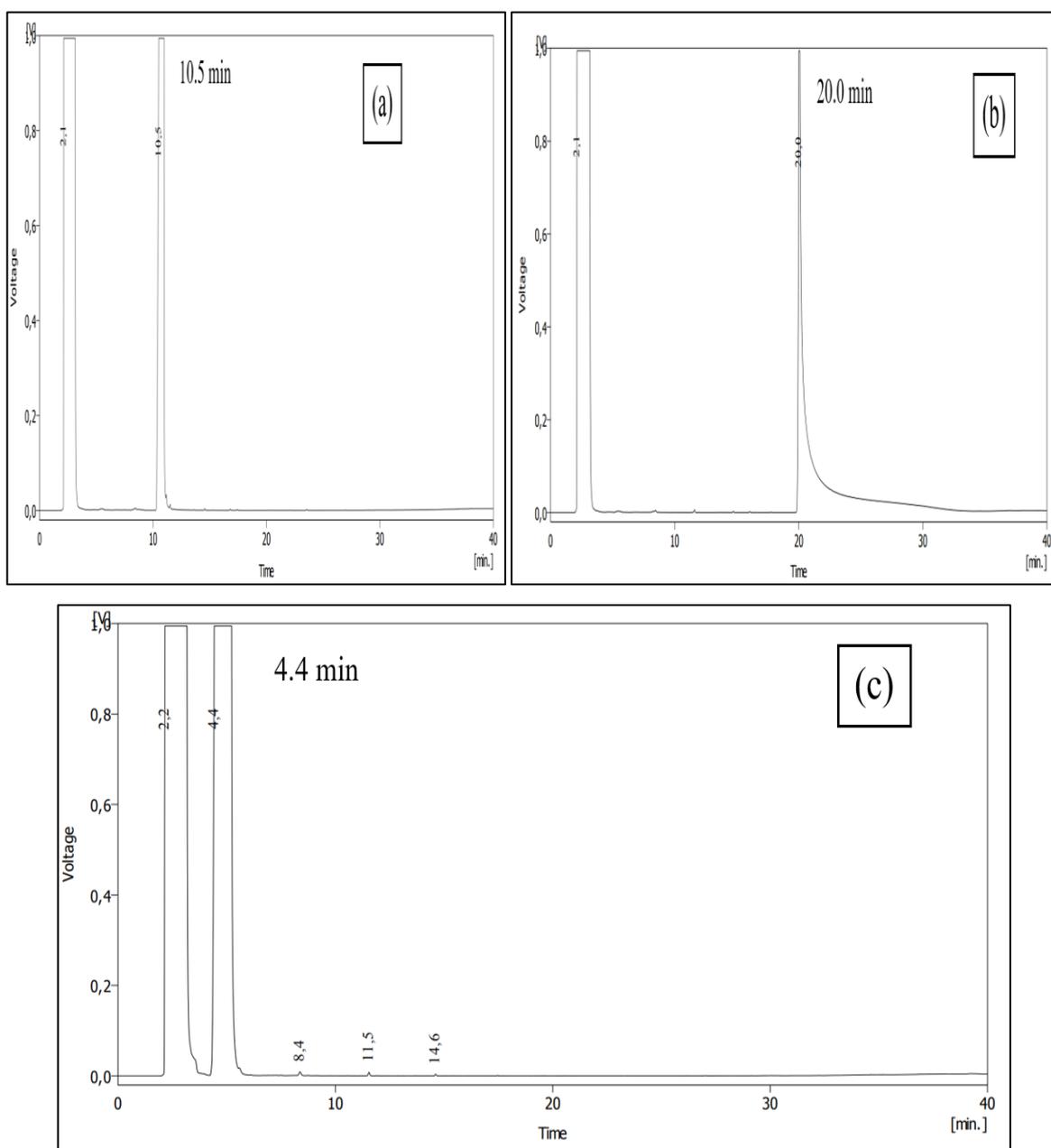


Figure 31 : Profils chromatographiques du menthol (a), thymol (b) et cymène (c)

3.6.2. Etude des facteurs influençant la biotransformation

3.6.2.1. Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice du menthol, thymol et cymène pour la biotransformation

L'optimisation de la concentration du substrat est un paramètre important pour obtenir une biotransformation et une croissance optimale.

3.6.2.1.1. Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition en milieu solide

Dans le but de déterminer la concentration assimilable non inhibitrice des substrats (menthol, thymol et cymène) permettant d'estimer la sensibilité de la souche 17R vis-à-vis des trois monoterpènes, différentes concentrations ont été testées : 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 10, et 20 mg/mL. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Effet de la concentration du menthol, thymol et cymène sur la croissance de la souche 17R

Concentration mg/mL	0.05	0.1	0.25	0.5	1	3	5	10	20
Menthol	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Thymol	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Cymène	-	-	-	-	-	-	+	+	+

- : Absence de zone d'inhibition (la souche est résistante). + : présence de zone d'inhibition (la souche est sensible).

En se basant sur ces résultats, la souche 17R soumise à des concentrations de 0.05 à 1 mg/mL du menthol montre une résistance. Toutefois, à des concentrations supérieures ou égale 3 mg/mL, la souche est sensible au métabolite (menthol) (Tableau 10).

Concernant les deux métabolites thymol et cymène, les résultats montrent une sensibilité pour des concentrations s'étalant entre 5 et 20 mg/mL. Par contre, pour la gamme de concentrations inférieure à 5 mg/mL, la souche montre une absence totale des zones d'inhibition qui indique la résistance de la souche vis-à-vis des deux métabolites (Tableau 10).

Par conséquent, les concentrations pouvant être utilisées pour la biotransformation doivent être inférieures à 5 mg/mL pour les deux substrats thymol et cymène et comprise entre 0.05 et 1 mg/mL pour le menthol.

3.6.2.1.2. Détermination de la concentration optimale du menthol, thymol et cymène en milieu liquide

Le menthol, thymol et cymène ont été utilisés comme sources de carbone, la croissance cellulaire (absorbance à 600 nm) et la biomasse de la souche bactérienne 17R ont été mesurées après 48 heures d'incubation (Figure 32). La croissance a été conduite dans un agitateur à 30 °C, 150 tr/min, pH=7.2, pendant 48 h. La détermination des effets de différentes concentrations des sources de carbone (menthol, thymol et cymène) sur la croissance cellulaire a été établie en utilisant la gamme de concentration suivante : 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 10, et 20 mg/mL.

La mesure de l'absorbance à 600 nm exprime principalement la turbidité du milieu et traduit ainsi le développement d'une population bactérienne.

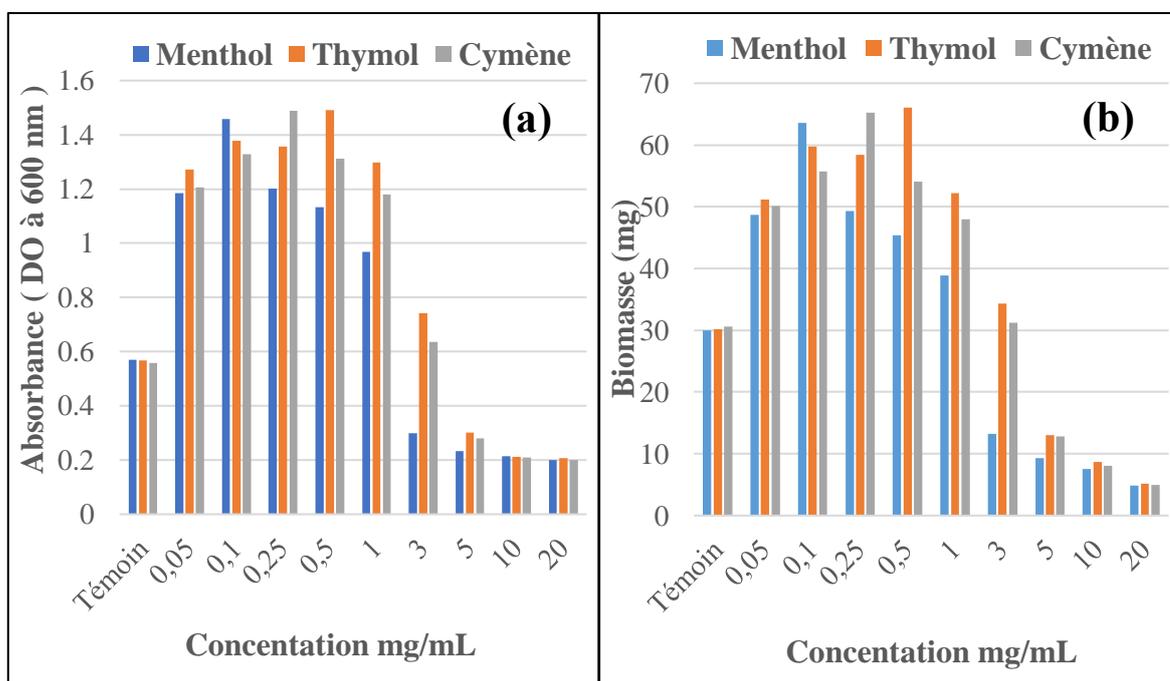


Figure 32 : Evolution de l'absorbance à 600 nm (a) et la biomasse (mg) (b) en fonction de différentes concentrations des sources de carbone (menthol, thymol et cymène), dans les cultures de 48 heures

D'après les résultats obtenus (Figure 32), la cinétique de la croissance bactérienne de la souche 17R en fonction de différentes concentrations des substrats (menthol, thymol et cymène) révèle une augmentation de l'absorbance et de la biomasse de façon linéaire jusqu'à atteindre des valeurs de 0.1 ; 0.25 et 0.5 mg/mL pour le menthol, cymène et thymol, respectivement. Au-delà de ces concentrations, nous observons une décroissance de la croissance cellulaire représentée par l'absorbance et la biomasse.

Pour des concentrations supérieures à 3 mg/mL pour les trois métabolites, les valeurs d'absorbance se stabilisent entre 0,2 et 0,3 unité de densité optique, en effet, la concentration élevée en substrat (menthol, thymol et cymène) produit un effet toxique sur la bactérie.

En se basant sur ces résultats, nous avons choisi pour la suite du travail les concentrations de 0.1 ; 0.25 et 0.5 mg/mL pour le menthol, cymène et thymol, respectivement.

3.6.2.2. Effet de la température sur la biotransformation

Deux millilitres (2 mL) d'échantillon de la préculture sous forme d'inoculum a été transféré dans des flacons de 250 mL contenant 50 mL de milieu complexe. Les flacons ont été incubés dans un agitateur à 150 tr/min à différentes températures de 20 à 40 °C. Après 48 heures, la croissance cellulaire (absorbance à 600 nm) a été établie, et les cellules ont été récoltées par centrifugation (la biomasse) (Figure 33).

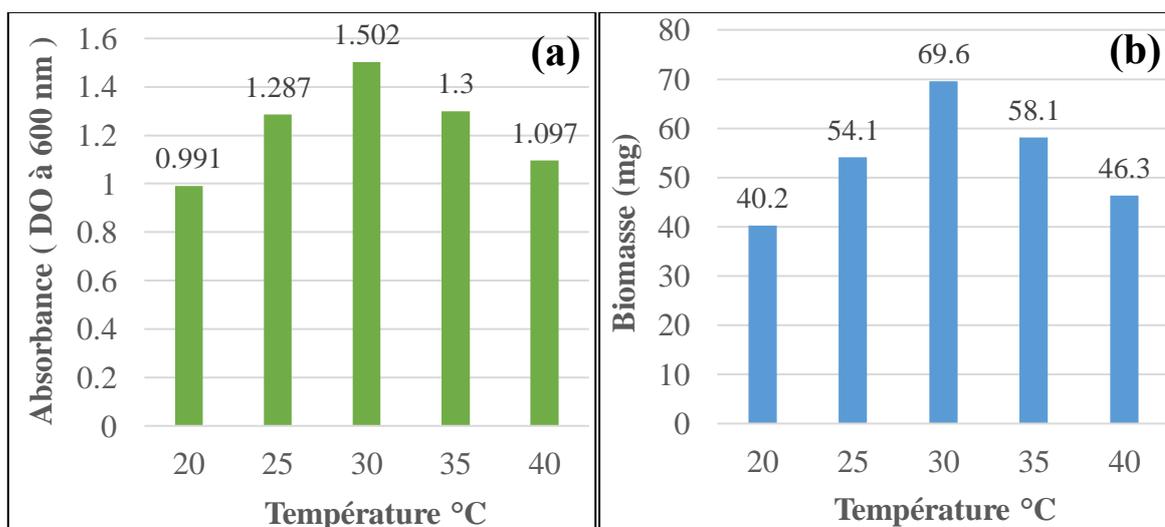


Figure 33 : Effet de la température sur la croissance cellulaire (l'absorbance (a) et la biomasse (b))

Les résultats présentés dans la figure 33 montrent que la croissance cellulaire la plus élevée a été obtenue à 30 °C avec un maximum d'absorption à 600 nm de 1.502 et une biomasse de 69.6 mg. La température optimale a donc été considérée comme étant de 30 °C. L'augmentation de la température d'incubation a entraîné une diminution de la croissance cellulaire en termes d'absorbance et de biomasse (Figure 33).

3.6.2.3. Effet du pH sur la croissance cellulaire

L'effet de diverses valeurs de pH allant de 5 à 9.5 [235, 236] sur la croissance cellulaire a été mesuré, il a été constaté que la croissance optimale de la souche bactérienne, était obtenue au pH actuel de 8.5, traduite par une absorbance maximale de 1.537 et une biomasse de 68.9 mg (Figure 34). À des valeurs de pH supérieures ou inférieures à cet optimum (8.5), la croissance bactérienne était assez faible.

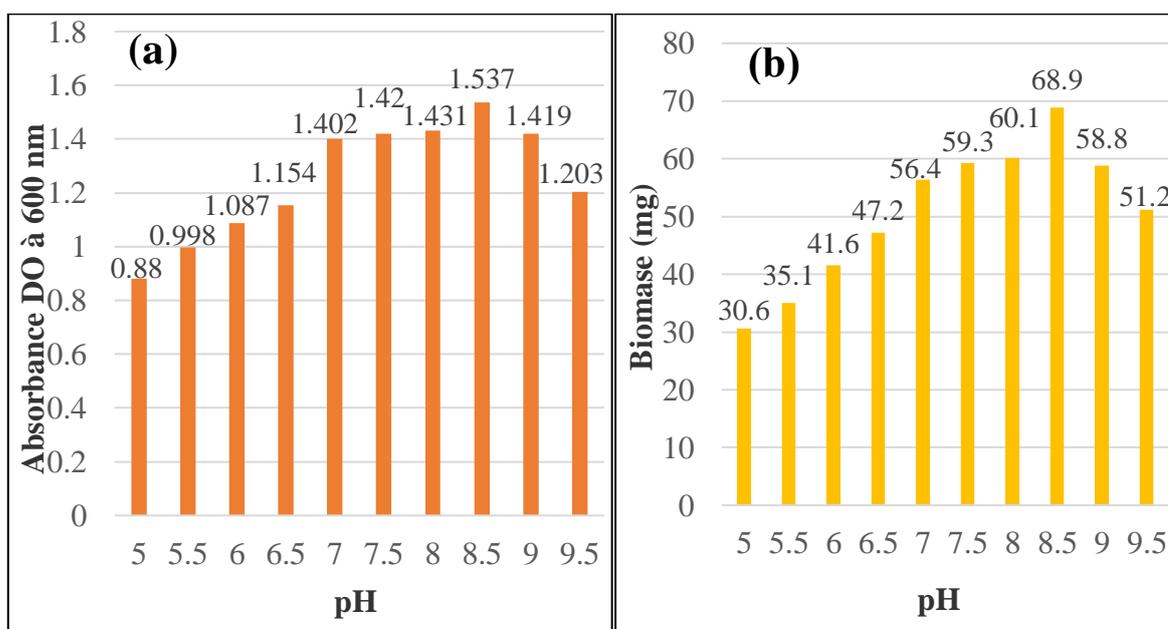


Figure 34 : Effet de la variation du pH sur la croissance cellulaire (l'absorbance (a) et la biomasse (b))

3.6.2.4. Effet des surfactants (Tensioactifs)

Nous avons étudié l'effet de trois composés tensioactifs (Tween 40, Tween 80 et Triton X) sur la biotransformation des trois monoterpènes. Les surfactants (tensioactifs) sont dissous dans l'eau distillée à raison de 1 % (v/v). Étant donné que ces tensioactifs peuvent être utilisés pour améliorer la solubilité des trois monoterpènes, la

croissance cellulaire de la souche 17R a été évaluée par la mesure de l'absorbance à 600 nm et la biomasse en mg (Figure 35).

