

LA REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE D'ALGERIE

UNIVERSITÉ BLIDA 1

Faculté des sciences

Département de Chimie

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules

VALORISATION DES SOUCHES MARINES D'ACTINOBACTERIES DANS LA BIOTRANSFORMATION ET LA PRODUCTION DES METABOLITES D'INTERETS INDUSTRIEL ET ENVIRONNEMENTAL

Par

BEICHI Madjeda

Devant le jury composé de :

BOURAS OMAR	Professeur, Université Blida 1	Président
TAOUALIT NADJET	MCA, Université Blida 1	Examinatrice
MESBAIAH FATMA ZOHRA	MRA, CNRDPA-Bousmail	Examinatrice
BADIS ABD EL MALEK	Professeur, Université Blida 1	Directeur de thèse
EL HATTAB MOHAMED	Professeur, Université Blida 1	Co-Directeur de thèse

Blida, le 02 juillet 2024

ملخص

خلال هذه الأطروحة، اهتمنا بدراسة الكائنات الحية الدقيقة البحرية، وخاصة البكتيريا الشعاعية، ذات القدرة العالية على إنتاج جزيئات جديدة. تم عزل سلالات البكتيريا الشعاعية البحرية من الطحالب البنية (*Zonaria Tournefortii*) التي تم جمعها من "القرن" الذهبي في منطقة تيبازة. تم تطبيق طريقة تكييفية لعزل وتوصيف سلالات البكتيريا الشعاعية وكذلك لفحص الخصائص التكنولوجية الحيوية لهذه السلالات، وهي الأنشطة المضادة للميكروبات، وإنتاج البروتينات والمواد الخافضة للتوتر السطحي. تم إجراء عزل السلالات على أوساط محددة مختلفة لزراعة البكتيريا الشعاعية البحرية. تم تشخيص هذه العزلات على أساس المورفولوجية (الدراسة العيانية والمجهريّة) والخصائص الفسيولوجية والكيميائية الحيوية. وقد أتاح التحديد الأولي لسبع عزلات ربط ستة سلالات مشفرة ، AZ3 ، *Rhodococcus* وسلالة واحدة (01) بجنس AZ4 و AZ9 و *Streptomyces* : AR1 AR2 K1 لديها إمكانات إنتاج فاعلة بالسطح الحيوي ملحوظة للغاية، وهو ما ينعكس في قطر إزاحة الزيت العالي (7.5 - 6.5 DDP =) .

تكشف النتائج التي تم الحصول عليها من نشاط التحلل البروتيني أن ستة سلالات سم مشفرة AR1 و AZ3 و AZ4 و AZ9 و K1 و AR2 هي منتجة للبروتينات. تم إجراء النشاط المضاد للميكروبات ضد ثلاثة أنواع من البكتيريا موجبة الجرام، واثنين من البكتيريا سالبة الجرام، وخميرة واحدة، وأربعة فطريات خيطية باستخدام تقنية أسطوانة الأجار. وأظهرت النتائج أن السلالات السبع لها نشاط مضاد للجراثيم، وأربع منها لها نشاط مضاد للفطريات. ومع ذلك، تم الحصول على أعلى نشاط تثبيطي بواسطة سلالة AZ3 ضد المكورات العنقودية الذهبية، و منطقة تثبيط 40، 35 و 28 ملم، التوالي *Staphylococcus aureus* ، *Listeria monocytogenes* مع *Bacillus subtilis*.

تم تحديد التركيز الاستيعابي عن طريق اختبار التثبيط في الوسط الصلب، وكان التركيز المختار لبقية العمل هو (0.25 \pm 0.79) ملغم/مل للمنتول والثيمول و (0.5 \pm 0.66) ملغم/مل للسيمين كما التركيز غير المثبط المتاح (NIAC). تم إجراء التحول الحيوي على وسط ISP2 بعد زراعة السلالة عند 30 درجة مئوية لمدة 6 أيام حدث خلالها نمو بكتيري جيد.

إن التحول الحيوي للتربينات الأحادية الثلاثة بواسطة سلالة AZ3 جعل من الممكن الحصول على التربينات الأحادية الهيدروكربونية والمؤكسجة، وخاصة البورنيول؛ إيزوبوليغول. 8-هيدروكسي مينثول؛ أكسيد الليمونين د-ليمونين، ثيموهيدروكينون؛ التيروزول، خلات. الكامفين والبيبيريتون.... إلخ. تشير النتائج إلى المسارات الأيضية المختلفة التي تشارك فيها هذه السلالة (AZ3) في التحول الحيوي للتربينات الأحادي

الكلمات المفتاحية : *Streptomyces Zonaria Tournefortii* sp ، الطحالب البنية، التحول الحيوي التربينات الأحادية، الفاعل بالسطح الحيوي، البروتينات.

RÉSUMÉ

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la recherche des microorganismes marins, notamment des actinobactéries, à fort potentiel de production de nouvelles molécules. Les souches d'actinobactéries marines ont été isolées à partir de l'algue brune (*Zonaria tournefortii*) prélevée dans la "Corne" d'Or de la région de Tipaza. Le criblage des propriétés biotechnologiques de ces souches, à savoir, les activités antimicrobiennes, la double production de protéases et de biosurfactants. L'isolement des souches a été effectué sur différents milieux spécifiques pour la culture des actinobactéries marines. L'identification de ces isolats a été basée sur les caractéristiques morphologiques (étude macroscopique et microscopique), physiologiques et biochimiques. L'identification préliminaire de sept isolats a permis de rattacher six souches au genre *Streptomyces* et une (01) au genre *Rhodococcus*. Six souches codées AR1, AZ3, AZ4, AZ9, K1 et AR2 ont un potentiel de production de biosurfactants très marqué, traduit par un diamètre de déplacement de pétrole élevé (DDP = 6,5 - 7,5 cm). Les résultats obtenus sur l'activité protéolytique révèlent que six souches sont productrices de protéase. L'activité antimicrobienne a été réalisée contre trois bactéries Gram-positif, deux bactéries Gram-négatif, une levure et quatre champignons filamenteux en utilisant la technique du cylindre sur gélose. Les résultats montrent que les sept souches ont une activité antibactérienne dont quatre ont une activité antifongique. Cependant, l'activité inhibitrice la plus élevée a été obtenue par la souche AZ3 contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes* avec une zone d'inhibition de 40, 35 et 28 mm, respectivement.

Concernant l'étude de la biotransformation de monoterpènes, la concentration choisie est de $(0.25 \pm 0,79)$ mg/mL pour le menthol et thymol et $(0.5 \pm 0,66)$ mg/mL pour le cymène comme concentration assimilable non inhibitrice (CANI). Par la suite, la biotransformation a été effectuée sur le milieu ISP2 après une culture de la souche sélectionnée à 30 °C sous agitation (150 tr/min) pendant 6 jours au cours de laquelle une bonne croissance bactérienne a lieu. La biotransformation des trois monoterpènes par la souche AZ3 a permis l'obtention des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés notamment le bornéol ; isopulegol ; 8-hydroxyméthol ; limonène oxide ; d-Limonène, thymohydroquinone ; tyrosol, acétate ; Camphène et piperitenone. Les résultats indiquent que différentes voies métaboliques sont impliquées par cette souche (AZ3) dans la biotransformation des monoterpènes, en particulier la voie d'hydratation et d'isomérisation, la voie d'hydrolyse et la voie d'oxydation.

Mots clés : Algue brune, *Zonaria tournefortii*, *Streptomyces* sp, Activité antimicrobienne, Biotransformation, monoterpènes, biosurfactant, protéase.

ABSTRACT

In the course of this thesis work, we focused on marine microorganisms, in particular actinobacteria, with high potential for the production of new molecules. Strains of marine actinobacteria were isolated from brown algae (*Zonaria tournefortii*) collected in the "Corne" d'Or in the Tipaza region. The screening of their biotechnological properties, namely antimicrobial activities, protease and biosurfactant production. Isolation of the strains was carried out on a range of specific media for cultivating marine actinobacteria. Identification of these isolates was based on morphological (macroscopic and microscopic study), physiological and biochemical characteristics. Preliminary identification of seven isolates enabled us to assign six strains to the *Streptomyces* genus and one (01) to the *Rhodococcus* genus. Six strains, coded AR1, AZ3, AZ4, AZ9, K1 and AR2, have a very marked biosurfactant production potential, reflected by a high oil displacement diameter (OD = 6.5 - 7.5 cm). The results obtained on proteolytic activity reveal that six strains are protease producers. Antimicrobial activity was tested against three Gram-positive bacteria, two Gram-negative bacteria, one yeast and four filamentous fungi using the agar cylinder technique. Results showed that all seven strains had antibacterial activity, four of which had antifungal activity. However, the highest inhibitory activity was obtained by the AZ3 strain against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes* with a zone of inhibition of 40, 35 and 28 mm, respectively.

The Assimilative Concentration was determined by a solid-state inhibition test, using a concentration of (0.25 ±0.79) mg/mL for menthol and thymol and (0.5 ±0.66) mg/mL for cymene as the Non-Inhibitory Assimilative Concentration (NAC).

Biotransformation was performed on ISP2 medium after culturing the strain at 30°C for 6 days, during which time good bacterial growth occurred.

Biotransformation of the three monoterpenes by strain AZ3 yielded hydrocarbon and oxygenated monoterpenes including: borneol; isopulegol; 8-hydroxymenthol; limonene oxide; d-Limonene, thymohydroquinone; tyrosol, acetate; camphene and piperitenone.....ect.

The results indicate the different metabolic pathways involved by this strain (AZ3) in the biotransformation of monoterpenes.

Keywords: Brown algae, *Zonaria tournefortii*, *Streptomyces* sp., Biotransformation, monoterpenes, biosurfactant, protease.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens remercier «*Allah*», tout puissant, de m'avoir orienté vers la lumière de la recherche de la science et du savoir et de m'avoir donné la force pour dépasser toutes les difficultés.

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Biomolécules, département de chimie à l'Université de Saad Dahlab Blida. Un stage à l'Université de l'Écosse de l'Ouest qui m'a permis de faire des analyses de GC/MS et j'apprends beaucoup de choses sur les techniques d'analyses comme LSMC et RMN.

Je témoigne ici ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, Professeur Badis Abdelmalek et Professeur El Hattab Mohamed, qui ont accepté de prendre la direction de cette thèse, transformant ainsi les difficultés rencontrées en une expérience enrichissante. Je tiens à leur remercier de m'avoir confiée ce sujet de thèse pluridisciplinaire entre la chimie et la microbiologie. Je suis également reconnaissante de m'avoir assuré un encadrement rigoureux tout au long de ces années, tout en me donnant la possibilité de trouver par moi-même mon cheminement personnel et, de m'avoir témoigné de la confiance en m'accordant une grande autonomie dans ce travail. Plus que tout, merci d'avoir été patients pendant toute cette période de mes études. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes vifs et sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Monsieur BOURAS OMAR, Professeur à l'Université Saad Dahlab Blida 1 Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être Président de ce travail de thèse.

Madame TAOUALIT NADJET Maître de conférence A, USD Blida 1, pour l'honneur et le privilège qu'il m'a accordé en acceptant d'être examinatrice et de juger ce travail.

Madame MISBAIAH FATMA ZOHRA, Maître de recherche A, à CNRDPA-Bou-Ismaïl, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinatrice de ma thèse et de juger ce modeste travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur le Professeur *Nasserdine SABAOU* «*Rahimaho Allah*» ancien directeur de laboratoire de biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) à l'Ecole Normale Supérieure d'Alger-Kouba de m'avoir donné l'opportunité d'entrer à son laboratoire, de m'avoir accordé sa confiance. Je le remercie également pour sa disponibilité avec moi dans l'été de 2019 pour purifier mes souches qui ont été contaminées je ne l'oublier jamais.

Je remercie très chaleureusement Professeurs Daghbouche Yasmina et Bouzidi Naima, Présidentes du Comité de Formation Doctorale, pour les efforts considérables qu'elles ont déployés pour assurer un bon cheminement de notre Doctorat.

Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à Monsieur Rateb Mostafa, Docteur à l'Université de l'Écosse de l'Ouest, pour son chaleureux accueil, pour toute sa gentillesse, son aide, ses conseils et sa bonne humeur de tous les jours. Merci pour cette expérience inoubliable tant personnelle que professionnelle, Mon passage par l'Ecosse m'a accordé de rencontrer des personnes qui nous manque autant, on en rencontre que très peu durant sa vie. Les mots ne suffisent tout simplement pas pour leur exprimer mes sentiments de reconnaissance. Merci Nawreen et son mari Riyad.

Je souhaite remercier également les laboratoires dans lesquels j'ai fait mon chemin et qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici, à commencer par l'équipe du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) en particulier, Mr Abou Mostafa, qui m'ont permis d'effectuer mes analyses CG/SM dans des meilleurs conditions; l'équipe du laboratoire d'hygiène de Blida, en tout particulièrement Mr Tafahi de m'avoir permis de réaliser l'identification phénotypique au sein de son unité.

Je tiens à remercier aussi tous les enseignants et les ingénieurs du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de biomolécules et le personnel et les administratifs de la Faculté des sciences pour leur aide et leur soutien en particulier : Mme Touafek, Mme Bouzidi, Mme Zeffouni, Mme Mehdaoui (*Rahimaha Allah*), Mr Zahi, Mlle Boudissa Hafida, Mlle messaoudi Fatiha, Mlle Medjdoub Dallel.

Je ne souhaite pas oublier le personnel des laboratoires pédagogiques du Pavillon 5 et du Pavillon 22 qui m'ont laissé faire mes premiers pas dans des meilleures conditions grace à leur sympathie et leur aide, particulièrement : Amina, Kahina, Asma, meriem, 3ami Aissa, Nawal.

Enfin, je remercie tous celles et ceux qui me connaissent et qui me permettent de me sentir exister... Merci pour toutes et tous.

Je dédie ce travail...

Aux être les plus chers, à ceux qui ont consacré leur vie pour mon éducation et ma réussite

A 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 et de déprime. En témoignage de ma profonde affection, qu'ils sachent que ce travail est en grande partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

Mon mari Nassim d'être toujours à mes côtés pour me soutenir et surtout pour me donner la force pour surmonter tout les obstacles et les difficultés. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Mon fils youcef, ma vie, ma fierté, tu es mon bonheur, tu m'as beaucoup donné pour continuer jusqu'à ce que j'obtienne mon doctorat, Je vous souhaite un avenir brillant et plein de réussite. Merci d'avoir rendu ma vie plus belle. je t'aime. Maman.

Ma grande mère. Ma tante Saida, ma deuxième mère, pour votre soutien continu. **Mes oncles**, leurs femmes et leurs enfants.

Mes très chère frères Abd el Rahim et sa femme Khouloud, Lakhdar et Abd el Djalil.

Mes beaux-frères Mohamed, Sidali et Toufik.

À ma très chère amie et sœur fatiha, merci pour le soutien et la force que vous m'avez apporté à un moment où j'avais abandonné. Merci pour les 7 années de travail acharné que nous avons passé ensemble....Merciii.

Mes collègues et amis: Hafsa, Nachida, Soumia, Amina, Rania et toute l'équipe du laboratoire.

TABLE DES MATIERES

ملخص	1
RESUME	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE	24

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

DIVERSITE BACTERIENNE DES ALGUES MARINES ET LEURS PROPRIETES BIOTECHNOLOGIQUES

1.1 Généralités sur les algues marines	25
1.1.1 Notions fondamentales sur les algues	25
1.2 Classification des algues marines	27
1.2.1 Algues rouges (<i>Rhodophycées</i>)	27
1.2.2 Algues vertes (<i>Chlorophycées</i>)	27
1.2.3 Algues brunes (<i>Phéophycées</i>)	28
1.2.4 Algues bleues-vertes	28
1.3 Etude de l'espèce <i>Zonaria tournefortii</i>	28
1.3.1. Systématique	28
1.3.2. Description, biologie et écologie	29
1.4 Etude des Microorganismes autochtone d'algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	29
1.4.1 Généralités sur les microorganismes marins	29
1.4.2 Diversité des microorganismes associés aux algues	30
1.4.3 Isolement des microorganismes	32
1.4.3.1 Isolement des microorganismes épiphytes	32
1.4.3.2 Isolement des microorganismes endophytes	33
1.4.4 Composés bioactifs obtenus à partir des microorganismes	34
1.5 Généralités sur les actinobactéries marines (Genre <i>Streptomyces</i>).	34
1.5.1 Répartition des actinobactéries dans le milieu marin	36

1.5.2 Rôle des actinobactéries en milieu marin	36
1.5.3 Position taxonomique et description morphologique du genre <i>Streptomyces</i>	37
1.5.4 Détermination des espèces du genre <i>Streptomyces</i>	39
1.5.5 Ecologie des actinomycètes	41
1.5.6 Cycle de développement des actinobactéries (exemple type : <i>Streptomyces</i> sp.)	42
1.5.7 Importance des actinobactéries	43
1.5.7.1 Importance en agronomie	43
1.5.7.2 Importance en biotechnologie	44
1.6 Métabolites secondaires biologiquement actifs obtenus de microorganismes associés aux algues marines	44
1.6.1 Culture des microorganismes marins	45
1.6.2 Criblage biologique	46
1.7 Mise au point d'une méthodologie de criblage optimisée des souches d'actinobactéries productrices de métabolites secondaires	46

BIOTRANSFORMATION DES MONOTERPENES PAR DES MICROORGANISMES MARINS

2.1 Introduction	48
2.2 Notions générales sur la biotransformation	49
2.2.1 Définition de la biotransformation	49
2.2.2 Classification des voies de bioconversion	49
2.2.3 Avantage des bioconversions	50
2.2.4 Difficultés liées à la bioconversion.	51
2.2.5 Facteurs affectant la bioconversion	51
2.2.6 Biocatalyseurs	51
2.2.7 Optimisation des procédés de bioconversion	52
2.3 Bioconversion des monoterpènes par des microorganismes marins du genre <i>Streptomyces</i> et d'autres espèces	53
2.3.1 Les terpènes	53
2.3.2 Les monoterpènes	54
2.3.3 Classification des monoterpènes :	55
2.3.4 Biotransformation des terpènes	58

2.3.5 Les principales voies métaboliques d'une transformation microbienne (biotransformation) des terpénoïdes par des microorganismes	56
2.3.6 Travaux antérieurs de la bioconversion des terpènes par le genre <i>Streptomyces</i>	56
2.3.7 Travaux antérieurs de la bioconversion des terpènes par différents microorganismes	59
2.3.8 Etude de la biotransformation des métabolites secondaire : Menthol, thymol et cymène	62
2.3.8.1 Biotransformation de menthol	62
2.3.8.1.1 Description chimique et utilisation de menthol	62
2.3.8.1.2 Propriétés physiques et chimiques du menthol	63
2.3.8.1.3 Biotransformation de menthol par divers microorganismes	63
2.3.8.2 Biotransformation de thymol	70
2.3.8.2.1 Description chimique et utilisation de thymol	70
2.3.8.2.2 Propriétés physiques et chimiques du thymol	72
2.3.8.2.3 Bioconversion de thymol par différents microorganismes	72
2.3.8.4 Biotransformation de cymène	76
2.3.8.4.1 Description chimique et utilisation de cymène	76
2.3.8.4.2 Propriétés physiques et chimiques du cymène	77
2.3.8.4.3 Bioconversion du cymène par différentes microorganismes	77

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1.1 Isolement et criblage des actinobactéries marines d'intérêts biotechnologiques	82
1.1.1 Coordonnées géographiques et présentation du site de prélèvement	82
1.1.2 Caractéristiques physicochimiques de l'eau de mer	83
1.1.3 Echantillonnage et conditionnement des algues	83
1.1.4 Traitement et mise en culture des échantillons d'algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	83
1.1.5 Méthodes d'isolement des actinobactéries marines	84
1.1.5.1 Première méthode : utilisation de la matrice de la surface d'algues pour l'isolement des actinobactéries épiphytes.	84
1.1.5.2 Deuxième méthode : utilisation de la matrice de profondeur d'algues pour	84

l'isolement des actinobactéries endophytes	
1.1.5.3 Troisième méthode : utilisation de l'algue entière (partie surface, profondeur et racines)	85
1.1.6 Milieux d'isolement des actinobactéries	85
1.1.7 Isolement des actinobactéries	85
1.1.8 Conservation des isolats d'actinobactéries	86
1.1.8.1 Conservation à courte durée	86
1.1.8.2 Conservation à longue durée	86
1.1.9 Caractérisation préliminaire des souches d'actinobactéries isolées de l'algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	86
1.1.9.1 Choix des isolats pour l'identification	86
1.1.9.2 Caractéristiques culturelles	87
1.1.9.3 Etude morphologique, biochimique et physiologique des isolats d'actinobactéries	87
1.1.9.4. Etude des activités microbiennes d'intérêts biotechnologique chez les souches d'actinobactéries nouvellement isolées	91
1.1.9.5. Sélection des souches productrices de protéases	94
1.1.9.6. Criblage des souches productrices de biosurfactants	94
1.2. Contributions à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche d'actinobactérie du genre <i>Streptomyces</i> codée AZ3	96
1.2.1 Etude de l'activité catabolique des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la souche AZ3	96
1.2.1.1 Analyses préliminaires des monoterpènes étudiées (menthol, thymol et cymène)	96
1.2.1.2 Conditions de culture pour l'activité catabolique de menthol, thymol et cymène par AZ3.	97
1.2.1.3 Effet des conditions environnementales sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3	99

1.2.1.4. Etude de l'effet de surfactants non ioniques sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3	100
1.2.2 Mise en évidence des produits issus de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par AZ3 après une croissance optimale	100

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Isolement et identification d'actinobactéries marines à partir d'une algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	103
2.1.1. Caractéristiques physicochimiques du site d'isolement des actinobactéries	103
2.1.2. Isolement et choix des isolats d'actinobactéries	103
2.1.3. Classification préliminaire des souches d'actinobactéries isolées	107
2.1.3.1. Etude morphologiques des souches d'actinomycètes obtenues	107
2.1.3.2. Étude physiologique et biochimiques des isolats obtenus	117
2.2 Etude des propriétés biotechnologiques des souches d'actinobactéries marines isolées à partir d'une algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	121
2.2.1 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	121
2.2.1.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries contre des bactéries pathogènes à Gram positif	122
2.2.1.2 Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries contre des bactéries pathogènes à Gram négatif	124
2.2.2 Mise en évidence de l'activité antifongique	126
2.2.3 Choix de meilleur milieu liquide pour la production des produits antimicrobiens en milieux liquide par l'isolat AZ3	129
2.2.3.1 Sur le milieu ISP2	129
2.2.3.2 Sur le milieu AF	130
2.2.3.3 Sur le milieu Bennett	131
2.2.4. Criblage et sélection de souches productrices de protéases	133
2.2.5 Criblage de l'activité hémolytique et des substances tensioactives	134
2.3 Contributions à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par AZ3 du genre <i>Streptomyces</i>	138
2.3.1 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse de Menthol, Thymol et Cymène	138

2.3.2 Etude de l'activité catabolique des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la souche AZ3	140
2.3.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en milieu solide	141
2.3.4 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice en milieu liquide	141
2.3.5. Effet des conditions environnementales sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3	144
2.3.5.1 Effet du pH	144
2.3.5.2 Effet de température	145
2.3.5.3 Etude de l'effet de surfactants non ioniques sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3	147
2.4 Mise en évidence des produits issus de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par AZ3 après une croissance optimale	148
2.4.1 Identification des produits issus de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche AZ3	149
2.4.1.1 Biotransformation du menthol	149
2.4.1.2 Biotransformation de thymol	152
2.4.1.3 Biotransformation de cymene	154
2.4.2 Voies plausibles de biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche marine de genre <i>Streptomyces</i> AZ3	156
2.4.2.1 Voies de biotransformation plausibles du menthol par la souche AZ3	156
2.4.2.2 Voies probables de biotransformation du thymol par la souche AZ3	159
2.4.2.3 Voies plausibles de biotransformation de cymène par la souche AZ3	161
CONCLUSION GENERALE	160
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	163
APPENDICES	164
RÉFÉRENCES	174

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1: La zonation de la l'algue brune dans la mer.	26
Figure 2: Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète.	37
Figure 3: Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes	40
Figure 4: Cycle de développement de <i>streptomycetes</i>	43
Figure 5: Structure des monoterpènes	55
Figure 6: Structure des monoterpènes oxygénés	55
Figure 7: (1R, 2S, 5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol	63
Figure 8: Voies métaboliques de (-) menthol par <i>Aspergillus niger</i> .	65
Figure 9 : Bioconversion du (-) menthol par <i>Cephalosporium aphidicola</i> .	66
Figure 10: Bioconversion du (-) menthol par <i>Mucor ramannianus</i> (PTCC5074)	67
Figure 11: Bioconversion du (-) menthol par <i>Mucor ramannianus</i> (PTCC5074)	68
Figure 12 : Bioconversion du (-) menthol par <i>Chlorella vulgaris</i> .	69
Figure 13 : Voie possible de bioconversion du (-) menthol par <i>Penicillium sp</i>	70
Figure 14 : 5-methyl-2-(propan-2-yl)-phénol .	71
Figure 15 : Biotransformation du thymol par <i>Streptomyces humidus et fung</i> <i>Aspergillus niger</i> Tu-1.	73
Figure 16 : Biotransformation du thymol par <i>Colletotrichum acutatum</i> et <i>Botryodiplodia theobromae</i> .	74
Figure 17: Biotransformation de thymol par différents microorganismes	75
Figure 18 : 1-méthyl-4(1-méthyléthyl) benzene.	76
Figure 19 : Biotransformation du p-cymène en utilisant <i>Penicillium claviforme</i> MR376.	78
Figure 20 : Biotransformation du p-cymène par la souche (PL) de <i>Pseudomonas sp.</i>	79
Figure 21 : Biotransformation du p-cymène en acide cumique par <i>Pseudomonas</i> <i>sp.Pseudomonas desmolytica et Nocardia salmonicolor.</i>	79
Figure 22 : Biotransformation du p-cymène en thymoquinone et analogues par des micro-organismes.	80
Figure 23 : Localisation du site de prélèvement	82
Figure 24 : Technique de diamètre de déplacement du pétrole DDP.	95
Figure 25: Les différentes étapes de l'isolement des actinobactéries afin d'obtenir	104

des colonies bien isolées sur gélose ISP2.

Figure 26 : Répartition du nombre d'isolats d'actinomycètes selon le milieu de culture utilisé.	105
Figure 27 : Macro et micromorphologie des actinobactéries obtenues.	117
Figure 28 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923).	122
Figure 29 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC6633).	123
Figure 30 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Listeria monocytogenes</i> . (ATCC49594).	124
Figure 31 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25843).	125
Figure 32 : Activité antifongique des isolats d'actinobactéries contre les souches <i>Aspergillus</i> (ATCC 5010) et (ATCC 3150).	127
Figure 33 : Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre <i>Mucor ramanianus</i> (ATTC 9628).	128
Figure 34 : Suivi de la production des produits antibactériens de l'isolat AZ3 sur milieu liquide ISP2 <i>vis-à-vis</i> de <i>S. aureus</i> .	130
Figure 35 : Suivi de la production des produits antibactériens de l'isolat AZ3 sur milieu liquide AF <i>vis-à-vis</i> de <i>S. aureus</i> .	131
Figure 36 : Suivi de la production des produits antibactériens de l'isolat AZ3 sur milieu liquide Bennett <i>vis-à-vis</i> de <i>S. aureus</i> .	132
Figure 37 : Diamètres de déplacement de pétrole (DDP) sur l'huile d'olive en fonction du temps.	135
Figure 38 : Diamètres de déplacement de pétrole sur l'huile de table en fonction du temps.	136
Figure 39 : Diamètres de déplacement de pétrole sur le pétrole en fonction du temps.	136
Figure 40 : Profil chromatographique d'analyse du thymol.	139
Figure 41 : le Profil chromatographique d'analyse du menthol.	139
Figure 42 : le Profil chromatographique d'analyse du cymène.	140
Figure 43 : Cinétique des concentrations des substrats menthol et thymol et de croissance bactérienne de la souche <i>Streptomyces</i> AZ3.	141

Figure 44 : Cinétique des concentrations de substrat cymène et de croissance bactérienne de la souche <i>Streptomyces AZ3</i> .	142
Figure 45 : L'effet du pH sur la croissance de la souche AZ3 réalisée dans un shaker à différents pH et à T=30 °C et sous agitation de 200 rpm.	145
Figure 46: L'effet de la température sur la croissance cellulaire a été réalisé dans un shaker à pH = 8 à 30 °C et sous agitation 200 rpm. Avec les trois substrats.	146
Figure 47 : L'effet des surfactants sur la croissance bactérienne à pH = 8 et T= 30°C et sous agitation 200 rpm avec les trois substrats .	147
Figure 48 : Voies de bioconversion de menthol par <i>Streptomyces sp AZ3</i> .	151
Figure 49 : Voies métaboliques de la biotransformation de thymol par la <i>Streptomyces sp AZ3</i> .	153
Figure 50: Voies de bioconversion de cymène par la souche <i>Streptomyces sp AZ3</i> .	155
Figure 51 : Voies de biotransformation du menthol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> en thymol et alcool phénéthylque.	156
Figure 52 : Voies de biotransformation du menthol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> en p- Mentha -3.8- diol.	156
Figure 53 : Voies de biotransformation de menthol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> en 4-Hydroxymenthol et 2-hydroxymenthol	157
Figure 54: Voie de biotransformation du menthol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> en Isopulegol	157
Figure 55: Voie de biotransformation de menthol en pipéritone	157
Figure 56 : Voie de bioconversion de menthol en oxyde de limonène	158
Figure 57 : Voies de biotransformation de menthol en Bornéol et camphène	158
Figure 58: Voie de biotransformation de menthol en Cymène -8-ol	158
Figure 59 : Voies de biotransformation de thymol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> en camphène.	159
Figure 60 : Voies de biotransformation de thymol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> en acide benzoïque.	159
Figure 61 : les Voies de biotransformation de thymol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> limonène et limonène oxide	160
Figure 62: Voies de biotransformation de thymol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i> en Isopulegol	160
Figure 63 : Voies de biotransformation de thymol par la souche <i>Streptomyces AZ3</i>	160

en p-cymène -8-ol.

Figure 64 : les Voies de biotransformation de thymol par la souche *Streptomyces* en 161
4-hydroxymenthol.

Figure 65 : Voies de biotransformation de thymol par la souche *streptomyces* AZ3 161
en 2-hydroxymenthol

Figure 66: Voies métaboliques de la biotransformation de cymène par la souche 161
Streptomyces AZ3 en cymène -7-ol

Figure 67: Voies métaboliques de la biotransformation de cymène par la souche 162
Streptomyces AZ3 en cymène -8-ol

Figure 68 : les Voies de biotransformation de cymène par la souche *Streptomyces* 162
AZ3 en thymohydroquione.

Figure 96 : les Voies de biotransformation de cymène par la souche *Streptomyces* 162
AZ3 en alcool phénéthylrique.

Figure 70 : Voies de biotransformation de cymène par la souche *Streptomyces* AZ3 163
en menthol

Figure 71: les Voies de biotransformation de cymène par la souche *Streptomyces* 163
AZ3 en thymol et carvacrol

Figure 72 : les Voies de biotransformation de cymène par la souche *Streptomyces* 164
AZ3 en: Indane-5-acide carboxilyque

Figure 73 : les Voies de biotransformation de cymène par la souche *Streptomyces* 164
AZ3 en Tyrosol acétate.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Bactéries identifiées à partir d'espèces d'algue brune	31
Tableau 2 : Isolement des actinomycètes à partir de divers habitats écologiques	41
Tableau 3 : la voie d'oxydation microbiologique sur différents monoterpènes	56
Tableau 4 : la voie de réduction microbiologique sur différents monoterpènes	57
Tableau 5 : la voie d'hydrolyse d'un ester.	58
Tableau 6 : la voie d'hydratation et d'isomérisation.	58
Tableau 7 : Bioconversion de quelques métabolites secondaires par le genre <i>Streptomyces</i>	59
Tableau 8 : Bioconversion de quelques métabolites secondaires par différents microorganismes	61
Tableau 9 : Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats sur milieux ISP solides	108
Tableau 10 : Caractéristiques macromorphologiques des souches bactériennes isolées de <i>Zonaria tournefortii</i>	109
Tableau 11 : Les caractères physiologiques des isolats obtenus.	118
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu solide GNL (test semi-qualitatif)	133
Tableau 13 : Critères de croissance des souches sur gélose au sang	134
Tableau 14 : Métabolites obtenus par bioconversion de menthol par la souche <i>streptomyces</i> AZ3 (1 ^{ère} et 7 ^{ème} jour)	150
Tableau 15 : Biotransformation de Thymol par la souche AZ3 (1 ^{ère} et 7 ^{ème} jour)	152
Tableau 16 : Biotransformation de cymène par la souche AZ3 (1 ^{ère} et 7 ^{ème} jour)	154

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La mer, couvrant plus de 70% de la surface de la terre, contient une diversité biologique exceptionnelle, représentant plus de 95% de l'ensemble de la biosphère [1]. Par conséquent, l'océan possède de nombreux groupes d'algues qui sont très diversifiées et constituent une part très importante de la biodiversité et la base principale des chaînes alimentaires des eaux douces, saumâtres et marines. Malgré, les ressemblances morphologiques, les algues constituent un ensemble très hétérogène (dans l'habitat, la taille et le mode de reproduction). De nombreux organismes marins, en particulier les macroalgues, sont souvent associées à des microorganismes, constituent un réservoir infini de composés chimiques, et une ressource prometteuse pour la biotechnologie innovante [2, 4].

A cet effet, la biodiversité marine et la diversité chimique qui en découle mobilisent un nombre croissant d'équipes de recherche dans le monde, et de grands groupes pharmaceutiques qui se penchent sur ce gisement de biomolécules. Cette chimio-biodiversité marine est aujourd'hui perçue comme un gisement pour les biotechnologies et aussi un outil pour la compréhension des interactions dans le monde vivant.

Les biotechnologies recouvrent l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants. Aujourd'hui, nous sommes à l'orée d'une nouvelle révolution directement issue des progrès de la biotechnologie [5]. Les applications de la biotechnologie sont très diverses et leurs avantages sont tellement évidents que les industries, les intègrent actuellement dans leurs processus de production d'un produit ou d'un autre. Parmi les nombreux secteurs ayant implanté des procédés biotechnologiques dans leur production, nous citons l'agroalimentaire les savons et détergents, l'agriculture, l'élevage, la pharmacie, le diagnostic médical, la chimie fine et la chimie médico-légale. Les travaux de la biotechnologie moderne, aux fins de production de biomolécules, se concentrent aujourd'hui autour des microorganismes d'intérêts [5].

Une attention particulière doit être accordée aux potentialités des microorganismes marins, non seulement pour l'obtention des antibiotiques, mais aussi pour la bioproduction des enzymes et des biosurfactants, la biotransformation (bioconversion) et les bioprocédés

environnementales (bioremédiation, biotraitement, biofiltration, biosorption et bioénergie). Parmi ces microorganismes, nous retrouvons les actinobactéries (anciennement appelées les actinomycètes) dont le genre *Streptomyces* qui représente le candidat le plus potentiel pour la production de métabolites secondaires (environ 75%) qui sont biologiquement actifs (antibiotiques, enzymes, biosurfactants) [6, 7]. Actuellement les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques [8]. Plus particulièrement celles des genres *Streptomyces* et *Bacillus* qui couvrant 40% de ce marché [9]. Du même et à cause de la toxicité des surfactants chimiques, la recherche s'est penché de plus en plus sur les surfactants biologiques synthétisés par les microorganismes, appelés biosurfactants dont le champ d'application est probablement un des plus vastes de la science et de la technologie moderne [10].

Par ailleurs, la tendance « chimie verte » et « biotechnologie blanche » est actuellement à la recherche d'alternatives aux solvants polluants. C'est dans ce cadre, le nombre d'articles relatant la bioconversion des métabolites secondaires, notamment, les terpènes et particulièrement les monoterpènes, en utilisant des bactéries comme biocatalyseurs, s'est multipliée ces dernières années. De nouveaux dérivés plus solubles et plus stables, ayant des propriétés biologiques très maintenues voire accrues par rapport aux molécules naturelles ont pu être synthétisés. Les paramètres réactionnels ont été améliorés pour rendre les procédés économiquement et écologiquement plus performants [10]. Dans ce contexte, le procédé de biotransformation offre une pléthore de possibilités pour obtenir des molécules régio et/ou stéréo-sélectives d'origine industrielle [11].

La biotransformation (ou bioconversion) peut être définie comme un processus utilisant des microorganismes ou des enzymes responsables de la transformation de métabolites conduisant à des produits de haute qualité en termes de régiosélectivité et de stéréosélectivité, ainsi que de meilleures performances [12]. De plus, elle peut être un outil efficace pour la modification structurale de composés naturels ou synthétiques afin de synthétiser de nouveaux composés bioactifs. Le processus de biotransformation s'inscrit tout à fait dans la lignée de la chimie verte, ce qui explique les nombreuses études menées sur la conversion microbienne des plusieurs composés naturels, notamment les monoterpènes [13]. Ce sont les principaux composés des huiles essentielles, ils ont un large éventail d'activités biologiques et constituent donc une source naturelle importante et

relativement abondante pour l'industrie des arômes et de l'alimentation. Malheureusement, la valorisation des monoterpènes est principalement réalisée par des voies chimiques qui se sont révélées généralement non régiosélectives [14].

Selon ces différents aspects et contextes vient le projet de cette présente thèse afin de répondre aux objectifs suivants :

1. Isolement et caractérisation de la communauté d'actinobactéries de l'algue brune *Zonaria tournefortii* prélevées dans la "Corne" d'Or dans la région de Tipaza.
2. Criblage des propriétés technologiques des souches d'actinobactéries isolées de l'algue marine *Zonaria tournefortii*, à savoir, les activités antimicrobiennes, la production de protéases et de biosurfactants.
3. Utilisation de la souche sélectionnée dans l'étude de la biotransformation des trois monoterpènes (menthol, thymol et cymène) en métabolites d'intérêts bioactifs.

Ainsi, le manuscrit se compose de deux parties. La première est consacrée à une recherche bibliographique concernant principalement, les algues brunes et leurs microorganismes associés, les composés bioactifs et les biomolécules produites par les microorganismes marins notamment par les actinobactéries et tout particulièrement par le genre *Streptomyces* isolés des écosystèmes marins. Des généralités sur la biotransformation ainsi que la biotransformation des terpènes et les travaux antérieurs ont été décrites dans cette partie. La deuxième partie concerne l'expérimentation, couvrant le matériel et méthodes ainsi que les résultats obtenus et leurs discussions. Une conclusion générale est réservée à la fin de cette thèse qui synthétise l'ensemble des résultats obtenus et leurs mises en valeurs en termes d'application dans les différents secteurs et nous terminerons par les perspectives qui en découlent en poursuivant ce thème de recherche.

DIVERSITE BACTERIENNE D'ALGUES MARINES ET LEURS PROPRIETES BIOTECHNOLOGIQUES

1.1. Généralités sur les algues marines

1.1.1. Notions fondamentales sur les algues

Les algues sont des organismes aquatiques douées d'activité photosynthétique ressemblant à des plantes non florifères appelés macroalgues. Elles sont classées en trois grands groupes en fonction de leur pigmentation dominante : rouge (Rhodophycées), vert (Chlorophycées) et brun (Phéophycées). Les algues rouges se composent d'environ 6000 espèces et les algues brunes se composent d'environ 1750 espèces. Les algues vertes se composent d'environ 1200 espèces [15, 16]. Environ 80% de la production totale d'algues sont tilisées pour la consommation humaine directe et les 20% restantes sont utilisées dans d'autres secteurs (cosmétiques, pharmaceutique, engrais, additifs alimentaires etc.). La production mondiale d'algues provient de deux sources : les stocks sauvages et l'aquaculture [17].

Les algues se trouvent dans tous les océans et mers, jusqu'à une profondeur de 268 m comme le cas des algues rouges (Figure 1). Ils peuvent être libres ou attachés à un support. Certaines algues varient en taille d'un micron à des dizaines de mètres. "A ce jour, environ 30 000 espèces d'algues ont été identifiées" [18].

Les algues macroscopiques sont dépourvues des feuilles, des tiges et des racines. Ces organismes sont appelés frondes et varient considérablement en taille. La base du thalle contient des structures (telles que des rhizomes, des crampons et des disques) qui peuvent ancrer les algues à un support (pierres, plantes, animaux et parfois même du sable) [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 peuvent flotter, mais sont pour la plupart attachées au fond ou à d'autres organismes et constituent des organismes benthiques [21]. Ce sont principalement des phototrophes qui, en présence de lumière,

réalisent la synthèse de substances organiques nécessaires à leur vie à partir de substances inorganiques présentes dans l'environnement telles que l'eau, les sels inorganiques et le dioxyde de carbone [22].

Comme les autres organismes marins, les algues sont affectées par des facteurs physiques (lumière, température, pH, etc.), chimiques (eau, salinité, polluants, etc.) et biologiques (bactéries, phytoplancton, etc.) [23]. Les algues sont abondantes dans les deux tiers des masses d'eau de la terre et leurs propriétés les rendent essentielles à l'équilibre de la planète. L'intérêt des algues s'explique principalement par la présence de trois composants majeurs (fibres, minéraux et protéines), mais aussi par la présence de métabolites secondaires à forte bioactivité [24].

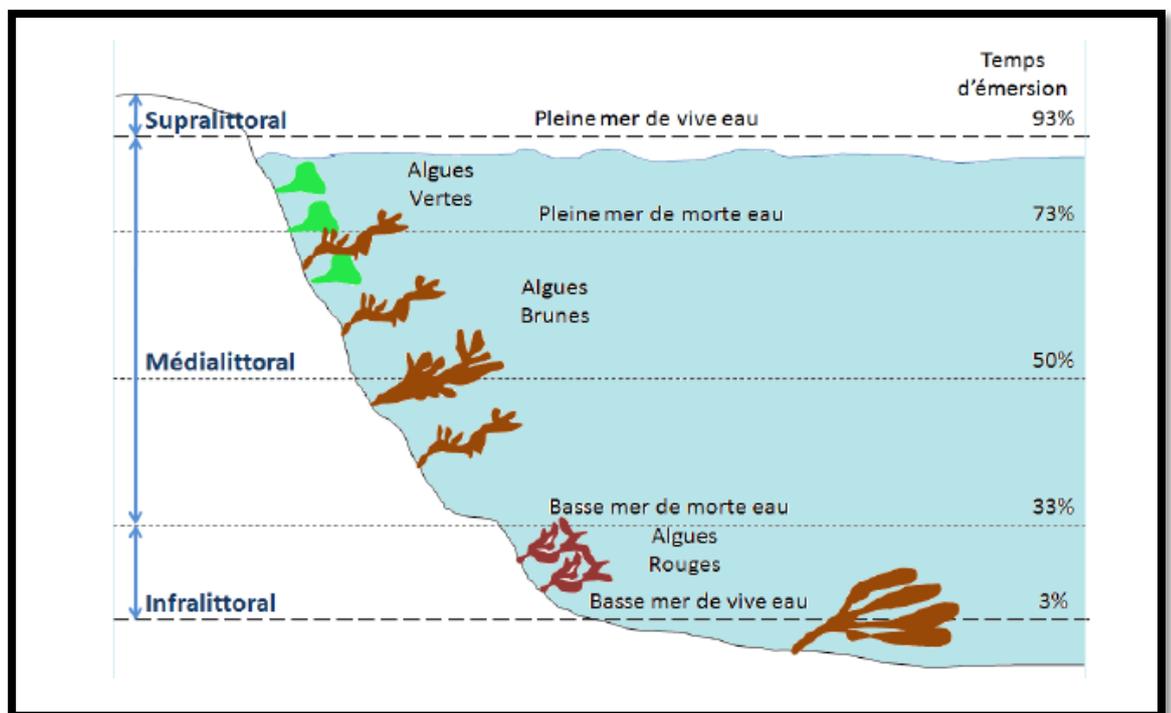


Figure 1 : Zonation de l'algue brune dans la mer [18].

1.2. Classification des algues marines

Les algues occupent une place incontournable dans l'arbre généalogique de la vie. En fait, c'est le botaniste français Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) qui classa les espèces en genres, et plus tard le naturaliste suédois Linnaeus (1707), le fondateur de la systématique (taxonomie -1778) classa les organismes en genres. Pour les groupes de plus en plus nombreux : Espèces, genres, familles, ordres, classes, tribus (ou embranchements) et règne.

Les algues sont généralement classées en quatre grands groupes: Algues rouges, algues vertes, algues brunes et les algues bleues-vertes.

1.2.1 Algues rouges (Rhodophycées)

Les rhodophycées, ou algues rouges, forment un groupe très diversifié. La couleur de ces algues est due à la présence de plastes roses, dans lesquels le pigment rouge phycoérythrine est lié à plusieurs autres pigments, dont la chlorophylle. Les algues rouges sont généralement plus petites, atteignant généralement quelques centimètres à environ un mètre de longueur [25]. La grande majorité de ces algues rouges sont 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 quelques formes unicellulaires et quelques-unes vivent également en eau douce. Elles se distinguent généralement 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 [26].

1.2.2 Algues vertes (Chlorophycées)

Les chlorophycées ont une structure et un cycle de développement très diversifiés uni-ou pluricellulaires. Beaucoup sont microscopiques, bien que certaines espèces marines atteignent une grande taille. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre [27]. En raison de leur équipement photosynthétique, plusieurs espèces de chlorophycées vivent à une profondeur de 5 mètres. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale [28].

1.2.3 Algues brunes (Phéophycées)

Les phéophycées forment un groupe très homogène. La couleur brune de ces algues résulte de la dominance des pigments xanthophylle et la fucoxanthine, qui masquent les autres pigments chlorophylliens. 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 [29]. Les phéophycées comprennent principalement des espèces

benthiques fixées sur un substrat dur et des espèces pélagiques vivant en pleine eau. Les algues brunes se trouvent en général entre la surface et une profondeur de 15 à 30 mètres dans les eaux souvent agitées [30].

1.2.4 Algues bleues-vertes (Cyanophycées)

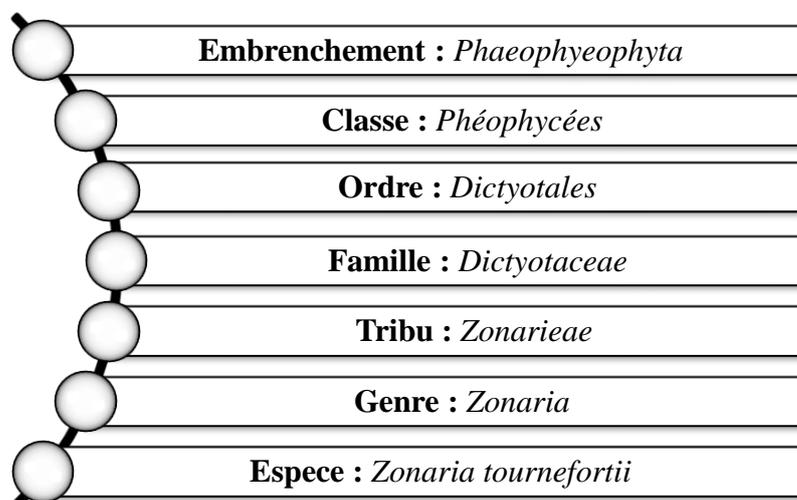
Les algues bleues vertes sont des organismes unicellulaires dépourvus de noyau différencié, il s'agit de procaryotes, également nommées cyanobactéries. Elles sont constituées des colonies de taille, de forme et de couleur très variables. Comme les algues rouges, elles possèdent des pigments surnuméraires bleus et rouges qui masquent la chlorophylle a. En dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés [31].

1.3 Etude de l'espèce *Zonaria tournefortii*

1.3.1. Systématique

Zonaria : du latin (zona)= ceinture, qui a donné le mot français zonal = porteur de stries transversales colorées ; *turnefortii* : en hommage à Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) physicien et botaniste français.

Actuellement appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne, antérieurement, cette espèce portait l'appellation *Fucus tournefortii* (Lamouroux), *Zonaria flava* Clément C. Agardh et *Padina tournefortii* (Lamouroux) Montagne [32]. Cette espèce a pour systématique :



1.3.2. Description, biologie et écologie

Zonaria tournefortii, est une algue foliacée de 20 cm de hauteur possédant un thalle verticale, lobé et dichotome portant des stries concentriques, fixée au substrat par un crampon, très ramifiée, composée de segments linéaires [33]. Les individus matures sont touffues, de plus en plus en érections, et atteignant une hauteur de 6 à 7 pouces. La couleur normale de l'algue est, en effet, d'un verdâtre tirant sur le brun [34]. Cette algue est présente toute l'année. Elle est gamétophyte et sporophyte, à spores dispersés sur la surface du thalle. Elle se trouve de la surface jusqu'à une quarantaine de mètres de profondeur, mais plus généralement, elle se trouve dans les eaux profondes [35]. Elle possède une raie de répartition sur les côtes Nord-Est de l'océan atlantique (Afrique occidentale), dans l'atlantique Nord-Est et la méditerranée [31].

1.4 Etude des microorganismes associés à l'algue brune *Zonaria tournefortii*

1.4.1 Généralités sur les microorganismes marins

Le milieu marin est un écosystème complexe avec une grande variété de formes de vie interconnectée. La relation la plus courante est entre les eucaryotes et les procaryotes [36]. Les microorganismes marins sont omniprésents à la fois géographiquement et spatialement. Ils présentent une très grande diversité et une gamme taxonomique très large, peut-être liée à la diversité des conditions environnementales rencontrées dans les milieux marins, mais on en sait peu à ce jour. Par conséquent, les microorganismes marins ont une grande capacité d'adaptation et vivent dans des niches écologiques spécifiques où seuls quelques autres types de microorganismes peuvent vivre. Les surfaces des organismes marins eucaryotes, tels que les invertébrés et les algues, fournissent des habitats riches en nutriments particulièrement adaptés à la colonisation de divers microorganismes vivant en communauté, souvent intégrés dans des substrats où il forme un biofilm défini comme "Assemblages de cellules microbiennes fixées de manière irréversible à des surfaces et enfermées dans une matrice de matériau polysaccharidique" [37].

L'étude de ces microorganismes a été longtemps négligée car leur taille infime pose souvent des problèmes techniques. Cependant, les progrès récents dans les domaines de la biologie moléculaire et de la microbiologie ont placé l'étude de ces microorganismes au centre de la recherche moderne. Ces techniques nous permettent d'ouvrir la porte d'un univers encore méconnu, avec une diversité taxonomique extrêmement riche, de nombreuses interactions

entre microorganismes et des adaptations étonnantes acquises au cours de l'évolution qui ont révélé leurs capacités. A cet effet, les microorganismes marins représentent une source potentielle de produits naturels prometteux, avec l'avantage de pouvoir produire de grandes quantités de métabolites secondaires à un coût raisonnable grâce à la culture et à la fermentation à grande échelle. De plus, les microorganismes marins peuvent accumuler des métabolites secondaires bioactifs structurellement uniques que l'on ne trouve pas dans les organismes terrestres [38].

1.4.2 Diversité des microorganismes associés aux algues

Les microorganismes marins vivent librement dans l'eau de mer ou sont fixés sur des surfaces biotiques ou abiotiques. Bien que divers microorganismes d'algues qui ont été observés et identifiés comprennent des levures, des champignons et des protozoaires, la plupart des rapports sur les communautés microbiennes associées aux algues sont des bactéries [37].

Une étude descriptive des bactéries isolées des algues a déjà été publiée en 1875. Cependant, le nombre et la complexité de ces études ont considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Cette augmentation est due à l'utilisation combinée de méthodes améliorées de culture bactérienne et de biologie moléculaire. L'association entre les bactéries et les algues brunes comprend une variété de nouvelles espèces, genres et même ordres bactériens, ce qui prouve que les algues brunes sont une source unique et riche de nouveaux taxons bactériens [38].

Les bactéries décrites à partir des surfaces d'algues marines appartiennent aux phylums supérieurs *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycètes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*. Ces bactériens représentants des grands groupes phylogénétiques ont été isolés à partir de chacun des trois groupes d'algues (brunes, rouges et vertes). Malgré cette similitude, les macroalgues brunes sont plus associées avec les espèces de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Firmicutes* [39].

Le tableau 1 regroupe des souches bactériennes isolées à partir d'algues brunes, nous donnons ici des exemples à titre d'illustration non exhaustive.

Tableau 1 : Bactéries identifiées à partir d'espèces d'algue brune

Espèces d'algues brunes	Bactéries associées	Référence
<i>Chordaria flagelliphormis</i>	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	[40]
<i>Colpomenia sinuosa</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[41]
<i>Desmarestia viridis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	[40]
<i>Ecklonia kurome</i>	<i>Croceitalea dokdonensis</i>	[42]
<i>Fucus evanescens</i>	<i>Bacillus algicola</i>	[43]
<i>Fucus serratus</i>	<i>Cellulophaga fucicola</i>	[44]
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Fucobacter marina</i>	[45]
<i>Sargassum sp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	[46]
<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Formosa algae</i>	[47]
<i>Laminaria saccharina</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	[48]

1.4.3 Isolement des microorganismes à partir d'algues marines

La littérature décrit différents protocoles pour l'isolement de microorganismes épiphytes et endophytes ainsi que les différentes conditions expérimentales utilisées pour le prétraitement d'algue.

1.4.3.1 Isolement des microorganismes épiphytes

✓ Méthode développée par Lachnit *et al.* [49].

Les algues ont été collectées individuellement dans des sacs ziplock stériles, placées dans une glacière (<10 °C) et transportées au laboratoire. Dans les deux heures qui suivent l'échantillonnage, les algues sont lavées 10 fois avec de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm pour éliminer les bactéries faiblement attachées. L'échantillon lavé est placé dans une boîte de Pétri stérile dont 2 cm² de la surface de chaque algue sont vigoureusement grattés avec

écouvillons stériles qui sont ensuite transférés dans des flacons stériles et conservées à -20 °C jusqu'à une analyse plus approfondie.

✓ Méthode développée par Nishijima *et al* [42].

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

✓ Méthode développée par Lee *et al* [50].

Les thalles d'algues sont lavés avec de l'eau de mer stérile pour éliminer les microorganismes qui sont souvent faiblement attachés à la surface d'algues. Les thalles sont ensuite découpés en morceaux carrés $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Chaque morceau est découpé avec une lame stérile et transféré dans des micro-tubes de centrifugation auquel est 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 sont étalées sur le milieu d'isolement. Les boîtes ont été cultivées à 30 °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%, p/v) à -80 °C.

1.4.3.2 Isolement des microorganismes endophytes

✓ Méthode développée par Abdel-Lateff *et al* [51].

