

UNIVERSITÉ BLIDA 1
Faculté des sciences
Département de Chimie

THÈSE DE DOCTORAT LMD

Spécialité : Chimie des substances naturelles et de biomolécules

**ÉTUDE CHIMIQUE DES MÉTABOLITES (PRIMAIRES ET
SECONDAIRES) PRODUITS PAR DES SOUCHES BACTÉRIENNES
ISSUES DE NICHES ECOLOGIQUES MARINES**

Par

HAMICHE Sonia

Devant le jury composé de :

Z. DJAZOULI	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Président
H. BOUTOUMI	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Examineur
S. AKKAL	Professeur, Université Constantine 1	Examineur
A. ZITOUNI	Professeur, Ecole Normale Supérieure Kouba	Examineur
M. EL HATTAB	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Directeur de thèse
A. BADIS	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Codirecteur de thèse

Blida, 11 Janvier 2020

ملخص

يتمحور هذا العمل حول الدراسة الكيميائية و تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة للمشتقات الفينولية من الطحلب البني *Zonaria tournefortii*، العزل والوصف المظهري للسلاسل البكتيرية المرتبطة بنفس الطحلب وتثمين البكتريا المعزولة في إنتاج المركبات ذات الأهمية الحيوية، البيئية و الصناعية. سمحت الدراسة الكيميائية للمستخلص الدهني للطحلب بعزل المركبات الفينولية المشتقة من الفلوروغلوسينول، وعلى وجه الخصوص الأسيلفلوروغلوسينول، وقد أظهر تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة للمركبات المعزولة، أن جميع المركبات لها نشاط مضاد للأكسدة.

من جهة أخرى، سمح الوصف الأولي لثلاثين سلالة بكتيرية معزولة من *Zonaria tournefortii* وهذا بإتباع مقارنة مظهرية مبنية على أساس الدراسات المورفولوجية، البيوكيميائية والأيضية بالحق العزلات إلى الأجناس *Staphylococcus* (14عزلة)، *Bacillus* (12عزلة) و *Acinetobacter* (عزلتان)، والى عائلة البكتيريا المعوية (عزلتان).

مكنت دراسة قابلية السلاسل البكتيرية لإنتاج المركبات الطيارة والمنتشرة المضادة للميكروبات وكذا الإنزيمات المحللة للكيراتين، من إختيار السلالة الأكثر كفاءة والمسماة ب-S13، والتي نسبت إلى النوع *Bacillus amyloliquefaciens* بالاعتماد على تحديد تتابع النيكليوتيدات للمورثة المشفرة للـ ARN الريبوزومي 16S.

تم إنتاج المركبات المضادة للميكروبات بحضن السلالة S13 في الوسط المغذي LB المضاف إليه الـ NaCl بتركيز 15% لمدة 48 ساعة في حرارة 30 درجة وحموضة ابتدائية 7,2. تنتمي أهم المركبات الطيارة والمنتشرة المحددة، على التوالي، بتقنية CG/SM و CL/ESI-SMHR إلى التربينات الثنائية من نوع Labdane والبيبتيدات الحلقية من عائلة 2,5-dicétopipérazines (DKP).

تم إجراء إنتاج للإنزيمات المحللة للكيراتين بعد 42 ساعة من حضن السلالة البكتيرية عند 30 درجة في وسط محسّن بقاعدة مسحوق ريش الدجاج. كشف التحليل بواسطة تقنية طيف الكتلة أن للجزيئين الإنزيميتين KERTZ-A و KERTZ-B، الكتلة 28 و 47 كيلو دالتون على التوالي. أظهر التوصيف الكيميائي الحيوي للإنزيمين أن النشاط المثالي بالنسبة لـ KERTZ-A كان في معامل الحموضة 6,5 ودرجة الحرارة 50° مئوية. أما KERTZ-B فقد سُجّل نشاطها المثالي على درجة حرارة 60° مئوية بمعامل حموض 8. هذه الخصائص الكيميوحيوية الملحوظة للجزيئين الإنزيميتين يمكن أن تفتح فرصاً واعدة جديدة لإعادة تدوير البقايا الكيراتينية والحد من تأثيرها على البيئة.

الكلمات المفتاحية: *Zonaria tournefortii*، S13 *Bacillus amyloliquefaciens*، acylphloroglucinols، النشاط المضاد للأكسدة، التربينات الثنائية، 2,5-dicétopipérazines، الإنزيمات المحللة للكيراتين.

RÉSUMÉ

Le présent travail porte sur l'étude chimique et l'investigation des activités antioxydantes des dérivés phénoliques de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, l'isolement et la caractérisation préliminaire de la communauté bactérienne associée à l'algue, et la valorisation des bactéries isolées dans la production des métabolites d'intérêt bioactif, environnemental et industriel.

L'étude chimique de l'extrait lipidique de l'algue a permis l'isolement des produits phénoliques dérivés du phloroglucinol en particulier les acylphloroglucinols, et l'évaluation des activités antioxydantes des produits isolés a montré que tous les composés présentent une activité antioxydante potentielle.

La caractérisation préliminaire de trente souches bactériennes isolées de *Zonaria tournefortii* en utilisant une approche phénotypique basée sur des études morphologiques, biochimiques et métaboliques a permis de rattacher les isolats aux genres *Staphylococcus* (14 isolats), *Bacillus* (12 isolats) et *Acinetobacter* (2 isolats), et à la famille des *Entérobacteraceae* (2 isolats).

L'étude des potentialités des souches bactériennes isolées dans la production des composés antimicrobiens volatils et diffusibles ainsi que des enzymes kératinolytiques a permis de sélectionner une souche plus performante codée S13, affiliée à l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens* via le séquençage du gène codant de l'ARNr 16S.

La production de métabolites antimicrobiens a été effectuée après une culture de la souche à 30 °C pendant 48 h dans un milieu LB additionné de 15 ‰ NaCl, avec un pH initial de 7,2. Les principaux composés volatils et diffusibles identifiés, respectivement, par CG/SM et CL/ESI-SMHR, appartiennent aux diterpènes de types Labdane et aux dipeptides cycliques de la famille de 2,5-dicétopipérazines (DKP).

La production des kératinases a été effectuée après 42h de culture de la souche à 30 °C dans un milieu optimisé à base de farine de plume de poulet. L'analyse SDS/PAGE des deux kératinases purifiées (KERZT-A et B), révèle qu'il s'agit d'un seul monomère ayant une taille estimée à 28 kDa pour KERZT-A et 47 kDa pour KERZT-B. La caractérisation biochimique des deux enzymes a montré que les valeurs optimales de pH et de température sont de 6,5, 50 °C, et 8, 60°C pour KERZT-A et KERZT-B, respectivement. Les propriétés biochimiques remarquables des deux enzymes, pourrait ouvrir de nouvelles opportunités prometteuses pour la valorisation des déchets kératinolytiques et la réduction de ses impacts sur l'environnement.

Mots clés : *Zonaria tournefortii*, *Bacillus amyloliquefaciens* S13, acylphloroglucinols, activité antioxydante, diterpènes, 2,5-dicétopipérazines, kératinases.

ABSTRACT

The present work focuses on the chemical study and the investigation of the antioxidant activity of phenolic derivatives of the brown algae *Zonaria tournfortii*, the isolation and phenotypic characterization of the bacterial community associated with the alga and the valorization of the isolated bacteria in the production of metabolites with bioactive, environmental and industrial interest.

The chemical study of the lipidic extract of the algae allowed the isolation of phenolic compounds derived from phloroglucinol, in particular acylphloroglucinol. The evaluation of the antioxidant activity of the isolated compounds showed that all compounds had a potential antioxidant effect.

The preliminary characterization of 30 bacterial strains isolated from *Zonaria tournfortii* by a phenotypic approach based on morphological, biochemical and metabolic studies allowed to attach the isolates to the genera *Staphylococcus* (14 isolates), *Bacillus* (12 isolates) and *Acinetobacter* (2 isolates) and to the *Enterobacteriaceae* family (2 isolates).

The study of the potential of the isolated bacterial strains on the production of volatile and diffusible antimicrobial compounds as well as keratinolytic enzymes allowed the selection of the most efficient strain encoded S13, affiliated to *Bacillus amyloliquefaciens* by sequencing the 16S rRNA gene.

The production of antimicrobial metabolites was performed after incubation of the selected strain on Luria–Bertani medium with NaCl 15‰ (w/v), pH 7.2 at 30°C for 48 h. The main volatile and diffusible compounds were identified by GC/MS and LC/ESI-HRMS. They belong to Labdane-type diterpenes and cyclic dipeptides class of 2,5-diketopiperazines (DKP) family.

The production of keratinases was performed after 42h of incubation of the selected strain at 30°C in an optimized medium based on chicken feather meal. The SDS/PAGE analysis of the two purified keratinases (KERZT-A and B), revealed that it is a single monomer with an estimated size of 28 kDa for KERZT-A and 47 kDa for KERZT-B. The biochemical characterization of the two enzymes showed that the optimum pH and temperature values were 6.5, 50°C, and 8, 60°C for KERZT-A and KERZT-B, respectively. The remarkably biochemical properties of the two enzymes could open a new promising opportunities for the recovery of keratinolytic waste and the reduction of its impact on the environment.

Key words: *Zonaria tournfortii*, *Bacillus amyloliquefaciens* S13, acylphloroglucinols, antioxidant activity, diterpenes, 2,5-diketopiperazines, keratinases.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, 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.

Mes plus sincères remerciements vont à mes très chers parents que dieu protège, qui ont su croire en moi et qui ont m'avoir soutenue tout au long de mes études. Merci pour votre amour, votre aide et confiance et surtout pour votre présence dans les moments difficiles 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.

Je témoigne ici ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, Professeur El Hattab Mohamed et Professeur Badis Abdelmalek, 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 leur 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.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur Djazouli Zahr Eddine, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie à l'Université Saad Dahleb Blida 1, pour m'avoir honoré d'accepter de présider le jury de ma thèse et de juger ce travail.

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

Monsieur Boutoumi Hocine, Professeur à l'Université Saad Dahleb Blida 1, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail de thèse. Je souhaite également témoigner ma reconnaissance pour ses encouragements, sa modestie et sa disponibilité. Je lui serai toujours reconnaissante de m'avoir fait bénéficier de son expérience, de ses discussions constructives qu'il n'a cessé de m'orienter vers le bon chemin de la recherche et, de sa sincérité pour nous avoir transmis son savoir, mais aussi pour sa gentillesse illimitée et sa générosité infinie.

Monsieur Akkal Salah, Professeur à l'Université Mantouri Constantine 1, pour l'honneur et le privilège qu'il m'a accordé en acceptant d'être examinateur et de juger ce travail.

Monsieur Zitouni Abdelghani, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure d'Alger-Kouba, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ma thèse et de juger ce modeste travail.

Je remercie très chaleureusement Professeur Daghbouche Yasmina, Présidente du Comité de Formation Doctorale, pour les efforts considérables qu'elle a déployés pour assurer un bon cheminement de notre Doctorat. Je la remercie également pour sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils pertinents.

Je tiens également à remercier tous mes amis et collègues de l'équipe de l'Ecole Normale Supérieure de Laghouat pour leur aide, leur soutien et leur gentillesse. Je souhaite également les remercier pour la confiance dont ils ont fait preuve à mon égard en me laissant m'impliquer au sein de la vie collective de l'équipe. Les rapports humains dont j'ai profité à leur côté ont fait naître de réels liens d'amitiés qui à mes yeux n'ont pas de prix. Qu'ils soient tous assurés de ma plus profonde gratitude et estime. J'exprime en particulier mes chaleureux remerciements et ma profonde gratitude à Monsieur Messaoudi Abdeljalil pour sa gentillesse, sa compréhension et son soutien continu ainsi que ses encouragements pendant les moments difficiles. Que vous trouvez ici l'expression de mon infinie reconnaissance et mon profond respect. Avec mes vœux de succès et de bonheur. Merci Abdeljalil.

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.

J'adresse également mes sincères remerciements à l'ensemble de l'équipe du Laboratoire des Produits Naturels de l'Université de l'Écosse de l'Ouest en particulier : Bathini, Gaya et Madjed. Mon passage par l'Écosse m'a accordé de rencontrer des personnes qui nous manquent 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 Samiul.

Je tiens particulièrement à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Jaouadi Bassem pour son accueil chaleureux qu'il m'a réservé lorsque j'ai rejoint le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB) au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS)-TUNISIE, pour ses aides précieuses, ses conseils qu'il a su me faire bénéficier, ses encouragements et surtout ses hautes qualités humaines. Je le remercie également pour sa collaboration fructueuse et pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer dans la révision de mon article.

Mes vifs remerciements vont également à tout le groupe du LBMIE-CBS pour les discussions scientifiques que nous avons eues, pour leur sympathie, leur encouragement et leur gentillesse. Un remerciement spécial à l'attention de Mechri Sondos. Merci Sondos pour l'ambiance de travail agréable que tu as contribué à créer durant mon stage au CBS. Merci pour avoir pris le temps de relire et de corriger une grande partie de mon article. Merci pour tous les échanges scientifiques fructueux et pour toutes les discussions professionnelles que nous avons eues et en fin un grand merci pour ton amitié qui n'a cessé de croître au fil du temps.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur Bensouici Chawki, responsable du Laboratoire de biochimie au Centre de recherche en Biotechnologie de Constantine, pour m'avoir si généreusement ouvert les portes de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche dans d'excellentes conditions. Je le remercie également pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour sa patience qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et mon immense gratitude.

Je désire aussi remercier Monsieur Saad Mebrek et Mme Lynda gali ainsi que tout le personnel du Laboratoire de biochimie du CRBt en particulier Amina, Asma et Hanene qui m'ont fourni les conditions nécessaires pour la réussite de mon stage. Je remercie également tous les thésards réunis dans ce stage : Wissem, Selma, Imad, Nour et Sarah pour la bonne ambiance de travail mais également pour les nombreux bons moments partagés.

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 Aoulmi et Mr Abou Mostafa, qui m'ont permis d'effectuer mes analyses CG/SM dans des meilleures 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 suis grée à toute l'équipe pour leurs aides, leur gentillesse et leur modestie; l'équipe de l'Institut Nationale de la Criminalistique et de la Criminologie (INCC) à Bouchaoui, et l'équipe de l'Ecole Nationale Polytechnique à El Harrach (ENP). J'exprime en particulier mes remerciements au colonel khimech et colonel cherif pour la magnifique opportunité qu'il m'a été offerte lorsqu'ils m'ont acceptée en stage au niveau de l'ENP, et au colonel ourida pour son accueil chaleureux qu'il m'a réservé lorsque j'ai rejoint l'INCC.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à Leyrat Mebarak, ancienne Ingénieur du laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de biomolécules pour son attention et son efficacité qui ont permis que je passe toutes mes premières années dans de bonnes conditions grâce à son professionnalisme. Merci Leyrat de m'avoir toujours tiré vers le haut. Vous ne m'avez jamais laissé baisser les bras et vous avez toujours su trouver les mots pour me remotiver après des moments difficiles.

Mes très sincères remerciements et mes sentiments distingués s'adressent à Mme Rachida et ses quatre filles qui ont ouvert la porte de leur maison pour m'accueillir durant la période de ma participation à un séminaire à Constantine. Merci Mme Rachida pour votre gentillesse, votre tendresse et surtout pour votre confiance.

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, Mr Zahi, Mlle Boudissa, Mlle messaoudi, Mlle Medjdoub, Mme Benkaddour, Mme Chourar, Mme Boudella, Mme Takarli et Mr AbdAllah.

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 leur laboratoire dans des meilleures conditions grâce à leur sympathie et leur aide, particulièrement : Amina, Kahina, Asma, meriem, Zami Aissa, Nawal et Nafissa.

Un grand merci à Hamdini Fatiha et Khalouia Lamia qui ont su me soutenir, me supporter et m'encourager pendant toute la durée de ma thèse et plus particulièrement durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été des plus agréables. Cette thèse et moi vous devons beaucoup. Merci.

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

TABLE DES MATIERES

ملخص	1
RESUME	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	15
INTRODUCTION GÉNÉRALE	21

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les algues brunes : étude chimique et diversité des micro-organismes associés	26
1.1.1 Généralités sur les algues marines	26
1.1.1.1 Classification des algues marines	27
1.1.1.2 Etude systématique de l'espèce <i>Zonaria tournefortii</i>	29
1.1.2 Composés phénoliques des algues brunes	29
1.1.2.1 Généralités	29
1.1.2.2 Extraction, purification et analyse	31
1.1.2.3 Composition phénolique des algues brunes	32
1.1.2.3.1 Dérivés polyphénoliques : phlorotannins	32
1.1.2.3.2 Dérivés du phloroglucinol: Etat de connaissance sur la composition chimique des genres <i>Zonaria</i> , <i>Cystophora</i> et <i>Lobophora</i>	35
1.1.3 Microorganismes autochtone des algues brunes	39
1.1.3.1 Généralités sur les microorganismes marins	39
1.1.3.2 Diversité des microorganismes des algues brunes	40
1.2 Composés bioactifs dérivés de microorganismes	42
1.2.1 Recherche et découverte de composés bioactifs d'origine microbienne	42
1.2.1.1 Composés organiques non volatils microbiens	43
1.2.1.1.1 Culture, production et extraction	43
1.2.1.1.2 Profilage chimique des composés bioactifs	44

1.2.1.1.3 Isolement, purification et identification	46
1.2.1.2 Composés organiques volatils microbiens	46
1.2.1.2.1 Extraction des COVs microbiens	47
1.2.1.2.2 Analyse et identification des COVs microbiens	48
1.2.2 Composés bioactifs produits par des microorganismes d'algues brunes	49
1.3 Enzymes kératinolytiques d'origine microbienne	54
1.3.1 Généralités	54
1.3.2 Nomenclature et classification des enzymes protéolytiques	55
1.3.2.1 Les exopeptidases	56
1.3.2.2 Les endopeptidases	57
1.3.2.2.1 Protéases à sérine	57
1.3.2.2.2 Protéases à cystéine	58
1.3.2.2.3 Protéases aspartiques	59
1.3.2.2.4 Protéases à métal	59
1.3.2.2.5 Protéases à thréonine	60
1.3.3 Origine des protéases kératinolytiques microbiennes	60
1.3.3.1 Protéases kératinolytiques bactériennes	60
1.3.3.2 Protéases kératinolytiques fongiques	61
1.3.4 Mécanisme d'action des protéases kératinolytiques microbiennes	62
1.3.5 Substrats kératiniques	63
1.3.5.1 Kératines	63
1.3.5.2 Les déchets d'origine kératiniques	64
1.3.6 Applications biotechnologiques des protéases kératinolytiques	65
1.3.6.1 Détergence et industrie textile	65
1.3.6.2 Fabrication du cuir	66
1.3.6.3 Alimentation animale, agriculture, bioénergie et produits à valeur ajoutée	67
1.3.6.4 Applications en médecine, pharmacie et en cosmétique	68
1.3.6.5 Digestion anaérobie des déchets kératiniques pour la production de biogaz	69

CHAPITRE 2
EXTRACTION, POTENTIALITES ANTIOXYDANTES ET
DIVERSITE BACTERIENNE DE L'ALGUE BRUNE ZONARIA
TOURNEFORTII

2.1 Etude de l'extrait brut de l'algue Zonaria tournefortii : Extraction, isolement et potentialités antioxydantes des métabolites secondaires	70
2.1.1 Récolte et traitement du matériel végétal	70
2.1.2 Extraction	70
2.1.3 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux	71
2.1.4 Fractionnement, purification et caractérisation structurale des métabolites secondaires	74
2.1.5 Potentialités antioxydantes de l'extrait brut et des métabolites secondaires isolés	76
2.1.5.1 Piégeage du radical DPPH•	77
2.1.5.2 Piégeage du radical ABTS•+	80
2.1.5.3 Activité de blanchissement du β -carotène	82
2.1.5.4 Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	86
2.1.5.5 Chélation des ions ferreux	87
2.2. Etude des souches bactériennes de Zonaria tournefortii : Isolement et caractérisation préliminaire	92
2.2.1 Echantillonnage et conditionnement	92
2.2.2 Isolement des souches bactériennes	92
2.2.2.1 Milieux de culture	92
2.2.2.2 Traitement et mise en culture des échantillons d'algue	93
2.2.3 Purification et conservation des souches bactériennes	94
2.2.4 Caractérisation préliminaire des souches bactériennes isolées de Zonaria tournefortii	94
2.2.4.1 Etude morphologique, biochimique et métabolique	94
2.2.4.2 Classification préliminaire des souches bactériennes isolées	97

CHAPITRE 3
PRODUCTION ET CARACTERISATION CHIMIQUE DE
METABOLITES BIOACTIFS PRODUITS PAR *BACILLUS*
AMYLOLIQUEFACIENS S13

3.1 Mise au point d'une méthodologie de criblage optimisée des souches bactériennes productrices de métabolites antimicrobiens	103
3.1.1 Culture des souches bactériennes en milieux solides	103
3.1.2 Criblage de souches productrices de métabolites antimicrobiens diffusibles	104
3.1.3 Criblage de souches productrices de métabolites antimicrobiens volatils	105
3.1.4 Discussion des résultats	107
3.2 Identification génotypique de l'isolat S13 : Etude moléculaire du gène de l'ARNr 16S	109
3.3 Etude de la production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens S13</i>	110
3.3.1 Optimisation de la production de métabolites antimicrobiens	110
3.3.2 Cinétique de croissance et de production des métabolites antimicrobiens	114
3.4 Etude des métabolites antimicrobiens volatils	115
3.4.1 Extraction des métabolites antimicrobiens volatils	115
3.4.2 Etude de la composition chimique de la fraction volatile	115
3.4.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne de la fraction volatile	124
3.5 Etude des métabolites antimicrobiens diffusibles	129
3.5.1 Extraction des métabolites antimicrobiens diffusibles	129
3.5.2 Etude de la composition chimique des extraits de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	130
3.5.2.1 Profilage chimique des extraits par CLHP/DAD-UV	130
3.5.2.2 Identification des métabolites par CL/ESI-SMHR	133
3.5.3 Discussion des résultats	135

CHAPITRE 4
PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION
BIOCHIMIQUE DES PROTEASES KERATINOLITQUES
PRODUITES PAR *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* S13

4.1 Criblage de souches productrices de protéases kératinolytiques	138
4.1.1 Criblage de souches productrices de protéases kératinolytiques en milieu solide	138
4.1.2 Criblage de souches productrices de protéases kératinolytiques en milieu liquide	139
4.1.2.1 Dosage de l'activité protéolytique	139
4.1.2.2 Production des protéases kératinolytiques des souches sélectionnées en milieu liquide	140
4.1.3 Caractérisation physicochimiques des préparations enzymatiques	141
4.1.4 Discussion des résultats	144
4.2 Optimisation de la production des protéases kératinolytiques de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13	146
4.2.1 Effet des différentes sources de carbone sur la production des kératinases	146
4.2.2 Effet de la concentration de la farine de plumes de poulet sur la production des kératinases	147
4.2.3 Effet des différentes sources d'azote sur la production des kératinases	148
4.2.4 Effet de la concentration de peptone de soja sur la production des kératinases	149
4.3 Cinétique de croissance et de production des protéases kératinolytiques en milieu liquide	150
4.4 Purification des kératinases de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13	151
4.4.1 Procédure de purification	151
4.4.2 Bilan de purification	152
4.5 Electrophorèse des protéines et séquençage de l'extrémité NH ₂ -terminale	153
4.5.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et non dénaturantes (zymogramme)	153

4.5.2 Détermination de la séquence N-terminale des kératinases purifiées	155
4.5 Caractérisation physicochimiques des kératinases KERZT-A et KERZT-B	156
4.5.1 Effet des inhibitions, des agents réducteurs et des ions métalliques sur l'activité des kératinases	157
4.5.2 Effet du pH sur l'activité et la stabilité des deux kératinases	159
4.5.3 Effet de la température sur l'activité et la stabilité des deux kératinases	161
4.6 Etude de la spécificité des enzymes KERZT-A et B vis-à-vis des substrats	162
4.7 Application biotechnologique des protéases kératinolytiques	165
4.7.1 Evaluation des performances des enzymes dans la dégradation des plumes de volailles	165
4.7.2 Test de l'activité de l'épilage des enzymes semi-purifiées	168
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	170
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	175
APPENDICES	178
RÉFÉRENCES	185

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

CHAPITRE 1

Figure 1.1 : Exemples de fucols	33
Figure 1.2 : Exemples de fuhalols	33
Figure 1.3 : Exemples de phloréthols	34
Figure 1.4 : Exemples de fucophoréthols	34
Figure 1.5 : Exemples de fucophoréthols	35
Figure 1.6 : Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria tournefortii</i>	36
Figure 1.7 : Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria farwolii</i>	36
Figure 1.8 : Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria diesingiana</i>	37
Figure 1.9 : Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria creneta</i>	37
Figure 1.10 : Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Cystophora</i>	38
Figure 1.11 : Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Lobophora papenfussii</i>	38
Figure 1.12 : Les principaux taxons bactériens associés aux algues brunes	42
Figure 1.13 : Structures chimiques des composés antimicrobiens produits par des bactéries et des champignons isolés d'algues brunes	53
Figure 1.14 : Mécanisme d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures	62

CHAPITRE 2

Figure 2.1 : Droite d'étalonnage des solutions standards de phloroglucinol de concentrations allant de 0,008 à 0,099 mg.ml ⁻¹ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu	72
Figure 2.2 : Produits isolés à partir de la fraction phénolique de <i>Z. tournefortii</i>	75
Figure 2.3 : Réduction du radical DPPH [*] en présence d'un antioxydant	77
Figure 2.4 : Comparaison des valeurs de CE ₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards	79
Figure 2.5 : Variation du taux de piégeage du DPPH [*] par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations	79

Figure 2.6 : Génération du radical-cation ABTS ^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant AH	81
Figure 2.7 : Comparaison des valeurs de CE ₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards	83
Figure 2.8 : Variation du taux de piégeage de l'ABTS ^{•+} par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations	83
Figure 2.9 : Comparaison des valeurs de CE ₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards	85
Figure 2.10 : Variation du pourcentage d'inhibition de blanchiment de β-carotène par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations	85
Figure 2.11 : Réduction du complexe chromogène de (neocuproïne) (Cu(II)-Nc)	86
Figure 2.12 : Mécanisme de formation de complexe Fe ⁺² -Ferène	87
Figure 2.13 : Comparaison des valeurs d'A _{0.50} de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards	88
Figure 2.14 : Variation des absorbances par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations	88
Figure 2.15 : Réaction de Fenton	89
Figure 2.16 : Comparaison des valeurs de CE ₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards	91
Figure 2.17 : Variation du taux de chélation métallique par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations	91
Figure 2.18 : Regroupement des isolats obtenus de <i>Zonaria tournefortii</i> (Groupe I: S02, S04, S05, S07, S08, S11, S15, S19, S23, S24, S25, S26, S28, S29 ; Groupe II: S01, S09, S10, S12, S13, S14, S16, S17, S18, S20, S21, S27; Groupe III: S03, S30; Groupe IV: S06, S22)	99

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S montrant la position de la souche S13 (n °d'accès: MG601134) dans genre <i>Bacillus</i>	109
---	-----

Figure 3.2 : Cinétiques de l'évolution du pH et de production de l'activité antimicrobienne de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13 contre <i>S. cerevisiae</i> , <i>A. tumefaciens</i> et <i>B. subtilus</i> dans les milieux liquides LB, VNSS, GN, 333, Bennett et Zobell	112
Figure 3.3 : Cinétiques de croissance bactérienne et de production de molécules antimicrobiennes de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13 contre <i>S. cerevisiae</i>	115
Figure 3.4 : Profil chromatographique de la fraction volatile de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13	117
Figure 3.5 Spectres de masse de (A) l'oxyde de 13-épi-manoyle et de (B) l'oxyde de manoyle, montrant la différence des intensités relatives des pics caractéristiques à $m/z=275$ et $m/z=257$	118
Figure 3.6 : Fragmentation par impact électronique du composé 42	119
Figure 3.7 : Structure chimiques des principaux produits identifiés dans la fraction volatile de <i>Bacillus amyloliquefacience</i> S13	124
Figure 3.8 : Comparaison des profils CLHP des extraits obtenus à partir de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13 par dichlorométhane (A), acétate d'éthyle (B) et n-butanol (C)	132
Figure 3.9 : Composés extraits de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13 avec l'acétate d'éthyle	135

CHAPITRE 4

Figure 4.1 : Cinétique de production de kératinases et de croissance bactérienne de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13	150
Figure 4.2 : Profil chromatographique des kératinases KERZT-A et B	152
Figure 4.3 : (A) Analyse SDS-PAGE des kératinases purifiées. Ligne1, marqueur de taille Amersham LMW (GE Healthcare Europe GmbH, Fribourg, Allemagne). Ligne 2, extrait total. Ligne 3, échantillon dialysé après précipitation au sulfate d'ammonium (45-65%). Lignes 4 et 5, enzymes KERZT-B et A purifiées. (B) Profil zymogramme des kératinases purifiées KERZT-A et B	155

Figure 4.4 : Effet du pH sur l'activité des enzymes kératnolytiques KERZT-A et KERZT-B	160
Figure 4.5 : Effet du pH sur la stabilité des enzymes kératnolytiques (A) KERZT-A et (B) KERZT-B	160
Figure 4.6 : Effet de la température sur l'activité des enzymes kératnolytiques KERZT-A et KERZT-B	161
Figure 4.7 : Effet de la température sur la stabilité des enzymes kératnolytiques KERZT-A (A) et KERZT-B (B)	162
Figure 4.8 : Évaluation de la performance des kératinases semi-purifiées dans la biodégradation des plumes de volaille	167
Figure 4.9 : Évaluation de la performance des kératinases semi-purifiées dans l'activité de l'épilage	168

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1.1 : Bactéries identifiées à partir de diverses espèces d'algues brunes	41
Tableau 1.2 : Composés antimicrobiens isolés de microorganismes d'algues brunes	51
Tableau 1.3 : Principales classes d'enzymes	55

CHAPITRE 2

Tableau 2.1 : Caractéristiques analytiques de la droite d'étalonnage	72
Tableau 2.2 : Variation des taux de piégeage du DPPH [*] en fonction des différentes concentrations des échantillons testés	79
Tableau 2.3 : Variation des taux de piégeage de l'ABTS ^{**} en fonction des différentes concentrations des échantillons testés	83
Tableau 2.4 : Variation du pourcentage d'inhibition de blanchiment de la β -carotène en fonction des différentes concentrations des échantillons testés	85
Tableau 2.5 : Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons testés	88

Tableau 2.6 : Variation des taux de chélation métallique en fonction des différentes concentrations des échantillons testés	91
Tableau 2.7 : Caractérisation macromorphologique des souches bactériennes isolées de <i>Zonaria tournefortii</i>	100
Tableau 2.8 : Caractérisation micromorphologique des souches bactériennes isolées de <i>Zonaria tournefortii</i>	101
Tableau 2.9 : Caractérisation biochimique et métaboliques des souches bactériennes isolées de <i>Zonaria tournefortii</i>	102

CHAPITRE 3

Tableau 3.1 : Effet de la concentration de NaCl sur la croissance et la production de métabolites antimicrobiens par <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13	114
Tableau 3.2 : Composition chimique de la fraction volatile de <i>B. amyloliquefaciens</i> S13	122
Tableau 3.3 : Activité antimicrobienne de la fraction volatile de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13 exprimée en diamètres des zones d'inhibition et de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	126
Tableau 3.4 : Test d'antibiographie des extraits de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13	130
Tableau 3.5 : Analyse CL/ESI-SMHR des composés extraits de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13 avec le dichlorométhane	134
Tableau 3.6 : Analyse CL/ESI-SMHR des composés extraits de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13 avec l'acétate d'éthyle	134

CHAPITRE 4

Tableau 4.1 : Activités protéolytiques et kératinolytiques sur milieux solides des souches bactériennes nouvellement isolées	139
Tableau 4.2 : Niveaux de production des protéases kératinolytiques par les souches bactériennes sélectionnées	141
Tableau 4.3 : Activités relatives des préparations enzymatiques des deux souches bactériennes retenues en fonction du pH	142
Tableau 4.4 : Activités relatives des préparations enzymatiques des deux souches bactériennes retenues en fonction de la température	143

Tableau 4.5 : Effets des ions métalliques sur l'activité des préparations enzymatiques	144
Tableau 4.6 : Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et la production de kératinases par la souche <i>B. amyloliquefaciens</i> S13	147
Tableau 4.7 : Optimisation de la concentration de la farine de plumes de poulet pour la croissance et la production de kératinases par la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S13	148
Tableau 4.8 : Effet de différentes sources d'azote sur la croissance bactérienne et la production de kératinases par la souche <i>B. amyloliquefaciens</i> S13	148
Tableau 4.9 : Optimisation de la concentration de peptone de soja pour la croissance et la production de kératinases par la souche <i>B. amyloliquefaciens</i> S13	149
Tableau 4.10 : Bilan de purification des enzymes kératinolytiques KERZT-A et B	153
Tableau 4.11 : Alignement des séquences N-terminales des enzymes KERZT-A et B et comparaison avec les séquences N-terminales d'autres kératinases du genre <i>Bacillus</i>	156
Tableau 4.12 : Effets de divers inhibiteurs, agents réducteurs et ions métalliques sur l'activité des deux enzymes KERZT-A et B	158
Tableau 4.13 Spécificité des enzymes kératinolytiques KERZT-A et B vis-à-vis des substrats	163
Tableau 4.14 : Capacité des enzymes semi-purifiées dans la biodégradation des plumes de volaille (poulet et canard)	167

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les produits naturels sont considérés comme des métabolites qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme principal de l'organisme producteur pour certains et secondaires pour autres, et jouent aussi un rôle majeur comme médiateurs dans les interactions avec l'environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Ils présentent une diversité de structures et une spécificité d'activités supérieures à celles des produits synthétiques. Ils ont été utilisés comme traitement contre diverses maladies et continuent aujourd'hui à être une source de médicaments potentiels. Parmi les exemples les plus célèbres utilisés en médecine traditionnelle, on retrouve bien évidemment l'aspirine qui possède des activités anti-inflammatoire. La quinine, rapportée par les chimistes français Joseph Pelletier et Joseph Caventou en 1820 et approuvée par la FDA en 2004, a été largement utilisée comme traitement contre la malaria, la fièvre, l'indigestion, les maladies de bouche et de gorge ou encore le cancer. Enfin, la morphine fût découverte en 1804 et employée comme médicament contre la douleur [1,2].

Les produits naturels provenant des organismes terrestres ont longtemps été considérés comme la principale source de principes actifs. Le développement considérable de la plongée sous-marine, depuis la fin de la seconde guerre mondiale, a permis aux chercheurs d'élargir leur champ d'investigation vers un milieu doté d'une formidable biodiversité. La recherche dans le domaine des produits naturels d'origine marine remonte donc à plus d'une cinquantaine d'années. Depuis 1975, la chimie des produits naturels marins s'est organisée en trois spécialités parallèles : La chimie des toxines, la chimie des produits biologiquement actifs et l'écologie marine. Les résultats obtenus principalement lors des vingt dernières années, dans le domaine de l'écologie chimique permettent aujourd'hui de mieux comprendre pourquoi tant de composés aux structures chimiques si diverses et si complexes ont été isolés d'organismes marins. Ces travaux, ainsi que ceux effectués sur les toxines marines, permettent une approche plus rationnelle de l'étude des métabolites marins d'intérêt biologique dans des perspectives de valorisation.

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 se penchent sur ce gisement de molécules. 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. Elles se retrouvent intégrées, généralement à des stades de recherche et développement dans des secteurs industriels bien définis comme la pharmacie, les industries agroalimentaires, l'environnement, le développement durable etc. Les travaux de biotechnologie moderne, aux fins de production de biomolécules, se concentrent aujourd'hui autour des microorganismes.

L'importance de la découverte de produits naturels de microorganismes n'a commencé qu'après la production à grande échelle de la pénicilline, au cours de la seconde guerre mondiale, à partir d'une moisissure appelée *Penicillium nitatum*. Dans les années suivant la seconde guerre mondiale, d'autres antibiotiques majeurs furent découverts tels que la polymyxine B (1947) produite par *Bacillus polymyxa*, le chloramphénicol (1948) sécrété par *Streptomyces venezuelae*, la tétracycline de *Streptomyces aureofaciens* (1948), l'érythromycine (1952), la vancomycine (1956), la kanamycine (1957), la lincomycine (1962), etc., élaborées par diverses espèces de *Streptomyces* [3]. Des années plus tard, plusieurs dizaines de milliers de produits naturels ont été identifiés comme étant synthétisés par des microorganismes marins et terrestres. La découverte de la streptomycine, la gentamicine, omegamycine et d'autres antibiotiques ont poussé l'industrie pharmaceutique au développement de programmes basés sur la découverte de produits naturels, avec un accent mis récemment sur les technologies de fermentation à base microbiennes marines. Grâce aux études faites par l'institut d'Océanographie Scripps (en anglais Scripps Institution of Oceanography, SIO), il a été démontré que les bactéries marines étaient capables de synthétiser des structures moléculaires qui n'avaient jamais été observées pour les microorganismes d'origine terrestre [4].

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 la biotransformation technologique (bioconversion) et environnementale (dépollution). Les activités socio-économiques humaines ont un impact significatif sur la dégradation de l'environnement. Ces activités ont considérablement augmenté depuis la révolution industrielle en raison de la croissance démographique, de la fabrication industrielle et des pratiques agricoles. Les industries du monde entier recherchent donc des technologies alternatives capables de consommer moins de ressources et d'avoir un impact moindre sur l'environnement. La biotechnologie industrielle est devenue l'un des principaux fournisseurs de la chimie verte. C'est une technologie alternative qui pourrait remplacer ou compléter les technologies conventionnelles pour passer à des processus de production plus propres [5].

L'utilisation des enzymes tant que biocatalyseurs offre, depuis quelques années, de nouvelles possibilités d'applications et d'exploitations biotechnologiques. Contrairement aux catalyseurs chimiques, les enzymes microbiennes sont dotées d'une grande spécificité d'action et représentent une technologie écologique alternative aux produits chimiques conventionnels. Aujourd'hui, 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 toxiques. Parmi les protéases d'importance industrielle, les kératinases microbiennes suscitent un intérêt considérable sur le marché des enzymes. A ce jour, les kératinases microbiennes sont produites par des bactéries, des levures et des champignons. Cependant, les kératinases d'origine bactérienne, en particulier ceux produites par des bactéries du genre *Bacillus*, suscitent beaucoup plus d'intérêt de la part des chercheurs et des industries que les kératinases d'autres sources, en raison de leurs caractéristiques spécifiques et de la facilité de production à grande échelle [6].

De nombreux organismes marins, en particulier les macroalgues marines, souvent associées à des microorganismes, représentent une source de nouvelles molécules et enzymes susceptibles de valorisation.

Dans ce contexte, le projet de cette thèse a été élaboré afin de répondre aux objectifs suivants :

1. Isolement et évaluation des potentialités antioxydantes des dérivés d'acylphloroglucinols de l'algue brune *Zonaria tournefortii*.
2. Isolement et caractérisation de la communauté bactérienne de l'algue brune *Zonaria tournefortii*.
3. Valorisation des bactéries isolées à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii* dans la production des métabolites primaires et secondaires d'intérêt bioactif, environnemental et industriel.

Afin de répondre à ces objectifs, le travail de thèse s'articule autour de quatre grands chapitres distincts :

Le premier chapitre constitue une revue des données bibliographiques concernant principalement, les algues brunes et leurs microorganismes associés, les composés bioactifs dérivés de microorganismes et les enzymes kératinolytiques produits par des microorganismes.

Le deuxième chapitre est consacré d'une part à l'étude chimique de l'extrait brut de l'algue brune *Zonaria tournefortii* et l'évaluation des potentialités antioxydantes des dérivés d'acylphloroglucinols isolés, et d'autre part sur l'isolement et la caractérisation préliminaire des souches bactériennes de l'algue brune *Zonaria tournefortii*.

Le troisième chapitre décrit un travail portant sur la production et la caractérisation chimique de composés antimicrobiens produits par *Bacillus amyloliquefaciens* S13. Il comporte un programme de criblage des souches bactériennes nouvellement isolées à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii* pour la recherche de nouvelles souches productrices de métabolites antimicrobiens diffusibles et volatils, suivi par une étude de production, extraction et caractérisation chimique des métabolites antimicrobiens à la fois diffusibles et volatils de la souche sélectionnée *Bacillus amyloliquefaciens* S13.