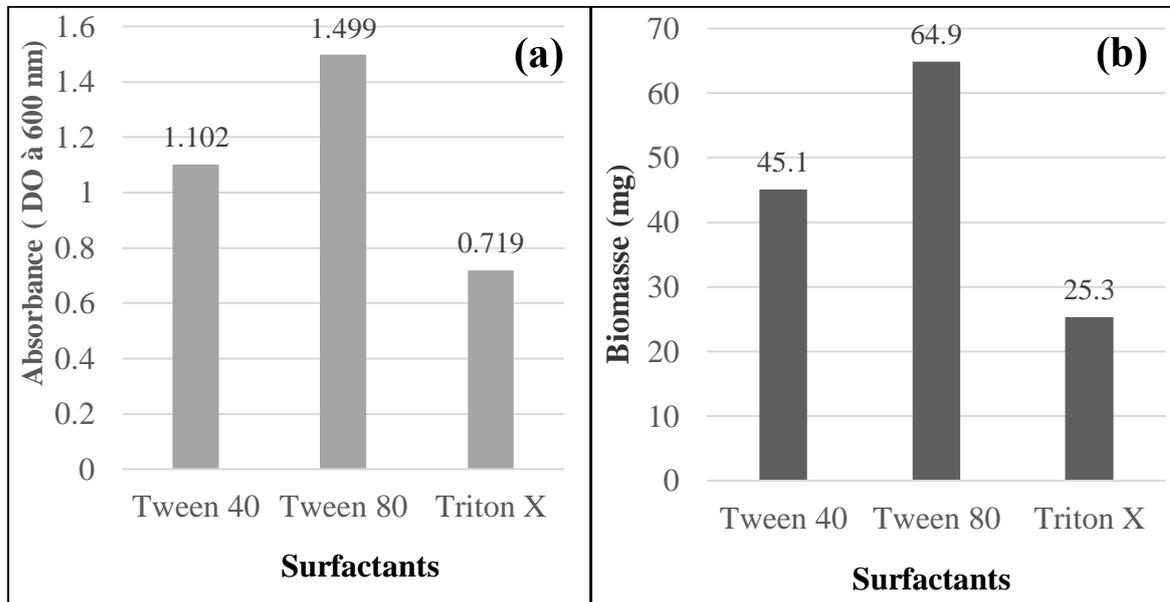


Figure 35 : Impact de l'utilisation des différents agents de surface (Tween 40, Tween 80 et Triton X) sur la biotransformation (croissance cellulaire : Absorbance **(a)** et Biomasse **(b)**)

Selon les résultats illustrés par la figure 35, il a été démontré que la croissance bactérienne de la souche 17R était significativement plus faible avec le Triton X qu'avec le Tween 40 et le Tween 80. Ce dernier présente la meilleure croissance cellulaire avec une densité maximale de 1.499 et une biomasse de 64.9 mg. Il a également été montré que les composés tensioactifs visent à augmenter le taux de transport du substrat dans la cellule.

A travers cette étude, nous avons tenté d'optimiser les facteurs influençant la biotransformation y compris (Concentration du substrat, Température, pH et Surfactant). Les résultats obtenus révèlent que la meilleure croissance cellulaire de la souche 17R (meilleure biotransformation) a été obtenue à pH=8.5, température de 30 °C, avec l'utilisation de Tween 80 comme surfactant et avec des concentrations de 0.1 ; 0.25 et 0.5 mg/mL pour le menthol, cymène et thymol, respectivement.

3.6.3. Etude de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par une bactérie 17R du genre *Bacillus*

La biotransformation du menthol, thymol et cymène a été réalisée sur le même milieu *Luria-Bertani* (LB) dans les conditions optimisées de pH = 8.5, température d'incubation = 30 °C, temps ou période d'incubation = 7 jours dans un agitateur rotatif à 150 rpm et avec une concentration des substrats de 0.1 ; 0.25 et 0.5 mg/mL du menthol, cymène et thymol, respectivement avec l'utilisation de Tween 80 à 1 % comme surfactant pour solubiliser les différents substrats utilisés.

3.6.4. Analyse chimique des produits de biotransformation par CG/SM

Les trois monoterpènes soumis à des tests de biotransformation par la souche bactérienne 17R a permis de récupérer une phase organique (mélange des métabolites). L'analyse par CG/SM de la phase organique a mené à différents profils chromatographiques liés à la biotransformation du menthol, thymol et cymène (Appendice C).

L'examen des chromatogrammes révèle la présence de plusieurs produits, indiquant que le menthol, thymol et cymène ont subi une biotransformation et que la souche 17R a prouvé son efficacité dans la biotransformation de ces monoterpènes.

3.6.4.1. Biotransformation du menthol par la souche 17R

Le tableau 11 regroupe les produits de biotransformation avec l'ordre d'élution, le temps de rétention, les valeurs des indices de rétention (calculés et rapportés par la littérature), les banques de données SM utilisées dans l'identification ainsi que la teneur de chaque constituant au premier et au septième jour d'incubation.

L'examen du tableau révèle la présence de six composés, représentés dans la figure 36.

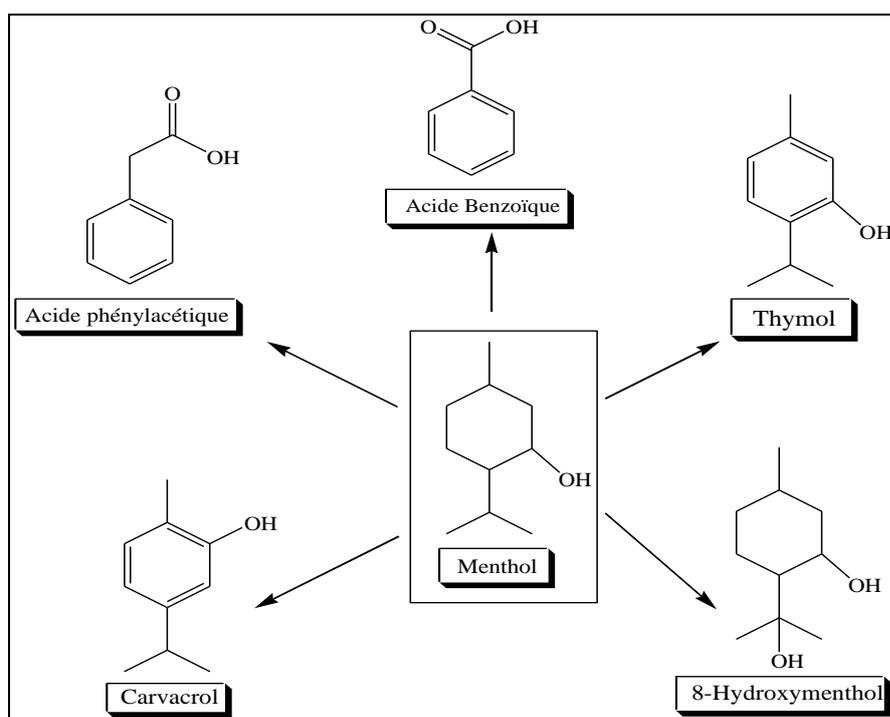
Tableau 11 : Métabolites issus de la biotransformation du menthol par la souche 17R

N°	Tr (min)	Nom du composé	LRIcal	LRIlit	Data base	(%) aire	
						1 jour	7 jours
1	11.96	Acide Benzoïque	1160	1159	W11N17 ; FFNSC	-	0.59
2	12.49	Menthol	1172	1169	W11N17 ; FFNSC	91.69	1.13
3	15.89	Acide phénylacétique	1250	1249	W11N17 ; FFNSC	-	12.87
4	17.66	Thymol	1292	1293 Nist	W11N17 ; FFNSC	8.31	72.59
5	17.71	Carvacrol	1298	1300 Nist	FFNSC	t	t
6	18.42	NI	1310	/	/	-	8.65
7	20.33	8-Hydroxymenthol	1353	1346	W11N17	-	4.17

t : trace (< 0.1%) ;

NI : Produit non identifier ;

m/z : 43(100), 60(14), 72(14), 86(63), 100(19), 125(2),143(1).

**Figure 36** : Voies métaboliques de la biotransformation du menthol par la souche 17R

Le profil chromatographique CG/SM obtenu (Appendice C) montre la présence de 6 composés, dont 5 ont été identifiés et un composé reste non identifié, comme indiqué dans le tableau 11.

Nous avons noté l'identification de quatre composés décrits pour la première fois dans la biotransformation du menthol par cette souche par rapport aux autres souches de bactéries et de champignons. Il s'agit des composés suivants : l'acide benzoïque, l'acide phénylacétique, le thymol et le carvacrol. Tandis que l'hydroxylation du menthol au niveau du groupe méthyle en C-8 du fragment isopropyle conduit à la formation d'un dihydroxymenthol ou 8-hydroxymenthol (Tableau 11). Cela a déjà été rapporté auparavant dans la littérature [126, 176, 178].

Nous avons enregistré l'obtention d'un composé que nous n'avons pas pu identifier sur la base des données spectrales et des indices de rétention. Au vu du spectre de masse du composé et de pourcentage des différents fragments, il s'agit fort probablement d'un monoterpène oxygénés.

- **Proposition des voies métaboliques plausible du menthol**

Les figures 37-40 regroupent les voies d'obtention plausibles des nouveaux métabolites : l'acide benzoïque, le thymol, le carvacrol, l'acide phénylacétique, et le 8-hydroxymenthol.

L'hydroxylation reste la réaction la plus courante dans les monoterpènes comme dans le menthol, elle produit principalement un dérivé hydroxylé qui est le 8-hydroxymenthol (Figure 37). De plus, le menthol est biotransformé en thymol via une réaction d'aromatisation qui est généralement réalisée par déshydrogénation du menthol (Figure 38). Suite à la réaction d'aromatisation, un réarrangement de Wagner-Meerwein est effectué sur le thymol dans lequel le groupe hydroxyle (OH) est déplacé d'un carbone (C¹) à un autre carbone (C⁶) pour former le carvacrol (Figure 38). En outre, le menthol a été métabolisé en deux acides (l'acide benzoïque et l'acide phénylacétique) à partir d'une réaction d'aromatisation et de déshydratation suivie d'une désalkylation et d'une oxydation (Figures 39 et 40).

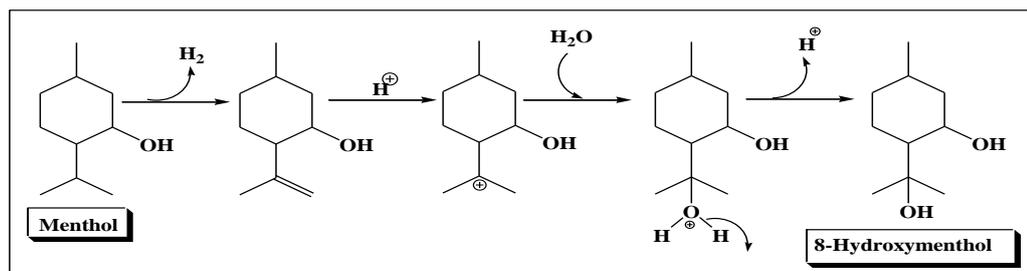


Figure 37 : Voie proposée de biotransformation du menthol en 8-hydroxymenthol

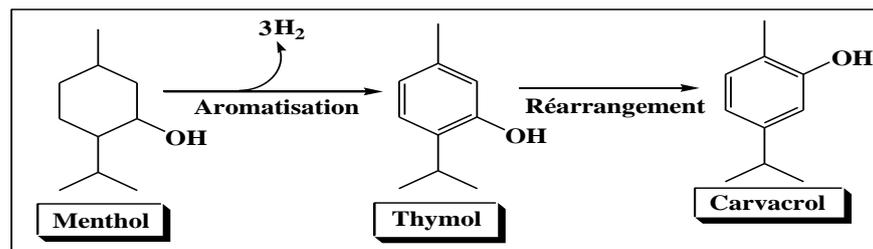


Figure 38 : Voie proposée de biotransformation du menthol en thymol et carvacrol

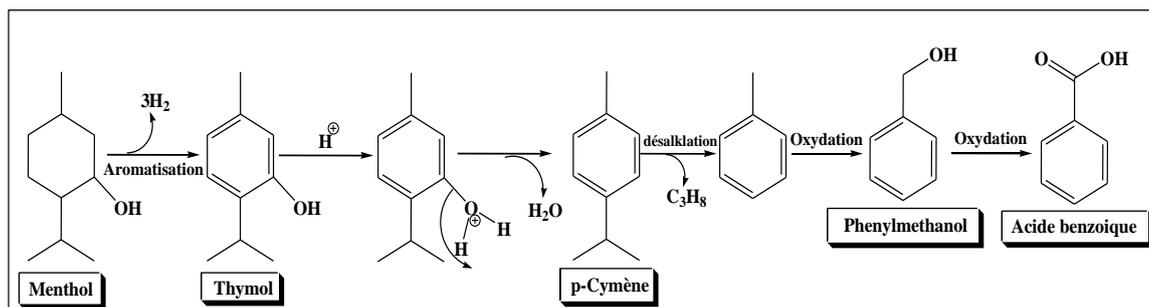


Figure 39 : Voie proposée de biotransformation du menthol en acide benzoïque

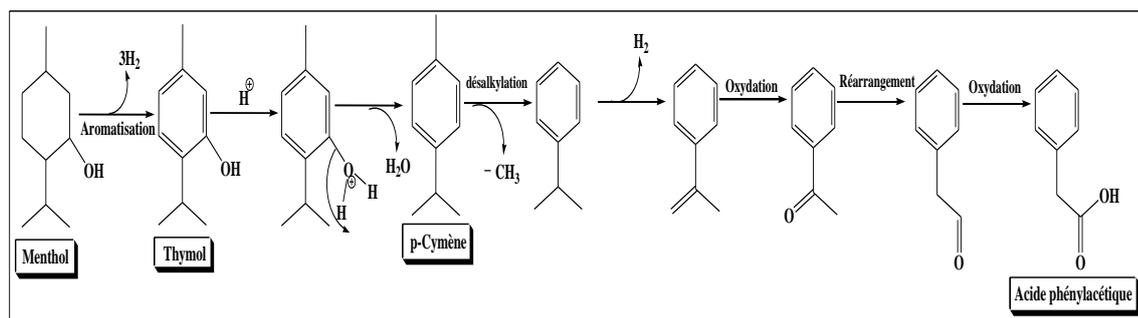


Figure 40 : Voie proposée de biotransformation du menthol en acide phénylacétique

3.6.4.2. Biotransformation du thymol par la souche 17R

Le profil chromatographique d'extract de biotransformation du thymol obtenu a révélé la présence de 11 composés comme indiqué dans le tableau 12 et la figure 41.

Tableau 12 : Métabolites issus de la biotransformation du thymol par la souche 17R

N°	Tr (min)	Nom du composé	L _R Ical	L _R Ilit	Data base	(%) aire	
						1 jour	7 jours
1	6.79	p-Cymène	1024	1025	FFNSC ; W11N17	0.03	0.15
2	7.07	Eucalyptol	1032	1032	FFNSC ; W11N17	-	0.04
3	10.01	Alcool phénéthylque (Benzèneéthanol)	1113	1113	FFNSC ; W11N17	-	0.03
4	10.95	Cis-1,2- Epoxy limonène	1136	1134 Nist	W11N17 ; FFNSC	-	0.05
5	11.36	Camphre	1146	1149	FFNSC ; W11N17	-	0.07
6	11.40	Bornéol	1149	1156	W11N17	-	t
7	11.96	Acide Benzoïque	1160	1159	W11N17 ; FFNSC	-	0.06
8	12.49	Menthol	1172	1169	W11N17 ; FFNSC	2.25	9.50
9	13.01	p-Cymène-8-ol	1185	1183	FFNSC ; W11N17	-	0.09
10	15.83	Acide phénylacétique	1250	1249	W11N17 ; FFNSC	0.18	0.22
11	17.78	Thymol	1295	1293 Nist	W11N17 ; FFNSC	97.43	89.68
12	17.86	Carvacrol	1298	1300 Nist	FFNSC	t	t

t: trace (< 0.1%)

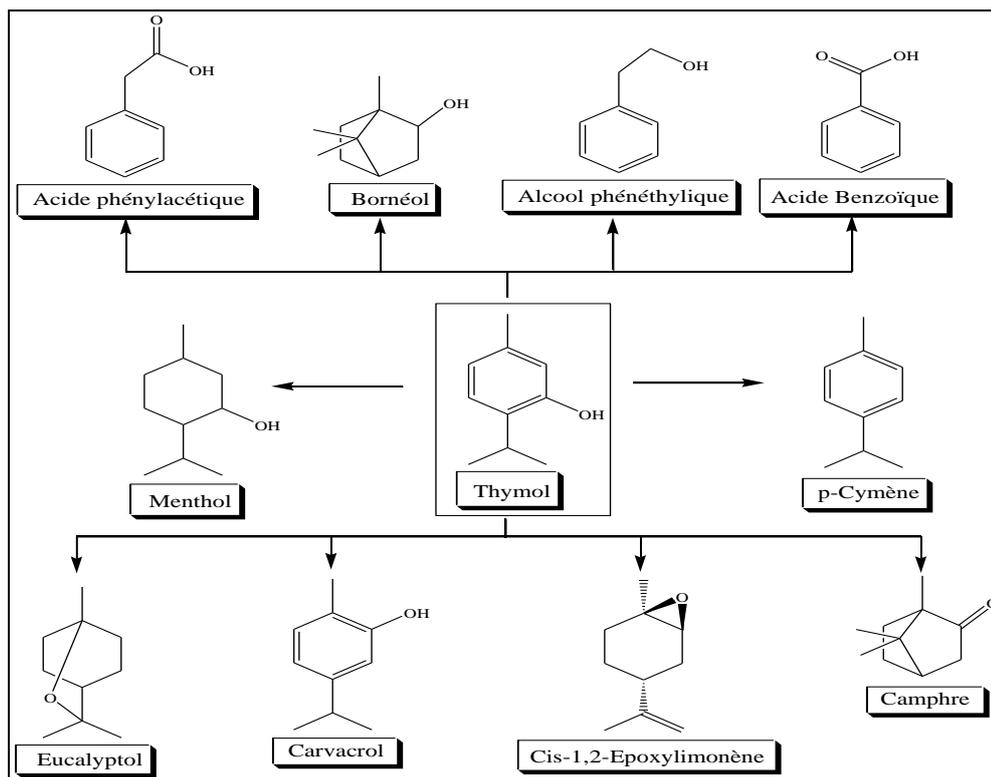


Figure 41 : Voies métaboliques de la biotransformation du thymol par la souche 17R

Dans la présente étude, la biotransformation du thymol par la souche 17 R a permis d'obtenir sept monoterpènes oxygénés (eucalyptol, cis-1,2- époxy limonène, camphre, bornéol, menthol, p-cymène-8-ol et carvacrol) et un seul monoterpène hydrocarboné (le p-cymène), deux acides (l'acide benzoïque et l'acide phénylacétique) et un alcool (l'alcool phénéthylique). Les différents produits obtenus sont décrits pour la première fois et n'ont jamais été rapportés dans la littérature.