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

✓ Méthode développée par Shiba et Taga [43].

Les échantillons d'algues sont rincés avec de l'eau de mer stérile pour éliminer les bactéries provenant de l'eau de mer de l'environnement. Les algues lavées sont coupées pour donner cinq morceaux de 1cm. Après avoir lavées avec de l'eau de mer stérile, ces cinq morceaux sont mélangés pendant trois minutes avec 30 mL d'eau de mer stérile

contenant 1 mg /mL de Tween 80. 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 El-Gendy [52].

Les échantillons d'algues sont 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 et immédiatement immergées dans l'eau de mer stérilisée et filtrée. Un gramme de tissu d'algue est transféré dans 99 mL de milieu de dissociation de l'éponge (2,7% de NaCl, 0,008% de KCl, 0,01% de Na₂SO₄, pH 8). Les échantillons sont trempés pendant 20 minutes, puis le tissu et le diluant est macéré et l'homogénat est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement puis incubées à température ambiante pendant 14 jours.

1.4.4 Composés bioactifs obtenus à partir des microorganismes

Avec l'émergence des microorganismes multirésistants aux antibiotiques, de nouveaux aspects de la pathologie microbienne et la gamme limitée de molécules utilisées dans les domaines thérapeutiques, plusieurs chercheurs à travers le monde ont suggéré que leur activité pourrait être inhibée. De nouveaux métabolites bioactifs plus efficaces et en même temps moins agressifs pour les organismes sont à l'essor [53].

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. 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 (abrégié en anglais : mVOCs), et la seconde s'intéresse aux métabolites bioactifs non volatils nommés composés organiques non volatils d'origine microbienne (non mVOCs).

1.5 Généralités sur les actinobactéries marines (Genre *Streptomyces*).

Les environnements marins sont des habitats avec des caractéristiques particulières et uniques qui n'existent pas dans les zones terrestres (pression hydrostatique élevée, salinité élevée et faible teneur en matière organique).

Waksman rapporta que jusqu'en 1959, il y avait peu de rapports d'épidémies liés aux actinomycètes (ancienne appellation) dans la mer. Des études ultérieures ont rapporté que la présence d'actinomycètes dans ce milieu était due à une contamination des sols, ou à la présence d'actinomycètes due à des algues flottant à la surface de la mer, ou encore à des prélèvements d'eau prélevés à proximité de bassins versants de rizière [54]. L'isolement des actinomycètes marins côtiers a été réalisé par Grein et Meyers [55]. En l'absence de différences morphologiques et biochimiques évidentes entre les isolats marins et terrestres, ils ont conclu que les actinomycètes n'évoluaient que sur terre et s'adaptaient à l'eau de mer salée.

Okami et Okazaki [56] ont étudié le transport des spores d'actinomycètes en eau peu profonde. L'étude explique que ces spores peuvent avoir été transportées de la terre à la mer par les eaux de ruissellement des rivières. Les spores tombent sous l'action du NaCl et pénètrent dans les sédiments marins. Par la suite, ces chercheurs ont découvert que certaines souches d'actinomycètes terrestres peuvent bien se développer dans des milieux préparés dans l'eau de mer et présenter une large gamme de tolérance au sel, tandis que la tolérance au sel des souches sensibles au NaCl augmente avec l'augmentation de la concentration [57]. Cependant, la présence d'actinomycètes résidents marins a été signalé par Weyland sur la base du nombre d'actinomycètes isolés des sédiments des grands fonds marins [58]. Jensen et al. [59] ont également signalé le plus grand nombre d'actinomycètes isolées d'algues côtières à deux points d'échantillonnage (profond et peu profond) montrant une distribution en fonction de la profondeur. Cela a été caractérisé par une diminution marquée des actinomycètes avec l'augmentation de la profondeur. Ils ont également récupéré 98 actinobactéries à des profondeurs inférieures à 3 m, et la proportion a diminué de manière significative avec l'augmentation de la profondeur. Cependant, le nombre d'actinomycètes a augmenté jusqu'à une profondeur minimale de 33 m. Ces résultats peuvent indiquer que la théorie selon laquelle les actinomycètes d'origine marine sont originaires de la terre semble être correcte. De plus, selon les mêmes chercheurs, les actinomycètes marines sont bien adaptés près de la côte et font partie de la communauté microbienne marine. Aussi, ces mêmes auteurs ont rapporté que les actinomycètes isolés

du milieu marin sont métaboliquement actives et adaptées aux organismes marins. De plus, les actinomycètes peuvent survivre dans les environnements marins en raison de leur tolérance au sel.

Selon Ghanem et al. [60], le nombre d'actinomycètes isolés de sédiments marins et d'algues marines dépassait de loin celles trouvées dans l'eau de mer. La confirmation de la croissance et de l'adaptation des actinomycètes en milieu marin a été rapportée, notamment après l'isolement d'actinomycètes du genre *Salinispora* [61] comme premier genre marin décrit. Les efforts pour isoler ces organismes du milieu marin ont augmenté principalement en raison de leur importance en applications biotechnologiques et de leur capacité à générer de nouveaux métabolites bioactifs.

1.5.1 Répartition des actinobactéries dans le milieu marin

Dans le milieu marin, deux localisations ont été distinguées : la zone littorale et côtière et la zone des sédiments de fonds marins. Il a été constaté que la population d'actinobactéries ainsi que d'autres microorganismes est plus dense dans la mer peu profonde qu'en mer profonde [58]. Cependant, des études récentes ont confirmé que les actinobactéries sont largement distribuées dans les différents habitats marins. En effet, les deux méthodes de cultures, dépendantes et indépendantes, ont montré que les actinobactéries marines sont omniprésentes dans les sédiments marins et sont présentes sur toute la gamme de profondeurs océaniques; de la surface des océans, comme dans le littoral et les environnements inter-marée, le plus profond, comme les sédiments sous-sol, et dans les fonds océaniques des récifs coralliens, et vivent en symbiose avec les invertébrés et les plantes (éponges et algues).

1.5.2 Rôle des actinobactéries en milieu marin

Les actinobactéries jouent de multiples rôles dans le milieu marin. L'activité cellulolytique des actinobactéries marines a été rapportée par Chandramohan et al. [62] et diverses enzymes importantes pour la production industrielle sont produites par les actinobactéries. Il a également été rapporté que ces dernières contribuent au recyclage des composés organiques. De plus, elles jouent un rôle important dans la minéralisation de la matière

organique, l'immobilisation des nutriments minéraux, la fixation de l'azote, l'amélioration des paramètres physiques et finalement la protection de l'environnement.

Ils présentent des hyphes embranchés et des spores, l'embranchement du mycélium peut se présenter sous deux formes ; mycélium de substrat et mycélium aérien [67] (Figure 1.2).

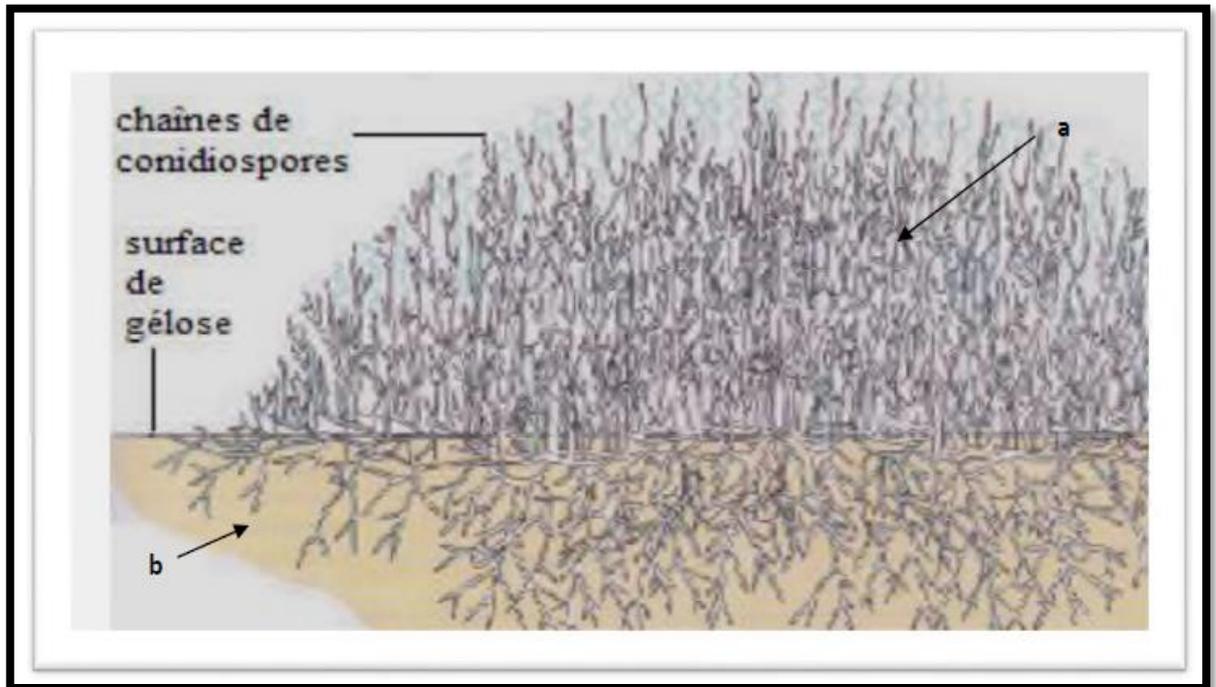


Figure 2 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète [67]. a : le mycélium aérien, b : le mycélium de substrat.

1.5.3 Position taxonomique et description morphologique du genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* appartient aux actinobactéries comme bactéries mycéliennes. En fait, elles étaient connues depuis longtemps sous le terme "actinomycètes", qui signifie en grec "actinomycètes" ou "mycètes". Cependant, la découverte de leur structure cellulaire fine (procaryotes) et de la composition chimique de leurs parois a permis depuis 1950 de les rattacher à un groupe de bactéries (Bactéries à Gram positif et mycéliennes). Leurs parois cellulaires ne contiennent ni chitine ni cellulose, mais contiennent des glycoprotéines (peptidoglycane) [63]. Elles n'ont pas d'enveloppe nucléaire, sont sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens et ont des diamètres d'hyphes plus petits que les champignons. Le terme « actinomycètes » a eu tendance au cours des

dernières décennies à être progressivement remplacé par le terme le plus couramment utilisé aujourd'hui «actinobactérie».

Dans le Manuel du Bergey (édition 2012), les actinobactéries sont définies comme des bactéries à Gram positif ayant un taux de G+C supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique, la plupart étant mycélienne. Mais sur la base des données de la biologie moléculaire (notamment le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S), la classification des actinobactéries a subi un grand remaniement. Ces microorganismes sont classés dans le règne des *Procaryotae*, le phylum des *Actinobacteria* et la classe des *Actinobacteria*, ordre des *Actinomycetales* (subdivisé en plusieurs ordres : *Actinomycetales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Micromonosporales*, *Micrococcales*, etc.). L'ordre des *Actinomycetales* est actuellement un petit ordre représenté par peu de genres dont *Streptomyces* [64].

Le genre *Streptomyces*, le plus grand genre du monde bactérien, appartient à l'ordre des *Streptomycetales* et à la famille des *Streptomycetaceae* [65]. Morphologiquement, le genre *Streptomyces* possède un mycélium du substrat abondamment ramifié, non sporulé et non fragmenté, surmonté par un mycélium aérien produisant des sporophores qui donnent naissance à des chaînes de spores (de 3 à 50 ou plus par chaîne) de formes variées : droites (*Rectus Flexibilis*), incurvées ou en boucles (*Retinaculum Apertum*) ou spiralées (*Spira*). Les spores ne sont pas mobiles et peuvent avoir une surface lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue.

Du point de vue chimiotaxonomique, le genre *Streptomyces* possède le chimiotype pariétal caractérisé par la présence de l'acide L-diaminopimélique et de la glycine, et par l'absence de sucres caractéristiques, ainsi que des phospholipides membranaires de type PII, c'est-à-dire, contenant de la phosphatidyléthanolamine [66; 67]. Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent la grande majorité de la famille des *Streptomycetaceae*. Ce genre représente non seulement une des composantes prédominantes de la population microbienne des sols à travers le monde, mais il est aussi considéré comme l'un des groupes d'espèces les plus répandues dans l'environnement [67].

1.5.4 Détermination des espèces du genre *Streptomyces*

L'étude des caractéristique physiologique, biochimique et morphologique constituent une approche classique d'identification des actinobactéries. Cette méthode décrites par Nonomura [68] dans l'ouvrage du bergey's manuel of determination bacteriology» qui

s'est révélé très utile dans l'identification et la classification des souches notamment les streptomycètes dont les caractéristiques les plus couramment employées sont :

- La couleur de mycélium aérien : La couleur du mycélium aérien mature et sporulé enregistrée qui est de couleur blanche, grise, rouge, verte, bleue ou violette. Lorsque le mycélium aérien présente deux couleurs, à la fois les couleurs sont enregistrées.
- Les pigments mélanoïdes : On peut regrouper les actinobactéries par rapport à la production de pigments mélanoïdes (brun verdâtre, brunâtre noir ou brun distinct, ou pigment modifié par d'autres couleurs). Les souches sont regroupées comme productrices de pigments mélanoïdes (+) ou non productrices (-).
- Les pigments non diffusibles ou de substrat : Les souches sont divisées en deux groupes, en fonction de leur capacité à produire des pigments caractéristiques sur la face arrière de la colonie, à savoir, distinctif (+) et non distinctif (-). Dans le cas, d'une couleur avec une faible saturation comme le jaune pâle, olive ou brun jaunâtre, il est inclus dans le second groupe (-).
- Les pigments solubles : Les souches sont divisées en deux groupes selon leur capacité à produire des pigments solubles autres que la mélanine : à savoir, une souche productrice (+) ou pas (-). Les couleurs enregistrées sont (rouge, orange, verte, jaune, bleue ou violette).
- La chaîne de spores et morphologie : En ce qui concerne les chaînes de spores, les souches peuvent être regroupées en "sections". Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* sont divisées en trois sections [69], à savoir *Rectus flexibilis* (RF), *Retinacula aperti* (RA) et *Spiralis* (S). Quand une souche forme deux types de chaînes de spores, les deux sont notés (par exemple SRA) (Figure 3)
- La surface de la spore : La morphologie des spores et ses caractéristiques de surface sont fournies grâce au microscope électronique à balayage. L'échantillon peut être examiné sous le microscope électronique à des agrandissements différents et la spore peut être caractérisée comme lisse, épineuse, crénelée et ondulée.

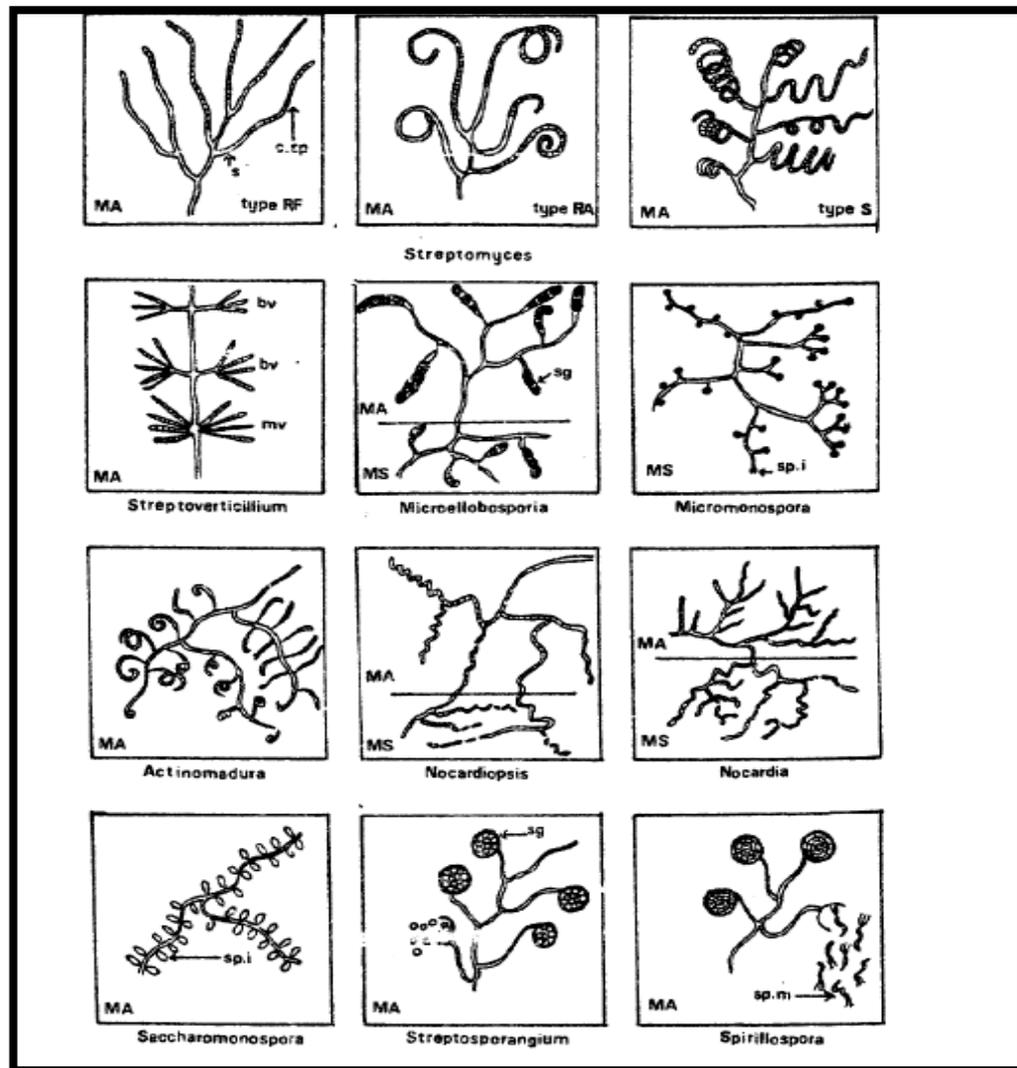


Figure 3 : Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes Types : RF = Rectus Flexibilis, RA = Retinaculum Apertum, S = spira, MA = Mycélium Aérien, MS = Mycélium de Substrat, bv = biverticille, mv = monoverticillé, s = sporophore, c.sp = chaîne de spore, sp.i = spores isolées, sp.m = spores mobiles, sg = sporange [69].

1.5.5 Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont presque omniprésents dans la nature. Ils représentent une partie importante du microbiote géothermique de 10 à 20%, parfois plus [70]. Le genre *Streptomyces* est un genre couramment trouvé dans le sol et divers autres biotopes. Il représente 80 à 95% de tous les actinomycètes suivi de *Nocardia* et *Micromonospora* [70]. Les autres genres constituent une petite fraction et sont rares ou très rares. La plupart des actinomycètes sont des saprophytes, mais certains peuvent être des pathogènes ou des

commensaux des animaux et des plantes. En générale, les actinobactéries sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe. Physiologiquement, il est possible de distinguer les formes aérobies qui sont de très loin les plus nombreuses, et des anaérobies trouvés primitivement chez les animaux et l'homme. Les actinobactéries préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, elles sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérantes à des températures avoisinant les 50 °C et peuvent aller jusqu'à 60 °C ou plus [71].

Le tableau 1.2 représente certains genres d'actinomycètes isolés à partir de divers habitats écologiques [71].

Tableau 2 : Isolement des actinomycètes à partir de divers habitats écologiques [71].

Habitat	Actinomycètes
Marin	<i>Actinomadura ; Actinosynnoma ; Amycolatopsis ; arthrobacter ; frankia ; Geodermatophilus ; Mycobactrium ; Nocardioles ; Nocardiosis ; Nonomurea ; Pseudonocardia ; Rhodococcus ; Saccharopolyspora ; Streptomyces ; Tsukamurella.</i>
Sol acide et sol alcalin	<i>Actinomadura ; Amycolatopsis ; Bargoriella ; Kribbella ; Micromonospora, Nocardiosis.</i>
Eaux usées	<i>Bifidobacterium ; Rhodococcus ; Nocardia ; Gordonia</i>
Sources thermales	<i>Actinomadura ; Micromonospora ; Microtetraspora ; Saccharomonospora ; Streptomyces ; Thermoactinomyces</i>
Sol désertique	<i>Actinomadura ; amycolatopsis ; microtetraspora ; nocardia ; saccharothrix.</i>
Compost	<i>Ammycolatopsis ; Laceyella ; Straptomyces ; Pplanifilum ; Saccharomonospora ; Thermoactinomyces ; Thermobifida ; Thermus Thermonospora</i>
Agriculture	<i>Actinoplanes ; Couchiplomates ; Catenuloplanes ; Saccharopolyspora</i>
Echantillons Clinique humain et animal	<i>Amycolatopsis ; Gordonia ; Rhodococcus ;</i>

1.5.6 Cycle de développement des actinobactéries (exemple type : *Streptomyces* sp.)

Sur milieu solide (Figure 4), le germe initiale, appelée « spore libre » croît à la surface du milieu de support non seulement en s'allongeant, comme toute bactérie, mais aussi en se ramifiant et, même, en pénétrant en profondeur dans le milieu, sans se diviser, sans qu'aucune septation n'apparaisse (formation de mycélium). Après quelques jours, le mycélium produit des structures aériennes qui s'étendent en hauteur (hyphes aériens = mycélium aérien = MA). Ces structures vont développer des torsades, tel un tire-bouchon. Leur partie terminale, après une série de réplifications et de migrations du chromosome bactérien, montre l'apparition d'un nombre important d'événements de septation, qui sont à la base de la formation d'autant de jeunes cellules bactériennes qui vont, après maturation et libération, donner naissance à de nouvelles formes libres, pour que le cycle vital recommence [72]. En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement. En milieu solide, une différenciation morphologique est donc observée (formation du mycélium aérien) tandis qu'en milieu liquide, la différenciation est généralement physiologique [73].

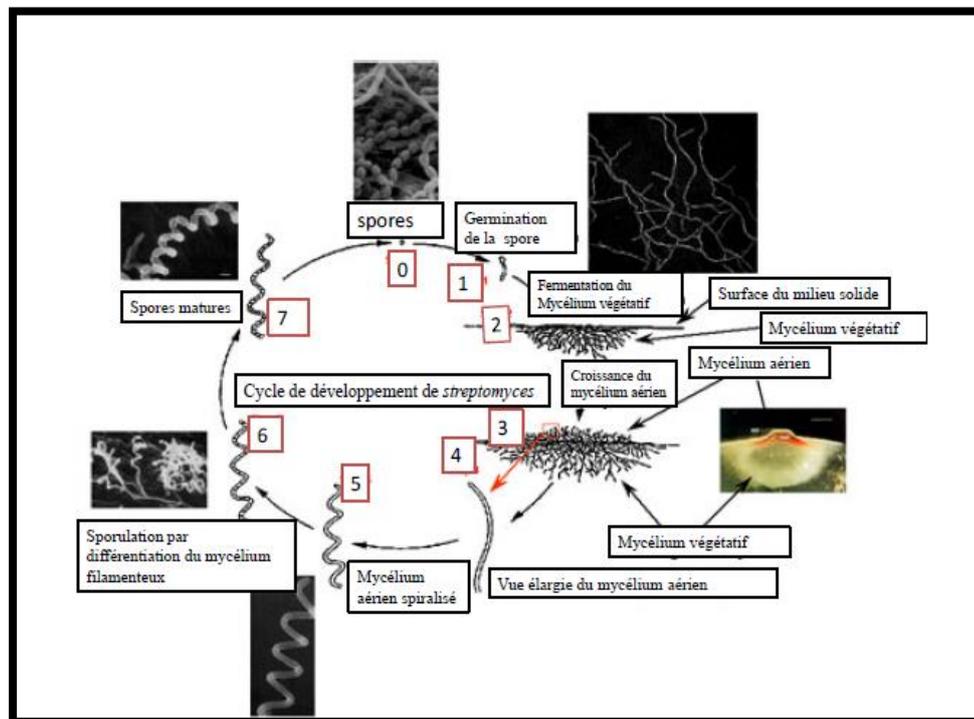


Figure 4 : Cycle de développement de *Streptomyces*

1.5.7 Importance des actinobactéries

1.5.7.1 Importance en agronomie

Les actinobactéries représentent une forte proportion de la biomasse microbienne du sol. Elles ont la capacité de produire diverses hydrolases extracellulaires qui jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique dans le sol contribuant ainsi à la fertilité des sols [74]. Elles ont une excellente capacité à métaboliser des substances organiques complexes difficiles ou impossibles à dégrader par d'autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, la lignocellulose, la chitine et les acides humiques et fulviques. Elles peuvent également dégrader ou recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et réduire le niveau de toxines dans le produit final [75].

1.5.7.2 Importance en biotechnologie

L'hétérogénéité biochimique, la diversité écologique et la capacité supérieure à produire des métabolites secondaires des actinobactéries en font des producteurs potentiels pour de nombreux composés intéressants dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire [76]. Les espèces du genre *Streptomyces* représentent 50% de la population totale d'actinobactéries dont 75 à 80% des antibiotiques sont dérivés de ce genre [77].

A cet effet, les actinobactéries sont d'une importance croissante car elles sont les producteurs les plus importants d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires bioactifs et donc des producteurs intéressants dans l'industrie pharmaceutique [77]. En conséquence, de nombreux métabolites sont synthétisés, notamment des antibiotiques, des enzymes telles que les enzymes alcalines, la transglutaminase, la xylanase utilisées dans le traitement des sous-produits [78].

1.6. Métabolites secondaires biologiquement actifs obtenus de microorganismes associés aux algues marines

Les microorganismes associés aux algues marines, par leurs nombreuses et complexes voies d'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 le potentiel biotechnologique des algues et de leurs métabolites.

L'algue brune *Laminaria saccharina* représente une des sources potentielles de nouveaux isolats bactériens avec des propriétés antimicrobiennes remarquables. Jutta Wiese et al. [48] ont isolé des bactéries à partir de l'algue brune *L. saccharina*, et ont testé leur activité antimicrobienne envers un panel de microorganismes pathogènes. Sur un total de 210 isolats testés, 103 souches bactériennes ont inhibé la croissance d'au moins un germe cible. L'algue brune *Padina pavonica*, représente une autre source de bactéries à activité antimicrobienne. Les travaux réalisés par Ismail et al. [80] ont indiqué la présence d'une potentielle activité antimicrobienne chez cinq bactéries épiphytes isolées de l'algue brune *P. pavonica*, contre un large éventail de pathogènes. En outre, des bactéries marines associées aux algues brunes du genre *Padina* et *Sargassum* ont été isolées et soumises à un screening de leur activité antimicrobienne [81]. Les résultats ont montré que tous les isolats avaient une activité antimicrobienne et pouvaient être de potentiels candidats en tant qu'agents producteurs d'antimicrobiens.

Kanagasabhapathy et al. [82] ont rapporté que 20% des souches bactériennes épiphytes associées à neuf espèces d'algues brunes (*Sargassum serratifolium*, *Sargassum fusiforme*, *Sargassum filicinum*, *Padina arborescens*, *Undaria pinnatifida*, *Petalonia fascia*, *Colpomenia sinuosa*, *Scytosiphon lomentaria* et *Ecklonia cava*) présentent des activités antimicrobiennes. Il est bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs. Près de 50% des espèces de *Streptomyces* isolées sont reconnues comme productrices d'antibiotiques [83].

1.6.1 Culture des microorganismes marins

En effet, la fermentation est un procédé qui consiste à cultiver ces microorganismes dans le but de leur faire produire une substance ou une molécule d'intérêt. La plupart de ces procédés s'effectuent dans un environnement contrôlé avec des microorganismes choisis comme étant particulièrement producteurs, et une stratégie de fermentation prédéterminée. À ce jour, les approches techniques utilisées pour cultiver les bactéries et les champignons marins ont atteint des normes différentes. Les échantillons prélevés sont exposés à différentes conditions et de formes de culture qui contribuent à l'obtention de microorganismes capables de s'adapter aux conditions établies [84].

La culture des différents types de microorganismes marins, particulièrement ceux qui ont un potentiel spécifique pour la production de métabolites biologiquement actifs, a été décrite principalement par des expériences à petite échelle. En effet, l'eau de mer artificielle ou 25:50:75:90% eau de mer naturelle a servi de base pour des milieux nutritifs. Les concentrations en sources de carbone et d'azote ont atteint jusqu'à 2% (p/p) : amidon, glucose, mélasse, glycérol, huile de soja, extrait de levure, extrait de malt, extrait de bœuf, peptone, liqueur de maïs et NZ-amine. En absence d'eau de mer artificielle ou naturelle, de fortes concentrations d'ions $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}/\text{Cl}^-$ ont été utilisées. Les températures dans la gamme de 20 à 30 °C et un pH de 7 à 7.5 ont été favorisés [85]. La composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires [73].

1.6.2 Criblage biologique

Après la croissance des microorganismes au laboratoire sur des milieux nutritifs, le screening d'isolats pour l'activité biologique est effectué, par exemple, sur la base de l'inhibition de la croissance de microorganismes qui entourent l'organisme d'essai, dans le cas d'agents antimicrobiens [86].

1.7 Mise au point d'une méthodologie de criblage optimisée des souches d'actinobactéries productrices de métabolites secondaires

Les actinobactéries sont les plus grands producteurs de métabolites secondaires biologiquement actifs. Parmi les métabolites microbiens connus, 45% (environ 10000 composés) ont été extraits de diverses espèces d'actinomycètes, dont 75% étaient issus du genre *Streptomyces* et 25% d'actinobactéries rares [87]. Plusieurs études ont récemment été publiées décrivant des molécules biologiquement actives d'actinobactéries marines [88]. Les métabolites marins présentent une grande diversité structurale et présentent un large éventail d'activités biologiques (antimicrobien, antiprotozoaire, antiparasitaire (antipaludéen) et antitumorales). Certains sont utilisés dans l'industrie alimentaire et détergente (protéases). La plupart des produits naturels dérivés d'actinomycètes marins ont des caractéristiques structurales uniques que l'on trouve rarement dans les composés extraits des ressources végétales.

La production de métabolites secondaires par les microorganismes est généralement influencée et liée au métabolisme primaire de la souche productrice et aussi de métabolites intermédiaires [89].

Les résultats du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. Plusieurs méthodes coûteuses ont été employées pour découvrir de nouveaux composés avec une activité biologique prometteuse, comme le criblage de différentes sources biologiques spécifiques pour de nouveaux microorganismes producteurs [90]. Le criblage a toujours été un moyen essentiel pour rechercher des microorganismes à fort potentiel pour la production de nouvelles molécules.

L'activité antimicrobienne a été toujours liée avec un antibiotique qui est définie comme une substance chimique produite par des microorganismes et qui a la propriété d'inhiber la croissance ou même de détruire des bactéries ou d'autre microorganismes [91].

Par ailleurs, les microorganismes représentent une source excellente d'enzymes grâce à leur vaste diversité biochimique et leur susceptibilité aux manipulations génétiques, entre autre les protéases, enzymes qui catalysent la coupure des liaisons peptidiques des protéines et des peptides, sont les plus vendues dans le monde [92]. Les protéases microbiennes sont préférées aux protéases animales et végétales puisqu'elles possèdent à peu près toutes les caractéristiques pour les applications biotechnologiques [93]. Environ 70% de la production mondiale des protéases, sont assurées par des microorganismes.

De meme, l'étude de souches capables de croitre et de produire des biosurfactants qui sont définis comme une molécule tensioactive produite par des cellules vivantes- dans la majorité des cas, par des microorganismes [94]. Ils sont synthétisés par un large éventail de microorganismes (tels que les bactéries, les levures et les champignons). Le criblage primaire des souches isolées d'actinomycètes productrices de biosurfactants débute par un test d'hémolyse. Il est basé sur l'ensemencement en gélose au sang est souvent utilisé pour cribler les microorganismes producteurs de biosurfactants. Ce test a été découvert par Bernheimer et Avigad, il a été déjà utilisé pour quantifier la surfactine et les rhamnolipides ; ce milieu de croissance est riche pour la croissance de nombreux microorganismes [95]. Un deuxième criblage des souches d'actinomycètes productrices des biosurfactants est nécessaire pour évaluer la potentialité de production des tensioactives par les souches criblées, comprenant le test de dispersion du pétrole qui basé

sur le déplacement de l'huile ; elle est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices de biosurfactants ; indique l'activité des biosurfactants.

BIOTRANSFORMATION DE MONOTERPENES PAR DES MICROORGANISMES MARINS

2.1 Introduction

La biotransformation (ou bioconversion) est un processus utilisant les microorganismes dans les transformations biologiques des métabolites. Elle permet d'obtenir des produits de haute qualité en termes de régiosélectivité et de stéréosélectivité ainsi que de meilleur rendement en comparaison à ceux obtenus par voie chimique classique. La biotransformation des composés bioactifs est une alternative intéressante permettant de remplacer des composés toxiques tels que les solvants organiques. 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 [96].

La bioconversion des métabolites secondaires a été appliquée à diverses classes chimiques, notamment, la classe des terpénoïdes. Dans ce cadre, les monoterpènes sont les métabolites ayant fait l'objet du plus grand nombre de travaux. Les monoterpènes qui constituent la majeure proportion des huiles essentielles des plantes terrestres. En plus de leurs propriétés organolytiques particulièrement intéressantes, de plus en plus d'études mettent en évidence des activités thérapeutique, antibactérienne, antivirale et anticancéreuse significatives des monoterpènes.

Diverses souches de bactéries, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas incognita*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas rhodesiae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gladioli*, *Yarrowia lipolytica*, *Bacillus stearthermophilus*, *Rhodococcus erythropolis* et de champignons tels que *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus cellulase* ont été utilisées dans la bioconversion des monoterpènes. Ces travaux ont mis l'accent sur l'importance de la nature chimique des produits obtenus ainsi que sur les rendements de réactions souvent élevés. Il y a lieu de souligner le caractère « vert » de la réaction de bioconversion, ce qui s'adapte parfaitement avec la protection de l'environnement en utilisant des produits biodégradables [97].

2.2 Notions générales sur la biotransformation

2.2.1 Définition de la biotransformation

Les biotransformations, également appelées transformations microbiennes ou bioconversions, peuvent être définies comme étant l'utilisation d'un catalyseur biologique pour convertir un substrat ou précurseur en un produit donné selon un nombre limité d'étapes enzymatiques [98]. Les bioconversions sont utilisées aussi bien pour la synthèse d'arômes alimentaires que pour la production de molécules ayant un intérêt pharmaceutique. La biotransformation microbienne est l'une des technologies les plus appropriées pour obtenir des composés naturels à valeur ajoutée dans des conditions très favorables à l'environnement [99]. C'est la capacité de la culture de cellules microbiennes pour catalyser la conversion d'un précurseur aisément disponible peu coûteux en un produit final plus précieux. Ce précurseur ne peut être transformé de manière efficace par des méthodes chimiques traditionnelles [98].

2.2.2 Classification des voies de bioconversion

La bioconversion peut être classée en deux catégories différentes :

- Le premier type de transformation est la transformation des xénobiotiques dans lequel le substrat est complètement étranger aux microorganismes.
- Le second type de transformation est génétiquement ciblé, également connu comme analogue de la biosynthèse, dans lequel le substrat est un analogue structural d'un intermédiaire biosynthétique. Cette biotransformation repose sur la flexibilité du substrat de la voie enzymatique existante, responsable de la biosynthèse du métabolisme secondaire [100, 101].

2.2.3 Avantage de la bioconversion

Les bioconversions, lorsqu'on les compare à des réactions chimiques ont l'avantage d'être régio et stéréo sélectives, ce qui conduit à des produits de forme énantiomérique donnée permettant la production des produits chiraux à partir de mélanges racémiques dont la demande dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire est élevée. Les conditions de la bioconversion sont douces, elles sont 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 [102].

Les bioconversions sont de 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 car elles permettent la production des produits qui peuvent être étiquetés comme « naturel ou bio ». Parmi ces produits, il y'a beaucoup qui ont des applications de grande envergure, y compris les arômes, les produits agrochimiques, les antibiotiques, les antioxydants et les agents anticancéreux [103]. Pour obtenir un produit naturel, il y'a actuellement le choix entre deux systèmes de production qui sont les procédés classiques d'extraction à partir de matières premières naturelles et les bioconversions.

La réalisation de réactions de biotransformation permet de pallier certaines faiblesses des techniques d'extraction conventionnelles. En effet, il est possible de s'affranchir des facteurs incontrôlables (climatiques et géographiques) qui affectent la quantité et la qualité des arômes extraits des matières premières. La biotransformation permet également une autonomie *vis-à-vis* de l'approvisionnement en matières premières fortement saisonnières, notamment pour les plantes aromatiques. Elle permet également la réduction des résidus d'extraction, notamment l'utilisation de microorganismes, avantage important lorsque les précurseurs utilisés sont toxiques pour les cellules.

Enfin, d'un point de vue commercial, certaines biotransformations peuvent être moins chers et plus directes que les analogues chimiques, tandis que les transformations se déroulent dans des conditions qui sont normalement considérés comme respectueux de l'environnement [104].

2.2.4 Difficultés liées à la bioconversion [102,105]

Il y a lieu de souligner certains inconvénients liés à l'utilisation de la bioconversion. On peut citer dans ce cadre :

- Certains métabolites secondaires sont des substrats toxiques pour les microorganismes, même à des cellules entières.
- Certains métabolites secondaires sont peu solubles dans l'eau.
- La plupart des biotransformations des métabolites secondaires conduisent à de faibles rendements.

- La volatilité des métabolites secondaires provoque des problèmes lors de la biotransformation, tels que les pertes des substrats et produits.
- La biotransformation des métabolites secondaires se déroule souvent sur plusieurs voies métaboliques conduisant à un mélange de produits.

2.2.5 Effets des facteurs nutritionnels et environnementaux sur la bioconversion

La bioconversion dépend de divers facteurs comme : aspects physiologiques, biochimiques et les conditions environnementales de la culture microbienne telle que [106] :

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

2.2.6 Biocatalyseurs de la bioconversion

La biocatalyse est un type majeur de biotransformation dans lequel des enzymes transforment un composé en un autre [107].

Des cellules entières d'animaux, de plantes et de microorganismes peuvent être utilisées comme biocatalyseurs. Pour ces derniers, des microorganismes eucaryotes tels que des champignons filamenteux et des levures, ou des procaryotes tels que des bactéries peuvent être utilisés [108]. Les biocatalyseurs peuvent être certaines enzymes présentes dans des extraits cellulaires ou sous forme purifiée.

Une grande variété de microorganismes permet de nombreuses réactions enzymatiques dans différentes voies métaboliques. La facilité d'utilisation, la croissance rapide et la facilité d'adaptation aux conditions dictées par les contraintes techniques et économiques sont également des avantages favorables à l'utilisation dans les procédés de biotransformation. Bien que l'utilisation de cellules végétales soit moins favorable que l'utilisation d'enzymes et de microorganismes, elle est toujours bénéfique pour la

production de métabolites secondaires complexes. Outre les enzymes, les microorganismes sont les biocatalyseurs les plus importants actuellement utilisés et étudiés [108].

En général, la sélection initiale des souches est basée sur plusieurs critères qui doivent être pris en compte dans les stratégies de biotransformation.

Il est nécessaire d'obtenir des rendements de conversion élevés, des réactions rapides et des produits uniques à haute valeur ajoutée tout en maintenant les coûts de substrat relativement bas. Les souches qui sécrètent le produit recherché ou qui réalisent la réaction en milieu de culture présentent un intérêt particulier [106].

2.2.7 Optimisation des procédés de bioconversion

Les principaux critères permettant d'évaluer la performance d'un procédé de bioconversion 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 ;
- La seconde étape consiste à choisir les paramètres physicochimiques et technologiques permettant de favoriser la réaction de bioconversion. Cette dernière met en jeu trois acteurs principaux, le précurseur ou substrat de bioconversion, le biocatalyseur (enzyme seule ou microorganisme entier) et le produit d'intérêt [108].

2.3 Bioconversion des monoterpènes par des microorganismes marins du genre *Streptomyces* et d'autres espèces

2.3.1 Les terpènes

- Le nom Terpène vient du mot allemand « Terpen » (1866) provenant dans Terpentin : la térébentine ;

- Les terpènes sont des hydrocarbures, mais de nombreux dérivés (alcols, aldéhydes, cétones et acides), de structure apparentée, sont considérés comme des composés terpéniques ;

- Présents dans les plantes, les bactéries et les champignons,

- Les terpènes constituent un groupe des lipides présentant une grande diversité structurale au niveau de : Taille - Nature des atomes (hydrocarbures, ou composés azotés ou oxygénés) - Structure (cyclique ou linéaire).

Dans la littérature, on compte environ 30000 différents terpènes qui sont répertoriés. Les composés dérivent d'une même molécule simple à cinq atomes de carbones : Isoprène ou 2- méthyl-1,3-diène (C_5H_8). Il s'agit d'unités isopréniques (U.I.) de formule brute $(C_5H_8)_n$, (avec $n \geq 2$).

Le seul terpène qui a des applications majeures est le caoutchouc naturel. Cependant, de nombreux autres terpènes ont des applications commerciales et industrielles à petite échelle : solvant organique, matière première chimique, encres, vernis, adhésifs, parfums, arômes, dans les domaines cosmétiques, thérapeutique, produits de nettoyage, produits alimentaires, pesticides en agriculture et dans les boissons. Les terpènes sont également des composants de certaines médecines traditionnelles, telles que l'aromathérapie. [109].

En fonction du nombre n (entier) d'unités pentacarbonées (en C_5) ramifiées, on peut distinguer pour :

- $n = 1$: l'isoprène;
- $n = 2$: les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$). Ce sont les plus communs et comptent de nombreux isomères ;
- $n = 3$: les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) ;
- $n = 4$: les diterpènes ($C_{20}H_{32}$) ;
- $n = 5$: les sesterterpènes ($C_{25}H_{40}$) ;
- $n = 6$: les triterpènes ($C_{30}H_{48}$) ;
- $n = 8$: les tétraterpènes ($C_{40}H_{64}$). Le carotène, un important pigment de photosynthèse végétal, fait partie de cette famille de terpènes ;
- $n > 8$: les polyterpènes, tels que le caoutchouc naturel ou le gutta-percha .

Les terpènes ont une structure acyclique et d'autres sont formés à partir du précurseur isopenténylpyrophosphate (IPP)

2.3.2 Les monoterpènes

Le monoterpène ($C_{10}H_{16}$) est un terpène comme un dimère d'isoprène. Il peut être divisé en composés acycliques, monocycliques, bicycliques et tricycliques.

Les monoterpènes (et monoterpénoïdes) forment une classe d'isoprénoïdes produits à partir de géranyl-pyrophosphate (GPP) par diverses synthèses monoterpéniques. Ces composés sont d'origine naturelle à chaîne ramifiée en C-10 des hydrocarbures formés à partir de 2 unités d'isoprène.

Le premier terpène isolé de la térébenthine dans les années 1850 était considéré comme l'unité de base sur laquelle repose le reste de la nomenclature. Les monoterpènes sont surtout connus comme constituants des essences florales volatiles et des huiles essentielles d'herbes et d'épices, représentant jusqu'à 5% en poids des plantes séchées. Les monoterpènes et leurs dérivés jouent un rôle important dans le développement de nouveaux composés biologiquement actifs, y compris des médicaments. Une revue [110] décrit les différents types d'activités biologiques présentées par les monoterpènes et leurs dérivés, notamment les activités analgésiques, anti-inflammatoires, anticonvulsivantes, antidépressives, anti-Alzheimer, anti-Parkinson, antivirales, antibactériennes (antituberculeux).

2.3.3 Classification des monoterpènes :

- Monoterpènes acycliques (ex. nérol)
- Monoterpènes monocycliques (ex. limonène)
- Monoterpènes bicycliques (ex. α et β -pinène)
- Monoterpènes tricycliques [109].

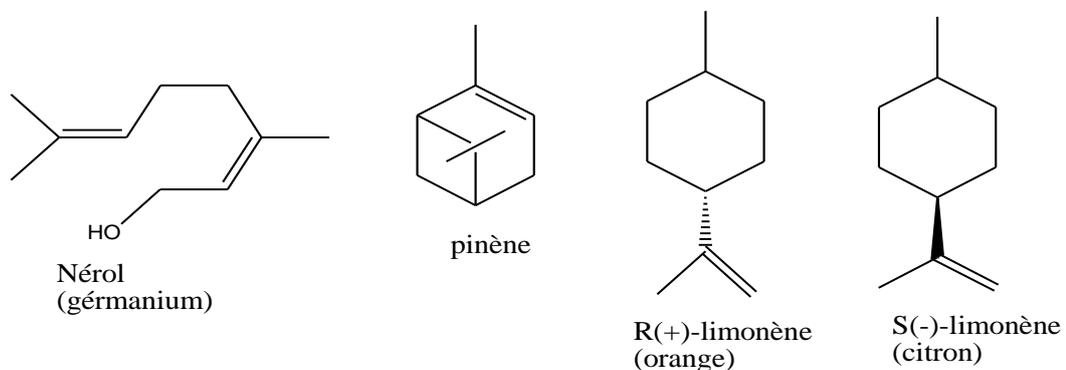


Figure 5 : Structure des monoterpènes.

A l'intérieur de chaque groupe, les monoterpènes peuvent être des hydrocarbures simples insaturés (ex. limonène), ou avoir des groupes fonctionnels et être des alcools (ex. menthol), des aldéhydes ou des cétones (ex. camphre).

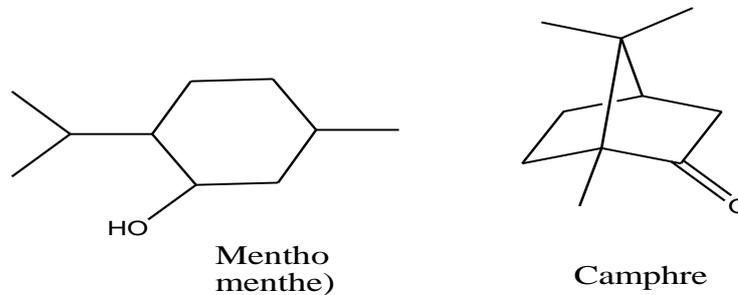


Figure 6 : Structure des monoterpènes oxygénés

2.3.4 Biotransformation des terpènes

Cette partie concerne l'action des microorganismes sur les terpènes et les voies de dégradation de ces composés par différents types de microorganismes. Toutefois, la majeure partie de la biotransformation des terpènes a été attribuée aux bactéries, champignons et levures. Ces microorganismes aérobies ainsi que les anaérobies utilisent les terpènes comme une source de carbone et d'énergie. Certaines bactéries du genre *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et *P. mallei*) sont les plus résistantes à l'activité des terpènes [110]. Plusieurs essais *in vitro* ont montré la dégradation de divers terpènes par *P. gladioli*, [111], *P. putida* GS1 et *P. fluorescens* [112]. D'autres bactéries, comme *Bacillus stearothermophilus*, *Escherichia coli* [113] et les actinobactéries comme *Rhodococcus erythropolis* [114] et *Rhodococcus opacus* [115] sont des espèces capables de contribuer à la biodégradation des terpènes. Une majeure partie des essais expérimentaux étudiant la bioconversion des terpènes sont réalisés dans des conditions d'aérobiose, puisque la présence d'oxygène moléculaire est un facteur déterminant des voies métaboliques chez ces microorganismes. Dans ces voies, l'oxygène est l'accepteur final d'électrons, avec production de CO₂ à partir des carbones issus des terpènes [116].

2.3.5 Les principales voies métaboliques d'une transformation microbienne (biotransformation) des terpénoïdes par des microorganismes

La biotransformation des terpénoïdes et des composés apparentés des terpénoïdes 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. Globalement, 10 voies métaboliques principales observées dans la biotransformation des terpénoïdes qui sont résumées dans les tableaux (3-6).

Les modèles microbiologiques utilisent des réactions d'oxydoréduction et d'autres réactions sur de monoterpénoïdes par deux champignons (*Aspergillus niger* TBUYN-2 et *Euglena gracilis* Z) [117].

Tableau 3 : Voie d'oxydation microbiologique sur différents monoterpènes		
Oxydation des alcools	Oxydation des alcools primaires en aldéhydes et acides. Oxydation des alcools secondaires en cétones.	(-)- <i>trans</i> -Carveol (+)- <i>trans</i> -Carveol 2-hydroxy-1,8-cineole 3-hydroxy-1,8-cineole
Oxydation des aldéhydes en acides Hydroxylation	Hydroxylation du carbone non allylique Hydroxylation du carbone allylique	(+)-carvotanacetone (+)-fenchone (+)-isomenthol (+)-neodihydrocarveol , (-)-dihydrocarveol
Oxydation des oléfins	Formation d'époxydes et d'oxydes Formation de diols	(+)-Neodihydrocarveol, (+)-dihydrocarveol
Lactonisation	Formation de triols	(-)-dihydrocarveol,

		(+)-limonene
--	--	--------------

Tableau 4 : Voie de réduction microbiologique sur différentes monoterpènes		
Réduction des aldéhydes en alcools	Réduction des aldéhydes terpéniques en alcools terpéniques	Myrtenal ; (-)-perillaldehyde, <i>trans</i> -and <i>cis</i> -1,2-dihydroperillaldehydes
Réduction des cétones en alcools	Réduction d'aldéhydes aromatiques et apparentés en alcools Réduction des cétones saturées	(+)-Dihydrocarvone ; (-)-isodihydrocarvone ; (+)-carvomenthon , (-)-isocarvomenthone ; (+)-dihydrocarvone-8,9-epoxides
Hydrogénation d'oléfines	Réduction des cétones a,b-insaturées Hydrogénation d'oléfine conjuguée avec un groupe carbonyle	(-)-Carvone ; (+)-carvone, (-)-carvotanacetone ; (+)-carvotanacetone
Tableau 5 : la voie d'hydrolyse d'un ester		
Hydrolyse	Hydrolyse de l'ester	(+)- <i>trans</i> - and <i>cis</i> -Carveyl acetates (-)- <i>cis</i> -carveyl acetate
Tableau 6 : la voie d'hydratation et d'isomérisation		

Hydratation	Hydratation de la liaison C=C dans groupe isopropényle en alcool tertiaire	(+)-Neodihydrocarveol (-)-dihydrocarveol
Isomérisation	Isomérisation	Geraniol, nerol

2.3.6 Travaux antérieurs de la bioconversion des terpènes par le genre *Streptomyces*

Nous regroupons dans le tableau 7 les données recueillies des travaux antérieurs concernant la biotransformation de certains monoterpènes par le genre *Streptomyces*. Cette synthèse est loin d'être complétée, toutefois, elle donne une vision claire sur l'intérêt de bioconversion pour l'obtention de métabolites d'intérêt biotechnologique.

Tableau 7 : Bioconversion de quelques métabolites secondaires par le genre *Streptomyces*

Microorganismes	métabolites	produits	Réf.
<i>St. bottropensis</i> SY-2-1 <i>Streptomyces</i> <i>ikutamanensis</i> Ya-2-1	1,8 cinéole	(+)-2a-hydroxy-1,8-cineole	[118].
<i>Streptomyces griseus</i>	1,4-cineole	8-hydroxy-1.4-cineole	[119].
<i>Streptomyces</i> <i>bottropensis</i> SY2-1	(+)- carvotanetone	5b-hydroxy-(+)-neoisocarvomenthol et a- hydroxy(-)carvotanacetone	[120].
<i>Streptomyces</i> A5-1	(-) carvone	(-) trans-Carvéol. (-) cis- carvéol, (+) dihydrocarvone, (+) isodihydrocarvone, (+) neodihydrocarveol, (+) isodihydrocarveol (+) neoisodihydrocarveol	[120]. [121].
<i>Streptomyces</i> <i>bottropensis</i>	(+) carvone	(+) carvone-8,9-epoxide et (+) 5a- hydroxycarvone	[122].

<i>Streptomyces ikutamanensis</i> Ya-2-1	(-)-Perillyl alcohol	8,9-epoxy-(-)-perillyl alcohol	[121].
<i>Streptomyces humidus</i> Tu-1	Thymol	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) et (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2-hydroxy-3- <i>p</i> menthen-5-one	[122].
<i>Streptomyces ikutamanensis</i> , Ya-2-1	Geranial Neral (+), (-), et (±)-citronellal	Geraniol Nerol (+), (-), and (±)-citronellol	[121].
<i>St. albus</i> NRRL B1865, <i>St. griseus</i> ATCC 10137	linalol racémique	oxydes de cis- et trans-linalol	[117; 123].
<i>St. bottropensis</i> SY-2-1 <i>S. ikutamanensis</i> Ya-2-1	(+) ou (-)-Cis-carveol	(-) 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]	[121; 122].
<i>Streptomyces ikutamanensis</i>	Cuminaldéhyde [4-isopropylbenzal déhyde	Acide 4-isopropylbenzoïque (Acide cuminique) et cuminol	[117; 124].

2.3.7 Travaux antérieurs de la bioconversion des terpènes par différents microorganismes

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 ont été réalisées.

Les différents travaux sur les transformations microbiennes des terpénoïdes sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Bioconversion de quelques métabolites secondaires par par différents microorganismes

<i>Substrat</i>	<i>Microorganisme</i>	<i>Produit</i>	<i>Réf.</i>
1,4-cineole	<i>Bacillus cereus</i>	2 α -hydroxy-1,4-cineole 2 β -hydroxy-1,4-cineole	[120,117]
α -pinène et β -pinène	<i>B. pallidus</i> BR 425.	formation de nombreux monoterpènes oxydés dérivés du carveol : Carvone ; Pinocarvone ; Myrtenal.	[125,117]
D-limonène	<i>B. stearothermophilus</i> BR388	Carveol ; Alcool perillyl ; Aldéhyde perillyl ; α -terpinéol.	[126,117]
1,8-cineole	<i>B. cereus</i> UI-1477	2R-endo-hydroxy-1,8-cinéole,	[127,117]
Isoeugenol	<i>B. subtilis</i> HS8	vanilline	[128]
Isoeugenol	<i>B. pumilus</i> S1	Vanilline	[129]
α -terpineol	<i>P. pseudomomallei</i>	8,9-epoxy-p-menthan-1-ol	[130,117]
cis-p-menthane	<i>P. mendocina</i> SF	Cis-p-menthan-1-ol	[1321]
Isoeugenol	<i>P. sp.</i> ISPC2	vanilline	[132]
1,8-Cineol	<i>Rhodococcus sp.</i>	2-oxo-1, 8-Cineole - 2-endo-hydroxy-1, 8-Cineole - 2-oxo-1, 8-Cineole.	[133]
(4R)-(+)-limonene	<i>Penicillium digitalum</i>	(4R)-(+)- α -terpineol	[134]
Myrcéne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 1074)	dihydrolinalol et le 2,6-iméthylactane/1,5 jour - 3 jours accumulation ée 2,6-diméthylactane	[135]

 et α -terpinéol

Thymol

Ocystis pusilla

Thymoquinone

[136]

2.3.8 Etude de la biotransformation des métabolites secondaire : Menthol, thymol et cymène

2.3.8.1 Biotransformation de menthol

2.3.8.1.1 Description chimique et utilisation de menthol

Le menthol est un composé organique obtenu soit par synthèse, soit par extraction à partir d'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha piperita*) ou d'autres huiles essentielles de menthe. Le menthol est un alcool terpénique monocyclique (C₁₀H₂₀O) dans lequel un groupe méthyle et un substituant sont substitués sur le cycle cyclohexane, et il a un groupe isopropyle en position *para* du groupe OH (Figure 7), ce qui en fait le composant principal de menthol. Huile essentielle de menthe poivrée et huile de menthe des champs (*Mentha arvensis*) [137,138].