Le quatrième chapitre a trait à une étude de production, purification et caractérisation biochimique de deux kératinases thermostables, nommées KERZT-A et KERZT-B, produites par *Bacillus amyloliquefaciens* S13. La bactérie est sélectionnée par une méthodologie de criblage soustractif des souches isolées à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii* pour la production de protéases kératinolytiques. Le chapitre rapporte également les potentialités de la souche et des enzymes semi purifiées dans la dégradation des substrats kératinolytiques et leur application dans le traitement de cuire et la dégradation des plumes de volaille.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les algues brunes : étude chimique et diversité des micro-organismes associés

1.1.1 Généralités sur les algues marines

Les algues regroupent un ensemble d'organismes qui se trouve dans les milieux aquatiques, bien qu'on en rencontre aussi dans de nombreux milieux terrestres : sur les sols, les rochers, les arbres et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. Les algues sont des végétaux photosynthétiques très divers, ne possédant ni feuilles, ni tiges, ni racines. Leur corps est un thalle, d'où leur nom de thallophytes. Elles se reproduisent sans jamais donner de fruits, graines ou fleurs d'où le terme de cryptogames. Le thalle contient une structure à sa base (rhizoïdes, crampons, disques...) permettant l'ancrage de l'algue sur un support : une roche (algues épilithes), ou une plante (algues épiphytes), ou un animal (algues épibiontes) ou parfois même le sable [7, 8].

Les algues poussent sous plusieurs formes, certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de long. Les variétés microscopiques, qui sont unicellulaires, s'appellent le phytoplancton. D'autres de plus grande taille, parfois flottante, mais le plus souvent fixées sur le fond ou sur d'autres organismes, constituent le phytobenthos [9]. Les cellules des algues possèdent les mêmes éléments de structure que celles des plantes supérieures. Elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des plastes pigmentés ou chromatophores. Elles sont le plus souvent des végétaux chlorophylliens photosynthétiques qui réalisent, en présence de lumière, la synthèse des substances organiques nécessaires à leur vie à partir des substances inorganiques prélevées dans le milieu comme l'eau, les sels minéraux et le dioxyde de carbone [10].

Les algues, comme les autres organismes marins, sont soumises à des facteurs physiques (lumière, température...), des facteurs chimiques (eau, salinité, substances polluantes...), et des facteurs biotiques (bactéries, phytoplancton...) [11]. Du fait de leur abondance en nombre dans le domaine aquatique qui recouvre les 2/3 de la planète, et de leurs propriétés, les algues sont essentielles pour l'équilibre du globe. L'intérêt pour les algues peut s'expliquer en grande partie par la présence de trois grandes catégories de composants (fibres, minéraux et protéines), mais également par la présence des métabolites secondaires à haute activité biologique tels que caroténoïdes, polyphénols, vitamines ou acides gras polyinsaturés [12].

1.1.1.1 Classification des algues marines

Les algues occupent une situation incontournable dans l'arbre du vivant. En fait, c'est le botaniste français Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708), qui a réuni les espèces en genres puis le naturaliste suédois Carl Von Linné (1707-1778), fondateur de la systématique (ou taxonomie), qui a classé les organismes en groupes de plus en plus larges : espèces, genres, familles, ordres, classes, embranchements (ou phylums) et règnes. En général, les algues sont classées en quatre grands groupes : les algues rouges, les algues vertes, les algues brunes et les algues bleues.

a. Algues rouges (*Rhodophycées*)

Les rhodophycées ou algues rouges forment un groupe très diversifié. Ces algues doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles. Les rhodophycées sont d'ordinaire de plus petite taille, leur longueur allant d'habitude de quelques centimètres à environ un mètre [13]. 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 [14].

b. 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 aient 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 [15]. 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 [16].

c. Algues brunes (Phaéophycées)

Les phéophycées forment un groupe très homogène. La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments. 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 [17]. 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 [18].

d. Algues bleues (Cyanobactéries)

Les algues bleues 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 [19].

1.1.1.2 Etude systématique de l'espèce *Zonaria tournefortii*

a. Systématique

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 [20]. Cette espèce a pour systématique : Embranchement: Phaeophyceophyta ; Classe : Phéophycées ; Ordre : Dictyotales ; Genre : *Zonaria*.

b. Description, biologie et écologie

Zonaria tournefortii, est une algue possédant un thalle verticale, fixé au substrat par un crampon, très ramifié, composé de segments linéaires [21]. Les plantes 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 [22]. Cette algue est présente toute l'année. Elle est gamétophyte et sporophyte, à spores dispersés à 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 [23]. 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 [21].

1.1.2 Composés phénoliques des algues brunes

1.1.2.1 Généralités

Les dérivés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ces produits sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal. Les produits phénoliques sont des dérivés non azotés dont l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) [24].

Les composés phénoliques sont obtenus par deux grandes voies d'aromagenèse : La voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, mais peuvent être également obtenus par une biogenèse mixte avec la participation du shikimate et de l'acétate, ou par le mévalonate avec le shikimate dans la biosynthèse d'autres dérivés mixte [25].

Les composés phénoliques algaux sont pour l'essentiel des polymères du phloroglucinol, dont les teneurs sont significativement plus importantes chez les algues brunes (Phéophycées) que chez les algues rouges ou vertes [26]. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles, à savoir, les algues brunes, qui se caractérisent par la présence de phlorotannins en tant que principaux composés phénoliques marins. Outre les phlorotannins, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les bromophénols ont également été constatés dans les algues brunes [27]. Toutefois, une autre classe chimique très ré pondant dans les algues brunes est celle des méroterpènes, ces molécules à biogenèse mixte, intermédiaire entre les phénols et les terpènes, comprennent un noyau hydroquinonique plus ou moins substitué fixé à un enchainement terpénique. Les méroditerpènes peuvent être considérées comme des dérivés phénoliques dont la voie de biosynthèse de la partie hydroquinonique dérive du métabolisme de l'acide shikimique [28].

Les composés phénoliques naturels ont été rapportés d'avoir d'excellentes propriétés comme agent de conservation, ainsi que d'avoir un rôle important dans la protection contre un certain nombre de troubles pathologiques. De plus, les produits phénoliques ont de nombreuses applications industrielles, par exemple, ils peuvent être utilisés comme colorants naturels et des conservateurs pour les aliments ou dans la production de peintures et de papier et dans le domaine cosmétique [29]. Ainsi, les phlorotannins d'algues brunes, présentent plusieurs activités biologiques telles que des activités antidiabétiques, antioxydantes, antimicrobiennes, protection contre les radiations ainsi que des activités anti-allergiques [30].

1.1.2.2 Extraction, purification et analyse

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes explorées dans l'extraction, la caractérisation chimique et le dosage. Cependant, il faut noter que ces propriétés peuvent s'exprimer différemment selon la complexité de la molécule concernée et le nombre de groupement hydroxyles portés par chacun des cycles benzéniques [31]. Les procédés d'extraction des composés phénoliques présentent un facteur majeur dans la variabilité des composés extraits. En effet, la température, la nature de solvant d'extraction, le temps d'extraction et la méthode adoptée pour la préparation des échantillons et pour l'extraction influe de manière significative sur la composition de l'extrait. Par conséquent, il n'existe pas de procédure uniforme ou tout à fait satisfaisante qui est appropriée pour l'extraction de tous les composés phénoliques ou à une catégorie spécifique de substances phénoliques dans les matières végétales [32].

La macération dans un solvant, connue comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. Le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle, et dans une moindre mesure le propanol, le diméthylformamide, et leurs combinaisons sont fréquemment utilisés pour l'extraction. Le développement de techniques modernes dites techniques d'extraction assistée (extraction assistée par micro-ondes, extraction assistée par ultrasons, extraction par liquide sous pression...) est destiné à surmonter les difficultés liées aux méthodes d'extractions classiques [33].

Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal non purifié. Par conséquent, la macération est souvent suivie d'une partition (extraction liquide-liquide) et d'un fractionnement sur colonne ou d'une pré-concentration en utilisant l'extraction en phase solide, nécessaires pour l'élimination des composés phénoliques non désirés et les substances non phénoliques telles que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles. Ainsi, plusieurs travaux ont été effectués sur la séparation ainsi que sur l'isolement de composés

phénoliques en utilisant la CLHP combinée avec d'autres techniques de détection plus ou moins complexes. En particulier, la purification de composés phénoliques en utilisant la CHLP couplée à un détecteur à barrette de diodes, a été couramment employée. La caractérisation structurale est réalisée grâce aux techniques spectrométriques classiques (UV-Visible, IRTF, SM et RMN) [34, 35].

1. 1.2.3 Composition phénolique des algues brunes

1.1.2.3.1 Dérivés polyphénoliques : phlorotannins

A la différence des polymères issus des végétaux terrestres qui dérivent de l'acide ellagique, les dérivés polyphénoliques des algues brunes sont des molécules provenant de couplages radicalaires, carbone-carbone ou carbones-oxygène, à partir du phloroglucinol, et biosynthétisés par la voie de l'acétate-malonate, appelés phlorotannins. Ces phlorotannins sont des composés possédant un large éventail de taille moléculaire (126 - 650 KDa) [36].

Les phlorotannins sont inclus dans des organismes particuliers, les physodes, desquels ils sont partiellement ou entièrement excrétés dans le milieu marin [37]. En fonction du type de liaison qui relie les monomères entre eux, les phlorotannins se classent en quatre grandes familles de composés.

- Fucols (Phlorotannins avec une liaison phényle)
- Fuhalols et Phloréthols (Phlorotannins avec une liaison éther)
- Fucophloréthols (Phlorotannins avec un éther et un assemblage phényle)
- Eckols (Phlorotannins avec liaison dibenzodioxine)

Fucols : Phlorotannins avec une liaison phényle

Ce sont des oligomères simples du phloroglucinol qui ne proviennent que de couplages C-C. Diverses structures de fucols ont été rapportées dans différents travaux de recherches dont nous pouvons citer le Difucol et le Tetrafucol A isolés à partir de *Fucus vesiculosus* le Trifucol de *Fucus spiralis* [38], ainsi que des fucols possèdent un noyau phloroglucinol halogéné décrit dans *Anelipus japonicus* [39].

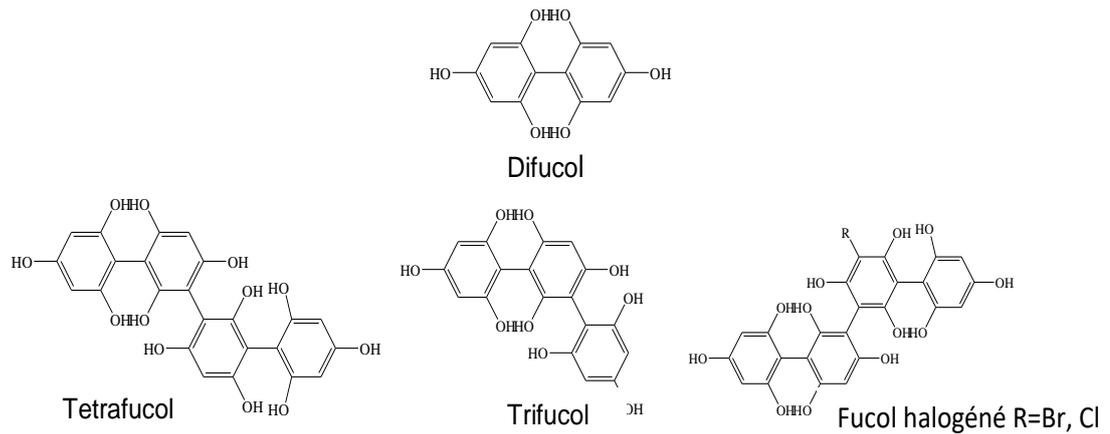


Figure 1.1 : Exemples de fucols

Fuhalols et Phloréthols : Phlorotannins avec une liaison éther

Ce sont des phlorotannins qui regroupent tous les dérivés résultant d'un couplage radicalaire carbone-oxygène entre deux ou plusieurs phloroglucinol. Les noyaux aromatiques sont donc tous reliés entre eux par des ponts éthers.

Les fuhalols diffèrent des phloréthols par la présence de plusieurs groupes hydroxyles supplémentaires sur les unités du phloroglucinol. Les fuhalols sont nombreux et complexes, certains d'entre eux sont présentés dans la figure 1.2. Il s'agit du bifuhalol isolé de *Bifurcaria bifurcata* [40], le tétrafuhalol C isolé de *Cystoseira baccata* [41] et le heptafuhalol-A octadecaacetate isolé de *Carpophyllum angustifolium* [42].

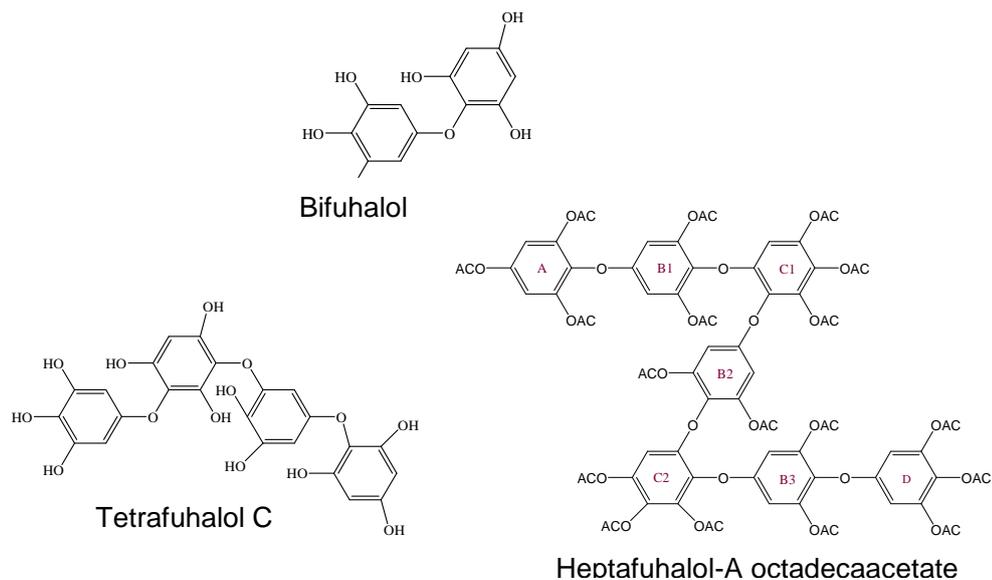


Figure 1.2 : Exemples de fuhalols

Le nom des phloréthols dérive de la contraction entre phloroglucinol et éther. Les possibilités de couplages radicalaires sur les positions *ortho* et *para* conduit à un très grand nombre de structures dès que le nombre de noyaux phloroglucinol augmente. Des exemples de phloréthols sont donnés dans la figure 1.3. Il s'agit du diphloréthol isolé de *Bifurcaria bifurcata*, le triphloréthol B de *Cystophora granulata* [43], et le triphloréthol A de *Cystophora congesta* [38].

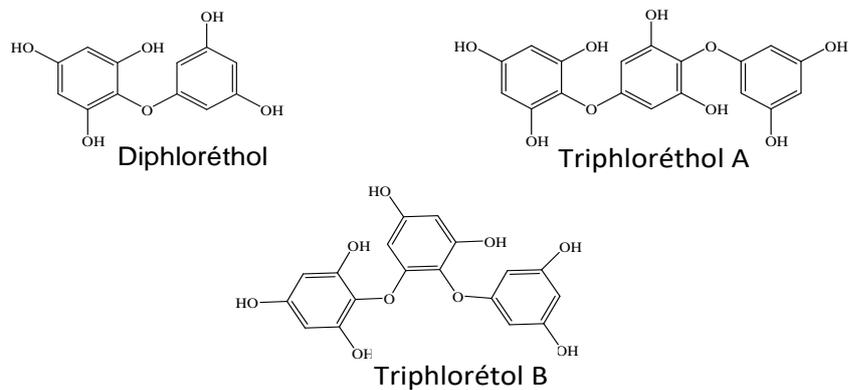


Figure 1.3 : Exemples de phloréthols

Fucophloréthols : Phlorotannins avec un éther et un assemblage phényle

Ce sont les formes mixtes associant des couplages C-C et C-O avec une majorité de couplage C-O. Le fucophlorétole A, premier terme de cette série, associe le difucol et le diphloretole. Il a été décrit dans *Fucus vesiculosus* [44]. Les fucophloréthols sont très nombreux, parmi eux, on peut citer le fucotriphloréthol F rapporté dans *Durvillea antarctica*, le fucodiphloroéthol G décrit dans *Ecklonia cava* [43] et le fucotriphlorethol A isolés à partir de *Fucus vesiculosus* [45].

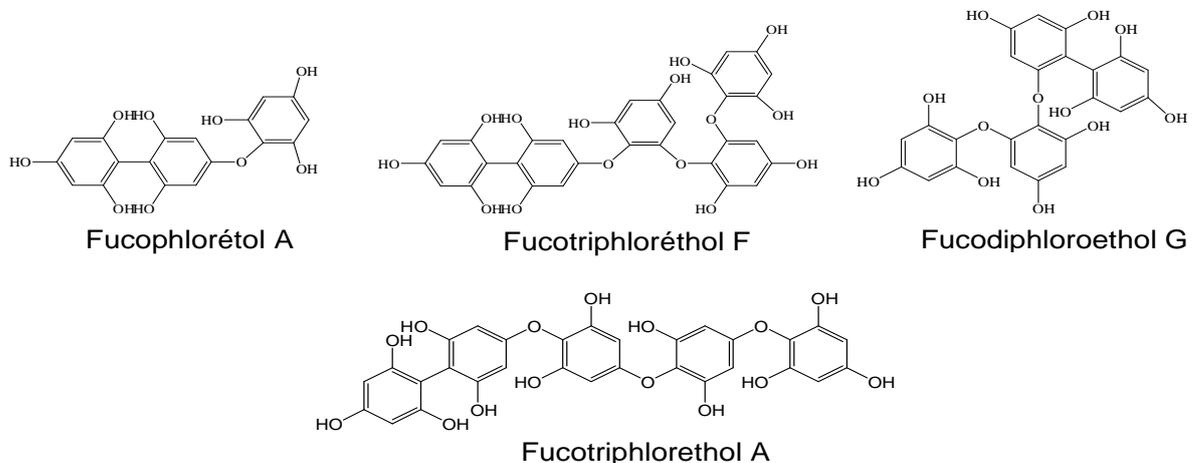


Figure 1.4 : Exemples de fucophloréthols

Eckols : Phlorotannins avec liaison dibenzodioxine

Ce sont des phlorotannins avec une liaison dibenzo-[1,4] dioxine. Deux genres de Laminariales, *Eckonia* et *Eisenia* (famille des *Alariaceae*), contiennent des phloréthols particuliers dans lesquels des cyclisations intramoléculaires ont formé des dibenzo-[1,4] dioxine et des furanes. Ils sont ainsi rencontrés dans le genre *Ishige*, particulièrement dans *Ishige okamurae*.

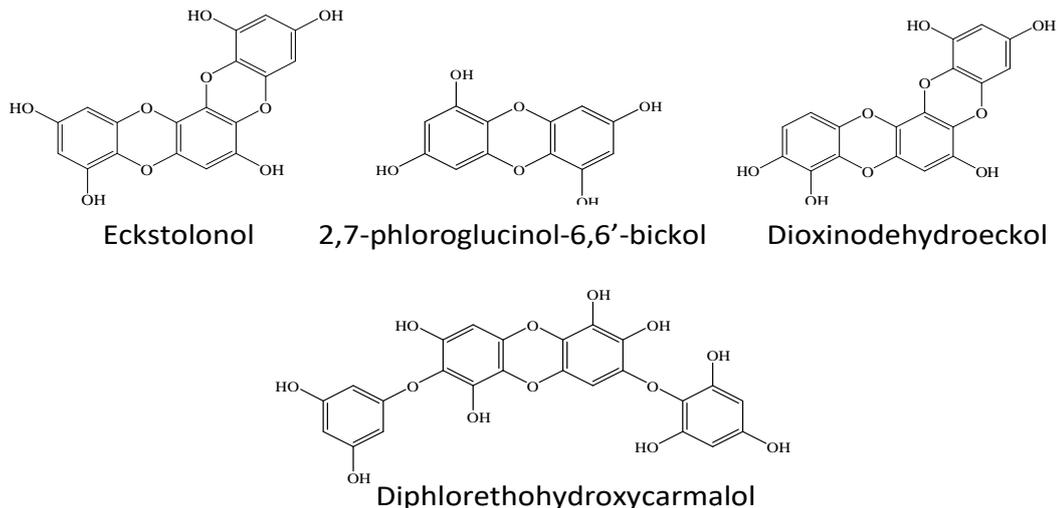


Figure 1.5 : Exemples de fucophoréthols

1.1.2.3.2 Dérivés du phloroglucinol: Etat de connaissance sur la composition chimique des genres *Zonaria*, *Cystophora* et *Lobophora*

a. Dérivés de phloroglucinol issus des algues brunes du genre *Zonaria*

Différents travaux de recherche ont été menés sur plusieurs espèces du genre *Zonaria*. Ceux-ci concernent l'isolement et l'élucidation structurelle de nombreux dérivés de phloroglucinols qu'elles contiennent. Ces derniers sont résultants d'un couplage entre une molécule de phloroglucinol et une oxylipine à 20 ou à 22 atomes de carbone [19].

V. Amico et al. [46, 47], C. Tringalli et M. Piatelli [48, 49] et M. El Hattab et al. [50] ont effectué des recherches sur l'espèce *Zonaria tournefortii* qui leur ont permis d'isoler six nouveaux dérivés du phloroglucinol à partir de l'extrait lipidique traité par la soude.

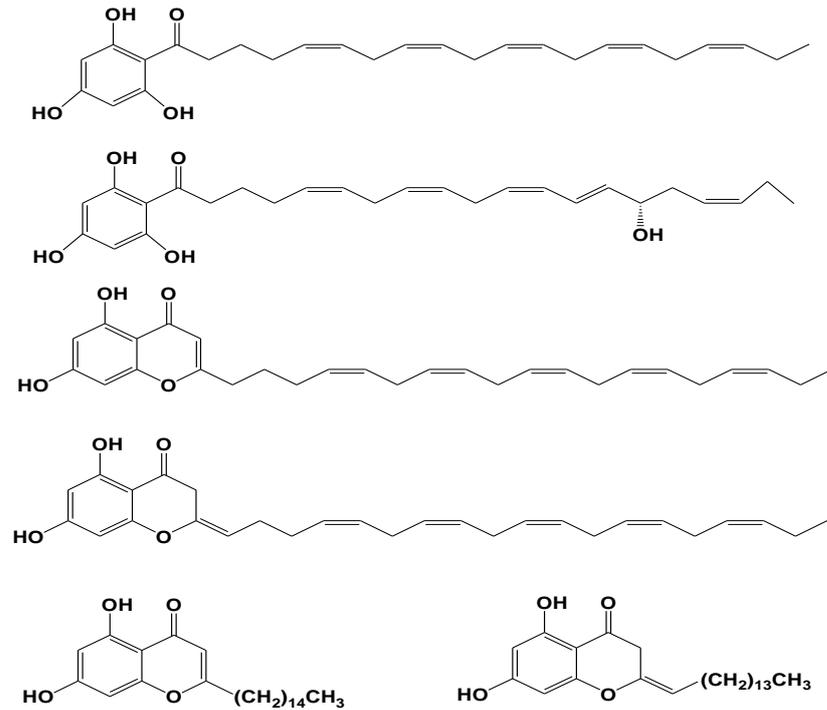


Figure 1.6 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria tournefortii*

Les travaux menés par W. Gerwick et al. [51] ont permis d'isoler deux nouveaux produits à partir des espèces *Zonaria farwolii* récoltée sur les côtes sud de la Californie et *Zonaria diesingiana* de l'herbier Fukuoka du Japon.

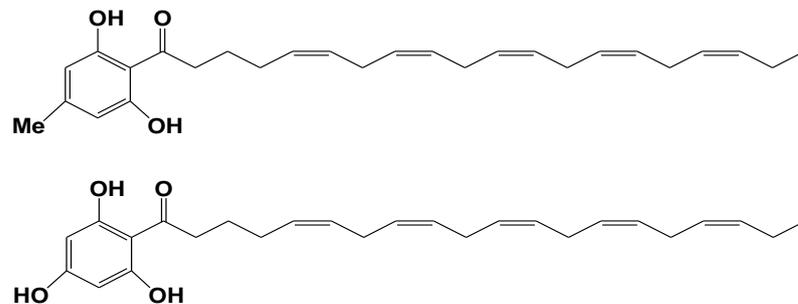


Figure 1.7 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria farwolii*

De même, P. Wisespongpan et al. [52] ont isolé trois dérivés du phloroglucinols à partir de *Zonaria diesingiana*, lesquels ont été ainsi isolés à partir de *Zonaria farwolii* et *Zonaria tournefortii*. En outre, une nouvelle structure d'un phloroglucinol avec un résidu acyle C-20 a été également isolée à partir de *Zonaria diesingiana* en 1994 par Kusumis et al. [53].

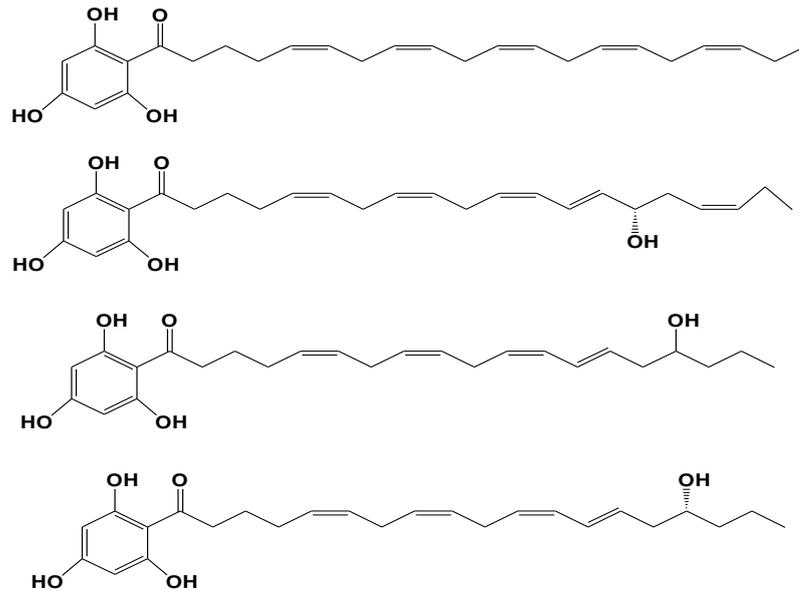


Figure 1.8 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria diesingiana*

Blackman & Rogers [54] ont effectué des travaux sur trois espèces du genre *Zonaria*, se trouvant dans les zones subtidales le long de la Tasmanie. Celles-ci concernent *Zonaria turneriana* J.Agardh, *Zonaria creneta* J. Agardh, et *Zonaria angustata* Kuetz. Ces travaux leur ont permis d'isoler trois dérivés de phloroglucinol déjà rapportés chez d'autres espèces de *Zonaria*.

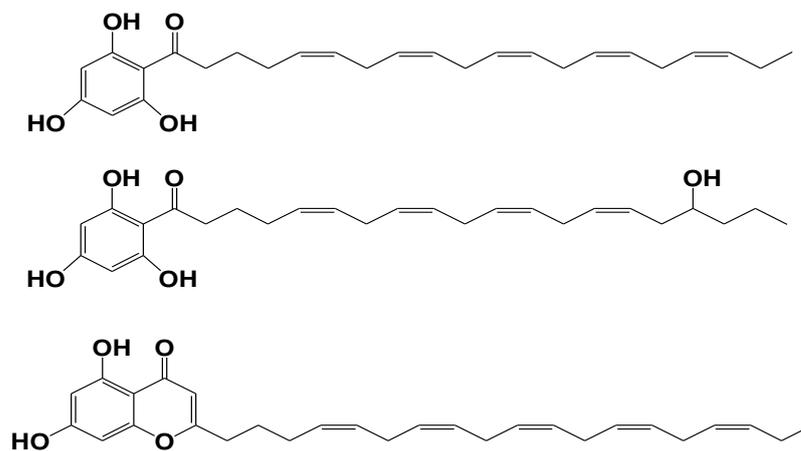


Figure 1.9 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria creneta*

b. Dérivés de phloroglucinol issus des algues brunes du genre *Cystophora*

Des travaux antérieurs effectués sur diverses espèces du genre *Cystophora* ont également permis d'isoler des dérivés de phloroglucinol similaire à ceux de *Zonaria*, y compris les travaux de Gregson et al. [43], Kazlauskas et al. [55], Damian W. Laird et al. [56], dont les différentes structures sont illustrées ci-dessous.

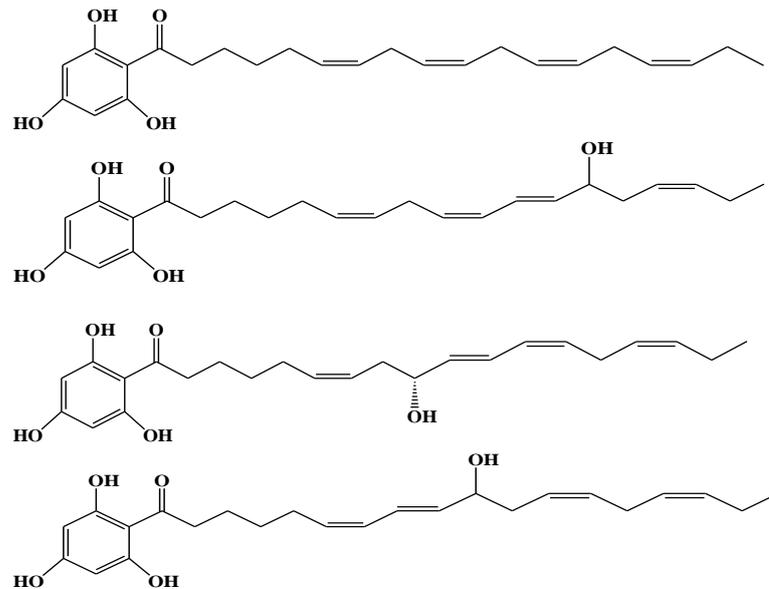


Figure 1.10 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Cystophora*

c. Dérivés de phloroglucinol issus des algues brunes du genre *Lobophora*

Deux dérivés du phloroglucinol représentés dans la figure 1.11 ont été isolés à partir de l'espèce *Lobophora papenfussii* récoltée sur les côtes nord ouest de l'Islande [53].

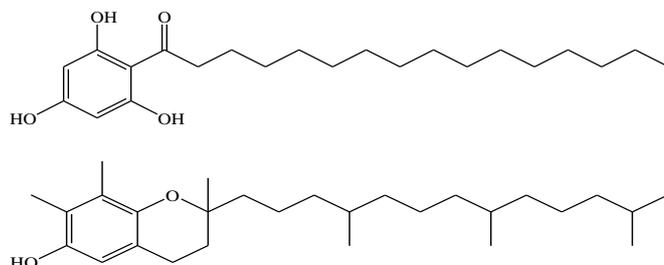


Figure 1.11 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Lobophora papenfussii*

1.1.3 Microorganismes autochtone des algues brunes

1.1.3.1 Généralités sur les microorganismes marins

Le milieu marin est un écosystème complexe avec une énorme pluralité de formes de vie qui sont associées entre eux, les associations les plus courantes sont entre les cellules eucaryotes et les microorganismes [57].

Les microorganismes marins sont présents dans toutes les mers et les océans du globe. Ils ont une répartition géographique et spatiale omniprésente. Ils présentent une très grande diversité et une couverture taxonomique très large probablement liée à la pluralité de conditions environnementales rencontrées en milieu marin, mais qui reste aujourd'hui encore mal connue. Les microorganismes ont donc une grande capacité d'adaptation, et vivent dans certaines niches ou peu d'autres types d'organismes sont capables de vivre. Les surfaces d'organismes marins eucaryotes tels que les invertébrés et les algues offrent un habitat riche en nutriments particulièrement bien adapté pour la colonisation des microbes qui vivent adhérents à diverses communautés souvent immergées dans une matrice ou avec formation d'un biofilm défini comme : « un assemblage de cellules microbiennes qui est irréversiblement associé à une surface, et enfermé dans une matrice de matériau de polysaccharide » [58].

L'étude des microorganismes a été pendant longtemps négligée car leur taille microscopique était souvent à l'origine d'obstacles techniques. Toutefois, les avancées récentes dans le domaine de la biologie moléculaire et la microbiologie placent désormais l'étude des microorganismes à la pointe de la recherche moderne. Ces techniques ont permis d'ouvrir les portes d'un univers encore peu connu, dévoilant une diversité taxonomique très riche, de nombreuses interactions entre les microorganismes et des capacités d'adaptation surprenantes acquises au cours de l'évolution. Les microorganismes pourraient donc bien être le principal gisement de nouvelles molécules des prochaines décennies. En fait, la majorité des produits naturels actifs sont à l'heure actuelle produits et isolés de microorganismes. Cependant, les microorganismes marins représentent de potentielles sources de produits naturels prometteurs ayant l'avantage de production réalisable de grandes quantités de métabolites secondaires avec un coût raisonnable, par culture à

grande échelle et fermentation de la source organisme. En outre, les microorganismes marins accumulent parfois des métabolites secondaires bioactifs structurellement uniques ne se trouvent pas dans les organismes terrestres [59].

1.1.3.2 Diversité des microorganismes des algues brunes

Les microorganismes marins vivent librement dans les eaux de mères, ou attachés à des surfaces biotiques ou abiotiques. Bien que les microorganismes observés et identifiés de diverses algues comprennent des levures, des champignons et des protistes, la majorité des rapports portés sur les populations microbiennes associées aux algues concernent des bactéries [58].

Les études descriptives des bactéries isolées à partir d'algues ont été signalées dès 1875. Cependant, le nombre et la complexité de ces études ont considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Cette augmentation peut être attribuée à l'utilisation combinée des méthodes améliorées de la culture bactérienne, la microscopie et la biologie moléculaire. Les associations bactéries-algues brunes comprennent un certain nombre de nouvelles espèces bactériennes, genres et même des ordres, ce qui prouve que les algues brunes représentent une source distincte et riche de nouveaux taxons bactériens [60].

Les bactéries décrites à partir des surfaces d'algues marines appartiennent aux phylums supérieurs *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *cyanobactéries*, *Firmicutes*, *Planctomycètes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Tenericutes* et la division *OP11*. Ces représentants bactériens 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* (Figure 1.12) [61].

Tableau 1.1 : Bactéries identifiées à partir de diverses espèces d'algues brunes

Espèces d'algues	Bactéries	Références
<i>Chordaria flagelliphormis</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	[62]
<i>Chorda filum</i>	<i>Algoriphagus chordae</i>	[63]
	<i>Arenibacter latericius</i>	[64]
	<i>Winogradskyella thalassocola</i>	[65]
<i>Colpomenia sinuosa</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[66]
<i>Desmarestia viridis</i>	<i>Bacillus</i> spp.	[62]
<i>Ecklonia cava</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[66]
<i>Ecklonia kurome</i> Okamura	<i>Croceitalea dokdonensis</i>	[67]
	<i>Croceitalea eckloniae</i>	[67]
	<i>Flagellimonas eckloniae</i>	[68]
<i>Fucus evanescens</i>	<i>Bacillus algicola</i>	[69]
	<i>Brevibacterium celere</i>	[70]
<i>Fucus serratus</i>	<i>Cellulophaga baltica</i>	[71]
	<i>Cellulophaga fucicola</i>	[71]
	<i>Bacillus pumilus</i>	[72]
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Fucobacter marina</i>	[73]
<i>Laminaria digitata</i>	<i>Cobetia marina</i>	[74]
	<i>Paracoccus aminophphylus</i>	
	<i>Algibacter lectus</i>	
	<i>Kocuria rhizophilia</i>	
	<i>Rhodococcus jostii</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Laminaria japonica</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	[75]
	<i>Winogradskyella eximia</i>	[65]
	<i>Zobellia laminariae</i>	[76]
	<i>Pseudoalteromonas bacteriocola</i>	[77]
	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	[78]
<i>Laminaire latissima</i>	<i>Kiloniella laminariae</i>	[79]
<i>Lobophora variegata</i>	<i>Alteromonas atlantica</i>	[80]
<i>Padina tetrastrumatica</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	[66]
<i>Padina</i> Sp.	<i>Roseibacillus ishigakijimensis</i>	[81]
<i>Petalonia fascia</i>	<i>Bacillus cereus</i>	[66]
	<i>Bacillus clausii</i>	
<i>Pocockiella</i> sp.	<i>Microbulbifer variabilis</i>	[82]
	<i>Microbulbifer epialgicus</i>	[82]
<i>Sargassum fusiformis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[66]
	<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Sargassum seratifolium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	[66]
<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Haloferula sargassicola</i>	[83]
<i>Sargassum</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>	[84]
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	<i>Bacillus cereus</i>	[66]
<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Leuconostoc miyukkimchii</i>	[85]
	<i>Phycococcus jejuensis</i>	[86]
	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	[87]
	<i>Psychrobacter aquimaris</i>	[87]
	<i>Psychromonas arctica</i>	[87]
	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	[87]
	<i>Bacillus psychrodurans</i>	[87]

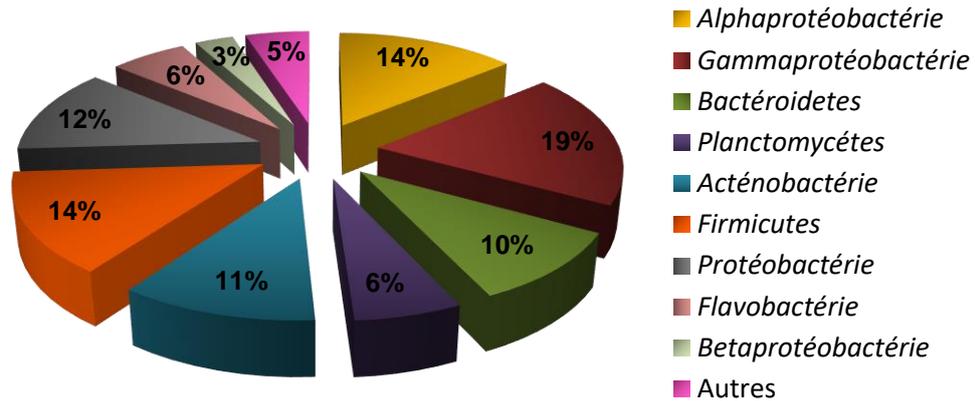


Figure 1.12 : Les principaux taxons bactériens associés aux algues brunes

1.2 Composés bioactifs dérivés de microorganismes

1.2.1 Recherche et découverte de composés bioactifs d'origine microbienne

Avec l'apparition des microorganismes multi-résistants aux antibiotiques et de nouveaux aspects de la pathologie microbienne, et au vu de l'éventail restreint des molécules utilisées dans le domaine thérapeutique, plusieurs chercheurs dans le monde se sont intéressés à la recherche et le développement de nouveaux métabolites bioactifs dont l'activité serait plus performante tout en étant moins agressifs pour l'organisme [88].

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 microbiens.

1.2.1.1 Composés organiques non volatils microbiens

1.2.1.1.1 Culture, production et extraction

La fermentation est un procédé qui consiste à cultiver les microorganismes dans le but de leur faire produire des substances ou des molécules 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 pré-déterminée. Au cours de la fermentation, le milieu de production doit d'abord permettre d'assurer une importante croissance pour conduire à une concentration élevée en cellule au moment de la production. Il doit assurer ensuite la production optimisée de métabolites bioactifs.

La culture des différents types de microorganismes, particulièrement ceux qui ont un potentiel spécifique pour la production de métabolites bioactifs est dépendante de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement. Des expériences basées sur le choix de divers paramètres influençant le résultat d'expériences de culture, y compris les sources d'énergie et les conditions physico-chimiques désirées (pH, température, agitation, oxygénation) peuvent être évaluées afin d'optimiser les conditions de culture appropriées pour l'obtention des meilleurs résultats pour la croissance des microorganismes et la production de métabolites.

La nature et la concentration des nutriments utilisés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites bioactifs. En fait, la nature des sources de carbone et d'azote, de phosphate inorganique, ainsi que d'autres sels inorganiques et des oligoéléments du substrat de culture utilisé, peut influencer le métabolisme primaire et secondaire des microorganismes et donc la production de métabolites. Outre l'importance de la composition du milieu de culture, plusieurs travaux ont montré l'implication du temps d'incubation comme étant un facteur déterminant dans la production des métabolites et qui peut être variable d'une espèce à une autre. Les microorganismes producteurs (champignons et bactéries) se caractérisent généralement par une production qui n'a lieu qu'après la croissance active, pendant des phases de stress, phases correspondant à des différenciations morphologique et physiologique. Cependant, dans certains cas, cette production peut débuter durant la phase exponentielle de croissance [89, 90].