• Voies plausibles de biotransformation du thymol

Sur la base des résultats obtenus, il semble que la souche favorise la voie d'oxydation du substrat (thymol). Les monoterpènes oxygénés (eucalyptol, cis-1,2- époxy limonène, camphre, bornéol, menthol, p-cymène-8-ol et carvacrol) sont obtenus via plusieurs étapes, le réarrangement de Wagner-Meerwein, l'hydrogénation des liaisons C=C, la déshydratation suivie d'une oxydation (Figures 42-45). L'hydrocarbure monoterpénique, à savoir le p-cymène, est atteint via une réaction de déshydratation dans laquelle le thymol perd une molécule d'eau (Figure 46).

Tandis que les deux acides (l'acide benzoïque et l'acide phénylacétique) ainsi que l'alcool phénéthylique sont obtenus à partir d'une réaction d'aromatisation et de déshydratation

suivies d'une désalkylation et d'une oxydation pour les acides et d'une réduction pour l'alcool (Figures 47 et 48). La voie d'oxydation est couramment impliquée dans les processus de biotransformation du thymol.

Selon la littérature, la biotransformation du thymol par différents microorganismes (*Aspergillus niger* [182], *Synechococcus Sp.* MCCS 034 [23, 183], *Colletotrichum acutatum* et *Botryodiplodia theobromae* [184], *Streptomyces humidus* Tu-1 [140, 148], *Pseudomonas* [140, 185]) conduit également à la formation de plusieurs produits rapportés comme produits d'oxydation indiqué dans la partie bibliographique (partie I).

Cette partie nous a permis de confirmer le fait que les produits d'oxydation des terpènes sont majoritairement des composés oxygénés, cycliques ou non, polaires, possédant des groupements fonctionnels qui augmentent leurs poids moléculaires et les rendent donc moins volatils.

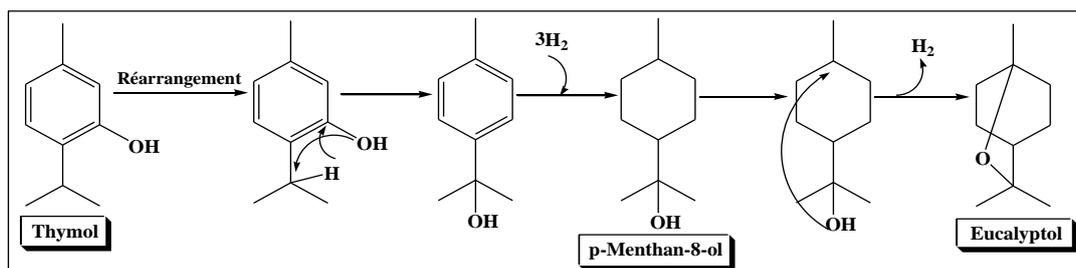


Figure 42 : Voie proposée de biotransformation du thymol en eucalyptol

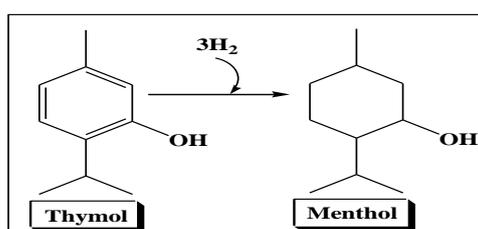


Figure 43 : Voie proposée de biotransformation du thymol en menthol

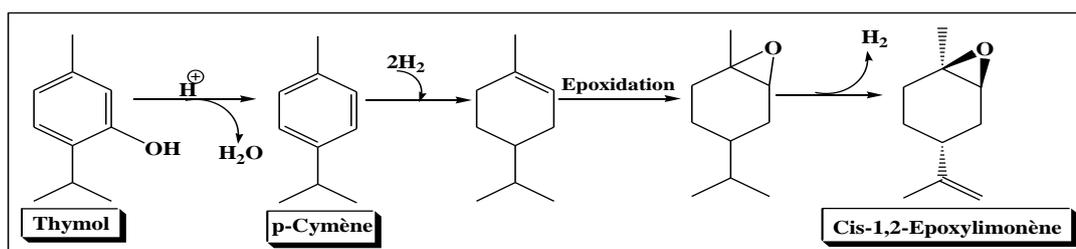


Figure 44 : Voie proposée de biotransformation du thymol en cis-1,2 epoxyimonène

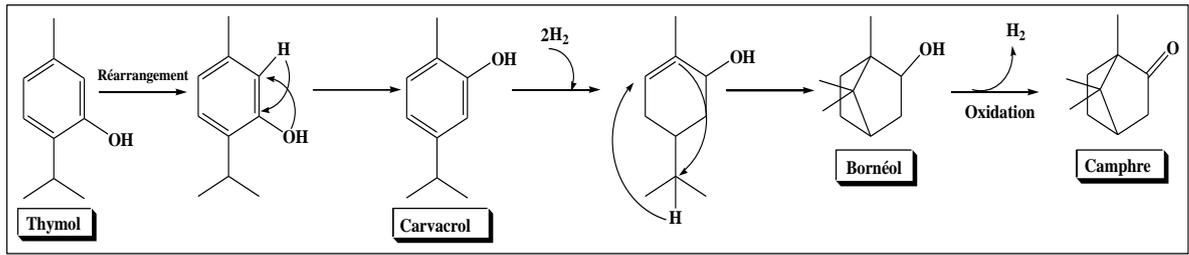


Figure 45 : Voie proposée de biotransformation du thymol en carvacrol, bornéol et camphre

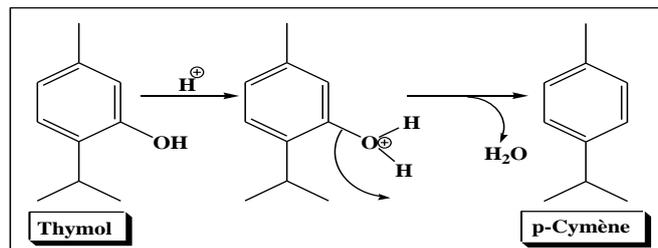


Figure 46 : Voie proposée de biotransformation du thymol en p-cymène

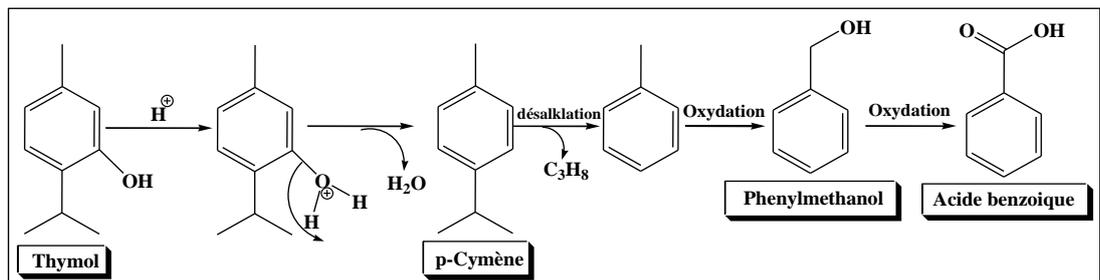


Figure 47 : Voie proposée de biotransformation du thymol en acide benzoïque

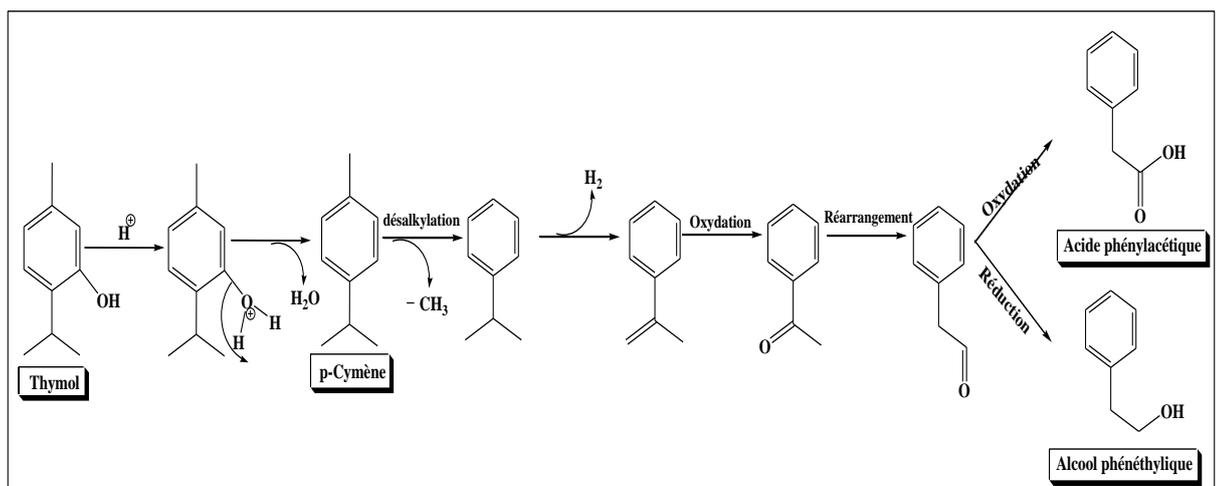


Figure 48 : Voie proposée de biotransformation du thymol en alcool phénythylique et acide phénylacétique

3.6.4.3. Biotransformation du cymène par la souche 17R

Les principaux produits obtenus à partir de la biotransformation du cymène sont regroupés dans le tableau 13 et la figure 49.

Tableau 13 : Métabolites issus de la biotransformation du cymène par la souche 17R

N°	Tr (min)	Nom du composé	L _R Ical	L _R Ilit	Data base	(%) aire	
						1 jour	7 jours
1	6.80	p-Cymène	1025	1025	FFNSC ; W11N17	18.33	-
2	10.01	Alcool phénéthylique (Benzèneéthanol)	1113	1113	FFNSC ; W11N17	-	0.10
3	10.95	Cis-1,2- Epoxy limonène	1136	1134 Nist	W11N17 ; FFNSC	-	0.12
4	11.36	Camphre	1146	1149	FFNSC ; W11N17	-	0.11
5	11.40	Bornéol	1149	1156	W11N17	-	t
6	12.06	Acide Benzoïque	1160	1159	W11N17 ; FFNSC	-	0.80
7	12.51	Menthol	1173	1169	W11N17 ; FFNSC	14.07	19.01
8	12.99	p-Cymène-8-ol	1185	1189	FFNSC ; W11N17	0.32	0.55
9	15.94	Acide phénylacétique	1249	1249	W11N17 ; FFNSC	0.66	3.12
10	17.69	Thymol	1292	1293 Nist	W11N17 ; FFNSC	66.61	76.17
11	17.75	Carvacrol	1298	1300 Nist	FFNSC	t	t

t: trace (< 0.1%)

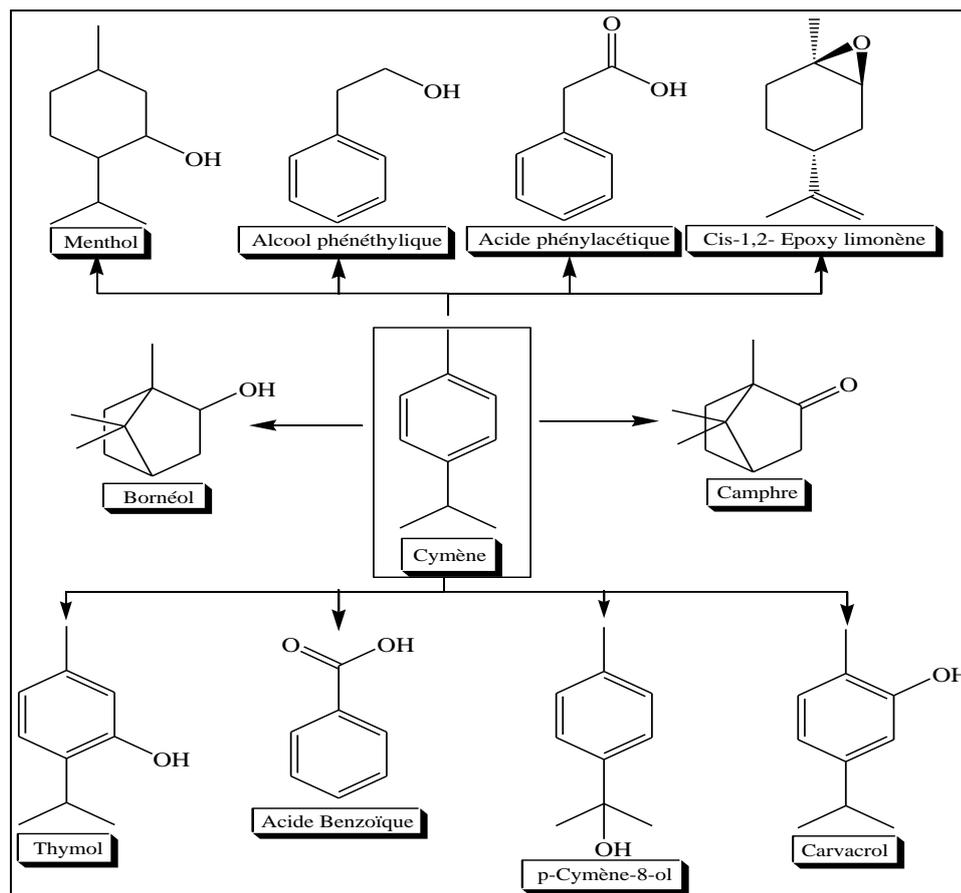


Figure 49 : Voies métaboliques de la biotransformation du cymène par la souche 17R

La transformation microbienne du cymène par la même souche 17R en utilisant les mêmes conditions a été examinée. Dix métabolites ont été identifiés, dont quatre composés ont été identifiés au premier jour de la transformation représentant 81,6 % de la biotransformation du cymène, et huit autres ont été identifiés au 7^{ème} jour de la biotransformation représentant 99.9 % de la composition totale, dont le thymol (66.61 % au 1^{er} jour et 76.17 % au 7^{ème} jours) [140, 192], le menthol (14.07 % au 1^{er} jour et 19.01 % au 7^{ème} jours), le p-cymène-8-ol (0.32 % au 1^{er} jour et 0.55 % au 7^{ème} jours) [189], le cis-1,2-époxy limonène (0.12 % au 7^{ème} jours), le camphre (0.11 % au 7^{ème} jours), l'acide phénylacétique (0.66 % au 1^{er} jour et 3.12 % au 7^{ème} jours), l'acide benzoïque (0.80 % au 7^{ème} jours), l'alcool phénéthylique (0.10 % au 7^{ème} jours) [189], et deux autres composés à l'état de trace, le bornéol et le carvacrol.

- **Voies plausibles de biotransformation du cymène**

Au vu des résultats obtenus, nous concluons que cette souche est capable de biotransformer le cymène en plusieurs métabolites ayant une valeur plus élevée et une utilisation commerciale plus large.

Comme nous l'avons vu précédemment, la biotransformation du cymène par la souche 17R applique les mêmes réactions biocatalytiques (voies métaboliques similaires) que les deux autres biotransformations du menthol et du thymol, ce qui donne lieu à l'obtention des métabolites relativement semblables (Figure 50-56).