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 (+) Neoisomenthol.

Le menthol (également connu sous le nom (1R, 2S, 5R) menthol) est la principale forme naturelle de menthol et est l'un des plus importants [139]. C'est l'un des composés de parfum [117]. La principale source de menthol naturel est obtenue en congelant l'huile de menthe des champs pour cristalliser le menthol présent [137; 139].

Le menthol est largement utilisé dans de nombreux produits commerciaux (produits pharmaceutiques, cosmétiques, dentifrices, articles de toilette tels que chewing-gum, tabac) et aliments et est utilisé comme sédatif, anesthésique, antiseptique, antibactérien et autre agent antiviral. Les propriétés antioxydantes et antispasmodiques du menthol favorisent la digestion.

Enfin, le menthol se caractérise par des fonctions relaxantes, et paradoxalement, certaines préparations de ce composé ont pour but de stimuler et tonifier le corps.

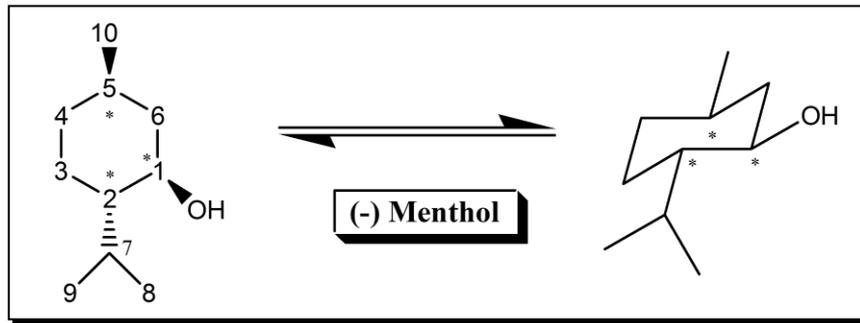


Figure 7: (1*R*, 2*S*, 5*R*)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol [140]

2.3.8.1.2 Propriétés physiques et chimiques du menthol

L'état physique : Cristaux ou granules (à température ambiante à de 20-25 °C), 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 acétone, le benzène. [139; 140].

2.3.8.1.3 Biotransformation de menthol par divers microorganismes

La biotransformation (bioconversion) de 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 [141].

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 de menthol est large [141]. La plupart de ces microorganismes sont des champignons. Parmi eux on trouve *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa*, *Penicillium* sp. *Rhizopus stolonifer*, *Macrophomina phaseolina* et *Cunninghamilla elegans*.

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

- La bioconversion fongique de (-) et (+) menthol par *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa* a été décrite par Asakawa et al. [142] *Aspergillus niger* a converti (-) menthol en 1-hydroxymenthol (1), 2- hydroxymenthol (2), 6- hydroxymenthol (3), 7- hydroxymenthol (4) enfin en 9-hydroxymenthol (5) et un anti-moustique très actif le 8-hydroxymenthol (6). La bioconversion de (+) et (-) Néomenthol et (+) Isomenthol par *Aspergillus niger* a été également étudiée par Asakawa et al. [142], il a été converti principalement à des produits hydroxylés. Pour un aperçu schématique très détaillée de ces réactions [142], est donnée par la planche présentée dans la figure 8.

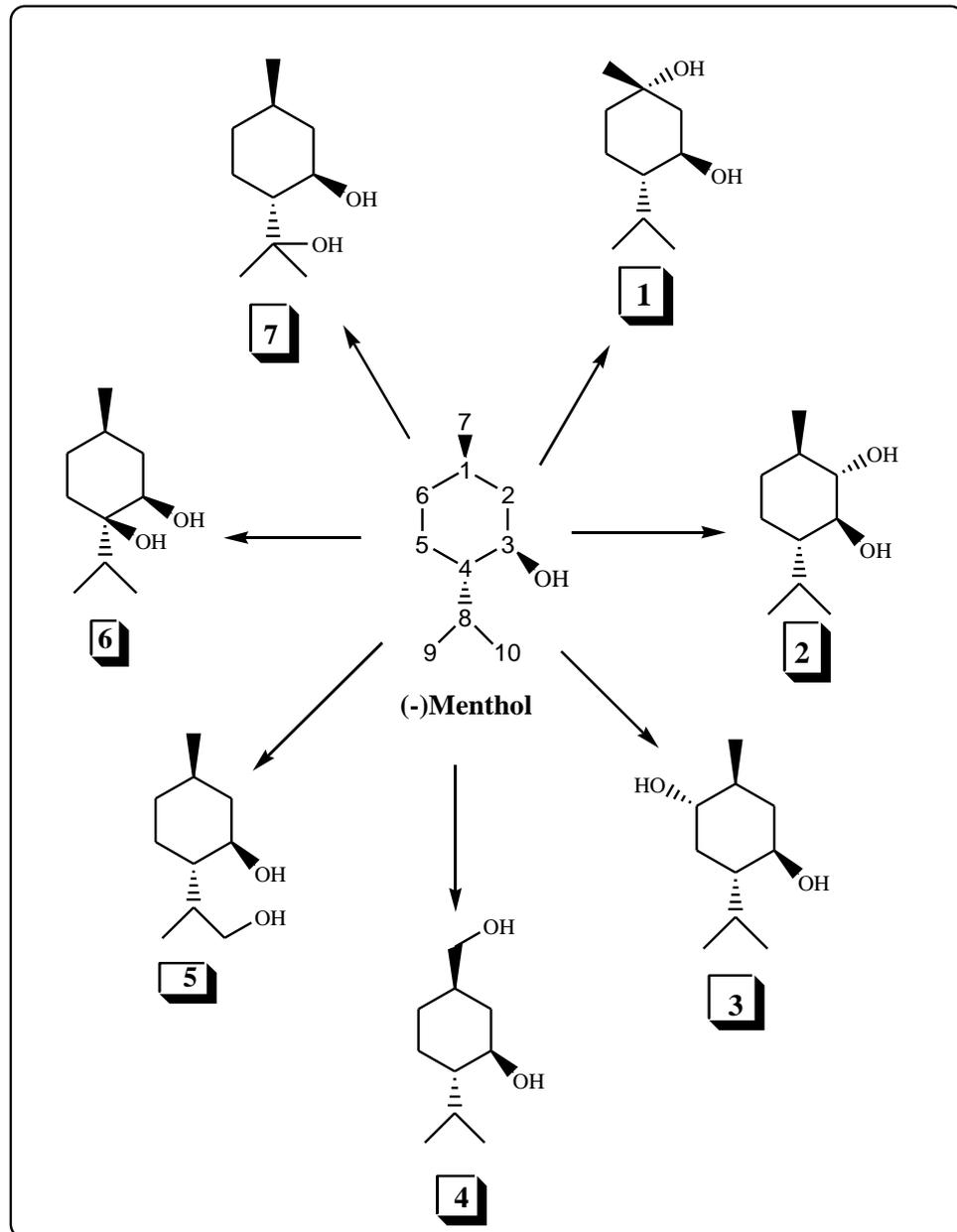


Figure 8 : Voies métaboliques de (-) menthol par *Aspergillus niger* [142].

Plus récemment, la transformation fongique du (-) menthol par *Cephalosporium aphidicola* a été rapportée par Atta-ur-Rahman et al. [143]. L'incubation du (-) menthol avec ce champignon pendant 12 jours a donné quatre nouveaux métabolites, 10- acetoxymenthol (1), 1- α -hydroxymenthol (2), 6- α -hydroxymenthol (3) et 10- hydroxymenthol (4) et deux composés connus identifiés comme 7- hydroxymenthol (5) et 9-hydroxymenthol (6) (Figure 9).

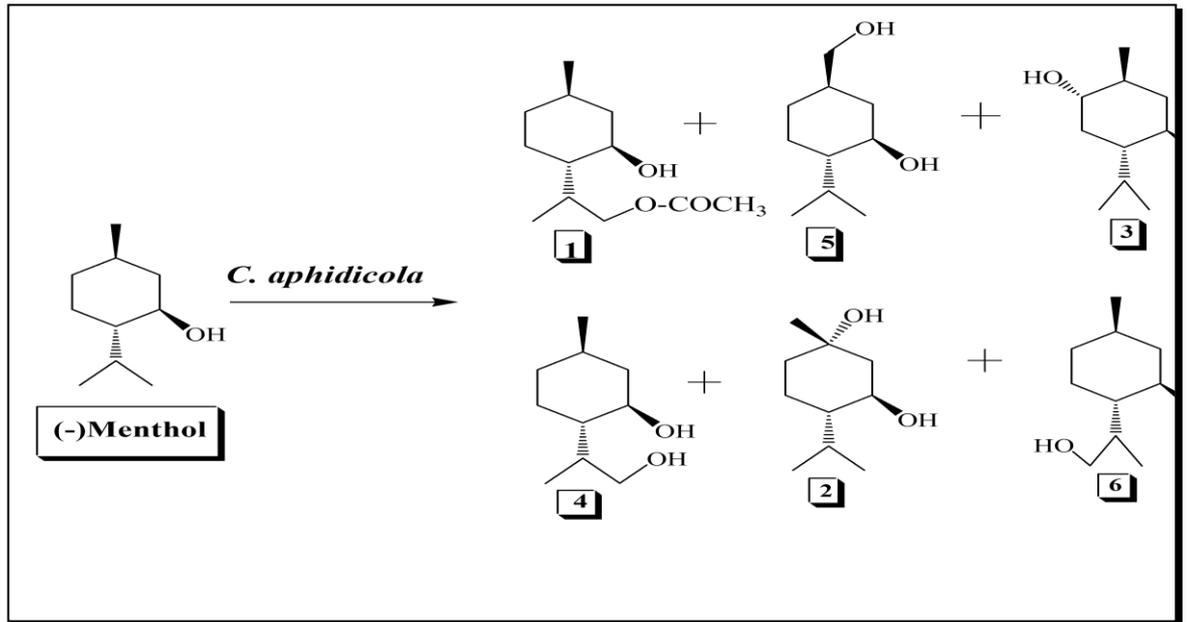


Figure 9: Bioconversion du (-) menthol par *Cephalosporium aphidicola* [143]

La bioconversion de (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074) a été étudiée par Esmaeili et al. [144]. Elle a été réalisée avec des cultures sporulées de surface de *Mucor ramannianus*. Les principaux produits obtenus (Figure 10) et (Figure 11) à partir de bioconversion du (-) menthol pendant 7 jours d'incubation sont : trans-p-menthane-8-ol, le trans-menth-2-ène-1-ol, le sabinane, p-menthane-3,8-diol, l'isomenthol, et le 1,8 cinéole, les rendements obtenus sont élevés.

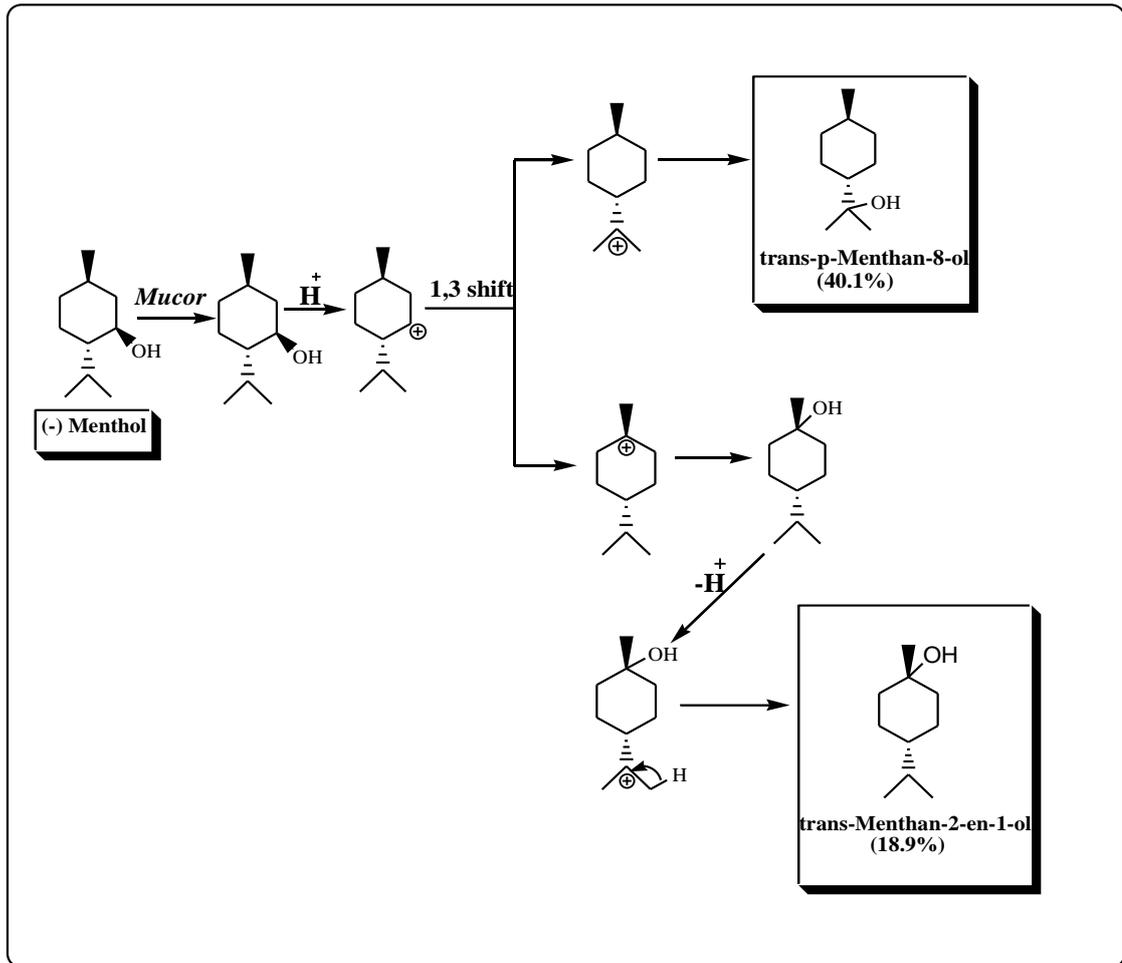


Figure 10: Bioconversion du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074) [144].

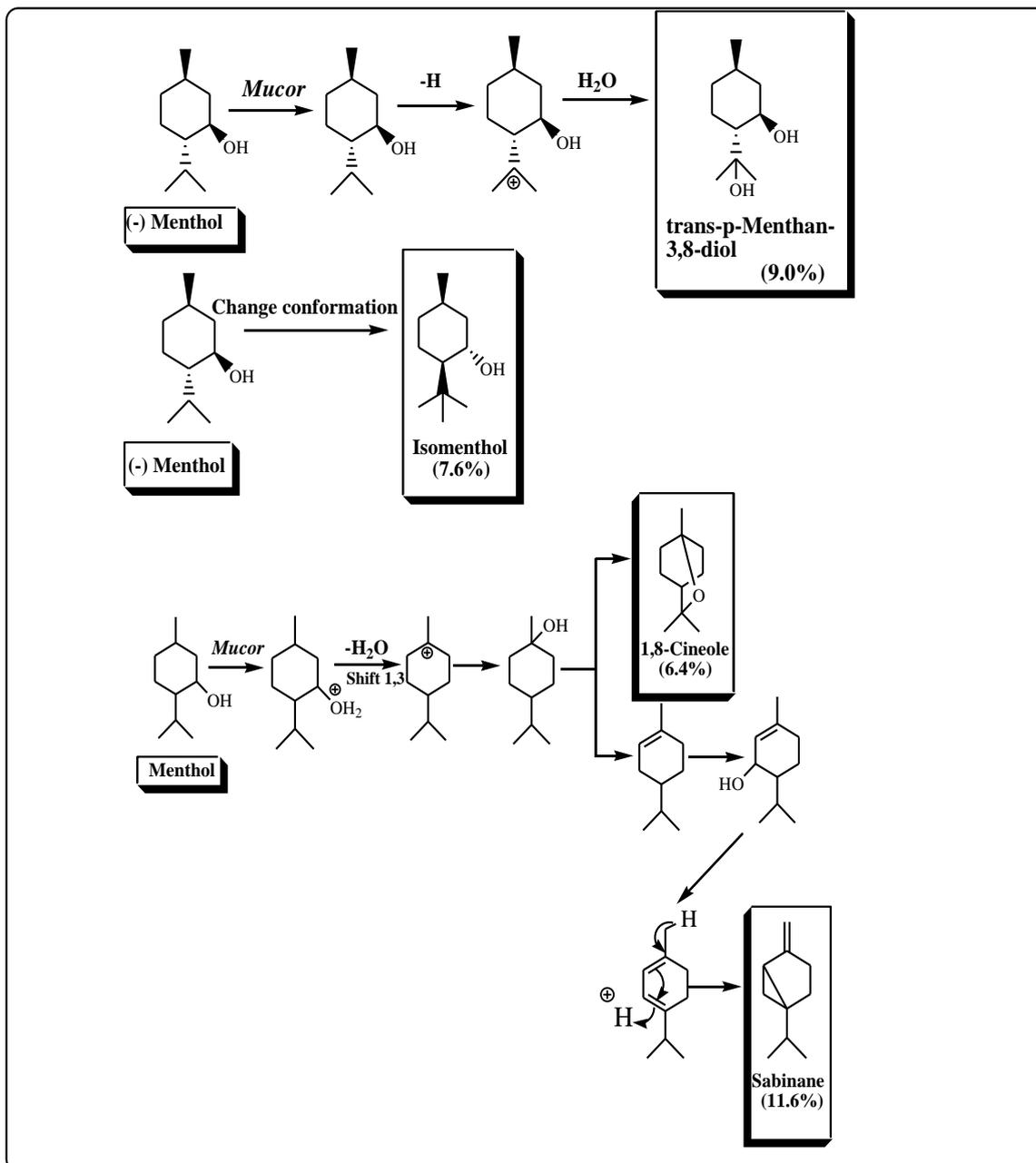


Figure 11: Bioconversion du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074) [144].

Afin d'étudier l'influence du temps d'incubation sur le procédé de la bioconversion de menthol, en présence d'un champignon *Chlorella vulgaris* avec des périodes d'incubation de 72, 92 et 120h, Esmaili et al. [119] ont trouvé que le menthol (1) est converti avec *C. vulgaris* pendant 72h en dihydroterpinéol (3) à (3, 48,8%) et l'isomenthol (4) à (4, 20,2%). Lorsqu'on utilise un temps d'incubation de 92h, le produit principal est l'isomenthol (92,3%). À 120h d'incubation, on obtient le cis-p menth-1-en-3-ol (2) à (2, 46,0%) et le dihydroterpineol (49,2%) (Figure 12) [145].

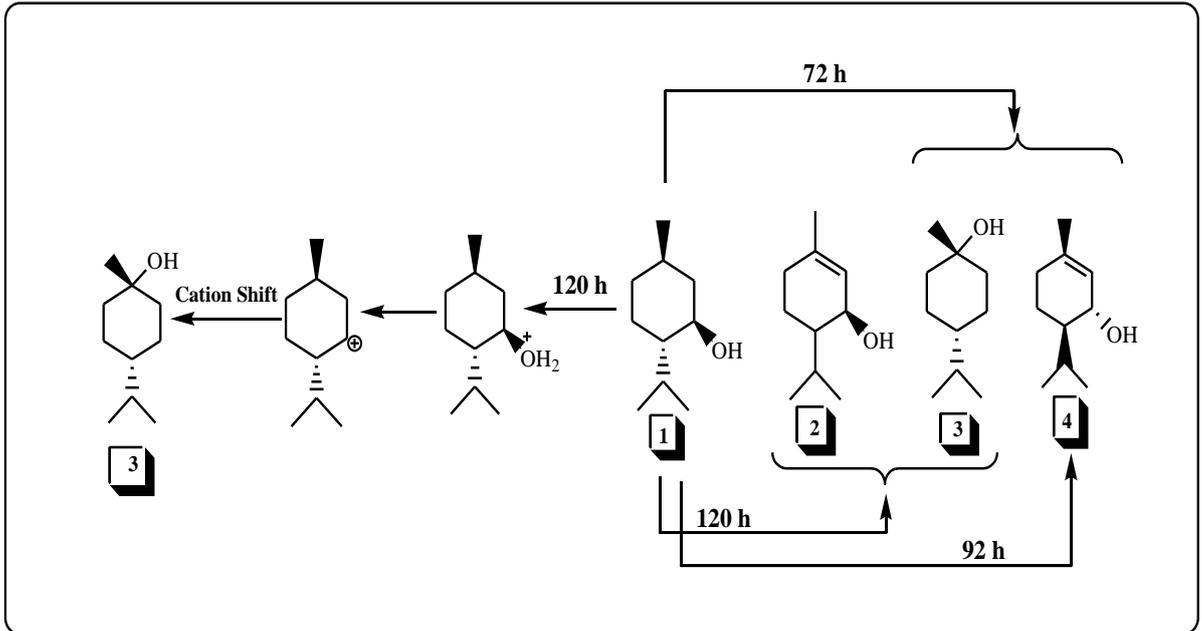


Figure 12: Bioconversion du (-) menthol par *Chlorella vulgaris* [145].

Un troisième schéma métabolique est mis en évidence par Esmaeili et al. [146], avec l'utilisation de la culture de surface sporulée de *Penicillium* sp. (PTCC 5074) isolé à partir du sol. Les principaux produits bioconvertis obtenus à partir du menthol après 7 jours sont : α - pinène (18,0%), sabinène (11,6%), trans-p-menthane-1-ol (10,6%), le p-menth-1-ène (5,8%), 1, 8-cinéole (6,4%) et le limonène (3,2%) (Figure 13)

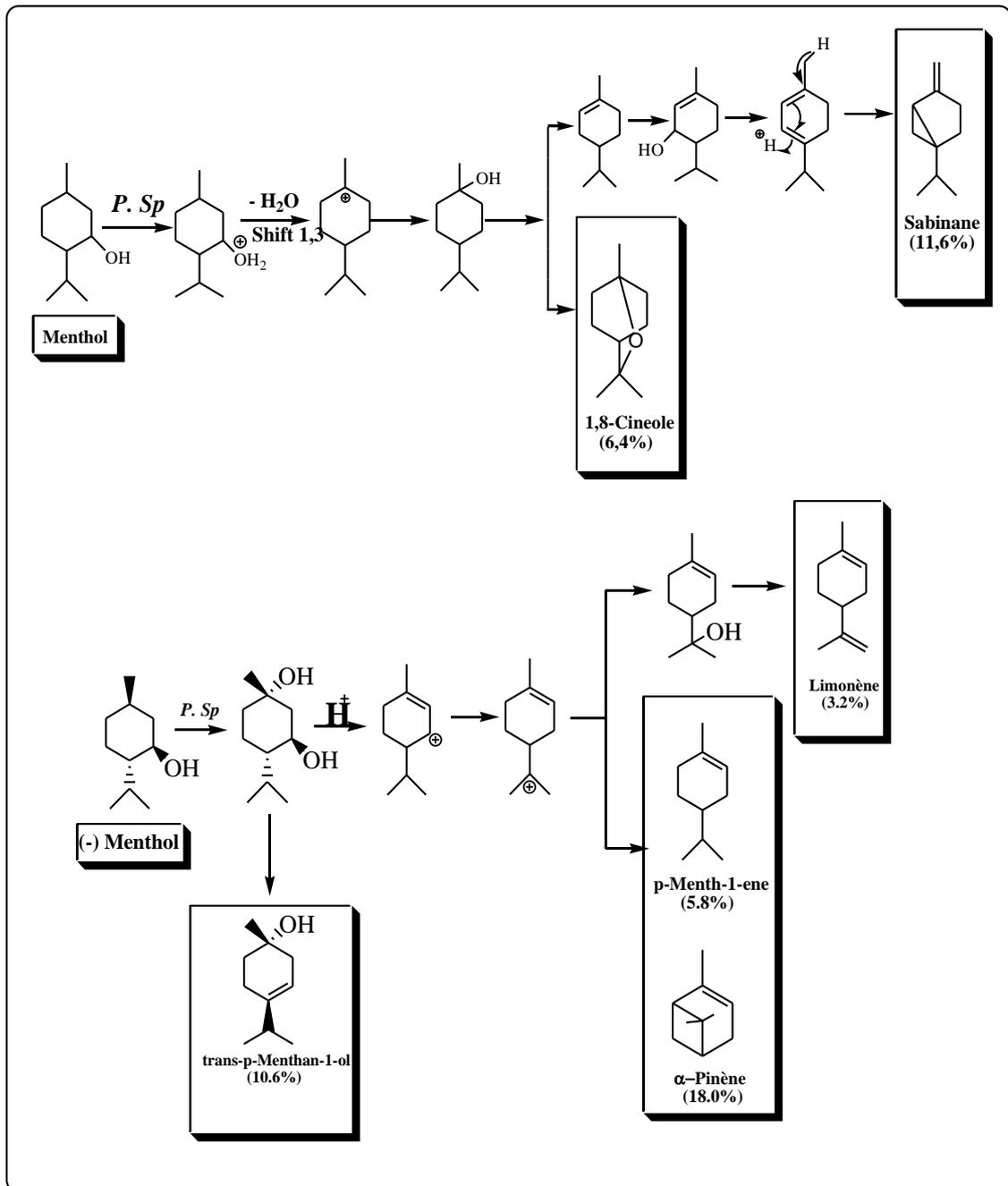


Figure 13 : Voie possible de bioconversion du (-) menthol par *Penicillium sp* [146].

2.3.8.2 Biotransformation de thymol

2.3.8.2.1 Description chimique et utilisation de thymol

Le thymol (5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol) est un composé aromatique de formule brute $C_{10}H_{14}O$ et de masse moléculaire de 150.22 g/mol [117]. Le thymol est une molécule naturelle extraite de plus grandes quantités dans l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) avec des concentrations allant jusqu'à 70%. Le thymol est un terpène qui fait partie de la famille des monoterpènes ; lipophile est volatile. Il n'est pas dangereux pour

l'homme mais peut altérer le goût du miel. Le thymol est vendu sous forme de cristaux incolores avec une odeur caractéristique. Le thymol est naturellement synthétisé dans les plantes avec deux unités d'isopréniques qui elles-mêmes sont obtenus par la voie de l'acide mévalonique à partir du coenzyme A [117]. Il peut aussi être synthétisé de manière chimique par une alkylation du m-crésol avec de l'isopropanol et propylène (Figure 14).

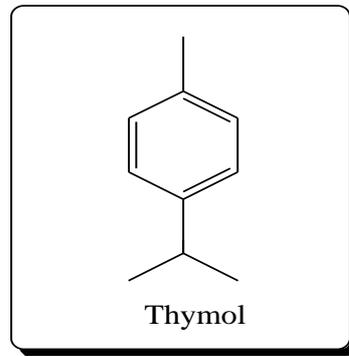


Figure 14: 5-methyl-2-(propan-2-yl)-phénol

Le thymol est le principal ingrédient des formules commerciales modernes de bains de bouche car il présente des propriétés antiseptiques. Cela peut expliquer l'utilisation de thym en phytothérapie pour traiter les infections de la bouche et de la gorge [147]. Il est intéressant de noter que le thymol est également utilisé comme additif alimentaire dans un certain nombre d'aliments et de boissons.

Le thymol est utilisé pour conserver les momies depuis l'Antiquité égyptienne ; dans la Grèce antique, le thym était utilisé pour ses propriétés aromatiques et brûlé dans les temples sacrés. Le thym a toujours été un symbole de courage et d'admiration. Aujourd'hui, le thymol est utilisé dans diverses compositions médicinales grâce à ses propriétés antibactériennes, antiseptiques et antifongiques [148].

2.3.8.2.2 Propriétés physiques et chimiques du thymol

Formule : C₁₀H₁₄O. Masse Molaire : 150,2176±0,0093 g/mol - T °C de fusion : 49,6 °C - T °C d'ébullition : 1013 (mbar) 233 °C - Solubilité (20 °C) très soluble dans l'éthanol ; l'acétate d'éthyle ; modérée (1g/l) dans l'eau - Masse volumique (24 °C) 0,97-0,93 g/l- Point d'éclair 104 °C - Point Critique : 424,85°C. [147].

2.3.8.2.3 Bioconversion de thymol par différents microorganismes

La gamme de microorganismes qui participe à la bioconversion du thymol est large. En effet, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence les principales voies de bioconversion du thymol par des souches bactériennes.

- Le thymol a été converti par *Streptomyces humidus*, d'après Noma et al. [149] pour donner (1R, 2S)- **(1)** et (1R, 2R)-2-hydroxy-3-p-menthen-5-one **(2)** comme produits principaux (Figure 2.15).

- D'autre part, chez un *Pseudomonas*, le thymol est biotransformé en 6-hydroxy-thymol **(3)** 7-hydroxy-thymol **(4)**, 9-hydroxy-thymol, **(5)** 7,9-dihydroxy-thymol, **(6)** Thymol-7-oïc acide **(7)** et thymol-9-oïc acide **(8)** Le thymol est métabolisé en p-cymène [150].

- La biotransformation de thymol par *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. a été décrite par Esmacili et al. [151] ; la transformation microbienne pendant 10 jours a révélé la présence de toluène ; le 3-méthylcyclohexanol ; le p-xylène et le menthol se sont avérés être les principaux constituants. Ainsi la biotransformation de thymol donne six hydrocarbures aromatiques et sept monotérpènes oxygénés et deux hydrocarbures oxygénés. La transformation microbienne en 5 jours de thymol représente le 3-méthylcyclohexanol et le pentanol comme étaient les principaux composants de cette bioconversion.

- Les travaux réalisés par Manuel et Numpaque et al. [152, 153] ont montré la métabolisation de thymol par les champignons phytopathogènes *Colletotrichum acutatum* et *Botryodiplodia theobromae* en faible proportion en plusieurs composés dont la thymoquinone, la thymohydroquinone, l'acétate de thymyle, l'éther méthylique de thymyle.

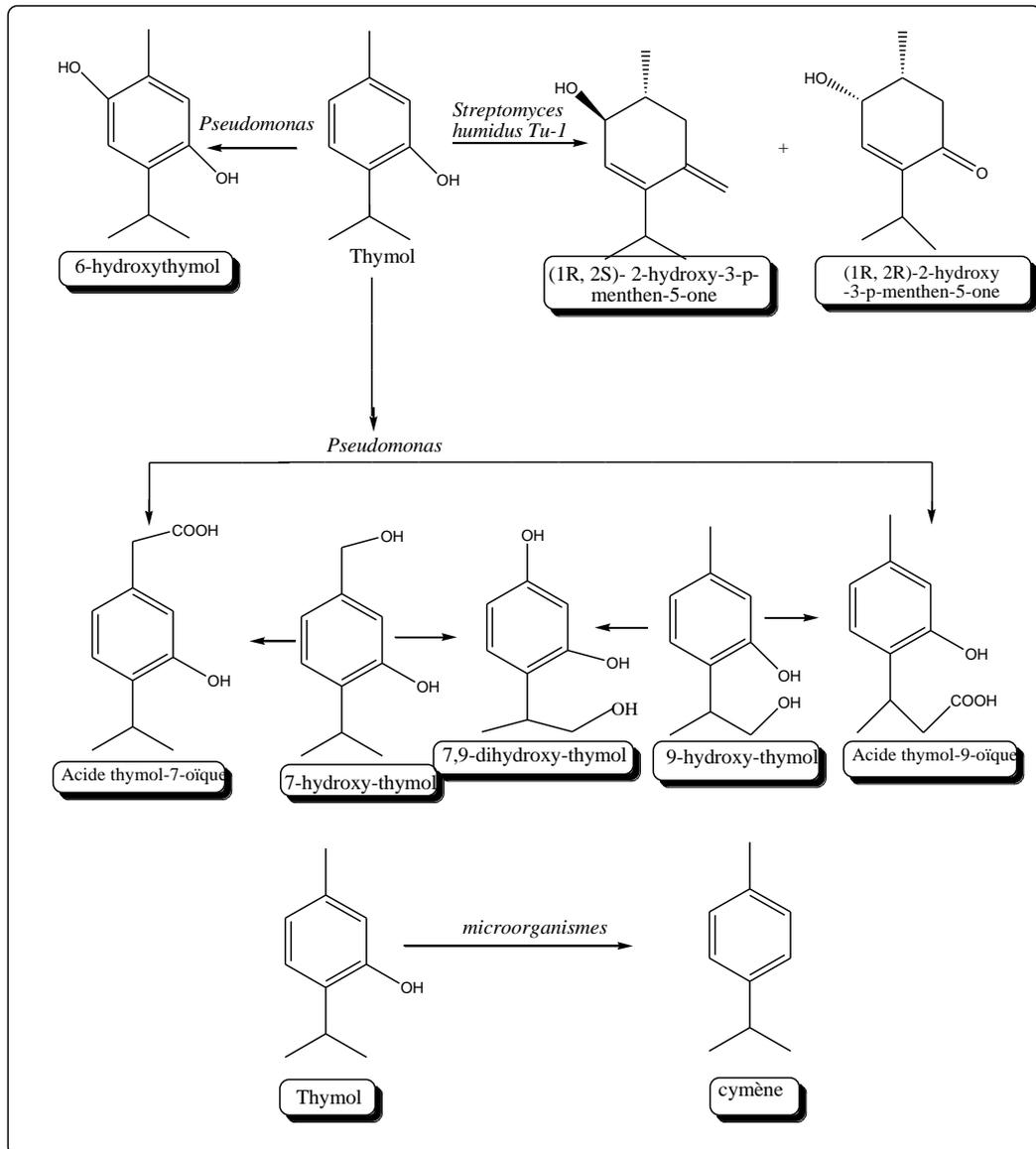


Figure 15: Biotransformation du thymol par *Streptomyces humidus* et *Aspergillus niger* Tu-1 [151].

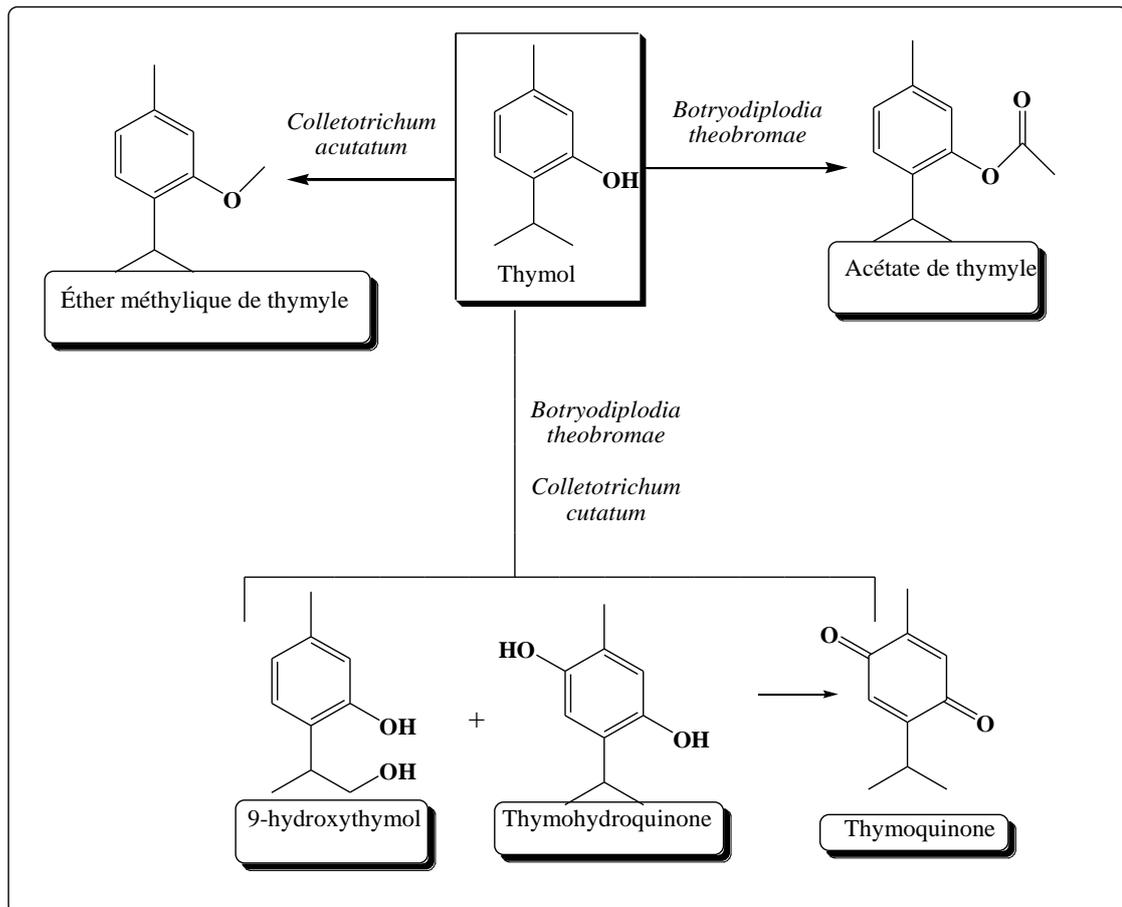


Figure 16: Biotransformation du thymol par *Colletotrichum acutatum* et *Botryodiplodia theobromae*. [152, 153].

Le thymol a été glycosylé par la glycosyl transférase d'*Eucalyptus perriniana*. Une telle glycosylation est utile pour obtenir des produits plus solubles dans l'eau à partir de produits naturels et des métabolites secondaires commercialement disponibles pour les additifs alimentaires et cosmétiques [154].

La figure 17 regroupe les différentes étapes et mécanismes de la bioconversion de thymol par différents microorganismes.

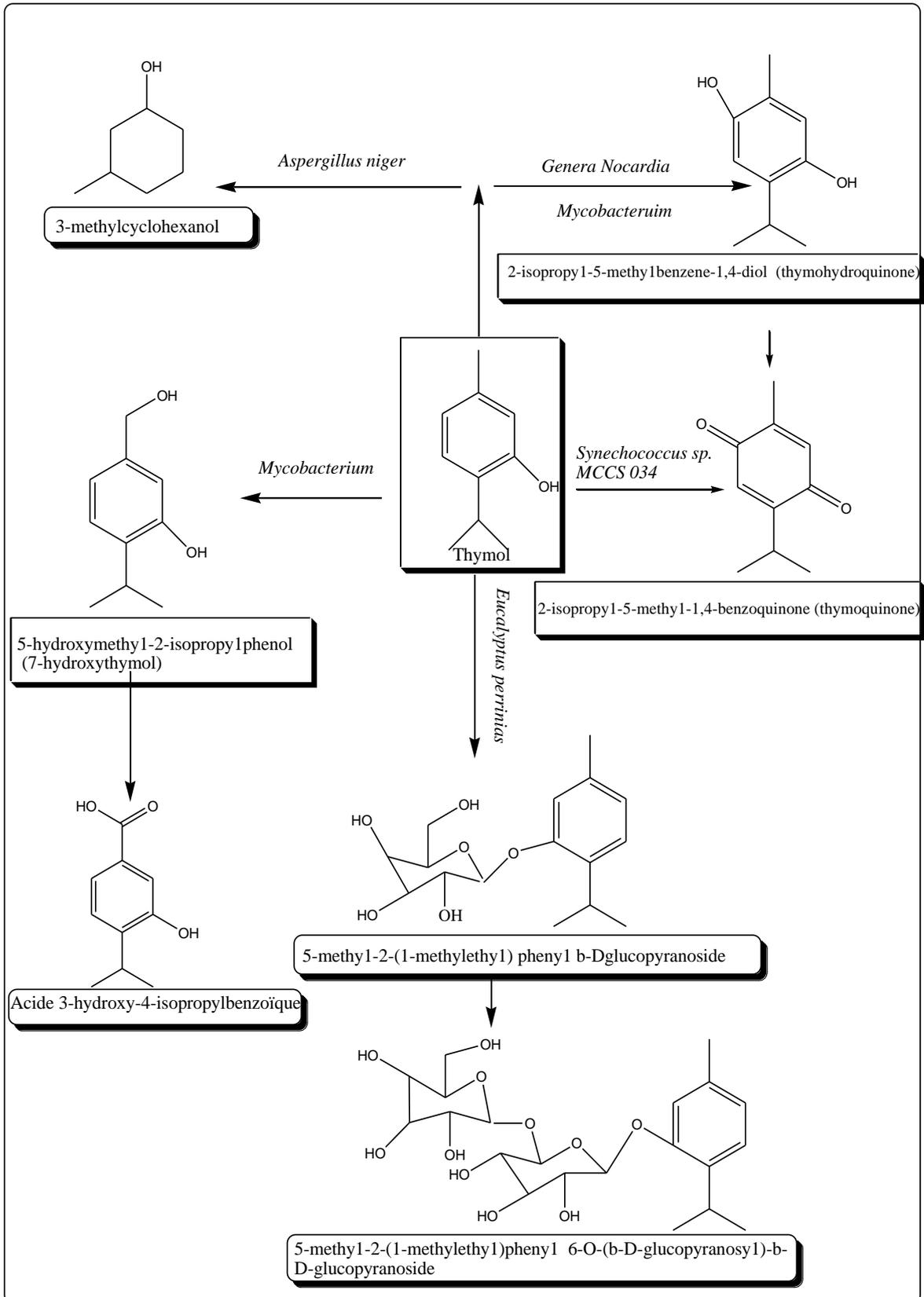


Figure 17: Biotransformation de thymol par différents microorganismes.

2.3.8.4 Biotransformation de cymène

2.3.8.4.1 Description chimique et utilisation de cymène

L'hydrocarbure aromatique 1-méthyl-4(1-méthyléthyl) benzène du cymène appartient à la classe des monoterpènes et est un composé naturel présent dans certaines plantes et répondant à la formule chimique $C_{10}H_{14}$. Cependant, la forme la plus courante de ce monoterpène est le p-cymène ou le para-cymène, et d'autres formes telles que l'o-cymène et le m-cymène sont également présentes.

Le cymène se trouve dans plus de 100 plantes différentes et plus de 200 aliments. Ce monoterpène secondaire se retrouve dans diverses huiles essentielles comme le cumin et le thym. Cependant, plusieurs études antérieures ont confirmé diverses fonctions selon lesquelles le p-cymène peut réellement être bénéfique pour la santé humaine. Il améliore également l'humeur et améliore la vigilance et la mémoire. Il a également pour effet d'abaisser la tension artérielle en inhibant la contraction du muscle cardiaque. En fait, ce monoterpène est facilement absorbé par la peau et peut procurer un soulagement naturel de la douleur sans les effets secondaires qui peuvent survenir chez certaines personnes avec certains médicaments et analgésiques [155].

L'industrie alimentaire utilise couramment le cymène (p-cymène) comme agent aromatisant dans certains aliments, boissons et confiseries, et ce terpène est un composé naturel beaucoup plus courant et omniprésent dans la vie quotidienne.

En raison de son parfum doux et citronné, il est également utilisé dans les industries des toilettes et des soins personnels pour produire des parfums pour les industries des cosmétiques, du nettoyage et des parfums. En plus de ces utilisations, le cymène a également des avantages médicaux dans le monde du cannabis en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antibactériennes, anxiolytiques et même anticancéreuses. [155].

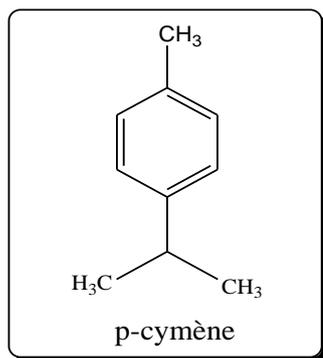


Figure 18: 1-méthyl-4(1-méthyléthyl) benzène

2.3.8.4.2 Propriétés physiques et chimiques du cymène

Formule : $C_{10}H_{14}$ - Masse Molaire : $134,2182 \pm 0,009$ g/mol - - T° de fusion : $-67,9$ °C - - T° d'ébullition : 177 °C - - Paramètre de solubilité : $16,8$ MPa^{1/2} (25 °C) - - Miscibilité : presque insoluble dans l'eau - - Masse Volumique : $0,86$ g.cm⁻³ - - T° d'autoinflammation : 435 °C - - Point d'éclair : 47 °C [156].

2.3.8.4.3 Bioconversion du cymène par différentes microorganismes

- La souche *Pseudomonas* sp. (PL) a été cultivée avec du p-cymène comme seule source de carbone pour donner de l'alcool cumylique (1), l'acide cumique (2), l'acide 3-hydroxycumique (3), l'acide 2,3-dihydroxycumique (4), l'acide 2-oxo-4-méthylpentanoïque (5), 9-hydroxy-p-cymène (189) et de l'acide p-cymène-9-oïque (190) comme le montre (Figure 19) [157].

- 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) [157]

- Le p-cymène est converti en thymquinone et en analogues, thymol et 6-hydroxythymol, par divers types de microorganismes (Figure 21) [158].

- Différents types de microorganismes ont été évalués pour leur capacité de biotransformation de p-cymène afin d'obtenir de nouveaux métabolites [117]. Au cours de la période de biotransformation microbienne de 14 jours, 16 différents métabolites ont été détectés par les méthodes TLC et GC/MS. Le p-cymène-8-ol et l'alcool de cumin ont été

caractérisés comme les métabolites initiaux par *Phanerochaete chrysosporium* (Figure 22) [117].

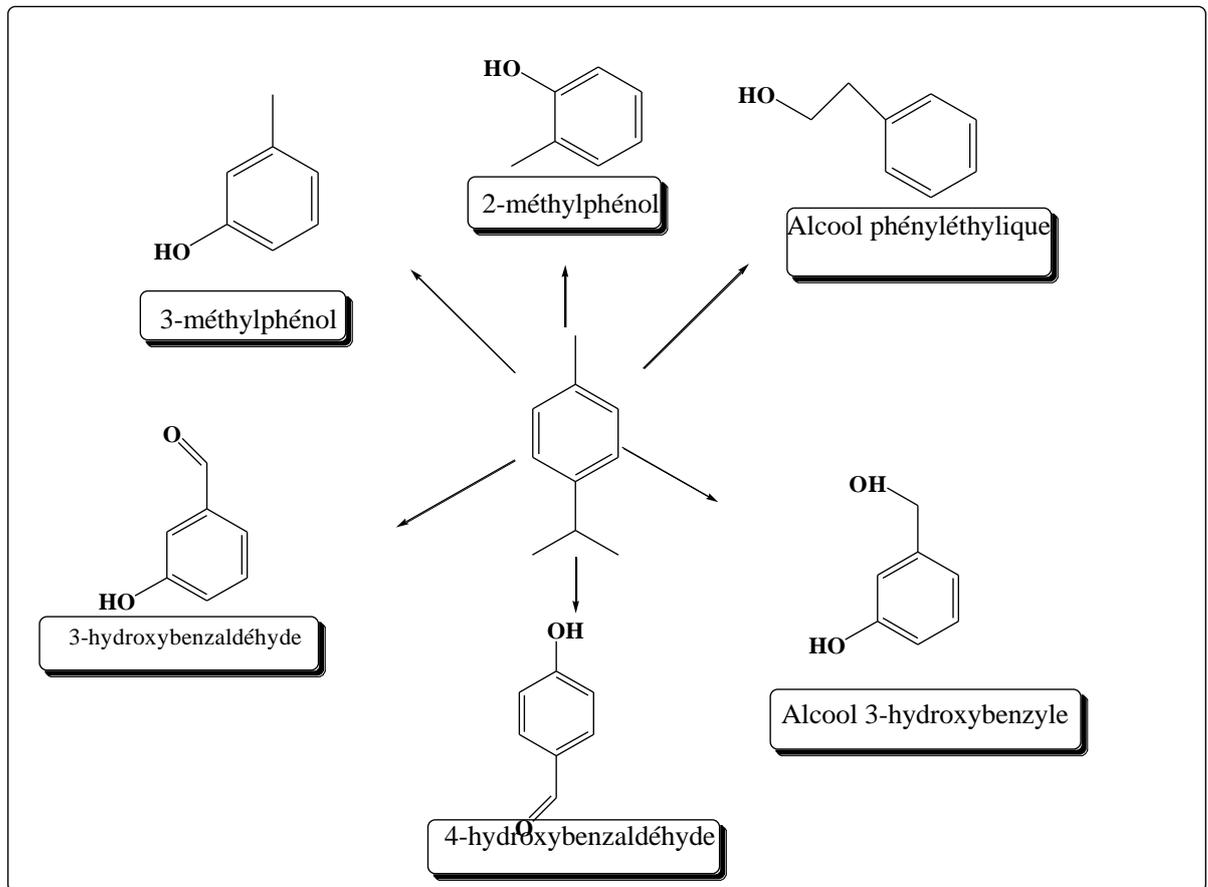


Figure 19: Biotransformation du p-cymène en utilisant *Penicillium claviforme* MR376

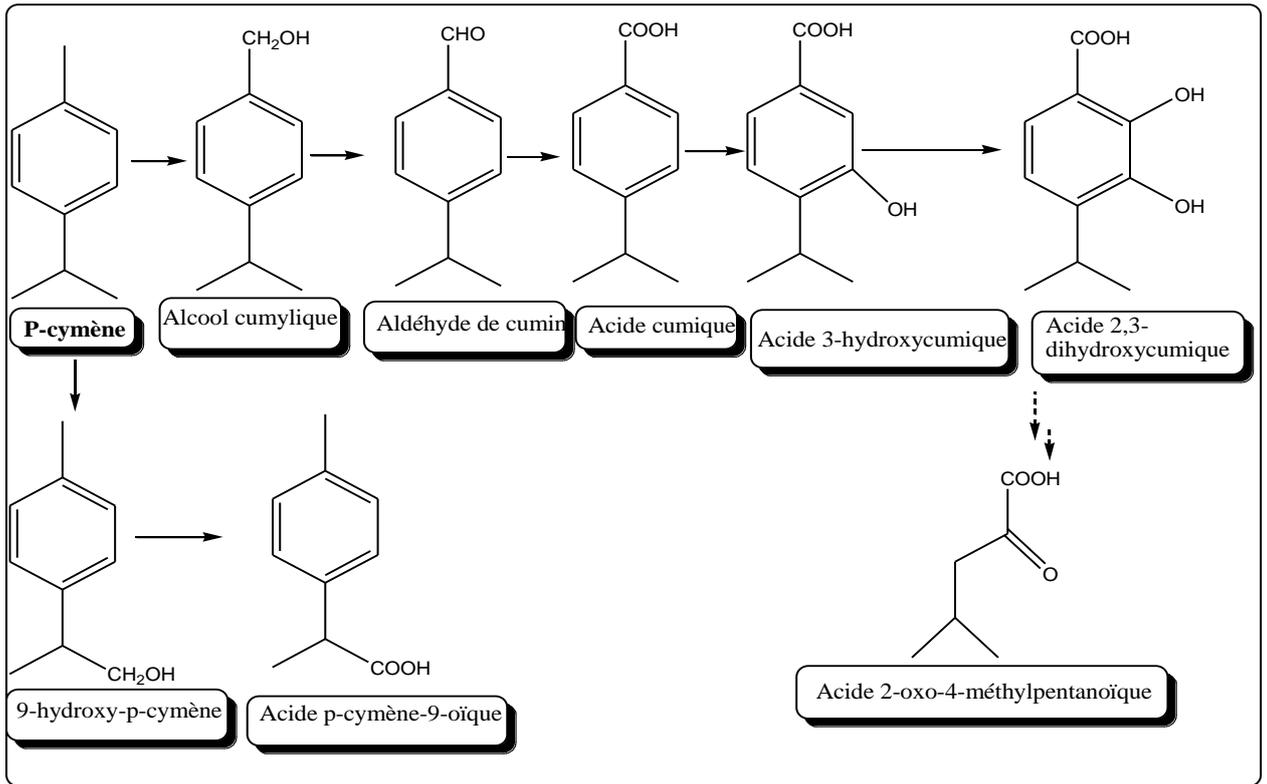


Figure 20: Biotransformation du p-cymène par la souche (PL) de *Pseudomonas* sp.

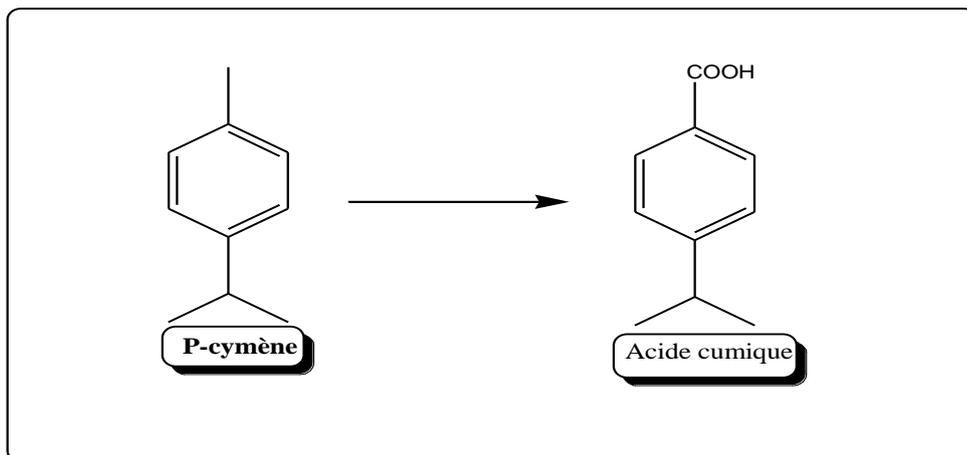


Figure 21: Biotransformation du p-cymène en acide cumique par *Pseudomonas* sp. *Pseudomonas desmolytica* et *Nocardia salmonicolor*.