Une méthodologie a été proposée récemment, recommandant de faire varier systématiquement différents paramètres de cultures (composition des milieux, aération, température, pH, addition d'inhibiteurs d'enzymes etc.) afin d'augmenter le nombre de métabolites disponibles à partir d'une même source microbienne. Cette méthodologie, nommée approche OSMAC (One Strain-Many Compounds), permet d'améliorer l'investigation de la diversité des composés qui peuvent être produits par une même souche de microorganismes. La variation des conditions de culture permettraient de stimuler ou d'activer des voies de biosynthèse différentes augmentant ainsi la diversité métabolique d'une souche et par la même les possibilités d'obtenir des composés originaux [91].

Les composés bioactifs ainsi produits sont généralement récupérés par extraction liquide-liquide à partir du surnageant de culture en utilisant des solvants organiques qui permettent une bonne extraction sans altération des métabolites. Cependant, il convient de noter, dans des cas assez rares, que certains composés produits sont totalement intracellulaires et d'autres ne sont pas secrétés en totalité dans le surnageant et une fraction reste intracellulaire. Devant cette situation, les métabolites actifs produits sont récupérés par extraction à partir de la biomasse. Par ailleurs, l'extraction des composés bioactifs est réalisée par plusieurs équipes de recherche en utilisant de la résine macroporeuse HP-20. Cette dernière est ajoutée au milieu de culture à la fin de la fermentation. Après centrifugation de la culture, le résidu constitué de la résine et de la biomasse cellulaire est lavé avec de l'eau distillée puis extrait en utilisant un solvant organique [92, 93].

1.2.1.1.2 Profilage chimique des composés bioactifs

La découverte de nouveaux composés bioactifs microbiens est un défi dans le domaine des recherches menées sur les produits naturels en raison du taux élevé de ré-isolément des métabolites déjà connus. L'enjeu se situe, par conséquent, dans la recherche à augmenter les chances d'identifier de nouveaux composés doués d'activités biologiques originales et inattendues, pouvant même conduire à l'identification d'une nouvelle cible biologique et à l'ouverture d'un champ de recherche. Une des principales stratégies pour résoudre ce problème est l'utilisation du concept de l'identification rapide et précoce des métabolites par déréplication.

Ce processus vise à analyser structurellement des mélanges complexes (extraits bruts) avec peu ou sans purification complète au préalable permettant l'identification de composés déjà décrits dans la littérature afin d'éviter la redondance des structures chimiques isolées. Ainsi, la probabilité d'arriver à l'élucidation structurale de molécules originales est plus élevée que dans le cas d'une recherche de molécules d'intérêt de façon plus traditionnelle [94].

La déréplication implique la combinaison de l'utilisation de techniques analytiques de caractérisation physicochimique adaptées aux molécules d'intérêt, et la comparaison des profils obtenus à des bases de données chimiques performantes et/ou à une chimiothèque de standards. Actuellement, la déréplication est beaucoup plus facile en raison du développement rapide de techniques de couplage modernes. Par rapport à l'utilisation classique de la spectroscopie UV, SM et RMN appliquée à des produits purs, l'intégration de toutes ces techniques dans leurs formes CL-UV, CL-SM et CL-RMN dans une seule configuration a permis la caractérisation complète de différents métabolites dans un mélange en une seule analyse [95].

L'introduction de la chromatographie liquide à haute performance couplée à des détecteurs de spectrométrie de masse haute résolution a marqué une réelle avancée. Cette technique permet d'obtenir rapidement la formule brute des molécules présentes dans l'extrait et donne ainsi une information primordiale dans la comparaison avec des bases de données. Néanmoins, cette information montre des limites, la discrimination entre différents isomères ne peut être faite et d'autres données spectrales sont alors nécessaires pour permettre leur différenciation. La spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) permet d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure des molécules par fragmentation de l'ion moléculaire puis d'une seconde analyse par spectrométrie de masse sur les fragments générés. Elle est donc plus discriminante dans le processus de déréplication. Les données obtenues pour chacun des métabolites identifiés, permettent d'établir des schémas de fragmentation spécifiques à chaque classe de composés chimiques. Ceci permet de définir une véritable «carte d'identité» pour chaque type de composé, caractéristique de sa structure chimique [96, 97].

1.2.1.1.3 Isolement, purification et identification

En absence de techniques de couplages CL-RMN suffisamment sensibles pour permettre une élucidation structurale en cours de déréplication, l'isolement et la purification du ou des composés actifs est nécessaire pour établir leur structure.

La complexité des extraits microbiens sélectionnés à l'issue de la déréplication constitués d'un mélange de molécules actives et non actives, nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules d'intérêt. Différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation des composés microbiens telles que la chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP), la chromatographie d'exclusion sur gel et la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Nous avons constaté les nombreux avantages et intérêt du couplage CLHP-SM dans une stratégie de déréplication. Même si cette technique fournit déjà un nombre important d'informations structurales, l'élucidation complète est souvent nécessaire en particulier pour les composés non encore répertoriés dans les bases de données de produits naturels. Des méthodes de caractérisation comme la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie ultraviolet (UV) et infrarouge (IR) et la spectroscopie de masse (SM) ont permis de faciliter la détermination de structure.

1.2.1.2 Composés organiques volatils microbiens

Les composés organiques volatils microbiens (mVOCs) représentent une variété de molécules provenant de différentes voies métaboliques au cours de la croissance d'un large éventail de microorganismes. Parmi l'immense diversité du métabolome microbien, les métabolites volatils génèrent un intérêt croissant. Cependant, les études sur les émissions de COVs microbiens sont largement moins nombreuses que celles sur les émissions de COVs des plantes. Les COVs microbiens sont utilisés dans la communication inter et intra spécifique, induisent des mécanismes de défense ou encore influencent des processus physiologiques. Il a été suggéré dans plusieurs recherches antérieures, que les COVs émis par divers microorganismes jouent un rôle important dans les interactions antagonistes entre des microorganismes occupant la même niche écologique et entre d'autres microorganismes cibles [98].

De même, depuis plusieurs années, un grand nombre de recherches s'intéresse au potentiel des COVs microbiens comme agents de biocontrôle dans la protection des plantes. Les COVs microbiens sont étudiés dans la lutte contre des microbes et des champignons [99]. Les COVs microbiens peuvent varier en fonction de l'espèce, du milieu de culture et des conditions environnementales. Certains composés volatils sont plus spécifiquement émis par quelques espèces seulement, alors que d'autres sont beaucoup plus universels.

1.2.1.2.1 Extraction des COVs microbiens

Une variété de systèmes ont été développés pour capturer les métabolites volatils émis par les microorganismes. Les principales techniques utilisées sont les méthodes d'échantillonnage qui collectent les substances volatiles d'une culture bactérienne liquide émis pendant ou après la période de croissance [100]. La diversité et la sensibilité des méthodes d'extraction utilisées ont une grande influence sur la qualité et la quantité des substances détectables.

Une des méthodes de collecte des COVs microbiens les plus usitées, est la méthode d'extraction par entraînement dans une boucle fermée (CLSA) [101]. Cette méthode consiste en l'extraction en circuit fermé, par un débit de gaz inerte, des composés volatils d'un échantillon. Ce débit gazeux passe à travers l'échantillon et, par la suite, dans un piège d'adsorbant (charbon activé) où les composés volatils sont adsorbés. Ces passages s'effectuent plusieurs fois et le charbon activé s'enrichit graduellement en molécules d'intérêt. Par la suite, les composés adsorbés sur le piège de charbon activé sont extraits avec un volume de solvant, généralement le dichlorométhane ou le sulfure de carbone [102, 103].

Bien que la méthode d'extraction par entraînement dans une boucle fermée (CLSA) soit largement utilisée pour l'extraction et la préconcentration des COVs microbiens provenant d'échantillons aqueux, la microextraction en phase solide (SPME) est une méthode de préparation d'échantillon rapide permettant de combiner l'extraction, la concentration et l'introduction dans un instrument d'analyse en une seule étape et sans utilisation de solvant. Cependant, la méthode SPME utilise des

fibres qui possèdent une plus ou moins grande affinité pour certains composés, ce qui limite la sensibilité de l'analyse et empêche la découverte de nouvelles molécules [104].

Le principe de fonctionnement de la méthode SPME est l'introduction d'une fibre, recouverte d'une phase adsorbante, dans l'interface gaz-liquide de l'échantillon dans un flacon fermé. Cette fibre est contenue dans une aiguille et est insérée dans l'enceinte à l'aide d'une seringue. Le flacon utilisé possède un couvercle muni d'un septum permettant la pénétration de l'aiguille. Une fois à l'intérieur, la fibre est libérée par un système de piston. Les composés volatils d'intérêt présents dans la phase gazeuse viennent s'adsorber sur la fibre pendant un temps déterminé selon la nature du matériel étudié. Ensuite, l'aiguille est introduite à l'intérieur d'un injecteur et les analytes sont désorbés thermiquement ou élués en fonction de la technique analytique utilisée [105].

Une autre méthode plus traditionnelle également décrite dans la littérature pour l'extraction des COVs microbiens est la méthode d'extraction distillation simultanée (SDE). Cette méthode combine la distillation à la vapeur et l'extraction par solvant [106]. Avec la méthode d'extraction simultanée, un certain volume de solvant organique est chauffé séparément dans un ballon à fond rond relié à une tête de distillation-extraction de type Nickerson-Lichens. La vapeur provenant de l'échantillon d'eau (bouillon de culture) se mélange à celle provenant du solvant, et les composés organiques volatils sont extraits dans la phase gazeuse [107].

1.2.1.2.2 Analyse et identification des COVs microbiens

La méthode la plus utilisée actuellement pour l'analyse des COVs microbiens est la chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CG/SM). Ce couplage est caractérisé par une capacité de séparation puissante et des performances de détection extrêmement sensibles. En effet, un logiciel CG/SM récent améliore la limite de détection grâce à la déconvolution de pics adjacents et à la soustraction du bruit de fond. Les étapes de fonctionnement de la CG/SM consistent d'abord en l'injection des composés dans une phase stationnaire où un

gaz vecteur va transporter et séparer les molécules selon leurs propriétés chimiques le long de la colonne. Ensuite, les molécules sont ionisées et leur spectre de masse est déterminé. Par ailleurs, une analyse CG/SM optimale comprend l'utilisation du TOF-MS, en particulier lorsqu'il est couplé à la chromatographie en phase gazeuse sur colonne en 2D (CG x CG). Le degré élevé de séparation offert par les deux colonnes et la grande sensibilité de TOF-MS sont des solutions appropriées pour l'analyse de composants volatils à l'état de traces [104].

L'identification des COVs microbiens peut être réalisée en utilisant des bases de données spectrales telles que les bibliothèques Wiley, NIST, NBS etc. et/ou en comparaison avec les spectres de masse rapportés par la littérature. En outre, une base de données sur les substances volatiles microbiennes, appelée mVOC, est maintenant disponible en ligne sur (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc>). Cette base de données répertorie près de 1000 composés volatils microbiens et contient des informations sur leurs organismes émetteurs, leurs voies de biosynthèse et leurs effets biologiques. Cette nouvelle base de données offre différentes possibilités à l'utilisateur de rechercher un composé volatil. En cas de composés volatils inconnus, une étape d'isolement est requise, suivie d'une identification spectrale en utilisant la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) [104].

1.2.2 Composés bioactifs produits par des microorganismes d'algues brunes

Les algues brunes représentent une source prometteuse de nouveaux taxons microbiens avec de potentialités bioactives importantes, en particulier des activités antimicrobiennes. L'algue brune *Laminaria saccharina* représente une des sources potentielles de nouveaux isolats bactériens avec des propriétés antimicrobiennes remarquables. Jutta Wiese et al. ont isolé des bactéries à partir de l'algue brune *L. saccharina*, et ont testé leur activité antimicrobienne envers un panel de microorganismes. Sur un total de 210 isolats testés, 103 souches bactériennes ont inhibé la croissance d'au moins un germe cible [108]. *Padina pavonica*, représente une autre source de bactéries à activité antimicrobienne. Les travaux réalisés par Amel Ismail et al. [109] ont indiqué la présence d'une potentielle activité

antimicrobienne chez 5 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 [110]. Les résultats ont montré que tous les isolats avaient une activité antimicrobienne et pouvaient être de potentielles candidates en tant qu'agents producteurs d'antimicrobiens.

Kanagasabhapathy et al. [111] 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. L'analyse phylogénétique des bactéries isolées, en utilisant le séquençage de l'ARNr 16S, a révélé que toutes les bactéries à activité antibactérienne élevée présentaient une affiliation proche avec le genre *Bacillus*. Ce résultat suggère que le genre *Bacillus* est un producteur efficace de composés antimicrobiens.

Les microorganismes associés aux algues brunes ont un grand potentiel pour le développement de l'industrie pharmaceutique marine car ils constituent une immense source de nouvelles molécules bioactives qui sont potentiellement plus faciles à utiliser dans les applications biotechnologiques par rapport à celles dérivés d'algues. Par ailleurs, les activités antimicrobiennes observées chez plusieurs espèces bactériennes et fongiques isolées d'algues brunes rapportées par plusieurs travaux de recherche démontrent clairement le potentiel des microorganismes isolés d'algues brunes à produire de nouveaux agents antimicrobiens.

Nous présentons dans le tableau 1.2 un aperçu des composés antimicrobiens isolés de microorganismes dérivés d'algues brunes décrits dans plusieurs travaux de recherche rapportés par différents auteurs.

Tableau 1.2 : Composés antimicrobiens isolés de microorganismes d'algues brunes

Organismes	Espèces	Algues	Composés isolés	Microorganismes cibles	Réf
Bactéries	<i>Streptomyces sundarbansensis</i>	<i>Fucus</i> sp.	(1) Phaéochromycine A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[112]
			(2) Phaéochromycine C	<i>Staphylococcus aureus</i>	
			(3) Phaéochromycine E	<i>Escherichia coli</i>	
			(4) 2-hydroxy-5-((6-hydroxy-4-oxo-4H pyran-2-yl)methyl)-2-propylchroman-4-one	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	
	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	<i>Padina australis</i>	(5) Cyclo-(L-proline-L-glycine)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	[113]
			(6) Cyclo-(L-phenylalanine-4-R-hydroxy-L-proline)		
			(7) 2,4-dibromo-6-chlorophenol		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Sargassum myriocystum</i>	(8) 2-(7-(2-Ethylbutyl)-2,3,4,4a,6,7-hexahydro-2-oxopyrano-[3,2b]-pyran-3-yl)-ethyl benzoate	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	[114]
			(9) 2-((4Z)-2-ethyl-octahydro-6-oxo-3-((E)-pent-3-enylidene)-pyrano-[3,2b]-pyran-7-yl)-ethyl benzoate		
	<i>Kocuria marina</i>	<i>Pelvetia canaliculata</i>	(10) Acide 4-[(Z)-2-phenylethynyl] benzoïque	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella Typhi</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus flavus</i>	[115]
	<i>Pelagibacter variabilis</i>	<i>Pocockiella variegata</i>	(11) Pélagiomycine A	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus hirae</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella choleraesuis</i>	[116]

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Anthophycus longifolius</i>	(12) 7 - O -6' -(2'' -acetyl phenyl) -5' - hydroxyhexanoate-macrolactin	<i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Salmonella enteric</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Vibrio spp.</i>	[117]
Champignons	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Sargassum thunbergii</i>	(13) Brevianamide M (14) 6,8-di-O-méthylavéfine (15) 6-O-méthylavéruf	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	[118]
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Colpomenia sinuosa</i>	(16) Isopyrophen (17) Aspergillusol (18) Pyrophen (19) Cyclo-(L-Tryptophane-L-Isoleucine) (20) Cyclo-(L-Tryptophane -L-Phenylalanine) (21) Cyclo-(L-Tryptophane -L-Tyrosine)	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger niger</i>	[119]
	<i>Pestalotia sp</i>	<i>Rosenvingeia sp</i>	(22) Pestalone	<i>Staphylococcus aureus</i>	[120]
	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Sargassum horneri</i>	(23) Dehydroxychlorofusarielin B (24) Fusarielins A (25) Fusarielins B	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	[121]
	<i>Eurotium cristatum</i> EN-220	<i>Sargassum thunbergii</i>	(26) Cristatumins A (27) Tardioxopiperazine A	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	[122]
	Chanpignon endophyte No. ZZF36	<i>Sargassum sp.</i>	(28) 6-oxo-de-O-methylsiodiplodin (29) (E)-9-etheno-lasiodiplodin (30) Lasiodiplodin (31) de-O-methylsiodiplodin (32) 5-hydroxy-de-O-methylsiodiplodin	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	[123]

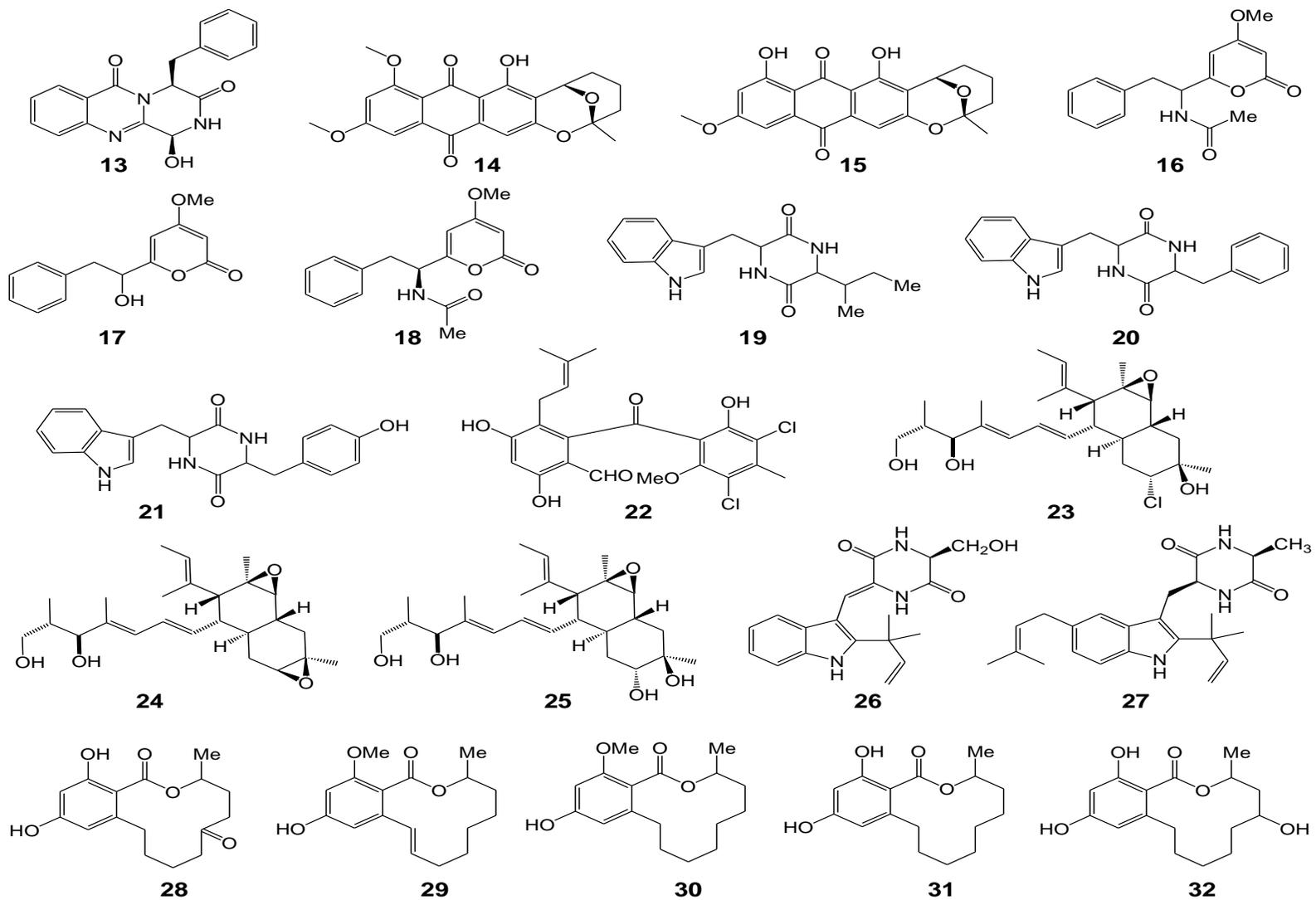


Figure 1.13 : Structures chimiques des composés antimicrobiens produits par des bactéries et des champignons isolés d'algues brunes

1.3 Enzymes kératinolytiques d'origine microbienne

1.3.1 Généralités

La majorité des enzymes industrielles actuellement utilisées sont hydrolytiques, et sont employées pour la dégradation de macromolécules de diverses substances naturelles. Les protéases figurent parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes et les plus largement étudiées depuis l'avènement de l'enzymologie. Elles représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en industrie de détergence, l'industrie laitier, l'industrie pharmaceutique, etc. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines et des peptides avec différents degrés de spécificités [124].

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

Les protéases kératinolytiques, nommées également kératinases, représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques ayant la capacité d'hydrolyser efficacement les substrats kératiniques (kératine des plumes, de laine, des cheveux etc) ainsi que d'autres protéines fibreuses (l'élastine et le collagène) et d'autre non fibreuses (la caséine, la gélatine et l'albumine) avec un haut degré de spécificité. Ces enzymes ont un grand intérêt industriel et des applications dans différents secteurs. Elles contribuent dans la valorisation des quantités importantes de déchets kératiniques qui se trouvent sous forme de plumes et cheveux.

En effet, l'importance biotechnologique et environnementale des kératinases est apparue après la commercialisation pour la première fois de la kératinase thermo-résistante Versazyme™, isolée à partir de la souche bactérienne *B. licheniformis* PWD-1, considérée une candidate potentielle pour la dégradation des kératines de plumes [125].

1.3.2 Nomenclature et classification des enzymes protéolytiques

Les enzymes peuvent être divisées en plusieurs classes selon la nomenclature EC (EC est le signe de « Enzyme Commission numbers », la Commission des enzymes). La classification établie par la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (sigle anglais "IUBMB") a été établie sur des critères de spécificité. La nomenclature des enzymes s'écrit de manière générale sous la forme : E.C. X.X.X.X. Le premier "X" correspond aux 6 types de réactions catalysées par les enzymes.

Tableau 1.3 : Principales classes d'enzymes

1 ^{er} X : Classes	Réactions catalytiques
X = 1 : oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène
X = 2 : transférases	Transfert de radicaux
X = 3 : hydrolases	Réactions d'hydrolyse
X = 4 : lyases	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
X = 5 : isomérases	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères)
X = 6 : ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

Au niveau industriel, la classe des hydrolases ou enzymes hydrolytiques représente la classe d'enzyme la plus importante. En 1998, 75% des enzymes destinées à l'industrie étaient hydrolytiques [126]. Les protéases, ou enzymes protéolytiques, font partie de cette classe. En effet, les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques. Ce type de protéase est moins intéressant à utiliser en industrie car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Les protéases extracellulaires, excrétées à l'extérieur de la cellule, sont importantes

pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule et aident ainsi la cellule à absorber et à utiliser les produits de cette hydrolyse. Ces enzymes sont plus intéressantes à utiliser dans l'industrie car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules.

En se basant sur leur mode d'action, les protéases sont divisées également en deux groupes, d'une part les exopeptidases qui réalisent une hydrolyse à partir des extrémités d'un peptide et d'autre part, les endopeptidases ou protéinases qui hydrolysent une liaison peptidique interne.

1.3.2.1 Les exopeptidases

Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C terminales des protéines. Il existe deux classes d'exopeptidases: les aminopeptidases et les carboxypeptidases.

Les aminopeptidases sont des exopeptidases qui agissent au niveau d'une extrémité N-terminale des protéines. Elles peuvent libérer soit, un unique résidu d'acide aminé et sont alors dénommées aminopeptidases (EC 3.4.11) soit, un dipeptide ou un tripeptide et sont alors dénommées dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14). Beaucoup d'aminopeptidases sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases [127].

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases qui agissent au niveau d'une extrémité C-terminale des protéines. Elles peuvent ainsi libérer un seul acide aminé et sont alors dénommées carboxypeptidases (EC 3.4.16, EC 3.4.17 et EC 3.4.18) ou, un dipeptide et sont alors dénommées peptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15). Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous classes, soit les sérines carboxypeptidases, les métallocarboxy-peptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique [128].

1.3.2.2 Les endopeptidases

Les endopeptidases sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique loin des extrémités N-terminale et C-terminale (à l'intérieur de la chaîne peptidique). La plupart des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répresseur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont subdivisées en cinq classes distinctes en fonction de leurs mécanismes catalytiques : les endopeptidases à sérine (EC 3.4.21), les endopeptidases à cystéine (EC 3.4.22), les endopeptidases à acide aspartique (EC 3.4.23), les endopeptidases à métal (EC 3.4.24) et les endopeptidases à thréonine (EC 3.4.25) [126]. A côté de ces cinq classes définies, d'autres endopeptidases, dont leurs mécanismes catalytiques sont inconnus, sont regroupées dans une classe à part (EC 3.4.99).

1.3.2.2.1 Protéases à sérine

Les protéases à sérine sont une sous-classe d'endopeptidases d'une grande importance au niveau industriel. La très grande majorité des protéases alcalines, très employées en industrie, sont des protéases de type sérine. Cette classe de protéases se caractérise par la présence de 3 acides aminés conservés dans leur site catalytique: une sérine, une histidine et un acide aspartique qui forment la triade catalytique [129]. Les protéases à sérine possèdent un mécanisme catalytique qui dépend du groupement hydroxyle d'un résidu sérine. Ce dernier agit comme un nucléophile qui attaque la liaison peptidique. Ces enzymes sont inhibées par le DFP et le PMSF. Certaines protéases à sérine sont aussi inhibées par le réactif à thiol p-chloromercuribenzoate (pCMB), du fait de la présence d'un résidu cystéine à proximité du site catalytique. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 18 et 35 kDa. Elles sont divisées en trois groupes selon leur site d'attaque sur la protéine: (i) les protéases sérines de type trypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu chargé positivement, (ii) les protéases sérines de type chymotrypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire, et (iii) les protéases sérines de type élastase, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire [130].

La Subtilisin Carlsberg et la Subtilisin Novo sont les protéases alcalines les plus connues et commercialisées. La protéase Subtilisin Carlsberg, produite par *Bacillus licheniformis* a été découverte en 1947 [131]. Elle est commercialisée depuis 1960 par la compagnie Novo Nordisk (Danemark). La protéase est constituée d'une simple chaîne de peptide avec 274 résidus d'acides aminés. Le site actif est formé par les résidus Ser 221, His 64 et Asp 32. Contrairement à plusieurs protéases sérines, les ions Ca^{2+} ne sont pas nécessaires pour assurer la stabilité de la protéase. Le pH optimal est de 10 et la température optimale de la protéase est de 50 °C. Le poids moléculaire de la protéase est de 27,2 kDa. Quant à la Subtilisin Novo, produite par *Bacillus amyloliquefaciens*, elle contient 275 acides aminés et une homologie avec la Subtilisin Carlsberg avec seulement 28 des 275 résidus d'acides aminés différents. Le site actif comprend les résidus Ser 221, His 54 et Asp 32. Son poids moléculaire est de 27,5 kDa [131].

1.3.2.2 Protéases à cystéine

Les protéases à cystéine, ou thioles, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Leur activité dépend de la présence de la diade catalytique cystéine et histidine. En 1937, la papaïne était la première protéase à cystéine isolée et caractérisée à partir de *Carica papaya* [132]. Les protéases ayant une forte homologie avec la papaïne sont nommées « papaïne-like ». La papaïne et les cathepsines appartiennent à la famille la plus abondante des peptidases à cystéine. Le mécanisme catalytique de ces enzymes est similaire à celui des peptidases à sérine dans la mesure où un nucléophile et un donneur de protons sont nécessaires. Le donneur de proton, chez toutes les peptidases à cystéine, est un résidu histidine (comme pour la majorité des peptidases à sérine).

La plupart des protéases à cystéine sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique. Leur activité n'est pas affectée en présence de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) et de diisopropylfluoro-phosphonate (DFP) et d'agents chélateur, mais elle est inhibée par la présence d'agents sulfhydriques comme le p-chloromercuribenzoate (pCMB) l'iodoacétamide et la N-éthylmaléimide [133].

1.3.2.2.3 Protéases aspartiques

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu acide aspartique présent au site actif de l'enzyme. La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à de faibles pH, généralement entre 3 et 4. Leurs masses moléculaires varient de 30 à 45 kDa. Ces protéases acides ne sont pas inhibées par le DFP et PMSF, ni par les réactifs avec des groupements thiols, comme le p-chloromercuribenzoate (pCMB). Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée [134].

Les protéases à acide aspartique sont très différentes des protéases à sérine, à cystéine et à thréonine, dans la mesure où le nucléophile qui attaque la liaison peptidique est une molécule d'eau activée. Les résidus impliqués dans le mécanisme catalytique, sont des acides aminés qui agissent comme des ligands. Le mécanisme d'action des protéases acides généralement admis est un mécanisme général acide-base basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif. Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbonyle du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage [135].

1.3.2.2.4 Protéases à métal

Les métalloprotéases forment un groupe de protéases très diversifiés. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn^{2+} , nécessaire à leur activité. Les métalloprotéases à zinc sont produites aussi bien par les eucaryotes que par les procaryotes et sont subdivisées en quatre groupes : DD-carboxypeptidases, carboxy-peptidases, zincines et inverzicines. Les métalloprotéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7. Toutefois, certaines métalloprotéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10. Leurs masses moléculaires sont comprises entre 35 et 45 kDa. Ces protéases sont inhibées par les agents chélateurs tels que l'EDTA ou l'EGTA, qui enlèvent le Zn^{2+} , alors que l'enlèvement des ions Ca^{2+} affecte seulement leur thermostabilité [136].

1.3.2.2.5 Protéases à thréonine

Les peptidases à thréonine n'a été découvertent que très récemment grâce aux recherches effectuées sur les protéasomes. Un protéasome est un complexe de protéases impliquées dans la dégradation protéique. Il est d'une grande importance pour la croissance et la viabilité de la cellule en raison de ses fonctions dans le cycle mitotique et dans le contrôle de la demi-vie de la plupart des protéines cellulaires. La recherche chez les procaryotes de particules ressemblant au protéasome eucaryote a conduit à la découverte d'un complexe protéolytique chez *Thermoplasma acidophilum* [137, 138]. Dans un premier temps, la particule était dénommée protéinase multicatalytique (prosome) puis, le nom protéasome, a été ensuite adopté. Ce nom a été choisi pour décrire son activité protéolytique « protéa- » mais aussi sa taille et sa complexité « some ». Les premières recherches sur les activités protéolytiques du protéasome ont conduit à des résultats controversés. Ceci découle du fait que même après les mutations de tous les résidus conservés du protéasome de *Thermoplasma*, à savoir les sérines, les deux résidus d'histidine, l'unique résidu de cystéine et les deux résidus d'acide aspartique, ce dernier présentait toujours une activité enzymatique. Cependant, la suppression de la thréonine N-terminal ou sa mutation par une alanine a conduit à l'inactivation totale de l'enzyme [139, 140]. Cela semblait indiquer que le protéasome n'appartenait pas aux groupes de peptidases "classiques" et qu'il fait partie d'une nouvelle classe de peptidases où le résidu de la thréonine N-terminal fonctionne comme un nucléophile.

1.3.3 Origine des protéases kératinolytiques microbiennes

1.3.3.1 Protéases kératinolytiques bactériennes

Les kératinases sont très répandues dans le monde microbien. Elles sont produites par des bactéries, de levures et de champignons. Les kératinases d'origine bactérienne ont suscité plus d'intérêt de la part des chercheurs et des industriels que les kératinases des autres microorganismes, en raison de leurs caractéristiques spécifiques et de la facilité de production à grande échelle.

La dégradation de la kératine chez les bactéries, est surtout confinée aux bactéries à Gram positifs des genres *Bacillus*, *Lysobacter*, *Kocurica* et *Microbacterium*. Néanmoins, les bactéries du genre *Bacillus* spp. représentent le groupe dominant. Elles sont classées dans la littérature parmi les genres bactériens les plus importants en termes de production de kératinases [141]. Par ailleurs, un certain nombre de souches de bactéries à Gram négatif, à savoir : *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* et *Chryseobacterium*, ont également été signalées récemment comme des souches kératinolytiques. En outre, quelques espèces thermophiles et extrémophiles appartenant aux genres *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter* et *Nesternokia* ont également été décrites comme des producteurs de kératinases [142]. Les actinobactéries du groupe *Streptomyces*, à savoir *S. fradiae*, *S. pactum*, *S. albidoflavus*, *S. thermoviolaceus* SD8 et *S. graminofaciens*, et le groupe de *Thermoactinomyces*, à savoir *T. candidus*, sont communément décrits comme dégradeurs de la kératine avec une capacité d'agir sur une grande variété de substrats, y compris la kératine des cheveux, de la laine et des plumes [143].

1.3.3.2 Protéases kératinolytiques fongiques

Les champignons kératinophiles constituent un groupe nutritionnel spécialisé qui utilise la kératine comme substrat nutritif riche. Ces champignons sont représentés par des dermatophytes et des espèces apparentées au genre *Chrysosporium* [144]. Les dermatophytes comprennent des saprotrophes préférant la vie dans le sol (dermatophytes géophiles). Les dermatophytes géophiles incluent certaines espèces de *Trichophyton* et *Microsporum*. Les champignons kératinophiles mais non dermatophytiques sont composés de deux genres : *Chrysosporium* et *Myceliophthora* (anamorphes) [145]. Certains auteurs classent également différentes espèces de moisissures omniprésentes comme des champignons kératinophiles, par exemple : *Aspergillus fumigatus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. et autres [146, 147, 148]. Les champignons sont faiblement kératinolytiques s'ils ne dégradent pas plus de 40 % de la kératine dans des cultures liquides après 8 semaines et sont non kératinolytiques s'ils dégradent moins de 20 % [149].

1.3.4 Mécanisme d'action des protéases kératinolytiques microbiennes

Fondamentalement, la kératinolyse microbienne est un processus protéolytique de dégradation des protéines puisque le substrat (kératine) est essentiellement une protéine fibreuse dure. La plupart des enzymes kératinolytiques caractérisées agissent toutes comme des protéinases et sont actives sur la kératine. Néanmoins, la connaissance des mécanismes définitifs de la kératinolyse et du métabolisme des microorganismes dégradant la kératine n'est pas totalement comprise.

La plupart des chercheurs ont affirmé que l'un des mécanismes possibles de la dégradation de la kératine est la réduction des liaisons disulfure, du fait que l'hydrolyse complète de la kératine ne peut être obtenue qu'après sa dénaturation par le clivage des ponts disulfure, qui constituent la principale source de l'extraordinaire stabilité et résistance à la digestion protéolytique [150]. En effet, les kératinases microbiennes, produites en présence d'un substrat kératinique, sont majoritairement extracellulaires et inductibles. Toutefois, une minorité sont membranaires [151]. La majorité des travaux montrent que la fraction intracellulaire contient une activité disulfure réductase qui agit en synergie avec les kératinases extracellulaires pour dégrader la kératine par réduction des ponts disulfures. La kératinolyse se fait donc en deux étapes: une étape de sulfitolyse ou de réduction des ponts disulfures suivi d'une protéolyse. L'étape de la sulfitolyse se fait soit en présence d'agents réducteurs (tels que sulfate de sodium, dithiotreitol (DTT) et mercaptoethanol) ou de disulfure réductase [152]. Le soufre en excès est excrété dans le milieu sous forme de sulfate et de sulfite (forme oxydée). Le sulfite réagit à un pH neutre à alcalin avec la cystine qui la clive en cystéine et S-sulfocystéine, selon l'équation (1).

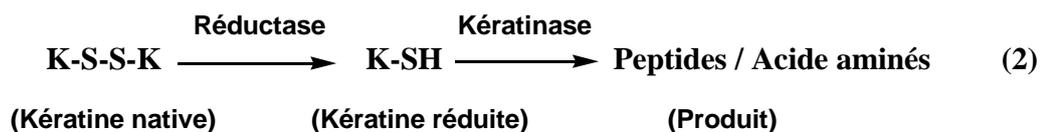


Figure 1.14 : Mécanisme d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures

Cette réaction se produit également avec la cystine combinée à des protéines, notamment la kératine. La coopération de ces actes avec l'activité kératinolytique permet d'aboutir à une dégradation complète de la kératine. Cependant, la chronologie de ces événements et leurs natures exactes ne sont pas encore bien élucidées.

1.3.5 Substrats kératiniques

1.3.5.1 Kératines

Les kératines forment une classe de protéines fibreuses particulièrement résistantes et insolubles dans l'eau froide, même en présence de sels, d'acides ou de bases diluées. En outre, ces protéines fibreuses sont non dégradables par les enzymes protéolytiques, tels que la trypsine, la pepsine et la papaïne [153]. Cette propriété est conférée par la présence d'acides aminés soufrés en particulier le L-cystine. Cet amino-acide est en grande partie responsable de la dureté et de l'insolubilité des kératines. Les ponts disulfures (S-S) permettant la formation d'un réseau tridimensionnel de chaînes peptidiques [154].

Les kératines forment la plus grande partie des couches cornées de l'épiderme, et de ses appendices comme les cheveux, les poils, les ongles, les plumes, les écailles, les griffes. D'un tissu à l'autre, les séquences primaires des kératines varient en particulier avec le nombre de résidus cystéines et en conséquence du nombre de pontages possible, ainsi, leur augmentation conduit à la formation de tissus durs et coriaces tels que les ongles, les sabots des animaux et les carapaces des tortues.

Les kératines sont des protéines dont les chaînes se présentent en hélice- α (α -kératine) ou en feuillet- β (β -kératine), qui se replient en forme tridimensionnelle.

L' α -kératine, ou cytokératine, est une large famille multi-génique qui présente un rôle structural important dans les épithéliums des mammifères. Elle a une structure hélicoïdale simple, de longs segments de 311 à 314 acides aminés en hélice α entourées d'extrémités N- et C-terminales non hélicoïdales forment un pas à droite. La résistance de cette protéine est amplifiée par l'enroulement de multiples brins

hélicoïdaux en une super-hélice appelée protofibrille. L'enroulement hélicoïdal des super-enroulements possède un pas à gauche dans un sens opposé à celui de l'enroulement des hélices polypeptidiques individuelles. Cette conformation permet le tassement le plus serré possible des multiples chaînes polypeptidiques. La résistance de ces fibres est augmentée par la richesse en résidus hydrophobes (Phénylalanine, leucine, Valine, Méthionine et Alanine) et par des liaisons covalentes entre les chaînes polypeptidiques. La résistance de la kératine α à la plupart des protéases est due essentiellement à la présence d'un taux élevé d'acides aminés à base de soufre, principalement la cystéine, qui forment des ponts disulfures entre les molécules, conférant sa rigidité à l'ensemble (exemple: la chevelure humaine est constituée de 14% cystéine) [155, 156, 157].

La β -kératine, est un énantiomère de l' α -kératine présente chez les reptiles et les oiseaux, c'est le constituant majeur de la fibroïne de la soie et la toile d'araignée, elle est plus flexible et plus molle que la kératine α du fait de sa richesse en résidus de Glycine et d'Alanine. L'organisation structurale de cette forme de kératine est dans une conformation β et le squelette de la chaîne polypeptidique s'étend-en zigzag. Dans la fibroïne, par exemple, les chaînes polypeptidiques en zigzag sont disposées côte à côte pour former une structure qui ressemble à une série de plis (appelée feuillet β plissé). Des liaisons hydrogène peuvent être soit intra- ou inter-chaînes entre les liaisons peptidiques de chaînes polypeptidiques adjacentes [156, 158].

1.3.5.2 Les déchets d'origine kératiniques

Les principaux déchets kératiniques proviennent de l'industrie de la viande, notamment celle de l'abattage. Les autres déchets sont issus des industries utilisant les matières kératiniques comme matière première. Nous pouvons citer, à titre d'exemple, les déchets de bourre et de poussière de laine, issus de l'amont de l'industrie lainière, les déchets d'abattoirs d'une manière générale comme les plumes issues d'oiseaux terrestres et de palmipèdes gras ou encore les poils des bovins ou porcins, mais également des cheveux humains provenant de la coiffure.

1.3.6 Applications biotechnologiques des protéases kératinolytiques

Les protéases bactériennes et celles à activité kératinolytique, notamment celles produites par le genre *Bacillus*, trouvent de nombreuses applications dans divers secteurs industriels. Ce type d'enzymes est utilisé essentiellement dans les tanneries pour le traitement du cuir, les détergents pour les lessives, le traitement des rejets industriels pour la préparation d'hydrolysats protéiques pour l'alimentation animale et dans la médecine et la pharmacie.