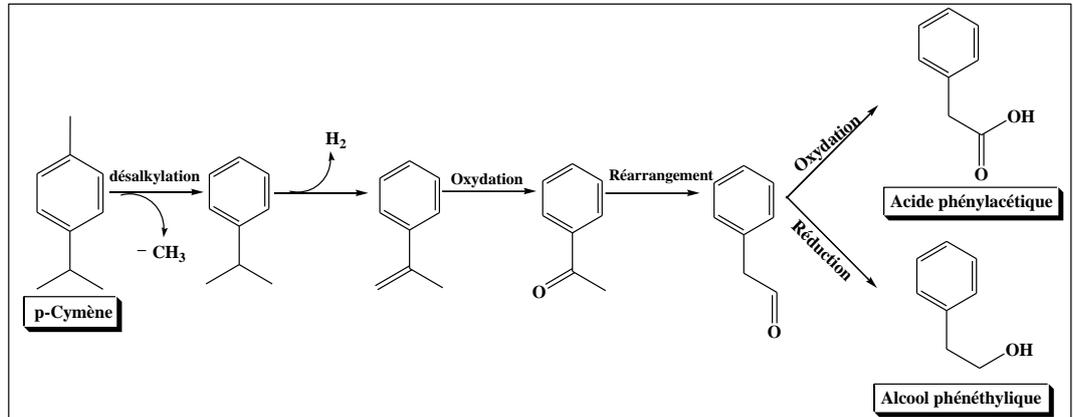


Figure 50 : Voie proposée de biotransformation du cymène en alcool phényéthylrique et acide phénylacétique

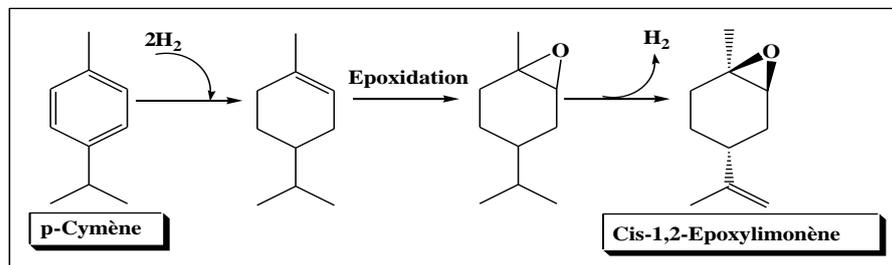


Figure 51 : Voie proposée de biotransformation du cymène en cis-1,2- epoxy limonène

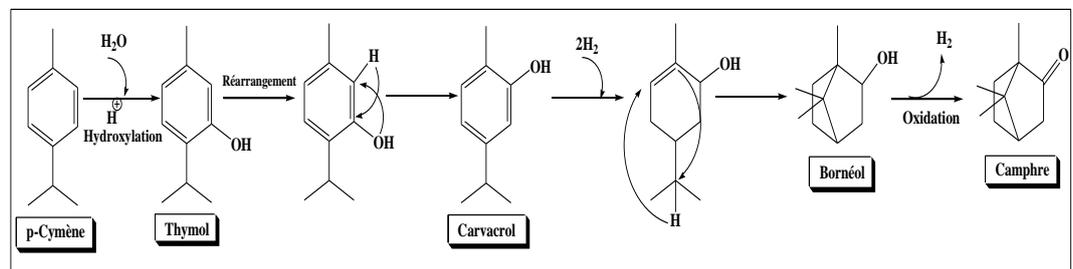


Figure 52 : Voie proposée de biotransformation du cymène en bornéol et camphre

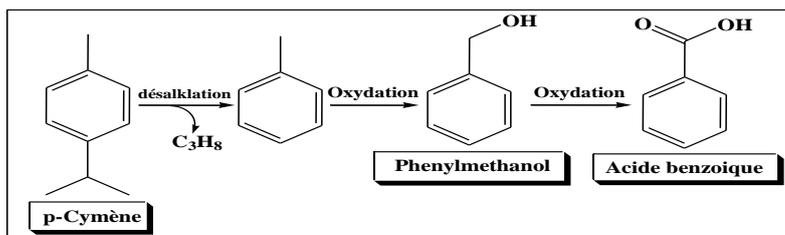


Figure 53 : Voie proposée de biotransformation du cymène en acide benzoïque

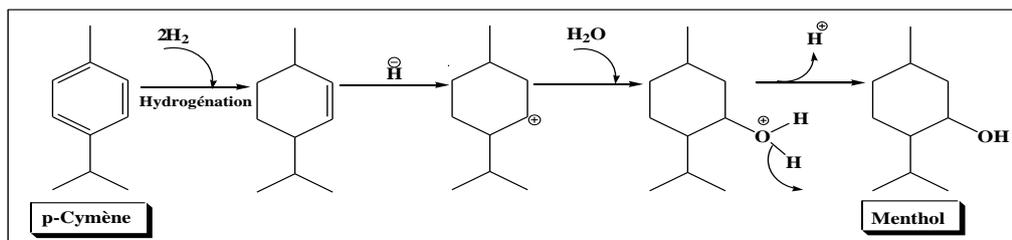


Figure 54 : Voie proposée de biotransformation du cymène en menthol

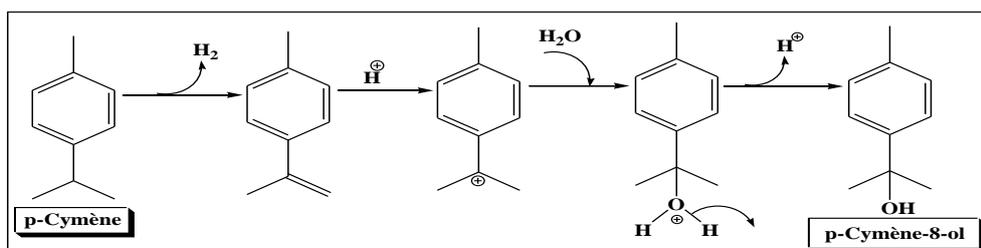


Figure 55 : Voie proposée de biotransformation du cymène en p-cymène-8-ol

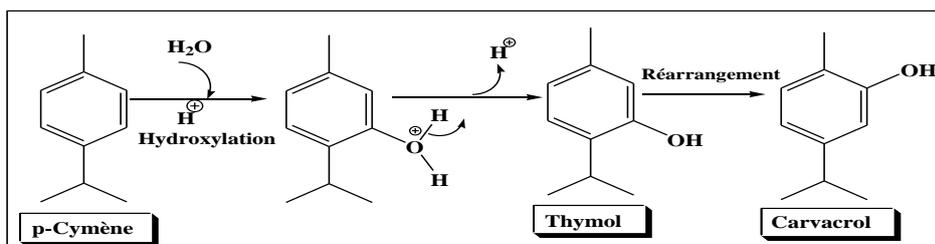


Figure 56 : Voie proposée de biotransformation du cymène en thymol et carvacrol

D'après notre revue exhaustive de la littérature (partie I), aucune étude sur la biotransformation du menthol, thymol et cymène n'a été réalisée en utilisant une souche bactérienne du genre *Bacillus*.

A notre connaissance, la souche 17R du genre *Bacillus* a été nouvellement isolée de l'algue rouge *Asparagopsis armata*. Elle a été utilisée pour la première fois dans notre cas dans la biotransformation de trois monoterpènes : menthol, thymol et cymène.

La souche isolée 17R a montré un bon potentiel dans l'étude de la biotransformation de trois monoterpènes : menthol, thymol et cymène. Des composés intéressants tels que le 8-hydroxymenthol, le thymol, le carvacrol, l'acide benzoïque, et l'acide phénylacétique, ont été produits à partir du menthol, tandis que l'eucalyptol, le cis-1,2-époxy limonène, le camphre, le bornéol, le menthol, le p-cymène-8-ol, le carvacrol, le p-cymène, l'acide benzoïque, l'acide phénylacétique, et l'alcool phénéthylique ont été produits à partir du thymol, et en fin le thymol, le menthol, le p-cymène-8-ol, le cis-1,2-époxy limonène, le camphre, le bornéol, le carvacrol, l'acide phénylacétique, l'acide benzoïque, et l'alcool phénéthylique ont été produits à partir du cymène. Ce processus implique la modification d'une substance à l'aide des enzymes biocatalytiques (biocatalyseurs) qui effectuent diverses réactions biochimiques comme : l'oxydation y compris l'hydroxylation et la cétonisation, qui se produisent à différentes positions, l'époxydation, la déshydrogénation des liaisons C-C, l'oxydation des alcools et des aldéhydes, la dégradation oxydative des chaînes d'alkyle et de carboxyalkyle, l'élimination oxydative des substituants, la désamination oxydative, l'oxydation des fonctions hétéro et le clivage oxydative du cycle. Il y a également la réduction des acides organiques, des aldéhydes, des cétones, l'hydrogénation des liaisons C=C, la réduction des fonctions hétéro, la déshydroxylation et l'élimination réductrice des substituants. Il faut noter aussi les réactions d'hydrolyse d'esters, d'amines, d'amides, de lactones, etc, l'hydratation des liaisons C=C et des époxydes ainsi que l'estérification, l'isomérisation et le réarrangement. Certains des terpénoïdes irréguliers, générés par la biodégradation ou le réarrangement, sont difficiles à obtenir ou ne peuvent pas être obtenus par un processus chimique de routine.

Ce travail représente une étape très prometteuse vers une future application industrielle des microorganismes pour la biotransformation des monoterpènes naturels, disponible en

abondance, afin de produire des produits aromatiques de grande valeur ajoutée. Les produits biotransformés sont classés aussi comme des « produits naturels », ce qui suggère un grand potentiel de marché.

La biotransformation microbienne est donc une approche nouvelle et attrayante de l'utilisation de monoterpènes naturels abondants et offre des possibilités infinies pour obtenir certains composés importants qui peuvent être utilisés dans les domaines de la médecine, la synthèse organique et la chimie fine.

**CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les objectifs de notre travail étaient d'une part d'isoler et d'évaluer les propriétés biotechnologiques chez une collection des souches bactérienne nouvellement isolées à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata* récoltée sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique « Corne d'Or » à l'Est de Tipaza, et d'autre part d'étudier la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche bactérienne 17R isolée d'*Asparagopsis armata*. Pour atteindre ces objectifs, les travaux réalisés durant cette thèse ont été décrits dans deux grands chapitres successivement développés dans ce manuscrit.

Le premier chapitre a été consacré à la diversité bactérienne de l'algue rouge *Asparagopsis armata* et à leurs propriétés biotechnologiques (Antimicrobiennes, Protéolytiques, Hémolytiques et Biosurfactants) d'intérêts bioactif et environnemental, dans laquelle nous avons tenté de donner, une approche générale sur les algues marines notamment les algues rouges et les microorganismes associés en particulier le genre *Bacillus*. Elle a permis de passer en relief la classification des algues marines et l'étude systématique de l'espèce étudiée *Asparagopsis armata*, nous avons complété cette section en présentant les concepts liés aux métabolites secondaires biologiquement actifs et aux enzymes protéolytiques et biosurfactants dérivés de microorganismes associés aux algues marines et leurs applications biotechnologiques dans les différents domaines, dans laquelle nous avons essayé de regrouper les étapes et les procédures nécessaires pour la recherche et la découverte de ces composés bioactifs d'origine microbienne.

Le nombre total de bactéries associées à l'algue rouge était de vingt-cinq souches bactériennes cultivables en milieu de culture *Väätänen Nine Salt Solution* (VNSS). L'identification de ces isolats a été basée sur les caractéristiques morphologiques (étude macroscopique et microscopique) et les différents tests biochimiques et métaboliques (catalase, oxydase, mannitol-mobilité, et le type respiratoire). Les résultats obtenus ont permis de classer les isolats en deux genres micromorphologiques différents, 9 souches du genre *Staphylococcus* et 16 souches du genre *Bacillus*. En ce qui concerne les caractéristiques biochimiques et métaboliques, toutes les souches isolées sont catalases

positives, 16 souches sont oxydases positives alors que les autres souches sont oxydases négatives et toutes les souches sont des aéro-anaérobies facultatives. Ainsi, le deuxième but de cette section concerne l'évaluation de leur capacité à exercer une activité antimicrobienne, protéolytique, hémolytique et de surface. Cette étape est complétée par la sélection des souches performantes pour des études de production et d'optimisation de ces activités.

Le criblage a permis d'obtenir un total de 13 isolats parmi les 25 souches bactériennes criblées pour leur potentiel de production de molécules antimicrobiennes, qui se sont révélés actifs contre les germes cibles (6 souches ont une activité antibactérienne tandis que 7 souches ont une activité antifongique). Quatorze souches produisant des protéases avec des halos plus importants, dix-sept souches ont une activité hémolytique positive parmi lesquelles 13 isolats ont montré une production considérable de biosurfactants. L'examen de l'ensemble des résultats obtenus, a conduit à la sélection des 10 souches bactériennes performantes notamment la souche 17R qui présentaient des activités de surface, hémolytiques, protéolytiques et antimicrobiennes.

Le deuxième chapitre a été réservé à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) en d'autres métabolites secondaires en utilisant une souche bactérienne 17R du genre *Bacillus*, nouvellement isolée des niches écologiques de l'Algérie à partir de l'algue rouge *Asparagopsis armata*. Il a été organisé selon l'ordre suivant : nous avons exposé dans la première partie l'ensemble des connaissances associées à la biotransformation des terpènes (monoterpènes) en particulier ; menthol, thymol et cymène par différents microorganismes notamment le genre *Bacillus*, dans laquelle nous visons à définir la biotransformation avec ses avantages et ses difficultés, étudier les différents facteurs affectant la biotransformation et présenter l'action des microorganismes sur les métabolites secondaires et la possibilité de dégradation de ces composés par différents types de microorganismes . Nous terminons cette partie par exposer les différents travaux de recherche portant sur les voies métaboliques et les principaux produits formés réalisés dans la bibliographie

Tout d'abord, nous avons réalisé une analyse préliminaire par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) afin d'évaluer la pureté chimique des trois monoterpènes utilisés dans la biotransformation. Ainsi, nous avons enchainé par

l'étude des facteurs influençant la biotransformation comprenant la concentration du substrat, le pH, la température et Surfactants. Il en ressort que la meilleure croissance cellulaire de la souche 17R (meilleure biotransformation) a été obtenue en utilisant un milieu *Luria-Bertani* (LB) liquide à pH=8.5, température d'incubation de 30 °C, avec l'utilisation de Tween 80 à 1 % comme surfactant et avec des concentrations de 0.1 ; 0.25 et 0.5 mg/mL pour le menthol, cymène et thymol, respectivement.

L'analyse CG/SM de la phase organique a montré différents profils chromatographiques des métabolites secondaires obtenus à partir de la biotransformation du menthol, thymol et cymène dont la majorité ont été décrites pour la première fois et n'ont jamais été rapportés dans la littérature. L'examen des chromatogrammes révèle la présence de plusieurs produits (mélange d'hydrocarbures, des monoterpènes oxygénés, des acides et des alcools) qui peuvent être divisés en deux groupes, le premier groupe comprend 09 composés (eucalyptol, cis-1,2- époxy limonène, camphre, bornéol, menthol, , lp-cymène, acide benzoïque, acide phénylacétique et carvacrol) ont été décrits pour la première fois dans la biotransformation du menthol, thymol et cymène et un second groupe rassemblant 04 composés précédemment rapportés : le 8-hydroxymenthol dans la biotransformation du menthol et le p-cymène-8-ol, l'alcool phénéthylrique et le thymol dans la biotransformation du cymène. Les résultats montrent que cette souche bactérienne possède des capacités biocatalytiques distinctes vis-à-vis les trois monoterpènes (menthol, thymol et cymène). De nombreux composés terpénoïdes différents peuvent être testés pour les réactions de biotransformation avec la même souche 17R.

La biotransformation fournit un indice important sur le fait que les substrats monoterpéniques peuvent moduler la production de métabolites microbiens, en particulier pour les terpénoïdes. La conversion de molécules d'une forme à une autre au sein d'un organisme a souvent été associée à un changement (augmentation, diminution ou faible changement) de l'activité pharmacologique, se réfère en particulier aux médicaments et autres xénobiotiques.

Les perspectives envisageables au terme de cette thèse sont :

- ✓ Identification moléculaire du gène de l'ARNr 16S des souches bactériennes isolées d'*Asparagopsis armata*.

- ✓ Exploiter les potentialités biotechnologiques des souches bactériennes marines isolées pour une production optimisée à l'échelle laboratoire puis en fermenteur et à l'échelle pilote et industrielle.

- ✓ Il serait très utile d'utiliser ces souches dans la biotransformation d'un grand nombre de monoterpènes avec des squelettes différents afin d'élucider clairement les différentes voies métaboliques impliquées.

- ✓ Identification de diverses enzymes impliquées dans les voies métaboliques des monoterpènes, qui seraient utiles en synthèse organique et économiques pour les processus de production industrielle en raison de leur efficacité catalytique élevée et de leur chimio, régio et stéréospécificité.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications scientifiques :

1. **SAIDANI Fatiha**, BEICHI Madjeda, FERRADJI Fatma-Zohra, EL HATTAB Mohamed, BADIS Abdelmalek, « Inventory for biologically-actives substances (antimicrobial, proteolytic, hemolytic, and biosurfactants) of marine bacteria isolated from the red algae *Asparagopsis armata* », *Revue Agrobiologia* (2021), 11 (2): 2801-2809.

Communications Nationales et internationales :

Communications Nationales :

- 1^{ère} Journées Nationale de Génie de l'Environnement et Développement Durable (GEDD2019), le 15 Décembre 2019, Université Blida 1, « Biotransformation de l' α -pînène par une souche bactérienne d'origine marine nouvellement isolée de l'algue rouge *Asparagopsis armata* », **SAIDANI Fatiha**, BEICHI Madjeda, FERRADJI Fatma-Zohra, BADIS Abdelmalek, EL HATTAB Mohamed.
- 1^{ère} Séminaire National sur la Chimie Analytique, Matériaux et Substances Naturelles CAMSN2019, le 17 Décembre 2019, Université Blida 1, « Mise en évidence des propriétés technologiques chez des souches microbiennes marines isolées de l'algue rouge *Asparagopsis armata* : Emulsifiante, Hymolytique, Protéolytique et Antimicrobienne », **SAIDANI Fatiha**, BEICHI Madjeda, FERRADJI Fatma-Zohra, BADIS Abdelmalek, EL HATTAB Mohamed.
- 2^{ème} Salon National des Produits de la Recherche, tenu au Palais des Expositions, Pins Maritimes - SAFEX- Alger du 02 au 04 juillet 2018, « Deux nouvelles Kératinases à fort potentiel technologique : Application industrielle. », **SAIDANI Fatiha**, KHELOUIA Lamia, BADIS Abdelmalek.