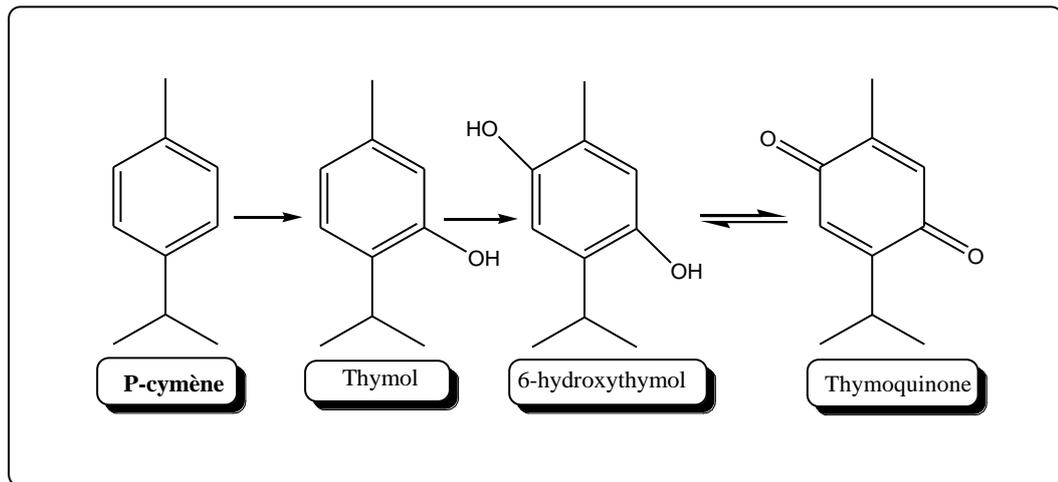


Figure 22: Biotransformation du p-cymène en thymoquinone et analogues par des micro-organismes

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1.1. Isolement et criblage des actinobactéries marines d'intérêts biotechnologiques

1.1.1 Coordonnées géographiques et présentation du site de prélèvement

Le complexe de la Corne d'Or, choisi comme site de prélèvement pour récolter des algues marines pour isoler des actinobactéries, est situé en bord de mer à environ 1 km dans l'est de la wilaya de Tipaza (À 36°35.3832' Nord et 2°26.85' Est). Il est composé de petites maisons traditionnelles (Figure 23).

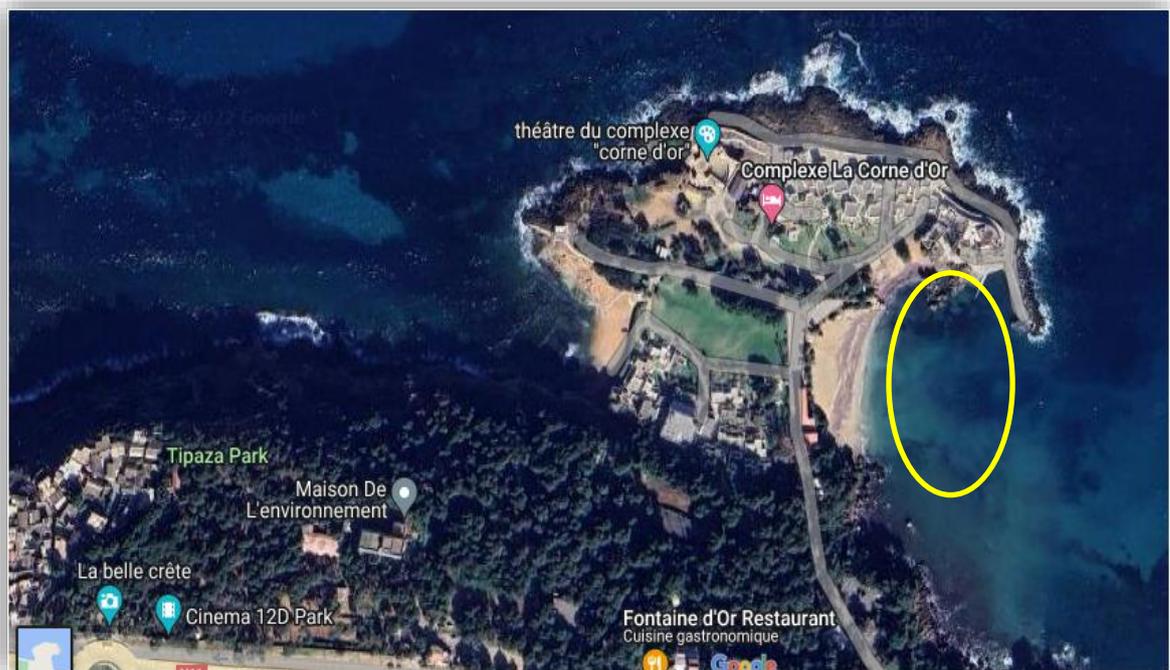


Figure 23 : Localisation du site de prélèvement [159].

1.1.2 Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer

Les prélèvements des échantillons d'eau et de sédiments ont été réalisés au niveau de la mer, lors de l'échantillonnage, quelques paramètres physicochimiques de l'eau de mer ont été mesurés à l'aide d'une sonde de multi paramètres (NT55 HUMEAU).

1.1.3 Echantillonnage et conditionnement des algues

L'échantillonnage a été effectué dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioMol) de l'université de Blida 1 à partir d'un thalle adulte de l'algue brune *Zonaria tournefortii* le 14 mai 2017. Cette opération a été réalisée avec la contribution des plongeurs de la protection civile. L'algue complète est prélevée avec un couteau stérilisé et à l'aide des gants de laboratoire stérile afin de ne pas contaminer la flore bactérienne épiphyte existante sur la surface des thalles. Les échantillons d'algue doivent être ensuite transférés dans des sacs en plastiques ou des bouteilles stériles contenant de l'eau de mer et puis conservés dans l'obscurité à la température ambiante de l'eau de mer jusqu'au traitement immédiat au laboratoire dans deux heures juste après le prélèvement.

1.1.4 Traitement et mise en culture des échantillons d'algue brune *Zonaria tournefortii*

Dans les deux heures qui suivent le prélèvement, les spécimens d'algue ont été traités par deux méthodes pour mieux différencier entre les souches bactériennes épiphytes et endophytes.

- Pour l'obtention des souches bactériennes épiphytes, les échantillons d'algue ont été initialement lavés trois fois avec de l'eau de mer stérile (en utilisant un filtre de 0,22 µm) pour éliminer les microorganismes faiblement attachés à la surface d'algue, puis rincés avec une solution de tampon phosphate salin PBS afin de faciliter l'élimination de l'eau de mer avant l'étape d'isolement.[166]

- Pour les souches bactériennes endophytes, les thalles pré-rincés avec l'eau de mer ont été soumis à une stérilisation de surface avec 70% d'éthanol pendant 15 secondes, puis lavés de nouveau avec l'eau de mer stérile et rincés avec une solution de PBS. A la fin de ce traitement, le pH est ajusté à 7,4 et compléter le volume final à 1L avec l'eau distillée [166].

1.1.5 Méthodes d'isolement des actinobactéries marines

Trois méthodes d'isolement ont été utilisées afin d'obtenir le maximum de la flore d'actinobactéries associées à l'algue.

1.1.5.1 Première méthode : utilisation de la matrice de la surface d'algue pour l'isolement des actinobactéries épiphytes :

Deux techniques, principalement destinées à l'isolement des bactéries épiphytes :

- **La première** consiste à frotter vigoureusement sur la surface de quelques thalles, pré-rincés avec le PBS, à l'aide d'un écouvillon stérile. Ce dernier est ensuite utilisé pour inoculer directement les boîtes de Pétri contenant les milieux de culture solides : M1, M2 et M3

- **La deuxième** consiste à découper des morceaux carrés d'environ 1cm² des thalles de l'algue et on les dépose directement sur la surface du milieu d'isolement : M1, M2 et M3

1.1.5.2 Deuxième méthode : utilisation de la matrice de profondeur d'algue pour l'isolement des actinobactéries endophytes

La deuxième méthode repose sur le découpage des thalles d'algue en petits morceaux, puis les placer dans des tubes à essai contenant de l'eau de mer filtrée et stérilisée. Ils sont ensuite soumis à une agitation vigoureuse avec vortex afin de permettre la récupération de maximum de souches bactériennes. Ainsi que des dilutions décimales préalablement préparées (10^{-1} à 10^{-5}) sont étalées (100 µL/boîte), à l'aide d'un râteau stérile sur les milieux de culture solides précités. Les boîtes ainsiensemencées sont mises en incubation à 30 °C jusqu'à ce que des colonies bactériennes soient visibles. Toutes les expériences de l'isolement ont été réalisées en triplicatas.

1.1.5.3 Troisième méthode : Utilisation de l'algue entière (partie surface, profondeur et racines)

Les trois parties sont placées dans un mortier stérile et homogénéisées avec de l'eau de mer stérile (10 mL) ou broyées à l'aide d'un mixeur stérile. Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-5}) ont été préparées en utilisant le NaCl (0,9%) comme solution de dilution.

1.1.6 Milieux d'isolement des actinobactéries

Quatre différents milieux (M1, M2, M3 et M4) complétés par 50 µg/mL d'amphotéricine (antifongique) et 10 µg/mL d'acide nalidixique (antibactérien Gram-négatif) ont été

sélectionnés pour isoler les actinobactéries. Les quatre milieux sont couramment utilisés pour l'isolement sélectif des actinobactéries en plus des milieux ISP2 (International *Streptomyces* Project) [160]. Pour les quatre milieux, le pH a été ajusté à 7,2 avant la stérilisation.

La composition de différents milieux selon Zhang et al. [161], sont (g/L) :

-**M1** : Agar (18), amidon (10), extrait de levure (4) et peptone (2).

-**M2** : Agar (18), amidon (10), KNO₃ (2), K₂HPO₄ (2), NaCl (2), caséine (0.3), MgSO₄.7H₂O (0.05), CaCO₃ (0.02), et FeSO₄.7H₂O (0.01).

-**M3** : Agar (18), extrait de levure (0,25) et K₂HPO₄ (0,5).

-**M4** : Agar (18), extrait de levure (3), extrait de malt (3), peptone (5) et glucose (10).

On ajuste le pH du milieu à 7,2 avec NaOH (0,1N) ou HCl (0,5N) et on ajoute 20g d'agar bactériologique en agitant la solution. Enfin, la solution préparée est ensuite stérilisée à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.

Les milieux sont incubés à 30 °C et observés quotidiennement après une semaine et jusqu'à un mois d'incubation pour vérifier la croissance des isolats d'actinobactéries à la surface des milieux gélosés sur boîtes de Pétri.

1.1.7 Isolement des actinobactéries

Pour chaque colonie présentant des caractéristiques morphologiques des actinobactéries; un disque de mycélium est prélevé au fur et à mesure de leur apparition, pour être ensemencé individuellement sur le milieu ISP2, afin d'obtenir des cultures d'actinobactéries bien séparées. Les colonies ainsi isolées ont ensuite fait l'objet de repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à la purification. L'incubation se fait à 30 °C pendant 10 à 15 jours.

1.1.8 Conservation des isolats d'actinobactéries

1.1.8.1 Conservation à courte durée

Les isolats sont ensemencés sur gélose ISP2 inclinée en tube. Après une durée d'incubation suffisante, les tubes sont conservés à température ambiante. Cette technique permet la conservation des souches pour une durée de trois à quatre mois.

1.1.8.2 Conservation à longue durée

La méthode utilisée est celle des stocks de spores qui permet la conservation de longue durée des souches sous forme de spores bactériennes maintenues en suspension dans la paraffine. Les isolats sont mis en culture sur milieu ISP2 avec une durée d'incubation de 7 jours à 30 °C (obtention d'une bonne sporulation), après cette période, 10 mL d'eau distillée stérile sont ajoutés à la surface du milieu gélosé. A l'aide d'une anse stérile, la surface des colonies est raclée doucement pour décoller les spores. La suspension de spores est ensuite prélevée à l'aide d'une pipette pasteur ; introduite dans un tube stérile puis vortexer pendant 1min à haute vitesse [162]. Après agitation, la suspension de spores est filtrée à travers une seringue stérile préalablement munie d'un coton stérile. Le filtrat est recueilli dans un nouveau tube puis centrifugé à 150 rpm pendant 10 min. Le surnageant est éliminé puis remplacé par un volume égal d'eau distillé stérile. Un volume égal de glycérol est ajouté à la suspension de spores qui est ensuite répartie dans des tubes de conservation (cryotube) sous forme d'aliquotes de 1 mL. La conservation est réalisée à -20 °C [162].

1.1.9 Caractérisation préliminaire des souches d'actinobactéries isolées de l'algue brune *Zonaria tournefortii*

1.1.9.1 Choix des isolats pour l'identification

Tous les isolats obtenus de toutes les parties de l'algue font l'objet d'une étude taxonomique. Cependant, une première observation des colonies nous a permis de constater que certains isolats étaient composés d'isolats macro et micromorphologiquement identiques les uns aux autres (au sein d'un même groupe) et qui prédominent par rapport à l'ensemble des actinobactéries et semblent appartenir au même genre. Pour confirmer ces observations, un certain nombre de souches de chaque groupe ont été identifiées de manière aussi complète. Le reste des isolats (un isolat) présents dans les boîtes de Pétri ont été systématiquement collectés et étudiés par des observations macro et microscopiques minutieuses, en utilisant des milieux spécifiques pour la détermination des actinobactéries et, en particulier, en notant la production de pigment (caractère important).

1.1.9.2 Caractéristiques culturelles

Les caractéristiques morphologiques et culturales de différentes actinobactéries isolées ont été étudiées conformément aux directives de l'International *Streptomyces* Project (ISP) [163] et l'ouvrage du « Bergey's manual of systematic bacteriology » [164]. Les souches sont ensemencées sur les cinq différents milieux dont leur composition est donnée en Appendice 1.

L'observation est réalisée après 14 jours d'incubation à 30 °C. L'examen des souches se fait à l'aide d'un binoculaire et de nombreux paramètres sont notés tels que : la couleur du mycélium aérien, la couleur du mycélium du substrat, la présence ou absence de sporulation et la production de pigment (diffusible ou non dans le milieu).

1.1.9.3 Etude micro et macromorphologique, biochimique et physiologique des isolats d'actinobactéries

***Etude macromorphologique :** L'observation macroscopique des colonies obtenues sur gélose permet la description des colonies, à savoir : la forme, la taille, la couleur, aspect de surface et le contour; la couleur des mycélia aériens (MA) et du substrat (MS). Elle consiste à noter respectivement aux 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour d'incubation à 30 °C, les caractéristiques culturales des colonies sur différents milieux de culture préconisés par l'International *Streptomyces* Project (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5) [163].

***Etude micromorphologique :** Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (X10 et X40) après 7 et 14 jours d'incubation. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycélia. Elles consistent à observer également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation de mycélium du substrat [165]. Ainsi, l'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques des actinobactéries. Elle repose sur une observation globale intégrant à la fois l'observation à l'état frais et l'observation après fixation.

Observation à l'état frais : L'observation microscopique à l'état frais permet la détermination de la forme des bactéries, de leur mode de groupement et de leur mobilité éventuelle. L'observation microscopique (×40) a été réalisée sur des cultures bactériennes

en milieux liquides ou des suspensions réalisées dans de l'eau distillée, ou bien sur des colonies ayant poussées sur des milieux solides.

Observation après fixation : L'observation microscopique d'un frotti fixé *via* la coloration de Gram permet de distinguer les actinobactéries qui sont à Gram positif et colorées en violet. Les frottis des bactéries à identifier sont préparés sur des lames microscopiques puis fixés à la chaleur. Une fois refroidi, les frottis sont colorés au violet de gentiane pendant 30 secondes avant d'être rincés. Les préparations sont contre colorées à l'alcool 95% durant 10 à 20 secondes. La décoloration est suivie d'un rinçage à l'eau déminéralisée puis d'une recoloration des frottis à la fuchsine pendant 30s. Enfin, les préparations sont lavées doucement à l'eau, séchées puis observées au microscope avec un grossissement X40.

***Etude biochimique et physiologique** : plusieurs tests ont été réalisés :

- Test de la catalase : La recherche de la catalase est effectuée par la mise en contact d'une colonie d'actinobactérie avec une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par un dégagement gazeux abondant sous forme de bulles d'oxygène. [166].

- Test de l'oxydase : Un disque d'oxydase contenant l'oxalate N-diméthylparanitrophénylènediamine, préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile, est déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie d'actinobactérie fraîchement cultivée. La présence d'un cytochrome oxydase se traduit, en 10 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration violette [166].

- Test de mannitol-mobilité : La mise en évidence simultanée de la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries est réalisée en milieu mannitol-mobilité ensemencé par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube. L'apparition d'une culture bactérienne le long de la piqûre centrale indique que la bactérie est immobile, tandis que l'apparition d'un trouble dans le milieu dû à la diffusion horizontale des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement indique que la bactérie est mobile. Un virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune à orange se manifeste en cas de réaction positive et la lecture de la mobilité est comme suit [166] : Envahissement du milieu : La bactérie est dite mobile - Croissance concentrée autour de la piqûre centrale : La bactérie est dite immobile.

- Test d'indole : La production de l'indole est mise en évidence à partir de tryptophane. Après ensemencement et incubation des souches à 37 °C pendant 18 à 24h, quelques gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu. La présence d'indole se manifeste, après agitation, par l'apparition d'un anneau rouge en surface [166].

- Détermination de type respiratoire : La détermination de type respiratoire d'une bactérie nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en oxygène ; le principal milieu utilisé est la gélose Viande-Foie. La gélose est régénérée par ébullition pendant 30 min puis coulée dans des tubes à essais. Les tubes sont ensemencés par des pipettes Pasteur boutonnées en remontant du fond vers le haut du tube en spirales et incubés à 37 °C pendant 24h [167].

- La production de pigments mélanoides : La mise en évidence de la production de pigments mélanoides par les isolats est réalisée sur milieu gélosé IPS7 dont le virage, du milieu, au brun marron est reconnaissable [163]. Les isolats sont ensemencés en spot ou en touches à la surface de la gélose et incubés à 30 °C. L'observation visuelle est effectuée quotidiennement après le troisième jour.

- Hydrolyse de l'amidon : Ce test est réalisé sur de la gélose nutritive contenant 10% (m/v) de l'amidon soluble selon la méthode de Marchal et Bourdon [168]. Après 14 jours d'incubation à 30 °C, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

- Dégradation de la caséine de lait : L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de Gordon et al. [169]. 10g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 mL d'eau distillée puis stérilisés à l'autoclave. 100 mL d'eau distillée (pH 7,2) contenant 3,6g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées dans des boîtes de Pétri. Les souches testées sont ensemencées en touches ou en stries à la surface de la gélose et incubées à 30 °C pendant 7 à 14 jours. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies témoigne de la dégradation de la caséine [169].

- Dégradation du tween 80 : Les isolats d'actinobactéries sont ensemencés en spots sur milieu contenant du tween 80. La lecture est effectuée après 7 et 14^{ème} jour d'incubation à 30 °C. L'apparition d'une auréole opaque autour des colonies est synonyme de dégradation du tween 80 par ces dernières [170].

- Dégradation de la chitine : La dégradation de la chitine est observée sur milieu chitine-agar préconisé par Hsu [171]. Une quantité de 4g de chitine est ajoutée au milieu. Le milieu est ensemencé et incubé à 30 °C pendant 7 jours. L'apparition d'une zone claire autour des colonies révèle une activité positive.

- Détermination de la température optimale de croissance : Les isolats d'actinobactéries sont ensemencés sur le milieu de culture ISP2 à raison de trois boîtes de Pétri par isolat pour chaque température d'incubation. La croissance est suivie pendant 21 jours d'incubation à 28, 30, 37, 45 et 55 °C [172].

- Croissance à différentes concentrations de NaCl : Les colonies d'actinobactéries sont ensemencées sur milieu d'ISP2 gélosé à différentes concentrations en NaCl (0, 1, 3, 10, 15 et 20% (m/v)). Les cultures sont incubées à 30 °C et la croissance est suivie par observation de croissance de colonies toutes les 24h [172].

- Détermination du pH optimum de croissance : Ce test est réalisé sur milieu ISP2 gélosé ajusté à différents pH (5.5; 6; 7; 7,2;8 et 9). Les isolats sont ensemencés et incubés à 30 °C. La croissance est observée et notée après 7 et 14 jours [172].

1.1.9.4. Etude des activités microbiennes d'intérêts biotechnologique chez les souches d'actinobactéries nouvellement isolées

***Mise en évidence des activités antibactériennes des souches isolées** : Les actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces* sont connues comme étant les plus productrices d'antibiotiques et l'un des objectifs de notre étude est de rechercher une souche performante productrice d'antibiotique. Ainsi, les stratégies de recherche de nouveaux antibiotiques passent, en premier lieu, par la mise en évidence des différentes activités sur milieu solide, ceci constitue un premier criblage. L'activité antibactérienne

des isolats d'actinobactéries est évaluée sur le milieu ISP2 (pour la croissance des actinobactéries), MH (pour la croissance des bactéries cibles) par la méthode de cylindre d'agar.

- Microorganismes cibles : Dans le cadre de la recherche de nouvelles souches d'actinobactéries productrices des métabolites antimicrobiens diffusibles, les isolats purifiés ont été testés pour leur activités antimicrobiennes contre dix types de microorganismes identifiés par un numéro ATCC (American Type Culture Collection), provenant du laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'Institut Pasteur d'Alger accrédité par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé).

Les isolats retenus sont testés pour leurs activités antibactériennes *vis-à-vis* des bactéries cibles suivantes : 02 bactéries Gram-négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25843) et 03 bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 49594) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

- Standardisation de l'inoculum bactérien : Après leurs revivifications, une culture de 18h dans des tubes de 5 mL de bouillon nutritif incubée à 37 °C a été réalisée pour chacune des bactéries cibles citées précédemment. La mesure de la densité optique de la suspension bactérienne à une longueur d'onde de 620 nm pour obtenir des DO = 0.8, déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini 1240) ceci est équivalent à une charge de l'inoculum de 10^7 UFC/mL [173]. Ces cultures sont considérées comme des solutions mères et puis une série de dilutions décimalesensemencées en surface chacune sur trois boîtes de milieu gélose Muller Hinton.

- Test d'activité antibactérienne par la méthode de cylindre de gélose : Afin de mettre en évidence les activités antimicrobiennes de nos souches d'actinobactéries isolées afin de déterminer leurs spectres d'activité, il est nécessaire de les cultiver sur différents milieux de culture puis de les mettre en contact avec les différents microorganismes cibles. Le test d'antagonisme (cylindre d'agar) contre les germes cibles permettra de mettre en évidence l'activité de ces souches.

Les souches d'actinobactéries ont été étalées de façon serrée à la surface du milieu gélosé ISP2 (formant un tapis homogène) après incubation à 30 °C. Des cylindres de gélose (sur

milieu ISP2) d'environ 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'un poinçon [174], puis déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures et les champignons, préalablement inoculés avec des microorganismes cibles (10^7 UFC/mL). Les boîtes de Pétri contenant les cylindres de gélose sont placées à +4 °C pendant 4h pour permettre la diffusion des substances bioactives, élaborées par les souches candidates, puis incubées pendant une durée spécifiée pour chaque souche cible. L'activité inhibitrice est exprimée par l'apparition d'une zone d'inhibition qui est évaluée après 18 à 24h d'incubation. Les souches présentant le plus large spectre d'activité contre les germes cibles testés ont donc été sélectionnées [175].

***Mise en évidence de l'activité antifongique :** Les isolats retenus sont testés pour leurs activités antifongique *vis-à-vis* des moisissures cibles suivantes : *Aspergillus carbonarius* (ATCC 5010) - *Aspergillus ochraceus* (ATCC3150) - *Mucor rammanianus* (ATTC 9628 NRRL) - *Fusarium culmorum* (ATCC 1824) et la levure *Candida albicans* (ATCC 10231).

- Standardisation de l'inoculum: Les suspensions des spores de moisissures de 10^7 /mL réalisées dans l'eau physiologique et dénombrées sur cellule de Thomas sont utilisées pour le test d'activité antifongique tandis que la standardisation pour la levure est effectuée comme déjà décrite pour les bactéries [173].

- Test d'activité antifongique : L'activité antifongique des isolats est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu Sabouraud gélosé selon Patel et Brown [176]. Ce test est réalisé de la même façon que pour le test précédent (activité antibactérienne), en utilisant des suspensions de spores (10^7 spores/mL) pour les moisissures [177] et une suspension chargée de 10^6 UFC/mL pour la levure [173]. Les boîtesensemencées sont incubées aux températures appropriées pour chaque germe cible et les zones d'inhibition ont été mesurées après 24h d'incubation pour la levure et 48h pour les moisissures à l'aide de pied à coulisse.

***Choix de meilleur milieu liquide pour la production des produits antimicrobiens :**

Dans le but de déterminer le milieu de culture qui donne une meilleure production des métabolites antimicrobiens en un temps optimal, nous avons comparé trois différents milieux de cultures à savoir ISP2, Bennett et AF.

La cinétique de production de substances antimicrobiennes par la souche codée AZ3 a été suivie sur les différents milieux de culture préparés dans des erlenmeyers de volume de 500 mL contenant chacun 100 mL de chaque milieu, puis le pH est ajusté à 7,2. Une préculture de chaque souche est préparée dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu ISP2 et incubée à 30 °C pendant 3 à 4 jours, sous une agitation de 150 rpm. Un volume de 5 mL de la préculture est utilisé pour inoculer 100 mL des différents milieux de cultures (ISP2, Bennett et AF). Les cultures ont été ensuite incubées dans un incubateur agitateur de 150 rpm à 30 °C pendant 14 jours.

Des prélèvements sont quotidiennement effectués à partir des trois meilleures cultures de chaque milieu. 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 qui sera utilisé pour la réalisation des activités antimicrobiennes.

L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode des puits contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Mucor ramanianus* (ATTC 9628) qui consiste à déposer 50 µL du surnageant de culture par puits sur des boîtes du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencées par les souches cibles. Les boîtes ont été maintenues à 4 °C pendant 4h pour permettre la diffusion des substances bioactives. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h. La lecture des résultats est faite par mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques.

1.1.9.5 Sélection des souches productrices de protéases

L'étude de l'activité protéolytique des actinobactéries isolées est effectuée dans un milieu sélectif contenant du lait écrémé (Milk Nutrient Agar) riche en caséine [178], comme substrat protéique utilisé pour démontrer l'activité protéolytique. Il est composé de 5 g de peptone, 3 g d'extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 mL d'eau distillée et le pH est ajusté à 7. Après stérilisation et refroidissement à 60 °C, 250 mL de lait écrémé sont ajoutés séparément. Après homogénéisation, le milieu est versé dans des boîtes de Pétri et incubé à 30 °C pendant 7 jours. Les boîtes de Pétri inoculées sont examinées toutes les 24h. L'activité protéolytique se manifeste par l'apparition d'un halo transparent dans le milieu qui indique la sécrétion de protéases par les souches et l'hydrolyse des protéines du lait (caséines). En fait, il s'agit d'un test semi-qualitatif qui est utilisé comme outil de screening [179]

1.1.9.6 Criblage des souches productrices de biosurfactants

Les isolats obtenus ont été testés et criblés pour leur production de substances tensioactives. Deux techniques ont été utilisées : le test de déplacement de pétrole et la mesure de l'activité hémolytique.

- Production de biosurfactants : La première étape consiste à utiliser le milieu ISP2 comme milieu de culture inoculé par un cylindre de mycélium fortement émoussé pour préparer la préculture. Cette expérience a été réalisée dans des flacons de 50 mL contenant 25 mL de milieu liquide ISP2 qui est incubé à 30 °C sous agitation à 150 rpm pendant 3 à 4 jours. La deuxième étape est la préparation du milieu de production de tensioactifs qui est réalisé dans des flacons de 250 mL en remplissant un volume de 25 mL de milieu MM (milieu de sel minéral), sa composition (g/L) : NH₄Cl (0,4), K₂HPO₄ (0,3), NaCl (10), MgCl₂ (0,33), CaCl₂ (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 mL d'une solution d'oligoéléments préparée dans 1L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 et stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min [180, 181]. Séparément, l'ajout d'un volume de 500 µL de source de carbone (huile d'olive, huile de table et huile brute) stérilisée par filtration sur membrane (0,45 µm). Le milieu de production de tensioactifs est inoculé avec 2% (v/v) de préculture. Après, trois jours d'incubation, le bouillon de culture est centrifugé à 7000 tr/min pendant 10 min afin d'éliminer la biomasse.

- Test de déplacement de pétrole (DDP) : Cette technique est rapide et fiable basée sur la capacité des biosurfactants à modifier l'angle de contact à l'interface huile-eau. Le test consiste à remplir des boîtes de Pétri avec 10 mL d'eau distillée, dans laquelle 20 µL d'huile brute (pétrole) ont été ajoutés, puis 10 µL de surnageant cellulaire (obtenu après centrifugation du bouillon de culture) sont soigneusement ajoutés au centre de la boîte. La production de tensioactifs de nos souches est révélée par mesure de diamètre de la zone claire formée sur l'huile brute, qui est corrélée avec la valeur du DDP (Figure 24). A partir d'un diamètre de 3 cm et plus, les souches sont considérées comme productrices de biosurfactants [181].

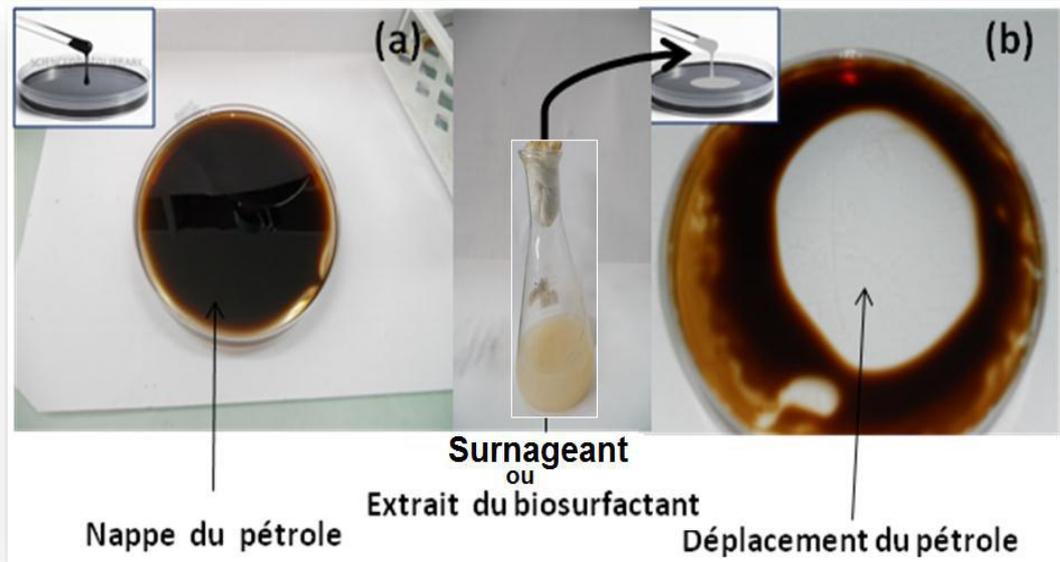


Figure 24 : Technique de diamètre de déplacement du pétrole (DDP)

(a): Etape 1: couche huileuse du pétrole. (b): Etape 2 : effet de l'ajout d'un biosurfactant sur la couche de pétrole (formation de zone claire).

- Activité hémolytique : Cette activité a été déterminée sur milieu gélose nutritif ou milieu LB solide. La composition est basée sur la dissolution de 28 g d'agar nutritif dans un litre d'eau stérile, fondu puis refroidi, puis ajouter 5 à 10% de sang humain stérile défibriné [182]. Agiter soigneusement pour éviter la formation de bulles d'air dans la gélose après l'avoir versé dans des boîtes de Pétri. Les colonies ont été pipetées sur la gélose au sang à l'aide d'une pipette stérile et incubées à 30 °C pendant 3 jours. Après incubation, la présence d'un halo transparent dans le milieu indique la présence de biosurfactants. Ceci est dû à la destruction des globules rouges libérant de l'hémoglobine dans le plasma sanguin [181].

1.2. Contributions à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche d'actinobactérie du genre *Streptomyces* codée AZ3

1.2.1 Etude de l'activité catabolique des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la souche AZ3

1.2.1.1 Analyses préliminaires des monoterpènes étudiées (menthol, thymol et cymène)

Des analyses préliminaires ont été réalisées afin d'évaluer la pureté chimique du métabolite étudié. Ces analyses ont été faites par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) de la marque SHIMADZU Nexis GC- 2030 couplé à un spectromètre de masse GCMS-QP2020 NX. L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales W11N17 (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, USA) ; FFNSC et Mass Finder 3 (DB3) (D.H. Hochmuth, www.massfinder.com), (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

Les conditions d'analyses sont les suivantes :

Injecteur : Température:250°C - Mode d'injection:Splitless (avec division)=1/90 - Volume injecté =1µL.

Colonne : Type:HP-5MS - Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane.

Température du four : 90°C pendant 5 min, 3°C/min jusqu'à 250°C, isotherme pendant 10 min.

Gaz vecteur : Nature : Hélium - Débit GV : 0.8ml/min

Détecteur de masse : Mode d'analyse : Scan TIC (m/z : 30 - 550) - Température de l'interface : 270 °C - Type d'ionisation : Impact électronique - Intensité du filament : 70 ev - Type de l'analyseur de masse : Quadripôles - Température de la source : 230 °C

1.2.1.2 Conditions de culture pour l'activité catabolique de menthol, thymol et cymène par AZ3

***Repiquage de la souche AZ3** : Cette souche AZ3 (retenue par rapport sa performance comme productrice de biomolécules) a fait l'objet des études de biotransformation des monoterpènes. Le repiquage est réalisé sur le milieu gélosé ISP2, puis incubée à 30 °C pendant 72h pour une croissance optimale.

***Préparation de préculture** : Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne, en prélevant 3 à 5 colonies identiques bien isolées à partir d'une culture bactérienne de 72h et les introduire dans un flacon de 250 mL contenant 50 mL du milieu ISP2 liquide stérilisé à l'autoclave, puis incubé à 30 °C sous une agitation de 150 rpm pendant 3 jour.

***Préparation de la solution mère du monoterpène :** L'opération s'effectue dans des conditions aseptiques ; dans un flacon stérile contenant un volume bien déterminé d'eau distillée stérile. Nous avons ajouté une quantité bien définie de monoterpène (menthol, cymène et thymol) de façon à avoir une concentration égale à 30 mg/mL [183]. Etant donné que les trois monoterpènes sont non miscibles avec l'eau, c'est pour cela qu'une quantité de 1% (v/v) de tween 80 a été ajoutée à la solution mère en vue d'obtenir un mélange homogène. La solution mère a été filtrée sous flamme, sur des microfiltres stériles de 0,45 µm.

***Détermination de la gamme des concentrations par le test d'inhibition en milieu solide :** Ce test consiste à déterminer l'effet inhibiteur de différentes concentrations du menthol, thymol et cymène à savoir (0,05 ;0,25 ;0,5 ;1,25 ;2,5 ;3 ;5 ;10 ;20 ;30 mg/mL) sur la croissance de la souche AZ3. La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (de 9 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité d'extrait et déposer sur la surface d'une gélose inoculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'extrait à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration. Les microorganismes poussent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'extrait suffisante pour inhiber leur croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « Zone d'inhibition ». La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre d'inhibition en mm plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'extrait. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [184].

- Préparation de la suspension bactérienne : Une quantité de 0.9 g de NaCl est dissoute dans 100 mL d'eau distillée. La solution ainsi préparée est autoclavée à 120 °C pendant 20 min, puis répartie dans des tubes à vis et fond plat à raison de 9 mL par tube. On stérilise à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. L'eau physiologique sert comme un diluant des suspensions bactériennes. A partir d'une culture pure de la souche AZ3 cultivée pendant 72h sur milieu ISP2, on racle à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, décharger complètement l'anse dans 5 à 10 mL d'eau physiologique stérile à 0,9%. Bien homogénéiser la suspension bactérienne dans des conditions stériles en utilisant un vortex. La suspension bactérienne ainsi obtenue peut être

ajustée en ajoutant, soit de la culture si elle est trop faible, soit de l'eau physiologique si elle est fortement concentrée.

- Préparation de la gamme de concentration : Une gamme de concentration du substrat étudié (menthol, thymol et cymène) a été préparée à partir de la solution mère de 30 mg/mL (0.05 ; 0.25 ; 0.5 ; 1.25 ; 2.5 ; 3 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 mg/mL). Le volume total de chaque flacon est de 50 mL. La mise en évidence des zones d'inhibition de croissance s'effectue selon les étapes suivantes : Le milieu ISP2 gélosé en surfusion a été coulé en boîtes de Pétri (20 mL par boîte), et laissé à refroidir préalablement à tout ensemencement. La gélose est frottée en stries serrées à l'aide d'un écouvillon stérile. Des disques de 8 mm sont imprégnés par la solution de monoterpène (à différentes concentrations) sont déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur la gélose (2 disques par boîte). Une boîte témoin est préparée afin de vérifier l'absence de contamination pendant l'ensemencement et deux répétitions pour chaque dilution ont été réalisées.

Après 4h de diffusion des solutions à +4 °C, les boîtes ensemencées sont incubées à une température 30 °C pendant 3 à 5 jours jusqu'à apparition d'une bonne croissance bactérienne. La lecture des résultats est faite à l'aide d'une observation visuelle de la croissance bactérienne *vis-à-vis* du substrat.

***Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice en milieu liquide :** Les différentes dilutions sont préparées à partir de la solution mère en distribuant les quantités décroissantes des substrats (monoterpène) à tester dans 10 tubes à hémolyse avec le milieu de culture liquide ISP2 (2 mL). On ajoute la même quantité de germes dans chaque tube. La gamme de concentration de chaque monoterpène s'étale comme suit : 30 ; 20 ; 10 ; 5 ; 3 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,5 ; 0,25 et 0,05 mg/mL. On prépare également un tube témoin de croissance de la souche AZ3 contenant le milieu ISP2 et 1 mL d'inoculum. Les tubes sont incubés dans un agitateur rotatif à 30 °C/150 rpm pendant 7 jours. [185].

Après incubation, on examine la croissance bactérienne dans chaque tube qui se traduit par la détermination de la biomasse de la souche AZ3. La CMI d'un substrat *vis-à-vis* d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations montrant aucune croissance visible de germe

1.2.1.3 Effet des conditions environnementales sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3

***Effet du pH :** L'effet du pH sur la biotransformation des monoterpènes a été étudié en ajustant le milieu de culture ISP2 par 0,1 M HCl ou 0,1 M NaOH afin d'avoir différentes valeurs de pH (4 ; 5,5 ; 6 ; 7,2 ; 8 ; 10 et 12). Les cultures ont été réalisées dans des Erlenmeyer de 250 mL par addition 50 mL de milieu ISP2 stérile avec un pH ajusté et une concentration fixée en substrat. Les milieux de culture ont été inoculés avec 2 mL de l'inoculum et incubés à 30 °C/72h, avec une agitation de 200 rpm.

Au 2^{ème} jour d'incubation des cultures de biotransformation (les expériences précédents), 50 mL de chaque culture liquide de la souche AZ3 ont été prélevés quotidiennement et centrifugés (Sigma 3-16 KL) à 7000 rpm pendant 20 min, le poids sec du mycélium (biomasse) a été évalué selon la méthode de Pfefferle et al. [186], comme suit : Après centrifugation des échantillons à 7000 rpm/20min ; le culot mycélien obtenu est lavé trois fois à l'eau distillée puis séché à 105 °C. Après, le poids sec du mycélium est déterminé par gravimétrie. [186].

***Effet de la température :** L'effet de la température sur la biotransformation des monoterpènes a été étudié dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de bouillon ISP2ensemencés à raison de 2% de l'inoculum puis incubés à différentes températures T =28, 30, 37, 40 et 45 °C pendant 7 jours avec une agitation de 200 rpm à pH=7.2. Le suivi de la cinétique de croissance selon l'effet de la température a été effectué comme le cas précédent (avec le pH).

1.2.1.4 Etude de l'effet de surfactants non ioniques sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3

L'effet du Tween 40, Tween 80 et Triton X-100 sur la biotransformation des monoterpènes étudiés est testé. Les surfactants ont été dissouts dans de l'eau distillée à raison de 0,2; 0,5; 1 et 2 % (v/v). Nous avons ajouté une concentration bien définie de monoterpènes avec des solutions de surfactants préparés et 2 mL de préculture puis incubés pendant 72h à 30 °C à 200 rpm et pH = 7.2. Le suivi de la cinétique de croissance selon l'effet de de surfactants a été effectué comme le cas précédent (avec le pH).

1.2.2 Mise en évidence des produits issus de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par AZ3 après une croissance optimale

***Procédure de la biotransformation en condition optimales de croissance :** La culture bactérienne a été effectuée dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 200 mL milieu ISP2 liquide en ajoutant 1% (v/v) de préculture de la souche AZ3. Le milieu de culture a été incubé dans un agitateur rotatif à 30 °C/200 rpm à pH= 8 pendant 6 jours au cours de laquelle une bonne croissance bactérienne a lieu. Après 6 jours, la biotransformation a été initiée par l'addition directe de substrats sous forme d'une solution mère à une concentration de 30 mg/mL ajoutés dans des conditions stériles (préparée par dissolution une quantité bien définie de substrat dans un mélange tween/eau à 1%). La solution mère a été stérilisée par filtration sur des filtres poreux stériles de 0.22 µm pour obtenir un volume final de 50 mL à une concentration de 0,25 mg/mL de menthol, 0,25 mg/mL de thymol et 0,5 mg /mL cymène.

Les flacons ont été scellés avec du coton cardé et placés dans un agitateur rotatif à 30 °C/150 rpm pendant 6 jours. Le suivi de la cinétique de la biotransformation est assuré en deux points (1^{ère} et 7^{ème} jour).

Simultanément, une expérience de témoin chimique a été réalisée sans microorganisme en ajoutant le substrat directement dans le bouillon stérile; et un témoin biologique a été réalisé en ajoutant la souche avec le milieu de culture stérile sans substrat. Les cultures ont été placées dans un incubateur agitateur à 30 °C/200 rpm pendant 6 jours

***Extraction liquide- liquide des métabolites :** La procédure d'extraction des produits de biotransformation des monoterpènes étudiés (menthol, thymol et cymène) par la souche AZ3 nouvellement isolée à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii* est décrite par les étapes suivantes :

- Centrifugation à 6000 tr.min⁻¹ pendant 30 min à deux reprises pour l'élimination de la biomasse (cellules bactériennes) ;
- Récupération de surnageant afin de subir une extraction deux fois consécutives par de l'éther di éthylique (v/v) ;
- Séchage des phases organiques sur du sulfate de sodium anhydre (NaSO₄), puis filtration de ces dernières en utilisant du papier wattman ;
- Distillation les phases organiques à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C pour éliminer le solvant ;

- Les extraits sec obtenus sont de couleur marron-jaunâtre;
- Diluer le mélange de produits final dans l'acétate d'éthyle.

***Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de**

Masse (CG/SM) : L'analyse CG/SM a été réalisée sur un chromatographie 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 30m x 0,25mmID x 0,25µm), 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 de 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 70eV et une gamme de masse de m/z 40-500. Un volume d'échantillon dilué dans l'acétate d'éthyle a été injecté.

La caractérisation des différents composés ou métabolites issus de la biotransformation a été réalisée à partir des bases de données suivantes : W11N17 (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, USA) ; 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-alcanes 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 (LRICAL) ont été comparées à celles fournies par la littérature (LRILit). Une identification supplémentaire a été réalisée sur la base des spectres de masse rapportés par la littérature spécialisée.

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et les discussions de deux parties de notre travail expérimental, relatifs à l'étude des propriétés biotechnologiques des souches d'actinobactéries marines isolées à partir d'une algue brune *Zonaria tournefortii* (mise en évidence de leurs activités microbiennes, production de protéases et biosurfactants). La deuxième partie concerne une contribution à l'étude de la biotransformation des trois monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par une souche d'actinobactéries choisie comme performante.

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.1 Isolement et identification d'actinobactéries marines à partir d'une algue brune *Zonaria tournefortii*

2.1.1. Caractéristiques physico-chimiques du site d'isolement des actinobactéries

Nous avons constaté que l'eau de mer se caractérise par un pH neutre ou légèrement alcalin allant de 7,58 à 8,23. Des faibles variations de pH peuvent avoir des effets particuliers sur la productivité d'une souche bactérienne. Le pH joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires par différentes actinobactéries [187].

Il est important de mesurer la température de l'eau de mer avec une bonne précision parce qu'elle joue un rôle dans la solubilité des sels et des gaz. Ceci pour connaître la température à laquelle vivent les microorganismes isolés à partir de ce biotope. Une température de 27 °C a été mesurée qui constitue une température de saison.

2.1.2. Isolement et choix des isolats d'actinobactéries

Suite aux différents traitements appliqués aux échantillons utilisés pour l'isolement par les trois méthodes décrites précédemment, nous avons pu isoler et purifier 07 isolats d'actinomycètes (actinobactéries) marines présentant des morphologies variables mais sont caractéristiques des actinobactéries (Figure 25).

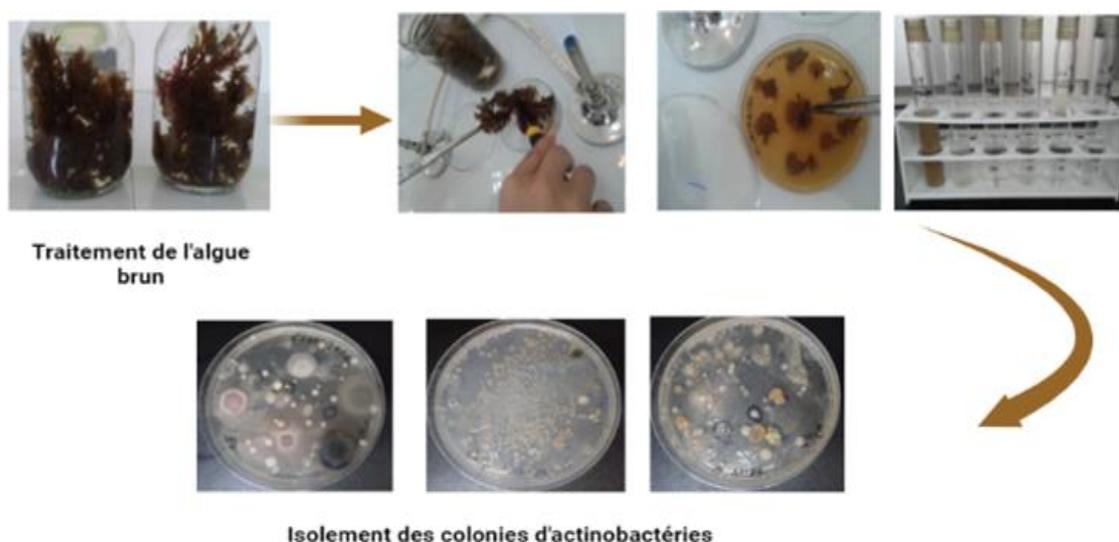


Figure 25: Les différentes étapes de l'isolement des actinobactéries afin d'obtenir des colonies bien isolées sur gélose ISP2

Le protocole de l'isolement ciblé est une stratégie très utilisée dans plusieurs laboratoires, elle permet un isolement sélectif de genres précis. Elle est également employée afin d'évaluer la biodiversité d'un échantillon quelconque en microflore. Il est à signaler, que l'algue complète (la partie surface d'algue, la partie profondeur et les racines) est plus peuplée par les actinobactéries.

Les colonies d'actinomycètes apparaissent après 15 à 30 jours d'incubation sur les milieux sélectifs d'isolement utilisés dans notre cas. Ces colonies sont reconnaissables par leur aspect macroscopique (colonies dures et incrustées dans la gélose) et microscopique (aspects filamenteux ramifiés avec des tailles différentes) de forme variable (lisse, bombée, aplatie...etc.), possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (grise, blanche, marron...etc.). Ces colonies d'actinobactéries sont reconnues par leur aspect morphologique caractéristique, elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhèrent à la gélose et présentent un mycélium végétatif du substrat (MS) et mycélium aérien (MA), certaines montrent seulement un mycélium du substrat [188].

A partir des milieux sélectifs utilisés additionnés d'antifongiques (50 µg/mL) des colonies d'actinomycètes ont été prélevées, elles sont repérées d'après leur aspect macroscopique et leur aspect microscopique.

Dans notre travail nous avons isolé 03 souches à partir du milieu M2 et 03 souches à partir du milieu ISP2 et 01 souches à partir du milieu M4 et aucun isolat n'est obtenu sur les autres milieux.

La répartition des isolats selon les milieux est représentée dans la figure 26.

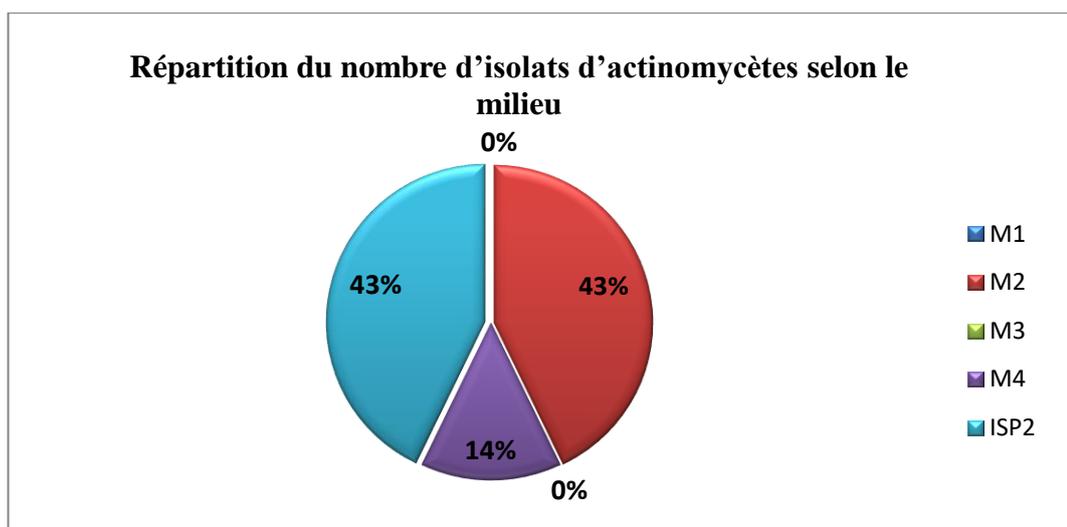


Figure 26 : Répartition du nombre d'isolats d'actinomycètes selon le milieu de culture utilisé

Les avis concernant l'utilisation des antibiotiques sont cependant controversés. Selon Porter et al. [189] la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. L'addition de l'acide nalidixique a permis l'élimination des bactéries à Gram négatif, il a été utilisé dans les travaux de Takizaw et al. [190] pour l'isolement des actinomycètes à partir des milieux marins, ont trouvé que les actinomycètes peuvent résister à l'acide nalidixique jusqu'à une concentration de 10 µg/mL, au-delà, la croissance de certains genres peut être diminuée.

Le problème délicat lors de l'isolement d'actinobactéries reste le développement des bactéries envahissantes à Gram positif comme les bactéries du genre *Bacillus* qui forment des plages rendant toute observation et purification difficile, voire, impossible. L'addition d'antibiotique anti-Gram positif permet de réduire de façon considérable le nombre de ces bactéries, mais ces antibiotiques ne sont pas sans effets sur les actinomycètes qui appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif [191].

Ces résultats font ressortir que le milieu M2 et ISP2 semble être les meilleurs milieux d'isolement des actinobactéries comme obtenu dans notre cas.

Des différentes procédures de prétraitement et d'utilisation de milieux d'isolement sélectifs sont recommandées pour l'isolement de nouvelles actinobactéries. Il n'existe pas de techniques universelles d'isolement mais il faut toujours varier les méthodes et les milieux dans un même screening, afin de réussir l'isolement au maximum la flore d'actinomycètes qui compose l'échantillon étudié [192]. C'est la raison pour laquelle que nous avons utilisé trois méthodes d'isolement afin d'augmenter la chance d'obtenir des actinobactéries marines.

Après deux à trois jours d'incubation, des colonies jeunes sont obtenues présentant un aspect typique d'actinobactéries. Ces colonies de formes rondes, sèches de couleur beige clair à brun correspondant à la formation du mycélium de substrat. Celui-ci est apparu dans les premiers stades de la croissance et s'est développé sur la gélose puis s'est enfoncé radicalement dans le milieu. Ce mycélium peut être aussi observé sur le dos des colonies lorsque le milieu est transparent. Entre le 4^{ème} et le 21^{ème} jour d'incubation les colonies prennent un aspect poudreux de couleur blanche à grise dans un premier temps, c'est le mycélium aérien. Ce dernier continue de se développer adoptant progressivement des couleurs variés, ce changement correspond à la formation des spores sur les extrémités des hyphes aériens [192].

Les colonies présentant cet aspect typique ont été repiquées et purifiées sur milieu ISP2 qui constitue le milieu de référence pour la culture des actinobactéries et permettra une bonne sporulation.

Les sept isolats obtenus ont été retenus pour la suite des expériences, un code composé de chiffres et de lettres a été attribué pour chacun d'entre eux.

2.1.3. Classification préliminaire des souches d'actinobactéries isolées

Afin de mettre en place une collection de souches bactériennes marines à fort potentiel biotechnologique, nous avons opté à cette approche proposée dans cette partie de thèse. Elle permet d'offrir les informations d'orientation pour une étude taxonomique préliminaire des souches d'actinomycètes isolées à partir de l'algue *Zonaria tournefortii* en

utilisant des méthodes conventionnelles qui font appel aux caractères d'identification classique.

2.1.3.1. Etude morphologiques des souches d'actinomycètes obtenues

Les analyses morphologiques sont importantes en taxonomie microbienne, elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives vu que les critères morphologiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables.

Cinq milieux de cultures (ISP1 - ISP2 - ISP3 - ISP4 - ISP5) sont généralement utilisés pour l'étude morphologique des actinobactéries notamment pour le genre *Streptomyces* [160].

Une étude des caractères cultureux des souches d'actinobactéries isolées, qui permet une orientation préliminaire pour la caractérisation, a été effectuée sur la base des observations macroscopiques *via* la détermination des caractéristiques morphologiques des souches. L'analyse discriminante des différents caractères morphologiques observés est présentée dans le tableau 1.10.

D'une manière générale, les colonies obtenues sont généralement irrégulières et rondes avec une couleur, jaune, brun, blanc, Gris, et orange. Leur consistance est généralement lisse, poudreuse avec taille des spores grande a petite.