1.3.6.1 Détergence et industrie textile

L'idée d'utiliser des enzymes en détergence remonte à 1913, quand Otto Eôhm breveta l'utilisation d'enzymes pancréatiques pour l'élimination des taches de sang. Cependant, elles ne sont réellement devenues des additifs importants dans les détergents ménagers qu'à partir de 1962 [159]. A la fin des années 70, le développement de réactions allergiques chez certains ouvriers qui manipulent ces détergents a contrecarré l'utilisation des protéases en détergence. Le problème a été résolu par l'introduction d'enzymes encapsulées. Aujourd'hui, les protéases alcalines représentent environ 89% des enzymes protéolytiques utilisées dans l'industrie des détergents [160]. Du fait de cette évolution et de l'intérêt grandissant du consommateur pour l'environnement, les fabricants de produits détergents ménagers ont dû s'engager à réaliser les efforts nécessaires pour réduire l'impact des constituants des détergents sur l'environnement. Ainsi des versions améliorées des enzymes sont constamment développées. Ces nouvelles enzymes de seconde et troisième génération sont optimisées pour répondre aux exigences relatives à une utilisation en détergence et à la composition des détergents liquides et solides qui est également en perpétuel développement. Plus particulièrement, la compatibilité des enzymes protéolytiques avec les composants des détergents, ainsi que leur capacité à fonctionner à basse température. Ce dernier point est d'autant plus important que le souci d'économie d'énergie est omniprésent depuis quelques années.

L'industrie textile utilise les kératinases pour le traitement des fibres de laine. La laine est composée de protéines structurales avec un degré élevé de ponts disulfure réticulés qui confèrent aux fibres une résistance mécanique et une résistance à la

dégradation. Ceci est attribué aux couches superposées de l'épiderme (épi-, exo- et endocuticule). L'épicuticule est riche en lipides, tandis que l'exo- et l'endocuticule sont composés de kératine. L'épiderme joue un rôle clé dans la contraction des fibres lors des processus de lavage et de teinture. Le retrait est traditionnellement contrôlé à l'aide de chlorures organiques résorbables. Les inconvénients de ce procédé sont notamment la perte du caractère naturel de la laine, le jaunissement du matériau, la pollution des eaux usées, la biodégradabilité du tissu et une consommation d'énergie et de temps importante [161].

Les solutions de remplacement des produits chimiques utilisées dans ce processus, sans danger pour l'environnement, sont les préparations enzymatiques, composées généralement de protéases et de lipases. Le rôle des protéases est d'enlever une couche externe de grosses fibres, réduisant ainsi la sensation de rugosité de la laine. Il est nécessaire de doser soigneusement les enzymes, car certaines protéases pénètrent profondément dans les fibres, ce qui les endommage, leur fait perdre de la masse et leur résistance à la traction [162]. C'est aussi la raison pour laquelle actuellement aucun processus n'est exclusivement basé sur des enzymes. Dans une certaine mesure, la pénétration peut être limitée en augmentant la masse moléculaire des protéases visées par cette application, par réticulation chimique, fixation de polymères synthétiques, etc. [163]. Une meilleure alternative consiste à utiliser des kératinases spécifiques qui agissent sélectivement et uniquement sur les couches kératiniques de la laine, sans effets néfastes sur les autres parties de la fibre. La kératinase alcaline de *Paenibacillus woosongensis* TKB2 est l'une des enzymes pouvant être utilisée dans l'industrie textile pour éliminer les taches sans affecter la texture du tissu, les fibres et la résistance des vêtements [164].

1.3.6.2 Fabrication du cuir

L'industrie du cuir est l'une des industries les plus anciennes au monde et joue un rôle important dans l'économie actuelle. L'ensemble du processus du traitement des peaux implique une séquence de réactions chimiques complexes et des processus mécaniques qui comprennent plusieurs étapes telles que le reverdissage, l'épilage, le confitage et le tannage [165]. Ces processus servent à transformer le cuir, produit dérivé des activités des abattoirs, en produits finis très variés. Cependant, elle

constitue l'un des principaux problèmes de pollution industrielle, et l'évacuation des effluents riches en produits chimiques, en sulfure de sodium, en sels, en solvants, en chaux, etc résultent principalement du processus de pré-tannage de traitement du cuir [166].

Afin de pallier aux risques causés par les effluents de tannerie, l'utilisation d'enzymes comme une alternative viable à des produits chimiques a contribué avec succès à l'amélioration de la qualité du cuir et à la réduction de la pollution environnementale. En plus de ses avantages pour l'environnement, le traitement enzymatique diminue les coûts et améliore la qualité du produit final qui devient plus résistant à la déchirure et présente une teinte plus uniforme. Le traitement enzymatique en tannerie a été préféré aux méthodes conventionnelles qui requièrent l'utilisation de produits chimiques polluants. Cette approche présente de nombreux autres avantages, notamment, le contrôle facile et rapide du processus avec réduction des pertes. Les protéases alcalines qui possèdent des activités élastolytiques et kératinolytiques sont très demandées dans ce type d'industrie [167]. Ce traitement protéolytique permet de réduire la quantité de produits chimiques requises et donc la charge de polluants dans les effluents, et d'obtenir un produit plus propre et de meilleure qualité, ainsi qu'un rendement supérieur par unité de surface.

1.3.6.3 Alimentation animale, agriculture, bioénergie et produits à valeur ajoutée

Selon le règlement du Conseil d'Europe (CE) 1774/2002 du Parlement européen, les déchets kératiniques sont classés dans la troisième catégorie de produits d'origine animale, ce qui signifie: (i) ils sont obtenus à partir de carcasses d'animaux, (ii) ne sont pas destinés à la consommation humaine et (iii) ne devraient pas transmettre de maladies à l'homme ou aux animaux [168]. De grandes quantités de déchets produits par les usines de traitement des animaux peuvent être utilisées comme substrat pour la bioénergie et les produits à valeur ajoutée si elles sont correctement traitées.

Les plumes sont produites en quantité considérable en tant que sous produit de déchets dans l'industrie avicole. L'accumulation de plumes en grande quantité entraîne des problèmes environnementaux liés à la transmission de maladies neurodégénératives [169]. Cependant, les plumes de volailles contiennent une grande quantité de protéines et d'acides aminés potentiellement utiles qui pourraient être exploités de manière avantageuse comme matière première dans la production de biodiesel, comme ingrédient dans les bioplastiques ou comme aliments pour animaux [170]. Néanmoins, les méthodes traditionnelles de dégradation des plumes impliquent des traitements à des températures et pressions élevées, consommant de grandes quantités d'énergie, et entraînent la perte de certains acides aminés essentiels à la production ultérieure de produits à valeur ajoutée ou de bioénergie et nuire à la qualité et à la digestibilité des protéines [171]. Pour pallier à ces problèmes, l'hydrolyse enzymatique des plumes par les kératinases a été proposée comme une technologie propre et alternative qui permet de produire des acides aminés de meilleure qualité. Les plumes hydrolysées peuvent également être utilisées comme bioengrais pour l'agriculture permettant une libération lente d'azote, améliorant la croissance des plantes et favorisant l'activité microbienne du sol.

1.3.6.4 Applications en médecine, pharmacie et en cosmétique

Les kératinases sont également utilisées dans l'industrie cosmétique pour le traitement de l'acné, des callosités, l'enlèvement de la peau kératinisée et sèche, le traitement du psoriasis, etc. [172, 173]. Les applications des kératinases dans l'industrie pharmaceutique sont principalement associées à l'amélioration du passage des médicaments fongicides à travers la surface de l'ongle kératinique. Les troubles des ongles, principalement associés aux infections fongiques, vont relativement inoffensifs à des affections douloureuses telles que la dystrophie des ongles [174]. Le traitement des infections fongiques des ongles (onychomycose) est extrêmement difficile et implique traditionnellement la consommation à long terme de médicaments antifongiques et des injections mensuelles répétées de corticostéroïdes, provoquant de nombreux effets secondaires, tels que des éruptions cutanées et des lésions du foie [175]. Une autre forme de traitement est l'application topique de médicaments antimycotiques directement sur la zone

touchée. L'inconvénient principal de cette approche est l'imperméabilité de la surface de l'ongle qui affecte la pénétration du médicament et l'efficacité du traitement. Une variété de méthodes chimiques est utilisée pour améliorer le transfert du médicament sur le site d'action comme l'utilisation des agents kératinolytiques, tels que l'urée, l'acide thioglycolique, l'acide salicylique et la N-acétylcystéine [176]. Cependant, ces produits chimiques ne sont efficaces qu'à des concentrations élevées et peuvent avoir une odeur âcre. En revanche, les kératinases peuvent être très efficaces pour desserrer les plaques d'ongles à de faibles concentrations, ce qui a été démontré pour la première fois par la kératinase de *Paecilomyces marquandii* [175, 177].

1.3.6.5 Digestion anaérobie des déchets kératiniques pour la production de biogaz

La digestion anaérobie est un processus prometteur pour la production microbienne d'énergie renouvelable à partir de différents types de substrats de déchets. Au cours de ce processus, les substrats sont hydrolysés en acides aminés, qui sont ensuite convertis en une variété d'acides organiques, d'ammoniaque, de dioxyde de carbone, d'hydrogène et de petites quantités de composés soufrés. Ce sont les substrats de la méthanogénèse, un processus microbien dans lequel l'acétate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone sont utilisés pour produire du méthane et du dioxyde de carbone.

La dégradation anaérobie des plumes dans des conditions thermophiles ou mésophiles, inclut généralement différents types de déchets. Ces dernières années, différentes méthodes de prétraitement chimiques, physiques et enzymatiques ont été explorées. Le développement de certaines souches kératinolytiques recombinantes avec une production accrue d'enzymes vise à augmenter et à améliorer la décomposition des déchets kératiniques avant et/ou pendant la digestion anaérobie. Une souche recombinante de *B. megaterium* portant le gène de la kératinase de *B. licheniformis* a été mise au point pour augmenter l'hydrolyse des plumes de poulet. La souche recombinante a effectivement dégradé les plumes avant la production de biogaz, ce qui a permis de produire jusqu'à 80% du rendement théorique en méthane provenant de la digestion des protéines [161].

CHAPITRE 2

EXTRACTION, POTENTIALITES ANTIOXYDANTES ET DIVERSITE BACTERIENNE DE L'ALGUE BRUNE *ZONARIA TOURNEFORTII*

2.1 Etude de l'extrait brut de l'algue *Zonaria tournefortii* : Extraction, isolement et potentialités antioxydantes des métabolites secondaires

2.1.1 Récolte et traitement du matériel végétal

L'algue *Zonaria tournefortii* a été récoltée en octobre 2016, à une profondeur de 2 à 3 mètres sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique la « Corne d'Or » à Tipaza (36°37' 12 " NR, 2°39' 00 " E). L'identification a été faite par Dr. H. Seridi au niveau du Laboratoire d'Océanographie Biologique et Environnement Marin (LOBEM) de l'Université des Sciences et de la Technologie d'Alger (USTHB). L'algue a été triée manuellement pour éliminer les épiphytes et autres organismes susceptibles de contaminer la nature chimique de l'extrait, puis elle est séchée à l'ombre, dans un lieu sec et aéré.

2.1.2 Extraction

L'extraction consiste à une macération de 300 g de l'algue avec 2,5 L de mélange de solvant Chloroforme (Ref : Sigma Aldrich 24233) / Methanol (Ref : Panreac 141091) (v/v : 1/1) dans un système statique à la température ambiante pendant une semaine, suivie d'une filtration et de l'évaporation du solvant. Le résidu sec obtenu est traité avec l'éther diéthylique pour éliminer les traces d'eau et les produits aqueux. L'extraction a permis d'obtenir un extrait brut avec un rendement de 2.4%. Ce dernier a été soumis à un procédé de séparation en fraction phénolique et neutre avec un rendement de 72 et 28% respectivement. Le choix du procédé est directement relié à la nature de la composition chimique de l'extrait qui contient principalement des produits phénoliques dérivés du phloroglucinol [46, 47, 50]. A cet effet, l'extrait brut solubilisé dans l'éther est neutralisé avec une solution aqueuse de potasse 0,5 N dans le but de séparer les produits phénoliques sous forme de phénates, solubles en phase aqueuse. Deux phases se mettent en

équilibre : une phase aqueuse contenant les produits phénoliques sous forme de phénates et des acides gras, et une phase étherée renfermant tous les produits non neutralisés par la potasse. La phase aqueuse est ensuite acidifiée par une solution d'acide sulfurique 0,5 N, puis extraite à l'éther. La solution obtenue est lavée à l'eau jusqu'à pH neutre puis séchée sur $MgSO_4$ et le solvant évaporé, conduisant à un extrait contenant des acides carboxyliques et des phénols appelé « fraction phénolique ».

2.1.3 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux

Une estimation rapide de la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait brut de *Zonaria tournefortii* a été obtenue par utilisation de réactif « Folin-Ciocalteu ». Ce dernier est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, qui montrent une absorption maximale aux environs de 760 nm permettant de déterminer la concentration des produits phénoliques en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues.

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée *via* la méthode adaptée par Blanca et al. [178] avec quelques modifications. 4mg d'extrait d'algue ont été préalablement dissous dans 8 mL d'un mélange eau/méthanol (v/v : 3/1) à la température ambiante. 2 mL de la solution d'extrait ont été mélangés à 10 mL d'eau distillée et 12 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à $290\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 1mL de réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté, et la coloration a été développée pendant 30min à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 760 nm avec un spectrophotomètre UV.

Le dosage quantitatif des produits phénoliques par le test de Folin-Ciocalteu nécessite tout d'abord l'établissement d'une droite d'étalonnage (Figure 2.1). Cette méthode de dosage est basée sur la réactivité entre les extraits phénoliques et le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette réactivité doit être comparée et normalisée avec un produit connu, celui-ci devant être le plus proche possible de la structure du squelette principal des produits phénoliques des extraits [179]. De ce fait, dans le cas de notre étude, la droite d'étalonnage a été effectuée sur un squelette type

phloroglucinol. Le tracé consiste à la réalisation de dix points expérimentaux, chaque point représentant la moyenne de trois analyses.

Les résultats du dosage ont été, par conséquent, exprimés en mg d'équivalence de phloroglucinol (EPG, Phloroglucynol Equivalence) par grammes d'extrait sec (mg.EPG/g) en utilisant une gamme étalon allant de 0,008 à 0,099 mg.mL⁻¹ de phloroglucinol dissous dans de l'eau distillée et du méthanol, et traité de la même manière que l'échantillon réel.

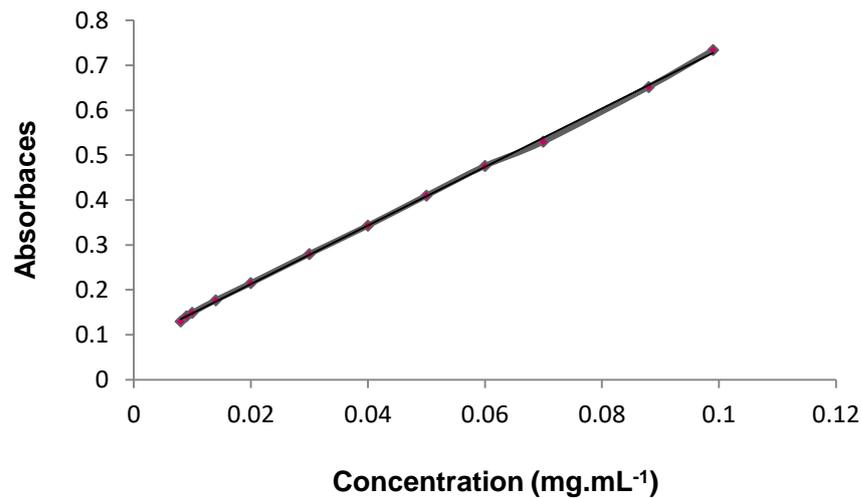


Figure 2.1 : Droite d'étalonnage des solutions standards de phloroglucinol de concentrations allant de 0,008 à 0,099 mg.ml⁻¹ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu

L'interprétation des résultats de l'étalonnage fait appel à des caractéristiques analytiques, ces dernières sont établies et résumées dans le tableau 2.1. Les caractéristiques analytiques montrent une très bonne linéarité, une limite de détection de 1,57 µg.mL⁻¹, une limite de quantification de 5,2 µg.mL⁻¹ et une déviation standard de 0,54%.

Tableau 2.1 : Caractéristiques analytiques de la droite d'étalonnage

Equation de la droite d'étalonnage	R ²	L.D. (mg.mL ⁻¹)	L.Q. (mg.mL ⁻¹)	D.S.R. (%)
$y = 6,512x + 0,082$	0,999	$1,57 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-3}$	0,54

D.S.R. (%) : Déviation standard relatif en pourcentage (Écart-type); L.D. : Limite de détection exprimée en µg×mL⁻¹ ; L.Q. : Limite de quantification exprimée en µg×mL⁻¹.

La teneur en composés phénoliques équivalente au phloroglucinol de l'extrait brut de l'algue *Zonaria tournefortii* est déterminée selon la relation ci-dessous, sachant que la concentration d'extrait équivalente au phloroglucinol est obtenue par extrapolation de la valeur d'absorbance de la solution d'extrait ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu ($A_{\text{Extrait}} = 0.275$) dans la droite de calibration établie pour le phloroglucinol traité de la même manière que l'extrait réel.

$$T = \frac{C \times V}{M}$$

T : Taux des composés phénoliques (mg EPG/g d'extrait sec d'algue)

C : Concentration d'extrait équivalente au phloroglucinol

V : Volume d'extrait (mL)

M : Poids sec d'extrait d'algue (g).

Le résultat de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux, met en évidence que la teneur en composés phénoliques de l'extrait de *Zonaria tournefortii* est de $(725,0 \pm 1,9)$ mg.EPG/g d'extrait sec, à savoir 72,5 %. Ce résultat est en bon accord avec le résultat obtenu par détermination volumétrique sur la même espèce [50]. Il a été rapporté dans ce travail que la séparation de l'extrait brut, par des réactions acido-basique, à aboutie à la récupération d'une fraction, appelée phénolique, contenant des acides carboxyliques et des phénols avec un rendement de 74%. Cette concordance dans les résultats est tout à fait explicable étant donné que le réactif de Folin-Ciocalteu réagit aussi bien sur les produits phénoliques que sur d'autres composés tels que les acides insaturés [180].

Néanmoins, une autre étude [181] a rapporté que le contenu en composés phénoliques totaux dans l'algue *Zonaria tournefortii* est de $2154,57 \pm 119,27$ mg. EAG/100 g d'extrait sec, une valeur très inférieure à celle trouvée dans notre étude. Ce désaccord peut être dû à différents facteurs, tels que l'origine géographique, la procédure d'extraction et/ou le solvant d'extraction utilisé, mais il peut être notamment dû à la différence de l'étalon utilisé pour le dosage. En fait, le choix du composé phénolique témoin pour la calibration est d'une importance capitale.

L'acide gallique a été utilisé comme témoin dans plusieurs travaux de recherche et il est considéré comme un bon compromis [182, 183], mais il n'est pas spécifique et ne représente pas les différents composés phénoliques présents dans l'algue brune *Zonaria tournefortii*.

2.1.4 Fractionnement, purification et caractérisation structurale des métabolites secondaires

L'étude entreprise dans le cadre de cette partie porte sur la fraction phénolique de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, composée essentiellement de dérivés de phloroglucinol et constitue la majeure partie de l'extrait brut.

Dans le but de purifier en quantité considérable les métabolites secondaires de *Zonaria tournefortii*, nous avons traité la fraction phénolique (4.5 g) en deux étapes : Un fractionnement grossier sur colonne ouverte de silice conduisant à des fractions de polarité croissante au fur et à mesure qu'on augmente la polarité de l'éluant, suivi d'une purification par CLHP analytique à polarité de phase inversée.

Le fractionnement a été réalisé sur une colonne en verre (hauteur = 60 cm, diamètre = 5cm) remplie avec de la silice Si 60 (Sigma-aldrich), en utilisant un gradient de solvants de polarité croissante isooctane/AcOEt (90/10 ; v/v) à 100% AcOEt, ensuite par le mélange AcOEt/MeOH dont la composition varie de 100% AcOEt à 50% MeOH, suivi du MeOH pur (100%). Un test analytique par CCM permis d'avoir une idée préliminaire des différentes fractions obtenues et d'établir les conditions de purification. L'analyse sur couche mince est réalisée en phase normale sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice Si 60 F₂₅₄ (Réf. : Merck 1.05554). L'analyse est effectuée par élution avec le système binaire TMP/AcOEt (v/v : 1/1), en utilisant le phloroglucinol comme témoin. La révélation est d'abord réalisée avec une lampe UV (254 et 336 nm), ensuite à l'acide sulfurique, suivie d'un chauffage à 100 °C. Sur la base d'informations obtenues à partir de la CCM, quinze fractions éluées avec le système isooctane/AcOEt : 60/40, ont été retenues.

L'étude des différentes fractions par CLHP en phase inversée a abouti à la sélection des fractions F14, F16, F18, F21 et F26, qui ont mené à l'isolement des produits Z1, Z2, Z3, Z4 et Z5, respectivement (Figure 2.2).

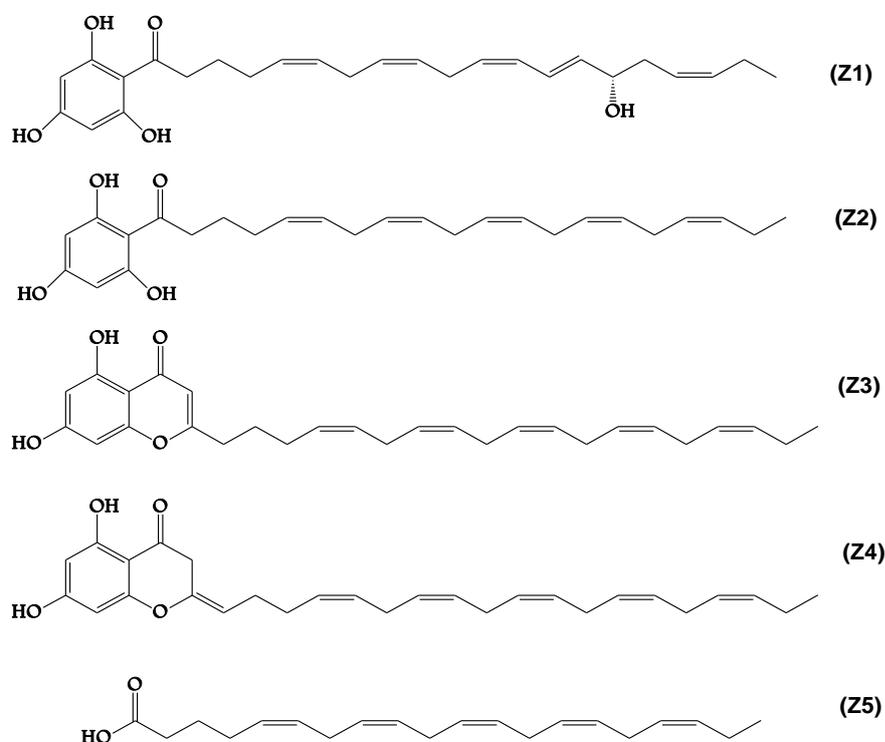


Figure 2.2 : Produits isolés à partir de la fraction phénolique de *Z. tournefortii*

La caractérisation structurale des différents métabolites a été effectuée par analyses des données spectroscopiques notamment RMN ^1H , RMN ^{13}C mono et bidimensionnelle et comparaison avec les données de la littérature. Cependant, les signaux RMN obtenus des cinq produits ont des valeurs identiques à celles rapportées dans la littérature, en prenant en considération l'influence du solvant sur certains signaux [46, 47, 48, 49, 50].

Les composés Z1 et Z2 sont deux acylphloroglucinols préalablement décrits dans *Zonaria tournefortii* récoltée en Sicile [46, 47], de même que Z3 et Z4 qui sont deux dihydroxychromanones dérivées de Z1 [48, 49]. En ce qui concerne le composé Z5, il est identifié comme étant l'acide (tout Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque décrit précédemment dans la même espèce par notre laboratoire de recherche [50].

2.1.5 Potentialités antioxydantes de l'extrait brut et des métabolites secondaires isolés

Les antioxydants sont des substances qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ROS), retarde significativement les processus d'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines et les carbohydrates. Leur rôle est d'intercepter les radicaux libres avant qu'ils ne réagissent avec le substrat. Ils sont utilisés pour la stabilisation de produits polymériques, pétrochimiques, alimentaires et pharmaceutiques. Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT). Même si ces antioxydants de synthèse sont efficaces et que leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité, nous avons assisté depuis les années 1980 à un engouement pour les produits naturels, et au développement d'extraits végétaux à usage antioxydant.

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante. La plupart des méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres, avec un échantillon contenant des antioxydants capables d'inhiber la génération des radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'existe pas une méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de cinq tests chimiques, à savoir : le piégeage du radical DPPH[•], le piégeage du radical-cation ABTS^{•+}, la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC, le blanchiment de β -carotène et le pouvoir chélateur des ions ferriques.

2.1.5.1 Piégeage du radical DPPH[•]

a. Description de la méthode

Le DPPH[•] (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable grâce à la délocalisation de l'électron non apparié au niveau de la molécule. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. L'utilisation de ce radical offre un moyen facile et rapide d'évaluer l'activité anti-radicalaire d'antioxydants.

La méthode de DPPH[•] implique la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH[•] en présence d'un donneur d'hydrogène (AH) (par un mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons), ce qui conduit à la formation du DPPH-H non-radicalaire (Figure 2.3). Cette réaction induit une perte de la couleur violette du radical qui peut être facilement suivie par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm [184].

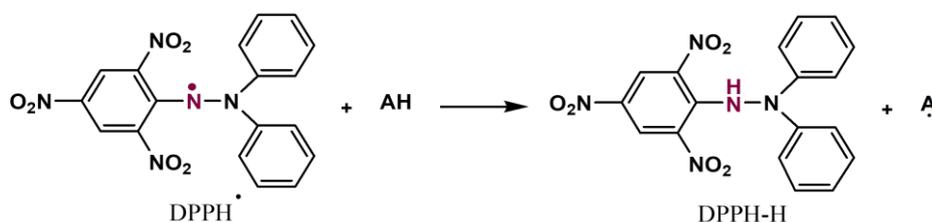


Figure 2.3 : Réduction du radical DPPH[•] en présence d'un antioxydant

b. Procédure expérimentale

La capacité antiradicalaire de l'extrait et des produits purs isolés de *Zonaria tournefortii* a été déterminée par la méthode DPPH adaptée par M.S. Blois [185]. La procédure générale est décrite comme suit : 40 µL de chacune des solutions d'extrait et de produits purs à différentes concentrations ont été mélangés avec 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH à 0,004% (p/v). La réaction a été laissée se développer pendant 30 min dans l'obscurité, à température ambiante. Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent rapportés par rapport à des antioxydants de référence. Par conséquent, plusieurs tests du taux de piégeage de radical libre DPPH[•] sur le BHA et le BHT ont été également effectués.

En parallèle, une solution exempte d'un antioxydant dite solution témoin, constituée de 40 µL du méthanol et 160 µL de la solution DPPH a été préparée dans les mêmes conditions opératoires. Le test antioxydant a été réalisé en "triplicata" sur microplaque, et la lecture des résultats a été effectuée à 517 nm avec un spectrophotomètre multi-puis. L'activité antioxydante est définie par le pourcentage d'inhibition ou l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage %RSA, où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant suivant l'équation (1) :

$$\% RSA = \frac{Abs\ contrôle - Abs\ échantillon}{Abs\ contrôle} \times 100 \quad (1)$$

Abs échantillon : Absorbance à 517 nm du mélange réactionnel (échantillon + DPPH).

Abs contrôle : Absorbance à 517 nm du mélange sans échantillon (méthanol + DPPH).

c. Résultats et discussion

Les profils d'activités antiradicalaires (figure 2.5) révèlent que l'extrait brut ainsi que les produits purs testés possèdent une activité dose-dépendante. L'augmentation de la concentration a fait augmenter le pourcentage d'inhibition. Cependant, la présence d'une phase stationnaire signifie une réduction presque totale du radical DPPH^{*} en sa forme non radicalaire DPPH-H. L'interprétation des résultats de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH^{*} est exprimée en concentration efficace (CE₅₀). Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant qui provoque une perte de 50% de l'activité de DPPH^{*} [186]. Les concentrations efficaces sont déterminées graphiquement à partir des courbes présentées par la figure 2.5. Notons que la capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE₅₀ est petite. L'extrait brut de l'algue brune *Zonaria tournefortii* a montré une activité antiradicalaire moins importante que celle des produits purs isolés, qui est attribuée aux interférences d'autres substances dans les échantillons bruts. Les extraits naturels, en comparaison avec les produits purs, sont composés d'un mélange complexe de produits actifs et inactifs. Ces derniers peuvent interagir directement, d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité. Cependant, en comparaison avec les antioxydants standards, tous les produits purs testés s'avèrent moins actifs (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Variation des taux de piégeage du DPPH* en fonction des différentes concentrations des échantillons testés

	% d'inhibition dans la méthode DPPH							
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	CE ₅₀ µg/mL
Ext	-	-	8,35 ± 0,44	15,44 ± 2,28	20,38 ± 0,76	28,11 ± 0,72	41,98 ± 0,67	> 200
Z1	8.03 ± 1,51	14,68 ± 0,50	25,13 ± 1,93	38,94 ± 0,40	54,71 ± 0,40	69,28 ± 0,22	75,93 ± 0,94	42,76 ± 0,26
Z2	8.16 ± 0,77	14,30 ± 0,99	23,10 ± 0,88	34,19 ± 0,72	49,77 ± 1,22	67,44 ± 0,44	77,32 ± 1,08	50,46 ± 0,12
Z3	6,28 ± 1,16	11,79 ± 1,05	17,07 ± 0,84	26,37 ± 1,36	38,64 ± 1,93	51,95 ± 0,72	66,46 ± 2,75	89,91 ± 0,51
Z4	3,97 ± 1,71	9,61 ± 0,77	13,67 ± 1,33	22,15 ± 2,48	36,41 ± 1,87	52,05 ± 1,37	72,07 ± 0,57	94,53 ± 1,19
BHT	11,69 ± 1,88	22,21 ± 1,30	37,12 ± 1,80	52,63 ± 2,70	68,02 ± 0,53	83,60 ± 0,23	87,28 ± 0,26	22,32±1,19
BHA	28,95 ± 1,16	54,33 ± 1,59	76,76 ± 1,65	84,09 ± 0,35	87,53 ± 0,82	87,73 ± 0,15	88,43 ± 0,23	5,73±0,41

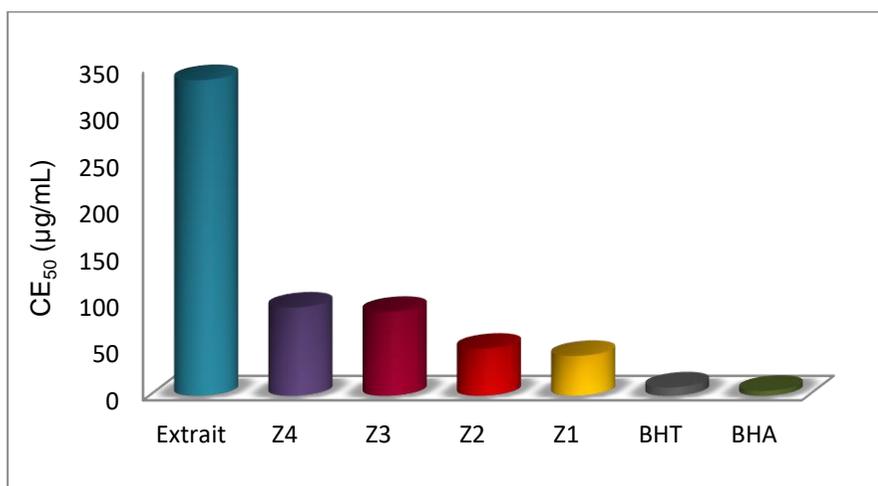


Figure 2.4 : Comparaison des valeurs de CE₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards

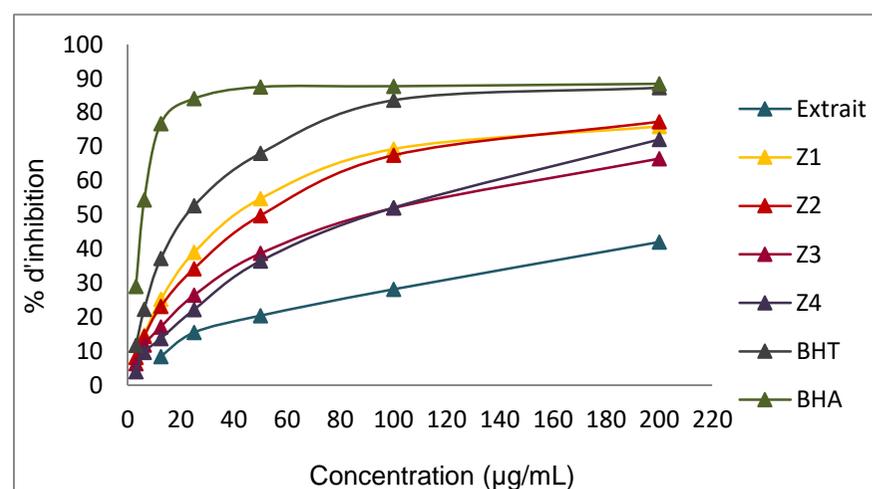


Figure 2.5 : Variation du taux de piégeage du DPPH* par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations

Indépendamment de l'extrait et des antioxydants standards, la comparaison des profils d'activité antiradicalaire des produits purs a permis de distinguer que les acylphloroglucinols Z1 et Z2 présentent des activités significativement plus importantes que leurs dérivés de type chromènes Z3 et Z4. En outre, il y a lieu de noter que l'acylphloroglucinol Z1 est le produit le plus actif au regard de sa concentration efficace CE_{50} la plus faible ($42,76 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats corroborent ceux de plusieurs rapports antérieurs qui ont montré que les activités antioxydantes des produits phénoliques peuvent être attribuées à la présence de groupes hydroxyles, qui agissent comme de bons donneurs d'hydrogène, formant ainsi des ions phénolates comme intermédiaires. Ces intermédiaires sont stabilisés par résonance lorsque des électrons non appariés aux positions *meta* du cycle aromatique sont délocalisés. En d'autre terme, les activités antiradicalaires dépendent largement de la capacité des composés phénoliques à donner de l'hydrogène et de la stabilité des radicaux phénoxyles formés après la déshydrogénation. En revanche, *O.K Popoola et al.* [187] ont indiqué dans leurs travaux de recherche que les activités antioxydantes des dérivés d'acylphloroglucinols se sont avérées dépendantes du degré d'hydroxylation et de l'augmentation de la conjugaison. Plus le nombre de groupes hydroxyles dans les composés phénoliques est élevé, plus l'activité antioxydante est élevée.

2.1.5.2 Piégeage du radical ABTS^{•+}

a. Description de la méthode

L'ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) est un radical généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec des oxydants comme le dioxyde de manganèse, le peroxyde d'oxygène ou le persulfate de potassium. La formation de radical ABTS^{•+} se traduit par l'apparition d'une coloration bleue-verte intense. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, l'atome d'azote concerné piège un H[•], conduisant à ABTS[•].

Le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration, résultant d'une réaction entre le radical ABTS^{•+} et le donneur de H[•]. La décoloration du radical, mesurée par spectrophotométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydants [188].

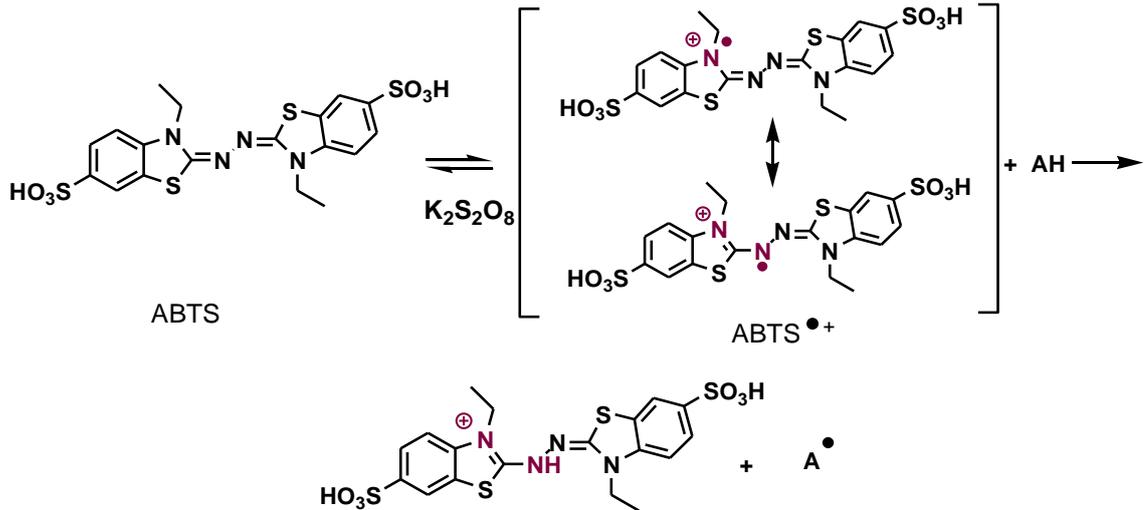


Figure 2.6 : Génération du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant AH

b. Procédure expérimentale

L'activité de piégeage de l' $ABTS^{\bullet+}$ a été déterminée selon la méthode décrite par R. Re et al. [189] avec de légères modifications. Le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ a été produit par la réaction entre 7 mM de l'ABTS et 2,45 mM de persulfate de potassium. Le mélange a été mis en incubation dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16h jusqu'à l'obtention d'une solution bleu-verdâtre. L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 734 nm puis diluée avec du méthanol jusqu'à avoir une absorbance de $0,70 \pm 0,02$. Ensuite, 160 μ L de la solution d' $ABTS^{\bullet+}$ ont été ajoutés à 40 μ L de chaque échantillon à tester ainsi que les échantillons de contrôle positifs (BHA, BHT) à différentes concentrations, puis incubés pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante. Les absorbances ont été par la suite mesurées à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Les valeurs d'absorbances obtenues permettent de calculer les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc (contrôle) en utilisant l'équation (2):

$$ABTS \text{ inhibition } \% = \frac{Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}}{Abs \text{ contrôle}} \times 100 \quad (2)$$

Abs échantillon : Absorbance à 734 nm du mélange réactionnel (échantillon + ABTS).

Abs contrôle : Absorbance à 734 nm du mélange sans échantillon (méthanol + ABTS).

c. Résultats et discussion

Comme décrit précédemment pour le test DPPH, la capacité de l'extrait brut et des produits purs à inhiber le radical ABTS^{•+} obtenu à partir de l'ABTS, est exprimée par concentration efficace (CE₅₀). Celle-ci est déduite à partir de la figure 2.8 illustrant les courbes représentatives du pourcentage d'inhibition du radical en fonction des concentrations des échantillons testés. Les données expérimentales obtenues sont représentées ainsi dans le tableau 2.3.

A partir des résultats obtenus, il est évident de constater que tous les échantillons testés inhibent le radical ABTS^{•+}. Cependant, la capacité antiradicalaire des produits purs est relativement plus importante que celle de l'extrait brut. La comparaison des concentrations efficaces (CE₅₀) des produits purs a révélé une variabilité significative corroborée à la présence de groupes hydroxyles donateurs d'hydrogène. En fait, le composé Z1 possédant dans sa structure un nombre de groupes hydroxyles le plus élevé, comparativement aux autres composés, s'est avéré le composé le plus actif avec une valeur d'CE₅₀ de 12,04 ± 1,6 µg/mL, suivi par le composé Z2 (12,73 ± 1,47 µg/mL), Z3 (30,63 ± 0,72 µg/mL) et Z4 (37,96 ± 0,96 µg/mL). En considérant les valeurs d'CE₅₀ obtenus, l'existence d'une relation structure-activité antioxydante s'avère bien évidente. Ces résultats sont en bon accord avec les résultats obtenus avec le test DPPH. Cette ressemblance est due certainement au mécanisme des réactions mises en jeu (mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons).