Communications internationales :

- Journée Internationale Biosciences 2018 de Génie enzymatique et production de métabolites, le 28 et 29 octobre 2018, Université d'Oran, « New production of bioactive compounds by biotransformation of α -pinene using the marine bacteria », **SAIDANI Fatiha**, BEICHI Madjeda, FERRADJI Fatma-Zohra, MESBAIAH Fatma-Zohra, HAMICHE Sonia, BADIS Abdelmalek, EL HATTAB Mohamed.
- First International Congress on Biotechnologies for Sustainable Development CIBSDD 2017, le 24-25 October, Boumerdes, « Contribution à l'étude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinene par des souches du genre *Bacillus* et *Streptomyces*. », **SAIDANI Fatiha**, BEICHI Madjeda, FERRADJI Fatma-Zohra, MESBAIAH Fatma-Zohra, HAMICHE Sonia, BADIS Abdelmalek, EL HATTAB Mohamed.
- Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM-2020) organized in University of Larbi Tebessi- Tebessa (Algeria) on February 25 to 27, 2020, « Screening of Marine-derived bacteria isolated from the red algae used in biotransformation of natural products », **SAIDANI Fatiha**, BEICHI Madjeda, FERRADJI Fatma-Zohra, BADIS Abdelmalek, EL HATTAB Mohamed

APPENDICES

APPENDICE A : LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ATCC : American Type Culture Collection

ARNr : Acide RiboNucléique Ribosomique

AN : *Agar Nutritif*

AAF : Aéro-anaérobie Facultatif

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CG/SM : Chromatographie en phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse

DDP : Diamètre du Déplacement du Pétrole brut

EI : Ionisation Electronique

GN : *Gélose Nutritif*

GNL : *Gélose Nutritive au Lait*

LB : Milieu *Luria Bertani*

L_{Rical} : Indice de rétention linéaire calculé

L_{RILit} : Indice de rétention linéaire littérature

MM : Milieu Minéral

PDA : *Gélose dextrosée à la pomme de terre (Potato Dextrose Agar)*

PPG : Pyrophosphate de Géranyl

PPF : Pyrophosphate de Farnésyle

PPGG : Pyrophosphate de Géranylgéranyle

Tr : Temps de Rétention

UFC : Unités Formant Colonies

VNSS : *Väätänen Nine Salt Solution*

VF : Viande-Foie

dh : diamètre du halo

dc : diamètre de colonie

dh/dc : rapports de diamètre du halo par rapport au diamètre de colonie

eV : électron-Volt

mVOCs : Composés organiques volatils microbiens (Microbial Volatile Organic Compounds)

pH: Potentiel Hydrogène

rpm : Rotation par minute

tr.min⁻¹ : tourne par minute

°C : Degré Celsius

APPENDICE B : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Milieu Vääänen Nine Salt Solution (VNSS)

NaCl	17.60 g
Na ₂ SO ₄	1.47 g
NaHCO ₃	0.08 g
KCl	0.25 g
KBr.....	0.04 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	1.87 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.41 g
SrCl ₂ .6H ₂ O	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01g
Peptone.....	1.00 g
Extrait de levure.....	0.50 g
Glucose.....	0.50 g
Amidon soluble.....	0.50 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.01 g
Na ₂ HPO ₄	0.01 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu Luria Bertani (LB)

Peptone.....	10 g
Extrait de levure	5.0 g
NaCl.....	10 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu Gélose Nutritif (GN)

Peptone.....	5.0 g
Extrait de levure	2.0 g
Extrait de bœuf	1.0 g
NaCl.....	5.0 g
Agar	15.0 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu 333

Glucose.....	5.0 g
Peptone.....	3.0 g
Extrait de levure.....	3.0 g
Amidon.....	10 g
CaCO ₃	2.0 g
NH ₄ NO ₃	3.0 g
Eau distillée.....	1000 mL

Milieu Bennett

Glucose.....	10 g
Peptone.....	2.0 g
Extrait de levure.....	1.0 g
Extrait de viande.....	1 g
Eau distillée.....	1000 mL

Milieu Gélose Nutritive au Lait (GNL)

Extrait de levure.....	3.0 g
Peptone.....	5.0 g
Agar.....	15 g
Lait écrémé	250 mL
Eau distillée	1000 mL

Solution Tampon Phosphate Salin

NaCl.....	8.0 g
KCl.....	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu Minéral MM

NH ₄ Cl	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g

KH₂PO₄ 0.3 g
NaCl 10 g
MgCl₂ 0.33 g
CaCl₂ 0.05 g
Extrait de levure 0.1 g
Solution des oligo-éléments 1 mL
Eau distillée 1000 mL

Solution des oligo-éléments

CuSO₄.5H₂O 0.64 g
FeSO₄.7H₂O 0.11 g
MnCl₂.4H₂O 0.79 g
ZnSO₄.7H₂O 0.15 g
Eau distillée 1000 mL

Milieu Marine Agar 2216

Peptone 5.0 g
Extrait de levure..... 1.0 g
NaCl 19.45 g
MgCl₂.6H₂O 8.8 g
Na₂SO₄..... 3.24 g
CaCl₂.2H₂O 1.8 g
KCl 0.55 g
NaHCO₃ 0.16 g
KBr 0.08 g
SrCl₂.6H₂O 34.0 mg
H₃BO₃ 22.0 mg
Na₂SiO₃ 4.0 mg
NaF 2.4 mg
C₆H₅FeO₇ 0.1 g
NH₄NO₃ 1.6 mg
Na₂HPO₄ 8.0 mg
Agar 15.0 g

Eau distillée 1000 mL

Milieu Zobell

Peptone 5.0 g

Extrait de levure..... 1.0 g

Eau de mer filtrée..... 800 mL

Eau ultra-pure 1000 mL

Milieu Mueller Hinton

Peptone..... 17.50 g

Extrait de bœuf2.00 g

Amidon..... 1.50 g

Agar 17.00 g

Eau distillée 1000 mL

Milieu Sabouraud

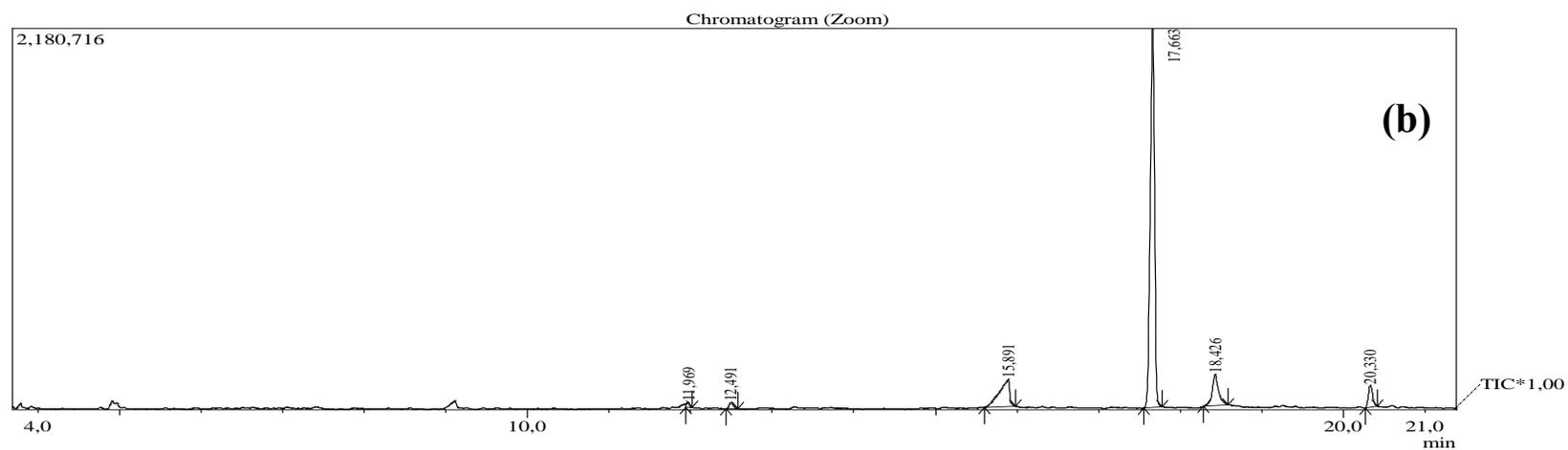
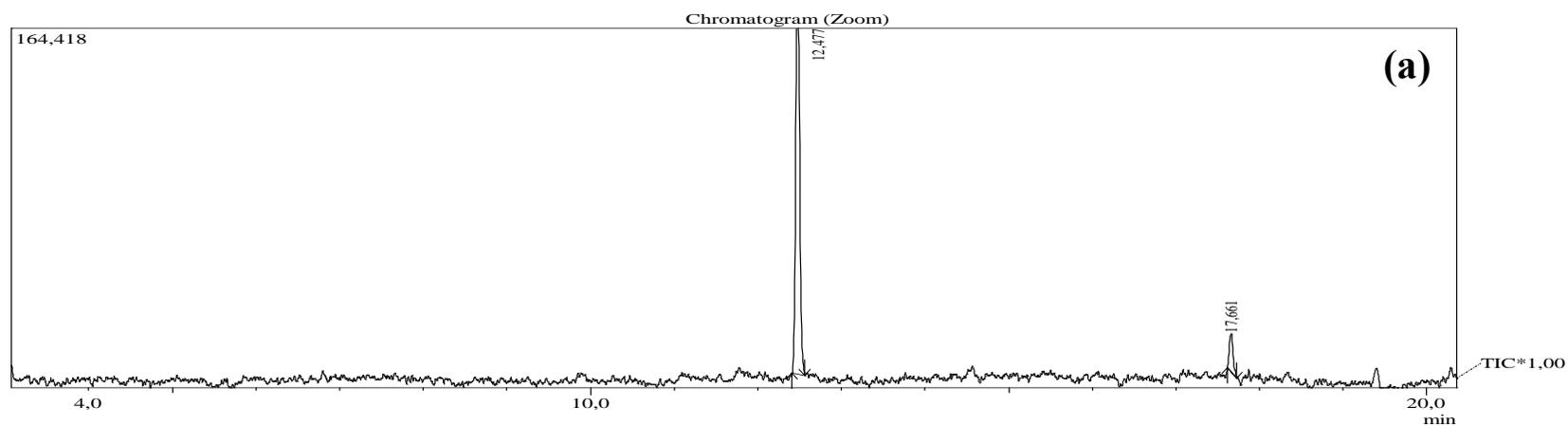
Peptone..... 10.0 g

Glucose ou Dextrose 40.0 g

Agar 15.0 g

Eau distillée 1000 mL

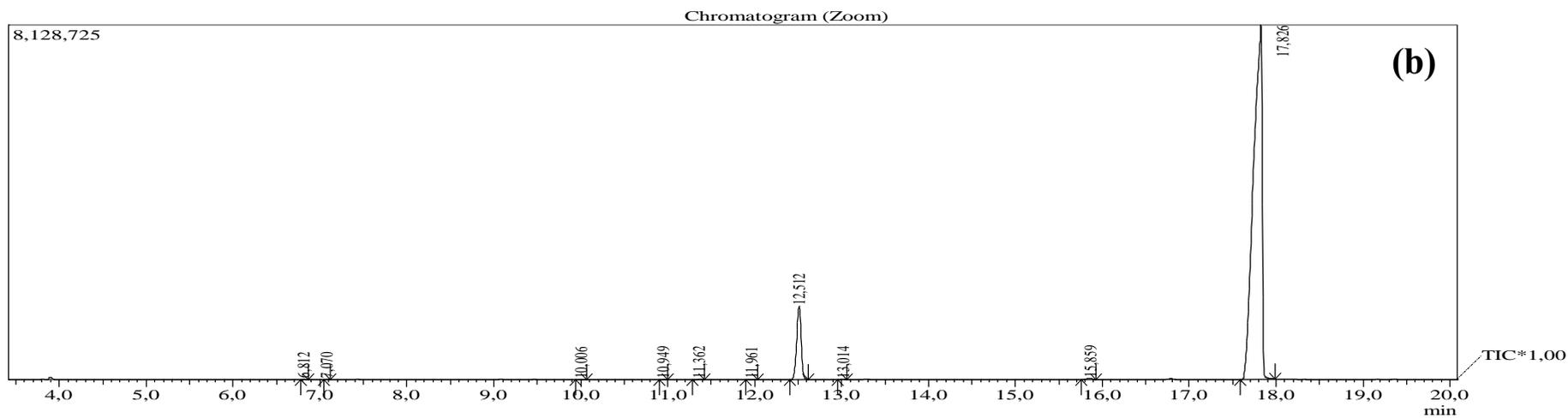
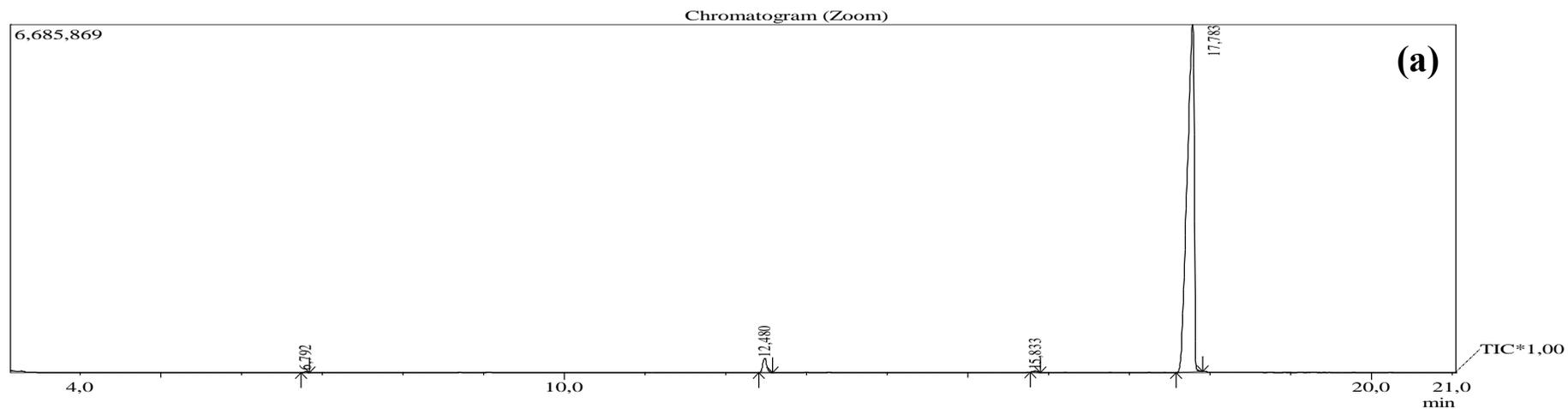
APPENDICE C : PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES DES METABOLITES SECONDAIRES OBTENUS A PARTIR DE LA BIOTRANSFORMATION DU MENTHOL, THYMOL ET CYMENE PAR LA SOUCHE 17R



Profils chromatographiques des métabolites secondaires obtenus à partir de la biotransformation du menthol par la souche 17R

(a) : Biotransformation après 1 jour d'incubation

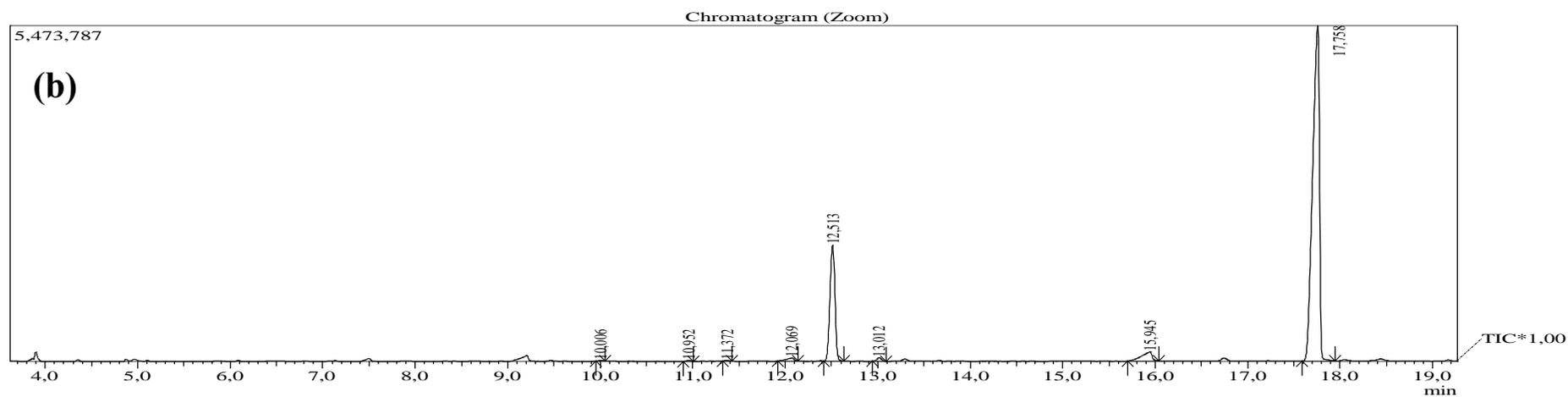
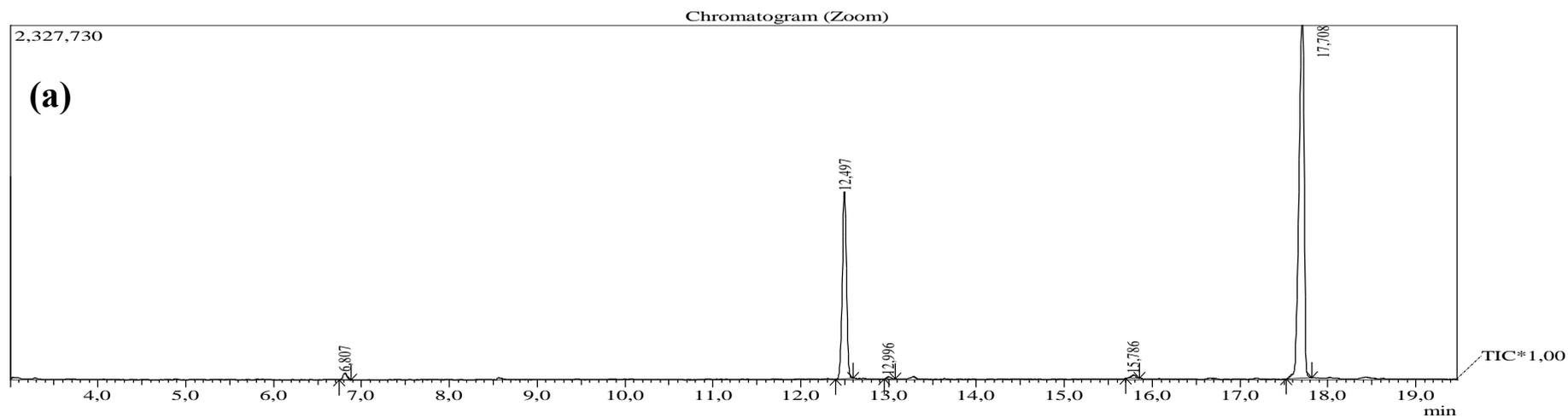
(b) : Biotransformation après 7 jours d'incubation