Les caractéristiques macromorphologiques sont données dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9 : Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats sur milieux ISP solide

Caractéristiques des isolats		Milieu ISP1	Milieu ISP2	Milieu ISP3	Milieu ISP4	Milieu ISP5
Couleur du MA	AR1	Brun jaunâtre	Brun jaunâtre	Brun jaunâtre clair grisâtre	Jaune grisâtre	Brun jaunâtre clair grisâtre
	AR2	Brun jaunâtre	Gris clair	Jaune brun grisâtre	Brun rougeâtre profond	Jaune grisâtre
	K1	Blanc jaunâtre	Jaune pale	Jaune pale	Blanc jaunâtre	Blanc jaunâtre
	AZ3	Jaune orangé vif	Gris foncé	Gris foncé	Vert grisâtre	Rouge grisâtre
	AZ4	Vert grisâtre	Blanc jaunâtre	Jaune pale	Jaune verdâtre	Vert grisâtre
	AZ9	Jaune pale	Blanc jaunâtre	Jaune pale	Jaune verdâtre	Vert grisâtre
	AZ10	Orange brillant	Orange brillant	Orange	Jaune orangé clair	Rose jaunâtre
Couleur du MS	AR1	Jaune pale	Brun jaunâtre	Blanc jaunâtre	Jaune pale	Brun jaunâtre
	AR2	clair grisâtre	Brun rougeâtre Claire	Brun rougeâtre	Rouge violacé foncé	Jaune grisâtre
	K1	Jaune pale	Blanc jaunâtre	Jaune claire	Blanc	Blanc jaunâtre
	AZ3	Gris claire	Brun rougeâtre Claire	Brun jaunâtre	Jaune grisâtre	Brun jaunâtre
	AZ4	Jaune verdâtre	Jaune pale	Jaune brun	Vert grisâtre	Jaune verdâtre
	AZ9	Jaune verdâtre	Jaune brun	Jaune pale	Brun jaunâtre	Jaune brun

Tableau 9 : Suite

Milieux	Milieu ISP1	Milieu ISP2	Milieu ISP3	Milieu ISP4	Milieu ISP5	
Pigmentation	AR1	Jaune vif	Jaune vif	Jaune vif	Jaune vif	Jaune vif
	AR2	-	Brun rougeâtre	-	-	Gris rougeâtre
	K1	-	Jaune pale	-	Jaune	-
	AZ3	Violet rougeâtre	Gris rougeâtre	-	-	-
	AZ4	-	Jaune clair	-	Jaune clair	Jaune clair
	AZ9	Jaune brun grisâtre	Jaune verdâtre	-	-	Jaune
	AZ10	-	-	-	-	-

Tableau 10: Caractéristiques macromorphologiques des souches bactériennes isolées de *Zonaria tournefortii*

Souches	Elévation	Contour	Forme	Taille des spores	Aspect de surface
AR1	plate	Régulier	Ronde	Petite	Rugueuse, poudre
AR2	Bombée	Ondulé	Filamenteux	Grande	Rugueuse, poudre
K1	plate	Régulier	Ronde	petite	Rugueuse, Poudre
AZ3	Bombée	Ondulé	Filamenteux	Grande	Rugueuse, Poudre
AZ4	Bombée	Irrégulier	Irrégulière	Moyenne	Rugueuse, poudre
AZ9	Bombée	Irrégulier	Irrégulière	Moyenne	Rugueuse, poudre
AZ10	Bombée	Régulier	Irrégulière	petite	lisse

Tableau 10 : suite

Caractéristique des isolats	Milieu ISP1	Milieu ISP2	Milieu ISP3	Milieu ISP4	Milieu ISP5	
La croissance	AR1	+	+++	++	+	+
	AR2	++	+++	+	++	++
	K1	+	+++	+	+	++
	AZ3	++	+++	+++	++	+
	AZ4	+	+++	+	+	++
	AZ9	++	+++	+++	+	+
	AZ10	-	++	+	-	-
Sporulation	AR1	++	+++	++	+	+
	AR2	+	+++	+	-	-
	K1	-	+++	+	-	+
	AZ3	+	+++	++	+	+
	AZ4	-	+++	-	++	++
	AZ9	+	++	+	+	-
	AZ10	-	++	-	-	-

(-) absence ; (+) faible ; (++) moyenne ; (+++) bonne

D'après les résultats présentés sur les tableaux 09 et 10, nous pouvons déduire que les isolats AZ3, AR2, AZ9, K1 et AZ4 présentent une croissance et une sporulation abondantes sur les milieux ISP3 et ISP4 et une croissance modérée pour AR1 et AZ10. La croissance est aussi abondante sur ISP5 mais avec un mycélium aérien peu développé ; elle est par contre bonne sur ISP2. La croissance de AZ10 sur les milieux ISP1, ISP3, ISP4 et ISP5 est mauvaise et se traduit par une absence totale de sporulation sur ces milieux ainsi que la même chose pour AZ3, AR2, AR1, AZ9, K1 et AZ4 sur milieu ISP1.

Les mycéliums aériens présentent une variété de couleur dont les couleurs prédominantes sont pour les séries jaune, blanc et gris tandis que les mycéliums du substrat sont généralement plus clair blanc-jaunâtre et jaune-clair à l'exception pour quelques isolats dont le mycélium de substrat est vivement coloré allant du gris rougeâtre à gris foncé. La plupart des isolats produisent un pigment (diffusible ou non) sur au moins l'un des milieux utilisés, exception pour AZ10. Les isolats AR1 et K1 produisent un pigment jaune vif diffusible dans la gélose. AZ3 et AR2 produisent un pigment brun et gris rougeâtre profond diffusible dans le milieu (sur milieu ISP2). Chez AZ9 la couleur du pigment passe au jaune verdâtre sur ISP4 et pour AZ4 produit un pigment jaune.

Comme le montre le Tableau 10, les isolats AZ3 et AR2 ont une forme filamenteuse et une grosse spore avec une surface poudreuse et elles se développent en colonies détachables. Le mycélium du substrat est abondant, bien développé avec des centres blancs et des côtés gris. Pour AZ4 a une spore de taille moyenne avec une surface rugueuse poudre. Les colonies des isolats AR1 et K1 sont de forme ronde avec une surface rugueuse poudre (AR1) et la taille des colonies est petite. Les colonies de l'isolat AZ10 sont de forme irrégulière, la surface est lisse et les spores sont de petite taille. L'isolat AZ9 est caractérisé par des spores de taille moyenne avec une surface rugueuse poudre et ressemble morphologiquement à la souche AZ4.

L'observation au microscope optique ($\times 40$ et $\times 100$) des isolats après une incubation de 14 jours à 30 °C sur milieu ISP2 révèle que tous développent un mycélium du substrat (sauf AZ10), ce dernier se présente sous forme de longs filaments ramifiés. Six souches ont la micromorphologie typique du genre *Streptomyces* et une souche ressemble morphologiquement au *Rhodococcus* en se basant sur les critères décrite par le bergy's manual of systematic bacteriology. La souche AR2 est similaire à la souche AZ3 (série grise de *Streptomyces*, type S = "Spira" avec des chaînes de spores en spirale) concernant le MS, la souche K1 est très similaire à la souche AZ9 et un peu aussi à la souche AZ4 (*Streptomyces* de la série jaune, type RF = "Rectus Flexibilis", avec des chaînes de spores droites à flexibles). La souche AR1 a un MA avec des filaments ramifiés qui se fragmentent totalement en une longue chaîne de spores (chaîne de spores

en forme de tige (*Streptomyces* de la série blanche, type S = "Spira" avec des chaînes de spores en forme de spores allongées, longues et ouvertes (Figure 27).

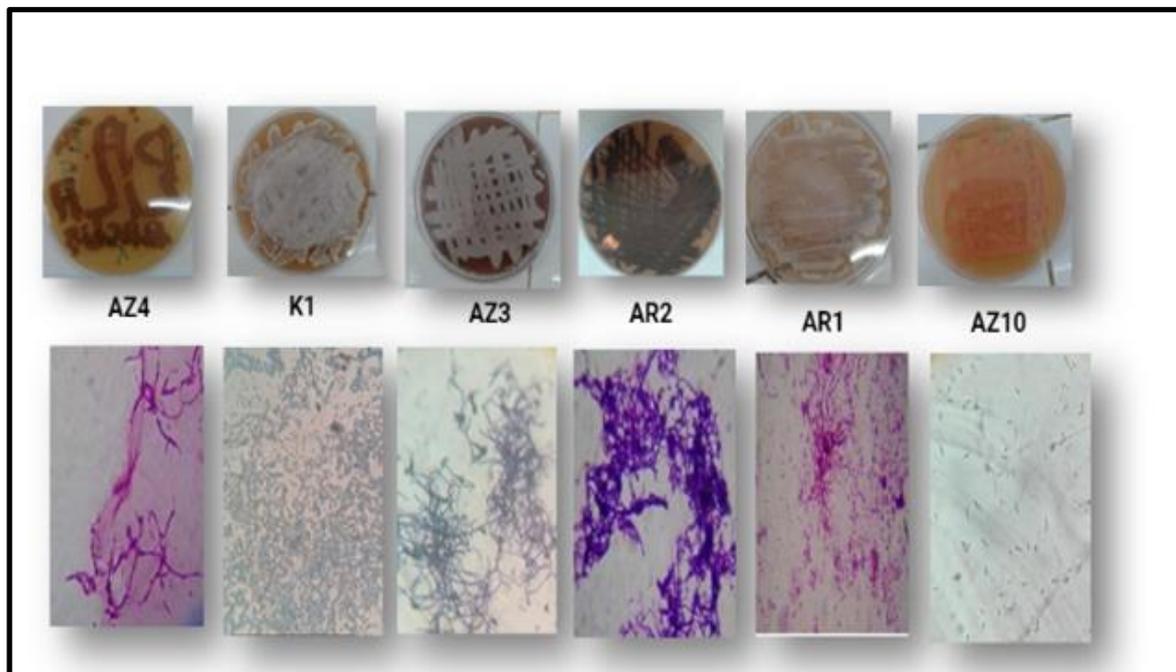


Figure 27: Macro et micromorphologie des actinobactéries obtenues. En haut : Mycélium aérien (MA). En bas : Observation microscopique après la coloration de Gram ($\times 100$). AZ9 n'est pas présentée car elle est morphologiquement identique à la souche K1

2.1.3.2. Étude physiologique et biochimiques des isolats obtenus

Le Tableau 11 illustre les résultats des tests physiologiques réalisés pour les sept isolats dont certaines spécificités physiologiques sont notées.

Tableau 11: Les caractères physiologiques des isolats obtenus

Croissance en présence de NaCl	AR1	AR2	AZ3	AZ4	AZ9	K1	AZ10
0%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1%	+++	+++	+++	++	++	++	++
3%	++	++	++	+	+	+	-
10%	+/-	-	+/-	-	-	-	-
20%	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à							
pH5.5	-	-	-	-	-	-	-
pH6	++/-	++/-	++/-	++	++	+/-	+
pH7-7.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH8	++	++	++	+++	++	++	++
pH9	+	+	+	+	+	+	+
croissance à							
28°C	++	+++	++	+++	++	++	+
30°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37°C	++/-	++/-	++/-	+/-	++/-	++/-	++
40°C	+	+	+	-	-	-	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-
Dégradation de:							
La caséine de lait	+	+	+	+	+	+	-
La chitine	+	+	+	+	+	+	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	+	+	+	+	+	+	-
Production de:							

Pigments mélanoides en ISP7	-	+	+	-	+	-	-
Test de :							
Catalase	+	-	+	+	+	-	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol- mobilité	mobile	mobile	mobile	mobile	mobile	immobil e	mobile
Type respiratoire	Aérobie stricts	Aérobie stricts	Aérobie stricts	Aérobie stricts	Aérobie stricts	Aérobie stricts	Aérobie Facultatif

+++ : Bonne croissance ; ++ : moyenne ; + : faible ; +/- : croissance mais absence de sporulation

***Croissance en présence de NaCl :** Ces isolats sont capables de se développer à des concentrations faibles et/ou négligeables en NaCl dont les sept isolats présentent une croissance optimale en absence total de NaCl. A 1% nous avons remarqué une croissance moyenne pour les isolats AZ4; AZ9; K1 et AZ10 et une bonne croissance pour AR1; AR2 et AZ3. Une croissance très faible est observée à 3% pour tous les isolats et pas de croissance pour la souche AZ10.

Sur des concentrations allant de 5 jusqu'à 20%, les sept isolats n'ont pas pu croître (sauf AZ3 et AR1 qui se développe faiblement à 10%).

Tang et al. [193, 194] ont classé les actinomycètes selon leur aptitude à croître en présence de NaCl en plusieurs classes. Sur la base de cette classification, les isolats AR1, AR2 et AZ3 pourraient appartenir aux Actinomycètes faiblement halophiles, tandis que les autres isolats appartiendraient au groupe des Actinomycètes non halophiles. Par ailleurs, les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées mais non obligatoires de sels pour leur croissance.

***Croissance à différents pH :** Selon les résultats de la croissance de nos isolats d'actinobactéries à des différentes valeurs de pH (pH acide, pH neutre et pH alcalin).

Nous pouvons dire que tous les isolats préfèrent un pH neutre à légèrement basique compris entre 6,6 à 8. Les sept isolats sont neutrophiles qui n'ont pu pousser que sur le pH de milieu d'isolement (pH =7-7.5).

Plusieurs travaux sont en accord, une cellulase à partir de *Streptomyces alcaliphiles* sp. Souche S36-2 active dans une plage de pH de 8 à 9 a été décrite par Singh et al. [195]. D'après les résultats obtenus dans une étude réalisée par Hachana [196], qu'a trouvé que des souches de *Streptomyces* montrent une bonne croissance dans une plage de pH allant de 7 à 9. D'après les études réalisées par Boughachiche et al. [197], ayant constaté que les actinomycètes sont capables de survivre dans une plage de pH allant de 7 à 10. De plus, les résultats obtenus par Nam et al. [198] qui suggèrent que les actinomycètes ont généralement une bonne croissance dans des milieux présentant un pH alcalin.

***Détermination de la T °C optimale de croissance :** Selon les résultats obtenus (Tableau 11), nous avons noté une meilleure croissance à 30 °C, qui se traduit par un développement plus important du MA, tandis qu'elle est moyenne à 28 et 37 °C avec une production de pigments solubles à cette dernière température. Nous avons constaté que la croissance commence à diminuer à 40 °C avec une absence du MA, puis une absence totale de développement à partir de 45 °C.

Non résultats montrent que les souches d'actinomycètes peuvent présenter une certaine variabilité dans leur tolérance à la température, en fonction de leur environnement d'origine. Selon Salaria [199], la température optimale pour la croissance des isolats d'actinomycètes variait de 25 à 30 °C. Cela signifie que ces souches se développaient le mieux dans cette plage de température spécifique. D'autre part, Gopalakrishnan [200], A signalé que la température plus large, allant de 20 à 37 °C. Cela indique une certaine plasticité thermique parmi les souches étudiées. Cependant, Messaoudi [201] a observé que la température optimale de croissance des isolats d'actinomycètes était plus élevée, dans l'intervalle de 40 à 45 °C. Cela suggère que certaines souches d'actinomycètes peuvent être adaptées à des environnements plus chauds.

En résumé, les souches d'actinomycètes peuvent présenter des capacités de tolérance à la température différente en fonction de leur environnement d'origine. Certaines

souches préfèrent des températures plus modérées, tandis que d'autres sont adaptées à des environnements plus chauds.

***Production de pigments mélanoides :** Les souches AR2 et AZ3 secrètent un pigment brun noir qui est la mélanine, la production des pigments mélanoides est une caractéristique très importante pour les actinobactéries, considérée comme une clé pour la classification des *Streptomyces*. Selon Margalith [202], la biosynthèse de la mélanine se fait par la voie de Raper-Mason avec la tyrosine comme substrat car la tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en dihydroxyphénylalanine et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation le produit final est l'acide 5,6-dihydroxyindol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur brun-noir. L'isolat AZ9 produit un pigment jaune sur le milieu ISP7 tandis que les autres isolats ne produisent pas de pigments mélanoides.

***Etude biochimique :** En ce qui concerne les caractéristiques biochimiques, à l'exception de l'isolat AZ10, toutes les souches sont positives à l'oxydase. Les souches AR1, AZ3, AZ9, AZ4 et AZ10 sont catalase-positives tandis que AR2 et K1 sont catalase-négatives. La souche K1 est immobile, alors que les autres souches sont mobiles. L'étude de type respiratoire sur gélose viande-foie a révélé que toutes les souches sont strictement aérobies. Toutes ces souches ont montré l'aptitude à dégrader l'amidon, la caséine au lait, tween 80 et la chitine, sauf pour la souche AZ10 où uniquement le tween 80 qui a été dégradé.

2.2 Etude des propriétés biotechnologiques des souches d'actinobactéries marines isolées à partir d'une algue brune *Zonaria tournefortii*

2.2.1 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Il a été estimé que sur un million de produits naturels rapportés, plus de 50000 sont d'origine microbienne [4]. Environ la moitié d'entre eux ont été associés avec un certain niveau d'activité cellulaire ou moléculaire et, par conséquent, sont communément appelés « composés bioactifs ». Outre les agents antimicrobiennes, les *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires possédant des structures

chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien.

Nous avons testé l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes obtenus par la technique des cylindres d'agar, afin de sélectionner les isolats les plus producteurs de substance(s) antimicrobienne(s). La bioactivité des isolats étaient dissemblables entre des souches bactériennes Gram positif et Gram négatif.

Les résultats obtenus sont donnés sous forme des figures présentées ci-dessous.

2.2.1.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries contre des bactéries pathogènes à Gram positif

***Activité antibactérienne d'isolats d'actinobactéries contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)** : Dans notre étude, six isolats d'actinobactéries parmi les sept testés se sont avérés producteurs de substances anti *S. aureus*, plus particulièrement l'isolat AZ3 qui possède l'activité la plus importante avec un diamètre de zone d'inhibition de 40 mm (Figure 28).

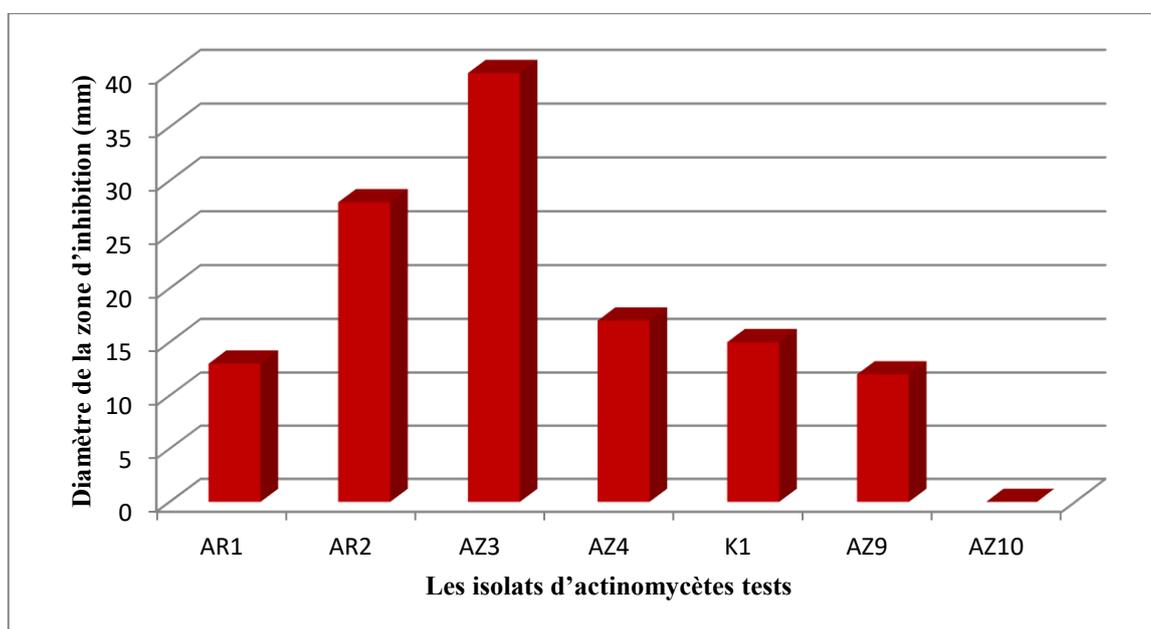


Figure 28: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)

Les staphylocoques sont parmi les agents pathogènes les plus couramment rencontrés dans la pratique clinique. *S. aureus* est une cause majeure d'infections nosocomiales d'intoxication alimentaire, d'ostéomyélite, d'endocardite, de syndrome de choc toxique

et d'un large éventail d'autres troubles [203]. Il y a eu une augmentation alarmante des infections nosocomiales par des souches de staphylocoques résistants à plusieurs antibiotiques [204]. De ce fait, la nécessité de la recherche de nouvelles molécules pour lutter contre ce germe est devenue une préoccupation d'urgence.

***Activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)** : L'espèce *B. subtilis* est un germe connu pour sa sensibilité lors des tests d'antibiogramme, dans notre cas cinq isolats ont montré une activité contre ce germe, avec des zones d'inhibition de 26, 35, 14, 14 et 14 mm respectivement pour AR2, AZ3, AZ4, K1 et AZ9 (Figure 29).

Dans l'étude réalisée par Valli et al. [205], des espèces de *Streptomyces* marines ont montré une bonne activité antimicrobienne contre *B. subtilis*.

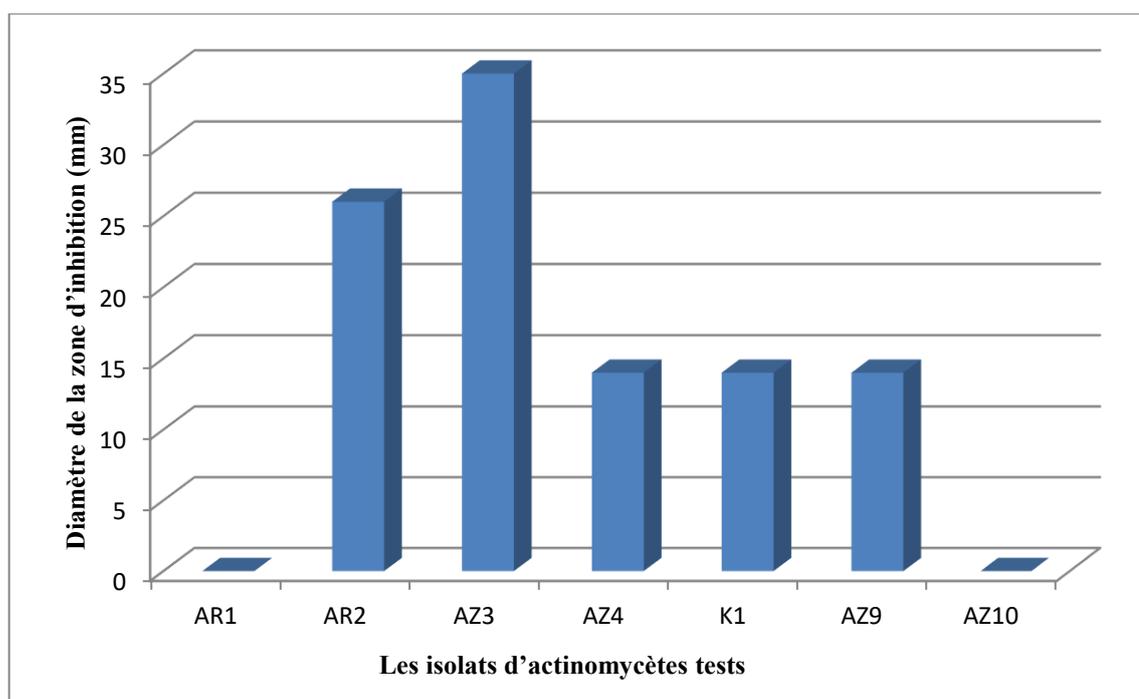


Figure 29: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Bacillus subtilis* (ATCC6633).

***Activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 49594)** : La seule espèce de *Listeria* qui soit pathogène pour l'homme est *L. monocytogenes*, qui cause la listériose. Elle peut traverser la barrière

intestinale et la barrière placentaire, pouvant alors provoquer des infections éventuellement mortelles de fœtus, du nouveau-né, ou des accouchements prématurés.

Deux (02) isolats sont avérés actifs *vis-à-vis* cette souche (Figure 30), parmi eux l'isolat AZ3 montre une zone d'inhibition maximale de 28 mm. Peu d'études ont été rapportées sur l'activité *anti-Listeria* par les souches d'actinomycètes marines et parmi ces dernières on peut citer celle de Kennedy [206].

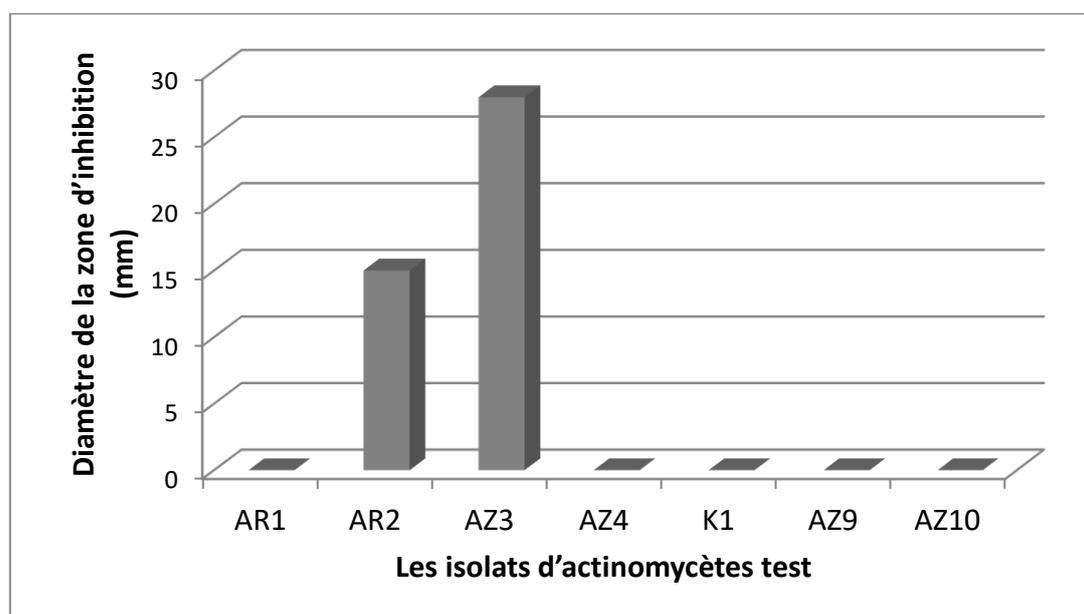


Figure 30: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Listeria monocytogenes*. (ATCC49594)

2.2.1.2 Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries contre des bactéries pathogènes à Gram négatif

Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Escherichia coli

(ATCC 25922) : *Escherichia coli*, est une bactérie intestinale des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80% de la flore intestinale aéro-anaérobies facultatives. C'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. Coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites...etc.

Aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée des sept isolats d'actinomycètes testés contre *Escherichia coli* (ATCC 25922).

***Activité antibactérienne d'isolats d'actinomycètes contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25843)** : *Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène important associé à des infections nosocomiales graves telles que la pneumonie et la septicémie. Il est également associé à plusieurs mécanismes de résistance à divers agents antimicrobiens. Le traitement des infections dues au *Pseudomonas* présente souvent un défi pour les cliniciens et la thérapie de combinaison est couramment utilisée pour prévenir l'apparition de la résistance [207].

L'activité antibactérienne a été faiblement enregistrée avec deux isolats; l'isolat (K1) qui donne une zone d'inhibition moyenne de 14 mm mais une faible activité avec une zone de 12 mm pour l'isolat AZ10 (Figure 31).

Selon Kokare et al. [208], au cours de la recherche de nouveaux métabolites secondaires, les souches marines d'actinomycètes isolées ont montré également une activité significative contre *P. aeruginosa*.

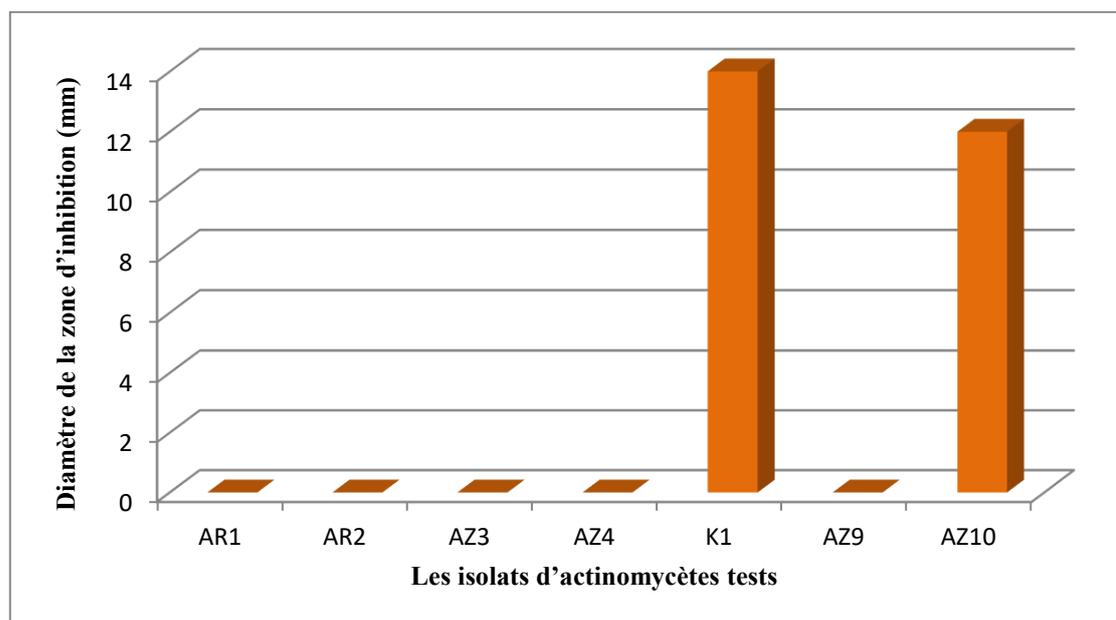


Figure 31: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25843)

La majorité des actinomycètes isolés au cours de ce travail (07 isolats) ont montré une activité antimicrobienne contre au moins une bactérie cible. En effet, plusieurs travaux antérieurs ont corroboré le pouvoir antibactérien remarquable de ces bactéries [163].

Les résultats des tests d'activité antimicrobienne obtenus montrent que la majorité d'isolats d'actinobactéries (AR1, AR2, AZ3, AZ4, K1 et AZ9) sont actifs sur la totalité des souches cibles à Gram positif (*S. aureus*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes*) alors, que deux isolats seulement (AZ10 et K1) sont sensibles à une bactérie à Gram négatif (*P. aeruginosa*). Cela, peut-être attribué à la différence de la composition de la paroi qui existe entre les deux types de bactériens (Gram positif et Gram négatif). En effet, les bactéries Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de nature lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries de coloration de Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace [209].

2.2.2 Mise en évidence de l'activité antifongique

Activité antifongique d'isolats d'actinobactéries contre *Aspergillus : L'ensemble des résultats des tests d'activité antifongique d'isolats testés sur milieu solide sont présentés dans la figure 32.

Les *Aspergillus* sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire et en biotechnologie, néanmoins certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes. Les mycoses provoquées par *Aspergillus* sont appelées des aspergilloses. Certaines espèces peuvent produire des mycotoxines comme les aflatoxines ou l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*).

Dans ce test, quatre isolats ont montré des activités anti-*Aspergillus*, les isolats actifs sont ceux ayant une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et qui semble produire des molécules différentes ou ayant des effets doubles (antibactérien et antifongique). Les zones d'inhibition obtenues sont moyennes à faibles. Avec AZ4 (14 mm et 17 mm contre *As. carbonarius* (ATCC 5010) et *As. ochraceus* (ATCC 3150), respectivement) et avec AZ9 (17 mm contre *As. Ochraceus*). Avec K1 et AZ10 (12 mm et 17 mm respectivement contre *As. Carbonarius*. Alors qu'aucune activité antifongique n'a été enregistrée pour les isolats AR1, AR2 et AZ3 contre les espèces *As. carbonarius* et *As. ochraceus*.

Nos résultats sont corroborés par ceux de Manivasagan et al. [89] qui ont isolé une souche marine *Streptomyces* PM-32 à partir de sédiments marins prélevé d'une baie de la côte du Bengale et qui a montré une activité antimicrobienne contre un groupe d'agents pathogènes bactériens mais aussi une activité anti fongique modérée contre les espèces d'*Aspergillus*.

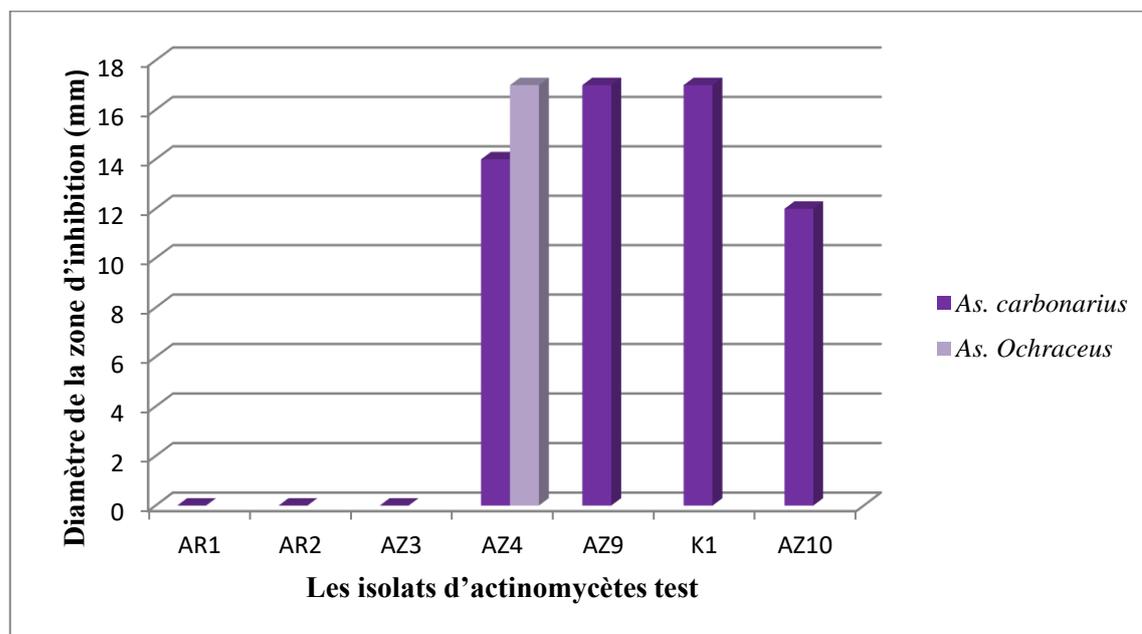


Figure 32 : Activité antifongique des isolats d'actinobactéries contre les souches *Aspergillus* (ATCC 5010) et (ATCC 3150).

Activité antifongique d'isolats d'actinobactéries contre *Fusarium culmorum

ATTC 1824 : Aucune activité antifongique n'a été enregistrée contre cette espèce par les sept isolats d'actinobactéries. Sachant que le genre *Fusarium* regroupe plusieurs espèces phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes, provoquant des maladies appelées fusarioses. Les espèces de *Fusarium* sont une source importante de mycotoxines dans les aliments suite à leurs contaminations des produits agroalimentaires.

Activité antifongique des isolats d'actinobactéries contre *Mucor ramanianus

(ATTC 9628) : Le champignon *M. ramanianus* est parmi les moisissures les plus

sensibles à l'effet des antifongiques naturels selon Bastide et al. [210]. C'est un bon indicateur de production de molécules actives par les germes à tester.

Les zones d'inhibition obtenues sont de 12, 25, 25 et 23 mm respectivement pour AZ3, AZ4, AZ9 et K1 (Figure 33).

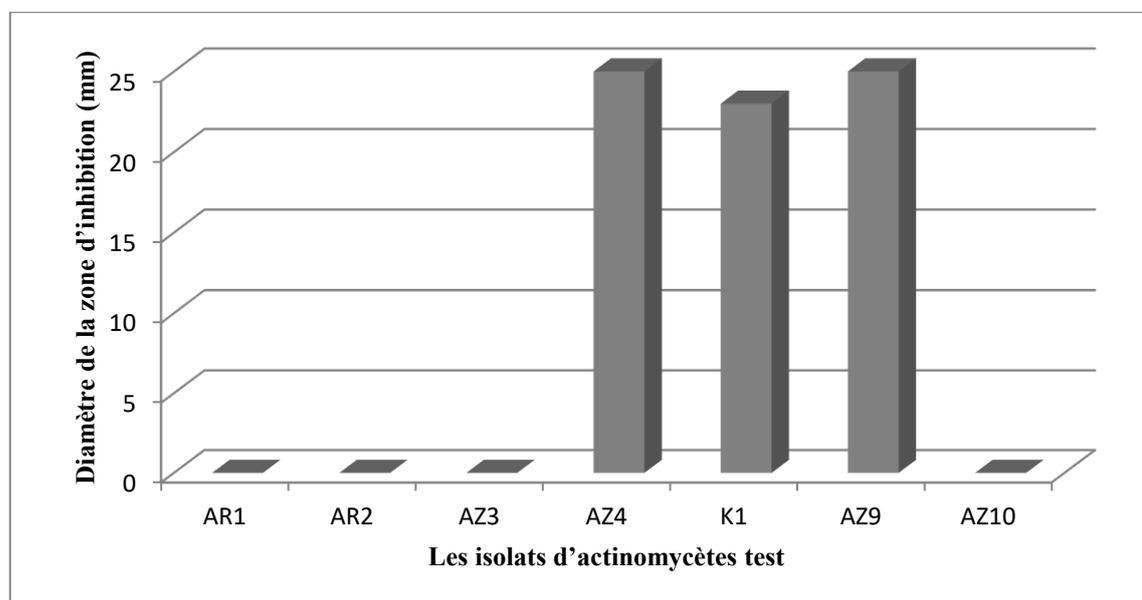


Figure 33 : Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre *Mucor ramanianus* (ATTC 9628)

Activité anti levurienne des isolats d'actinobactéries contre *Candida albicans

(ATCC 10231) : *Candida albicans* est un microorganisme commensal. Le pouvoir pathogène de cette levure est dû au fait qu'elle provoque des infections fongiques (candidose), essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique [211]. Dans cette présente étude aucune activité n'a été enregistrée pour tous les isolats testés.

Les résultats de tests d'activité antifongiques obtenus montrent que 04 isolats des isolats testés possèdent une activité antifongique *vis-à-vis* au moins un germe cible. Par ailleurs, l'isolat ayant le spectre le plus large est l'isolat AZ4. Celui-ci est actif contre les trois moisissures (*As. carbonarius*, *As. Ochraceus* et *M. ramanianus*).

En comparant ces résultats avec ceux obtenus dans le cas de l'activité antibactérienne, on remarque que les actinobactéries avaient une activité antibactérienne, plutôt qu'anti-

fongique, ceci est en accord avec les résultats rapportés par Sunaryanto et Marwoto [212].

2.2.3 Choix de meilleur milieu liquide pour la production des produits antimicrobiens en milieux liquides par l'isolat AZ3

La capacité des microorganismes à produire des antibiotiques n'est pas une propriété fixe, mais peut être largement augmentée ou complètement perdue dans différentes conditions de nutrition et /ou de culture.

Afin d'obtenir des rendements élevés de produits, il est indispensable de concevoir un milieu de production approprié par un processus de fermentation efficace. Les milieux utilisés pour la culture de microorganismes doivent contenir tous les éléments dans une forme disponible pour la synthèse de substances et de division cellulaire nécessaires pour la production des produits métaboliques. Un milieu de culture parfaitement équilibré est obligatoire pour une production maximale d'un composé cible [212].

L'isolat AZ3 est retenu sur la base des tests précédents à l'égard de son potentiel antimicrobien qui s'avère important pour la production de métabolites bioactifs. De ce fait, un suivi de la cinétique de production des métabolites bioactifs sur le milieu liquide a été effectué en utilisant *Staphylococcus aureus* comme un germe cible sensible aux substances produites par notre isolat.

La production des métabolites antimicrobiens est déterminée par la méthode des puits sur milieu Muller Hinton après 24h à 37 °C pour *S. aureus* qui est mesurée quotidiennement pendant 14 jours. Les résultats de cette étude sont montrés dans les (Figures 34-35).

2.2.3.1 Sur le milieu ISP2

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 34.

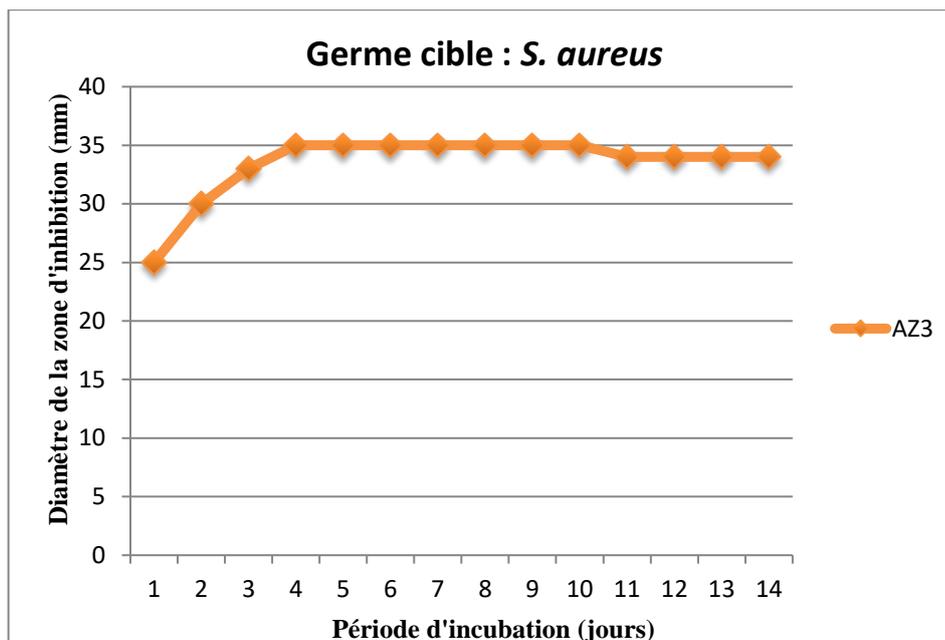


Figure 34: Suivi de la production des produits antibactériens de l'isolat AZ3 sur milieu liquide ISP2 contre *S. aureus*

La figure ci-dessus met en évidence l'activité antimicrobienne de l'isolat AZ3 obtenue sur le milieu liquide ISP2 vis-à-vis du germe cible *S. aureus*. Nous remarquons un début précoce de cette activité qui correspond un diamètre de la zone d'inhibition de 25 mm (AZ3) dès le 1^{er} jour d'incubation. Cette dernière augmente à partir de 3^{ème} jour et ce jusqu'au 7^{ème} jour d'incubation où on observe une stabilité de l'activité antibactérienne qui correspond à une zone d'inhibition optimale de 35 mm, alors que sur le milieu solide nous avons enregistré un diamètre de la zone d'inhibition de 40 mm (avec AZ3). Une diminution de diamètre de la zone d'inhibition est observée après le 11^{ème} jour d'incubation. Ceci signifie que la culture peut être arrêtée au bout de 7 à 8 jours car la production de la substance active n'augmente plus.

2.2.3.2 Sur le milieu AF

Selon la figure 35, la production de l'agent antibactérien par la souche AZ3 sur milieu AF a commencé au bout de 1^{er} jour avec un diamètre de la zone d'inhibition moins par rapport au précédent milieu (20 mm). Après on remarque que la production augmente progressivement pour atteindre un maximum le 8^{ème} jour (33 mm de zone d'inhibition). Une diminution de diamètre de la zone d'inhibition est observée après le 9^{ème} jour et

terminer par une stabilité de l'activité antimicrobienne qui correspond à une zone d'inhibition de 28 mm.

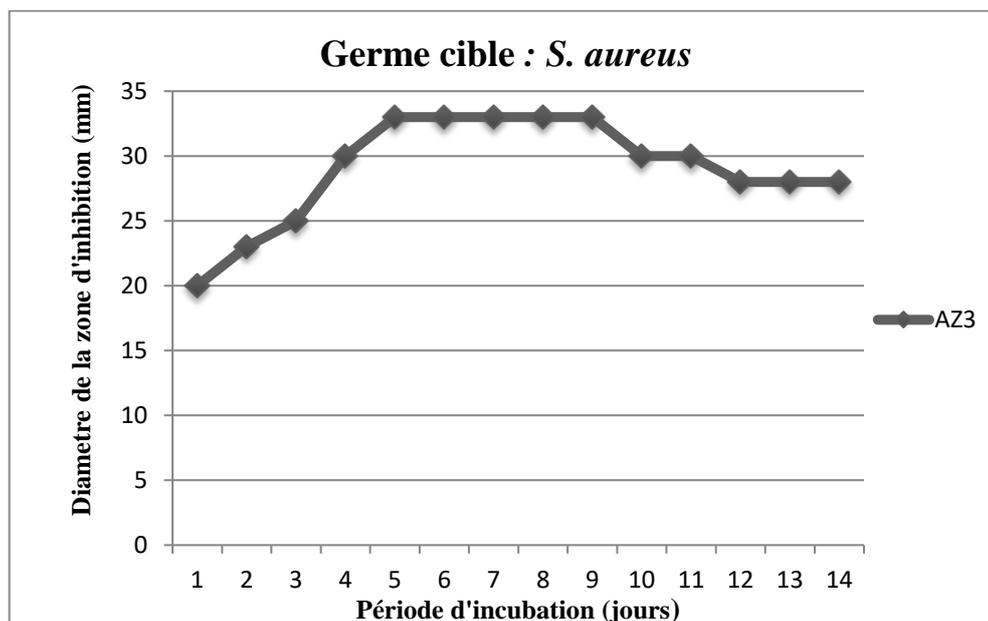


Figure 35: Suivi de la production des produits antibactériens de l'isolat AZ3 sur milieu liquide AF vis-à-vis de *S. aureus*

L'allure de la courbe suggère également que ce milieu n'est pas très favorable à la production de substances actives car les valeurs obtenues pour la production sont pratiquement moins et stables depuis le début de la culture jusqu'au 14^{ème} jour. De ce fait, ce milieu ne sera pas retenu.

2.2.3.3 Sur le milieu Bennett

L'activité antibactérienne de la souche AZ3 apparaît dès le premier jour d'incubation, avec une zone d'inhibition de 25 mm elle atteint son maximum au 3^{ème} jour contre *S. aureus* sur milieu Bennett par la suite une diminution de cette activité est observée à partir de 6^{ème} jour pour reste stable jusqu'à 14^{ème} jour. (Figure 36).

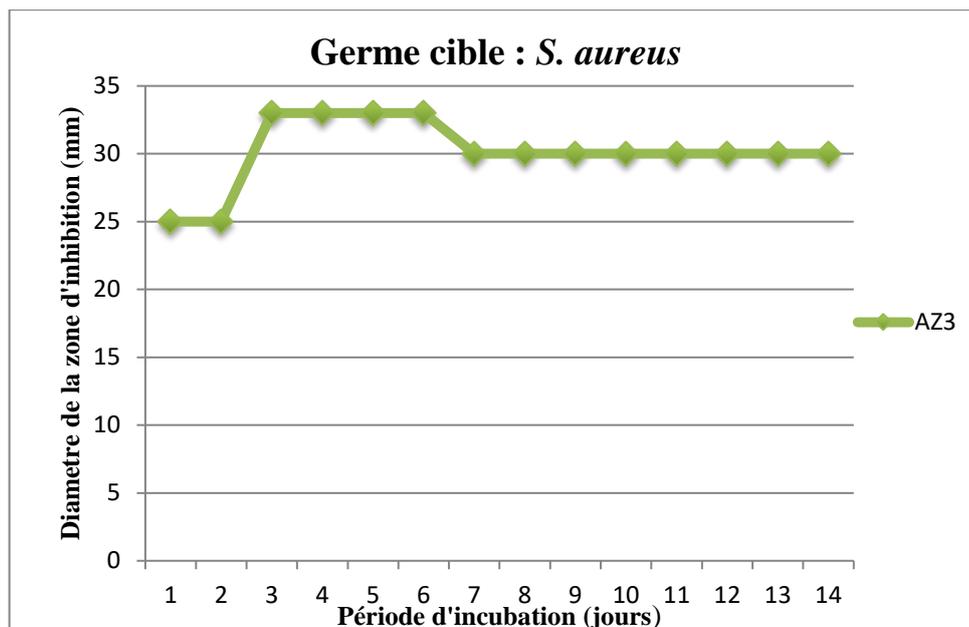


Figure 36: Suivi de la production des produits antibactériens de l'isolat AZ3 sur milieu liquide Bennett *vis-à-vis* de *S. aureus*.

D'après les résultats obtenus en comparant les trois milieux, on remarque que le bouillon ISP2 donne de grande zone d'inhibition, maximum de 35 mm (AZ3), après trois jours d'incubation et pendant une période maximale de 10 jours contre *S. aureus*. Ces résultats nous amènent à retenir ce milieu pour la production des substances bioactives. En effet, ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans plusieurs travaux par Boubatra-Biskri [213] et Driche [214] et Tata, [215].

Les résultats obtenus confirment que la composition des milieux de culture, en particulier la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote, influent considérablement sur la quantité ainsi que la qualité des substances antimicrobiennes sécrétées par les actinomycètes [216].

En effet, plusieurs auteurs ont remarqué que la production des antibiotiques ne se fait que sur les milieux solides et le passage au milieu liquide pose quelques problèmes, soit par l'arrêt de la synthèse des antibiotiques ou bien par une diminution de leur production. Sharma *et al.* et Singh *et al.* [195] expliquent cela soit par la variation de la répartition des nutriments en fonction du temps de la fermentation alors que la

distribution de ceux-ci autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie que très peu Badji et *al.* [175] ou par la différence de la morphologie des actinobactéries lorsqu'ils évoluent respectivement dans le milieu liquide et solide. Généralement, la production des antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments de mycélium. En effet en milieu liquide et à cause de l'agitation, les filaments mycéliens se fragmentent, et les petits fragments se trouvent incapables de produire des quantités importantes d'antibiotiques contrairement au milieu solide où la fragmentation de mycéliums peut être évitée ce qui favorise la production importante d'antibiotique [217].

2.2.4. Criblage et sélection de souches productrices de protéases

Les résultats obtenus (Tableau 12), après incubation sur le milieu sélectif indiquent que six isolats ont une activité protéolytique. Cette observation démontre clairement que, d'une part, ces isolats sont capables d'hydrolyser la caséine (protéine) du lait qui donne des acides aminés solubles utilisables, et d'autre part, que les enzymes responsables de cette hydrolyse sont sécrétées dans le milieu extérieur.

Ces résultats permettent de considérer nos souches sont des souches productrices de protéases exocellulaires, ce qui représente un point très positif pour leur production et leur caractérisation. Le diamètre du halo est proportionnel soit à la quantité de protéases libérées par les colonies, soit à la diffusion des enzymes sécrétées dans le milieu pendant la période d'incubation.

Tableau 12: Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu solide GNL
(test semi-qualitatif)

Souches	Diamètre de l'halo après 7 jours incubation	Résultat
K1	10 mm	++
AR1	9 mm	++
AR2	7 mm	++
AZ3	5 mm	++
AZ4	4 mm	+
AZ9	3 mm	+
AZ10	-	-

- : absence d'activité protéase; + : moyenne activité; ++ : forte activité

Les isolats bactériens K1, AR1, AR2, AZ3, AZ4 ; présentent une activité protéolytique forte, diamètre du halo 10; 9 ; 7 ; 5 ; 4 mm respectivement. L'isolat AZ9 a une activité protéolytique moyenne et absence d'activité avec l'isolat AZ10.

D'une manière générale, le niveau de production des protéases par les souches protéolytiques peut être modulé par la composition chimique des milieux de culture. Ainsi, cette production est fortement influencée par la nature et la concentration des constituants du milieu. Plusieurs autres facteurs physiques tels que l'aération, la densité de l'inoculum, le pH, la température et le temps d'incubation affectent d'une manière considérable la production des protéases.

2.2.5. 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. Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à la sélection des souches performantes productrices de biosurfactants et à la sélection de la source de carbone par la détermination du déplacement d'huile et des activités hémolytiques.

Tableau 13: Critères de croissance des souches sur gélose au sang et la mesure de la zone claire d'hémolyse

Souches	Diamètre (mm)	Couleur de la zone d'hémolyse	Résultat
K1	23	Transparent	++
AR1	15	Transparent	++
AR2	12	Verdâtre	+
AZ9	14	Transparent	+
AZ3	10	Verdâtre	+
AZ4	13	Transparent	+
AZ10	0	Absence	-

Les isolats retenus pour le test d'hémolyse ont révélé que six souches sont positives à l'hémolyse par la création de zones claires ou incolores autour des colonies. Les résultats positifs (Tableau 13) suggèrent que ces souches sont des productrices de biosurfactants et d'enzymes d'hémolyse. [95].

La cinétique de production de biosurfactants sur milieux liquides en utilisant plusieurs sources de carbone (Figures 37-39).

➤ Utilisation de l'huile d'olive comme source de carbone

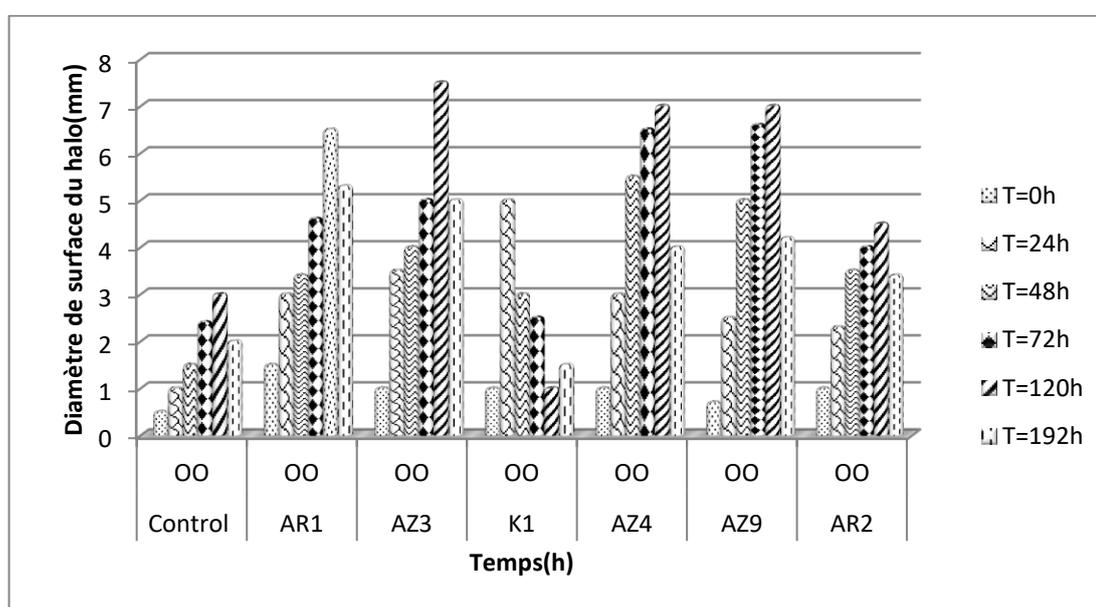


Figure 37 : Diamètres de déplacement de pétrole (DDP) sur l'huile d'olive en fonction du temps

➤ Utilisation de l'huile de table comme source de carbone.