2.1.5.3 Activité de blanchissement du β-carotène

a. Description de la méthode

Dans le test du β-carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes conjugués, ces radicaux vont par la suite oxyder le β-carotène hautement insaturé, ce qui entraîne la perte de ses doubles liaisons, et par conséquent la disparition de sa couleur qui est suivie par spectrophotomètre à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc la prévention de l'oxydation et le blanchissement du β-carotène [188]. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

Tableau 2.3 : Variation des taux de piégeage de l'ABTS^{•+} en fonction des différentes concentrations des échantillons testés

	% d'inhibition dans la méthode ABTS							CE ₅₀ µg/mL
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	
Ext	-	-	28,66 ± 1,86	34,74 ± 2,31	45,28 ± 1,76	64,04 ± 1,20	78,40 ± 1,91	63,42 ± 1,05
Z1	21,02 ± 1,48	39,49 ± 2,07	51,30 ± 2,81	65,49 ± 0,96	75,16 ± 2,71	82,05 ± 0,82	82,40 ± 0,10	12,04 ± 1,60
Z2	22,58 ± 2,58	36,77 ± 1,42	49,91 ± 1,58	66,36 ± 1,40	76,26 ± 1,26	83,73 ± 0,89	80,49 ± 1,58	12,73 ± 1,47
Z3	10,02 ± 1,50	18,76 ± 1,4	32,95 ± 1,38	48,93 ± 0,90	64,50 ± 0,20	72,32 ± 0,10	77,42 ± 1,06	30,63 ± 0,72
Z4	30,12 ± 2,38	31,87 ± 2,82	35,79 ± 2,63	45,19 ± 0,66	54,08 ± 1,82	65,94 ± 1,76	72,48 ± 2,73	37,96 ± 0,96
BHA	59,22 ± 0,59	78,55 ± 3,43	90,36 ± 0,30	92,18 ± 1,27	93,37 ± 0,86	94,87 ± 0,87	96,68 ± 0,39	1,29 ± 0,30
BHT	83,42 ± 4,09	93,52 ± 0,09	93,58 ± 0,09	93,63 ± 0,16	93,63 ± 0,95	94,20 ± 0,90	95,39 ± 2,62	1,81 ± 0,10

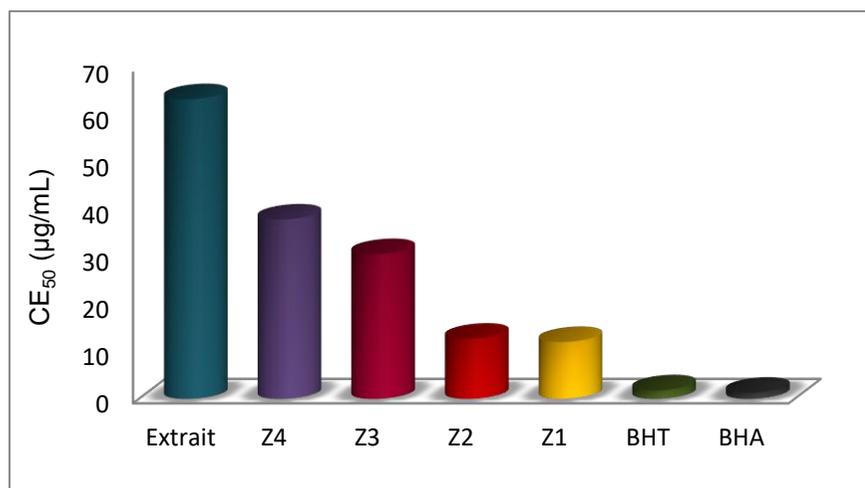


Figure 2.7 : Comparaison des valeurs de CE₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards

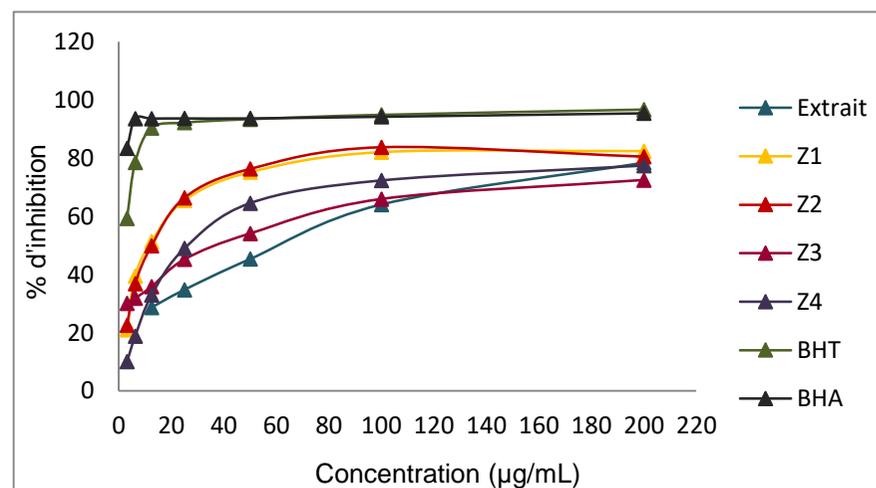


Figure 2.8 : Variation du taux de piégeage de l'ABTS^{•+} par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations

b. Procédure expérimentale

L'activité de blanchissement du β -carotène a été évaluée par la méthode décrite par H. M. Miller [190]. Une émulsion β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dans 1 mL de chloroforme et 25 μ L d'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène est assurée par le Tween 40. Après évaporation complète du chloroforme, 100 mL d'eau saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution du β -carotène doit être comprise entre 0,8 et 0,9 nm. Dans une microplaque, un volume de 160 μ L de cette solution préparée, a été ajouté à un volume de 40 μ L de chaque échantillon à tester à différentes concentrations. Deux témoins ont été aussi préparés avec la même procédure à savoir, un témoin négatif sans antioxydant, et des témoins positifs par des antioxydants de synthèse (BHA et BHT). Les microplaques ont été alors mises en incubation à 50 °C pendant 120 min et les absorbances ont été ensuite mesurées (à t=0 et t=2h) à 470 nm en utilisant un lecteur de microplaque à 96 puits. Le pourcentage d'inhibition, pour chaque concentration, est obtenu suivant l'équation (3):

$$ABTS \text{ inhibition } \% = \frac{Abs \text{ échantillon } (0) - Abs \text{ échantillon } (120)}{Abs \text{ contrôle } (0) - Abs \text{ contrôle } (120)} \times 100 \quad (3)$$

Abs contrôle (0): Absorbance du mélange sans échantillon à t=0h.

Abs échantillon (2): Absorbance du mélange avec échantillon à t=2h.

Abs contrôle (0): Absorbance du mélange sans échantillon à t=0h.

Abs échantillon (2): Absorbance du mélange avec échantillon à t=2h.

c. Résultats et discussion

L'aptitude de l'extrait brut et des dérivés de phloroglucinol isolés de l'algue brune *Zonaria tournefortii* à inhiber la peroxydation des lipides a été évaluée dans cette partie par la méthode de blanchiment du β -carotène. Les résultats représentés dans le tableau 2.4, exprimés en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (CE_{50}), ont montré que tous les échantillons testés inhibent la formation des radicaux libres par l'acide linoléique par rapport aux contrôles négatifs. Cependant, ils se sont avérés dotés d'un pouvoir antioxydant plus faible que celui des standards.

Tableau 2.4 : Variation du pourcentage d'inhibition de blanchiment de la β -carotène en fonction des différentes concentrations des échantillons testés

	% d'inhibition dans la méthode β -carotène							CE ₅₀ $\mu\text{g/mL}$
	3,125 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	
Ext	30,75 \pm 3,52	33,82 \pm 0,64	56,41 \pm 1,04	60,13 \pm 1,14	66,04 \pm 2,51	75,84 \pm 0,24	82,89 \pm 1,69	10,55 \pm 0,44
Z1	6,63 \pm 1,36	13,79 \pm 0,44	32,96 \pm 1,34	42,48 \pm 0,98	61,27 \pm 0,40	77,88 \pm 1,83	84,24 \pm 0,45	35,07 \pm 0,70
Z2	20,33 \pm 1,04	26,85 \pm 1,81	35,87 \pm 1,64	46,70 \pm 2,36	59,41 \pm 2,82	60,00 \pm 2,92	67,61 \pm 1,29	32,58 \pm 2,22
Z3	2,7 \pm 1,02	8,39 \pm 0,40	37,18 \pm 0,08	59,24 \pm 0,30	64,18 \pm 2,43	65,29 \pm 2,28	67,06 \pm 0,94	23,76 \pm 0,63
Z4	21,2 \pm 0,60	33,61 \pm 1,02	44,58 \pm 0,28	52,33 \pm 1,32	71,42 \pm 1,14	77,96 \pm 2,38	83,20 \pm 1,24	20,99 \pm 2,70
BHT	93,48 \pm 0,44	95,52 \pm 0,33	96,34 \pm 0,55	97,56 \pm 0,19	97,64 \pm 2,22	97,85 \pm 0,32	99,66 \pm 0,52	1,05 \pm 0,03
BHA	88,29 \pm 0,10	91,70 \pm 0,36	93,65 \pm 0,30	93,68 \pm 0,46	94,49 \pm 0,07	94,88 \pm 0,10	95,58 \pm 0,19	0,91 \pm 0,01

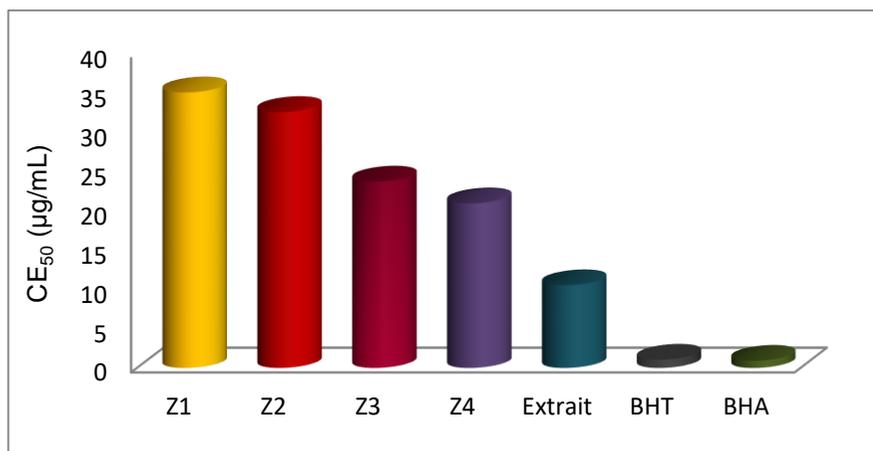


Figure 2.9 : Comparaison des valeurs de CE₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards

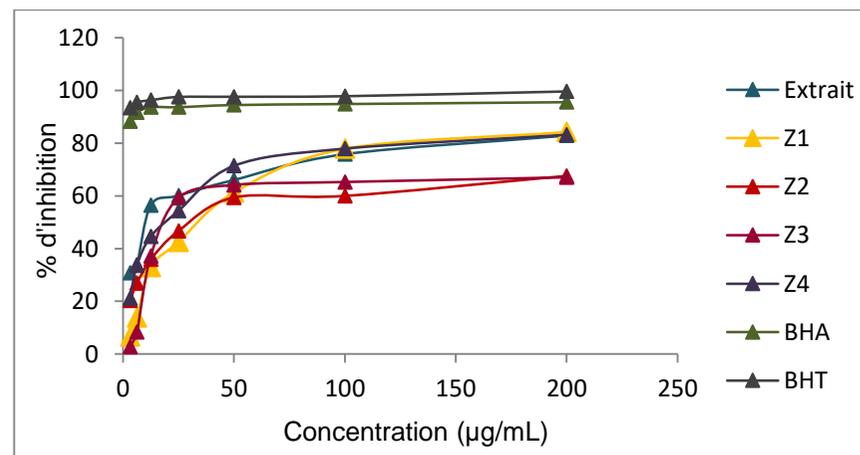


Figure 2.10 : Variation du pourcentage d'inhibition de blanchiment de β -carotène par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations

A l'opposé des résultats obtenus dans les deux tests précédents (DPPH[•] et ABTS^{•+}), l'extrait brut a manifesté la plus grande aptitude à inhiber la formation des radicaux libres par l'acide linoléique avec une valeur d'CE₅₀ de l'ordre de 10,55 ± 0,44 µg/mL, suivie respectivement par les produits purs Z4, Z3, Z2 et finalement Z1 qui a montré la plus faible activité. Ce résultats est probablement du à la haute spécificité de l'essai de blanchiment du β-carotène pour les composés lipophiles [191].

2.1.5.4 Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

a. Description de la méthode

La méthode CUPRAC implique la réduction du complexe de cuivre (II) (neocuproïne) (Cu(II)-Nc) en présence d'un antioxydant, ce qui conduit ainsi à la formation du complexe chromogène de cuivre (I) (neocuproïne) (Cu(I)-Nc) de couleur jaune orangée montrant une absorption maximale à 450 nm (Figure 2.11). Dans cette réaction, les groupes Ar-OH des antioxydants phénoliques réactifs sont essentiellement oxydés en quinones correspondantes (Ar)-O [192].

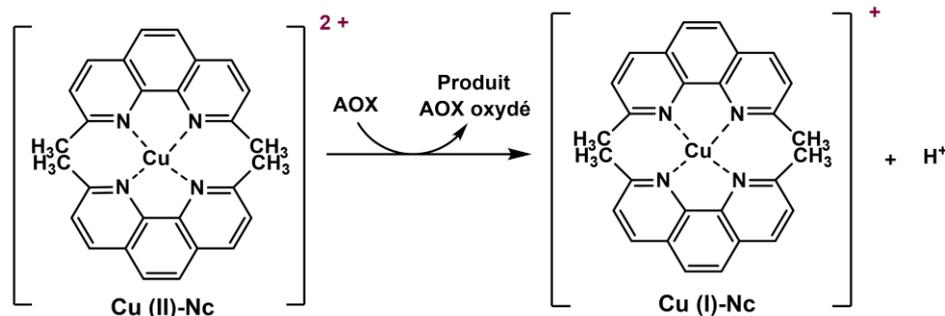


Figure 2.11 : Réduction du complexe chromogène de (neocuproïne) (Cu(II)-Nc)

b. Procédure expérimentale

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par Apak et al. [193]. Dans une microplaque de 96 puits, 50 µL de chaque échantillon à tester à différentes concentrations ont été mélangés avec 50 µL Cu (II) (10 mM), 50 µL neocuproïne (7,5 mM), et 60 µL de solution tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7,0). Après 60 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 450 nm. La capacité de réduction de l'extrait et des produits purs a été comparée à celles du BHA et BHT. Les résultats ont été calculés à titre d'A_{0.5} (µg/mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

c. Résultats et discussion

Les résultats de la capacité antioxydante de l'extrait brut et des produits purs par le complexe cuivre (II) (neocuproïne) (Cu(II)-Nc) sont présentés dans le tableau 2.5. Ces résultats sont légèrement différents de ceux obtenus avec le test DPPH[•]. Dans cette méthode les dérivés de types chromène Z3 et Z4 présentent les valeurs les plus petites en CE₅₀, par rapport aux acylphloroglucinols Z1 et Z2. Ces valeurs reflètent la capacité de ces deux composés à réduire le complexe cuivre (II) (neocuproïne). Ce résultat tend à indiquer que l'activité antioxydante des produits Z3 et Z4 est liée de façon privilégiée à un mécanisme de transfert d'électron, tandis que pour les produits Z1 et Z2, l'activité est due à principalement à un transfert de proton renforcé par rapport au transfert d'électron.

2.1.5.5 Chélation des ions ferreux

a. Description de la méthode

La chélation des ions ferreux est déterminée suivant une méthode basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe⁺²-Ferène, un chromophore de couleur bleu intense ayant un maximum d'absorption à 562 nm. En présence d'agent chélateur, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de l'intensité de couleur qui sera suivie par spectrophotomètre [188].

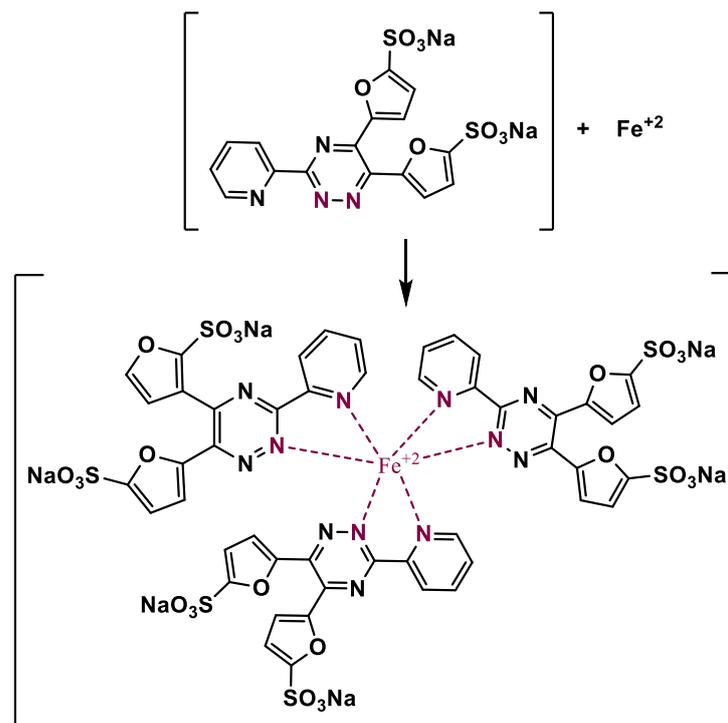


Figure 2.12 : Mécanisme de formation de complexe Fe⁺²-Ferène

Tableau 2.5 : Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons testés

Absorbances dans la méthode CUPRAC								
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg	A _{0.5} µg/mL
Ext	-	-	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,08	0,41 ± 0,04	0,57 ± 0,02	0,84 ± 0,03	80,20 ± 0,60
Z1	0,19 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,36 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,75 ± 0,01	1,10 ± 0,06	1,61 ± 0,04	23,81 ± 0,72
Z2	0,18 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,55 ± 0,04	0,83 ± 0,06	1,28 ± 0,08	1,71 ± 0,12	23,54 ± 1,20
Z3	0,29 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,98 ± 0,04	1,34 ± 0,02	1,70 ± 0,06	19,06 ± 0,11
Z4	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,64 ± 0,01	1,06 ± 0,08	1,69 ± 0,02	2,41 ± 0,1	17,72 ± 0,26
BHT	0,19 ± 0,01	0,33 ± 0,04	0,66 ± 0,07	1,03 ± 0,07	1,48 ± 0,09	2,04 ± 0,14	2,32 ± 0,28	9,62 ± 0,87
BHA	0,46 ± 0,00	0,78 ± 0,01	1,34 ± 0,08	2,36 ± 0,17	3,45 ± 0,02	3,76 ± 0,03	3,93 ± 0,01	3,64 ± 0,19

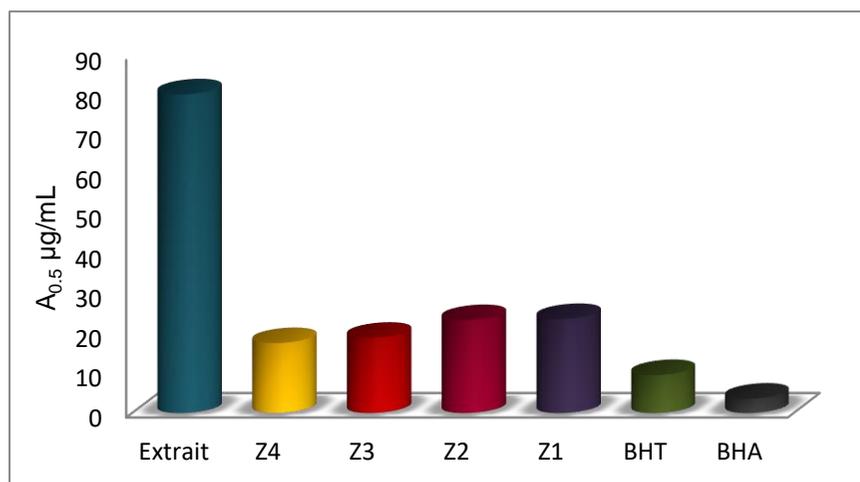


Figure 2.13 : Comparaison des valeurs d'A_{0.50} de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards

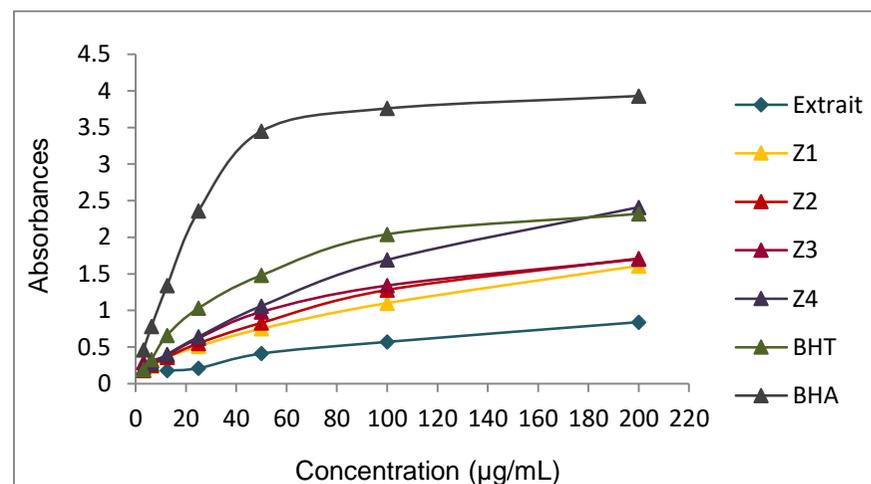


Figure 2.14 : Variation des absorbances par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations

b. Procédure expérimentale

L'activité de chélation des ions métalliques par des ions ferreux Fe^{+2} a été mesurée selon la méthode décrite par Decker et al. [194]. 40 μL de différentes concentrations d'échantillons à tester ainsi que l'échantillon de contrôle positif (EDTA) ont été ajoutés à 40 μL de la solution de chlorure de fer (FeCl_2 , 0,2 mM) et 40 μL de méthanol. La réaction a été amorcée par l'addition de 80 μL de ferène (0,5 mM). Le mélange a été agité vigoureusement et laissé au repos à une température ambiante pendant 10 min. Un contrôle négatif a été ainsi préparé dans les mêmes conditions. A l'équilibre, les absorbances ont été déterminées à 562 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage de chélation en utilisant l'équation (4).

$$\text{Métal chelate (\%)} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100 \quad (4)$$

Abs échantillon : Absorbance à 562 nm du mélange avec échantillon.

Abs contrôle : Absorbance à 562 nm du mélange sans échantillon.

c. Résultats et discussion

Les propriétés antioxydantes jouent un rôle de prévention important contre le stress oxydant initié par les métaux de transition tels que le cuivre et le fer. Cette action peut se produire soit par la décomposition des hydroperoxydes, soit par la production de radicaux hydroxyles (HO^\bullet) par la réaction de Fenton (Figure 2.15) [195]. En fait, il a été démontré que les composés phénoliques agissent comme des antioxydants qui inhibent efficacement l'action pro-oxydante des métaux sans interagir directement avec les espèces oxydantes, par un processus de chélation, dans lequel les composés phénoliques réagissent avec les ions métalliques pour former un complexe incapable de favoriser l'oxydation.

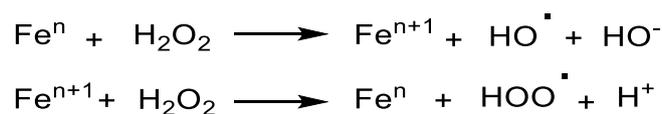


Figure 2.15 : Réaction de Fenton

Plusieurs travaux ont mis en évidence que les propriétés réductrices des produits phénoliques et leur capacité à former des complexes stables avec les métaux de transition, notamment le fer et le cuivre, peuvent moduler divers processus d'importance biologique faisant intervenir l'état redox de l'ion métallique. Les interactions des ions du cuivre et du fer avec les produits phénoliques sont souvent proposées comme l'un des mécanismes d'action antioxydante de ces produits naturels.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'activité antioxydante de l'extrait et des produits purs de *Zonaria tournefortii* par la méthode de chélation des ions ferreux basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe^{+2} -Feréne. Les données expérimentales obtenues comparées au standard EDTA sont représentées par la figure 2.17, et les valeurs des CE_{50} déduites sont présentées dans le tableau 2.6. L'examen du tableau révèle une affinité importante de tous les échantillons testés pour les ions ferreux avec des valeurs d' CE_{50} très proches. Ce résultat est lié à la structure chimique des dérivés de phloroglucinol étudiés et la localisation des groupements hydroxyles. D'un point de vue structural, les produits Z1 et Z2 sont capables de complexer les ions ferreux *via* le groupement 1'-hydroxy-1-carbonyle et les produits Z3 et Z4 *via* le groupement 5'-hydroxy-4'-carbonyle. Des sites potentiels de complexation métallique, pour donner des chélates à six centres.

Tableau 2.6 : Variation des taux de chélation métallique en fonction des différentes concentrations des échantillons testés

	% d'inhibition dans la méthode chélation des ions ferreux							CE ₅₀ µg/mL
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	
Ext	-	-	27,81 ± 1,14	44,49 ± 2,59	79,80 ± 2,43	88,54 ± 0,60	86,52 ± 0,55	14,41 ± 0,16
Z1	33,87 ± 2,50	48,27 ± 3,57	64,69 ± 0,79	71,92 ± 0,79	76,24 ± 1,98	78,83 ± 1,52	65,62 ± 1,58	7,71 ± 0,54
Z2	38,95 ± 0,08	56,22 ± 1,03	60,52 ± 0,63	65,06 ± 1,17	76,64 ± 1,53	55,39 ± 0,79	42,20 ± 0,79	5,13 ± 0,11
Z3	38,21 ± 1,32	50,95 ± 0,53	66,14 ± 1,26	76,68 ± 0,68	82,25 ± 1,50	73,26 ± 0,57	66,76 ± 1,93	3,45 ± 0,14
Z4	43,00 ± 0,40	67,50 ± 0,61	70,27 ± 0,38	73,08 ± 0,50	79,54 ± 2,65	72,99 ± 1,15	62,63 ± 3,10	3,57 ± 0,18
EDTA	9,69 ± 1,32	20,59 ± 0,50	51,15 ± 0,31	95,80 ± 0,06	95,87 ± 0,06	95,84 ± 0,22	95,76 ± 0,06	12,11 ± 0,32

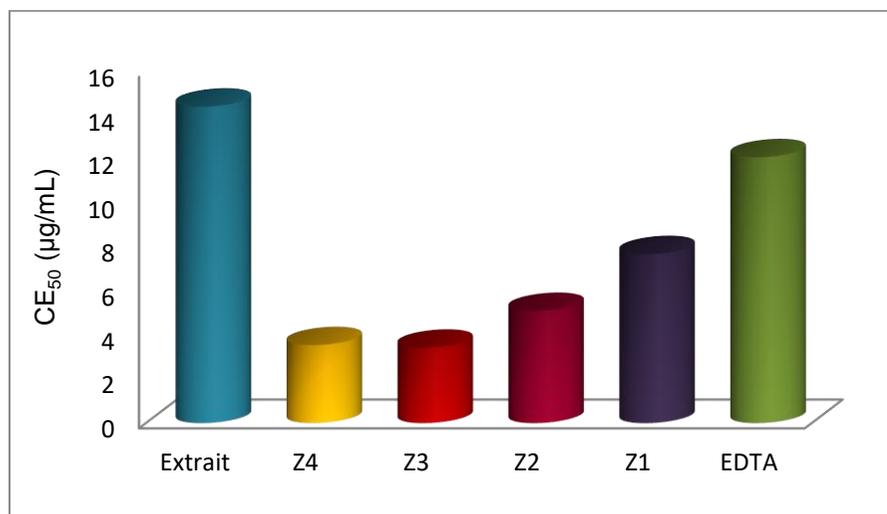


Figure 2.16 : Comparaison des valeurs de CE₅₀ de l'extrait brut, des produits purs et des antioxydants standards

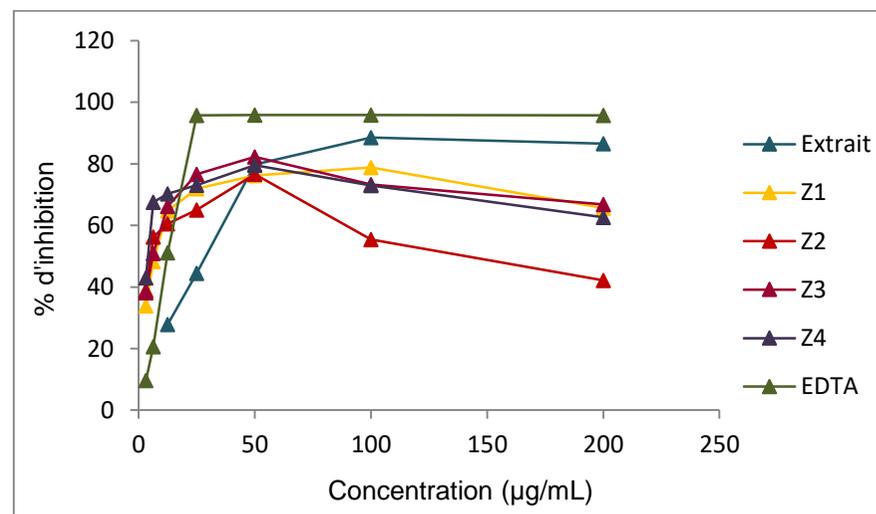


Figure 2.17 : Variation du taux de chélation métallique par les échantillons testés en fonction des différentes concentrations

2.2. Etude des souches bactériennes de *Zonaria tournefortii* : Isolement et caractérisation préliminaire

2.2.1 Echantillonnage et conditionnement

L'algue brune *Zonaria tournefortii* a été récoltée en février 2016 sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique « Corne d'Or » à Tipaza. Les algues ont été stérilement prélevées et placés dans des flacons stériles et hermétiquement fermés contenant de l'eau de mer, puis, transportés au laboratoire à température ambiante de l'eau de mer.

2.2.2 Isolement des souches bactériennes

2.2.2.1 Milieux de culture

Deux milieux sélectifs aux bactéries marines à savoir VNSS et Zobell ont été exclusivement utilisés dans le cadre de cette thèse pour l'isolement et la purification des souches bactériennes de *Zonaria tournefortii*. Le pH des milieux a été ajusté à 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH (1N) pour le milieu VNSS et de l'HCL (1N) pour le milieu Zobell, avant d'être autoclavés à 121 °C pendant 20 min.

Milieu VNSS

Le milieu VNSS est considéré comme un milieu relativement pauvre par rapport à d'autres milieux couramment utilisés pour la culture de bactéries marines. Il est composé de NSS (Nine-Salt Solution), neuf sels solubilisés dans 1 L d'eau déminéralisée : NaCl (17,6 g), Na₂SO₄ (1,47 g), NaHCO₃ (0,08 g), KCl (0,25 g), KBr (0,04 g), MgCl₂.6H₂O (1,87 g), CaCl₂.2H₂O (0,41 g), SrCl₂.6H₂O (0,01 g) et H₃BO₃ (0,01g). D'autres ingrédients sont ajoutés au NSS avant stérilisation, il s'agit de : peptone (1 g), extrait de levure (0,5 g), glucose (0,5 g), amidon soluble (0,5 g), FeSO₄.7H₂O (0,01 g) et Na₂HPO₄ (0,01 g). Le milieu VNSS agar est constitué à partir du milieu VNSS liquide auquel est ajouté 1,5% (p/v) d'agar bactériologique.

Milieu Zobell

Le milieu Zobell est composé de : peptone (5 g), extrait de levure (1 g), eau de mer filtrée (800 mL), qsp 1L eau ultra-pure et 1,5% (p/v) d'agar.

2.2.2.2 Traitement et mise en culture des échantillons d'algue

Dans les 3h qui ont suivi le prélèvement, les spécimens d'algue ont été traités par deux méthodes afin de mieux différencier entre les souches bactériennes épiphytes et endophytes. Afin d'isoler les souches bactériennes épiphytes, les échantillons d'algue ont été initialement lavés 3 fois avec de l'eau de mer stérilisée avec un filtre de 0,22 µm pour éliminer les microorganismes faiblement attachés à la surface d'algue, puis rincés avec la solution tampon phosphate salin PBS (×1) afin de faciliter l'élimination de l'eau de mer avant l'étape d'isolement. De même, pour les souches bactériennes endophytes, les thalles pré-rincés avec l'eau de mer ont été soumis à une stérilisation de surface avec 70% éthanol pendant 15 secondes, puis lavés à nouveau avec l'eau de mer stérile et rincés avec une solution de PBS(×1). Trois méthodes d'isolement ont été utilisées afin de récupérer le maximum de la flore bactérienne de l'algue.

- La première méthode, principalement destinée à l'isolement des bactéries épiphytes, consiste à froter vigoureusement la surface de quelques thalles, pré-rincés au PBS (1×), à l'aide d'un écouvillon stérile. Ce dernier a été ensuite utilisé pour inoculer directement les boîtes de Petri contenant les milieux de culture solide VNSS et Zobell.
- La deuxième méthode consiste à découper des morceaux carrés d'environ 1 cm² des thalles d'algues et à les déposer directement sur la surface du milieu d'isolement.
- La troisième méthode, repose sur le découpage des thalles d'algue en petits morceaux carrés, puis placés dans des tubes à essai contenant de l'eau de mer filtrée et stérilisée. Ils ont ensuite été soumis à une agitation vigoureuse par vortex, pour permettre de récupérer le maximum de souches bactériennes. 100 µL de la suspension de l'algue obtenue après filtration, ainsi que les dilutions décimales préalablement préparées (10^{-1} à 10^{-5}) ont été étalées, à l'aide d'un râteau, sur les milieux de culture solide VNSS et ZoBell. Les boîtes ainsiensemencées ont été 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 triplicata.

2.2.3 Purification et conservation des souches bactériennes

Les unités formant colonies (UFC) ont été discriminées et sélectionnées à partir d'une étude macromorphologique (forme, taille, couleur, opacité, aspect de surface et de contour), au fur et à mesure de leur apparition, pour être ensemencées individuellement sur VNSS-agar ou Zobell-agar afin d'obtenir des cultures bactériennes bien séparées. Les colonies ainsi isolées ont ensuite fait l'objet de repiquages successifs sur les mêmes milieux d'isolements jusqu'à purification. Au total, 30 isolats bactériens purs ont été obtenus, codés, ensuite conservés à courte et longue durée. La conservation à courte durée consiste à ensemencer les souches bactériennes marines isolées sur le milieu VNSS coulé en pente dans des tubes à essais. Ces derniers sont incubés à 30 °C pendant 24 h puis conservés à +4 °C. Quant à la conservation à longue durée, les souches sont conservées dans des cryotubes à -80 °C à partir d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance en milieu VNSS en présence de 25% de glycérol.

Les espèces cultivables ne représentent qu'une petite partie de la diversité microbienne des différents écosystèmes de la planète. On estime que seulement 1% des microorganismes est accessible par des techniques de culture standard reposant sur l'isolement de souches. L'essor de la métagénomique a permis un développement important des connaissances liées à cette diversité [196, 197].

2.2.4 Caractérisation préliminaire des souches bactériennes isolées de *Zonaria tournefortii*

2.2.4.1 Etude morphologique, biochimique et métabolique

a. Etude morphologique

L'étude de la morphologie bactérienne demeure un critère important permettant une orientation préliminaire pour l'identification. Elle repose sur des observations macro- et microscopiques.

Observation macroscopique

L'observation macroscopique des colonies obtenues sur des boîtes de Petri permet la description des colonies, à savoir: la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect de surface et de contour.

Observation microscopique

L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques des bactéries. 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 morphologie des bactéries, de leur mode de groupement et de leur mobilité éventuelle. A partir des cultures bactériennes en milieux liquides ou des suspensions réalisées dans de l'eau distillée à partir des colonies ayant poussées sur des milieux solides, un prélèvement de 10 μ L de chaque suspension bactérienne a été déposé entre lame et lamelle puis directement observé au microscope optique avec un grossissement \times 40.

- *Observation après fixation* : L'observation microscopique d'un frottis fixé via la coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram positif qui sont colorées en violet, de celles à Gram négatif colorées en rose. Le test a été réalisé en utilisant quatre solutions différentes : un colorant basique, un mordant, un agent de décoloration et un colorant de contraste. Les frottis des bactéries à identifier sont préparés sur des lames en verre puis fixés à la chaleur. Une fois refroidi, les frottis ont été colorés au violet de gentiane pendant 30 secondes puis lavés à l'eau. Les frottis ont été ensuite couverts de lugol et laissés agir pendant 30 secondes pour être ensuite lavés. Les préparations ont été 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 30 s. Enfin, les préparations ont été lavées doucement à l'eau, séchées puis observées au microscope avec un grossissement \times 40.

La présence des spores peut être mise directement en évidence par examen microscopique d'un frottis coloré par la méthode de Gram. Elles se présentent sous forme de particules endocellulaires sphériques ou ovales non colorées et réfringentes. Dans des cas douteux, une coloration spécifique par le vert de malachite peut être réalisée.

b. Etude biochimique et métabolique

Test de la catalase

La recherche de la catalase a été effectuée simplement par la mise en contact d'une colonie bactérienne 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.

Test de l'oxydase

Pour réaliser le test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-diméthyl paranitrophénylène diamine, préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile, a été déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. La présence d'un cytochrome oxydase se traduit, en 10 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration violette.

Test de mannitol-mobilité

La mise en évidence simultanée de la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries a été réalisée en milieu mannitol-mobilité ensemencée en 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. La fermentation du mannitol se traduit par un virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune à l'orange.

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 24 h, 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.

Détermination du type respiratoire

Le type respiratoire des bactéries a été déterminé sur milieu réducteur gélosé « viande foie », réparti dans des tubes à essais fins et profonds, et ensemencés par piqûre centrale jusqu'au fond du tube. Ceci permet de mettre en évidence les différents types respiratoires.

2.2.4.2 Classification préliminaire des souches bactériennes 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 bactériennes isolées à partir de l'algue *Zonaria tournefortii* en utilisant des méthodes conventionnelles qui font appel aux caractères d'identification classique.

Une étude des caractères culturels des souches bactériennes 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 2.7. D'une manière générale, les colonies obtenues sont généralement rondes avec une couleur crème, jaune, orange, rouge et marron. Leur consistance est généralement crémeuse, visqueuse d'opacité translucide à opaque. Les constatations obtenues permettent de regrouper les différentes souches en quatre types :

- *Le premier type* présente des colonies crémeuses, de couleur blanc-crème : isolats S03, S09, S10, S12, S13, S16, S17, S18, S20, S21 et S27.
- *Le deuxième type* a encore des colonies blanc-crème, mais d'aspect visqueux : isolats S01 et S14.
- *Le troisième type* présente des colonies opaques colorées en jaune à orange : isolats S02, S04, S05, S06, S07, S08, S11, S15, S19, S23, S24, S25, S26, S28 et S29.
- *Dans le quatrième type*, se classent des souches allant de couleur jaune à orange mais plus ou moins transparentes (opacité translucide). C'est le cas des souches S22 et S30.

Cette étude macromorphologique primaire a été suivie par des analyses microscopiques qui ont permis une caractérisation complémentaire des différentes souches. L'ensemble des résultats obtenus (Tableau 2.8) nous a permis de classer les isolats dans quatre groupes micromorphologiques différents:

- *Le premier groupe* rassemble les bactéries Gram positif, cocci, asporulés, immobiles: isolats S02, S04, S05, S07, S08, S11, S15, S19, S23, S24, S25, S26, S28, S29.
- *Le deuxième groupe* rassemble les bactéries Gram positif, bacilles, sporulés, mobiles: isolats S01, S09, S10, S12, S13, S14, S16, S17, S18, S20, S21, S27.
- *Le troisième groupe* rassemble les bactéries Gram négatif, coccobacilles, asporulés, immobiles : isolats S03 et S30.
- *Le quatrième groupe* rassemble les bactéries Gram négatif, Bacilles, asporulés, mobiles: isolats S06 et S22.

Au regard des caractéristiques biochimiques et métaboliques, toutes les souches isolées sont catalase positive. Les souches S01, S09, S10, S12, S13, S14, S16, S17, S18, S20, S21, S27 sont oxydase positive tandis que les autres souches sont oxydase négative. L'étude du type respiratoire sur la gélose viande-foie a permis de révéler que toutes les souches sont des aéro-anaérobies facultatives à l'exception des deux souches S03 et S22 qui sont des aérobies strictes (Tableau 2.9).

La notion d'espèce bactérienne ne peut être déterminée de manière précise en se basant uniquement sur tels critères. Plusieurs espèces étant phénotypiquement très proches ou non différenciables et certaines souches pouvant être atypiques, il est préférable dans ces cas et en l'absence de toute identification moléculaire de parler de groupe taxonomique. De ce fait, suite aux résultats des tests bactériologiques préliminaires d'orientation obtenus en se référant aux résultats décrits dans le manuel de la Bactériologie Systématique [198], nous avons pu rattacher les isolats aux genres *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Acinetobacter*, et à la famille des *Entérobacteraceae* (Figure 2.18).