Profils chromatographiques des métabolites secondaires obtenus à partir de la biotransformation du thymol par la souche 17R

(a) : Biotransformation après 1 jour d'incubation

(b) : Biotransformation après 7 jours d'incubation



Profils chromatographiques des métabolites secondaires obtenus à partir de la biotransformation du cymène par la souche 17R

(a) : Biotransformation après 1 jour d'incubation

(b) : Biotransformation après 7 jours d'incubation

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Radmer, R.J., and Parker, B.C., « Commercial application of algae: opportunities and constraints », *Journal of Applied Phycology*, V. 6, (April 1994), 93-98.
- [2] Lakhdar, F., « Contribution à l'étude des potentialités antiproliférative et antibactérienne des algues brunes et rouges de la côte d'El Jadida pour une valorisation médicale et environnementale », Thèse de Doctorat, Université de NANTES, (Juin 2018).
- [3] Saunders, G.W., and Hommersand, M.H., « Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data », *American Journal of Botany*, V. 91, n° 10, (October 2004), 1494-1507.
- [4] Zitouni, H., « Valorisation nutritionnelle d'algues marines du littoral Algérien chez le ruminant via des méthodes chimiques, biologiques et moléculaires », Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle LMD en Biotechnologies microbiennes, Université des Frères Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie, (Juillet 2015).
- [5] Das, S., Lyla, P.S., Khan, S.A., « Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives », *Current Science*, V. 90, n° 10, (May 2006), 1325-1335.
- [6] Zhang, C., and Kim, S.K., « Application of Marine Microbial Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries », *Advances in Food and Nutrition Research*, V. 65, (January 2012), 423-435.
- [7] Susilowati, R., Sabdono, A., and Widowati, I., « Isolation and characterization of bacteria associated with brown algae *Sargassum spp.* from Panjang Island and their antibacterial activities », *Procedia Environmental Sciences*, V. 23, (January 2015), 240-246.
- [8] El Gamal, A. A., « Biological importance of marine algae », *Saudi Pharmaceutical Journal*, V. 18, n°1, (January 2010), 1-25.

- [9] Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., and Imhoff, J.F., « Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria », *Marine Ecology Progress Series*, V. 409, (June 2010), 267-299.
- [10] Debbab, A., Aly, A.H., Lin, W.H., and Proksch, P., « Bioactive compounds from marine bacteria and fungi », *Microbial biotechnology*, V. 3, n° 5, (August 2010), 544-563.
- [11] Brent, E., Janet, E.N. and Paul, W., « Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals », *Biotechnology Journal*, V. 7, n° 2, (February 2012), 176-185.
- [12] Molina, G., Pimentel, M.R., and Pastore, G.M., « Pseudomonas: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes », *Applied Microbiology Biotechnology*, V. 97, (January 2013), 1851-1864.
- [13] Suresh, B., Ritu, T., and Ravishankar, G.A., « Biotransformations as applicable to food industries », In: Shetty K, Paliyath G, Pometto A, Levin RD (eds) *Food biotechnology*, edn. Marcel Dekker, New York, (2006), 1655-1690.
- [14] Bousaab, H., « Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica* », Thèse de doctorat, Université de Haute Alsace-Mulhouse, France, (Juillet 2011).
- [15] Molina, G., Pinheiro, D.M., Pimentel, M.R., dos Ssanros, R., and Pastore, G.M., « Monoterpene Bioconversion for the Production of Aroma Compounds by Fungi Isolated from Brazilian Fruits », *Food Science Biotechnology*, V. 22, n° 4, (August 2013), 999-1006.
- [16] Shannon, E., and Abu-Ghannam, N., « Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications », *Marine Drugs*, V. 14, n° 4, (April 2016), 81 p.
- [17] Guezennec, J., and Debitus, C., « Les ressources marines de la Polynésie française : applications en matière biotechnologique », *Substances naturelles en Polynésie française : Stratégies de valorisation*, IRD, Montpellier, (2005).

- [18] Zehlila, A., « Caractérisation structurale et fonctionnelle des métabolites de l'algue verte *Ulva Rigida* au moyen d'une approche protéomique », Thèse de doctorat, Université de Rouen Normandie et de la Faculté des Sciences de Tunis, (Juin 2017).
- [19] Ribier, J., and Godineau, J.C., « Les algues-Connaissances, utilisation, culture », Paris : Ed. Flammarion, (1984), 281 p.
- [20] Gayral, P. and Cosson, J., « Connaitre et reconnaitre les algues marines », Ouest France : (1986), 222 p.
- [21] Garon-Lardiere, S., « Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (*Bonnemaisoniales*) », Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Ecole doctorale des sciences de la matière, de l'information et du vivant, (Février 2004).
- [22] Lûning, K. and Dring, M.J., « Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli », *Marine Biology*, V. 87, (March 1985), 119-129.
- [23] Lûning, K., « Seaweeds Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology », John Wiley and Sons, (1990), 527 p.
- [24] Boudouresque, C.F., Meinesz, A. and Verlaque, M., « Guide des algues des mers d'Europe : méditerranée », Paris : Ed. Delachaux et Niestlé, (2006), 239-226.
- [25] Pitton de Tournefort, J., « Éléments de botanique », (1694).
- [26] Hamiche, S., « Etude chimique des métabolites (primaires et secondaires) produits par des souches bactériennes issues de niches écologiques marines », Thèse de Doctorat, Université Saad Dahleb de Blida 1, Faculté des sciences, Département de Chimie, Algérie (Novembre 2019).
- [27] De Reviers, B., « Biologie et phylogénie des algues », Paris : Ed. Belin, (2002), 352-353.

[28] Ruis Gaël, « Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges », Thèse de Doctorat, Université de Limoges Discipline : Chimie appliquée-Chimie des Substances Naturelles, (Novembre 2005).

[29] Perez R. « Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture », (1997), 272 p.

[30] Alves, C., Silva, J., Freitas, R., Pinteus, S., Reboleira, J., Pedrosa, R. and Bernardino, S., « Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements », Chapter 3.35 - Red Algae, *Academic Press*, (2019), 375-382.

[31] Moreira-González, A.R., Fernández-Garcés; R., Gómez-Batista, M., León-Pérez, Á.R., Castellanos-González, M.E., Cabrales-Caballero, Y., Garcia-Moya, A., Fujii, M.T. and Suárez-Alfonso, A.M., « Marine red algae from central-southern coast of Cuba », *Regional Studies in Marine Science*, V. 25, (January 2019), 100450.

[32] Rahaoui, A., « Écophysiologie de *Rhodellavioleacea (Rhodophyta)* : production et propriétés structurales des exopolysaccharides et de l'amidon floridéen », Thèse de Doctorat, Université des sciences et technologies de Lille, France, (Février 1999).

[33] Round, F.E., « The taxonomy of the Chlorophyta », *British Phycological Bulletin*, V. 2, n°4, (July 2007), 224-235.

[34] Oucif, H., « Valorisation des algues de la côte Ouest Algérienne : Potentiel antioxydant et hormonal », Thèse de Doctorat, Université Ahmed Benbella 1, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de Biotechnologie, Oran, Algérie, (Décembre 2018).

[35] Fang, L., Leliaert, F., Zhang, Z.H., Penny, D. and Zhong, B.J., « Evolution of the Chlorophyta: Insights from chloroplast phylogenomic analyses », *Journal of Systematics and Evolution*, V. 55, n° 4, (March 2017), 322-332.

[36] Reboleira, J., Freitas, R., Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Pedrosa, R., Bernardino, S., « Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements », Chapter 3.8 - Brown Seaweeds, *Academic Press*, (2019), 171-176.

- [37] Wijesinghe, W.A.J.P., and Jeon, Y.J., « Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review », *Phytochemistry Reviews*, V. 10, (June 2011), 431-443.
- [38] Wehr, J.D., « Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification, A volume in Aquatic Ecology », *Academic Press*, (2015), 851-871.
- [39] Dumont, V., « Etude des cyanobactéries dans la rivière TARN-Campagne été 2005 », Centre de Ressources Technologiques en Biotechnologie-Bioprocédés, (2006), 7-8.
- [40] Kornprobst, J.M. « Substances naturelles d'origine marine, chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie », Paris, France, Editions Tec & Doc, 160-191, (2005).
- [41] F. Gévaert, « Importance des facteurs de l'environnement et du phénomène de photo inhibition sur la production des grandes algues marines », Thèse de Doctorat, Université des sciences et technologies de Lille, France, (2001).
- [42] Gorenflot, R. and Guern, M., « Organisation et biologie des Tahllophytes », Doin Editions, (1989), 235 p.
- [43] Lobban, C.S. and Harrison, P.J., « Seaweed ecology and physiology », Cambridge University Press, (1994), 366 p.
- [44] Harvey, W. H., « Some account of the marine botany of the colony of Western Australia », *The Transactions of the Royal Irish Academy*, (1855), 525-566.
- [45] Jégaden, D., Loddé, B., Lucas, D., and Dewitte, J.D., « Reaction to *Asparagopsis armata* », *Nouvelles Dermatologiques*, V. 25, n° 7, (September 2006), 498-500.
- [46] Andreakis, N., Procaccini, G., and Kooistra, W. H., « *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations », *European journal of phycology*, V. 39, n° 3, (2004), 273-283.

- [47] De Valera, M., « A red alga new to Ireland: *Asparagopsis armata* Harvey on the West Coast », *The Irish Naturalists' Journal*, V. 8, n° 2, (September 1942), 30-33.
- [48] Félix, R., Dias, P., Félix, C., Cerqueira, T., Andrade, P. B., Valentao, P., and Lemos, M. F., « The biotechnological potential of *Asparagopsis armata*: What is known of its chemical composition, bioactivities and current market? », *Algal Research*, V. 60, (December 2021), 102534.
- [49] Soria-Mercado, I.E., Villarreal-Gómez, L.J., Guerra-Rivas, G. and Ayala-Sánchez, N.E., « Bioactive Compounds from Bacteria Associated to Marine Algae », *Biotechnology Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life, Croatia* (March 2012), 25-44.
- [50] Martin, M., Portetelle, D., Michel, G. and Vandenberg, M., « Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications », *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 98, n° 7, (February 2014), 2917-2935.
- [51] Kebede, B., Wrigley, S.K., Prashar, A., Rahlff, J., Wolf, M., Reinshagen, J., Gribbon, P., Imhoff, J.F., Silber, J., Labes, A. and Ellinger, B., « Establishing the Secondary Metabolite Profile of the Marine Fungus: *Tolyposcladium geodes* sp. MF458 and Subsequent Optimisation of Bioactive Secondary Metabolite Production », *Marine Drugs*, V. 15, n° 4, (March 2017), 84-104.
- [52] Hollants, J., Leliaert, F., De Clerck, O. and Willems, A., « What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations », *FEMS Microbiology Ecology*, V. 83, n° 1, (January 2013), 1-16.
- [53] Staufenberger, T., Thiel, V., Wiese, J., and Imhoff, J. F., « Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina* », *FEMS Microbiology Ecology*, V. 64, n° 1, (March 2008), 65-77,
- [54] Pal Singh, R., Mantri, V. A., Reddy, C. R. K., and Jha, B., « Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis-inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata* », *Aquatic Biology*, V. 12, (March 2011), 13-21.

- [55] Beleneva I. A., and Zhukova, N. V., « Bacterial Communities of Some Brown and Red Algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan », *Microbiology*, V. 75, n° 3, 348-357, (May 2006).
- [56] Zifeng, W., Tian, X. Shaojun, P., Min, L., and Haidong, Y., « Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species », *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, V. 27, n° 3, (November 2009), 487-492.
- [57] Bakunina, I. Y., Shevchenko, L. S., Nedashkovskaya, O. I., Shevchenko, N. M., Alekseeva, S. A., Mikhailov, V. V., and Zvyagintseva, T. N., « Screening of Marine Bacteria for Fucoidanases », *Microbiology*, V. 69, n° 3, (May 2000), 303-308.
- [58] El-Gendy, M. M., Hawas, U. W., and Jaspars, M., « Novel Bioactive Metabolites from a Marine Derived Bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000 », *Journal of Antibiotics*, V. 61, n° 6, (June 2008), 379-386.
- [59] Tebben, J., Motti, C., Tapiolas, D., Thomas-Hall P., and Harder, T., « A Coralline Algal-Associated Bacterium, *Pseudoalteromonas* Strain J010, Yields Five New Korormicins and a Bromopyrrole », *Marine Drugs*, V. 12, n° 5, (May 2014), 2802-2815.
- [60] Prieto, M. L., O'Sullivan, L., Tan, S. P., McLoughlin, P., Hughes, H., O'Connor, P. M., Cotter, P. D., Lawlor P. G., and Gardiner, G. E., « Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived *Bacillus* spp », *Marine Drugs*, V. 10, (October 2012), 2280-2299.
- [61] Lee, S. D., « *Phycococcus jejuensis* gen. nov, sp. nov, an actinomycete isolated from seaweed », *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 56, n° 10, (October 2006), 2369- 2373.
- [62] Elsebai, M. F., Kehraus, S., Gütschow M., and König, G. M., « New Polyketides from the Marine-derived Fungus *Phaeosphaeria spartinae* », *Natural Product Communications*, V. 4, n° 11, (November 2009), 1463-1468.

[63] Gao, S. S., Li, X. M., Li, C. S., Proksch, P., Wang, B. G., « Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, V.21, n° 10, (May 2011), 2894-2897.

[64] Qiao, M. F., Ji, N. Y., Liu, X. H., Li, K., Zhu, Q. M., Xue, Q. Z., « Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae* », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, V.20, n° 19, (October 2010), 5677- 5680.

[65] S. Wang, X. M. Li, F. Teuscher, D. L. Li, A. Diesel, R. Ebel, P. Proksch and B. G. Wang, « Chaetopyranin, a Benzaldehyde Derivative, and Other Related Metabolites from *Chaetomium globosum*, an Endophytic Fungus Derived from the Marine Red Alga *Polysiphonia urceolata* », *Journal of Natural Products*, V. 69, n° 11, (October 2006), 1622-1625.

[66] Jo, M. J., Bae¹, S. J., Son, B. W., Kim C. Y., and Kim, G. D., « 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid and (+)-epoxydon isolated from marine algae-derived microorganisms induce down regulation of epidermal growth factor activated mitogenic signaling cascade in Hela cells », *Cancer Cell International*, V. 13, n° 1, (May 2013), 1-9.

[67] Greve, H., Schupp, P. J., Eguereva, E., Kehraus, S., Kelter, G., Maier, A., Fiebig, H. H., and König, G. M., « Apralactone A and a New Stereochemical Class of Curvularins from the Marine-Derived Fungus *Curvularia* sp », *European Journal of Organic Chemistry*, V. 30, (October 2008), 5085-5092.

[68] Manmadhan, K., Hideaki, S., Haldar, S., Shinji, Y. and Shinichi, N., « Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan », *Annals of Microbiology*, V.56, n° 2, (June 2006), 167-173.

[69] Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., and Nagata, S., « Phylogenetic identification of epibiotic bacteria possessing antimicrobial activities isolated from red algal species of Japan », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 24, (April 2008), 2315-2321.

[70] T. Lachnit, M. Blümel, J. F. Imhoff, M. Wahl, « Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat », *Aquatic Biology*, V. 5, n° 2, (April 2009), 181-186.

[71] Nishijima, M., Takadera, T., Imamura, N., Kasai, H., An, K. D., Adachi, K., Nagao, T., Sano H., and Yamasato, K., « *Microbulbifer variabilis* sp. nov. And *Microbulbifer epialgicus* sp. nov., isolated from Pacific marine algae, possess a rod-coccus cell cycle in association with the growth phase », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 59, n° 7, (July 2009), 1696-1707.