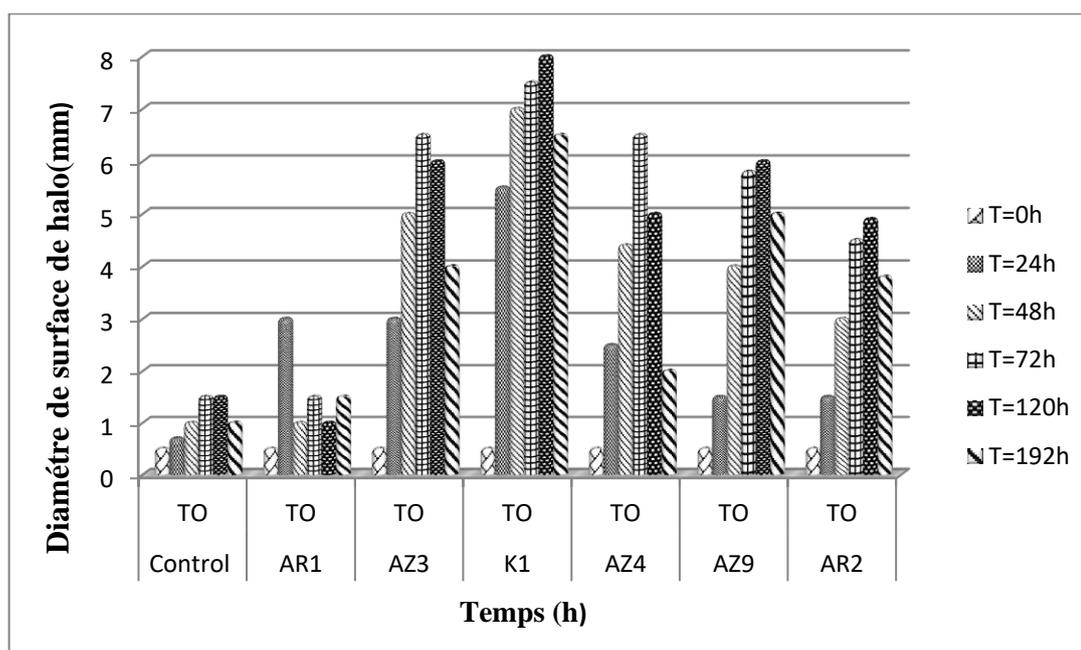


Figure 38 : Diamètres de déplacement de pétrole sur l'huile de table en fonction du temps

➤ Utilisation de pétrole comme source de carbone

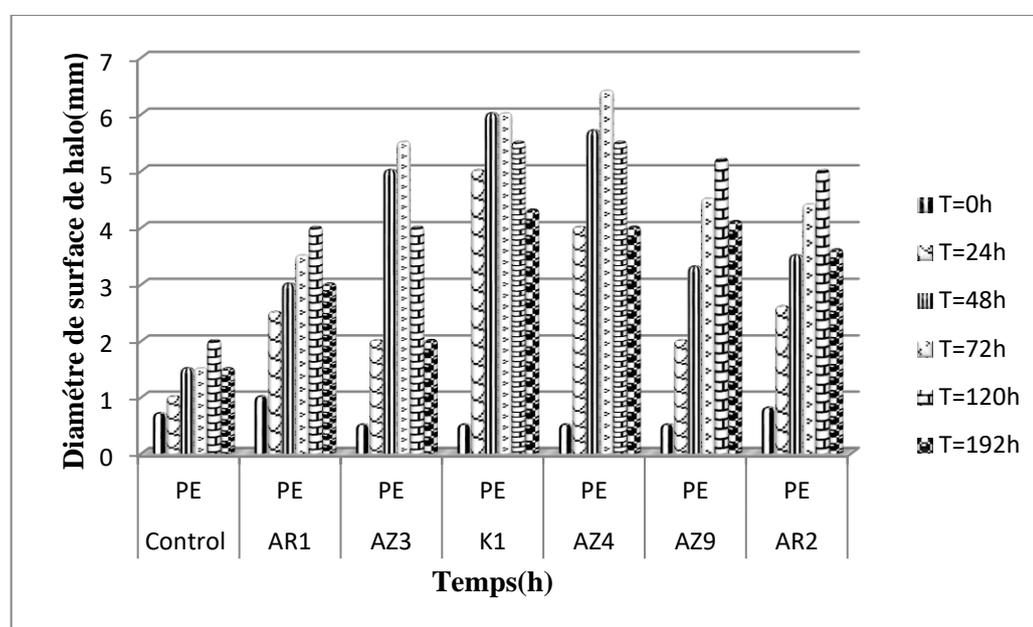


Figure 39: Diamètres de déplacement de pétrole sur le pétrole en fonction du temps

Ces résultats montrent que la production de biosurfactants en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone a augmenté du premier jour d'incubation jusqu'au cinquième

jour pour les souches AR1, AZ4, AZ9 et AZ3, montrant une production maximale (DDP= 6,5 cm, 7 cm, 7 cm, et 7,5 cm, respectivement), et a diminué pour le huitième jour. La souche K1 a le potentiel de produire du biosurfactant avec de l'huile de table ; elle devrait atteindre une production maximale avec un DDP de 8 cm. Le pétrole comme source de carbone ne donne pas de résultat aussi intéressant. En fait, la souche AZ4 est la seule qui donne un DDP élevé (6.4 cm) avec du pétrole. Les souches AZ3, AZ4, AZ9 peut être choisie comme des souches produisant le plus de biosurfactants avec l'huile d'olive et la souche K1 avec l'huile de table comme source de carbone

Le groupe d'actinobactéries est toujours considéré comme les bactéries les plus importantes en raison de leur production de plus de 70% des antibiotiques commercialisés dans le monde [118]. Les espèces d'actinobactéries les plus connues sont d'origine terrestre. A ce titre, l'isolement de ce groupe à partir du milieu marin est fortement recherché d'où l'importance d'identifier les isolats obtenus dans notre cas. Sur les bases des critères phénotypiques les 07 isolats ont été affiliés aux deux genres, *Streptomyces* et *Rhodococcus*.

Au total, sept souches d'actinobactéries ont été obtenues en utilisant des milieux spécifiques afin d'isoler ces microorganismes très particuliers. Le criblage a toujours été un moyen essentiel pour rechercher des microorganismes à fort potentiel pour la production de nouvelles molécules. Une vision adaptative a été appliquée pour l'isolement et la caractérisation des souches d'actinobactéries obtenues ainsi que pour le criblage des propriétés technologiques de ces souches isolées, à savoir, les activités antimicrobiennes, la production de protéases et de tensioactifs dont nous avons pu sélectionner trois souches performantes a savoir : la souche K a le potentiel de production du biosurfactant maximale avec un DDP de 8 cm, et la souche AZ3 avec un DDP de 7,5 cm ainsi que les souche AZ4 et AZ9 avec un DDP de 7 cm.

Concernant les activités antimicrobiennes, nous pouvons conclure que la souche AZ4 possède le spectre d'activité antifongique le plus large. De plus, l'isolat AZ3 possède la plus grande activité antimicrobienne avec un diamètre de zone d'inhibition de 40 mm

Cette bactérie possède également des caractéristiques morphologiques plus spécifiques que d'autres bactéries, comme la facilité de repiquage sur plusieurs milieux, cela prend également peu de temps (3 jours) pour l'apparaître. De là nous pouvons choisir la souche (AZ3) pour le suivi de travail expérimental.

A notre connaissance, peu de travaux ont été réalisés sur l'isolement d'actinobactéries d'origine marine, en particulier à partir d'algues marines. Cet environnement a été ciblé pour la découverte de nouveaux produits naturels ayant une puissance biologique. Parmi les travaux sur l'isolement de ce type de bactéries d'origine marine, nous pouvons citer une revue qui résume les dernières études sur les actinobactéries marines rares et leurs produits naturels intitulé : *Marine Rare Actinobacteria. Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds* [218].

Localement, Habibeche [219] a proposé d'étudier les aspects morphologiques, physiologiques de six actinobactéries d'origine marine en utilisant différents milieux et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces souches par deux méthodes différentes. De même, Boudrahem [220], dans le cadre de la recherche de métabolites secondaires actifs produits par des actinobactéries marines, sur la base d'une caractérisation morphologique (macro et micromorphologie), a permis de rattacher les 14 isolats sélectionnés au genre *Streptomyces* et de mettre en évidence l'activité antibactérienne et/ou antifongique de ces isolats.

A notre niveau, notre étude a été réalisée suite à la demande des secteurs de production cherchant à investir dans le domaine de la biotechnologie en utilisant nos souches locales, notamment celles isolées des milieux marins. Pour ce faire, notre recherche se situe dans le cadre des objectifs de notre laboratoire sur les biomolécules d'origine microbienne marine. Sur la lumière des résultats obtenus, nous avons pu mettre en place une collection de souches d'actinobactéries isolées d'algues marines à fort potentiel biotechnologique.

2.3 Contributions à l'étude de la biotransformation des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par AZ3 du genre *Streptomyces*

La biotransformation de trois monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la souche AZ3 isolée localement à partir d'une algue brune de *Zonaria tournefortii* a été étudiée.

2.3.1 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse de Menthol, Thymol et Cymène

Le profil chromatographique obtenu par CG/SM montre un seul pic correspond au thymol (Figure 40), menthol (Figure 41) et cymène (Figure 42) avec un temps de rétention de 20.0 min, 10.5 min et 4.4 min, respectivement. Ce qui indique la pureté de grade analytique de trois monoterpènes utilisés lors de nos expérimentations.

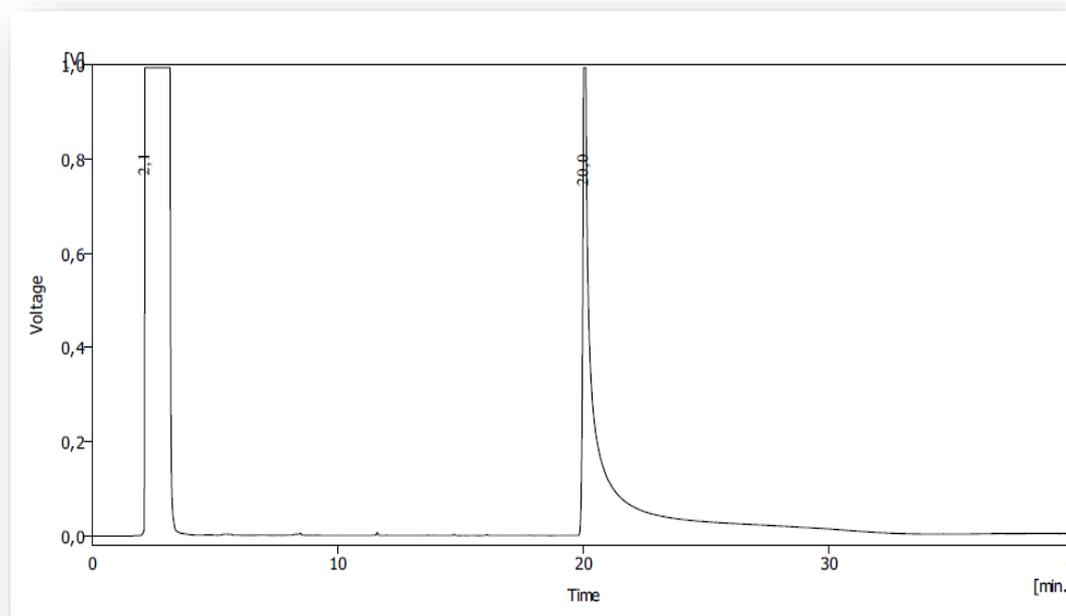


Figure 40: Profil chromatographique d'analyse du thymol

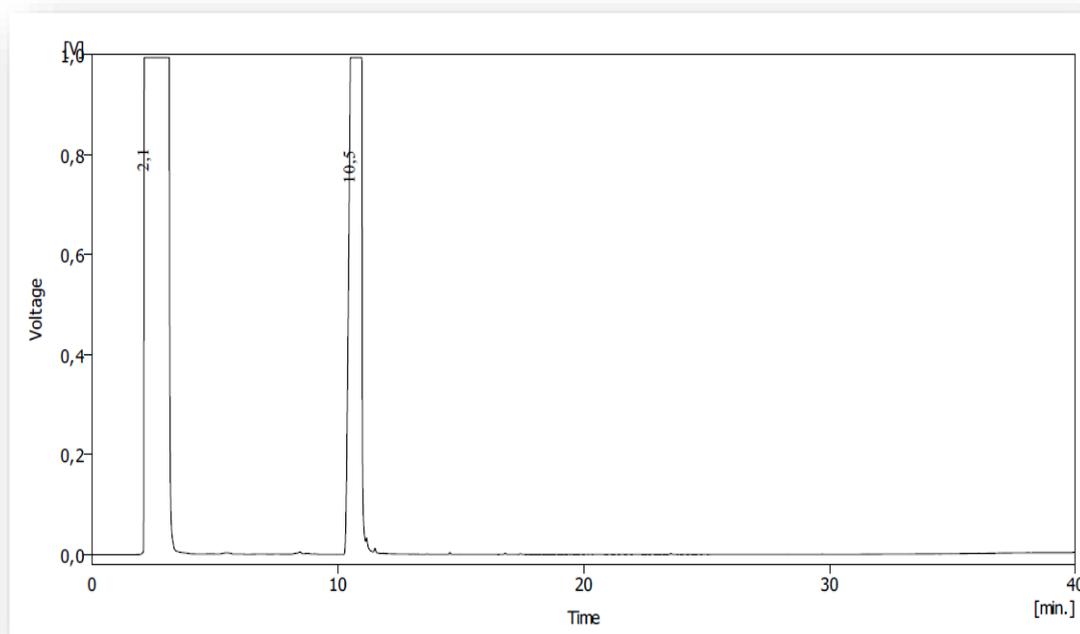


Figure 41 : le Profil chromatographique d'analyse du menthol

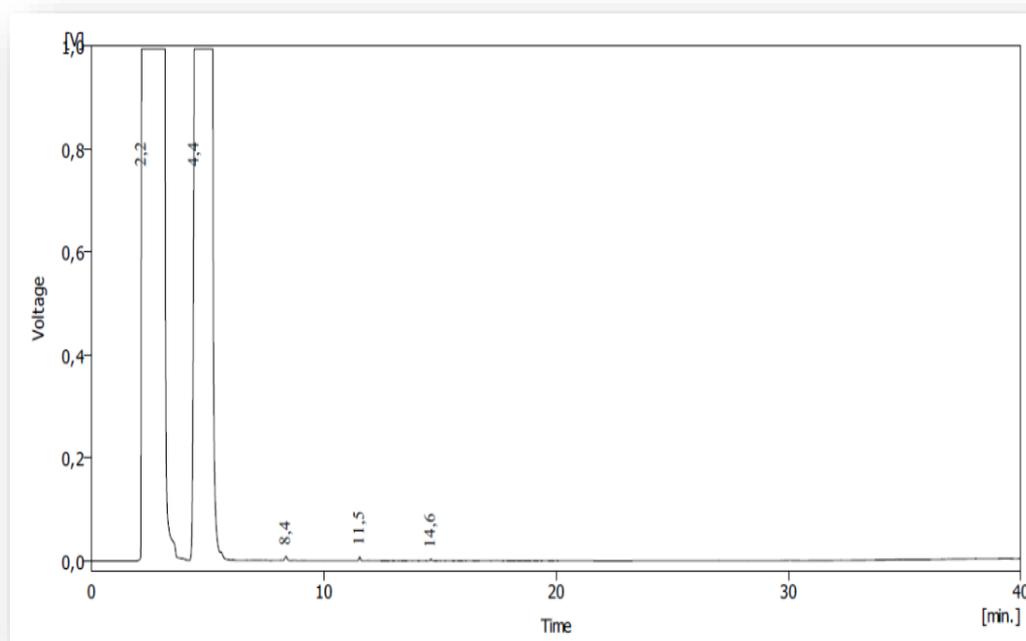


Figure 42 : le Profil chromatographique d'analyse du cymène

2.3.2 Etude de l'activité catabolique des monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la souche AZ3

Nous rappelons que les conditions retenues pour l'étude de la biotransformation sont comme suit : Des Erlenmeyer de 500 mL ont été utilisés pour la croissance de la souche *Streptomyces* AZ3 contenant 250 mL de milieu ISP2 pour étudier les conditions optimales nécessaires à la biotransformation. La phase de croissance appropriée après laquelle les cellules pourraient être récoltées a été déterminée en utilisant une période de croissance de 6 jours. La valeur optimale du pH a été estimée dans la plage de pH 7.2 à 8 et la température optimale à 30 °C sous agitation de 150 tr / min avec une concentration de substrat (monoterpène) : Menthol et thymol = 0,25 mg/L - cymène = 0,5 mg/L); le tween 80 est utilisé comme surfactant chimique avec une concentration de 1%.

La détermination de la CMI est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité d'une espèce bactérienne *vis-à-vis* à une molécule bioactive. Elle se définit comme la plus faible concentration d'une molécule (produit) nécessaire à l'inhibition de toute croissance bactérienne visible *in vitro*.

2.3.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en milieu solide

La souche *Streptomyces* AZ3, soumise à des concentrations du menthol, thymol et cymène dont les résultats montrent une sensibilité pour des concentrations du substrat s'étalant entre 0,5 à 20 mg/mL. Par contre, pour la gamme de concentrations inférieure à 3 mg/mL, la souche montre une absence totale des zones d'inhibition qui indique la résistance de la souche envers le substrat étudié.

La concentration choisie pour la suite du travail est de $(0.25 \pm 0,09)$ mg/mL pour menthol et thymol et $(0,50 \pm 0,08)$ mg/mL pour le cymène comme concentration assimilable non inhibitrice (CANI).

2.3.4 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice en milieu liquide

L'effet de variation des concentrations du substrat (menthol et thymol) sur la croissance de la souche *Streptomyces* AZ3 (Figure 43 et la Figure 44).

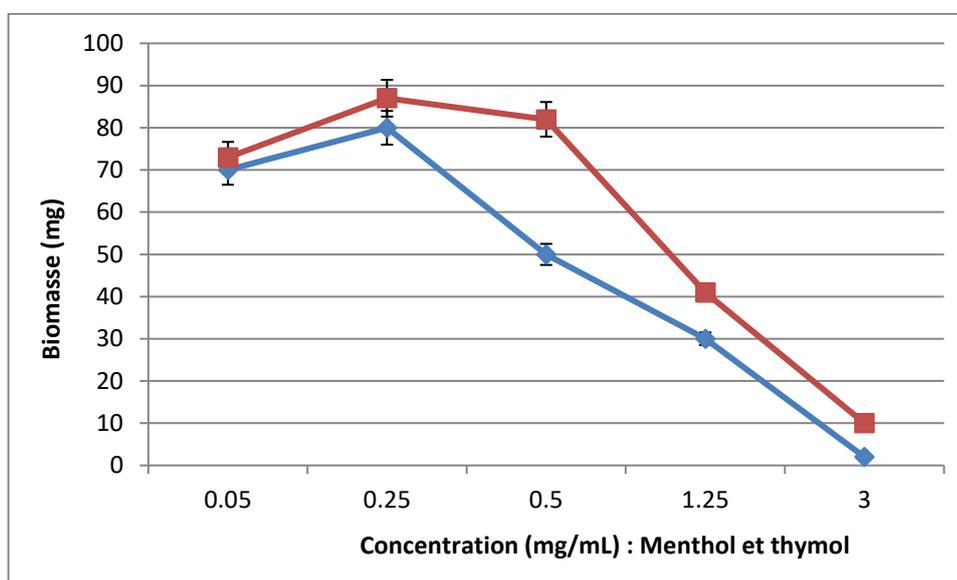


Figure 43: Effet de variation des concentrations du substrat (menthol et thymol) sur la croissance de la souche *Streptomyces* AZ3. Le graphe rouge : représente le menthol ; le graphe bleu : représente le thymol.

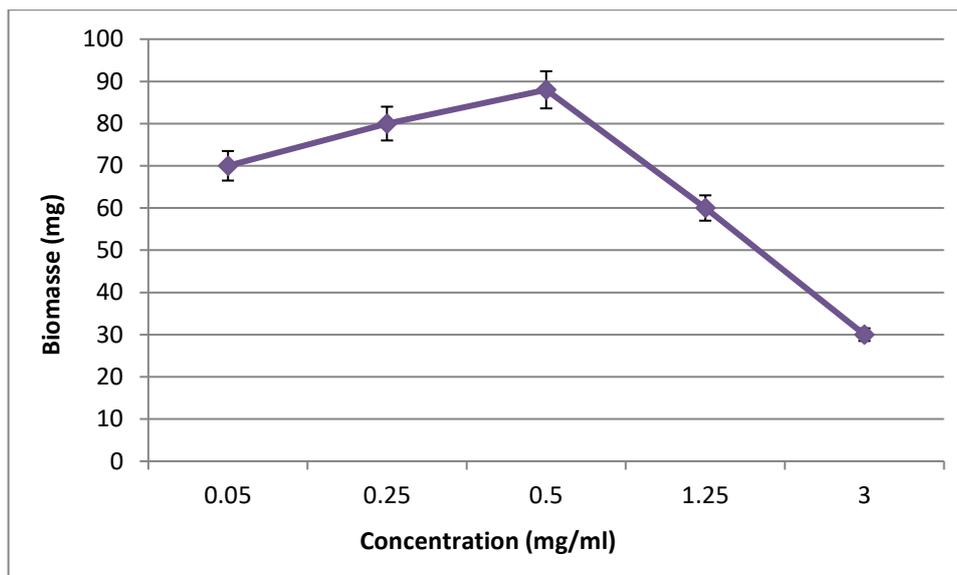


Figure 44: Effet de variation des concentrations de substrat cymène sur la croissance de la souche *Streptomyces* AZ3.

La concentration qui inhibe notre souche (AZ3) s'observe à l'œil nu par l'absence de croissances bactérienne ou bien qu'elle ne produise qu'une très faible biomasse (à concentration = 3 mg/mL) dans les tubes à essais utilisés. Elle sera fonction de la concentration du substrat, mais aussi de la souche bactérienne testée dans la limite de la gamme de concentration.

Nous remarquons que l'effet des 03 substrats (monoterpènes) sur la souche AZ3 s'est débuté à des concentrations faibles telles que 3 mg/mL. A cet effet, les résultats obtenus confirment clairement les résultats de test d'inhibition en milieu solide que la concentration choisie des trois monoterpènes est 0,25 mg/mL estimé à une biomasse de (80 et 87 mg) pour le menthol et thymol, resp, et de 0,5 mg/mL pour le cymène estimé à une biomasse de 88mg.

Des résultats trouvés par Esmaeili [144] dans une expérience de biotransformation du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074), cultivé sur de menthol à 0,5 mg/mL et 1 mg/mL. Qu'après 7 jours, les cultures sur 0,5 mg/mL de (-) menthol étaient complètement développées et la sporulation s'est produite. Les cultures à 1 mg/mL de (-) menthol est insuffisant ne couvraient qu'une partie la surface.

En comparaison avec nos résultats, la concentration que nous avons choisie est inférieure à cela, qui est $[C]=0.25$ mg/mL, malgré que la souche AZ3 produit une sporulation à cette concentration de menthol $[C]= 0.5$ mg/mL. Cela indique à la résistance de notre souche AZ3 avec le substrat terpénique (menthol).

Pour une étude expérimentale réalisée par Chamberlain et Dagley [150], des cellules de *Pseudomonas* ont été cultivées dans un milieu ajusté à pH 7,2 sous agitation à 30 °C contenant : 2g/L KH_2PO_4 ; 1g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ plus d'une concentration bien définie de thymol 0,3g/L.

Une étude de Manuel et Numpaque [153] sur l'activité antifongique et le métabolisme de thymol et de carvacrol par *Colletotrichum acutatum* et *Botryodiplodia theobromae*, a montré que les deux composés fournissaient un contrôle relativement bon contre ces champignons phytopathogènes. La croissance de *C. acutatum* et *B. theobromae* était inhibée à 50 $\mu\text{g/mL}$ et plus. A concentration de 150 $\mu\text{g/mL}$, le thymol et le carvacrol ont inhibé la croissance complète des champignons et cet effet persiste pendant 240 h. De plus, le thymol et le carvacrol ont été métabolisés par ces deux champignons pathogènes. Donc le CMI= 50 $\mu\text{g/mL}$.

Par rapport à nos résultats, nous constatons que la concentration de Thymol qui 0,25 mg/mL que nous avons trouvé est plus élevée que cela, c'est ce que montre la résistance de notre souche AZ3 à faibles concentrations.

Peu de travaux sur la biotransformation de cymène par les microorganismes ont été réalisés ; on trouve à titre d'exemple le travail de DeFrank et Ribbons [157] ayant étudié des réactions initiales de la voie du p-cymène induites chez *Pseudomonas putida* PL en utilisant le cymène à une concentration de 0,05 mg/mL. D'après les résultats de ces travaux on peut dire que cette concentration est trop faible à ce que nous trouve avec notre souche $[C]=0.5$ mg/mL.

Nous concluons que la capacité d'une souche à se multiplier à une concentration de substrat (terpénique) supérieure à celle qui inhibe la majorité de souches appartenant à

la même espèce, est la définition de la résistance bactérienne. Cette capacité est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques impliqués dans l'étude des interactions entre substrats et métabolisme bactérien. La résistance de notre souche AZ3 au substrat est une caractéristique qui confère à cette souche la capacité de se développer en présence de concentrations « élevées » (ou inhabituelles) du substrat étudié.

2.3.5 Effet des conditions environnementales sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3

2.3.5.1 Effet du pH

La cinétique de croissance a été suivie en culture batch réalisée sur milieu ISP2 liquide. Des prélèvements de 7 jours après l'addition de substrat (le menthol) avec une concentration fixée. Pour toutes les cultures à différents pH, la température d'incubation est fixée à 30 °C en suivant l'évolution de la biomasse (en poids sec) en fonction du temps d'incubation en mode agité.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 45. Après une période d'incubation de 7 jours, la cinétique de croissance de la souche AZ3 révèle une croissance rapide pour atteindre un maximum arrivant à $(60,03 \pm 0.53)$ mg à pH=8 et puis une fiable diminution de biomasse de $(54,89 \pm 0.40)$ mg à pH de 7,2.

La souche AZ3 enregistre des biomasses légèrement plus faibles avec un pH acide (aller de 4 à 6), également, nous avons remarqué un abaissement de biomasse avec des valeurs fortement basique de pH (10 à 12).

Il est à noter que cette actinobactérie se développe en milieu liquide en formant des mycéliums libres en forme de billes sphériques de couleur grisâtre bien visibles à l'œil nu.

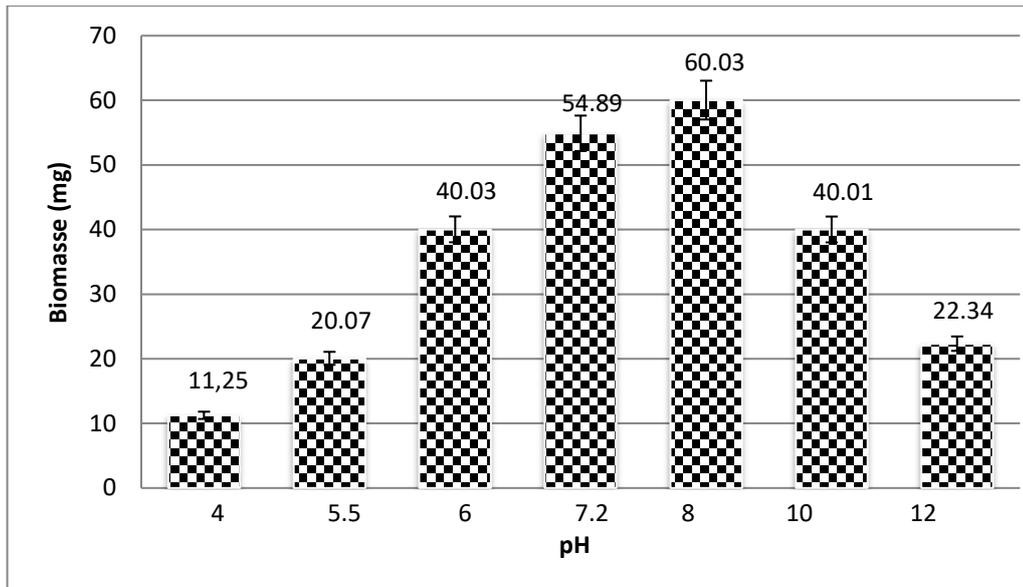


Figure 45: L'effet du pH sur la croissance de la souche AZ3 à différents pH et à T=30 °C et sous agitation de 200 rpm.

2.3.5.2 Effet de température

L'effet de la température sur la croissance de la souche AZ3 au cours de la transformation microbienne avec les trois substrats pendant 7 jours est présenté dans la Figure 46.

Pour les cultures de différentes températures le pH est ajusté à 8, la concentration des substrats est préalablement fixées.

La souche AZ3 se développe d'une façon optimale avec une biomasse de (53,29±1.37) mg à une température de 30 °C et une croissance très faible à 45 °C. (Avec le menthol)

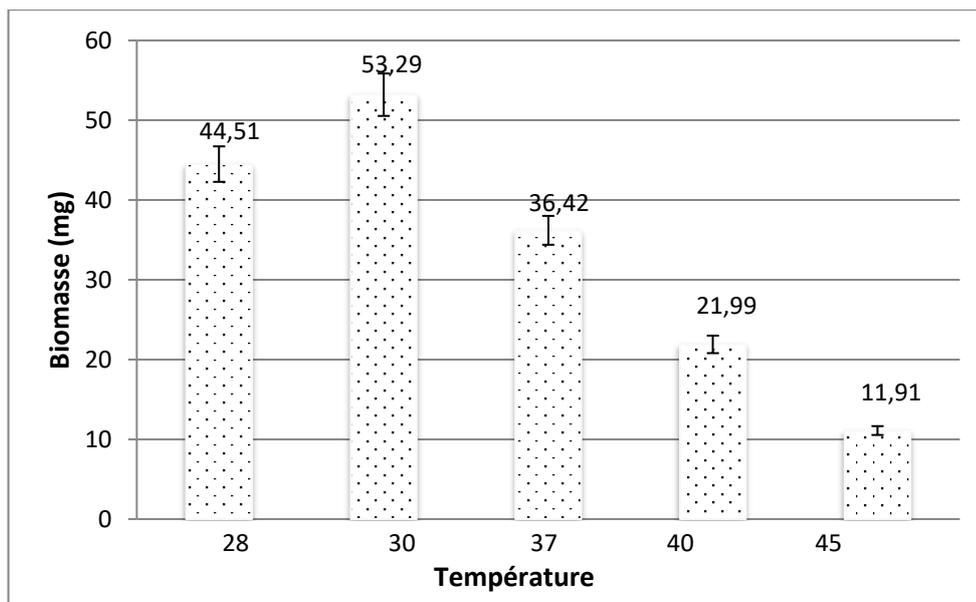


Figure 46 : L'effet de la température sur la croissance cellulaire à pH = 8, à 30 °C et sous agitation 200 rpm.

Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature par Chatterjee et Bhattacharyya [99]. L'influence de la température et le pH sur la bioconversion de limonène par *P. putida* MTCC 1072 a été étudié à différentes températures sur plage de 20 à 40 °C. La bioconversion a atteint un maximum à 30 °C et a commencé à diminuer fur à mesure que la température augmentait et à pH varie de 3,5 à 8, une activité meilleure de bioconversion étant trouvé à pH= 7.

Molina [103] a étudié l'effet du pH sur la biotransformation de limonène par *Sphingobium sp*, trois valeurs de pH différentes ont été étudiées, les tampons utilisés étaient un tampon phosphate 20 mM pH 7,0, un tampon acétate 20 mM pH 5,3, et tampon Tris-HCl pH 8,7. Les résultats ont démontré que l'analyse statistique a montré que la production optimale d' α -terpinéol (*via* la transformation de limonène) était à et pH 7,0 et 28 °C.

Esmaeili et al. [144], ont étudié l'influence du pH sur la bioconversion de menthol par *Chlorella vulgaris*, dans une plage de pH de 3,0 à 7,0, le microorganisme a affiché une bonne biomasse sur une plage de pH de 4,5 à 5,5, avec l'activité la plus élevée à pH 5,5.

2.3.5.3 Etude de l'effet de surfactants non ioniques sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3

L'effet du Tween 40, Tween 80 et du Triton X-100 sur la biotransformation des trois monoterpènes étudiés par AZ3 a été testé à raison de 1% de surfactant ajouté simultanément avec le substrat. Une expérience de témoin a été réalisée sans surfactant en ajoutant uniquement le substrat terpénique avec une concentration bien définie directement dans le bouillon de culture stérile.

Les résultats obtenus sont graphiquement représentés sur la figure 47.

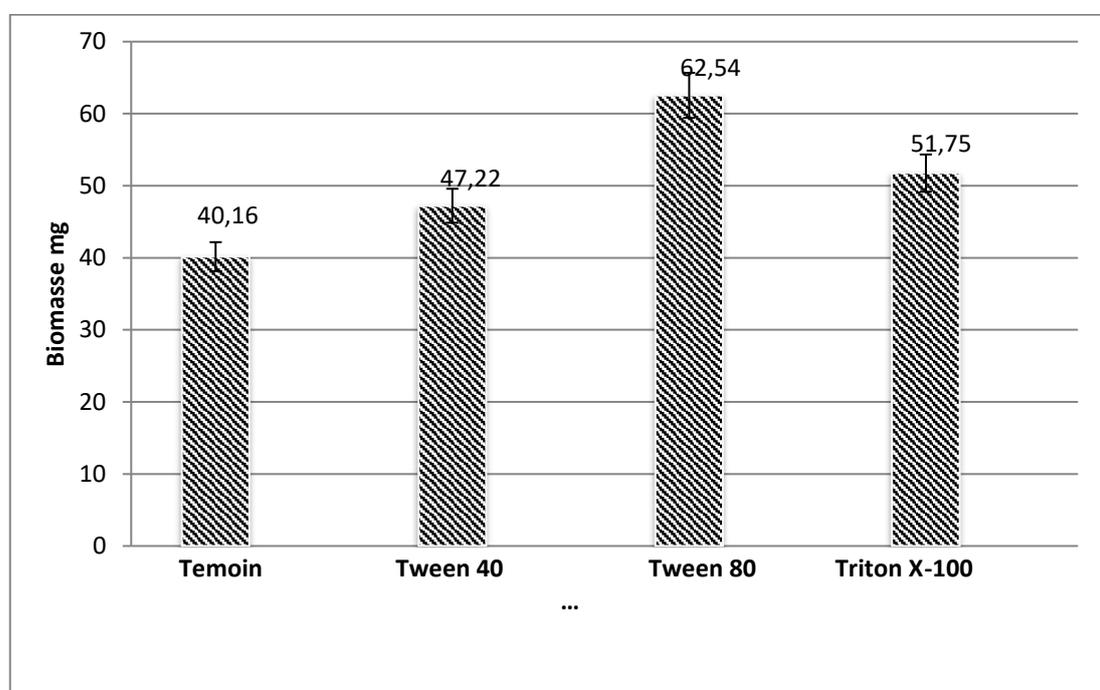


Figure 47: L'effet des surfactants sur la croissance bactérienne à pH = 8 et T= 30°C et sous agitation 200 rpm

Les résultats de l'effet de surfactants sur le processus de biotransformation sont consignés dans la Figure 1. 48. Nous observons également une augmentation de la biomasse en présence de surfactant par rapport à la biomasse de témoin sans surfactant. Une augmentation de la croissance microbienne a été signalée avec le tween 80, ce résultat indique que le tween 80 est le meilleur surfactant avec une biomasse de (62,54±0,22) mg.

Les agents de tensions actifs (surfactants) utilisés n'ont pas d'effet négatif sur les molécules de substrat monoterpénique utilisé dans notre cas. Cependant, il semblerait

que ces agents contribuent à faciliter l'action de ces molécules sur la souche (AZ3) en abaissant la tension superficielle de l'eau, ou bien en dégradant la membrane cytoplasmique comme expliqué par Aguedo et al, [221], que les tensioactifs ajoutés peuvent avoir des actions délétères *vis-à-vis* des cellules vivantes. Ce transport est lié à la surface spécifique et au transfert de masse à travers l'enveloppe cellulaire.

Dans des travaux comparables par Esmaeili [146,151], sur la transformation microbienne de citral, menthol et thymol par *Penicillium* sp. *Mucor ramannianus* et *Aspergillus niger* en présence de surfactants chimiques (SDA et Tween 80) dont les résultats étaient en parfaite accord.

2.4 Mise en évidence des produits issus de la biotransformation des menthol, thymol et cymène par AZ3 après une phase de croissance optimale

Les monoterpènes étudiés soumise à des essais de bioconversion dans les conditions étudiées précédemment (pH = 8, Température = 30 °C, Tween 80 =1% ; Temps d'incubation = 7 jours sous agitation), ceci nous a permis de récupérer des phases organiques (mélange des métabolites) renfermant les différents métabolites obtenus. L'analyse par CG/SM des phases organique a montré les profils chromatographiques donnés par les figures ci-dessous. L'examen des chromatogrammes, révèle la présence de plusieurs métabolites représentant les produits de bioconversion de menthol, thymol et cymène par la souche *Streptomyces* AZ3.

L'identification des différents produits a été faite en se basant sur les banques de données spectrales W11N17 (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, USA) ; FFNSC et Mass Finder 3 (DB3) (D.H. Hochmuth, www.massfinder.com).ainsi que sur les données de la littérature comportant les spectres de masse des produits purs. Les tableaux ci-dessous regroupent les différents métabolites obtenus.

2.4.1 Identification des produits issus de la biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche AZ3

2.4.1.1 Biotransformation de menthol

L'analyse chimique de la bioconversion de menthol ($C_{10}H_{20}O$) avec la souche *Streptomyces* AZ3 pendant 6 jours a abouti à la production de deux ensembles de métabolites : monoterpènes oxygénés et des hydrocarbures comme illustré par le profil chromatographique de la biotransformation obtenu par CG/SM (Appendice C). L'analyse rapporte la présence de 14 composés (Tableau 2.14), résultant de la biotransformation du menthol par *Streptomyces* sp AZ3. L'examen de tableau 4.14 révèle que les composés : camphène, alcool phénéthylique, oxyde de limonène, Bornéol, d-Isopulegol, cymène -8-ol et thymol ont été décrits pour la première fois dans la biotransformation de menthol par notre souche. Un composé reste non identifié ($t_r = 24.68$ min, son indice de rétention a été estimé à 1457), les fragments de son spectre de masse (indiqués au bas du tableau), ont révélé qu'il s'agit très probablement d'un monoterpène oxygéné d'un poids moléculaire de 172 g/mol, correspondant à $C_{10}H_{20}O_2$. Il présente un pic de base à $m/z = 81$.

Tableau 14 : Métabolites obtenus par bioconversion du menthol par la souche *streptomyces* AZ3 (3^{ème} et 7^{ème} jour)

N°	Tr (min)	Nom du composé	LRI _{cal}	LRI _{lit}	Aire(%)	
					3 jours	7 jours
1	4.79	Camphène	950	954	-	0.43
2	10.01	Alcool phénéthylique	1113	1169	0.24	-
3	10.97	Oxyde de limonène	1137	1136	-	0.46
4	11.28	Bornéol	1149	1156	-	0.19
5	11.38	d-Isopulegol	1150	1156	0.42	-
6	12.53	Menthol	1174	1172	50.42	10.72
7	13.05	Cymène -8-ol	1186	1187	-	0.56
8	16.01	Pipéritone	1254	1252	0.61	-
9	17.68	Thymol	1294	1297	3.67	10.27
10	19.27	p-Menthane-3,8-diol	1320	1315	-	11.47
11	19.53	8-hydroxymenthol	1328	1330	20.66	40.62
12	20.68	2-hydroxymenthol	1357	1353	13.89	9.57
13	21.07	4-hydroxymenthol	1397	1395	10.09	-
14	24.68	NI	1457	-	-	10.71

NI : 41(36), 71(64), 95(39) ; 124(28), 81(100), 112(35), 139(10).

L'examen du tableau 14 montre que 50% du menthol est bioconverti au troisième jour pour mener principalement à 20,66% de 8-hydroxymenthol, 13,89% de 2-hydroxymenthol et 10,09 de 4-hydroxymenthol. Au bout du septième jour il ne reste que 10,27% menthol, alors que la teneur du 8 hydroxymenthol atteint 40,62%, ce composé reste le principal produit de bioconversion du menthol par la souche AZ3. Nous constatons que le p-Menthane-3,8-diol qui ne se forme pas le troisième jours sa teneur atteind 11,47% au 7^{ème} jour, tout comme le thymol dont la teneur augmente de

3,67% (1^{er} jour) à 10,27 % (7^{ème} jour). Un phénomène très particulier se passe pour les deux isomères 2-hydroxymenthol, 4-hydroxymenthol varie de 13,89% et 10,09% (premier jour) à 9,57% et 0% (septième jour). Il est fort probable que les deux isomères, notamment le 4-hydroxymenthol, subissent une réaction d'isomérisation pour donner le 8-hydroxymenthol. Les isomères alcools du menthol ont été déjà signalés dans la bioconversion du menthol par *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa* [142,143]. Toutefois, le p-menthane-3,8-diol a été obtenu par bioconversion du menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074) (Figure 48).

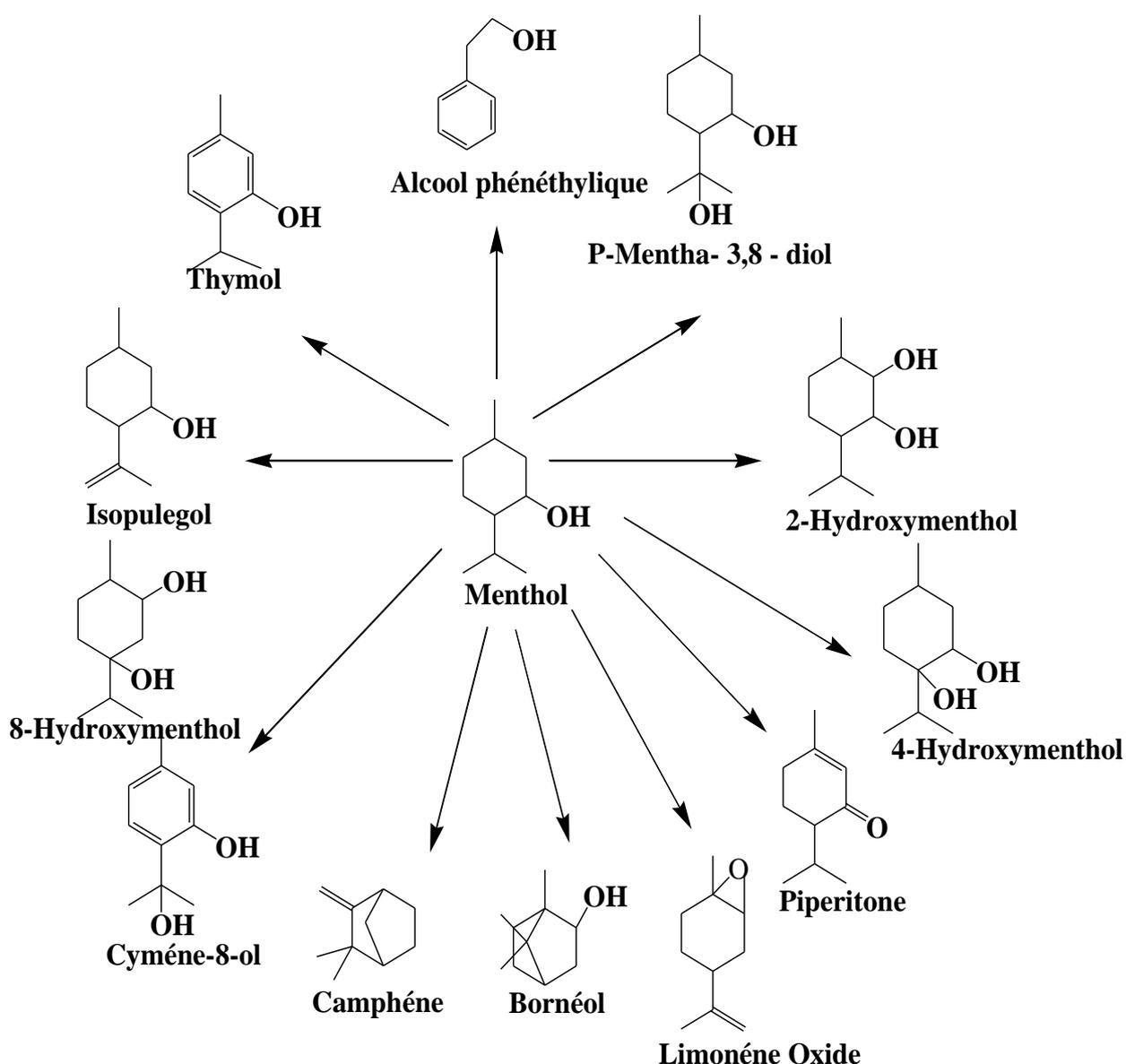


Figure 48 : Voies de bioconversion du menthol par *Streptomyces sp AZ3*.

2.4.1.2 Biotransformation de thymol

La bioconversion de thymol a été effectuée dans les conditions décrites précédemment avec la souche *Streptomyces* AZ3. L'analyse par CG/SM de la phase organique contenant les produits de la biotransformation a montré le profil chromatographique donné dans l'appendice C. L'examen du chromatogramme révèle la présence de plusieurs métabolites regroupés dans le Tableau 15. Ainsi, la biotransformation de thymol donne deux hydrocarbures et huit monoterpènes oxygénés. Parmi les composés identifiés, et selon notre synthèse bibliographique, le camphène, le limonène, l'oxyde de limonène, le d-Isopulegol et l'acide benzoïque qui ont été décrits pour la première fois dans la biotransformation de thymol par notre souche par rapport aux autres souches bactériennes et champignons décrits dans les travaux antérieurs.

Tableau 15: Biotransformation de thymol par la souche AZ3 (3^{ème} et 7^{ème} jour)

N°	Tr (min)	Nom du composé	LRical	LRlit	Aire(%)	
					3 jours	7 jours
1	4.79	Camphène	950	954	0.1	-
2	6.91	limonène	1028	1030	-	0.09
3	10.98	Oxyde de limonène	1137	1136	-	0.07
4	11.42	d-Isopulegol	1150	1156	-	0.03
5	11.99	Acide benzoïque	1161	1162	0.5	-
6	12.53	Menthol	1174	1172	9.4	18.58
7	13.05	Cymène -8-ol	1186	1187	-	0.87
8	17.73	Thymol	1294	1297	90	5.33
9	20.11	8-hydroxymenthol	1328	1330	-	64.83
10	20.51	2-hydroxymenthol	1357	1353	-	9.57

L'examen de tableau 15 montre qu'une faible teneur estimée à 10% subit la biotransformation dès le premier jour, cette teneur augmente pour atteindre plus de 95%

au septième jour. Le principal produit de la bioconversion est le 8-hydroxymenthol avec 64,83% suivi du menthol de 18,58% et enfin du 2-hydroxymenthol avec 9,57%. Les trois métabolites ci-dessus cités ont été également rapportés par la littérature comme produits de la biotransformation du thymol par divers microorganismes [150, 151, 152]. (Figure 49).

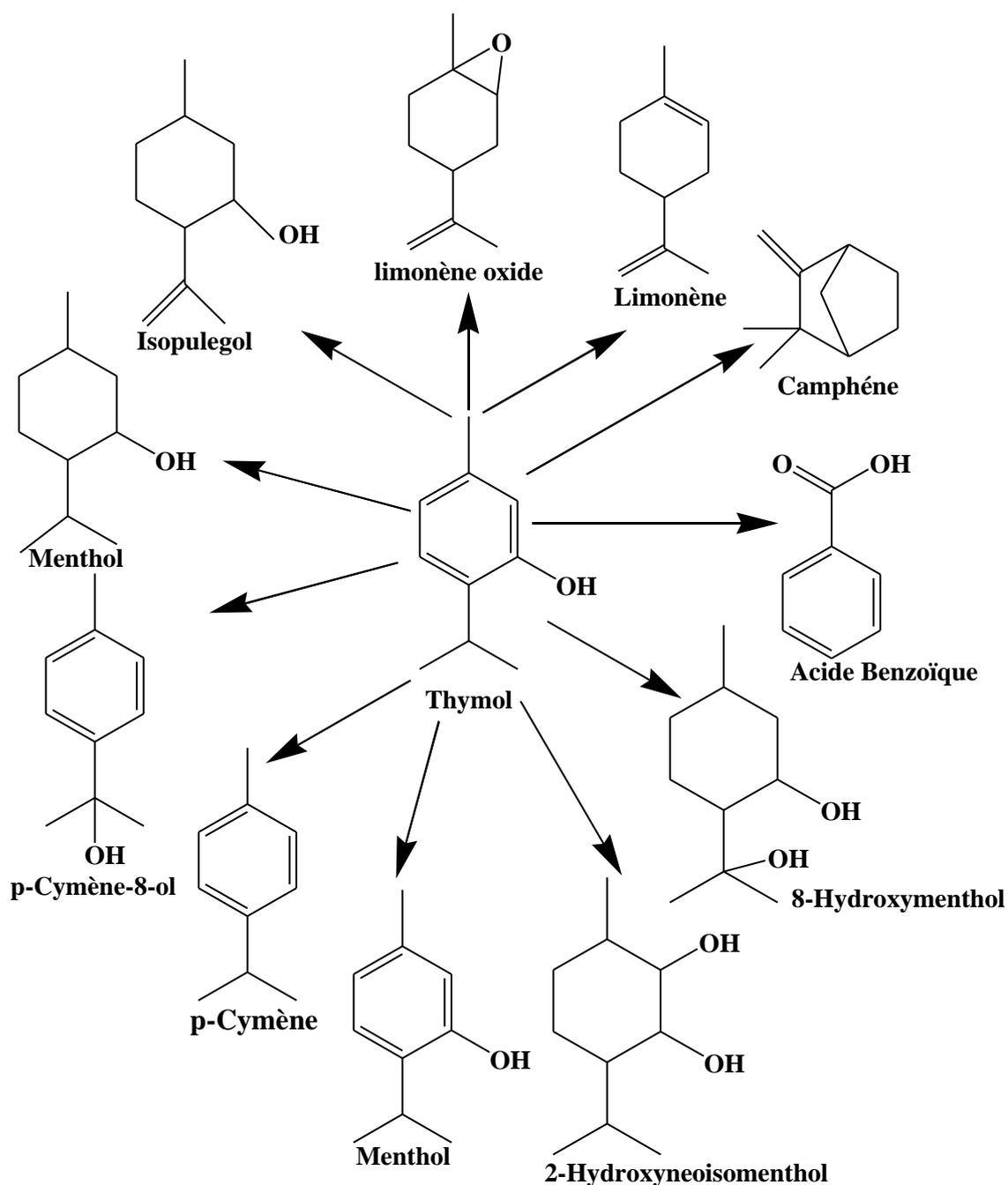


Figure 49 : Voies métaboliques de la biotransformation de thymol par la *Streptomyces* sp. AZ3.

2.4.1.3 Biotransformation de cymène

La biotransformation de cymène par la souche AZ3 a montré le profil chromatographique donné dans l'appendice C ayant mené à l'identification de 09 métabolites (Tableau 16). Les composés identifiés concernent un hydrocarbure monterpénique et 08 monoterpènes oxygénés. Le menthol, l'Indan-5- acide carboxylique et l'acétate de tyrosol sont décrits pour la première fois.

Tableau 16: Biotransformation de cymène par la souche AZ3 (3^{ème} et 7^{ème} jour)

N°	Tr (min)	Nom du composé	LRlcal	LRlIt	Aire(%)	
					3 jours	7 jours
1	5.9	p-Cymène	1025	1026	23.25	-
2	10.01	Alcool phénéthylque	1114	1116	0.45	-
3	12.52	Menthol	1137	1136	17.68	-
4	13.01	Cymène -8-ol	1150	1156	9.48	-
5	17.59	Cymène -7-ol	1290	1289	17.12	-
6	17.69	Carvacrol	1294	1299	18.98	74.13
7	25.07	Indan-5- acide carboxylique	1420	1424	3.50	-
8	27.03	Thymohydroquinone	1562	1559	-	5.34
9	38.46	Acétate de Tyrosol	1568	1567	-	20.53

L'examen de tableau 16 révèle que 76,75% de cymène ont été bioconvertis au troisième jour pour donner par ordre décroissant 18,98% de cravacrol, 17,68% de menthol, 17,12% de cymène -7-ol et 9,48% de cymèn-8-ol. Au bout du septième jour, toute la quantité de cymène a été métabolisée. Le principal produit de la biotransformation de cymène est le carvacrol avec 74,13%. Toute fois et de manière très surprenante, le menthol, cymène -7-ol, cymèn-8-ol avec des teneurs respectives de 17,68%, 17,12%, 9,48%, ont complètement disparait au bout du septième jour, ils ont subi eux même une

biotransformation qui mène au carvacrol. Nous avons également constaté la formation de l'acétate de tyrosol au bout du septième jour avec 20,53%, alors qu'il était complètement absent le premier jour.

En comparant avec les données de la littérature, les produits tels que le carvacrol, le cymène -8-ol, le cymène -7-ol, la thymohydroquinone, et l'alcool phénéthylique obtenus dans cette étude, ont également été produits lors de la bioconversion du cymène à l'aide de *Pseudomonas* sp. et *Penicillium claviforme* MR376 [157,158] (Figure 50).