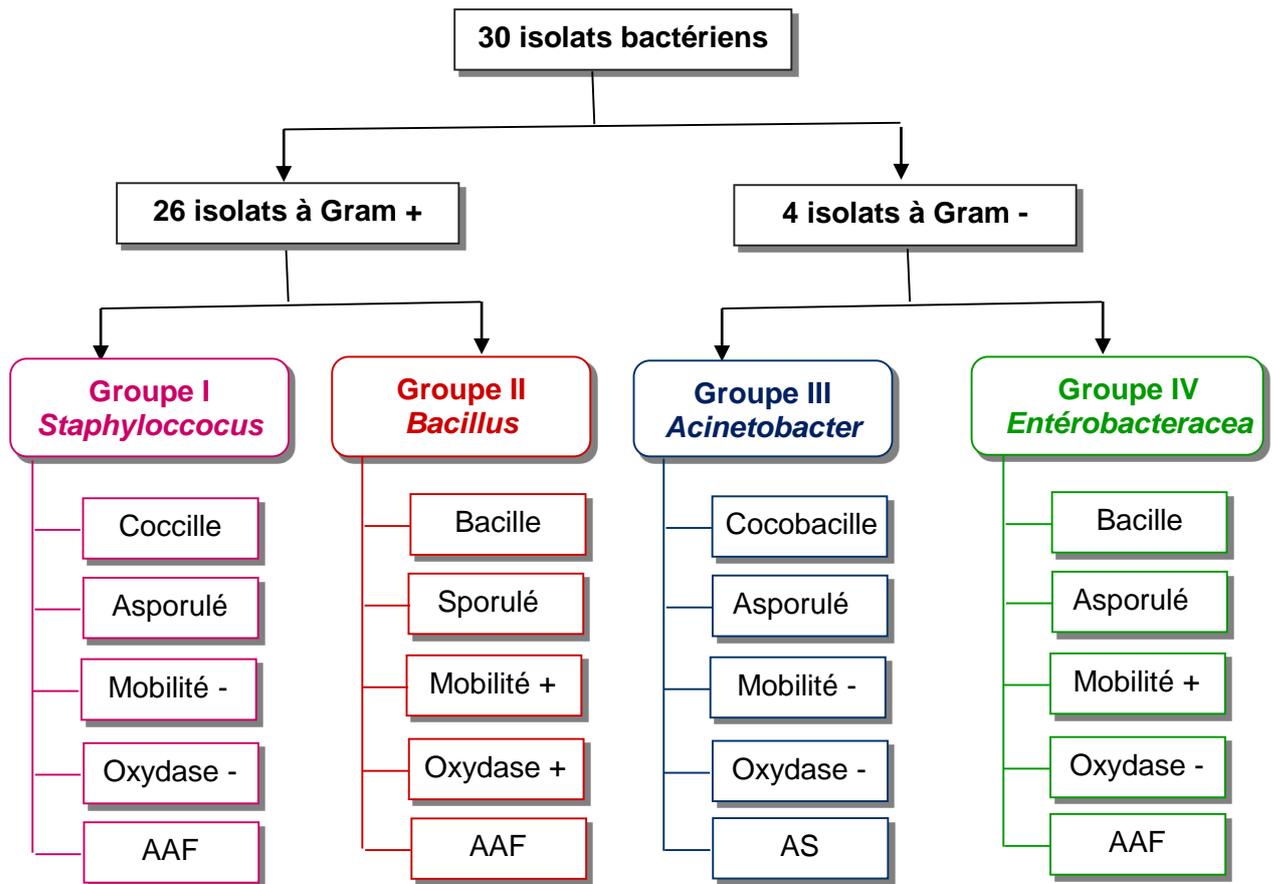


Figure 2.18 : Regroupement des isolats obtenus de *Zonaria tournefortii* (Groupe I: S02, S04, S05, S07, S08, S11, S15, S19, S23, S24, S25, S26, S28, S29 ; Groupe II: S01, S09, S10, S12, S13, S14, S16, S17, S18, S20, S21, S27; Groupe III: S03, S30; Groupe IV: S06, S22)

Tableau 2.8 : Caractérisation micromorphologique des souches bactériennes isolées de *Zonaria tournefortii*

Caractères microscopiques	<i>Souches bactériennes</i>														
	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10	S11	S12	S13	S14	S15
Gram	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forme	Bacille	Cocci	Cocco bacille	Cocci	Cocci	Bacille	Cocci	Cocci	Bacille	Bacille	Cocci	Bacille	Bacille	Bacille	Cocci
Mobilité	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Sporulation	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Arrangement	Isolés	Amas	Isolés	Amas	Amas	Isolés	Amas	Amas	Isolés	Isolés	Amas	Isolés	Isolés	Isolés	Amas
Caractères microscopiques	<i>Souches bactériennes</i>														
	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30
Gram	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Forme	Bacille	Bacille	Bacille	Cocci	Bacille	Bacille	Bacille	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Bacille	Cocci	Cocci	Cocco bacille
Mobilité	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Sporulation	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Arrangement	Isolés	Isolés	Isolés	Amas	Isolés	Isolés	Isolés	Amas	Amas	Amas	Amas	Isolés	Amas	Amas	Isolés

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

Tableau 2.9 : Caractérisation biochimique et métaboliques des souches bactériennes isolées de *Zonaria tournefortii*

Tests biochimiques	Souches bactériennes														
	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10	S11	S12	S13	S14	S15
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Mannitol	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Indole	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Type respiratoire	AAF	AAF	AS	AAF											
Tests biochimiques	Souches bactériennes														
	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Mannitol	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Indole	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Type respiratoire	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF

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

CHAPITRE 3

PRODUCTION ET CARACTERISATION CHIMIQUE DE METABOLITES BIOACTIFS PRODUITS PAR *BACILLUS* *AMYLOLIQUEFACIENS* S13

3.1 Mise au point d'une méthodologie de criblage optimisée des souches bactériennes productrices de métabolites antimicrobiens

Dans le cadre de la recherche de nouvelles souches bactériennes productrices de métabolites antimicrobiens diffusibles et volatils, un criblage de trente souches bactériennes isolées à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii* a été effectué. En s'inspirant des protocoles décrits dans la littérature, nous avons testé l'action des isolats bactériens ayant des cibles biologiques différentes sur un panel de micro-organismes cibles, provenant du laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), comprenant huit bactéries, cinq à Gram positif, *Bacillus subtilis* (ATCC 6663), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 49594), *Micrococcus luteus* (LB 14110) et *Bacillus cereus* (ATCC 14975), et trois à Gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 43300), *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 23308) et *Salmonella enterica* (CIP 80.39), deux levures, *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) et un champignon *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

3.1.1 Culture des souches bactériennes en milieux solides

Afin d'étudier l'influence du milieu de culture sur le développement des souches bactériennes par étude de leur croissance et leur aspect macroscopique, ces souches ont été ensemencées sur six milieux solides sélectionnés pour le criblage: VNSS, Zobell, GN, LB, Bennett, et 333. Pour certaines souches bactériennes, considérées en même temps de culture, des colonies d'aspect plus au moins distinct ont pu être observées sur les différents milieux. Des variations ont pu être notées au niveau de la couleur, de la texture et de la taille des colonies selon le milieu, démontrant son influence sur le métabolisme bactérien.

Au niveau de la couleur et de la texture, ce sont les souches S06, S07 et S08 qui ont montré des différences notables en fonction des milieux. A titre d'exemple, la souche S07 a présenté une colonie de couleur crevette, d'aspect variolitique en milieu VNSS tandis qu'en milieu LB, cette souche s'est développée sous forme d'une colonie marron-orangé d'aspect velouté relativement lisse.

Au niveau de la taille et de la croissance des colonies, des variations en fonction du milieu et de la souche ont pu être observées. Les souches S04, S07, S11, S15, S22 et S23 ont montré une croissance lente par rapport aux autres souches indépendamment du milieu de culture, tandis que les souches S01, S09, S10, S12, S13, S14, S17, S18, S21 et 27 se sont développées, particulièrement, plus rapidement. Ces dernières ont montré une croissance quasiment similaire sur tous les milieux de culture. Parmi les isolats bactériens, les souches S02, S19 et S26 se sont développées uniquement sur le milieu VNSS avec une croissance lente, tandis que les souches S03, S05, S06, S08, S11, S15 se sont développées plus rapidement en milieu GN en comparaison aux milieux VNSS, Zobell, LB et Bennett.

3.1.2 Criblage de souches productrices de métabolites antimicrobiens diffusibles

La mise en évidence des activités antimicrobiennes de trente isolats bactériens a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar. La méthode consiste à ensemercer un tapis bactérien de toutes les souches sur les milieux de criblage (VNSS, Zobell, GN, LB, Bennett et 333) coulés en boîte de Pétri puis incubés à 30 °C pendant 7 jours. Des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été ensuite prélevés quotidiennement et déposés à la surface des milieux de culture (Mueller-Hinton pour les bactéries et les levures et Saboureaud pour les champignons) préalablement ensemençés avec les germes cibles. Des cylindres de milieu non ensemençés par les bactéries tests ont été utilisés en tant que témoins négatifs. Les boîtes ont été ensuite maintenues à 4 °C pendant 4 heures pour permettre une bonne diffusion des substances antimicrobiennes, puis elles ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C pour les bactéries et les levures, et 72 heures à 28 °C pour les champignons. La lecture des résultats est effectuée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

Au total sur trente souches bactériennes criblées pour leur potentialité de production de molécules antimicrobiennes, quinze isolats se sont montrés actifs contre au moins un germe-cible. Les souches S01, S13, S14 et S17 ont montré un spectre d'action relativement assez large, qui s'étend aussi bien sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif que sur les levures et les champignons. Cependant, l'apparition et les valeurs des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à un autre et varient, sur le même milieu de culture, d'un microorganisme test à un autre. En revanche, les souches S02, S08, S11, S12, S15, S23, S24, S25, S29 et S30 ont inhibé au moins la croissance d'un germe cible, tandis que les autres bactéries n'ont présenté aucune activité.

Des variations ont également pu être observées selon les milieux de culture. Le milieu VNSS a permis l'obtention des plus importants halos d'inhibition pour tous les isolats, à l'exception de la souche S13. Cette dernière à toute fois présentée des meilleures activités en milieu LB qui semble être adapté à la production de composés bioactifs. A l'opposé, les plus faibles halos d'inhibition ont été obtenus pour le milieu Zobell par rapport aux autres milieux. Les souches S01, S14 et S17 ont présenté des activités antilevuriennes similaires sur les milieux 333 et Bennett, tandis que certaine variabilité d'action a été observée au niveau des deux milieux contre les bactéries. En effet, les meilleures activités ont été obtenues sur le milieu Bennett par rapport à 333. Il faut signaler que les activités obtenues lors de ce criblage sont faibles ou parfois modérées, à l'exception des souches S01, S13, S14 et S17 qui ont montré des activités particulièrement fortes contre *B. subtilus*, *S. cerevisiae* et *A. tumefaciens*.

3.1.3 Criblage de souches productrices de métabolites antimicrobiens volatils

Un test in vitro en milieux solides a été réalisé pour évaluer les potentialités des souches bactériennes isolées de *Zonaria tournefortii* dans la production de composés organiques volatils antimicrobiens. Les souches à cribler ont été cultivées sur différents milieux de culture (VNSS, Zobell, GN, LB, Bennett et 333) à 30 °C pendant 1 à 7 jours, ensuite les couvercles des boîtes de pétri ont été enlevés et remplacés chaque jour par des boîtes de pétri inversées contenant au centre des

cylindres de six millimètres de diamètre provenant des milieux préalablement ensemencés avec les germes-cibles, empêchant tout contact physique entre les deux microorganismes (avec les cultures bactériennes à cribler au fond et les cultures pathogènes en haut). Les témoins sont réalisés dans des conditions similaires, sauf que les boîtes de pétri inférieures n'étaient pas inoculées. Les boîtes ont été ensuite hermétiquement fermées, en utilisant du Parafilm, et incubées pendant 24 h à 37 °C pour les bactéries et les levures et 48 h à 28 °C pour les champignons. L'effet antagoniste bactérien a été exprimé sur la base des pourcentages d'inhibition, selon l'équation suivante:

$$Inhibition (\%) = \frac{R_c - R_i}{R_c} \times 100$$

Où R_c est la valeur moyenne des diamètres de croissance des germes-cibles en absence de bactéries à cribler (témoin) et R_i représente les diamètres de croissance des germes-cibles en présence des bactéries à cribler.

Les résultats du test in vitro visant à mettre en évidence certains modes d'action importants qui sont la capacité de production de métabolites antimicrobiens volatils par les 30 souches bactériennes testées, ont mis en évidence la sécrétion de composés volatils par cinq souches bactériennes seulement, à savoir : S03, S10, S13, S18 et S28. Les isolats actifs ont inhibé surtout les levures, champignons filamenteux et les bactéries à Gram positif et à un degré moindre les bactéries à Gram négatif.

Parmi les germes-cibles fortement inhibés, nous retrouvons *B. subtilus*, *M. luteus*, *S. cerevisiae* et *A. tumefaciens*. Les activités des cinq isolats varient suivant les milieux de culture. La souche S13 a présenté les meilleures activités sur le milieu LB quelque soit les germes-cibles. En ce qui concerne les autres isolats, des variations importantes ont pu être observées selon les milieux de culture. Les activités sont en général meilleures sur milieu Bennett suivi par les milieux 333 et VNSS, et sont variables selon les milieux pour les levures et les champignons.

3.1.4 Discussion des résultats

La résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques disponibles se multiplie et le nombre de souches multi-résistantes ne cesse de croître, ce qui représente un grave problème de santé publique. La découverte de nouveaux antimicrobiens est donc primordiale. L'une des stratégies suivies dans la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes consiste à explorer des écosystèmes et des niches écologiques peu ou pas étudiés. Les bactéries marines et leurs métabolites constituent une source, peu exploitée mais au potentiel d'innovation élevé, de molécules antimicrobiennes pouvant révéler des modes d'actions inconnus jusqu'ici. Dans ce contexte, un criblage des activités antimicrobiennes sur une trentaine de souches bactériennes marines, nouvellement isolées à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, non encore explorées, a été réalisé dans l'objectif de trouver de nouveaux antimicrobiens avec des structures et activités originales.

Un criblage préliminaire a été effectué sur la base de la croissance et l'aspect macroscopique des souches bactériennes sur différents milieux solides. Cette condition est importante pour faciliter la suite de nos travaux. Compte tenu de cette condition, les souches bactériennes qui se sont développées plus rapidement ainsi que celles possédant une consistance plus au moins facile à manipuler à savoir les souches S01, S05, S08, S09, S10, S12, S13, S14, S17, S18, S21 et S27 ont attiré notre attention. En revanche, les souches S02, S19 et S26 ont été éliminées car elles ne se développent que sur milieu VNSS et elles présentent une croissance très lente. Les cultures de ces souches sur boîte de Petri ont nécessité des temps d'incubation de 4 jours.

Comme nous l'avons décrit précédemment, des colonies d'aspect plus au moins distinct et des développements différents pour certaines bactéries ont pu être observés sur les différents milieux. La variation de l'apparence des colonies en fonction des milieux montre que la composition des substrats a une forte influence sur le phénotype des souches. Le développement différent selon le milieu refléterait un fonctionnement métabolique variable, s'adaptant aux apports nutritionnels, et laisse supposer aussi l'existence de variation du métabolisme secondaire selon le milieu de culture.

Ce criblage préliminaire a été suivi par la recherche des souches bactériennes productrices de molécules antimicrobiennes en milieux solides en utilisant deux techniques différentes, à savoir la nature des métabolites volatils ou diffusibles. L'ensemble de nos résultats, in vitro, avec les 30 souches montre que les deux tests sont clairement divergents. Le criblage de souches bactériennes pour leurs capacités de production de molécules antimicrobiennes diffusibles a abouti à la présélection de quatre souches, à savoir S01, S13, S14 et S17, présentant un spectre d'action relativement assez large. Leur activité est variable suivant les germes-cibles et selon le milieu de culture. Cette variabilité laisse ainsi supposer la sécrétion de plus d'un antibiotique par souche et qui seraient différents d'une souche à une autre. Concernant les molécules antimicrobiennes volatiles, cinq isolats seulement qui ont montré des activités antimicrobiennes via la production de métabolites volatils. Les isolats S13, S18 et S28 ont été présélectionnés, au regard de leur fort potentiel de production de molécules antimicrobiennes volatiles contre *B. subtilus*, *M. luteus*, *S. cerevisiae* et *A. tumefaciens*.

Au niveau des profils d'activités, la souche S13 s'avère très intéressante par rapport à son pouvoir d'inhibition de la croissance des germes-cibles, à la fois par la production des composés diffusibles et volatils. Une meilleure efficacité de cette souche a été observée avec les composés volatils. En outre, la souche S13 présente de fortes activités sur le milieu LB que ce soit pour la production de métabolites antimicrobiens volatils ou diffusibles. Cependant, les autres isolats ne présentent pas le même comportement de production de molécules actives en fonction du milieu. En effet, tous les isolats actifs étudiés ont présenté des meilleures activités sur le milieu VNSS et Bennet pour la production de métabolites diffusibles et volatils, respectivement. Le milieu LB favorisant une croissance rapide et une production de métabolites importante s'est toutefois montré plus discriminant au niveau de l'activité puisque seule la souche S13 a montré une meilleure activité sur ce milieu. Ce résultat laisse supposer qu'en milieu LB des voies de biosynthèse particulières de la souche S13 ont été mises en œuvre conduisant à la production de molécules actives contrairement aux cultures sur les autres milieux.

L'examen de l'ensemble des résultats obtenus, a conduit à la sélection de la souche S13, pour une étude plus approfondie en considérant les performances de la souche dans la production de métabolites antimicrobiens à la fois volatils et diffusibles, ainsi que l'aspect macromorphologique qu'elle offre.

3.2 Identification génotypique de l'isolat S13 : Etude moléculaire du gène de l'ARNr 16S

L'identification moléculaire de l'isolat bactérien S13 a été achevée suite à l'amplification par PCR du gène d'ARNr 16S. L'analyse phylogénétique a été réalisée par comparaison des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S des bactéries phylogénétiquement proches dont la séquence est déposée dans les banques de données : GenBank (USA), EMBL (Europe) et DDBJ (Japon) utilisant les programmes Blast disponibles. Par la suite, ces séquences ont été analysées par le programme Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software v.4.1. pour construire l'arbre phylogénétique et déterminer l'apparenté de la souche étudiée (Figure 3.1).

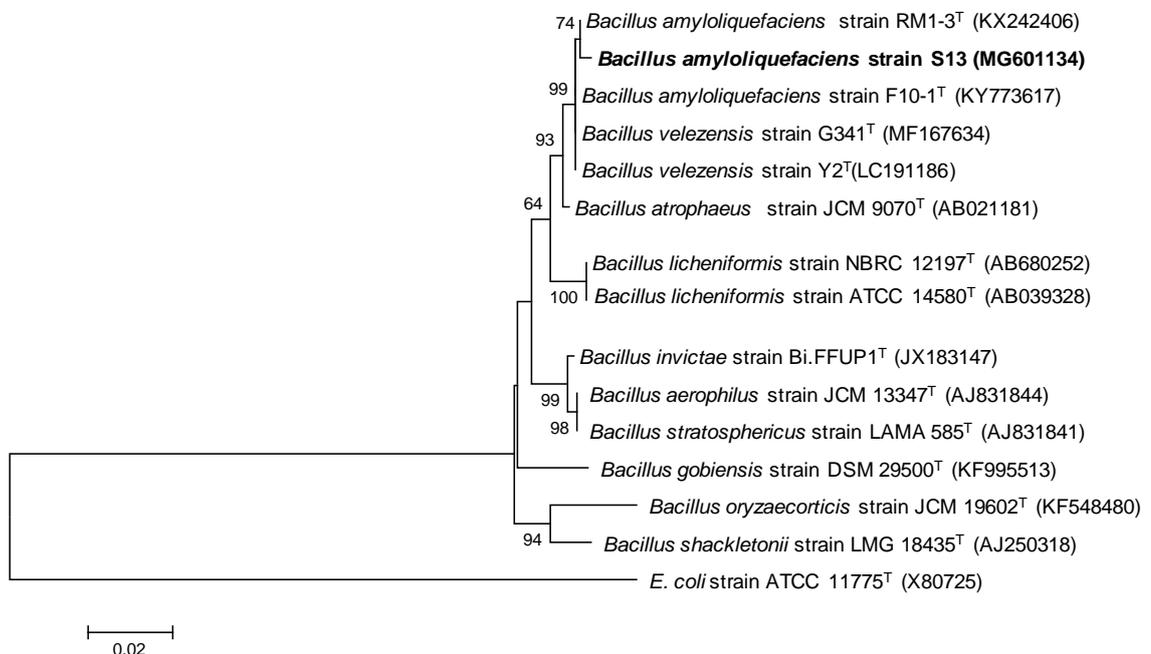


Figure 3.1 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S montrant la position de la souche S13 (n °d'accès: MG601134) dans genre *Bacillus*

Cette analyse montre que la souche S13 présente une identité très importante (99% et 74%) respectivement avec les gènes d'ARNr 16S des souches de *Bacillus* notamment celles de l'espèce *amyloliquefaciens* à savoir : souche F10-1^T de *Bacillus amyloliquefaciens* (numéro d'accèsion KY773617) et de la souche RM 1-3^T de *Bacillus amyloliquefaciens* (numéro d'accèsion KX242406). Les résultats obtenus ont fortement suggéré que cet isolat devrait être assigné en tant que souche S13 de *Bacillus amyloliquefaciens*. Un arbre phylogénétique basé sur le gène 16S rRNA a montré que les nouveaux isolats se sont regroupés avec des membres du genre *Bacillus*, le voisin le plus proche étant *Bacillus amyloliquefaciens* F10-1^T (99,9% de similitude de séquence). En se basant sur toutes ces données, il a été assigné à la bactérie ainsi sélectionnée le nom de *Bacillus amyloliquefaciens* S13.

3.3 Etude de la production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13

3.3.1 Optimisation de la production de métabolites antimicrobiens

Les productions microbiennes peuvent être améliorées par deux approches distinctes. La première vise à améliorer la production spécifique des molécules d'intérêt. La seconde s'attèle à augmenter la quantité de la biomasse produite. L'amélioration de la production spécifique de métabolites antimicrobiens par la souche *B. amyloliquefaciens* S13 a fait l'objet de cette présente investigation.

L'optimisation de la production de biomolécules nécessite le choix d'un milieu de culture adéquat. En fait, plusieurs travaux ont prouvé que l'activité antimicrobienne est étroitement liée à la nature et la composition des milieux de culture [199, 200]. De ce fait, en vue d'optimiser la production des molécules responsables des inhibitions et, de sélectionner le milieu convenable à la production d'antimicrobiens, des cultures de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 ont été réalisées sur six milieux liquides complexes à savoir : VNSS, Zobell, GN, LB, Bennett et 333.

Des précultures de la souche ont été effectuées sur les différents milieux de culture dans des Erlenmeyers de 100 mL avec un volume utile de 10 mL. Les suspensions ont été homogénéisées puis incubées à 30 °C pendant 48 h, sous une agitation de

250 rpm. Des Erlenmeyers de 500 mL avec un volume utile de 100 mL et des mêmes milieux liquides ont été inoculés par 2 mL de la pré-culture à 3 unités DO₆₀₀. L'incubation a été faite pendant 7 jours à la température adéquate et sous agitation de 250 rpm. Des prélèvements réguliers ont été réalisés et les activités antimicrobiennes ainsi que des mesures de pH ont été effectuées (Figure 3.2).

Les activités antimicrobiennes ont été mesurées par la méthode de diffusion de puits contre *B. subtilus*, *A. tumefaciens* et *S.cerevisiae*. Des suspensions de germes-cibles ont étéensemencées dans le milieu Mueller-Hinton (contenant 12 g/L d'agar) précédemment autoclavé et maintenu en surfusion (45 °C), puis coulé par la suite dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, une aliquote de 50 µL de surnageant est déposée dans le fond de chaque puits de 6 mm de diamètre préalablement réalisés. Les boîtes ont été maintenues à 4 °C pendant 4 h pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles, puis elles ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. La lecture des résultats a été faite par mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques.

A travers l'examen des résultats obtenus, nous avons constaté que, indépendamment des six milieux utilisés, la production des métabolites antimicrobiens contre les trois germes-cible débute après une phase de latence de 6 h à 8h puis elle augmente progressivement jusqu'à 36 h à 48 h, où la production atteint son maximum, s'en suit un pallier ou l'activité reste relativement constante. Toutefois, nous avons constaté que le milieu LB est le meilleur milieu de production de métabolites antimicrobiens par rapport aux autres milieux de culture en se référant aux inhibitions maximales observées chez *S. cerevisiae* (22mm), *A. tumefaciens* (18mm) et *B. subtilus* (17mm), suivi par le milieu VNSS. Cependant, Il y'a lieu de relever que les trois milieux GN, Bennet et 333, à l'exception du résultat montré précédemment, ont mené à des activités relativement proches, tandis que le milieu Zobell mène aux plus faibles activités pour les trois germes-cibles.

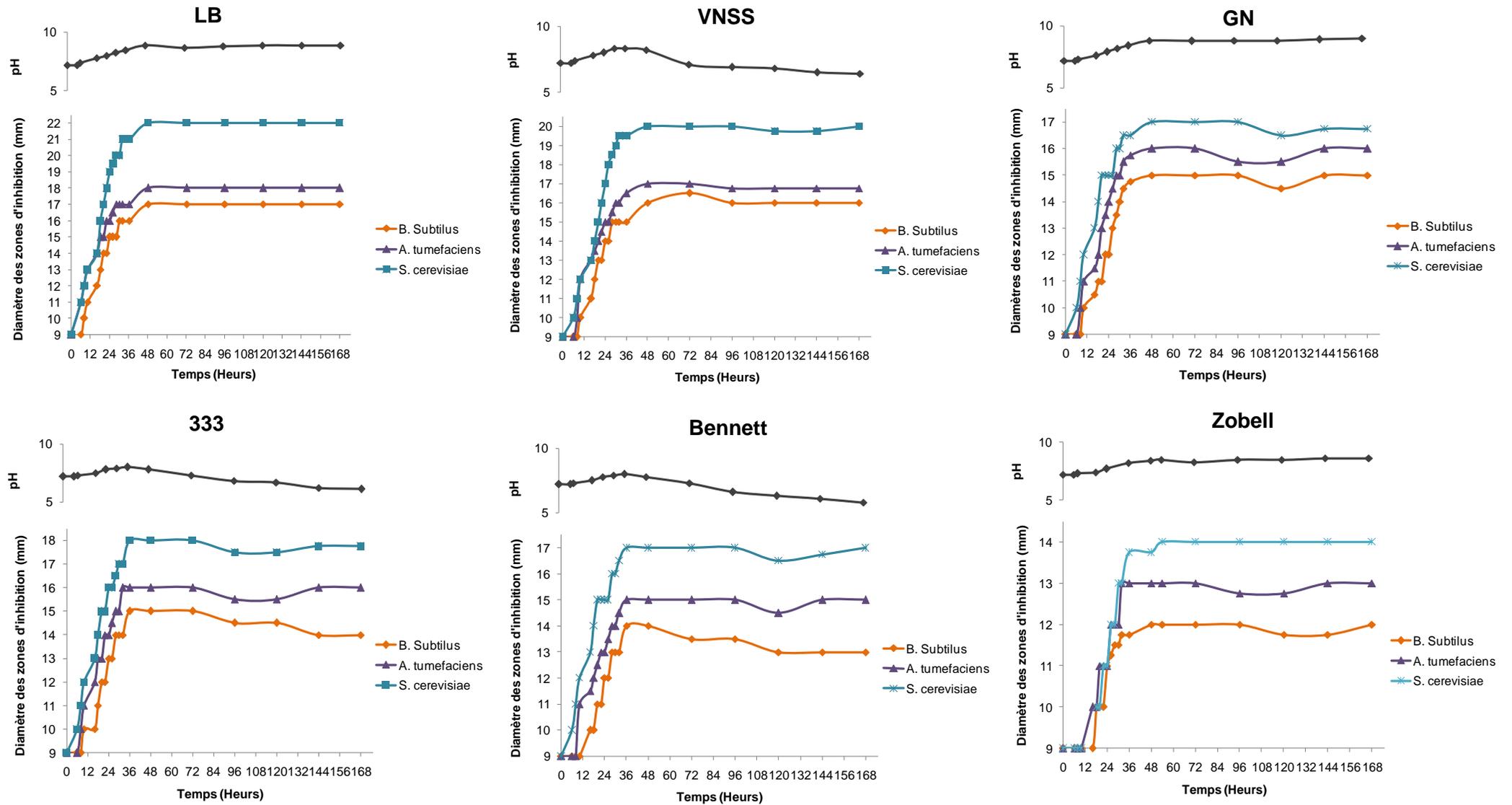


Figure. 3.2 : Cinétiques de l'évolution du pH et de production de l'activité antimicrobienne de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 contre *S. cerevisiae*, *A. tumefaciens* et *B. subtilus* dans les milieux liquides LB, VNSS, GN, 333, Bennett et Zobell

De légères variations de pH ont également été observées. Les variations de pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques [201]. L'examen des résultats (Figure 3.2) indique que le pH devient légèrement basique dans l'intervalle du temps (0-48 h) que ce soit le milieu de culture utilisé. Cette alcalinisation résulte, probablement, de la synthèse métabolique ou d'une consommation en substrat de sources azotées organiques tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure (et la peptone), qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier provoque l'augmentation du pH du milieu. Le pH reste ensuite constant dans les différents milieux LB, GN et Zobell et diminue de nouveau dans les milieux VNSS, Bennett et 333. La dégradation du glucose présent dans ces derniers milieux provoque la production de l'acide lactique qui empêche, par conséquent, une baisse de pH liée à l'accumulation de lactate.

D'une manière générale, le niveau de production des métabolites 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. Cependant, la croissance bactérienne et la production de métabolites antimicrobiens, notamment par les bactéries marines, sont principalement influencées par la concentration de NaCl dans leur milieu [202]. De ce fait, l'influence de la concentration en sel sur la croissance et la production d'antimicrobiens a été étudiée par la culture de la souche *B. amyliiquefaciens* S13 dans le milieu LB, sélectionné comme le meilleur milieu de production, en présence de différentes concentrations croissantes de chlorure de sodium (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 et 5%). Des mesures de l'activité antimicrobienne ont été réalisées lorsque la culture atteint la production maximale.

Les résultats obtenus présentés dans le tableau 3.1 confirment que le NaCl affecte le niveau de croissance et de production d'antimicrobiens. Nous constatons que l'activité diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Au vu de ces résultats, le milieu LB additionné de 15 ‰ (p/v) de NaCl a été sélectionné pour la continuité du travail entrepris. Ces résultats sont en bon accord avec ceux des études antérieures montrant que le milieu LB est le meilleur milieu de production

d'antimicrobiens [203, 204]. D'autres travaux montrent également que le NaCl est souvent nécessaire pour stimuler la production de composés antimicrobiens par les bactéries marines, et qu'une augmentation de la concentration de NaCl peut entraîner une diminution progressive des niveaux de production [205].

Tableau 3.1 : Effet de la concentration de NaCl sur la croissance et la production de métabolites antimicrobiens par *Bacillus amyloliquefaciens* S13

NaCl (g/L)	OD ₆₀₀	Diamètre d'inhibition (mm)		
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
0	4.8	14	12	11
5	5.9	18	16	14
10	7.3	22	19	18
15	8.1	25	22	20
20	7.9	23	20	19
30	7.1	20	18	16
40	5.3	16	13	12
50	4.1	12	10	9

3.3.2 Cinétique de croissance et de production des métabolites antimicrobiens

La culture de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 dans le milieu LB additionné de 15‰ NaCl a été incubée à 30 °C dans des Erlenmeyer de 500 mL avec un volume utile de 100 mL et sous une agitation de 250 rpm. Des prélèvements réguliers ont été effectués afin de déterminer la croissance bactérienne ainsi que l'activité antimicrobienne (Figure 3.3). Le suivi de production de molécules antimicrobiennes et de la croissance bactérienne de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 en fonction du temps montre que la production de molécules bioactives commence après une phase de latence de 6 h et dès le début de la phase de croissance exponentielle, puis elle évolue par la suite de façon concomitante avec la croissance bactérienne et atteint son maximum d'activité (25 mm) après 48 h de culture avec une DO à 600 nm d'environ 8,1. Ainsi, le maximum de croissance coïncide avec le maximum d'activité antimicrobienne. Au-delà de cette période, les densités optiques commencent à diminuer tandis que l'activité antagoniste reste constante. La cinétique de production antimicrobienne de cette souche s'est avérée similaire à celle publiée pour les métabolites antimicrobiens de *B. amyloliquefaciens* N 2-4 et *B. amyloliquefaciens* N 3-8 isolée du sol [206].

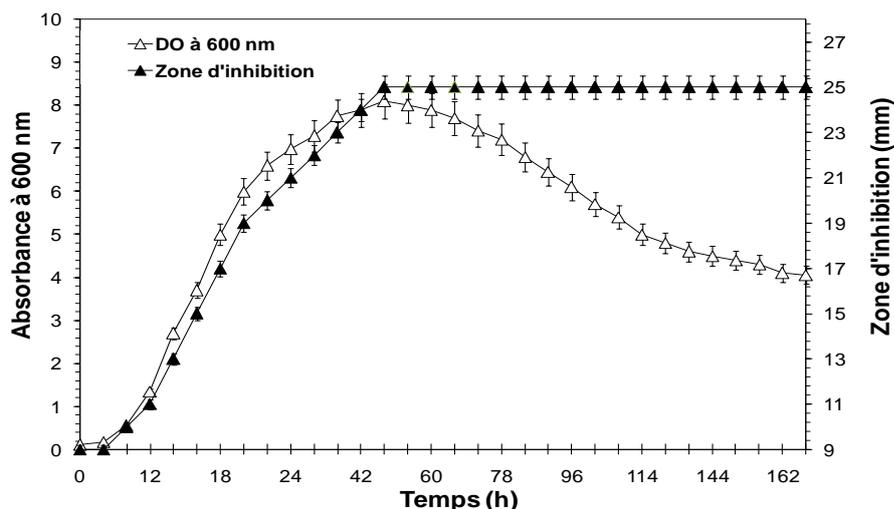


Figure 3.3 : Cinétiques de croissance bactérienne et de production de molécules antimicrobiennes de *Bacillus amyloliquefaciens* S13 contre *S. cerevisiae*

3.4 Etude des métabolites antimicrobiens volatils

3.4.1 Extraction des métabolites antimicrobiens volatils

Les conditions optimales de culture déterminées préalablement ont été appliquées pour l'extraction des métabolites antimicrobiens volatils. Les cellules bactériennes issues de la culture de 48h de la souche de *B. amyloliquefaciens* S13 dans le milieu LB additionné de 15‰ NaCl ont été éliminées par centrifugation à 9000 × g pendant 30 min. Le surnageant ainsi récupéré, contenant l'activité antimicrobienne extracellulaire a été clarifié par filtration, puis soumis à une hydrodistillation en utilisant un appareil Clevenger. Les produits volatils ont été récupérés par extraction liquide-liquide avec l'éther di-éthylique et séchés avec du sulfate de sodium.

3.4.2 Etude de la composition chimique de la fraction volatile

L'analyse a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) sur un chromatographe de type HP-6800 couplé à un spectromètre de masse HP MSD 5973. La séparation a été réalisée sur une colonne de type HP-5MS (250 µm × 30 m × 0.25 µm avec 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane) utilisée en mode Split (1/90). Le programme de température varie de 90 °C (5 min) jusqu'à 250 °C (10 min) à raison de 3 °C/min. L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée en utilisant le mode d'ionisation par impact électronique (EI) à 70 EV.

L'identification des différents produits a été effectuée en se basant sur les banques de données spectrales : Wiely 7n, NIST, NBS75k, Mass Finder 3 et FFNSC: Flavor and Fragrance Natural et Synthetic Compounds, ainsi que sur la comparaison de leurs indices de rétention (Indices de Kovats) déterminés avec une série d'alcanes standard (C7-C28) injectés dans les mêmes conditions opératoires. Une identification plus poussée des composés a été réalisée en comparant leurs spectres de masse avec ceux rapportés par la littérature concernant les mêmes composés obtenus par synthèse organique ou isolés à partir d'une source naturelle.

L'analyse de la fraction volatile par CG/SM a permis l'identification de quarante-sept composés correspondant à 94,94% de la composition chimique globale. Le tableau 3.2 rassemble les constituants de la fraction volatile avec l'ordre d'élution, le temps de rétention, les valeurs des indices de rétention (calculés et rapportés par la littérature), les banques de données SM utilisées ainsi que la teneur de chaque constituant. L'examen du tableau 3.2 révèle la présence de composés volatils appartenant à plusieurs classes chimiques: terpénoïdes, phénols, hydrocarbures et leurs dérivés et autres constituants diversement fonctionnalisés. Les principaux composés volatils identifiés sont: oxyde de 13-epi-manoyle (29,39%), manool (17,39%), 15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one (13,17%), labda-8(17),13Z-dien-15-ol (9,51%) et oxyde de 3 α -acetoxy-13 epimanoyle (5,26%) appartenant à la classe des diterpènes de type labdane. Cette large gamme de composés diterpéniques dérivent de squelettes à 20 atomes de carbone, sont issus du métabolisme du géranyl-géranylpyrophosphate (GGPP) par cyclisation catalysée par des diterpènes synthases (diTPS) [207]. Ils comprennent un squelette bicyclique basique caractéristique lié à une chaîne supplémentaire à six carbones, qui peut être ouverte ou fermée (cyclique ou acyclique) par un atome d'oxygène, comme dans le cas de l'oxyde de manoyle et ses dérivés [208].

D'autres composés appartenant à la même classe chimique ont également été identifiés dans la composition globale, avec des teneurs plus au moins faibles, à savoir : acétate de manoyle (1,93%), l'oxyde de 3 α -hydroxy-13-epi-manoyle (1,87%), labda-8(17),13E-dien-15-al (0,88%), (13S)-dinorlabdane,8,13:13,20-diepoxy (0,43%), labdadiene (0,35 %) et labd-7,13-dien-15-ol (0,29%).

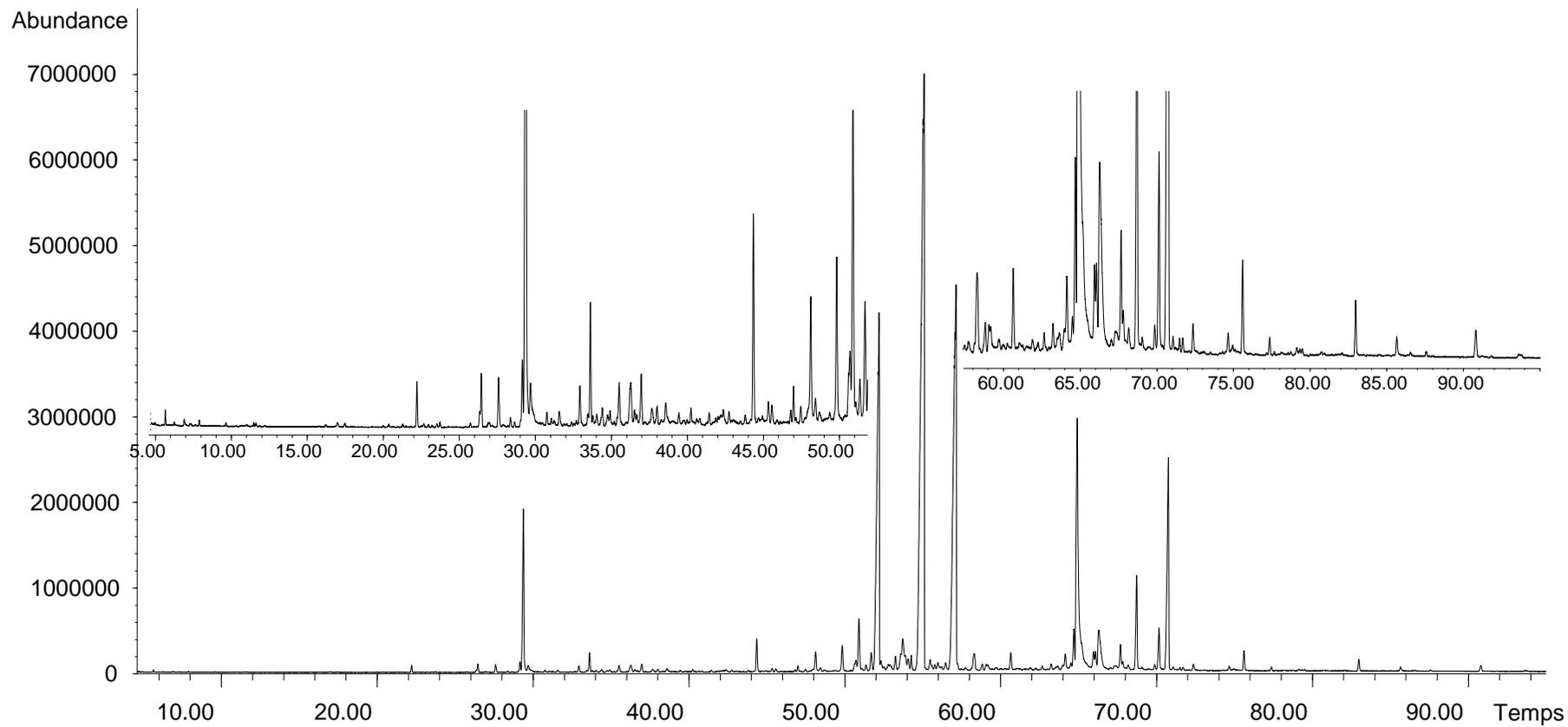


Figure 3.4 : Profil chromatographique de la fraction volatile de *Bacillus amyloliquefaciens* S13

Cependant, il y a lieu de noter que l'identification et la différenciation de certains constituants par analyse CG/SM est parfois délicate, particulièrement pour les molécules structurellement très proches (ie : stéréoisomères). Dans ce contexte, l'oxyde de 13-épi-manoyle et l'oxyde de manoyle, deux labdanes diterpéniques, ont des spectres de masses identiques et des indices de rétention très proches, leur identification a été confirmée par les travaux de *C. Demetzos et al.* [209] consacrés à la différenciation des épimères d'oxydes de manoyle en utilisant l'analyse CG/SM appuyée par la spectroscopie RMN avec l'emploi des réactifs de déplacement chiraux.