[72] Jamal, M.T. and Mudarris, M.S.A., « Separation of YbdN Bioactive Protein from *Bacillus subtilis* Isolated from the Red Sea algae *Sargassum* sp. with Bioactivity against Antibiotic Resistant Bacterial Pathogens », *Journal of Marine Sciences*, V. 21, n° 1, (August 2010), 53-64.

[73] Lee, Y.K., Jung, H.J. and Lee, H.K., « Marine Bacteria Associated with the Korean Brown Alga, *Undaria pinnatifida* », *Journal of Microbiology*, V. 44, n° 6, (December 2006), 694- 698.

[74] Salaün, S., Kervarec, N., Potin, P., Haras, D., Piotto, M. and La-Barre, S., « Whole-cell spectroscopy is a convenient tool to assist molecular identification of cultivatable marine bacteria and to investigate their adaptive metabolism », *Talanta*, V. 80, n° 5, (March 2010), 1758-1770.

[75] Salaün, S., La Barre, S., Santos-Goncalvez, M. D., Potin, P., Haras, D., and Bazire, A., « Influence of exudates of the kelp *Laminaria digitata* on biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes », *Microbial ecology*, V. 64, n° 2, (August 2012), 359-369.

[76] Abdel-Lateff, A., Okino, T., Alarif, W. M., and Al-Lihaibi, S. S., « Sesquiterpenes from the marine algicolous fungus *Drechslera* sp », *Journal of Saudi Chemical Society*, V. 17, n° 2, (April 2013), 161-165.

- [77] Mohammed, N. A., Hassan, H. M., Rateb, M. E., Ahmed, E. F., Hawas, U. W., Sameer, S., Ebel, R., El-Safty, M. M., Abdel Hameed, M. S., and Hammouda, O. H., « Diketopiperazine derivatives from *Enterobacter cloacae* isolated from the Red Sea alga *Cystoseira myrica* », *Egyptian Pharmaceutical Journal*, V. 12, n° 2, (2013), 163-172.
- [78] Li, Y., Sun, K. L., Wang, Y., Fu, P., Liu, P. P., Wang, C., and Zhu, W. M., « A cytotoxic pyrrolidinoindoline diketopiperazine dimer from the algal fungus *Eurotium herbariorum* HT-2 », *Chinese Chemical Letters*, V. 24, n° 12, (December 2013), 1049-1052.
- [79] Shiba, T., and Taga, N., « Heterotrophic Bacteria Attached to Seaweeds », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, V. 47, n° 3, (1980), 251-258.
- [80] El-Gendy, M. M., Hawas, U. W., and Jaspars, M., « Novel Bioactive Metabolites from a Marine Derived Bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000 », *Journal of Antibiotics*, V. 61, n° 6, (June 2008), 379-386.
- [81] De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.H. and Whitman W. B., « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition », *The Firmicute*. Springer, New York, USA, (2009), 63-67.
- [82] Nicholson, W. L., « Roles of *Bacillus* endospores in the environment », *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, V. 59, (March 2002), 410-416.
- [83] Awais, M., Shah, A. A., Hameed, A., and Hasan, F. « Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp. », *Pakistan Journal of Botany*, V. 39, n° 4, (2007), 1303-1312.
- [84] Ludwig, W., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B., « Revised Road map to the phylum Firmicutes », In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, New York, USA, (2009), 1-13.
- [85] Bron, S., Meima, R., Van Dijk, J. M., Wipat A., and Harwood, C. R., « Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp », In: *Manual of Industrial Microbiology and*

Biotechnology 2nd Edition. Eds. A. L. Demain and J. E. Davies, *American Society for Microbiology (ASM) Press*. Washington, (1999), 392-416.

[86] Maughan, H., and Van der Auwera, G., « *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading », *Infection, Genetics and Evolution*, V. 11, n° 5, (July 2011), 789-797.

[87] Priest, F.G., Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R., « Systematics and ecology of *Bacillus* », *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. American Society for Microbiology, Washington, USA, (April 1993), 1-16.

[88] Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J. G., and Sermswan, R. W., « Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei* », *AMB express*, V. 7, n° 1, (January 2017), 1-11.

[89] S. Smaoui, « Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés », Thèse de doctorat, Université de Toulouse, (Mai 2010).

[90] Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, S., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y. and van Wezel, G.P., « Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria* », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, V. 80, n° 1, (March 2016), 1-43.

[91] Penesyanyan, A., Kjelleberg S., and Egan, S., « Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms », *Journal of Marine Drugs*, V. 8, n° 3, (March 2010), 438-459.

[92] Rani, K., Rana, R. and Dat, S., « Review on latest overview of proteases », *International Journal of Current Life Sciences*, V. 2, n° 1, (January 2012), 12-18.

[93] Gupta, R., Beg, Q. K., and Lorenz, P., « Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications », *Applied microbiology and biotechnology*, V. 59, (April 2002), 15-32.

[94] Zhang, C., and Kim, S.K., « Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects », *Marine Drugs*, V. 8, n° 6, (June 2010), 1920-1934.

[95] Gupta A., Roy I., Patel R.K., Singh S.P., Khare S.K., Gupta M.N., « One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus sp.* », *Journal of chromatography A*, V. 1075, n° 1-2, (May 2005), 103-108.

[96] Peterson, G.L., « A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable », *Analytical Biochemistry*, V. 83, n° 2, (December 1977), 346-356.

[97] Rouse J. D., Sabatini D. A., Suflita J. M., and Harwell J. H., « Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds », *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, V. 24, n° 4, (1994), 325 - 370.

[98] Fiechter, A., « Biosurfactants: moving towards industrial application », *Biotechnology Journal*, V.10, (June 1992), 208-217.

[99] Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S., « Potential commercial applications of microbial surfactants », *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, V.53, (2000), 495-508.

[100] De Gusmao, C. A. B., Rufino, R. D., and Sarubbo, L. A., « Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 26, (February 2010), 1683-1692.

[101] Vipulanandan, C., and Ren, X., « Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant », *Journal of environmental engineering*, V. 126, n° 7, (July 2000), 629-634.

[102] Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M., and Franzetti, A., « A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement », *Ecotoxicology and environmental safety*, V. 154, (June 2018), 100-107.

[103] Sullivan, E. R., « Molecular genetics of biosurfactant production », *Current opinion in biotechnology*, V. 9, n° 3, (June 1998), 263-269.

[104] Fakruddin, M. d., « Biosurfactant: production and application », *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, V. 3, n° 4, (June 2012), 124.

[105] Sadouk, Z., Hacene, H., and Tazerouti, A., « Biosurfactants production from low-cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* strain », *Oil & Gas Science and Technology-Revue de l'IFP*, V. 63, n° 6, (September 2008), 747-753.

[106] Banat, I., Thavasi, R., and Jayalakshmi, S. « Biosurfactants from marine bacterial isolates », *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, (January 2011), 1367-1373.

[107] Desai, J. D., and Banat, I. M., « Microbial production of surfactants and their commercial potential », *Microbiology and Molecular biology reviews*, V. 61, n° 1, (March 1997), 47-64.

[108] Makkar, R. S. and Cameotra, S. S., « An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications », *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 58, (January 2002), 428 - 434.

[109] Banat I. M., « Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review », *Bioresource Technology*, V. 51, n° 1, (1995), 1-12.

[110] Bhardwaj, G., Cameotra, S. S., and Chopra, H. K., « Biosurfactants from fungi: a review », *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, V. 4, n° 6, (November 2013), 1-6.

[111] Padmapriya, B., Suganthi, S., and Anishya, R. S., « Screening, optimization and production of biosurfactants by *Candida* species isolated from oil polluted soils », *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, V. 13, n° 2, (2013), 227-233.

[112] Mouafi, F. E., Abo Elsoud, M. M., and Moharam, M. E., « Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology », *Biotechnology Reports*, V. 9, (March 2016), 31-37.

[113] Mahalingam, P. U., and Sampath, N., « Isolation, characterization and identification of bacterial biosurfactant », *European Journal of Experimental Biology*, V. 4, n° 6, (2014), 59-64.

[114] Eddouaouda, K., « Etude du potentiel biodegradatif de souches isolees du sol de Hassi Messaoud contamined par du petrole : criblage, biodegradation de HAP et production de biosurfactant », Thèse de Doctorat, Université de Blida 1, Algérie, (Décembre 2012).

[115] Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M. and McInerney, M. J., « Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms », *Journal Microbiological Methods*, V. 56, n° 3, (March 2004), 339-347.

[116] Bernheimer, A. W., and Avigad, L. S., « Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis* », *Journal of General Microbiology*, V. 61, n° 3, (June 1970), 361-369.

[117] Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., and Giulietti, A. M., « Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 12, (January 1996), 82-84.

[118] Penesyan, A., Marshall-Jones, Z., Holmstrom, C., Kjelleberg, S., and Egan, S., « Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs », *FEMS Microbiology Ecology*, V. 69, n° 1, (July 2009), 113-124.

- [119] Burgess, J.G., Jordan, E.M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., and Boyd, K.G., « Microbial antagonism: A neglected avenue of natural products research », *Journal of Biotechnology*, V. 70, (1999), 27–32.
- [120] Singh, S. B., and Barrett, J. F., « Empirical antibacterial drug discovery-Foundation in natural products », *Biochemical pharmacology*, V. 71, n° 7, (March 2006), 1006-1015.
- [121] Pelaez, F., « The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-Can history repeat? », *Biochemical pharmacology*, V. 71, n° 7, (March 2006), 981-990.
- [122] Madeira Junior, J. V., Teixeira C. B., and Macedo, G. A., « Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview », *Critical Reviews in Biotechnology*, V. 35, n° 1, (July 2013), 75-81.
- [123] Bister-Miel, F., Agier, C., Bury, M., Viel, C., and Guignard, J. L., « Biotransformations comparées de benzylisoquinoléines par des suspensions cellulaires végétales non productrices d'alcaloïde », *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, V. 135, n° 1, 57-70, (Juillet 2014).
- [124] Larroche, C., Gros, J. B., and Fontanille, P. « Microbial Processes », In *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Berlin, Heidelberg, (2007), 575-597.
- [125] Raval, K. M., Vaswani P. S., and Majumder, D. R., « Microbial biotransformation: Pharmaceutical peptides », *Journal of Biological and Food Science Research*, V. 1, n° 1, (March 2012), 1-14.
- [126] Sultana, N., and Saify, Z. S., « Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents », *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, V. 28, n° 6, (September 2012), 1-16.
- [127] Siddiqui, Z. A., « Biotransformational studies on bioactive secondary metabolites of plant origin », Thèse de doctorat, university of Karachi, Pakistan, (2007).

[128] Linares, D., « Etudes sur la voie de dégradation de l'a-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide », Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, (Juillet 2008).

[129] Hegazy, M. F., Mohamed, T. A., ElShamy, A. I., Mohamed, A. H., Mahalel, U. A., Reda, E. H., Shaheen, A. M., Tawfik, W. A., Shahat, A. A., Shams, K. A., Abdel-Azim, N. S., Hammouda, F. M., « Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review », *Journal of Advanced Research*, V. 6, n° 1, (January 2015), 17-33.

[130] Cabral, J. M. S., « Biotransformations. In: Basic Biotechnology », Ratledge, C., and Kristiansen, B., (Ed), Cambridge University Press, Cambridge, (2001), 471-501.

[131] Dave, V., Khirwadkar, P., and Dashora, K., « A review on biotransformation », *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, V. 2, n° 2, 1136-1140, (April 2014).

[132] Schreier, P., « Biotechnology and flavour production », In: *Proceedings: 8th International Biotechnology Symposium*, edited by G. Durand, L. Bobichon, J. Floren, Paris, France, Société française de microbiologie, (1988), 869-883.

[133] Scragg, A. H., « The production of aromas by plant cell cultures », *Biotechnology of aroma compounds*, book series, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Editor by Scheper, T., V. 55, (December 2006), 239-263.

[134] Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P., and Narasu, M. L., « Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospects », *Biotechnology Advances*, V. 19, n° 3, (June 2001), 175-199.

[135] Benabdelkader, T., « Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes ailées, *Lavandula stoechas* Sensus Lato, un Complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique », Thèse de doctorat, l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, Algérie et de l'Université Jean-Monnet de Saint-Etienne, France, (Octobre 2012).

[136] Phillips, M. A., and Croteau, R. B., « Resin-based defenses in conifers », *Trends in Plant Science reviews*, V. 4, n° 5, (May1999), 184-190.

[137] Breitmaier, E., « Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones », John Wiley and Sons, Weinheim, (2006).

[138] Costes, P., « Cycloisomérisations d'énynes issus de monoterpènes par différentes voies catalytiques », Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, (Décembre 2007).

[139] Mikami, Y., « Microbial Conversion of Terpenoids», *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, V. 6, n° 1, (1988), 271-320.

[140] Baser K. H. C., and Buchbauer, G., « Handbook of essential oils: science, technology, and applications », *CRC Press*, Ed by Taylor and Francis Group, LLC, an informa business, Boca Raton, London, New York, (December 2009).

[141] Balcerzak, L., Lipok, J., Strub D., and Lochynski, S., « Biotransformations of monoterpenes by photoautotrophic micro-organisms », *Journal of Applied Microbiology*, V. 117, n° 6, (December 2014), 1523-1536.

[142] Liu, W. G., Goswami, A., Steffek, R. P., Chemman, R. L., Sariaslani, F. S., Steffens, J. J., and Rosazza, J. P. N., « Stereochemistry of microbiological hydroxylations of 1,4-cineole », *Journal of Organic Chemistry*, V. 53, n° 24, (November 1988), 5700–5704.

[143] Savithiry, N., Gage, D., Fu, W., and Oriel, P., « Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425 », *Biodegradation*, V. 9, n° 5, (September 1998), 337-341.

[144] Badee, A. Z. M., Helmy, S. A., and Morsy, N, F. S., « Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202) », *Food Chemistry*, V. 126, n° 3, (June 2011), 849-854.

[145] Marmulla, R., and Harder, J., « Microbial monoterpene transformations - areview », *Frontiers in Microbiology*, V. 5, n° 3, (July 2014), 346.

[146] Zhang, Y., Xu, P., Han, S., Yan, H., Ma, C., « Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8 », *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 73, (December 2006), 771-779.

[147] Hua, D., Ma, C., Lin, S., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B., Xu, P., « Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites », *Journal of Biotechnology*, V. 130, n° 4, (July 2007), 463-470.

[148] Noma, Y., Toyota, M., and Asakawa, Y., « Microbial transformation of thymol formation of 2-hydroxy-3- *p*-menthen-5-one by *Streptomyces humidus*, Tu-1 », *Proceedings 28th TEAC*, (1988), 177-179.

[149] Noma, Y., and Nishimura, H., « Microbiological transformation of 1,8-cineole. Production of 3 β -hydroxy- 1,8-cineole from 1,8-cineole by *S. ikutamanensis*, Ya-2-1 », *Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society*, Book of abstracts, (1981), 196 p.

[150] Noma, Y., and Nishimura, H., « Microbiological transformation of 1, 8-cineole. Oxidative products from 1,8-cineole by *S. bottropensis*, SY-2-1 », *Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society*, Book of abstracts, (1980), 28 p.

[151] Noma, Y., Toyota, M., and Asakawa, Y., « Reduction of terpene aldehydes and epoxidation of terpene alcohols by *S. ikutamanensis*, Ya-2-1 », *Proceedings 30th TEAC*, (1986), 204-206.

[152] David, L., and Veschambre, H., « Preparation d'oxydes de linalol par bioconversion », *Tetrahedron Lettres*, V. 25, n° 5, (1984), 543-546.

[153] Noma Y., and Nishimura, H., « Bottrospicatols, Novel Monoterpenes Produced on Conversion of (-)- and (+)-Cis-Carveol by *Streptomyces* », *Agricultural and Biological Chemistry*, V. 51, n° 7, (July 1987), 1845-1849.

- [154] Y. Noma, « Conversion of (-)-Carvone by Strains of *Streptomyces*, A-5-1, and *Nocardia*, 1-3-11 », *Agricultural and biological chemistry*, V. 44, n° 4, (April 1980), 807-812.
- [155] Hayashi, T., Uedono, S., Tatsumi, C., « Conversion of α -terpineol to 8,9-epoxy-p-menthan-1-ol », *Agricultural and Biological Chemistry*, V. 36, n° 4, 690–691, (January 1972).
- [156] Tsukamoto, Y., Nonomura, S., Sakai, H., « Formation of p-cis-menthan-1-ol from pmenthane by *Pseudomonas mendocina* SF », *Agricultural Biological Chemistry*, V. 39, (1975), 617-620.
- [157] Ashengroph, M., Nahvi, I., and Zarkesh-Esfahani, H., « A bioconversion process using a novel isolated strain of *Pseudomonas* sp. ISPC2 to produce natural vanillin from isoeugenol », *Research in Pharmaceutical Sciences*, V. 3, n° 2, (October 2008), 41-47.
- [158] Rodríguez, P., Sierra, W., Rodríguez, S., Menéndez, P., « Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of *Eucalyptus* oils », *Electronic Journal of Biotechnology*, V. 9, n° 3, (April 2006).
- [159] Tan, Q., Day, D. F., « Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum* », *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 49, (January 1998), 96-101.
- [160] Esmacili, A., and Hashemi, E., « Biotransformation of myrcene by *Pseudomonas Aeruginosa* », *Chemistry Central Journal*, V. 5, n° 26, (May 2011), 1-7.
- [161] Labuda, I. M., Goers, S. K., and Keon, K. A., « Bioconversion process for the production of vanillin », US patent, n° 5, (July 1992), 128-253.
- [162] Ghasemi, Y., Mohagheghzadeh, A., Moshavash, M., Ostovan, Z., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M. H., Bagher Ghoshoon, M., Javad Raei, M., Bagher Mosavi-Azam, S., « Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla* », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 25, 1301-1304, (March 2009).