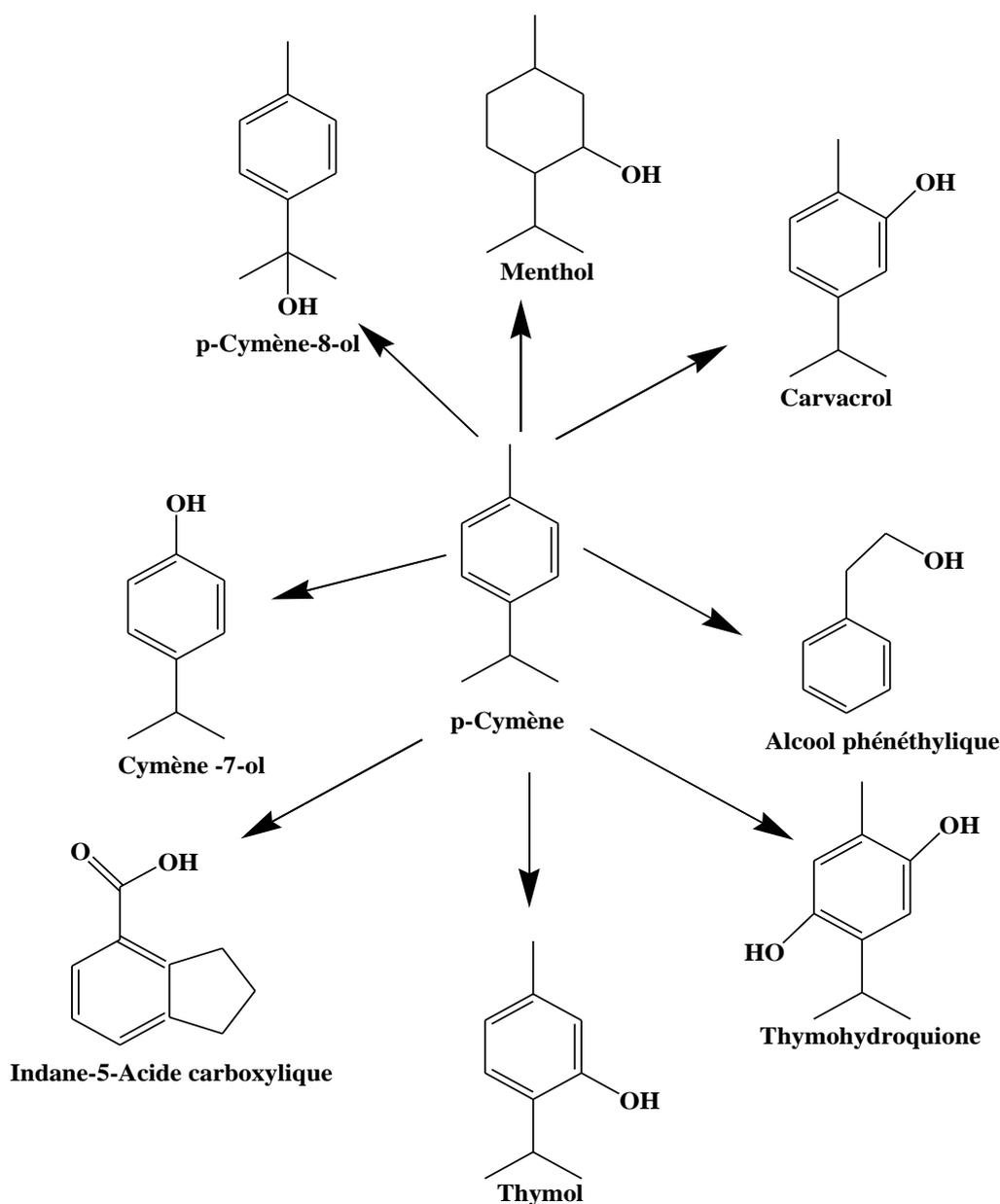


Figure 50 : Voies de bioconversion de cymène par la souche *Streptomyces* sp. AZ3.

2.4.2 Voies plausibles de biotransformation du menthol, thymol et cymène par la souche marine de genre *Streptomyces* sp. AZ3

2.4.2.1 Voies de biotransformation plausibles du menthol par la souche AZ3

Nous allons présenter dans ce qui suit des propositions de voies métaboliques de biotransformation du menthol pour l'obtention des différents métabolites donnés par le tableau 14.

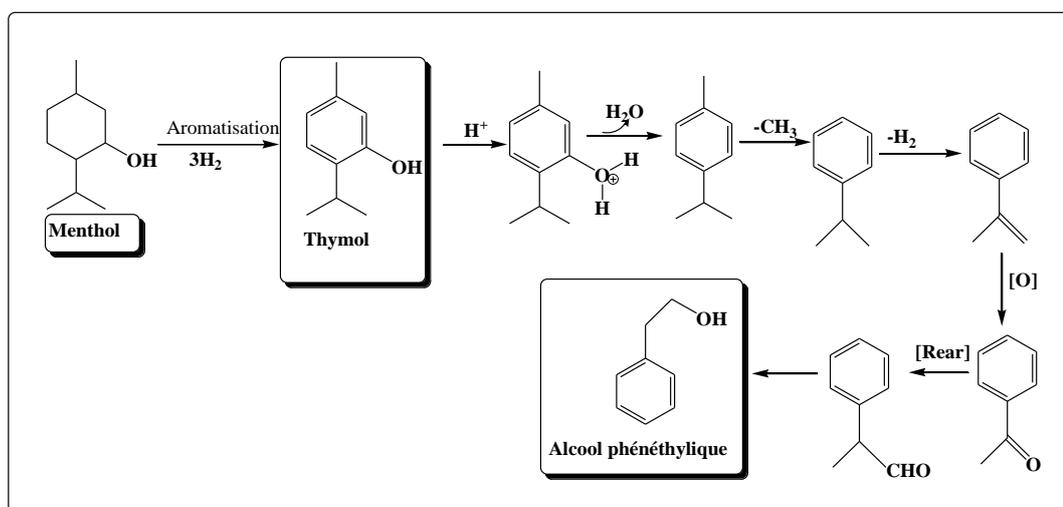


Figure 51 : Voies de biotransformation du menthol en thymol et alcool phénéthylique

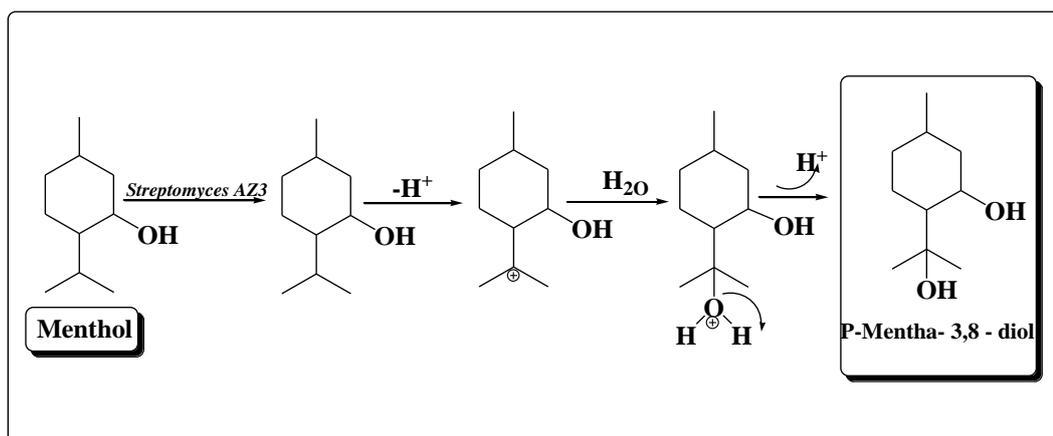


Figure 52: Voies de biotransformation du menthol en p-Mentha-3,8-diol

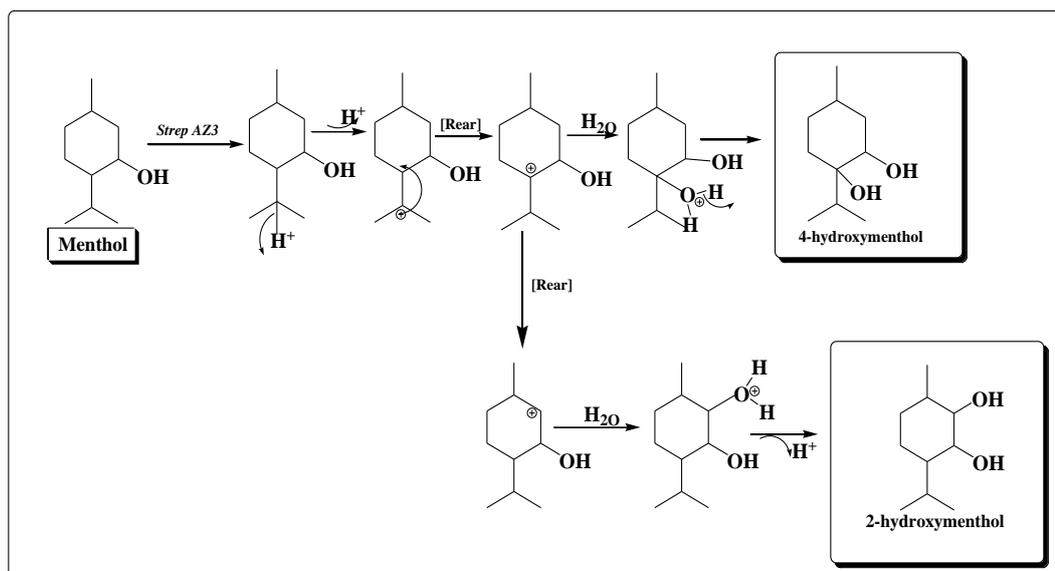


Figure 53 : Voies de biotransformation de en 4-Hydroxymenthol et 2-hydroxymenthol.

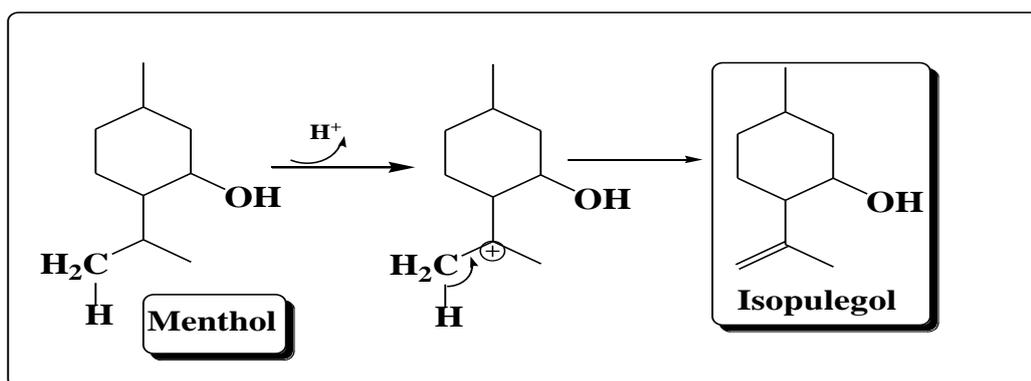


Figure 54: Voie de biotransformation du menthol en Isopulegol.

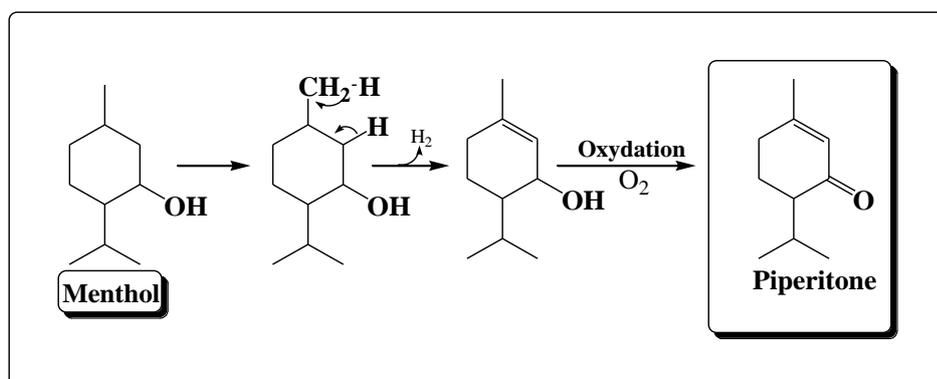


Figure 55: Voie de biotransformation de menthol en pipéritone.

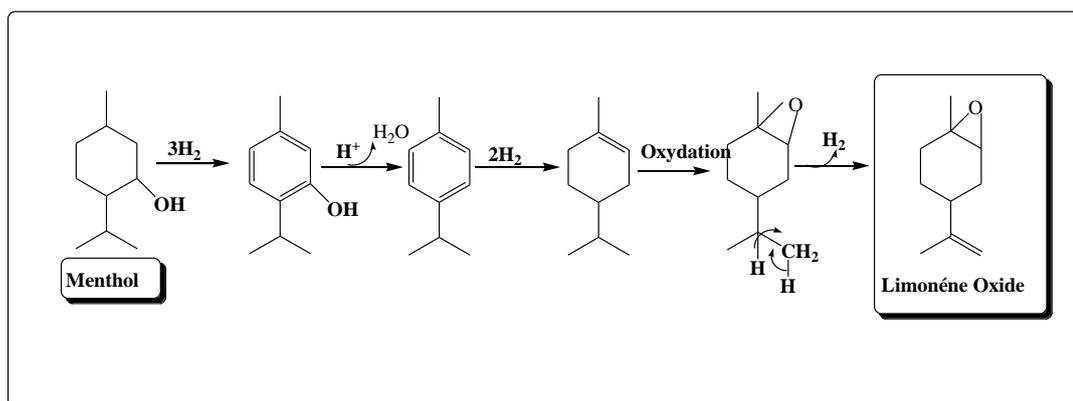


Figure 56 : Voie de bioconversion de menthol en oxyde de limonène

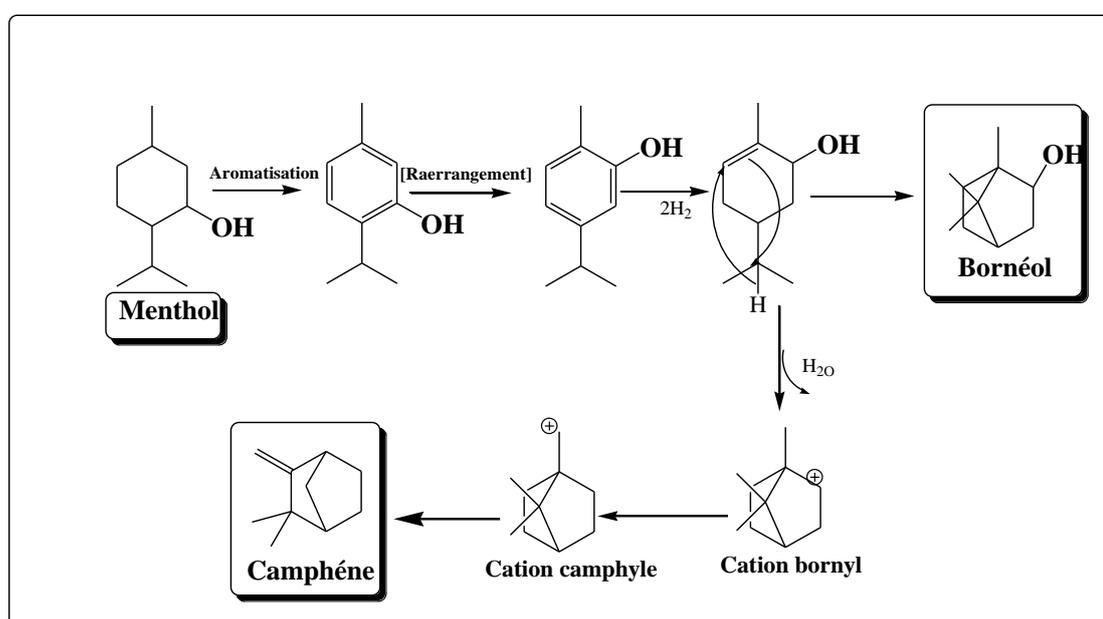


Figure 57 : Voies de biotransformation de menthol en Bornéol et camphène

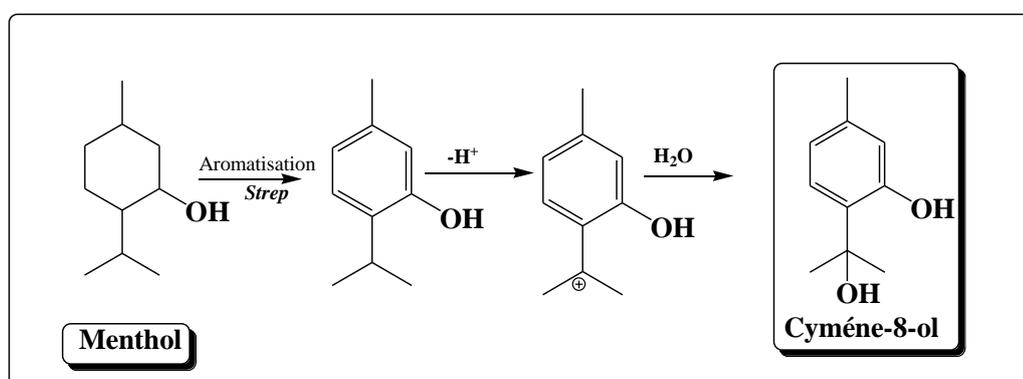


Figure 58: Voie de biotransformation de menthol en Cymène -8-ol

2.4.2.2 Voies probables de biotransformation du thymol par la souche AZ3

Les figures suivantes illustrent les voies de bioconversion de thymol par la souche AZ3 conduisant aux métabolites donnés sur le tableau 15.

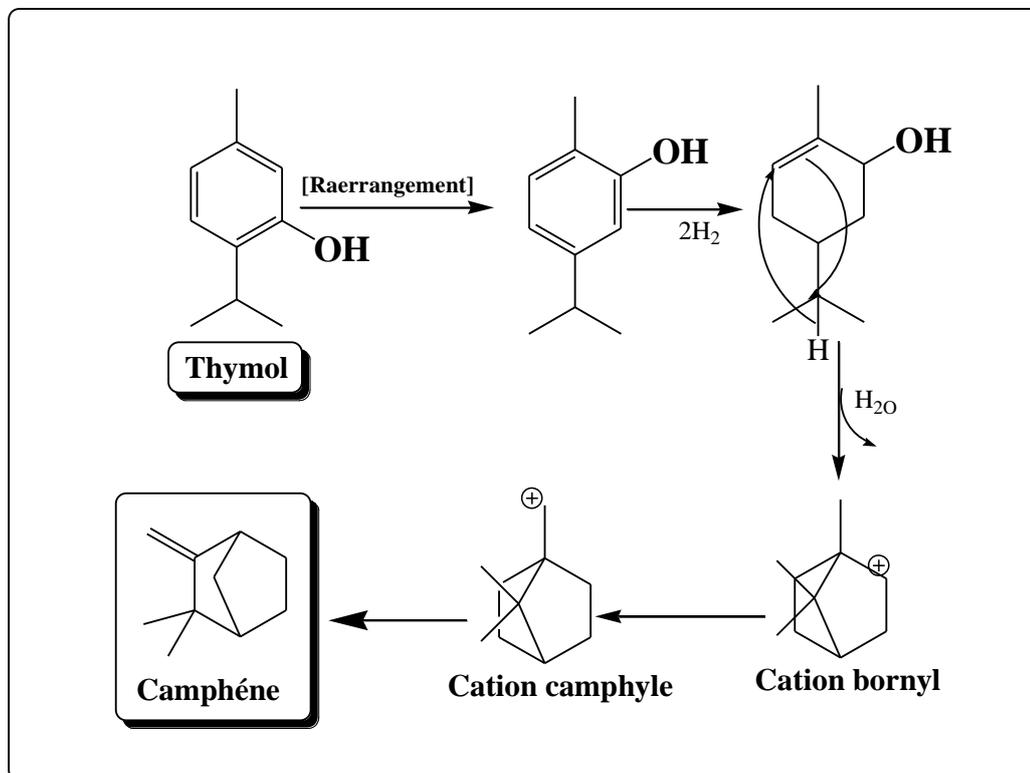


Figure 59 : Voies de biotransformation de thymol en camphène

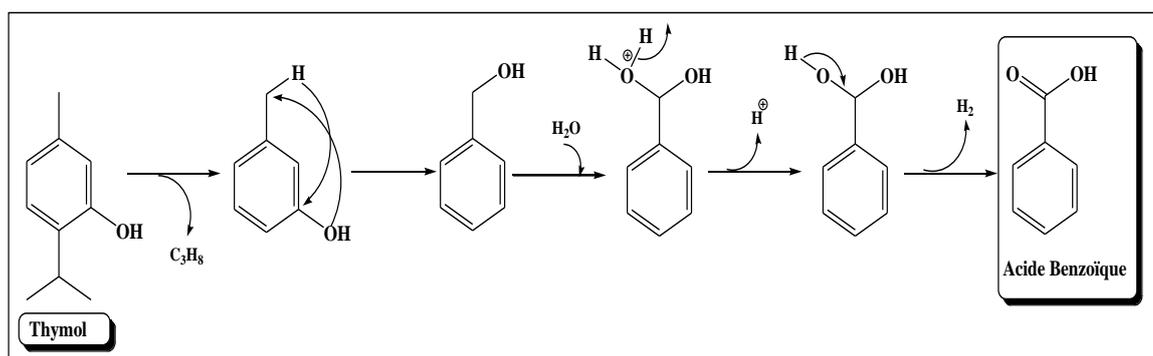


Figure 60 : Voies de biotransformation de thymol en acide benzoïque

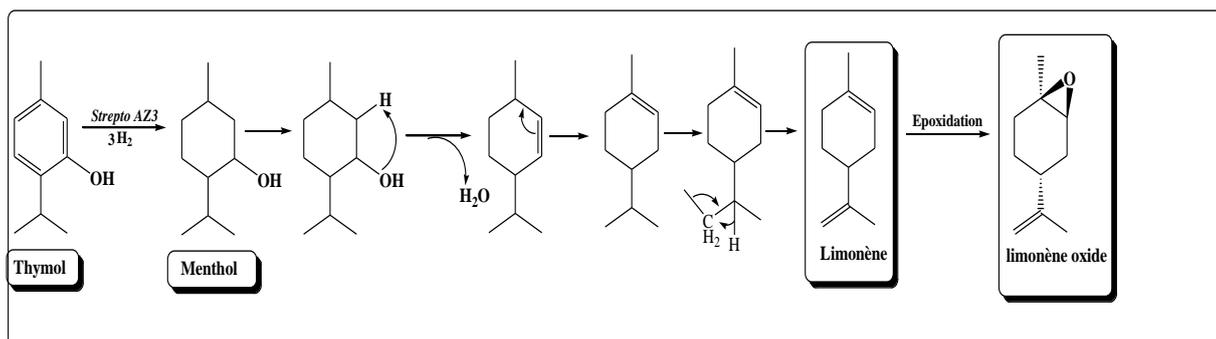


Figure 61: Voies de biotransformation de thymol en limonène et oxyde de limonène

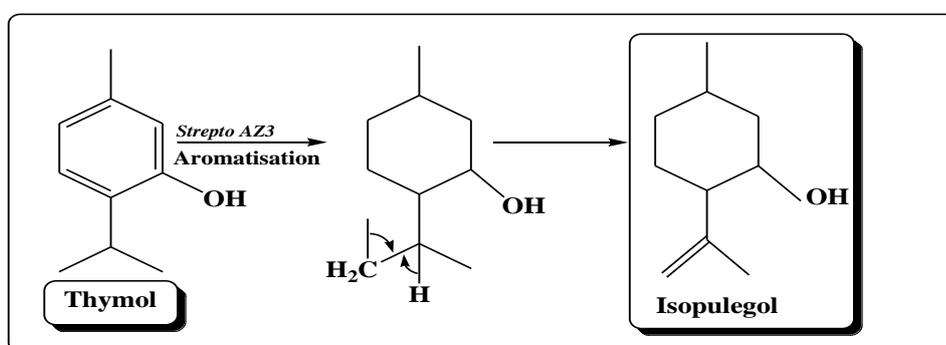


Figure 62 : Voies de biotransformation de thymol en Isopulegol

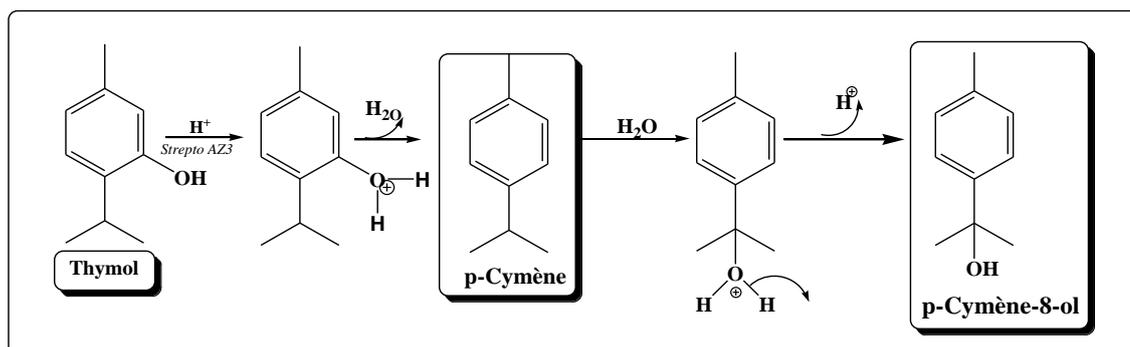


Figure 63: Voies de biotransformation de thymol en p-cymène -8-ol.

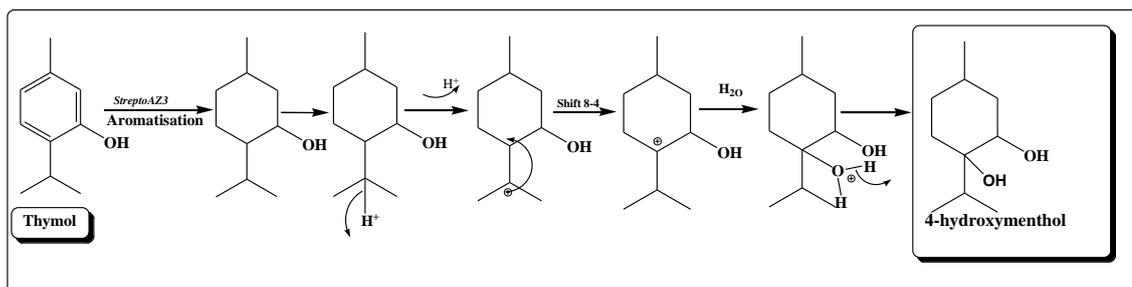


Figure 64 : les Voies de biotransformation de thymol en 4-hydroxymenthol.

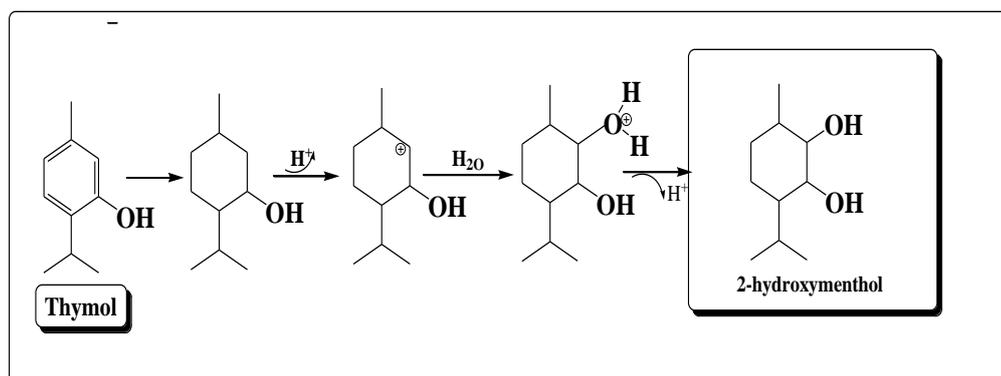


Figure 65 : Voies de biotransformation de thymol en 2-hydroxymenthol.

2.4.2.3 Voies plausibles de biotransformation de cymène par la souche AZ3

Les figures suivantes illustrent les voies de bioconversion de cymène par la souche AZ3 ayant mené à l'obtention des métabolites donnés par le tableau 16.

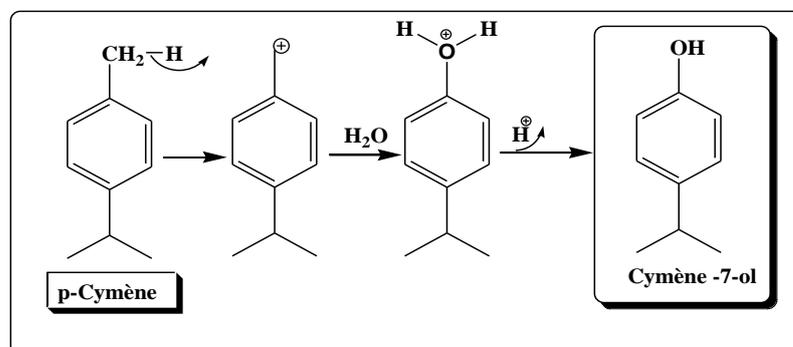


Figure 66 : Voies métaboliques de la biotransformation du cymène en cymène -7-ol

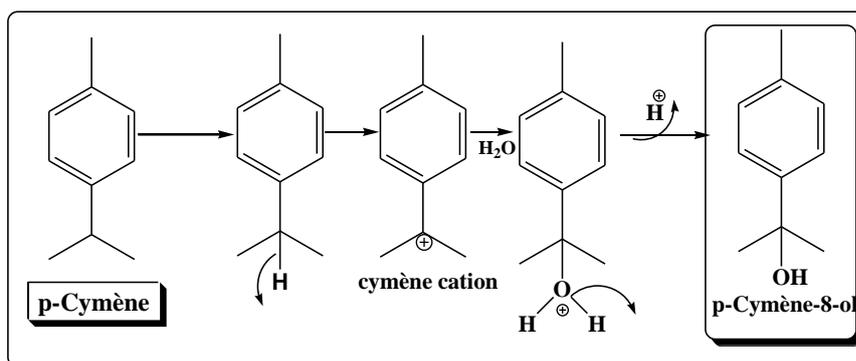


Figure 67 : Voies métaboliques de la biotransformation de cymène en cymène -8-ol.

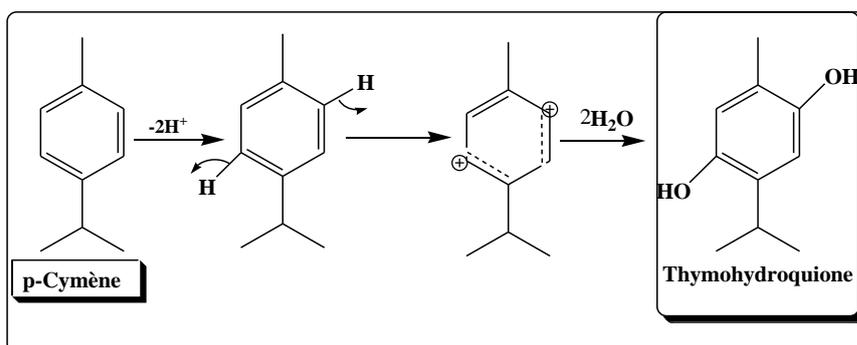


Figure 68: Voies métaboliques de la biotransformation de cymène en thymohydroquinone.

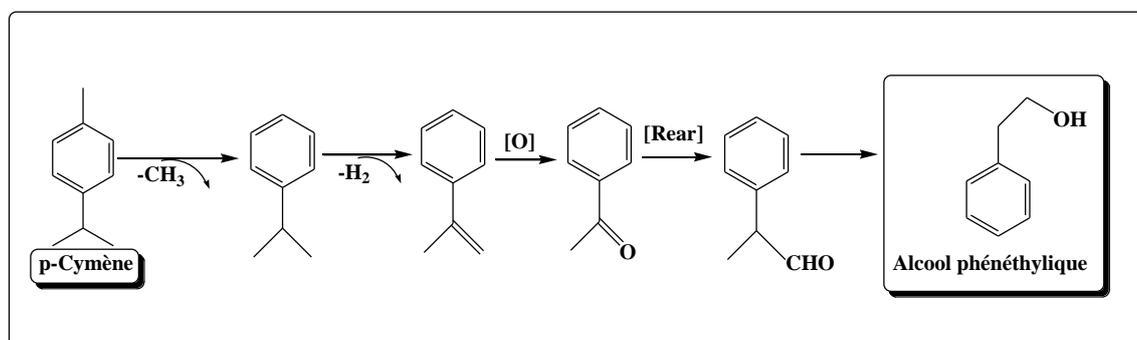


Figure 69: Voies de biotransformation de cymène en alcool phénéthylique.

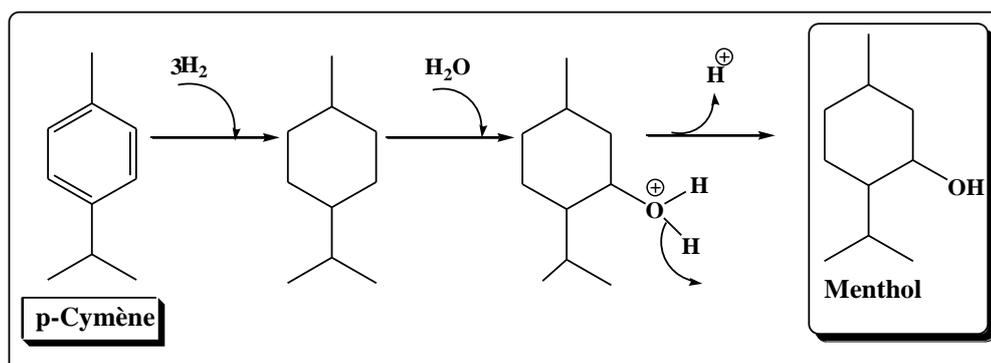
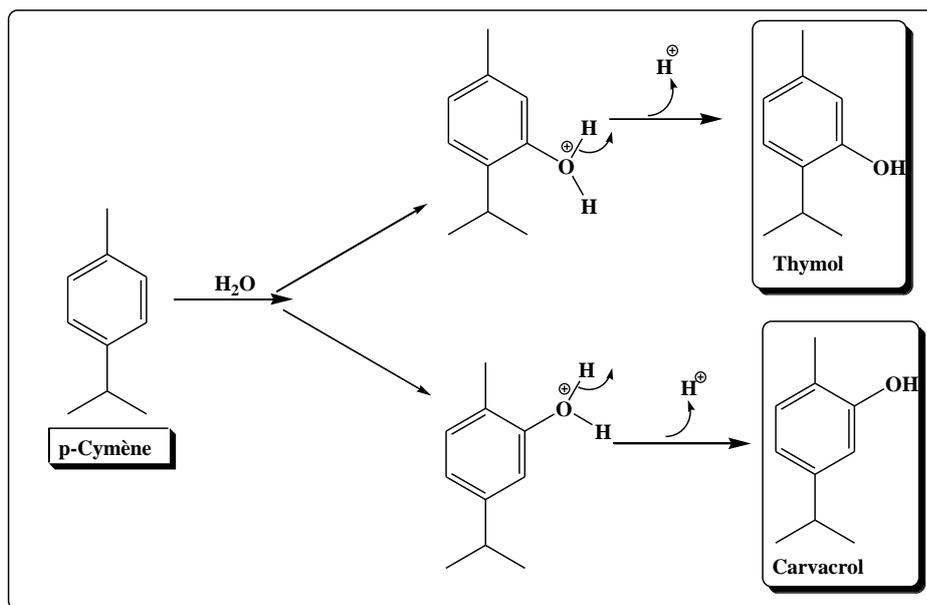
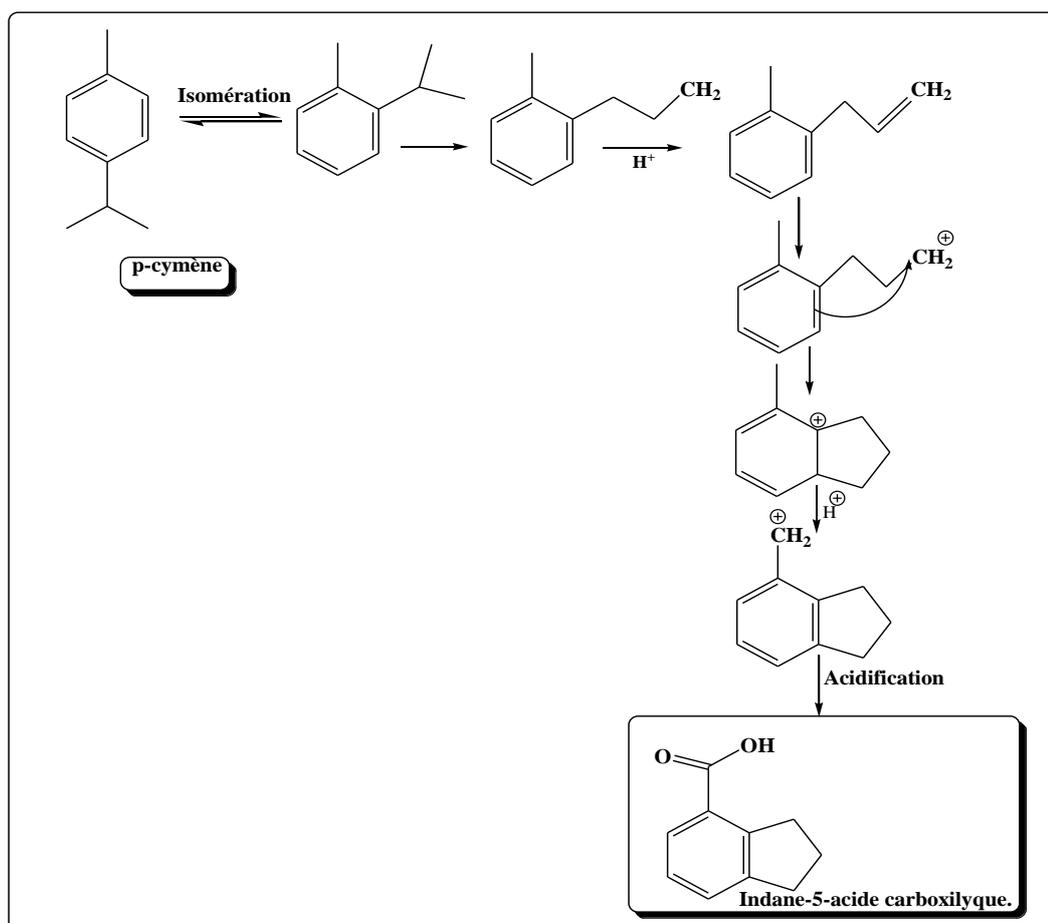


Figure 70: Voies métaboliques de la biotransformation de cymène en menthol.**Figure 71 :** Voies de biotransformation du cymène en thymol et carvacrol**Figure 72 :** Voies de biotransformation de cymène en indane-5-acide carboxylique.

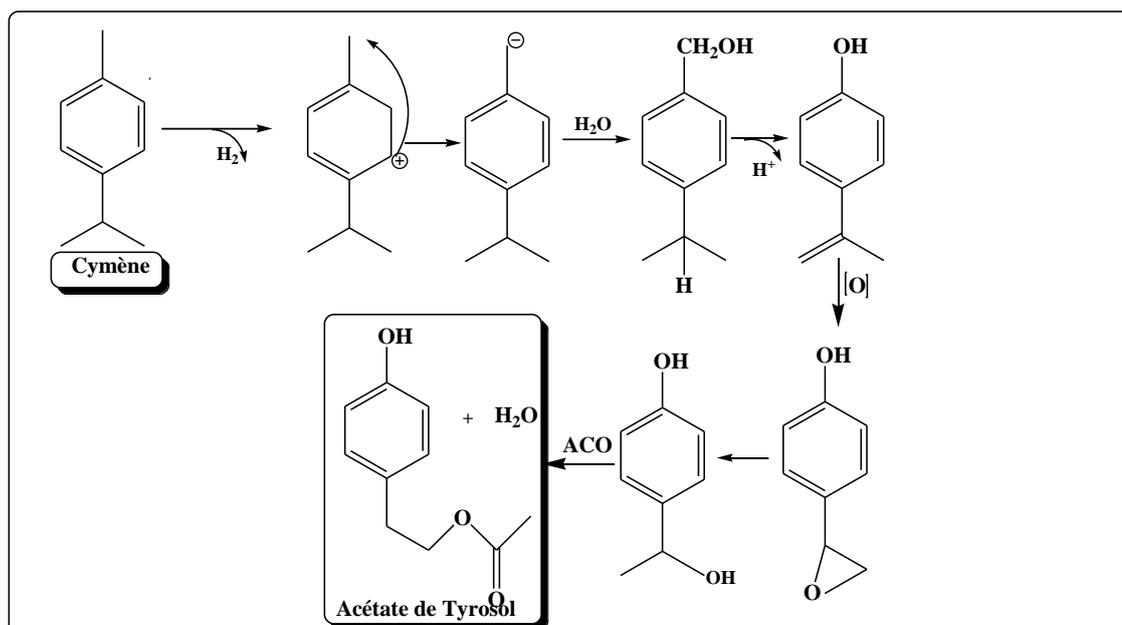


Figure 73: Voies de biotransformation du cymène en acétate de tyrosol.

La souche du genre *Streptomyces* sp. AZ3 nouvellement isolée de l'algue brune *Zonaria tournefortii* prélevée au niveau de la « Corne d'Or » à l'est de Tipaza, est utilisée pour la première fois dans la biotransformation des trois monoterpènes, menthol, thymol et cymène. La biotransformation des monoterpènes par la souche *Streptomyces* sp. AZ3 conduit à la formation de plusieurs produits intermédiaires et finaux de monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés dont certains d'entre eux sont décrits pour la première fois. D'autres produits obtenus par la biotransformation ont déjà été rapportés dans la littérature. Globalement, six voies métaboliques principales ont été observées dans la biotransformation des trois monoterpènes par la souche AZ3 à savoir : hydroxylation, époxydation, hydrogénation, hydrolyse de l'ester, réarrangement, décarboxylation et isomérisation.

L'hydroxylation reste la réaction la plus courante dans les monoterpènes comme dans le menthol, elle produit principalement des dérivés hydroxylés qui sont le 8-hydroxymenthol, 2-hydroxymenthol, 4-hydroxymenthol et le Pipéritone. D'autre part l'hydrogénation ou (aromatisations) comme le cas de la formation de thymol à partir de menthol et *vice versa*. Le réarrangement de Wagner-Meerwein conduit à la formation de bornéol à partir de menthol suivi par une cyclisation C₂-C₈.

Une réaction déshydratation ($-H_2O$) conduisant à la formation de double liaison suivie d'un réarrangement en (C_1-C_2) après la formation du cation 1-8 α -terpiny. En outre, la 1,2-époxydation de la double liaison endocyclique $C=C$ du limonène a produit de l'oxyde de limonène.

Le menthol et le thymol ont été métabolisés en deux acides (l'acide benzoïque acide phénéthylique) à partir d'une réaction d'aromatisation et de déshydratation suivie d'une désalkylation et d'une oxydation.

L'hydrocarbure monoterpénique, à savoir le p-Cymène, est atteint via une réaction de déshydratation dans laquelle le thymol perd une molécule d'eau (H_2O).

Par une réaction simple de bioisomérisation de cymène suivie d'une déshydrogénation, menant à la formation d'un cycle en C_2-C_3 , l'étape d'acidification permet l'obtention d'indan-5- acide carboxylique.

Le tyrosol acétate est obtenu à partir de cymène par une déshydrogénation ($-H_2$) suivie par un réarrangement conduit à la formation d'un carbocation en C_7 . La déshydrogénation ($-H^+$) menant à la formation d'un cation α -terpiny-8, une étape d'oxydation pour former un époxyde qui va hydrolyser en alcool secondaire, l'étape se termine par une carboxylation de l'alcool.

Nous avons proposé des voies métaboliques plausibles (Figure 51-73) ayant conduit par biotransformation du menthol, thymol et cymène aux différents métabolites donnés regroupés dans (les tableaux 14-16). Nous nous sommes basés sur un ensemble de réactions raisonnables pour expliquer les métabolites obtenus. Nous allons essayer de faire une discussion générale des métabolites obtenus par biotransformation des trois monoterpènes.

L'examen des trois tableaux (14-16) permet de noter que sur les trois métabolites ayant subi la biotransformation par la même souche, le cymène a été le plus transformé par la souche en subissant un degré élevé de bioconversion (76,75%) dès le premier jour suivi du menthol de 49,48% et enfin du thymol par 10%. Un résultat tout à fait surprenant au regard parce que le thymol et le cymène possèdent un cycle aromatique très stable, la seule différence est la présence de l'hydroxyle pour le thymol. Nous avons relevé que le principal produit de la biotransformation du thymol et du menthol est le 8-hydroxymenthol, alors que pour le cymène le produit majoritaire de la biotransformation est le carvacrol. Également, nous avons noté que sur les 10 composés obtenus par biotransformation du thymol, 8 composés se retrouvent parmi les 14 composés obtenus par la biotransformation du menthol. Par conséquent, il y avait de grandes ressemblances dans les voies métaboliques de biotransformation du menthol et du thymol. La biotransformation du cymène a conduit à des produits globalement différents en comparaison à ceux obtenus pour le thymol et le menthol à l'exception du menthol et du cymène-8-ol. Il semble tout à fait probable d'avancer que le cycle aromatique n'a pas d'impact direct sur les voies métaboliques de biotransformation. Dans le même point de vue, la biotransformation du cymène a mené à formation d'un produit phénolique doté d'une forte activité antioxydante qui est l'acétate de tyrosol.

Au regard des produits obtenus et des réactions mises en œuvre, il apparaît que notre souche de *Streptomyces* AZ3 possède des capacités très intéressantes qui n'ont pas été décrites chez d'autres souches, avec la mise en œuvre de plusieurs voies métaboliques qui lui permettent de mettre en œuvre des réactions de biotransformation conduisant à de nouveaux métabolites. Ces résultats révèlent la performance notable de notre souche AZ3 d'actinobactéries utilisée dans le présent travail.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les objectifs assignés à ce travail étaient d'une part le criblage d'actinobactéries à forts potentiels biotechnologiques, isolées de l'algue marine *Zonaria tournefortii*, prélevées dans la "Corne" d'Or dans la région de Tipaza. Une vision adaptative a été appliquée pour l'isolement et la caractérisation phénotypique des souches d'actinobactéries obtenues ainsi que pour le criblage des propriétés technologiques de ces souches, à savoir, les activités antimicrobiennes, la production de protéases et de tensioactifs, et d'autre part, la valorisation d'une souche d'actinobactéries dans la biotransformation des monoterpènes pour la production des métabolites secondaires d'intérêt bioactif dans le domaine environnemental et industriel.

Une caractérisation phénotypique préliminaire des souches d'actinobactéries isolées en utilisant des méthodes conventionnelles qui font appel aux caractères d'identification classique (caractéristiques macroscopiques, microscopiques, physiologiques et biochimiques). L'étude des caractéristiques culturelles des isolats sélectionnés, sur milieux de culture solides recommandés par l'international *Streptomyces* Project, a révélé que la majorité d'entre eux présentaient des mycélium aériens dans la série «gris» ou «jaune» produisent des pigments diffusables ou non dans le milieu, la couleur du mycélium était variable en fonction du milieu. Ces tests bactériologiques préliminaires nous ont permis de classer les sept isolats en deux genres, six souches du genre *Streptomyces* et une est affiliée à *Rhodococcus*. Globalement, les écosystèmes algériens abritent une variété intéressante de microorganismes qui peuvent être une source prodigieuse de molécules bioactives d'une grande diversité.

Les résultats de tests d'activité antibactériennes et antifongiques, réalisés par la technique des cylindres d'agar *vis-à-vis* trois bactéries Gram-positif, deux bactéries Gram-négatif, une levure et quatre champignons filamenteux d'origine clinique, montrent que les sept isolats testés possèdent une activité antimicrobienne contre d'au moins un germe cible. L'isolat ayant le spectre le plus large est AZ3 qui possède l'activité antibactérienne la plus importante avec un diamètre de zone d'inhibition de 40 mm et l'isolat AZ4 et AZ9 possèdent une activité antifongique avec un diamètre de

zone d'inhibition de 25 mm. De ce fait, un suivi de la cinétique de production des antimicrobiens sur trois milieux liquides ISP2, AF et Bennett a été effectué en utilisant *Staphylococcus aureus* comme germe cible sensible aux substances produites par notre isolat. D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que le milieu ISP2 donne de grandes zones d'inhibition (moyenne 35 mm), à partir de 3^{ème} jour et ce jusqu'au 7^{ème} jour d'incubation et puis une stabilité de l'activité antimicrobienne a été enregistrée jusqu'à 11^{ème} jour.

La mise en évidence de l'activité protéolytique, réalisée sur un milieu sélectif contenant du lait écrémé (Milk Nutrient Agar), révèle que les sept isolats ont permis la sélection de six souches protéolytiques. Du même, sur la base du test de déplacement d'huile, toutes les souches ont la capacité de production de biosurfactants avec l'huile d'olive et l'huile de table comme meilleures sources de carbone et d'énergie.

La deuxième partie est réservée à l'étude de la biotransformation de trois monoterpènes (menthol, thymol et cymène) par la même souche d'actinobactéries du genre *Streptomyces* codée AZ3 nouvellement isolée à partir de l'algue *Zonaria tournefortii*. L'effet des conditions environnementales sur l'activité catabolique de monoterpènes par la souche AZ3 a été suivie en culture batch réalisée sur milieu ISP2 liquide. Un pH=8 et à une température de 30 °C, la souche AZ3 révèle une croissance rapide pour atteindre un maximum arrivant à (60.03±0,53) mg/L, une augmentation de la croissance microbienne a été signalée en présence de surfactant chimique tween 80 pour une biomasse de 62.54 mg/mL.

L'étude de la biotransformation de trois monoterpènes a conduit à des mélanges d'hydrocarbures et de monoterpènes oxygénés dont certains sont décrits pour la première fois. D'autres produits obtenus ont déjà été rapportés dans la littérature. Les métabolites obtenus ont été extraits à partir du surnageant de culture par extraction liquide-liquide et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dont les principaux composés identifiés sont : le thymohydroquinone ; 8-hydroxymenthol ; piperitenone ; bornéol ; isopulegol ; limonène oxide; carvacrol ; d-Limonène, camphène et tyrosol, acétate appartenant à la classe des monoterpènes.

La souche AZ3 du genre *Streptomyces* transforme les trois monoterpènes d'une manière plus au moins différente par des voies métaboliques basées principalement sur la voie

oxydative donnant ainsi des produits à valeur ajoutée et d'une importance certaine tels que : acétate de tyrosol, alcool phénéthylique, indan-5-acide carboxylique, thymohydroquinone, piperitenone, bornéol ; isopulegol ; limonène oxide; et carvacrol

A la lumière des résultats obtenus, il apparaît que la souche AZ3 affiliée au genre *Streptomyces* appartient à un groupe bactérien très spécifique et connu de ses aptitudes biotechnologiques d'intérêts majeurs, notamment, dans la production de biomolécules de types antibiotiques, protéases et biosurfactants, d'une part et, comme un bioconvertisseur largement recherché dans le domaine des métabolites secondaires tels les monoterpènes, d'autre part.

En perspective de cette étude nous proposons d'ouvrir les créneaux de recherche sur les points suivants :

- Identification moléculaire par la technique de l'ARNr 16S des souches d'actinobactéries isolées de *Zonaria tournefortii*.
- Exploiter les potentialités biotechnologiques des souches d'actinobactéries 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.
- Il est essentiel de travailler à l'échelle pilote la biotransformation de p-cymène par la souche AZ3 vu les résultats discriminants obtenus.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications internationales

Beichi, M., Saidani, F., Mechri, S., Jaouadi, B., El Hattab, M and Badis, A., “Isolation and characterization of Actinobacteria from two marine algae *Asparagopsis armata* and *Zonaria tournefortii* with biotechnological interest”, *Revue Agrobiologia*, V11, n°2, (December 2021), 2600-2608

Communications internationales

1. **Beichi, M.**, Saidani, F., Ferradji, F.Z., Hamiche, S., Badis, A., El Hattab, M., “Contribution de l’étude de la bioconversion et la biodégradation du limonène par des souches du genre *Streptomyces* et *Paenibacillus*”, 1er Congrès International sur les biotechnologies au service du développement durable, (Octobre 2017), Boumerdes

2. **Beichi, M.**, Saidani, F., Ferradji, F.Z., Hamiche, S., Badis, A., El Hattab, M., “Valorisation des souches d’actinobactéries d’origine marine dans la biotransformation des métabolites secondaires ”, Colloque International Biosciences, (Octobre 2018), Oran

3. **Beichi, M.**, Saidani, F., Ferradji, F.Z., El Hattab, M., Badis, A., «Valorisation des potentialités biotechnologiques des souches d’origine marines dans la biotransformation des substances naturelles», Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM), (February 25 to 27), (2020), Tebessa.

Communications nationales

1. **Beichi, M.**, Saidani, F., Ferradji, F.Z., Badis, A., El Hattab, M., “Contribution à l’étude des propriétés technologiques chez des souches marines d’acténobactéries isolée de l’algue rouge « *Asparagopsis armata* »: Emulsifiante, Hémostatique, Protéolytique et Antimicrobienne“, 1^{er} Séminaire National sur la Chimie Analytique, Matériaux et Substances Naturelles CAMSN 2019, (17 Décembre 2019), Blida

2. **Beichi, M.**, Saidani, F., Ferradji, F.Z., El Hattab, M., Badis, A., “Biotransformation de D(+) limonène par une souche d’actinobactéries nouvellement isolée de l’algue brun "*Zonaria tournefortii*"“, 1^{ère} journée National de Génie de l’Environnement et Développement Durable (GEDD 2019), (15 Décembre 2019). Blida.

APPENDICES

Appendice A : Liste des abreviations

ISP : International *Streptomyces* Project

ATCC: American Type Culture Collection

ARNr : Acide RiboNucléique Ribosomique

C : Degré Celsus

pH: Potentiel Hydrogène

VNSS : Väätänen Nine Salt Solution

LB : Milieu *Luria Bertani*

GN : Gélose Nutritif

GNL : Gélose Nutritive au Lait

MM : Milieu Minéral

UFC : Unités Formant Colonies

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

AN : Agar Nutritif

PPG : Pyrophosphate de Géranyl

PPF : Pyrophosphate de Farnésyle

PPGG : Pyrophosphate de Géranylgéranyle

VF : Viande-Foie

AAF : Aéro-anaérobie Facultatif

dh : diamètre du halo

dc : diamètre de colonie

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

tr.min⁻¹ : tourne par minute

rpm : Rotation par minute

mVOCs : Composés organiques volatils microbiens (**M**icrobial **V**olatile **O**rganic **C**ompounds)

DDP : **D**éplacement **D**e **P**étrole

CCM : Chromatographie sur **C**ouche **M**ince

CG/SM : Chromatographie en phase **G**azeuse associée à la **S**pectrométrie de **M**asse

EI : Ionisation **E**lectronique

eV : électron-**V**olt

LR_{ical} : Indice de rétention linéaire calculé.

LR_{lit} : Indice de rétention linéaire littérature.