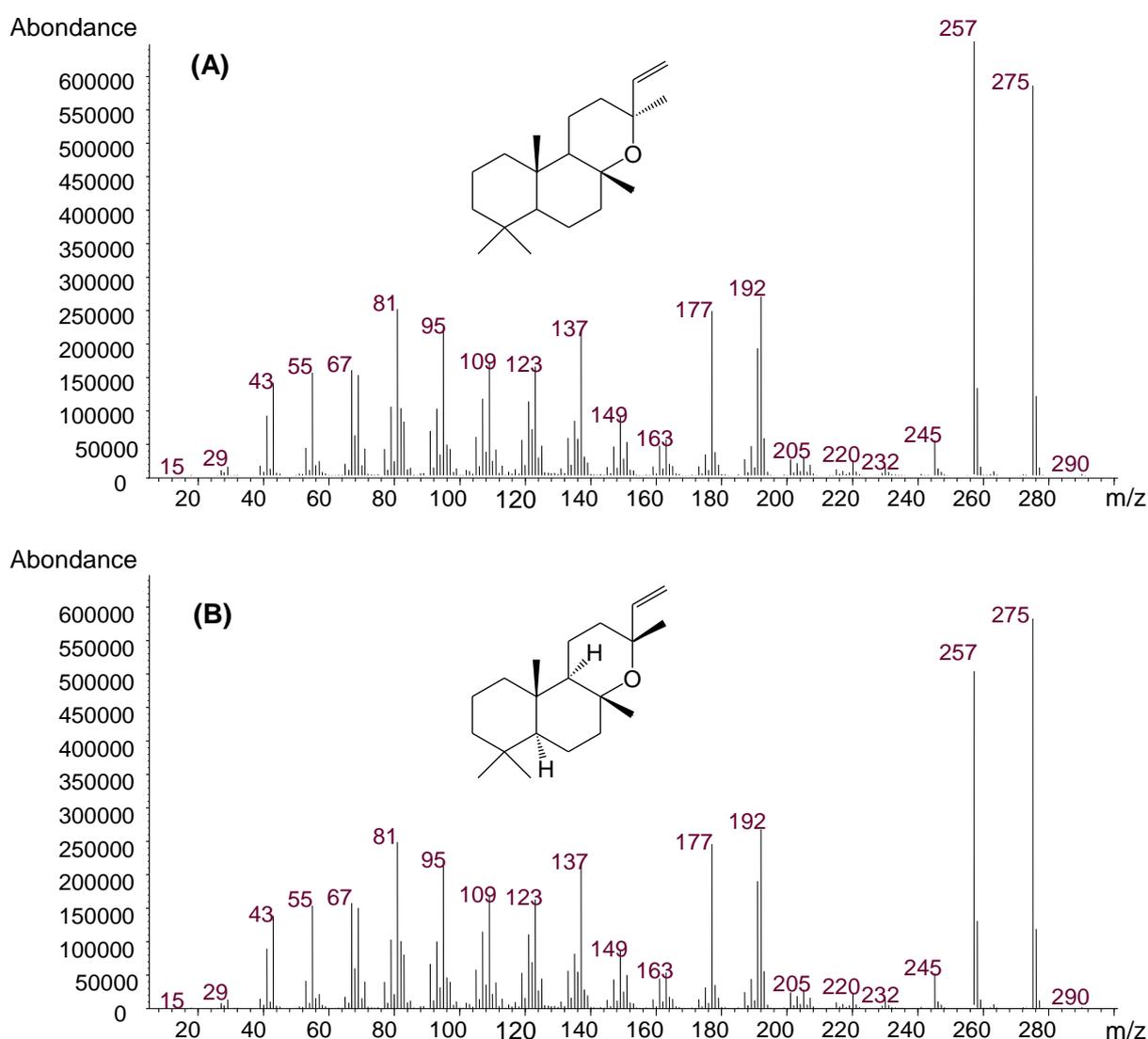


Figure 3.5 Spectres de masse de (A) l'oxyde de 13-épi-manoyle et de (B) l'oxyde de manoyle, montrant la différence des intensités relatives des pics caractéristiques à $m/z=275$ et $m/z=257$

La stéréochimie des deux épimères a été déterminée à partir de la différence des intensités relatives des pics caractéristiques à $m/z=275$ et $m/z=257$ (Figure 3.5). Par conséquent, le rapport d'intensités des signaux m/z 275/257 de l'oxyde de 13-epi-manoyle est inférieur à celui de l'oxyde de manoyle. Ces résultats sont en outre utiles pour la caractérisation structurale des dérivés d'oxydes de manoyle. De même, le manool est un composé qui a un spectre de masse superposable à celui de son stéréoisomère 13-epi-manool. Il a été identifié sur la base des banques de données spectrales Wiely 7n, NIST, NBS75k, Mass Finder 3 et FFNSC. Son identification a été rendue possible également grâce à son indice de rétention (ADAMS). Toutefois, la différenciation entre les deux épimères reste délicate et l'utilisation de plusieurs méthodes d'analyse complémentaires s'avère nécessaire.

L'identification du composé 42 a été achevée par l'analyse de son spectre de masse. Le composé a été identifié selon son mécanisme de fragmentation (Figure 3.6) comme étant le « **acétate de manoyle** » de formule brute $C_{22}H_{36}O_2$ correspondant à une masse molaire de $332 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Le spectre de masse révèle la présence de signaux caractéristiques du manool (clairement identifiés par: Wiely 7n, NBS75k, Mass Finder 3 et FFNSC). La fragmentation du composé permet d'observer un pic de masse à $m/z=332$ avec une intensité relativement faible et un pic à $m/z=272$ correspondant à M-60 (AcOH) qui indique la présence d'un groupement acétate. Elle a permis également de noter la présence d'un pic très important à $m/z=43$ correspondant au départ d'un groupement acyle (CH_3CO).

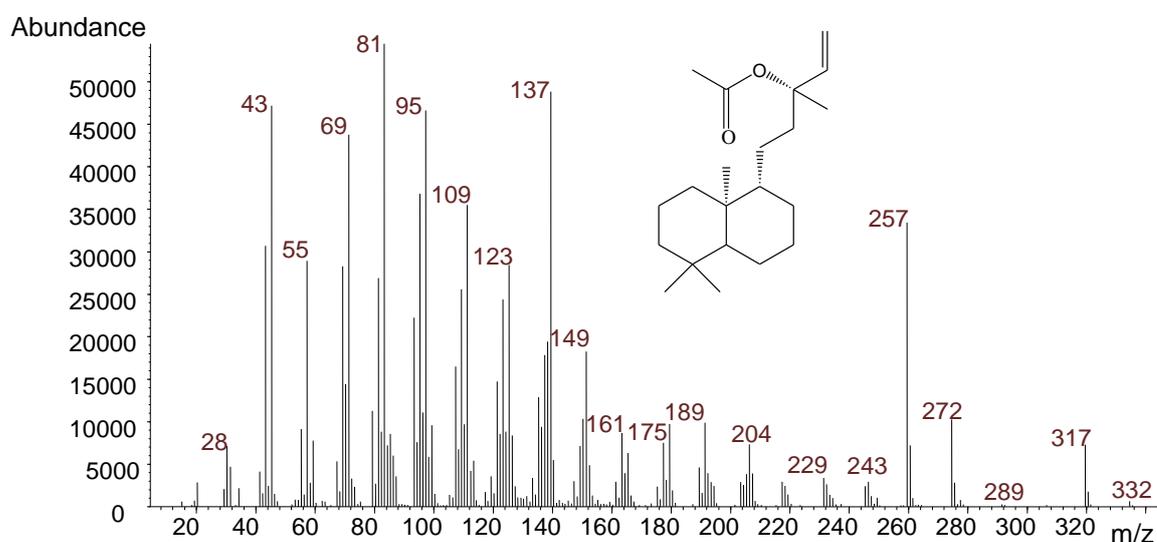


Figure 3.6 : Fragmentation par impact électronique du composé 42

Il y a lieu de noter que la grande majorité des diterpénoïdes, ont été biosynthétisés par de nombreux organismes terrestres et marins et de champignons [210, 211]. Cependant, une fraction relativement mineure de ces métabolites largement répandus a été identifiée chez les procaryotes [212]. En fait, jusqu'à présent, un seul diterpène de type labdane a été décrit à partir de microorganismes, il s'agit bien de la pénioxalicine « 3-nor-2,3-seco-labdane » isolé de la souche *Penicillium oxalicum* TW01-1 [213]. En outre, en se référant à la base de données de composés organiques volatils microbiens (mVOC), disponible en ligne (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc>) et sur les données de la littérature, **les diterpènes de type labdane n'ont jamais été rapportés**, jusqu'à présent, comme composés organiques volatils microbiens. Ce résultat a été expliqué dans la littérature par la faible volatilité relative des diterpènes (C20) par rapport aux monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15) et leurs dérivés [100].

Dans notre cas, la présence de produits diterpéniques dans la fraction volatile est fort probablement due aux conditions expérimentales du processus d'hydrodistillation. En effet, le débit de vapeur relativement élevé, imposé par une puissance de chauffe importante (environ 100 °C), combiné à une durée d'entraînement à la vapeur d'eau relativement longue (2 heures) ont probablement faciliter l'entraînement de la fraction des diterpènes, ce qui montre de façon claire l'importance du choix de la technique d'extraction à utiliser dans le domaine des produits volatils microbiens, pour cibler l'obtention préférentielle de certaines familles structurales de composés. Il convient de mentionner que les méthodes utilisées pour extraction de métabolites volatils à partir de bactéries ont une grande influence sur la qualité et la quantité des produits obtenus. Les produits volatils émis pendant la période de croissance, qui se produisent typiquement sous forme d'un mélange complexe de composés de bas poids moléculaire, sont particulièrement différents de ceux obtenus par distillation à la vapeur après la période de croissance [214]. D'autre part, l'apparition des produits diterpéniques peut cependant être attribuée au métabolisme spécifique de la bactérie ou aux voies métaboliques actives dans la bactérie.

D'autres composés représentant différentes classes chimiques ont également été identifiés dans la composition globale de la fraction volatile. Contrairement à la classe des diterpènes, ces diverses classes de composés sont presque tous biosynthétisés par d'autres micro-organismes. Les composés appartenant à la classe des hydrocarbures et leurs dérivés, y compris les alcanes saturés et insaturés, les cétones et les aldéhydes, probablement dérivés de la voie de biosynthèse des acides gras [104], ont été fréquemment métabolisés par des microorganismes terrestres et marins [215, 216]. Cependant, le 2,4-di-tert-butylphénol a été spécifiquement produit par des micro-organismes marins, et il a été considéré comme un métabolite produit par des bactéries marines [217]. En plus des hydrocarbures et de phénols, la fraction volatile renferme aussi une série de produits sesquiterpéniques caractérisés par une teneur relativement faible. Les métabolites de type sesquiterpènes comprennent des composés organiques volatils biosynthétisés par des terpènes cyclases qui guident la cyclisation des produits à 15 carbones [218]. Ces composés ont été rencontrés fréquemment dans le règne des végétaux terrestres. Cependant, un certain nombre d'entre eux ont également été décrits dans les bactéries et les champignons [219, 220]. Pour la classe des monoterpènes, le limonène est le seul monoterpène hydrocarboné identifié dans la fraction volatile. Il a été trouvé dans plus de 300 huiles essentielles végétales provenant d'espèces très diverses, dont l'orange, le citron, la menthe et le sapin [221]. Toutefois, le limonène a été naturellement présent à l'état de trace dans l'espace de tête des microorganismes [222].

Tableau 3.2 : Composition chimique de la fraction volatile de *B. amyloliquefaciens* S13

N°.	Composés	t _R (min)	Méthodes d'identification			Contenu relatif (%)
			KI ^a _(cal)	KI ^b _(Lit)	Spectre de masse ^c	
01	Limonène	5.65	1031	1029	DB1, DB2	t
02	n-Nonanal	7.88	1106	1107	DB1, DB2	t
03	Camphre	9.63	1148	1149	DB1, DB2	t
04	1-Dodécène	11.46	1191	1191	DB1, DB2	t
05	α-Terpinéol	11.60	1195	1195	DB1, DB2	t
06	1-Tetradécène	22.20	1392	1392	DB1, DB2	0.11
07	Caryophyllène	23.70	1419	1424	DB1, DB2, DB4	t
08	2,6-bis (1,1-diméthyléthyl)-2,5-cyclohexadiène-1,4-dione	26.48	1467	1469	DB1, DB2	0.18
09	2,4-di-tert-butylphenol	29.37	1517	1513	DB1, DB2	3.14
10	δ-Cadinène	29.67	1523	1522	DB1, DB3	0.25
11	α-Calacorène	30.73	1542	1544	DB1, DB3, DB4	t
12	Oxyde de Caryophyllène	32.92	1580	1583	DB1, DB3	0.14
13	Hexadécène	33.62	1593	1589	DB1, DB2	0.34
14	Muurolo-4,10(14)-dien-1β-ol	35.51	1627	1630	[223]	0.17
15	epi-α-Cadinol	36.21	1640	1640	DB1, DB3, DB4	0.09
16	T-Muurolol	36.23	1641	1644	DB1, DB3	0.11
17	α- Muurolol	36.49	1647	1651	DB1, DB3, DB4	t
18	α-Cadinol	36.96	1654	1654	DB1, DB3	0.18
19	Cadalène	38.02	1673	1676	DB1, DB3	0.06
20	1-Octadécène	44.34	1793	1793	DB1, DB2	0.63
21	6, 10, 14-Triméthyl-2-pentadécane	46.98	1846	1840	DB1, DB2	0.09
22	Isopimara-9(11),15-diene	49.82	1903	1905	DB1, DB3, DB4	0.59
23	7,9-di-tert-Butyl-1 oxaspiro(4,5) deca-6,9-diene-2,8-dione	50.71	1921	1929	DB1, DB2	0.39
24	Pimara-8,15-diene	50.89	1925	/	DB1, DB2, DB3	1.15
25	ent-pimara-8(14),15-diene	51.37	1935	1942	DB1, DB3, DB4	0.14

26	15,16-dinorlabdane,8,13:13,20-diepoxy-(13S)-	51.67	1942	/	DB1, DB2	0.43
27	15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one	52.17	1952	1954	DB1, DB2	13.17
28	Oxyde de Manool	53.71	1984	1989	DB1, DB3, DB4	1.76
29	Eicosene	54.25	1995	2000	DB1, DB2, DB4	0.27
30	Oxyde de epi-13-manoyle	55.06	2010	2009	DB1, DB2	29.39
31	Kaur-16-ene	55.70	2026	2015	DB1, DB2	0.12
32	(E,E)-Géranyl linalool	55.90	2032	2027	DB1, DB3, DB4	0.11
33	Manool	7.11	2058	2057	DB1, DB2, DB3, DB4	17.39
34	NI	60.64	2136	/	/	0.35
35	Labda-8(17),13E-dien-15-al	64.69	2230	/	DB1, DB2	0.88
36	Labda-8(17),13Z-dien-15-ol	64.90	2235	/	DB1, DB2	9.51
37	Ribenol	66.28	2268	2270	[224,225]	1.87
38	Labd-7,13-dien-15-ol	67.25	2292	2293	DB1, DB3, DB4	0.29
39	Tricosane	67.67	2302	2300	DB1, DB2	0.56
40	Octadecyl-propanoate	67.75	2304	2305	DB1, DB4	0.11
41	Méthyl 8-piramen-18-oate	68.09	2314	2306	DB1, DB3, DB4	0.14
42	Acétate de Manoyle	68.71	2326	/	/	1.93
43	9-(Z)-Octadécènamide	70.15	2362	/	DB1, DB2	2.86
44	Oxyde de 3 α -Acetoxy-13-epimanoyle	70.74	2376	2387	[224,225]	5.26
45	Pentacosane	75.52	2500	2500	DB1, DB2	0.38
46	Heptacosane	82.97	2700	2700	DB1, DB2	0.24
47	n-Nonacosane	90.71	2900	2900	DB1, DB2	0.16
						94.94

t = Trace (pourcentage inférieur à 0.05%)

NI = Composé non identifié

a. KI (cal) : Indices de rétention linéaire déterminés avec une série d'alcane standards (C7-C28) sur la colonne capillaire HP-5.

b. KI (Lit): Indices de rétention rapporté par la littérature [223].

c. Spectre de masse : Les composés sont identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des références (bases de données MS: Wiley 7N (DB1), NBS 75K (DB2), Mass Finder 3 (DB3) et FFNSC (DB4)). Tous les composés sont identifiés par au moins deux bases de données avec des taux de similarité élevés (> 98%).

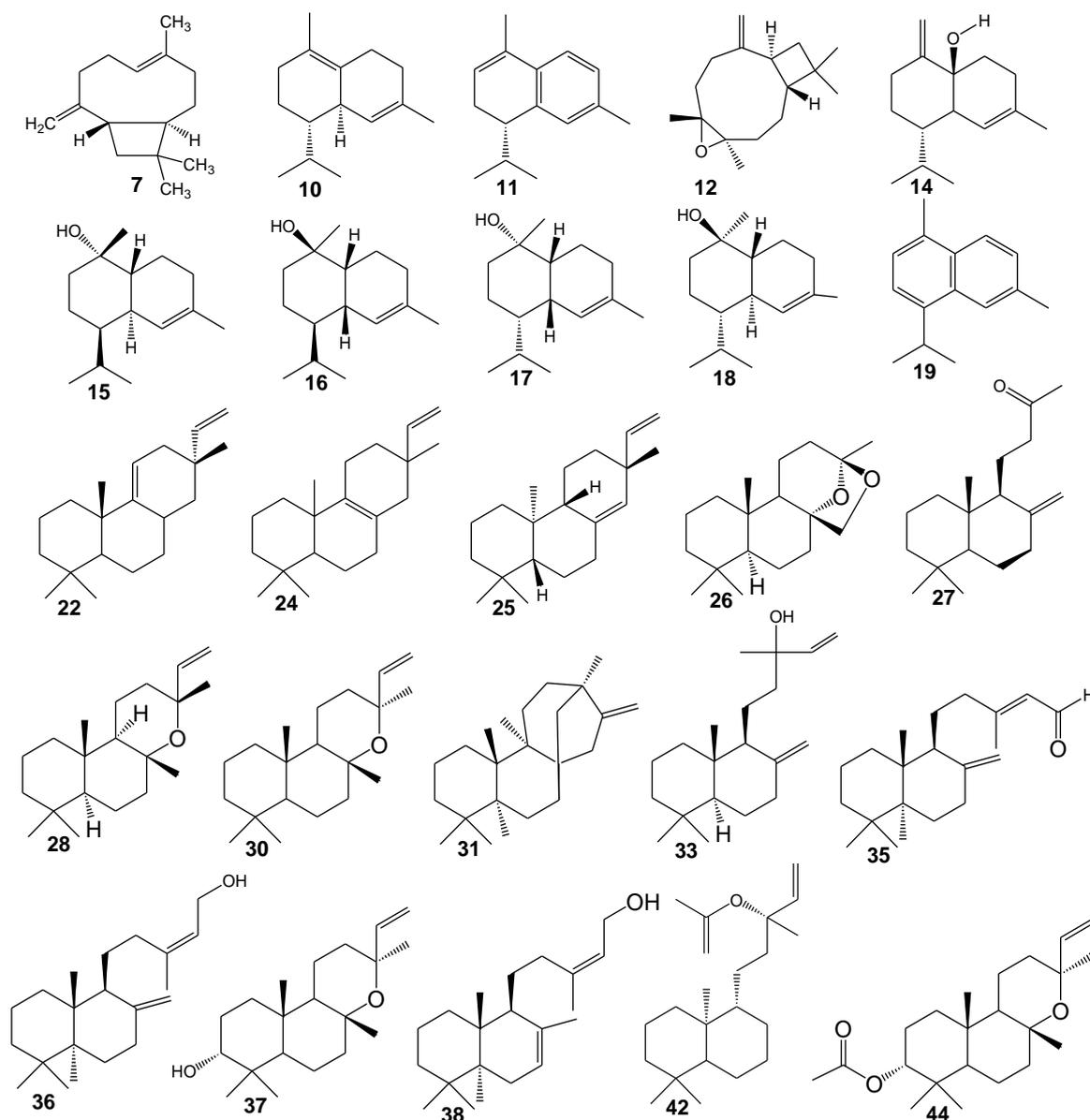


Figure 3.7 : Structure chimiques des principaux produits identifiés dans la fraction volatile de *Bacillus amyloliquefacience* S13

3.4.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne de la fraction volatile

a. Méthode de diffusion sur agar

L'activité antimicrobienne a été évaluée qualitativement par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Des disques absorbants de 6 mm de diamètre ont été imprégnés d'une quantité de 50 μL de la fraction volatile (10 mg/mL) puis séchés à l'aide d'un séchoir. Après stérilisation sous UV (254 nm) durant 45 min, les disques ont été déposés à la surface des géloses (Mueller Hinton pour les bactéries, et Sabouraud

pour les levures et champignons) inoculées avec chaque germe-cible préalablement calibré à 10^7 UFC.mL⁻¹. De même, des disques contenant du méthanol et des antibiotiques (chloramphénicol et kétoconazole) ont été déposés à la surface des géloses et utilisés tant que contrôles de croissance négatif et positif respectivement. Les boîtes de pétri ont été maintenues à 4 °C pendant 4 h afin de permettre une bonne diffusion et inhiber momentanément la croissance du germe-cible, puis incubées à 37 °C/24h pour les bactéries et les levures, et 26 °C/48h pour les champignons. Chaque essai a été réalisé en triplicata et la lecture des résultats a été effectuée par mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques.

b. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne via la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CIM) a été réalisée avec la méthode de dilution en bouillon, en utilisant les milieux Mueller-Hinton pour les bactéries et Saboureaud pour les levures et champignons. La détermination des CMI a été, toutefois, étudiée que pour les germes qui ont présenté une sensibilité envers la fraction volatile dans l'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne. Une série de dilution de la fraction volatile a été introduite aseptiquement, ainsi que les contrôles de croissance positif et négatif, dans différents tubes à essai. Chaque tube à essai a été ensuite inoculé avec une suspension microbienne préalablement calibré à 10^7 UFC.mL⁻¹. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les tubes à essai ont été incubés à 37 °C/24h pour les bactéries et 26 °C/48h pour les levures et champignons. La croissance des germes-cibles a été détectée par densité optique à 600 nm et la CMI a été déterminée en considérant la concentration minimale qui inhibe totalement la croissance des germes.

c. Résultats et discussion

La capacité antimicrobienne de la fraction volatile a été évaluée qualitativement et quantitativement, par rapport à celle du chloramphénicol et du kétoconazole, par la méthode de diffusion sur gélose ainsi que par la détermination des valeurs de la CIM. Les résultats obtenus (Tableau 3.3) montrent que la fraction volatile présente des activités antimicrobiennes à des degrés variables contre des différents germes testés.

Tableau 3.3 : Activité antimicrobienne de la fraction volatile de *Bacillus amyloliquefaciens* S13 exprimée en diamètres des zones d'inhibition et de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

	Fraction volatile		Chloramphenicol		Ketoconazole	
	DZI	CMI	DZI	CMI	DZI	CMI
Bactéries à Gam-positif						
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14110 ^T	14 ± 0.47	100 ± 0.5	25 ± 0.52	0.625 ± 0.6	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 ^T	18 ± 0.8	128 ± 0.4	23 ± 0.71	0.625 ± 0.4	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14975 ^T	12 ± 0.6	>500	14 ± 0.9	2.5 ± 0.8	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^T	11 ± 0.31	>500	23 ± 0.6	5 ± 0.5	-	-
Bactéries à Gam-negatif						
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 23308 ^T	20 ± 0.5	128 ± 0.6	24 ± 0.4	5 ± 0.9	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ^T	10 ± 0.62	> 500	21 ± 0.5	80 ± 0.7	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> CIP 8039 ^T	Na	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43300 ^T	Na	-	-	-	-	-
Levures et champignon						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 ^T	24 ± 0.3	64 ± 0.5	-	-	18 ± 0.2	5 ± 0.9
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023 ^T	11 ± 0.47	>500	-	-	24 ± 0.7	0.3125 ± 0.6
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 ^T	13 ± 0.9	256 ± 0.3	-	-	16 ± 0.5	10 ± 0.3

IZD: Diamètre de la zone d'inhibition (mm) dans la méthode de diffusion sur disque; CMI: Concentration minimale inhibitrice (µg/mL). Les déterminations ont été effectuées en triplicata et les données correspondent à la moyenne ± écart type.

Dans un premier temps, le potentiel antimicrobien de la fraction volatile a été évalué par diffusion sur gélose contre toutes les souches bactériennes décrites, à une concentration de 10 mg/mL. Les résultats relatifs aux essais antimicrobiens obtenus (Tableau 3.3) indiquent une résistance particulière des bactéries à Gram négatif *S. typhimurium* et *E. coli*. Les résultats indiquent également la présence d'une forte activité contre *S. cerevisiae*, *B. subtilis* et *A. tumefaciens*, une activité modérée contre *M. luteus*, *B. cereus*, *A. Brasiliensis* et une faible activité contre *S. aureus*, *C. albicans* et *P. aeruginosa*. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été par la suite déterminées pour les germes qui ont présenté une sensibilité envers la fraction volatile à savoir toutes les souches bactériennes décrites à l'exception de *S. typhimurium* et *E. coli*.

L'examen de l'ensemble des résultats obtenus indique que *S. cerevisiae* est le microorganisme le plus sensible considérant sa zone d'inhibition la plus élevée ($24 \pm 0,3$ mm) et sa valeur de CIM la plus faible ($64 \mu\text{g/mL}$), suivie par *A. tumefaciens* ($20 \pm 0,5$ mm; $128 \mu\text{g/mL}$) et *B. subtilis* ($18 \pm 0,8$ mm, CMI = $128 \mu\text{g/mL}$). Quant à *P. aeruginosa*, il a été considéré comme le microorganisme le moins sensible ($10 \pm 0,62$ mm, CMI > 500 mg/mL). En fait, selon plusieurs auteurs, cette bactérie ainsi que la majorité des bactéries à Gram négatif semblent être les moins sensibles à l'action de nombreux huiles essentielles et fractions volatiles [226, 227]. Cependant, nous avons noté que la bactérie à Gram négatif *A. tumefaciens* a montré une sensibilité remarquable vis-à-vis de la fraction volatile de *B. amyloliquefaciens* S13. Ce résultat est intéressant au regard de la résistance que manifeste cette bactérie envers de nombreux antibiotiques.

De nombreuses études ont montré que les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et de fractions volatiles sont étroitement liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires [228]. De ce fait, les activités antimicrobiennes obtenues dans la présente étude pourraient être probablement liées à la présence de diterpénoïdes. Des travaux de recherche antérieurs ont suggéré qu'un certain nombre d'activités biologiques ont été répertoriées pour les diterpènes, particulièrement, pour les diterpènes de type labdane. Certains de ces composés ont ainsi révélé des activités antibactériennes et anti-fongiques,

notamment les composés de diterpènes contenant un squelette type oxyde de 13-épi-manoyle [229]. Ce dernier, considéré comme le composé majoritaire de la fraction volatile, s'est avéré être un puissant agent antimicrobien [230]. Son dérivé hydroxylé en position C-3, l'oxyde de 3-hydroxy-13-épi-manoyle (ribénol), également identifié parmi les composés majoritaires, a été décrit pour ses activités antibactériennes remarquables [231, 232].

Plusieurs travaux de recherche ont tenté d'identifier les composés responsables des activités antimicrobiennes [233, 234, 235]. Il a été noté que les molécules oxygénées qui entrent dans la composition des fractions volatiles sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées [236]. Ceci est lié à la présence de groupements hydroxyles, connus pour leur solubilité dans l'eau et par conséquent leur forte capacité à accéder aux cellules microbiennes et à pénétrer les parois des cellules bactériennes et fongiques [237]. Les effets antimicrobiens sont également liés à la présence de groupements hydrophobes (lipophiles). Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires des cellules microbiennes, assurant ainsi leur solubilisation dans la bicouche lipidique. De ce fait, l'activité des molécules oxygénées des fractions volatiles dépend à la fois du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels [238, 239]. De même, les travaux de recherche menés par *A. Urzúa et al.* [240] ont indiqué que les caractéristiques structurelles qui favorisent les activités antibactériennes efficaces des diterpènes de type labdane comprennent une structure lipophile qui permet l'insertion dans la membrane cellulaire et, un groupe donneur de liaison hydrogène (groupe hydrophile) qui favorise les interactions avec les groupes phospholipides membranaires.

En outre, l'activité antimicrobienne pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à l'état de trace. Ces derniers peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique. Il convient de noter que certains travaux antérieurs ont indiqué que le potentiel antimicrobien de plusieurs composés organiques volatils microbiens a été attribué à la présence de sesquiterpènes, tels que l'oxyde de caryophyllène,

α - Muurolol et α -Cadinol [241]. Bien que leur teneur soit faible dans notre fraction volatile, ce qui pourrait induire un faible pouvoir antimicrobien, leur présence combinée à d'autres métabolites pourrait être à l'origine d'un effet de synergie conférant à la fraction volatile un fort pouvoir antimicrobien.

3.5 Etude des métabolites antimicrobiens diffusibles

3.5.1 Extraction des métabolites antimicrobiens diffusibles

En se basant sur les résultats de la cinétique de production, la culture de 48h de la souche de *B. amyloliquefaciens* S13 dans le milieu LB additionné de 15% NaCl a été centrifugée à 9000 \times g pendant 30 min. Les cellules bactériennes et le surnageant de culture ainsi récupérés ont été soumis à deux méthodes d'extraction. La première méthode, principalement destinée à l'extraction des métabolites antimicrobiens extracellulaires issus de surnageant de culture a été effectuée en utilisant 4 solvants de polarité croissante à savoir : n-hexane, dichlorométhane, n-butanol et acétate d'éthyle. Les phases organiques ainsi récupérées ont été séchées sur du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. Les solvants ont été ensuite évaporés et les extraits bruts récupérés ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C pour les analyses ultérieures. La deuxième méthode, destinée à l'extraction des métabolites antimicrobiens intracellulaires (restés internes aux cellules bactériennes), le culos bactérien récupéré a été lavé plusieurs fois à l'eau distillée par centrifugation, égoutté puis extrait par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:2 ; v/v) dans un bain à ultrasons pendant 10 min. Le mélange obtenu a été filtré puis évaporé afin d'obtenir un extrait brut.

Afin de sélectionner la nature des métabolites antimicrobiens (extra ou intracellulaires) ainsi que le meilleur solvant d'extraction pour la suite du travail, les différents extraits obtenus ont été testés par antibiographie, contre les germes-cibles les plus sensibles utilisés lors de la cinétique, en utilisant la méthode des disques. Pour ce faire, des disques absorbants de 6 mm de diamètre ont été imprégnés par 50 μL d'extraits à tester, et séchés. Après stérilisation sous UV (254 nm) pendant 45 min, les disques ont été déposés à la surface des milieux (Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) préalablement coulés dans des boîtes de Pétri et inoculés par le germe-cible. Les boîtes ont été mises à 4 °C

pendant 4 h, puis incubées à 37 °C pendant 24h. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 3.4 : Test d'antibiographie des extraits de *Bacillus amyloliquefaciens* S13

Extraits	Zone d'inhibition de la croissance du germe-cible (mm)		
	<i>B. subtilus</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Extrait intracellulaire	Na	Na	Na
Extraits Extracellulaires			
<i>n</i> -Hexane	10	10	11
Dichlorométhane	16	17	19
<i>n</i> -Butanol	12	12	13
Acétate d'éthyle	20	22	26

L'examen du tableau 3.4 montre que l'extrait obtenu par le culos bactérien n'a présenté aucune activité, tandis que les extraits organiques du surnageant de culture ont révélé des activités antimicrobiennes envers tous les germes-cibles avec des diamètres d'inhibition allant de 10 à 26 mm. Toutefois, l'acétate d'éthyle s'est révélé être le meilleur solvant d'extraction qui a permis l'obtention des plus importants halos d'inhibition, suivi par le dichlorométhane et le n-butanol et à un degré moindre le n-hexane. Il est judicieux de comparer la composition chimique de ces quatre extraits afin de tenter d'identifier les molécules potentiellement responsables de l'activité et qui seraient absentes ou en plus faible concentration dans les extraits de culture obtenu avec n-butanol et le n-hexane.

3.5.2 Etude de la composition chimique des extraits de *Bacillus amyloliquefaciens*

3.5.2.1 Profilage chimique des extraits par CLHP/DAD-UV

Le profilage chimique des extraits bruts obtenus à partir de la souche bactérienne *B. amyloliquefaciens* S13 par les différents solvants d'extraction: dichlorométhane, n-butanol et acétate d'éthyle a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance muni d'un détecteur UV à barrettes de diodes (CLHP/DAD-UV).

Les profils chromatographiques par CLHP analytique à polarité de phase inversée des extraits bruts (Figure 3.9) ont été obtenus avec un gradient d'éluant MeCN/H₂O (20-60% pendant 30 min, 100% pendant 10 min) à un débit de 1 mL/min et un

volume d'injection de 10 μ L en utilisant une chaîne chromatographique Agilent 1100, composée d'un injecteur automatique (G1313A), d'un four (G1316A), d'une pompe (G1312A), d'un dégazeur (G1379A), et d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes (G1315B).

L'examen de la figure 3.8 révèle que les profils chromatographiques des extraits de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle sont relativement semblables. Cependant, la zone des deux chromatogrammes (zone 1) entre 10 et 16 min montrent la présence de six pics élués aux temps de rétention ($t_{R1}= 10,44$ min, $t_{R2}=11,07$ min, $t_{R3}=12,51$ min, $t_{R4}=13,59$ min, $t_{R5}=14,98$ min $t_{R6}=15,77$ min) dans l'extrait dichlorométhane, alors que, seulement un pic élué à un temps de rétention $t_{R1}=15,77$ min a été observé dans le cas de l'extrait acétate d'éthyle. En outre, la zone 2 correspondant à des temps de rétention s'étalant de 16 à 27 min, montre la présence de huit pics élués au même temps de rétention dans les deux extraits ($t_{R7}=16,77$ min, $t_{R8}=17,14$ min, $t_{R9}=17,98$ min, $t_{R10}=18,28$ min, $t_{R11}=19,81$ min, $t_{R12}=21,93$ min, $t_{R13}=24,60$ min et $t_{R14}=26,00$ min), qui probablement se trouvent en concentration plus importante dans l'extrait acétate d'éthyle que dans l'extrait dichlorométhane. Cependant, nous constatons également l'apparition de deux autres pics dans l'extrait acétate d'éthyle avec des intensités relatives importantes, et qui sont totalement absents dans l'extrait dichlorométhane à des temps de rétention $t_{R8}=19,06$ min et $t_{R9}=21,31$ min.

La comparaison des chromatogrammes des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle avec celui du n-butanol, nous a permis de repérer la même série de pics avec les mêmes temps de rétention, cependant avec des intensités relatives nettement plus faibles, ce qui peut être interprété par une teneur de métabolites plus faible dans l'extrait n-butanol. Ce résultat est en bon accord avec le résultat obtenu dans le test d'antibiographie des différents extraits, montrant que les extraits de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle ce sont révélés être les plus actifs par rapport à l'extrait n-butanol.

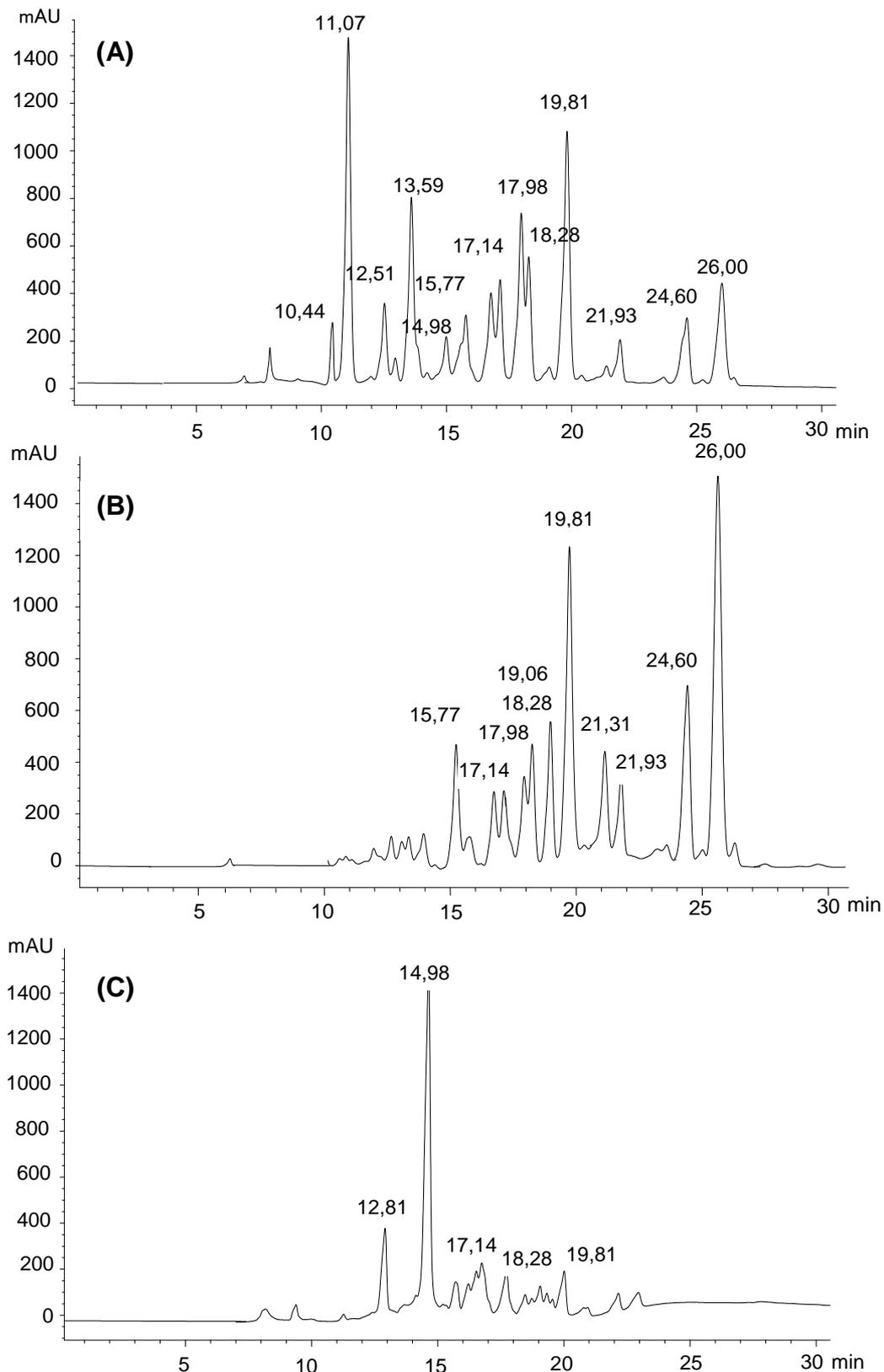


Figure 3.8 : Comparaison des profils CLHP des extraits obtenus à partir de *Bacillus amyloliquefaciens* S13 par dichlorométhane (A), acétate d'éthyle (B) et n-butanol (C)

3.5.2.2 Identification des métabolites par CL/ESI-SMHR

Les analyses CL/ESI-SMHR des extraits bruts obtenus avec le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle ont été effectuées par le système CLHP couplé à un spectromètre de masse Thermo LTQ Orbitrap dans les conditions suivantes : le voltage et la température appliqués au capillaire sont, respectivement, de 45V et de 260°C, débit de gaz auxiliaire de 10-20 unités arbitraires, le débit du gaz séchant est de 40-50 unités arbitraires, le voltage de l'ESI est de 4,5 kV, et la plage de masse est de 100-2000 amu (Résolution maximale de 30000). La séparation a été réalisée sur une colonne analytique à polarité de phase inverse (Sunfire : 5µm 4.6 mm × 150 mm) en utilisant un gradient d'élution MeOH dans l'H₂O (0-100% pendant 30 min, 100% pendant 10 min) à un débit de 1 mL/min.