- [163] Trytek, M., Jedrzejewski, K., Fiedurek, J., « Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum*», *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, V. 42, n° 2, 181–188, (February 2015).
- [164] Bicas, J. L., Barros, F. F. C., Wagner, R., Godoy, H. T., and Pastore, G. M., « Optimization of R- (+)-*a*-terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene », *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, V. 35, n° 9, (September 2008), 1061-1070.
- [165] Chatterjee, T., and Bhattacharyya, D. K., « Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida* », *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.55, 541-546, (April 2001).
- [166] Toniazzo, G., De Oliviera, D., Dariva, C., Oestreicher, E. G., and Antunes, O. A. C., « Biotransformation of (–) β -Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642 », *Applied Biochemistry and Biotechnology*, V. 123, (March 2005), 121-124.
- [167] Eaton, R. W., « *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate », *Journal of Bacteriology*, V.179, n° 10, (May 1997), 3171-3180.
- [168] Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., and Kraut, J., « The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450», *Journal of Biological Chemistry*, V. 260, n° 30, (December 1985), 16122-16130.
- [169] Bell, S. G., Dale, A., Rees, N. H., and Wong, L. L., « A cytochrome P450 class I electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans* », *Applied Microbiology Biotechnology*, V. 86, (September 2009), 163-175.
- [170] Eccles, R., « Menthol and Related Cooling Compounds », *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, V. 46, n° 8, (August 1994), 618-630.
- [171] Chizzola, R., « Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils) », Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, University of Veterinary Medicine,

Vienna, Austria, Ramawat, K. G., Mérillon, J. M., (eds.), *Natural Products*, V. 10, (January 2013), 2973-3008.

[172] Gelal, A., « Influence of menthol on first pass elimination », *Journal of Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, V.7, n° 2, (February 2008), 119-124.

[173] Croteau, R. B., Davis, E. M., Ringer, K. L., and Wildung, M. R., « (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics », *Journal of Naturwissenschaften*, V. 92, n° 12, (December 2005), 562-577.

[174] Talapatra S.K., and Talapatra, B., « Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine », Berlin, Germany: Springer, (January 2015), 377 p.

[175] Mostafa, M., « Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins », Thèse de doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris, (Mai 2008).

[176] Asakawa, Y., Takahashi, H., Toyota, M., and Noma, Y., « Biotransformation of monoterpenoids, (-) and (+) Menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus* species », *Phytochemistry*, V. 30, n° 12, (April 1991), 3981-3987.

[177] Atta-ur-Rahman, Yaqoob, M., Farooq, A., Anjum, S., Asif, F., and Choudhary, M. I., « Fungal transformation of (1R, 2S, 5R) (-) Menthol by *Cephalosporium aphidicola* », *Journal of Natural Product*, V. 61, n° 11, (September 1998), 1340-1342.

[178] Esmaeili, A., Saad, N., Safaiyan, S., and Rustaiyan A., « Biotransformation of (-)-menthol by spores of *Mucor ramannianus* and study of the pathways involved », *herba polonica*, V. 55, n° 2, (2009), 51-58.

[179] Esmaeili, A., Mirmhadi, H. R., and Rafiee, F., « Biotransformation of menthol by *Chlorella vulgaris* and study of the pathways involved », *Chemistry of Natural Compounds*, V. 49, n° 6, (January 2014), 1160-1161.

- [180] Esmaeli, A., Zarea, A. H., Sharafian, S., Safaiyan, S., and Rustaiyan, A., « Biotransformation of menthol by sporulated surface cultures of *Penicillium* sp. and study of the pathways involved », *herba polonica*, V. 55, n° 1, 78-83, (July 2009).
- [181] Charpentier, G., « Étude des effets létaux et sublétaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'*Apis mellifera* élevées in vitro », Thèse de doctorat, Université de Toulouse III Paul Sabatier, Paris, (Juillet 2013).
- [182] Esmaeli, A., Khodadadi, A., and Safaiyan, S., « Biotransformation of thymol by *Aspergillus niger* », *Chemistry of Natural Compounds*, V. 47, n° 6, (January 2012), 966-968.
- [183] Rasoul-Amini, S., Fotooh-Abadi, E., and Ghasemi, Y., « Biotransformation of monoterpenes by immobilized microalgae », *Journal of Applied Phycology*, V. 23, n° 6, (November 2010), 975-981.
- [184] Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., García C. M., and Durango, D. L., « Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae* », *Tropical Plant Pathology*, V. 36, n° 1, (February 2011) , 3-13.
- [185] Chamberlain, E. M., and Dagley, S., «The metabolism of thymol by a *Pseudomonas* », *Biochemical Journal*, V. 110, n° 4, (December 1968), 755-763.
- [186] Shimoda, K., Kondo, Y., Nishida, T., Hamada, H., Nakajima, N., and Hamada, H., « Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana* », *Phytochemistry*, V. 67, n° 20, (October 2006), 2256-2261.
- [187] Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Wathelet, J. P., and Marlier, M., « Chemical Composition of Volatile Oils from Algerian *Nigella sativa* L. seeds », *Journal of Essential Oil Research*, V. 22, n° 4, (August 2010), 318-322.
- [188] De Oliveira, T. M., De Carvalho, R. B. F., Da Costa, I. H. F., De Oliveira, G. A. L., De Souza, A. A., De Lima, S. G., and De Freitas, R. M., « Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant », *Pharmaceutical Biology*, V. 53, n° 3, (December 2014), 423-428.

- [189] Jivishov, E., Kırimer, N., İşcan G., and Demirci, F., « Microbial transformation of p-cymene », *Natural Volatiles and Essential Oils*, V. 3, n° 1, (June 2016), 18-22.
- [190] Madyastha, K. M., and Bhattacharyya, P. K., « Microbiological transformations of terpenes. 13. Pathways for degradation of p-cymene in a soil pseudomonad (PL-strain) », *Indian Journal of Biochemistry*, V. 5, n° 4, (December 1968), 161-167.
- [191] Yoo, S. K., and Day, D. F., « Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas sp.* strain PIN », *Process Biochemistry*, V. 37, n° 7, (February 2002), 739-745.
- [192] Demirci, F., Berber, H., and Baser, K. H. C., « Biotransformation of p-cymene to thymoquinone », *Book of Abstracts of the 38th ISEO, SL-1*, (2007), p. 6.
- [193] Susilowati, R., Sabdono, A., and Widowati, I., « Isolation and characterization of bacteria associated with brown algae *Sargassum spp.* from Panjang Island and their antibacterial activities », *Procedia Environmental Sciences*, V. 23, (2015), 240-246.
- [194] Beleneva, I. A., and Zhukova, N.V., « Bacterial communities of some brown and red algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan », *Microbiology*, V. 75, n° 3, (May 2006), 348-357.
- [195] Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Haldar, S., Yamasaki, S., and Nagata, S., « Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan », *Annals of microbiology*, V. 56, n° 2, 167-173, (June 2006).
- [196] Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z., Silva, C. H. D., Justo, M. R., Leal, R. R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V. M., Berlinck, R. G. S., and Sette, L. D., « Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil », *Microbiological Research*, V. 165, n° 6, (August 2010), 466-482.

[197] Romanenko, L. A., Uchino, M., Kalinovskaya, N. I., and Mikhailov, V. V., « Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities », *Microbiological research*, V. 163, n° 6, (November 2008), 633-644.

[198] Wang, Z., Xiao, T., Pang, S., Liu, M., Yue, H., « Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species », *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, V. 27, n° 3, (November 2009), 487-492.

[199] Singh, R. P., Mantri, V. A., Reddy, C. R. K., Jha, B., « Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis-inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata* », *Aquatic Biology*, V. 12, n° 1, (March 2011), 13-21.

[200] Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J. G., and Sermswan, R. W., « Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei* », *AMB Express*, V. 7, n° 1, (January 2017), 1-11.

[201] Cao, H., He, S., Wei, R., Diong, M., and Lu, L., « *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A Potential Antagonistic Bacterium against Eel-Pathogenic *Aeromonas hydrophila* », *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, (May 2011), 1-7.

[202] Tyc, O., Zweers, H., De Boer, W., and Garbeva, P., « Volatiles in Inter-Specific Bacterial Interactions », *Frontiers in microbiology*, V. 6, (December 2015), 1-15.

[203] Benkiar, A., « Isolement et criblage de souches bactériennes productrices de protéase alcaline en vue d'une application industrielle », Thèse de Doctorat, Université Saad Dahlab De Blida, Faculté de Technologie Département de Génie des Procédés, Algérie, (2016).

[204] Frikha Dammak, D., Zarai, Z., Najah, S., Abdennabi, R., Belbahri, L., Rateb, M. E., Mejdoub, H., and Maalej, S., « Antagonistic Properties of Some Halophilic Thermoactinomycetes Isolated from Superficial Sediment of a Solar Saltern and Production of Cyclic Antimicrobial Peptides by the Novel Isolate *Paludifilum halophilum* », *BioMed Research International*, (July 2017), 1-13.

[205] Chakrabarti, S., « Bacterial Biosurfactant: Characterization, Antimicrobial and Metal Remediation Properties », National Institute of Technology, Department Of Life Science, (2012).

[206] Zenati, B., « Étude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole », Thèse de Doctorat, Université Saad Dahlab De Blida 1, Faculté de Technologie, Département de Génie des Procédés, Algérie, (Décembre 2018).

[207] Haslett, A.S.W., « The chemical significance of the Gram test for bacteria », *Australian Journal of Science*, (June 1947), V. 9, n° 6, 211 p.

[208] Agbonlahor, D.E., Odugbemi, T.O., and Udofia, P.O., « Differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria and yeasts using a modification of the "string" test », *American Journal of Medical Technology*, (March 1983), V.49, n° 3, 177-178.

[209] Almohsen, J.S.H., « Isolation and Characterisation of Halotolerant Bacteria and Algae and their Potential for Biofuel Production », Thesis submitted in part fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy, Department of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Sheffield, UK, (July 2014).

[210] Guiraud, J.P., « Techniques d'analyses microbiologiques. In : microbiologie alimentaire », Ed. Dunod, Paris, (1998), 168-333.

[211] Smaoui, S., « Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés », Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, (France), (Mai 2010), 251 pp.

[212] Penesyan, A., Kjelleberg, S., and Egan, S., « Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms », *Marine Drugs*, V. 8, n° 3, (March 2010), 438-459.

[213] Boudjelal, F., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Sabaou, N., « Taxonomic study and partial characterization of antimicrobial compounds from a moderately halophilic strain

of the genus *Actinoalloteichus* », *Brazilian Journal of Microbiology*, V. 42, n° 3, (January 2011), 835-845.

[214] Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K., and Tanasupawat, S., « Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from Thai mangrove sediment », *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, V. 38, n° 1, (January-March 2014), 1-56.

[215] Hamiche, S., Badis, A., Jouadi, B., Bouzidi, N., Daghbouche, Y., Utczás, M., Mondello, L., and El Hattab, M., « Identification of antimicrobial volatile compounds produced by the marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 newly isolated from brown alga *Zonaria tournefortii* », *Journal of Essential Oil Research*, V. 31, n° 3, (January 2019), 203-210.

[216] Sihem, B.M., Rafik, E., Florence, M., Mohamed, C., and Ahmed, L., « Identification and partial characterization of antifungal and antibacterial activities of two *Bacillus sp.* strains isolated from salt soil in Tunisia », *African Journal of Microbiology Research*, V. 5, n° 13, (2011), 1599-1608.

[217] Zhang, C., and Kimn, S.K., « Application of Marine Microbial Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries », *Advances in Food and Nutrition Research*, V. 65, (2012), 423-435.

[218] Zhang, C., and Kim, S.K., « Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects », *Marine Drugs*, V. 8, n° 6 (June 2010), 1920-1934.

[219] Schinner, F., Margesin, R., and Pumpel, T., « Extracellular protease-producing psychrotrophic bacteria from high alpine habitats », *Arctic and Alpine Research*, V. 24, n° 1, (February 1992), 88-92.

[220] Jo, G.H., Jung, W.J., Kuk, J.H., Oh, K.T., Kim, Y.J., and Park, R.D., « Screening of protease producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction », *Carbohydrate Polymers*, V. 74, n° 3, (November 2008), 504-508.

- [221] Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S. Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., and Jaouadi, B., « Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A », *International Journal of Biological Macromolecules.*, V. 114, (July 2018), 1033-1048.
- [222] Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S. B., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, M., Chamkha, M., and Sayadi, S., « Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation », *Journal of Basic Microbiology.*, V. 52, n° 4, (November 2011), 408-418.
- [223] Ferradji, F.Z., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K., and Sayadi, S., « Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria) », *International Biodeterioration and Biodegradation*, V. 86, (January 2014), 300-308.
- [224] Elazzazy, A.M., Abdelmoneim, T.S., and Almaghrabi, O.A., « Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia », *Saudi Journal of Biological Sciences*, V. 22, n° 4, (July 2015), 466-475.
- [225] Arimi, S.M., Park, R.W.A., and Fricker, C.R., « Study of haemolytic activity of some *Campylobacter* spp. on blood agar plates », *Journal of applied Bacteriology*, V. 69, n° 3, (September 1990), 384-389.
- [226] Morikawa, M., Daido, H., Takao, T. Murata, S., Shimonishi, Y., and Imanaka, T., « A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS 38 », *Journal of Bacteriology*, V. 175, n° 20, (October 1993), 6459- 6466.
- [227] Li, H., Lan, W., Cai, C., Zhou, Y., and Lin Y., « Biotransformation of Limonene by Marine Bacteria », *chinese journal of analytical chemistry*, V. 34, n° 7, (July 2006), 946-950.

- [228] Rasoul-Amini, S., Fotooh-Abadi, E., and Ghasemi, Y., « Biotransformation of monoterpenes by immobilized microalgae », *Journal of applied phycology*, V. 23, (2011), 975-981.
- [229] Pimentel, M., Molina, G., Bertucci, T., and Pastore, G., « Biotransformation of citronellol in rose oxide by *Pseudomonas* spp », *Chemical Engineering Transactions*, V. 27, (June 2012), 295-300.
- [230] Adams, R.P., « Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy », 4th Edition, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL (2007).
- [231] Massada, Y., « Analysis of Essential Oil by Gas Chromatography and Mass Spectrometry », John Wiley & Sons, NewYork, (1976).
- [232] Toniazzo, G., de Oliveira, D., Dariva, C., Oestreicher, E. G., and Antunes, O. A.C., « Biotransformation of (-) β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642 », *Applied Biochemistry and Biotechnology*, V. 123, n° 1-3, (2005), 837-844.
- [233] Trytek, M., Jedrzejewski, K., Fiedurek, J., « Bioconversion of α -pinène by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum* », *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, V. 42, n° 2, (February 2015), 181-188.
- [234] Fauchère, J.L., and Avril, J.L., « Bactériologie générale et médicale », Ed. Ellipses, (2002), 365 p.
- [235] Chatterjee, T., and Bhattacharyya, D., « Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida* », *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 55, (May 2001), 541-546.
- [236] Evans, C.T., Hanna, K., Payne, C., Conrad, D., and Misawa, M., « Biotransformation of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine: Optimization of reaction conditions using whole yeast cells », *Enzyme and Microbial Technology*, V. 9, n° 7, (July 1987), 417-421.

[237] Sartoros, C., Yerushalmi, L., Béron, P., and Guiot, S. R., « Effects of surfactant and temperature on biotransformation kinetics of anthracene and pyrene », *Chemosphere*, V. 61, n° 7, (November 2005). 1042-1050.

[238] Aguedo, M., Waché, Y., Coste, F., Husson, F., and Belin, J.M., « Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica* », *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, V. 29, n° 1-6, (June 2004). 31-36.

[239] Rodríguez, P., Sierra, W., Rodríguez, S., and Menéndez, P., « Biotransformation of 1, 8-cineole, the main product of Eucalyptus oils », *Electronic Journal of Biotechnology*, V. 9, n° 3, (June 2006), 1-5.

[240] Esmaeili, A., Saad, N., Safaiyan, S., and Rustaiyan, A., « Biotransformation of (-)-menthol by spores of *Mucor ramannianus* and study of the pathways involved », *Herba Polonica*, V. 55, n° 2, (2009), 51-58.

[241] Ilori, M.O., Amobi, C.J., and Odocha, A.C., « Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment », *Chemosphere journal*, V. 61, n° 7, (November 2005), 985-992.

[242] Ferhat, S., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaoui, R., Boucherita, A., Mhiri, Moulai-Mostefa, N., and Sayadi, S., « Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils », *International Biodeterioration and Biodegradation Journal*, V. 65, n° 8, (December 2011), 1182 -1188.

[243] Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Ben Younes, S., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, N., Chamkha, M., and Sayadi, S., « Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation », *Journal of Basic Microbiology*, V. 51, (November 2011), 1-11.