AppendiceB : Composition des milieux de culture**Le milieu ISP 2**

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose	4g
Eau distillée	1000ml
Agar	20g
pH = 7,2	

Le milieu ISP 1

Extrait de levure.....	3g
tryptone	5g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
PH = 7, 2	

Le milieu ISP 3

Farine d'avoine	20g	
Solution saline.....	1ml	
Agar	20g	
Eau distillée.....	1000ml	PH = 7, 2

Le milieu ISP 4

Amidon soluble.....	10g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄	1g
NaCl	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
CaCO ₃	2g
Solution saline;	1ml
Agar	20

Le milieu ISP5

Glycérol	10g
----------------	-----

L-Asparagine	1g
Solution d'oligo-éléments	1ml
Eau distillée	1000ml
Agar	20g

Le 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

Le milieu ISP 7

Glycérol	15 g
L-Tyrosine	0,5 g
L-Asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,8 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,2

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

Le Milieu AF

Agar.....15g/l
 Extrait de levure.....4g/l
 Extrait de malt.....10g/l
 Glucose.....2g/l
 NaCl.....2,5g/l
 CaCO₃.....1 g/l
 PH : 7,0

Le Milieu Bennett

Agar.....15g/l
 Extrait de levure2g/l
 Extrait de viande.....1g/l
 Peptone2g/l
 Glucose.....10g/l
 PH : 7,3

Gélose viande foie

Extrait de viande10 g
 Peptone20 g
 Extrait de levure10 g
 Glucose5 g
 Eau distillée1000 ml
 Agar20 g

Solution d'oligo-éléments

FeSO₄ 7H₂O0,1 g
 MnCl₂ 4H₂O0,1 g
 ZnSO₄ 7H₂O0,1 g
 Eau distillée1000 ml

Le milieu Muller Hinton (MH)

Extrait de viande2 g
 Hydrolysate acide de caséine ...17,5g

Amidon	1, 5 g,
Agar	18 g ;
Eau distillée	1000 m

Le milieu *Luria Bertani* (LB)

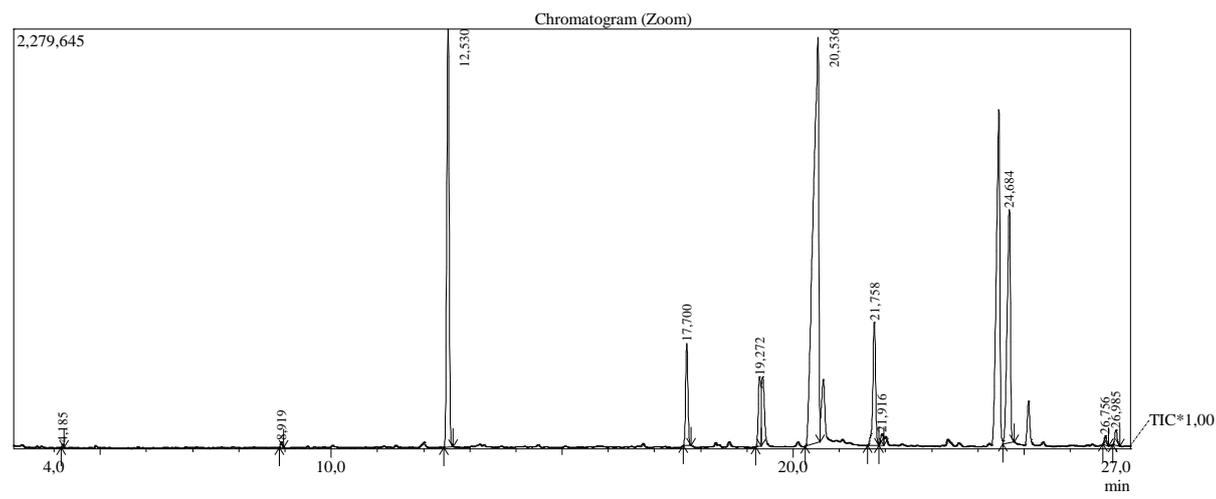
Peptone.....	10 g
Extrait de levure	5.0 g
NaCl.....	10 g
Eau distillée	1000 mL

Le milieu *Sabouraud*

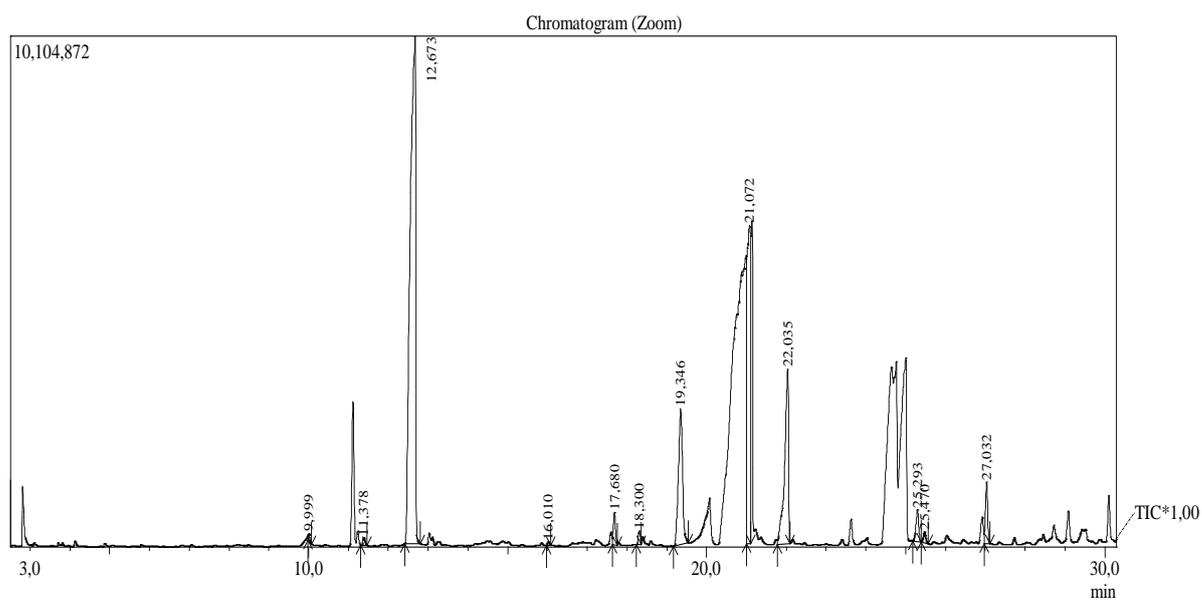
Peptone.....	10.0 g
Glucose ou Dextrose	40.0 g
Agar	15.0 g
Eau distillée	1000 mL

Appendice C: les profils chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la biotransformation des monoterpènes par la souche *Streptomyces sp AZ3*.

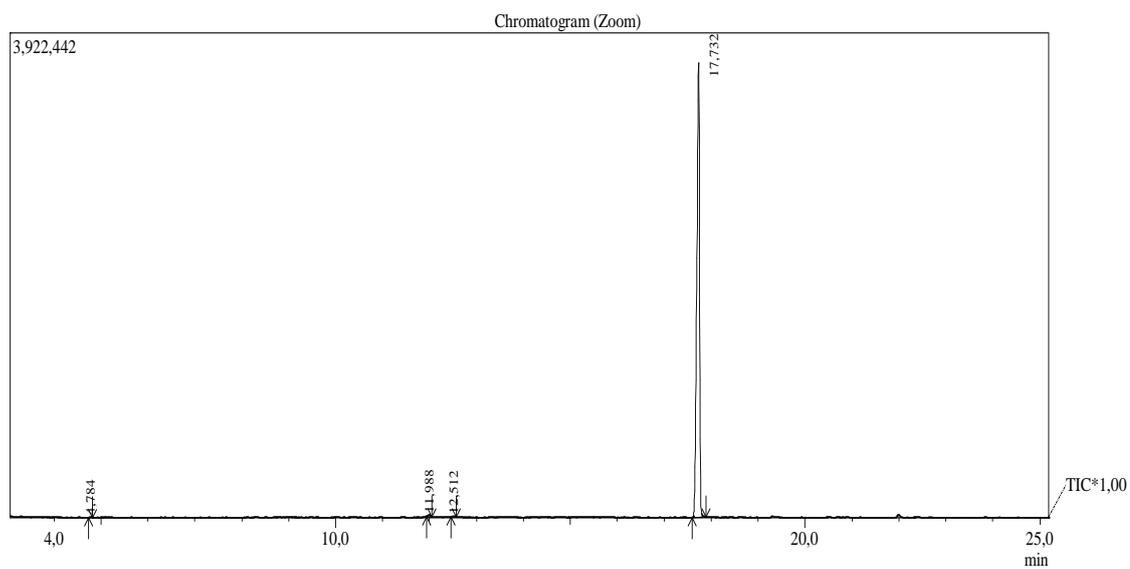
(a)

(a) Biotransformation de menthol en 1^{ère} jour

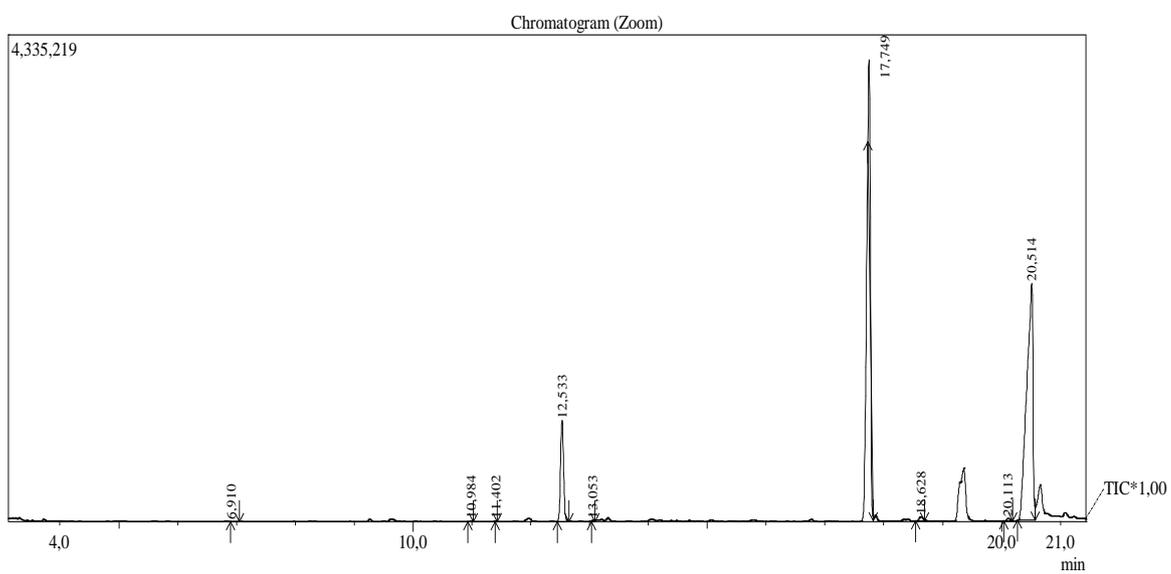
(b)

(b) Biotransformation de menthol en 7^{ème} jour.

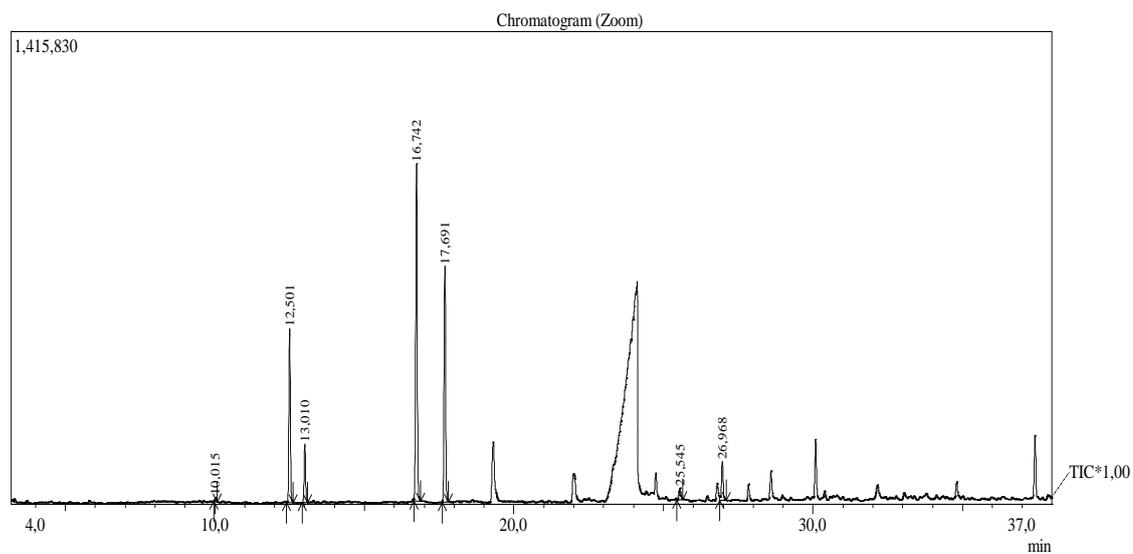
(c)

(c) Biotransformation de thymol en 1^{ère} jour

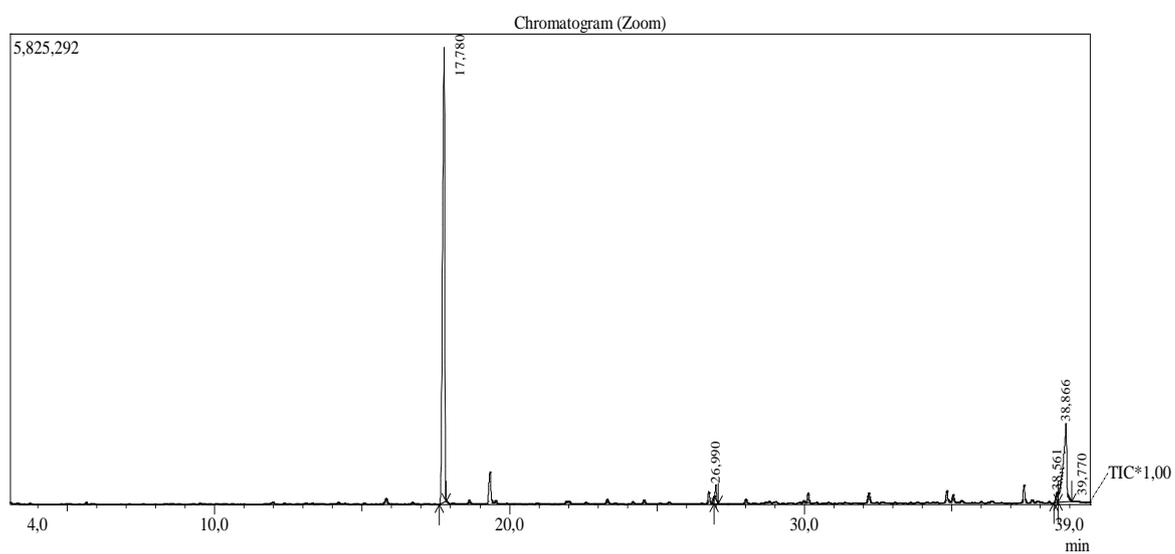
(d)

(d) Biotransformation de thymol en 7^{ème} jour.

(e)

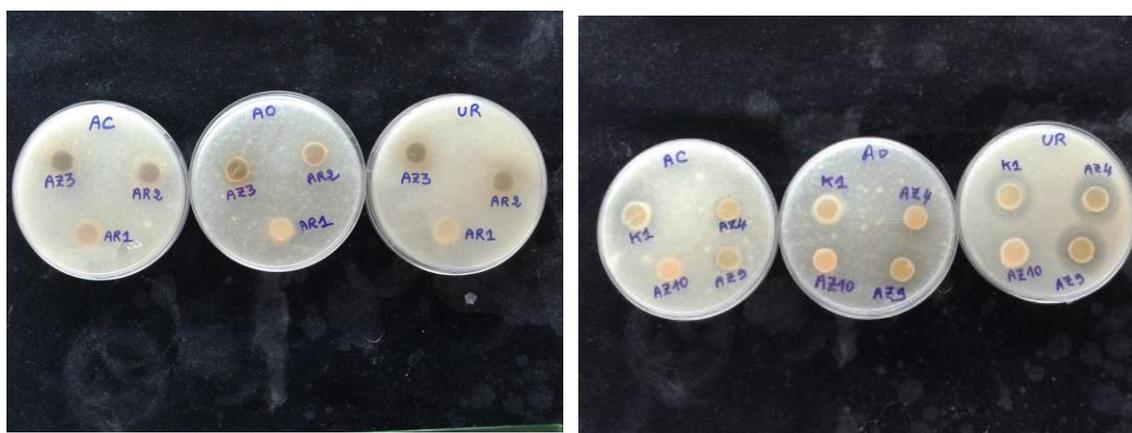
(e) Biotransformation de cymène en 1^{ère} jour

(f)

(f) Biotransformation de cymène en 7^{ème} jour



Activités antibactériennes des isolats d'actinobactéries déterminées par la méthode du cylindre d'agar contre les germes cibles.



Activités antifongiques d'isolats d'actinobactéries déterminées par la méthode du cylindre d'agar contre les germes cibles

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Qasim, S.Z, “The Indian Ocean: images and realities”, *Oxford and IBH, New Delhi*, (1999), 57-90.
2. Lakrid, K ; adda, L ; et kirdi, B, « *Evaluation des activités des extraits d’algue sur la performance de génotypes de pois chiche* », (2020), thèse de Doctorat.
3. Jensen, P.R, et Fenical, W, “Marine Microorganisms and Drug Discovery: Current Status and Future Potential”, *Drugs from the Sea*. Basel, Karger, (2000), 6-29.
4. Berdy, J, “Bioactive microbial metabolites”, *The Journal of antibiotics*.Antibiot, V 58, (January 2005), 1-26.
5. Souraya, B.T et al. «Étude de la production des protéases et d’antibiotiques par une souche de *Streptomyces* isolée d’un sol de la Mitidja (Algérie)». Thèse de Doctorat, Département de Sciences Naturelles, à l’Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba ; (février 2016).
6. Solecka, J; Zajko, J; Postek, M and Rajnisz, A, (2012) “Biologically active secondary metabolites from actinomycetes” , *Open Life Sciences*, V 7, n° 3, (April 2012), 373-390.
7. Hopwood, D, “An introduction to the actinobacteria”, *Microbiology Today*, V 34, n° 2, (May 2007), 60-61.
8. Gupta, R; Beg, Q.K; Khan, S. et Chauhan, B., “An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 60, (2002), 381-395.
9. Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M. et Bejar, S., “Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency”, *Biochimie*, V. 90, n°9, (2008), 1291-1305
10. Bousaab, H., « Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries Immobilisées sur *Luffa cylindrica* », thèse du doctorat, université de Haute Alsacen, France, (2011).

11. Adams, A.; Demyttenaere, J.C, and De Kimpe, N.; "Biotransformation of (R)-(+)-and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*—investigation of the culture conditions." *Food Chemistry*, V 80, n° 4 (2003), 525-534.
12. Ferrara, M.A, et al.; "Bioconversion of R-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica*.", *Brazilian Journal of Microbiology*, V 44 , (2013), 1075-1080.
13. Toniazzo, G, et, al.; "Biotransformation of (-) β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. » In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, (2005), 837-844.
14. Badee, A.Z.M., Helmy, S.A., and Morsy, N.F.; "Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202)." *Food Chemistry*, V 126, n°3, (2011), 849-854.
15. Yan, X.; Chuda, Y.; Suzuki, M.; and Nagata, T.; "Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis* a common edible seaweed", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, V 63, n°3, (January 1999), 605–7.
16. Beetul, K.A.; Gopeechund, D.; Kaullysing, S.; Mattan-Moorgawa, D.; Puchooa, and R, Bhagooli, "Challenges and opportunities in the present era of marine algal applications", *Algae-Organisms for imminent biotechnology* , V 40, (2016), 278-280
17. Buschmann, A. H., Camus, C., Infante, J., Neori, A., Israel, A., Hernandez-Gonzalez, M.C., Pereda, S.V., Gomez-Pinchetti, J.L., Golberg, A., Tadmor-Shalev, N, et al., "Seaweed production: Overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity", *European Journal of Phycology*, V 52 , n°4, (October 2017), 391–406.
18. Floc'h, J.Y et Leclerc, V, «Les secrets des algues», (2010), 1-168
19. Ribier, J., et Godineau, J.C. "Les algues: connaissance, utilisation, culture: avec des clés simples de détermination des algues du littoral de la Manche et de l'Atlantique.", *La maison rustique*, (1984), 281p.
20. Gayral, P. et Cosson, J, "Connaitre et reconnaitre les algues marines", *Ouest France* : (1986), 222p.
21. De Reviere, B., "Biologie et phylogénie des algues", Paris, Ed. Belin, (février 2003), 256 p

22. Lûning, K. et Dring, M.J., "Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli", *Marine Biology*, V. 87, (January 1985), 119-129.
23. Lûning, K., "Seaweeds Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology", John Wiley and Sons, Inc, (1990), 527p.
24. Boudouresque, C.F., Meinesz, A. et Verlaque, M., "Guide des algues des mers d'Europe : méditerranée", Paris : Ed. Delachaux et Niestlé, (1992), 239-226.
25. Alves, C., Silva, J., Freitas, R., Pinteus, S., Reboleira, J., Pedrosa, R. et Bernardino, S., "Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements. Chapter 3.35 - Red Algae", *Academic Press*, (2019), 375-382.
26. 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. et Suárez-Alfonso, A.M., "Marine red algae from central-southern coast of Cuba", *Regional Studies in Marine Science*, V. 25, (January 2019), p 100450
27. Round, F.E., "The taxonomy of the Chlorophyta", *British Phycological Bulletin*, V.2, n° 4, (July 2007), 224-235.
28. Fang, L., Leliaert, F., Zhang, Z.H., Penny, D. et 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.
29. 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.
30. Wehr, J.D., Sheath, R.G., et Kociolek, J. P. "Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification, A volume in Aquatic Ecology", *Academic Press, Elsevier*. (2015), 851-871.
31. Kornprobst, J.M. "Substances naturelles d'origine marine, chimiodiversité, pharmaco-diversité, biotechnologie", Ed. TEC & DOC, (2005), 160-191.
32. Debray, F., "Catalogue des algues du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie", Alger : Ed. HJourdan, (1893), 78p.
33. Phillips, J.A., "Genus and species concepts in *Zonaria* and *Homoeostrichus* (Dictyotales, Phaeophyceae), including the description of *Exallosorus* gen. Nov. ", *Journal of Phycology*, V. 32, (August 1997), 303-311.

- 34.** Hillson, C.J., "Seaweeds, A Color-Coded, Illustrated Guide to Common Marine Plants of the East Coast of the United States", Pennsylvania State University, (1977), 194p.
- 35.** Cabioch, J., Floch, J.Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C.F., Meinesz, A. et Verlaque, M., "Guide des Algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique", Ed. Delachaux et Niestlé, (1992), 231p.
- 36.** Soria-Mercado, I.E., Villarreal-Gómez, L.J., Guerra-Rivas, G. et Ayala-Sánchez, N.E., "Bioactive Compounds from Bacteria Associated to Marine Algae", *Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*, (2012), 25-44.
- 37.** Martin, M., Portetelle, D., Michel, G. et Vandenberg, M., "Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications", *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 98, (2014), 2917-2935.
- 38.** Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F., "Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria", *Marine Ecology Progress Series*, V. 409, (2010), 267-300.
- 39.** Hollants, J., Leliaert, F., Clerck, O.D. et 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.
- 40.** 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, (2006), 348-357.
- 41.** 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, (May 2006), 167-173.
- 42.** Nishijima, M., Takadera, T., Imamura, N., Kasai, H., An, K. Adachi, K. D, 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, (July 2009), 1696-1707,
- 43.** Shiba, T., Taga, N., "Heterotrophic Bacteria Attached To Seaweeds", *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, V 47, n° 3 (April 1980); 251-258,.

44. Chandan, S., Aman, j., Sivakumar, J. and Malaiyarasa pandian, P., "Surface associated bacteria of marine algae in kovalam beach, Chennai, had screened for its antifouling activity ", INDIAN J. MAR. SCI, V 42 n° 4, (August 2013), 489-502.
45. Kossuga, M.H. *et al.*"Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites ", Journal of Pharmacognosy, V 22, n°2, (April 2012), 257-267.
46. 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 ", JKAU: Mar. Sci, V 21, (August 2010), 53-64.
47. Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. and Imhoff, J. F.,"Phylogenetic analysis and antibiotic activity of bacteria isolated from the surface of two co-occurring macroalgae from the Baltic Sea ", European Journal of Phycology, V 48 n°1, (Mars 2013), 47-60.
48. Wiese,J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberger, T., Imhoff, J. F., "Diversity of Antibiotic-Active Bacteria Associated with the Brown Alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea ", Mar Biotechnol, V 11, (October 2009), 287-300.
49. Lachnit, T., Blümel, M., Imhoff, J. F., Wahl, M., "Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat ", Aquat Biol, V 5, (April 2009) , 181-186
50. Lee, Y. K., Jung, H. J., and Lee, H. K., " Marine Bacteria Associated with the Korean Brown Alga, *Undaria pinnatifida* ", The Journal of Microbiology, V 44, , (2006), 694-698.
51. Abdel-Lateff, T.; Okino, W.M.; Alarif, S.; Al-Lihaibi, S.; " Sesquiterpenes from the marine algicolous fungus *Drechslera* sp ", Journal of Saudi Chemical Society, V 17, n° 2, (April 2013), 161-165.
52. El-Gendy, M.M.; Hawas, U.W., Jaspars, M., "Novel Bioactive Metabolites from a Marine Derived Bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000 ", J. Antibiot, V 61, n°6, (2008), 379-386
53. Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, S., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y. et van Wezel, G.P., "Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*", Microbiology and Molecular Biology Reviews, V.80, (November 2016), 1-43.

54. Waksman, S.A.; "The Actinomycetes Nature, occurrence and activities. Williams and Wilkins Co", Baltimore; V 1, (1959).
55. Grein, A., Meyers, S.P.; "Growth characteristics and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and materials suspended in sea water", *Journal of Bacteriology*, V 76, n° 5, (April 1958) , 457-463.
56. Okami, Y., Okazaki, T.; "Studies on marine microorganisms. III. Transport of spores of actinomycete into shallow sea mud the effect of salt and temperature on their survival", *Journal of Antibiotics*, V 27, n° 4, (1974), 240-247
57. Okazaki, T., Okami, Y.; "Actinomycetes tolerant to increased NaCl concentration and their metabolite", *Journal of Fermentation and. Technology.*, V 53, (1975) , 833-840.
58. Weyland, H.; "Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments", *Nature* V 223, n° 5208, (August 1969), 223:858.
59. Jensen, P., Dwight, R., Fenical, W.; "The distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments", *Applied and Environmental Microbiology*. V 57, n° 4, (April 1991), 1102-1108.
60. Ghanem, B.N., Soraya, A.S., Zeinab, M.E., Gehan, A.A.E.; "Isolation and enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria", *Appllied Microbiology*, V 46, n° 3, (July 2000), 105-111.
61. Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Mincer, T.J., Wrad, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M., "Salinispora arenicola gen. nov., and Salinispora tropica nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family" *Micromonosporaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, V 55, n° 5, (September 2005), 1759-1766.
62. Das, S., Lyla, P., Khan, S.A. (2006): Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*. 90:1325-1335.
63. Cho, J. Y., Kwon, H. C., Williams, P. G., Jensen, P. R., & Fenical, W.; "Azamerone, a terpenoid phthalazinone from a marine-derived bacterium related to the genus Streptomyces (Actinomycetales)", *Organic Letters*, V 8, n°12, (May 2006), 2471-2474.
64. Goodfellow, M., Kampfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B.; "Taxonomic outline of the phylum Actinobacteria.", In: Whitman WB Editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. New York, V 1 , (2012), 2024.

65. Labeda, D.P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A.C., Lanoot, B., Vannanneyt, M.; Swings, J. *et al.*; “Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae”; *Antonie van Leeuwenhoek*, V 101, (2012), 73-104.
66. Kim, B.S., Lonsdale, J., Seong, C.N., et Goodfellow, M.; “*Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae”, *Ant. V Leeuwenhoek*, V 83, (January 2003), 107-116.
67. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., « Microbiologie. De Boeck & Larcier ». France. (2003).
68. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., “Bergey’s manual of determinative bacteriology”. (Eighth edition), *The Williams and Wilkins Co., Baltimore*, (1974) , 747 – 842.
69. Shirling, E. B., Gottlieb, D., “Methods for Characterisation of Streptomyces Species”, *International journal of systemic Bacteriology*, V 16.,(1966), 313-340
70. Dommergues, Y., et Mangenot, F., « Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.)”, Paris; (No. 631.461 DOM), (1970).
71. Omura, S. “Trends in the search for bioactive microbial metabolites”; *J.ind. Microbiol* ,V 10.,n° 3-4, (septmeber1992), 135-156.
72. Zouaghi, A., « Optimisation de la production de l’Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus* », Diplôme National d’Ingénieur. Université de Carthage, (Novembre 2007), 12p
73. Smaoui, S., «Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés», en vue de l’obtention du doctorat , Toulouse ,(2010), 22p.
74. Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M.; “Introduction to and importance of the actinomycetes”, In: « The biology of the actinomycetes », London, Academic Press, (1984), pp. 1-6.
75. Holzapfel, W., Brost, I., Faerber, P., Geisen, R., Bresch, H., Jany, K.D., Mengu M., Jakobsen, M., Steyn, P.S., Teniola, D., Addo, P, “Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone “, *PCT Int. Appl.*, (2002), p. 19.
76. Abbas, I.H., “A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait”, *J. Appl. Sci. Res*, V 2, n°10, (May 2006), 809-815.

77. Valan Arazu, M; Duraipandiyan, V; Agastian, P; Ignacimuthu, S.; "In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock " , (India), V 19, n° 1, .(March 2009), 22-28.
78. Rawasheh, R., Saadoun, I., et Mahasneh, A., "Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace", *Afri. J. of Biotechnol.*, V 4, n° 3, (February 2005), 251-255.
79. Boyd, K.G., Adams, D.R. & Burgess, J.G., « Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces », *Biofouling, Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, V 14, n° 3, (Jan 1999)., 27-236
80. Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Boudabbous, A., Stal, L.J., Cretoiu, M.S. et El Bour, M., "Antimicrobial Activities of Bacteria Associated with the Brown Alga *Padina pavonica*", *Frontiers in Microbiology*, V.7, (July 2016).
81. Lunggani, A.T., Darmanto, Y.S., Radjasa, O.K. et Sabdon, A., "Prospective Source of Antimicrobial Compounds From Pigment Produced by Bacteria associated with Brown Alga (Phaeophyceae) Isolated from Karimunjawa island, Indonesia", *Earth and Environmental Science*, V. 116, n° 1, (2018), 012088.
82. Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Haldar, S., Yamasaki, S. et Nagata, S., "Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan", *Annals of Microbiology*, V. 56, (June 2006), 167-173.
83. Madigan, M.T et Martinko, J.M. ; « Biologie des microorganismes. *Pearson Education France* », 11e edition, V 331-423, (2007), 686-718.
84. Soria-Mercado, E., Villarreal-Gómez, L.J., Guerra Rivas, G. and Ayala Sánchez, N.E., « Bioactive Compounds from Bacteria Associated to Marine Algae », V 4, n°4, (2009), 519-524.
85. Wagner-Döbler, W.; Beil, S.; Lang, M.; Meiners, H.; Laatsch, « Integrated Approach To Explore the Potential of Marine Microorganisms for the Production of Bioactive Metabolites », *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, V 74, n° 3, (2002), 207-238
86. Penesyan, S.; Kjelleberg and Egan, S., « Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms », *J. Mar. Drugs*, V 8, n°3, (March 2010), 438-459.
87. Berdy, J.; "Bioactive microbial metabolites." *The Journal of antibiotics*, V. 58, n° 1, (2005), p. 1-26.

- 88.** Goodfellow, M., Fiedler, H.P.; “A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, V 98, n°2, (June 2010), 119-142.
- 89.** Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K.; “Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives”, *Microbiological Research*, V 168, (July 2013), 311–332.
- 90.** Mellouli, L, Mehdi, R.B, Sioud, S, Salem, M. , Bejar, S.; “Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain”, *Res Microbiol*; V 154, (June 2003), 345-52.
- 91.** Simon, P. et Meunier, R., »Microbiologie industrielle et génie biochimique », 1970, 452p
- 92.** Gupta, R., Beg, Q.K., and Lorenz, P., “*Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications*”. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, V 59, n°1, (June 2002), 15-32.
- 93.** Gupta, R., et al., “*An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases.*” *Appl Microbiol Biotechnol*, V 60, n°4, (2002), 381-95.
- 94.** Fiechter, A., “Biosurfactants: moving towards industrial application”, *Trends in biotechnology*, V 10, (July 1992), 208-217.
- 95.** Walter, V., Sylđatk, C., & Hausmann, R., “Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms”, In *Biosurfactants* Springer, New York, NY, (2010), 1-13.
- 96.** Ferrara, M A et al. "Bioconversion of R-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica*."; *Brazilian Journal of Microbiology*, V 44 , (Decmeber 2013), 1075-1080.
- 97.** Khirwadkar,P.; Dave, V., Dashara, K.; “Areview on biotransformation” .*journal of research in pharmacy and biotechnology*, V 1136-1137, (2014).
- 98.** Denis, L. ; “Etudes sur la voie de dégradation de l’a-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide“. *Biotransformation des terpènes et terpinoides* , thèse de doctorats Génie Chimique et Biochimique :université de Blaise Pascale.(2008).
- 99.** Chatterjee, T, And Bhattacharyya, D.K.; “Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*”. *Appl. Microbiol Biotechnol*. V. 55, (200), 1541-546.

100. Alfarrá, H.Y. and Nor Omar, M., « Microbial Transformation of Natural Products », *Biological Sciences*, V 3, n°10, (December 2013), 357- 364.
101. Siddiqui, Z.A., « Biotransformational studies on bioactive secondary metabolites of plant origin », Thèse de doctorat, university of Karachi, Pakistan, (2007).
102. Cabral, J.M.S, “Biotransformations. Dans : Basic Biotechnology”, Ratledge C. & Kristiansen B. (eds), *Cambridge University Press*, Cambridge, (2001), 471-501.
103. Molina, G., Pimentel, MR., Bertucci, TCP, Pastore, GM., “Application of fungal endophytes in biotechnological processes”, *Chem Eng Trans*, V 27, (2012), 89–294.
104. Clark, B.C., Chamblee, T.S., “Acid-catalyzed reactions of citrus oils and other terpene-containing flavors”, Dans : Off-flavour in foods and beverages, G. Charalambous (ed), *Elsevier Sciences Publishers*, Amsterdam, V 28, (August 1992), 229-232
105. Okamura, H., “Antimicrobial properties of perfumes”, *Kôryô*, V 108, 1974, 9-13
106. Schreier, P., « Biotechnology and flavour production », Proc. 8Th International Biotechnology Symposium, 2, Paris, France, (1988), 869-883.
107. Raval, K.M., Vaswani, P.S. and Majumder, D.R., « Microbial biotransformation: Pharmaceutical peptides », *Biological and Food Science Research*, V 1, n°1, (March 2012), 1-14.
108. Linares, D. ; « Etudes sur la voie de dégradation de l' α -pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide », Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, (2012).
109. Azouz, Dr.L. ; « Cours de chimie organique II Chapitre V ». Les terpènes.
110. Martino, L.D., Mancini, E., Almeida, L.F.R.d., Feo, V.D., “The antigerminative activity of twenty-seven monoterpenes. *Molecules*”, V 15, n°5, (September 2010), 6630–6637
111. Best, D.J, Floyd, N.C., Magalhaes, A, Burfield, A ,and Rhodes, P.M. “Initial enzymatic steps in the degradation of α -pinene by *Pseudomonas fluorescens* Ncimb 11671. *Biocatal. Biotransfor.*”, V 1, n°2, (June 1987), 147–159
112. Fontanille, P, Larroche, C., “*Pseudomonas rhodesiae* PF1: a new and efficient biocatalyst for production of isonovalal from α -pinene oxide. *Biocatal. Biotransformation*”, V 20; n°6, (May 2002), 413 421

113. Boontawan, A, And Stuckey, D.C. “A membrane bioreactor for the biotransformation of alpha-pinene oxide to isonovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V69, (February 2006). 643–649.
114. Van derWerf, M.J, Swarts, H.J., and De Bont, J.A.M. “*Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene”, . *Appl. Environ. Microbiol.*, V 65, n°5, (May 1999). 2092–2102.
115. Lueddeke, F., Wuelfing, A, Timke, M ., Germer, F.; Weber , J. A .Dikfidan, et al., “Geraniol and geranial dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*”. *Appl. Environ. Microbiol.*, V (2012) 2128–2136
116. Brodkorb, D, Gottschall, M., Marmulla, R., Lueddeke, F . ,and Harder, J. .”Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes”. *J. Biol. Chem.* V. 285, n° 40, (October 2010), 30436–30442
117. Baser, K.H.C., Buchbauer, G., « Handbook of essential oils: science, technology, and applications », Ed by Taylor and Francis Group, LLC, an informa business, Boca Raton London New York, (2010).
118. Noma, Y.; H. Nishimura, and C. Tatsumi, “Biotransformation of carveol by Actinomycetes.1. Biotransformation of (-)-*cis*-carveol and (-)-*trans*-carveol by *Streptomyces bottropensis*”, SY-2-1, *Proc. 24th TEAC*, 67–70. 1980
119. Noma, Y, and Nishimura, H., “Biotransformation of (-)-carvone and (+)-carvone by *S. ikutamanensis* Ya-2-1”. *Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society*, Book of abstracts, (1983), 390.
120. Liu, W., 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”. *J. Org. Chem.* (1988), 5700–5704.
121. Noma, Y., Nonomura, S., and Sakai, H; . “Conversion of (-)-carvotanacetone and (+)-carvotanacetone by *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1”, *Agric. Biol. Chem.*, V 38, n°9, (September 1974), 1637–1642.
122. Noma, Y; “On the pattern of reaction mechanism of (+)-carvone conversion by actinomycetes”. Biochemical reduction of terpenes, part X, *Ann. Res. Stud. Osaka Joshigakuen Junior College*, V 23, (1979), 27–31.

123. David, L., and Veschambre, H., « Preparation d'oxydes de linalol par bioconversion », *Tetrahedron Letters*, V 25, (1984), 543–546
124. Noma, Y, Toyota, M., and Asakawa, Y., « Reduction of terpene aldehydes and epoxidation of terpene alcohols by *S. ikutamanensis*, Ya-2-1 », *Proc. 30th TEAC*, (1986), 204–206.
125. Savithiry, N., Gage, D. Fu, W., Oriel, P., « Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425 », *Biodegradation*, V 9, n° 5, (September 1998), 337-341.
126. Badee, A.Z.M., Shahinaz, A.H., Nashwa, F.S.M., « 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
127. Marmulla, R. and Harder, J., « Microbial monoterpene transformations - areview », *Frontiers in Microbiology*, V 5, n°3, (July 2014).
128. Zhang, M., Xu, P., Han, S., Yan, H.Q, Ma, C.Q. « 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.
129. 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 », *Biotechnology*, V 130, n°4, (July 2007), 463- 470
130. Hayashi ,S. Uedono, C. Tatsumi, « Conversion of α -terpineol to 8,9-epoxy-p-menthan-1-ol » *Agricultural and Biological Chemistry*, V 36, n°4, (1972), 690–691.
131. Tsukamoto, Y.; Nonomura, O.S., Sakai, H. , « Formation of p-cis-menthan-1-ol from p-menthane by *Pseudomonas mendocina* SF », *Agricultural Biological Chemistry*, V 39, n°3, (August 1975), 617–620.
132. 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, , (April 2008), 41-47.
133. 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, (June 2006).
134. 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.

135. Esmaeili and El. Hashemi, « Biotransformation of myrcene by *Pseudomonas Aeruginosa* », Journal of Chemistry Central, V 5, n°26, (May 2011).
136. 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, (June 2009), 1301–1304.
137. Eccles, R.; « Menthol and Related Cooling Compounds », Pharmacy and Pharmacology, V 46, n°8, (August 1994), 618-630.
138. Chizzola, R., “Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils) “, Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria, V 10, (2013). 2979-2998
139. Gelal, « 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.
140. Talapatra, S.K. and Talapatra, B., « Chemistry of Plant Natural Products », Springer-Verlag Berlin Heidelberg, V 388, (2015).
141. Malecky, M., « The metabolism of terpenoids in caprins », Thèse de doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris, (2008).
142. 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, (May1991), 3981–3987.
143. Atta-ur-Rahman, Yaqoob, M., Farooq, A., S. Anjum, Asif, F., and Choudhary, M.I., «Fungal transformation of (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)Menthol by *Cephalosporium aphidicola* », *Journal of Natural Product*, V 61, n°11, (September 1998), 1340–1342
144. Esmaeili, A.; Saad, N., Safaiyan, S., Rustaiyan, A.; «Biotransformation of (-)-menthol by spores of *Mucor ramannianus* and study of the pathways involved», *herba polonica*, V 55, n°2, (2009), 52-55.
145. Esmaeili, A.; Mirmhadi, H.R., and Rafiee, F., « Biotransformation of menthol by *Chlorella vulgaris* and study of the pathways involved », *Chemistry of Natural Compounds*, V49, n°6, (January 2014).
146. Esmaeili, A.; Zarea, H, Sharafian, S., Safaiyan, S., Rustaiyan, A., « Biotransformation of menthol by sporulated surface cultures of *Penicillium. sp.* and study of the pathways involved», *herba polonica*, V 55, n°1, (2009), 79-82.

147. https://fr.search.yahoo.com/search_propriéter de thymol.
148. https://www.aroma_fiche-technique/huile-essentielle-thym-thymol.
149. 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. *Proc. 28th TEAC*, (1988), 177–179.
150. Chamberlain, E.M. and Dagley, S., “The metabolism of thymol by a *Pseudomonas*.”, *Biochem. J.*, V 110, n°4, (December 1968), 755–763.
151. Esmaeili, A, Sharafian, S, Safaiyan, S, Rezazadeh, S, Rustaiyan, A “Biotransformation of one monoterpene by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp*”. *Nat Product Res V 23*, n°11, (October 2009), 1058–1061.
152. Alzate, DA, Mier, GI, Afanador, L, Durango, DL, García, CM ; « Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo(*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios ». *Vitae*, V 16, n°1, (April 2009), 116-125.
153. Numpaque, A.; Luis, A. ; Oviedo; Jesús, H. ; Gil, Carlos, M Manuel. ; García & Diego, L. Durango. ; “(Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*” *Tropical Plant Pathology*, V. 36, n°1, (Februray 2011), 003-013.
154. 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.
155. https://fr.search.yahoo.com/search_utilisation de cyméne
156. https://fr.search.yahoo.com/search_propriéter de Cyméne
157. Madyastha, K.M. and Bhattacharyya, P.K., Microbiological transformation of terpenes. Part XIII. Pathways for degradation of *p*-cymene in a soil pseudomonad (PL-strain). *Indian J. Biochem.*, V 5, n° 4, (December 1968), 161–167.
158. 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.
159. https://fr.search.yahoo.com/search_site_géographique_cornd d'ord Tipaza.
160. Shirling, E.B., Gottlieb, D., “Methods for Characterisation of *Streptomyces* Species”, *International journal of systemic Bacteriology.*, V 16, n°3, (1966), 313-340.

- 161.** Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M., Yu, W., “A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species”, *Antonie van Leeuwenhoek*, V 93, (August 2008), 241-248.
- 162.** Hopwood, D.A.; Bibb, M.J.; Chater, K.F.; Kieser, T.; Bruton, C.J.; Kieser, H.M.; Lydate, D.J.; Smith, C.P.; Ward, J.M and Schrempf, H; “Genetic Manipulation of *Streptomyces*”, A laboratory Manual John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom, V48, n°3, (April 1985), 201-202.
- 163.** Amayaly, B.E., Kelle, C., Freel, P.R.J., Irma, E., Soria, M.; “Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite”, *Journal of Microbiology*, V 102, n°3, (December 2012), 809-819.
- 164.** Cross, T.; “Growth and Examination of Actinomycetes Some Guidelines.”, In *Bergey’s Manual of Systematic bacteriology*. 4th. Williams and Wilkins Company, Baltimore, (1989), 2340-2343.
- 165.** Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G. “Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 399AL. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey’s manual of systematic bacteriology*”. Williams and Wilkins, Baltimore, V 4, (1989), 2452-2492.
- 166.** Hamiche, S, « Étude chimique des métabolites (primaires et secondaires) produits par des souches bactériennes issues de niches écologiques marines » thèse de doctorat Université de Blida 1, (Novembre 2019).
- 167.** Guiraud, J.P. ; « Techniques d’analyses microbiologiques ». In: *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris, (1998)., 168-333.
- 168.** Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C.I. ; « Les milieux de culture pour l’isolement et l’identification biochimique des bactéries ». *Doin editor*. Paris, (1987), 67-122.
- 169.** Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handarhan, J.E., Pang, C.H.-N. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol*, V 24, n°1, (January 1974), 54–63.
- 170.** Sierra, G., “A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antoni Van Leeuwenhoek*, V 23, (December 1957), 15-22.
- 171.** Hsu, S.C, and, Lockwood, J.L.; “Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *App. Microbiol*, V29, (1975), 422-426.

- 172.** Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J., White, R.P., “Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardopsis*”. *International journal of systematic bacteriology*, V 35, (1985), 86-98.
- 173.** Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P., Marquier, P, « Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle », *Hygiene Review*, V 53, n°3. (2002), 269-273.
- 174.** Petrosyan, P.; Garcia-Varela, M.; Luz-Madrigal, A.; Huitron, C. and Floress; ME; “*Streptomyces mexicans* sp.nov, xylanolytic microorganism isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*”, V 53, n°1, (January 2003), 269-273.
- 175.** Badji, B, Zitouni, A.; Mathieu, F.; Lebhiri, A.; Sabaou, N; “Actinomicrial compounds produced by *Actinomadura* sp AC104 isolated from Algerian Saharan Soil. *Canadian Journal of Microbiology*”, V 52, (April 2006), 373.382.
- 176.** Patel, J.J., Brown. M.N., “Interaction of *Azobacter* with rhizosphere and root-surface microflora”, *Plant and soil*, V 31, (1969), 276-281.
- 177.** Matan, N., “Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*)”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, V 62, n°1, (July 2008), 75-78.
- 178.** Clarke, P.h., steel, K.j, “Rapid and simple biochemical tests for bacterial identification”. *Academic press*. London, (1989), pp. 111.
- 179.** Smith, N.R., Gordon, R.E., clark F.E, “Aerobic spores-forming bacteria. *Journal of Applied Microbiology*”, V 27, (1995); 78-99.
- 180.** Walter, V, Sylatk, C, & Hausmann, R, “screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorg anisms”. In *Biosurfactants*, (2010), 1-13.
- 181.** Azarmi, R, Ashjaran, A.; “Type and application of some common surfactants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, V 7, n°2, (August 2015); 632-640.
- 182.** Guérin, F.S.; Karray, B, & Richard, Y, “*Actinomyce pyogenes*: conventional and API gallery bacteriological study of 103 strains isolated from ruminants”, V 23, n°2, (May 1992), 151-160.

- 183.** Trytek, M., Jedrzejewski, K. Fiedurek, J., “Bioconversion of α -pinène by a novel coldadapted fungus *Chrysosporium pannorum*”, *J Ind Microbiol Biotechnol*, V 42, n°2, (February 2015), 181-188
- 184.** Fauchère, J.L., Avril, J.L., « Bactériologie générale et médicale », Ed. Ellipses, 2002, 365 p.
- 185.** Aouissi, M., «Ecologie et valorisation chimique des macrophytes du golfe d’Annaba, Algérie», thèse de doctorat, 2017-2018.
- 186.** Pfefferle, C., Theobald, U., Guetlr, H and Fiedler, H.P, « Ipmroved secondry metabolite production in the genus *Streptomyces* by optimization of the fermentation condition », *J.Biotechnol*, V 80, n° 2, (June 2006), 135-142.
- 187.** Dumenil,G. et Sanglier, J.J. « Physiologie de la production des antibiotiques, dans : Larpent J.P. et Sanglier J.J. Biotechnologie des antibiotiques », *Masson Edition Paris*, , (1989), 195-217
- 188.** Boudemagh, A., « Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales Productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives », Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine.Algérie, (2007), 132 p.
- 189.** Porter, J.N., Wilhem, J.J., Tresner, H.D., “Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil”, *Appl Microbiol*, V 8, n°3, (1960), 174–178.
- 190.** Takizawa, M., Cowell, R.R. and Hill, R.T., “Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay”. *Appl. Envirnm. Microbiol*, V 144, n° 4, (April 1993), 647-651.
- 191.** Kitouni, M., « Isolement de bactéries actinomycétales productrices d’antibiotiques à partir d’écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation Préliminaire des substances élaborées ». Thèse doctorat : Microbiologie : Université Mentouri- Constantine. (2007).
- 192.** Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioua. (2005): “Isolation and molecular identification of actinomycetes microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains”, *Journal of Medecine and Mycology*. 15: 39-44.
- 193.** Tang, S. K; Li, W. J; Dong, W; Zhang, Y. G; Xu, L; and Jiang, C. L. “Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant Actinomycetes isolated from saline and alkaline soils”, *Actinomycetologica*, V 17, n°1, (August 2003), 06–10.

- 194.** Lefebvre, O. « Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins ». Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, (2005), pp 271.
- 195.** Singh, L.S., Baruahet, I., Bora, T.C.; “Actinomycetes of Loktak habitat: Isolation and screening for antimicrobial activities”, *Biotech*, V 5, (2006), 217-221
- 196.** Kanagasabhapathy Boughachiche, F, Rachedi, K, Duran, R,*et al*, “ Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment”. *African Journal of Biotechnology*, V15, n°26, (2016); 1401-1412.
- 197.** Nam, S.W, Kim, W, Chun, J, *et al*. “Tsukamurella pseudospumae sp. Nov., a novel actinomycete isolated from activated sludge foam”, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, V 54, n° 4, (July 2004), 1209-1212.
- 198.** Salaria, N. et Furhan, J. “Antibacterial potential of actinomycetes from north-western himalayas against pathogenic bacteria”. *Biology Bulletin*, V.48, n° 3, (2021), p. 281-289.
- 199.** Gopalakrishnan, S, Pande, S, Sharma, M, “Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea”, *Crop Protection*, V 30, no 8, (August 2011), p1070-1078.
- 200.** Messaoudi, O, Bendahou, M, Benamar, I *et al*. « Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa Algeria”, *Asian pacific journal of Tropical biomedicine*, V 5, n° 6, (June 2015), p. 438-445.
- 201.** Margalith, P.Z., “Pigment microbiology.”, Shapman and Hall. London, (1992), 5-114.
- 202.** Rubin, R.J., Harrington, C.A., Poon, A., Dietrich, K., Grene, J..A, Moiduddin, A. “The economic impact of *Staphylococcus* infection in New York City hospitals”. *Emerging Infectious Diseases journal*.,V 5, n° 1, (1999), 9-17.
- 203.** Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C. “Methicillinresistant *Staphylococcus aureus*, clinical strain with reduced vancomycin susceptibility”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, V 40, n° 1, (Februry 1997), 135-136.
- 204.** Valli, S., Sugasini, S. S., Aysha, O, S, Nirmala., Vinoth Kumar P, Reena. An Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, V 2, n° 6, (June 2012), 469-473.

- 205.** Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Paul, D Cotter.P.D., Walsh, M., Mooij, M.J., Bourke, M.B., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., O'Gara, F., Marchesi, J.R., Dobson, A.D.W. "Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters", *Marine Biotechnology*, V 11, (October 2008), 384-96.
- 206.** Tam, V .H, Schilling, A.N., Nikolaou, M., "Modelling time–kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, V 55, n° 5, (May 2005), 699-706.
- 207.** Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S., Chopade, B.A., "Isolation, Characterization and antimicrobial activity of marine halophilic Actinopolyspora species AH1 from the west coast of India", *Current Science*, V 86, (February 2004a), 593-597.
- 208.** Sateesh, V. N., Rathod, J. L. Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*, V 3, n° 3, (July 2011), 48-53.
- 209.** Bastide, A., de Méo, M, Andriantsoa, M., Laget, M., Duménil. G, « Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de structure nonpolyéniques ». *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, V 2, n° 1, (May 1986), 453-466.
- 210.** Ravikumar, S., Krishnakumar, S., Samuel Jacob Inbaneson, S.J., Gnanadesigan, M., "Antagonistic activity of marine actinomycetes from Arabian Sea coast". *Archives of Applied Science Research*, V 2, n° 2, (January 2010a), 273-280.
- 211.** Sunaranto, R., Marwoto, B.,"Marine Actinomycetes screening of Banten West Coast and their antibiotics purification", *Biodiversitas*, V3, n° 10, (November 2010), 176-181.
- 212.** Kanagasabhapathy, M, Sasaki, H, Haldar, S, *et al.* Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan. *Annals of microbiology*, V.56, (2006), p167-173.
- 213.** Dalila, B B, « Nouvelles espèces de Saccharothrix isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrètes par Saccharothrix SP.SA198 », thèse de doctorat, ENSA : département de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine, (2013).

- 214.** El Hadj Driche, N. S., Bijani, C., Zitouni, A., Pont, F., Mathieu, F., et Badji, B. « Streptomyces sp. AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* », (May 2019).
- 215.** Samira, T, Affaf, L, Amine, Y., Fawzia, C ; Chaouch, C., Lamari, L ; Bouras, N et Sabaou, N « Effet des sources d'azote sur la production de la saquayamycine C par la souche PAL114 de Streptomyces », Journal of Advanced Research in Science and Technology, V 8, n°2, (2022), 60-67.
- 216.** Song, Q., Huang, Y., Yang, H.,”Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by *Actinomycetes YJI* Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*”. *Journal of Agricultural Science*, V 4, (2012), 95-102.
- 217.** Gurung, T.D., Sherpa, C., Agrawal, V.P., Lekhak, B, “Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region”. *Nepal Journal of Science and Technology*, V, 10, (2009), 173-182.
- 218.** Dipesh, D; Anaya; R.P; Biplav, S; Jae Kyung, S ; “Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds”, V 15, n°8, (June 2017), 1106.
- 219.** Habibeche, L. “Isolation and selection of antibiotic-producing actinomycetes strains”, Doctoral thesis university of Abderrahmane Mira of Bejaia, (2012), p.230.
- 220.** Boudrahem D. « Isolement et sélection de souches d’actinomycètes marines productrices de substances bioactives », Doctoral thesis University of Abderrahmane Mira of Bejaia, (2014), p.198.
- 221.** Aguedo, M, Waché, Y, Coste, F; et al., “Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*”, *Journal of molecular catalysis b: enzymatic*, V29, n°1, (2004), 31-36.