Les tentatives d'identification des différents constituants chimiques des extraits a été réalisée en se basant sur les bases de données : Antibase 12.0, Antimarine 11.0, Dictionary of Natural products et Dictionary of Marine Natural products, et les résultats sont rassemblées dans les tableaux 3.5 et 3.6. L'examen de ces tableaux montre que la composition chimique de l'extrait obtenu avec le dichlorométhane renferme une série d'acides aminés dominée par la proline et une série de dipeptides cycliques de la famille de 2,5-dicétopipérazines (DKP) dont les principaux composés sont : cyclo-(L-proline-L-valine), cyclo-(L-proline-L-leucine), cyclo-(L-proline-L-isoleucine), cyclo-(L-valine-L-Isoleucyl) et cyclo-(L-proline-L-phenylalanine). Cependant, la composition chimique de l'extrait acétate d'éthyle est caractérisée par l'absence de la série d'acides aminés et par la présence de la même série de dipeptides cycliques présentes dans l'extrait dichlorométhane. Elle renferme en outre le 3-(hydroxyacétyl) indole et deux autres dicétopipérazines le cyclo-(L-Leucine-L-Tyrosine) et le cyclo-(L-isoleucine-L-isoleucine).

Cette identification basée sur les banques de données pourrait présenter certaines insuffisances notamment au niveau de l'identification des isomères. Une étude structurale par RMN mono- et bidiimensionnelle aurait été judicieuse, mais assez couteuse pour être dispensée à des composés déjà élucidés et rapportés par la littérature. Actuellement nous assistons à la mise en place d'un nombre de nouvelles banques de données de spectrométrie de masse (payante et gratuite) construite sur la base d'une technologie de plus en plus développée avec l'appui de l'outil

informatique notamment dans le domaine de la déconvolution des spectres [242]. Les banques de données sont devenues alors un outil très précieux, efficace et performant dans l'identification d'une manière générale et notamment dans le criblage à haut débit.

Tableau 3.5 : Analyse CL/ESI-SMHR des composés extraits de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 avec le dichlorométhane

N°	t _R (min)	m/z de [M+H] ⁺	Formule moléculaire	Composé suggéré
01	0.65	116,13126	C ₅ H ₉ NO ₂	Proline
02	1.17	132,17425	C ₆ H ₁₃ NO ₂	Leucine
03	1.77	132,17328	C ₆ H ₁₃ NO ₂	Isoleucine
04	2.62	166,19960	C ₉ H ₁₁ NO ₂	Phénylalanine
05	3.48	197.12968	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-valine)
06	4.11	181.09824	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	Antibiotique SF-2771
07	4.67	211.14558	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-leucine)
08	5.06	211.14558	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-isoleucine)
09	5.40	245.12971	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-phénylalanine)
10	5.74	245.12971	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	cyclo-(D-proline-D-phénylalanine)
11	6.04	213.16089	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₂	cyclo-(L-valine-L-Isoleucyl)
12	6.76	247.14539	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-valine-L-phenylalanine)
13	7.19	227.17676	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	cyclo-(L-isoleucine-L-isoleucine)
14	7.36	227.17676	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	cyclo-(L-leucine-L-leucine)
15	7.58	261.16107	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	cyclo-(L-leucine-L-phenylalanine)
16	8.30	295.14536	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-phenylalanine-L-phenylalanine)

Tableau 3.6 : Analyse CL/ESI-SMHR des composés extraits de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 avec l'acétate d'éthyle

N°	t _R (min)	m/z de [M+H] ⁺	Formule moléculaire	Composé suggéré
01	2.93	188.07185	C ₁₁ H ₉ NO ₂	3-(hydroxyacétyl) indole
02	3.44	197.12961	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-valine)
03	4.10	181.09824	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	Antibiotique SF-2771
04	4.55	277.15585	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₃	cyclo-(L-Leucine-L-Tyrosine)
05	4.63	211.14542	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-leucine)
06	5.02	211.14558	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-isoleucine)
07	5.40	245.12971	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	cyclo-(L-proline-L-phénylalanine)
08	5.74	245.12971	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	cyclo-(D-proline-D-phénylalanine)
09	6.08	213.16089	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₂	cyclo-(L-valine-L-Isoleucyl)
10	6.73	247.14539	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-valine-L-phenylalanine)
11	7.15	227.17676	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	cyclo-(L-isoleucine-L-isoleucine)
12	7.37	227.17676	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	cyclo-(L-leucine-L-leucine)
13	7.62	261.16107	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	cyclo-(L-leucine-L-phenylalanine)
14	8.30	295.14536	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₂	cyclo-(L-phenylalanine-L-phenylalanine)

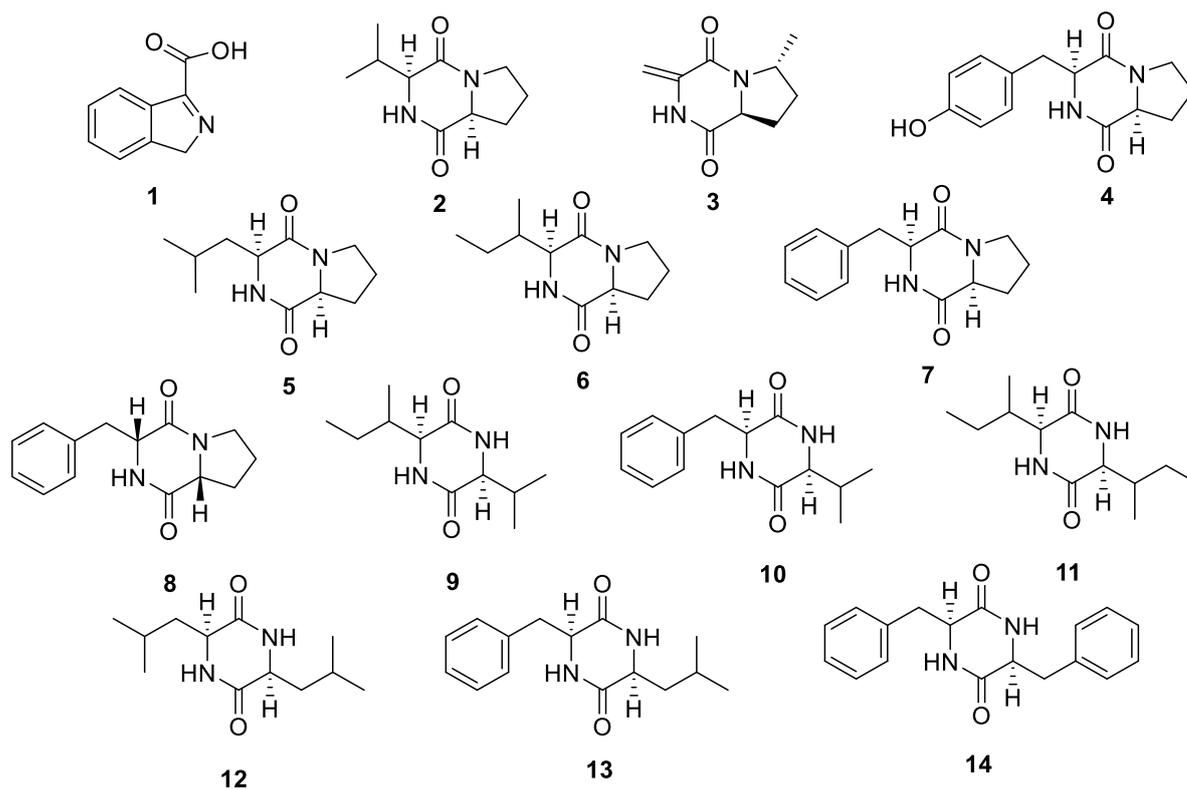


Figure 3.9 : Composés extraits de *Bacillus amyloliquefaciens* S13 avec l'acétate d'éthyle

3.5.3 Discussion des résultats

La recherche de nouvelles molécules à partir de microorganismes comporte de nombreuses étapes que sont le criblage d'activité biologique, la sélection des souches à étudier, la culture, l'extraction, l'isolement et la purification des composés suivis de leur élucidation structurale. Cependant, au regard de l'importance d'un tel processus de recherche et, d'autre part, du nombre de molécules déjà décrites pour les bactéries terrestres ou marines, l'un des défis de la recherche de nouvelles molécules actives est la mise en place, à travers l'utilisation des techniques de couplage, d'un criblage à haut débit afin d'identifier la présence de métabolites déjà décrits dans la littérature. Cette méthodologie permettrait de sélectionner des souches et des extraits bactériens présentant un intérêt certain en termes de nouveaux métabolites et d'activités biologiques. Cette démarche correspond au processus de déréplication qui vise à analyser structurellement des mélanges complexes avec peu ou sans purification au préalable. Une telle démarche doit permettre d'obtenir une estimation rapide de la composition chimique d'un échantillon.

L'objectif de cette partie est de réaliser une déréplication des extraits de culture de la souche *B. amyloliquefaciens* S13, obtenus par les différents solvants d'extraction afin d'évaluer leur potentiel en termes de nouveauté chimique par la détermination de la composition chimique de ces extraits et son lien avec l'activité biologique observée.

La déréplication des extraits de culture de *B. amyloliquefaciens* S13 montre que la bactérie privilège essentiellement le métabolisme des composés dipeptidiques cycliques de la famille de 2,5-dicétopipérazines (DKP). Comme nous l'avons décrit précédemment, la composition chimique de l'extrait obtenu avec le dichlorométhane renferme en plus de la série de dipeptidique cycliques, une série d'acides aminés. La composition chimique de l'extrait de l'acétate d'éthyle est caractérisée par l'absence de la série d'acides aminés et par la présence de la même série de dipeptides cycliques rencontrée dans l'extrait dichlorométhane, de plus de la présence du 3-(hydroxyacétyl) indole et deux autres dicétopipérazines le cyclo-(L-Leucine,L-Tyrosine) et le cyclo-(L-isoleucine-L-isoleucine). Ce résultat est en parfait accord avec le résultat obtenu dans le profilage chimique des extraits par CLHP/DAD-UV ainsi que dans le test d'antibiographie montrant que l'acétate d'éthyle s'est révélé être le meilleur solvant d'extraction. En fait, les cyclodipeptides et leurs dérivés, les dicétopipérazines (DKP), constituent une large classe de métabolites secondaires, essentiellement synthétisés par des microorganismes bien connus pour leurs activités biologiques remarquables, notamment des activités antibactériennes et antifongiques [243, 244, 245]. De ce fait, l'activité observée pour l'extrait acétate d'éthyle pourrait être liée à la présence de dicétopipérazines, et leur présence combinée avec les acides aminés dans l'extrait dichlorométhane peut être à l'origine d'un effet antagoniste lui conférant un pouvoir antimicrobien moins fort par rapport à l'extrait acétate d'éthyle.

Bien qu'un fort potentiel de production de métabolites secondaires ait été mis en évidence, l'approche que nous avons privilégiée n'a pas permis d'aboutir des composés bioactifs originaux. Afin de pouvoir atteindre cet objectif, le point clef réside dans l'utilisation des approches OMICS différentes. Une méthodologie, nommée l'approche « OSMAC » (One Strain-Many Compounds), permet

d'améliorer l'investigation de la diversité de composés qui peuvent être produits par une même souche de microorganisme [246]. Cette approche représente un outil puissant pour élucider le métabolisme secondaire global chez un microorganisme donné. Cette méthodologie recommande de faire varier systématiquement différents paramètres de cultures (composition des milieux, aération, température, pH, addition d'inhibiteurs d'enzymes etc) afin d'augmenter le nombre de métabolites secondaires disponibles à partir d'une même source microbienne. Les variations de conditions de culture permettraient, de stimuler ou d'activer des voies de biosynthèse différentes augmentant ainsi la diversité métabolique d'une souche et les possibilités d'obtenir des composés originaux. Par conséquent, de très petits changements dans les conditions de culture peuvent engendrer des modifications du profil métabolique d'une souche microbienne.

L'ensemble des résultats obtenus dans la première partie de ce chapitre est présenté dans la publication n°1 parue dans le journal *Essential Oil Research* et dont le titre est : Identification of antimicrobial volatile compounds produced by the marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 newly isolated from brown alga *Zonaria tournefortii*.

CHAPITRE 4

PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PROTEASES KERATINOLITQUES PRODUITES PAR *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* S13

4.1 Criblage de souches productrices de protéases kératinolytiques

4.1.1 Criblage de souches productrices de protéases kératinolytiques en milieu solide

L'évaluation des activités kératinolytiques en milieu solide de trente souches bactériennes nouvellement isolées à partir de l'algue *Zonaria tournefortii* a été effectuée en utilisant deux méthodes complémentaires visant à mettre en évidence, d'un point de vu global, la dégradation des caséines du lait, et la dégradation des kératines des plumes. De ce fait, les trente isolats bactériens ont été examinés, dans un premier temps, pour une éventuelle activité protéolytique en utilisant une méthode simple et pratique, largement utilisée dans les programmes de criblage pour des souches microbiennes productrices d'enzymes [247]. Elle repose sur l'ensemencement des souches bactériennes sur gélose nutritive au lait (GNL), un milieu solide contenant un substrat protéique, notamment la caséine, utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires. Après incubation à 30 °C, les boites de Pétriensemencées sont examinées tous les 24 h. Ce test qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases sécrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les caséines du lait ce qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. Les rapports des diamètres du l'halo par rapport aux diamètres des colonies (dh/dc) permettent un classement préliminaire des souches isolées. Au total, sur trente souches bactériennes criblées, neuf (9) souches productrices de protéases présentant les plus importants halos à savoir S01, S03, S09, S13, S14, S16, S18, S21 et S29, se sont montrés plus intéressantes. Au regard des travaux antérieurs portant sur le potentiel des souches producteur d'enzymes protéolytiques, il s'avère clairement que nos résultats sont très appréciables [248, 249].

Ce test primaire a été suivi par la recherche des souches bactériennes productrices de protéases à activités kératinolytiques. Pour ce faire, les neuf souches bactériennes précédemment sélectionnées entant que meilleures souches productrices de protéases ont été testés pour leur capacité à hydrolyser la kératine des plumes par ensemencement sur gélose nutritive à base de farine de plumes (GNFP). Après incubation à 30 °C, quatre souches bactériennes S01, S13, S14 et S21 qui peuvent dégrader la kératine de plumes s'avèrent les plus intéressantes.

Tableau 4.1 : Activités protéolytiques et kératinolytiques sur milieux solides des souches bactériennes nouvellement isolées

Souches	Activité protéolytique (dh/dc)			Activité kératinolytique (dh/dc)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
S01	2,4	3,8	4,6	2,6	4,1	4,9
S03	1,7	1,9	2,5	-	-	-
S09	1,5	1,7	2,1	-	-	-
S13	3,1	4,5	6,3	3,6	4,8	6,7
S14	2,8	4,3	5,4	3,0	4,6	5,6
S16	1,8	2,1	2,7	-	-	-
S18	2,1	2,6	3,1	-	-	-
S21	1,9	2,3	2,9	2,3	2,7	3,1
S29	1,4	1,6	2,1	-	-	-

4.1.2 Criblage de souches productrices de protéases kératinolytiques en milieu liquide

4.1.2.1 Dosage de l'activité protéolitique

L'activité protéolytique des différentes souches retenues a été déterminée par la mise en évidence d'hydrolyse enzymatique de la kératine permettant la libération d'acides aminés aromatiques détectés sous UV à 280 nm. L'activité est mesurée dans le surnageant, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloracétique (TCA 20%) selon la méthode décrite par Peterson avec quelques modifications [250].

Un prélèvement de 0,5 mL de la solution enzymatique préalablement diluée a été mélangé à 0,5 mL d'une solution de kératine (1% p/v) dans un tampon désiré. Le mélange a été mis en incubation pendant 15 min à une température appropriée. La réaction a été ensuite arrêtée par addition de 0,5 mL d'acide trichloroacétique permettant la précipitation de la kératine non hydrolysée. Le milieu réactionnel a été incubé à la température ambiante pendant 15 min et les protéines précipitées ont

été éliminées ensuite par centrifugation à 10000 xg. La matière soluble dans l'acide a été estimée à 280 nm.

Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/mL/min. Une courbe d'étalonnage (0-100 µg/mL) de tyrosine a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales à partir de laquelle nous avons déduit que 1 µg/mL de tyrosine correspond à une DO 280 nm de 0,0055. L'activité protéolytique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité protéolytique (U/mL)} = \frac{DO \times D \times d}{t \times 0,0055}$$

DO: Densité optique;

D: Dilution de l'enzyme;

d: Dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel;

t : Temps de la réaction en minute.

4.1.2.2 Production des protéases kératinolytiques des souches sélectionnées en milieu liquide

En vue d'évaluer les niveaux de production de protéases kératinolytiques et de vérifier la capacité d'hydrolyser les protéines en milieu liquide, les souches bactériennes précédemment sélectionnées ont été cultivées à un pH initial de 7,4 dans un milieu initial à base de CaCl₂ (1 g/L); K₂HPO₄ (0,5 g/L); KH₂PO₄ (0,5 g/L) et NaCl (5g/L), additionné de la farine de plume de poulet (10 g/L) comme substrat carboné et de l'extrait de soja (2 g/L) comme source d'azote. Les cultures des différentes souches ont été réalisées dans des erlenmeyers de 500 mL avec un volume utile de 100 mL. Les dosages d'activité ont été effectués après chaque 24h d'incubation à 30 °C sous une agitation de 200 rpm. L'absorbance à 600 nm et le pH final, lorsque la culture atteint la production maximale de chaque souche, ont été également évalués. L'ensemble des résultats est regroupé dans le tableau 4.2. L'analyse des résultats montre que les souches sélectionnées poussent bien sur le milieu de culture utilisé et elles présentent des pH et des niveaux de production de kératinases variables.

En effet, l'activité kératinolytique des préparations enzymatiques est de 3000, 2000, 800 et 400 U/mL pour les souches S13, S14, S01 et S21, respectivement. Toutefois, les deux souches S13 et S14 présentant des niveaux de production plus élevés ont été retenues pour une étude plus approfondie.

Tableau 4.2 : Niveaux de production des protéases kératinolytiques par les souches bactériennes sélectionnées

Souches	Biomasse (DO 600nm)	pH final	Activité		
			24h	48h	72h
S01	6,1	7,0	380	800	410
S13	7,1	7,2	1600	3000	1780
S14	6,5	6,9	2000	1710	1320
S21	5,4	7,6	400	260	137

4.1.3 Caractérisation physicochimiques des préparations enzymatiques

La caractérisation biochimique du surnageant de culture d'une souche productrice d'une activité enzymatique d'intérêt donne une idée sur l'applicabilité de cette activité dans le secteur choisi et permet aussi de donner des indications relatives à la méthodologie et les conditions à suivre pour la purification.

Ainsi, les deux souches bactériennes les plus actives ont été soumises à une méthodologie de criblage soustractif basée sur la détermination de certaines caractéristiques biochimiques des surnageants de culture, à savoir, la température optimale d'action et le pH optimum de fonctionnement ainsi que l'effet de certains ions métalliques permettant de sélectionner la candidate la plus intéressante pour une éventuelle application en traitement du cuir.

Étude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité des préparations enzymatiques

L'activité des deux préparations enzymatiques a été déterminée à des pH allant de 3 à 13 à une température de 50 °C, en utilisant les tampons suivants à des concentrations de 100 mM : glycine-HCl pour les pH 3 à 5, acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique (MES) pour les pH 5 à 6, acide 4-(2- hydroxy éthyl)-1-piperazine éthane sulfonique (HEPES) pour les pH 6 à 8, Tris-HCl pour les pH 8 à 9, glycine-NaOH pour les pH 9 à 11, bicarbonate-NaOH pour les pH 11 à 11,5, Na₂HPO₄-

NaOH pour les pH 11,5 à 12 et KCl-NaOH pour les pH 12 à 13. Les activités relatives, comparées aux activités optimales de chaque souche, sont portées sur le tableau 4.3.

Les résultats montrent que la préparation kératinolytique de la souche S13 est active dans une large gamme de pH qui s'étend de 6,5 à 11, avec un optimum d'activité (100%) à pH 8 et une activité relative de 98% à pH 6,5. Cependant, la souche S14 secrète une ou plusieurs enzymes actives possédant un pH optimum de fonctionnement basique de 10 et ne conserve que la moitié de son activité dans un domaine de pH plus étroit (8 à 10). Par ailleurs, les deux préparations enzymatiques sont quasiment stables dans une gamme de pH variant de 6 à 12, et montre des activités relatives de l'ordre de 100% à pH 8 pour la souche S13 contre 80% pour la souche S14.

Tableau 4.3 : Activités relatives des préparations enzymatiques des deux souches bactériennes retenues en fonction du pH

Souches	Activité relative (%) en fonction du pH										
	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	10	11	12	13
S13	70	98	85	80	100	95	90	87	80	55	20
S14	12	25	40	55	80	85	96	100	65	35	15

Étude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité des préparations enzymatiques

En vue d'étudier l'effet de la température sur l'activité des préparations enzymatiques, les réactions d'hydrolyse ont été réalisées en faisant varier la température de 30 à 80 °C en maintenant le pH à des valeurs optimales de chaque préparation enzymatique. La thermostabilité a été également étudiée après pré-incubation pendant 1h à différentes températures. Les activités résiduelles ont été mesurées dans les conditions optimales de pH et de température, et les enzymes non pré-incubées ont été considérées comme témoins (100%).

Les résultats présentés dans le tableau 4.4 montrent que les deux préparations enzymatiques présentent un maximum d'activité à 50 °C. Cependant, la souche S13 produit des enzymes qui semblent être les plus intéressantes puisqu'elles sont actives dans une large gamme de température allant de 40 à 70 °C, avec une

activité relative de 94 % à 40 °C. Alors que, l'enzyme issue de la souche S14 garde uniquement 35 et 20% d'activité à 40 et 70 °C respectivement. Par ailleurs, l'étude de la stabilité thermique montre qu'après 1h d'incubation à 40 °C, les deux préparations enzymatiques demeurent pratiquement stables avec 100% d'activité résiduelle. La préparation enzymatique issue de la souche S13 garde 100% de son activité à 50 et 60 °C, alors que celle de la souche S14 conserve 35 % de son activité à 50 °C et s'annule après 1 h de pré-incubation à 60 °C.

Tableau 4.4 : Activités relatives des préparations enzymatiques des deux souches bactériennes retenues en fonction de la température

Souches	Activité relative (%) en fonction de la température					
	30	40	50	60	70	80
S13	60	94	100	90	60	35
S14	20	35	100	60	20	0

Étude de l'effet des ions métalliques sur l'activité des préparations enzymatiques

L'activité kératinolytique a été testée dans les conditions optimales de pH et de température de chaque préparation enzymatique en absence et en présence de 5 mM d'ions métalliques bivalents : Ca^{2+} (CaCl_2), Mg^{2+} (MgSO_4), Zn^{2+} (ZnSO_4), Co^{2+} (CoSO_4), Fe^{2+} (FeSO_4), Mn^{2+} (MnSO_4), Ba^{2+} (BaCl_2), Cu^{2+} (CuSO_4), Ni^{+2} (NiCl_2), Cd^{2+} (CdCl_2) et Hg^{2+} (HgCl_2). Les extraits enzymatiques incubés en absence d'ions métalliques ont été considérés comme témoins. Les résultats présentés dans le tableau 4.5 montrent qu'une forte augmentation de l'activité kératinolytique de la souche S13 a été provoquée en présence des ions Ca^{2+} et Mn^{2+} avec des activités relatives de 230 % et 280 %, respectivement. Cependant, l'activité a été fortement inhibée par Cu^{2+} , Ba^{2+} et Zn^{2+} et non affectée par la présence de Co^{2+} et Fe^{2+} . Quant à la souche S14, l'activité de la préparation enzymatique, n'a pas été affectée par la présence de Co^{2+} et Fe^{2+} , et les activités sont de l'ordre de 101 % et 102 %, respectivement. Cependant, elle a été considérablement activée par l'ion Ca^{2+} et inhibée par les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} .

Tableau 4.5 : Effets des ions métalliques sur l'activité des préparations enzymatiques

Ions métalliques	Activité kératinase résiduelle (%)	
	S13	S14
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	230	220
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	180	160
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	15	10
Co ²⁺ (CoCl ₂)	101	101
Fe ²⁺ (FeCl ₂)	101	102
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	280	90
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	35	88
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	10	20
Ni ²⁺ (NiCl ₂), Cd ²⁺ (CdCl ₂), Hg ²⁺ (HgCl ₂)	0,0	0,0

4.1.4 Discussion des résultats

L'étude entreprise dans le cadre de la présente partie s'attèle sur le criblage de nouvelles souches bactériennes productrices de protéases kératinolytiques d'intérêt biotechnologique, qui pourraient être impliquées dans les opérations de transformation des peaux brutes en cuirs ainsi que la valorisation des ressources locales riches en kératines, principalement les plumes de volailles.

La première étape consiste en un criblage des souches productrices d'enzymes protéolytique sur GNL. Ce test qualitatif a permis de sélectionner neuf souches productrices de protéases présentant les plus importants halos à savoir S01, S03, S09, S13, S14, S16, S18, S21 et S29. Il s'ensuit par la détection de l'activité kératinolytique sur milieu solide réalisée sur GNFP. En fait, lorsque la kératinase produite par les souches est sécrétée dans le milieu, la kératine présente autour de la colonie se dégrade et des halos transparents se sont formés. Tenant compte de cette condition, quatre souches bactériennes S01, S13, S14 et S21 présentant des halos de dégradation de la farine de plumes de diamètres significatifs ont été sélectionnées. Ces souches produiraient donc une ou plusieurs activités kératinolytiques capables de dégrader plus au moins efficacement la farine de plumes.

Ce premier criblage de souches productrices d'enzymes kératinolytiques en milieu solide constitue une étape préliminaire et indispensable, où les isolats sont examinés pour une éventuelle activité enzymatique. Cependant, les résultats obtenus sont surtout d'ordre qualitatif puisqu'ils indiquent seulement la présence ou l'absence de l'activité kératinolytique. Par conséquent, ce criblage primaire a été suivi par la recherche des souches bactériennes productrices d'enzymes kératinolytiques en milieu liquide, lequel est plus pratique pour l'extraction et la purification des enzymes en vue de leur caractérisation. L'ensemble de nos résultats, suggère que les quatre souches retenues S01, S13, S14 et S21 sont susceptibles de produire une ou plusieurs protéases kératinolytiques. Cependant, notre choix a porté sur les deux souches S13 et S14 dont les niveaux de croissance bactérienne et de production des enzymes kératinolytiques sur milieu liquide est très intéressant comparativement aux autres souches. Nous nous sommes intéressé par la suite à déterminer certaines caractéristiques biochimiques des surnageants de culture, à savoir, la température optimale d'action et le pH optimum de fonctionnement ainsi que l'effet de certains ions métalliques, afin de choisir la bonne candidate pour la suite de notre travail.

Au regard des caractéristiques biochimiques, la souche S13 s'avère très intéressante car le surnageant de culture de la souche est stable et actif, à la fois dans une large gamme de pH et de température, ce qui présente l'avantage de pouvoir être utilisé dans de nombreuses applications industrielles, en comparaison avec la souche S14 qui est active dans un domaine restreint. Plusieurs travaux réalisés ont démontré que les paramètres étudiés influencent sensiblement la croissance bactérienne et la production des protéases kératinolytiques [251, 252]. En outre, plusieurs travaux ont montré que l'activité enzymatique de certaines kératinases microbiennes exige la présence d'ions, tels que le calcium, le potassium ou le magnésium [253, 254]. En général, le Ca^{2+} joue un rôle important dans le maintien de l'activité protéolytique des protéases alcalines à serines par stabilisation de la conformation active de l'enzyme, sans être impliqué dans la réaction catalytique [255, 256]. Cependant, la classification de cette préparation enzymatique nécessite des études plus poussées tel que la purification de la kératinase et sa caractérisation biochimique.

L'examen de l'ensemble des résultats obtenus, a conduit à la sélection de la souche S13, identifiée comme étant *Bacillus amyloliquefaciens* S13, pour une étude plus approfondie en considérant les performances de la souche dans la production des enzymes kératinolytiques, ainsi l'avantage qu'elle offre dans l'activité et la stabilité vis-vis du pH et de la température.

4.2 Optimisation de la production des protéases kératinolytiques de *Bacillus amyloliquefaciens* S13

La production de protéases extracellulaires chez les microorganismes est fortement influencée non seulement par les conditions physiques (température, pH, aération et temps d'incubation), mais également par la composition chimique des milieux de culture, particulièrement la source de carbone et la source d'azote. Un milieu de culture doit donc contenir les matières premières nécessaires pour la croissance et la production des enzymes d'intérêts. Ainsi, dans la perspective d'optimiser la production d'enzymes kératinolytiques par *B. amyloliquefaciens* S13, les cultures bactériennes ont été réalisées dans un milieu de base composé de : source de carbone (10 g/L); source d'azote (2 g/L); CaCl₂ (1 g/L); K₂HPO₄ (0,5 g/L); KH₂PO₄ (0,5 g/L) et NaCl (5 g/L). Le pH du milieu est ajusté à 8,0 et les cultures ont été menées pendant 24h à une température de 30 °C et sous agitation de 200 rpm. L'activité enzymatique a été mesurée par la méthode classique de Peterson, et la croissance bactérienne par mesure de l'absorbance à 600 nm. Le pH final des cultures a été également mesuré.

4.2.1 Effet des différentes sources de carbone sur la production des kératinases

La production de kératinases par la souche *B. amyloliquefaciens* S13 a été testée sur le milieu de base additionné à de différentes sources de carbone : farine de plume de poulet (FPP), gélatine, caséine, glucose et maltose à raison de 10 g/L.

Les résultats illustrés dans le tableau 4.6 montrent que la croissance bactérienne (absorbance à 600 nm de 6,7) et la production de protéases kératinolytiques (activité de 2700 U/mL) est plus importante en présence de la farine de plume de

poulet comme source de carbone. Le tableau montre également que des niveaux de productions d'enzymes kératinolytiques intéressants sont obtenus en présence de la gélatine et la caséine avec des activités quasiment comparables de l'ordre respectif de 2000 et 1500 U/mL. En présence de sources de carbone simples à savoir le glucose et le maltose, le niveau de production est plus faible soit de l'ordre de 964 et 773 U/mL respectivement. Ce qui est plus logique, sachant que l'ajout d'un substrat glucidique réprime la production des protéases en fournissant une source d'énergie plus assimilable. Cependant, d'autres travaux de recherche portant sur l'optimisation de production de kératinases par des bactéries du genre *Bacillus* montrent que des niveaux de productions importantes sont obtenus également en présence de source de carbone tels que : le glucose, le saccharose ou l'amidon [257, 258].

Tableau 4.6 : Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et la production de kératinases par la souche *B. amyloliquefaciens* S13

Source de carbone (10 g/L)	Témoin	FPP	Gélatine	Caséine	Glucose	Xylose
Activité (U/mL)	401	2700	2000	1500	964	773
Biomasse (DO 600 nm)	4,33	6,7	6.2	5,9	1,4	2,7
pH final	5,42	5.9	5.6	6,24	5,13	5,33

4.2.2 Effet de la concentration de la farine de plumes de poulet sur la production des kératinases

L'effet des concentrations croissantes de la meilleure source de carbone à savoir la farine de plume de poulet a été étudié afin de déterminer la concentration optimale permettant la production maximale des enzymes. Les résultats présentés dans tableau 4.7 montrent que la croissance bactérienne et la production de kératinases par la souche de *B. amyloliquefaciens* S13 augmentent avec la concentration en farine de plume de poulet jusqu'à 15 g/L. L'augmentation de la production est significative pour des concentrations supérieures à 5 g/L et atteint un maximum de 3000 U/mL à 15 g/L. Au delà de 15 g/L, une diminution de la production et de la croissance a été observée. A travers l'ensemble des résultats obtenus la farine de plumes de poulet avec une concentration de 15 g/L a été retenue pour la suite de notre travail.

Tableau 4.7 : Optimisation de la concentration de la farine de plumes de poulet pour la croissance et la production de kératinases par la souche

Bacillus amyloliquefaciens S13

Concentration de la FPP (g/L)	Témoin	1	2	5	10	15	20
Activité (U/mL)	497	600	780	1100	2700	3090	2500
Biomasse (DO 600 nm)	4,30	4,7	5,8	6,5	6,6	6,9	6,4
pH final	5,7	5,8	5,9	6,1	5,9	6,30	6,8

4.2.3 Effet des différentes sources d'azote sur la production des kératinases

L'azote, tout comme le carbone, est un constituant majeur du milieu de culture et doit répondre aux besoins nutritionnels de la souche. L'azote est métabolisé pour produire essentiellement des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines et certaines composantes des parois cellulaires et doit donc être disponible dans le milieu de culture. L'effet de différentes sources d'azote organique (extrait de levure, extrait de veau, peptone de soja), et inorganique (Sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et Nitrate d'ammonium (NH_4NO_3)) sur la croissance et la production d'enzymes kératinolytiques par la souche *B. amyloliquefaciens* a donc été étudié à raison de 2 g/L. Les résultats obtenus ont été comparés à une culture témoin (0 g/L) de source d'azote et représentés dans le tableau 4.8.

Tableau 4.8 : Effet de différentes sources d'azote sur la croissance bactérienne et la production de kératinases par la souche *B. amyloliquefaciens* S13

Source d'azote (2 g/L)	Témoin	peptone de soja	extrait de levure	extrait de veau	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4NO_3
Activité (U/mL)	391	3100	1630	1182	482	545
Biomasse (DO 600 nm)	4,25	6,9	5,8	4,2	2,0	3,4
pH final	5,81	6,35	6,2	7,26	7,04	5,85

Les résultats illustrés dans le tableau 4.8 montrent que le meilleur niveau de production est obtenu en présence de peptone de soja avec un maximum d'activité de 3100 U/mL. Une production assez importante est obtenue en présence de l'extrait de levure et de l'extrait de veau, et le niveau est très faible en présence de sulfate d'ammonium et de nitrate d'ammonium. Ces résultats sont en concordance avec plusieurs travaux qui ont montré que les sources d'azote organiques sont meilleures pour la production d'enzymes par les bactéries du genre *Bacillus* [259].

De même, la répression de la synthèse des kératinases chez es espèces du genre *Bacillus* par un excès d'ammonium a été largement décrite [260].

A la lumière de ces résultats, la peptone de soja s'avère être plus adéquat pour la production des protéases kératinolytiques de la souche *B. amyloliquefaciens* S13.

4.2.4 Effet de la concentration de peptone de soja sur la production des kératinases

L'estimation de la production d'enzymes kératinolytiques par *B. amyloliquefaciens* S13 en fonction des concentrations de peptone de soja a été évaluée. Les expériences ont été menées en utilisant différentes concentrations de peptone de soja, et en maintenant à des niveaux constants les constituants du milieu de culture constitué de (g/L) : farine de plumes de poulet (15 g/L); CaCl₂ (1 g/L); K₂HPO₄ (0,5 g/L); KH₂PO₄ (0,5 g/L) et NaCl (5 g/L).

Les résultats présentés dans le tableau 4.9 montrent que la concentration de peptone de soja affecte le niveau de croissance et de production des enzymes kératinolytiques. En fait, le niveau de production est faible en absence de peptone de soja (389 U/mL), tandis qu'il augmente avec l'augmentation de la concentration de peptone de soja et atteint son maximum (5000 U/mL) pour une concentration de 5 g/L. Au-delà de cette concentration, la production de kératinases ainsi que la croissance bactérienne commencent à diminuer.

Tableau 4.9 : Optimisation de la concentration de peptone de soja pour la croissance et la production de kératinases par la souche *B. amyloliquefaciens* S13

Concentration de Peptone de soja (g/L)	Témoin	2	3	4	5	6	8	10
Activité (U/mL)	389	3050	4180	4800	5000	3900	2981	2545
Biomasse (DO 600 nm)	4,30	5,0	6,2	6,64	6,72	6,81	6,52	6,41
pH final	5,73	6,2	6,5	6,7	6,9	7,0	7,2	7,4

A la lumière des résultats obtenus suite à l'étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production des protéases kératinolytiques, un nouveau milieu de culture est déterminé dont la composition est : farine de plumes de poulet (15 g/L); peptone de soja (5g/L); CaCl_2 (1 g/L); K_2HPO_4 (0,5 g/L); KH_2PO_4 (0,5 g/L) et NaCl (5 g/L) et 1% (v/v) d'oligoéléments (ZnCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Ce milieu a été retenu pour la suite du travail puisqu'il permet une meilleure croissance de la souche ($\text{DO } 600\text{nm} = 7,7$) et une production de kératinases maximale (8000 U/mL).

4.3 Cinétique de croissance et de production des protéases kératinolytiques en milieu liquide

La culture de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 dans le milieu optimisé a été incubée à 30 °C dans des Erlenmeyer de 500 mL avec un volume utile de 100 mL et sous une agitation de 200 rpm. Des prélèvements réguliers ont été effectués et la croissance bactérienne ainsi que l'activité kératinolytique ont été déterminées (Figure 4.1). Le suivi de production et de la croissance bactérienne de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 en fonction du temps montre que la sécrétion de protéases kératinolytiques commence après une phase de latence de 6 h et dès le début de la phase de croissance exponentielle, puis elle évolue par la suite de façon concomitante avec la croissance bactérienne et atteint son maximum d'activité après 42 h de culture avec une DO à 600 nm d'environ 7,7. Au-delà de cette période, la production commence à diminuer légèrement.

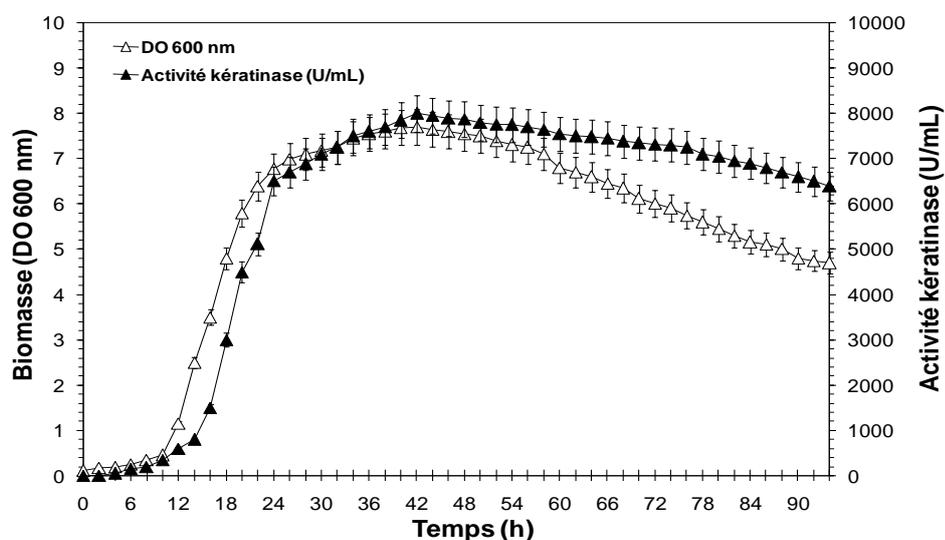


Figure 4.1 : Cinétique de production de kératinases et de croissance bactérienne de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13

4.4 Purification des kératinases de *Bacillus amyloliquefaciens* S13

4.4.1 Procédure de purification

Le procédé de purification des protéases kératinolytiques de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 a été mis en œuvre selon deux étapes : une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (45% à 65%), suivi d'une chromatographie d'exclusion-diffusion sur Zorbax PSM 300/HPLC, en utilisant un extrait enzymatique obtenu après élimination des cellules bactériennes issues des cultures de 42h de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 par centrifugation à 10000 × g pendant 15 min.

Dans la première étape, le surnageant récupéré contenant l'activité kératinolytique a été partiellement purifié en utilisant la précipitation fractionnée avec du sulfate d'ammonium. Ce dernier entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau, entraînant une désolvatation suivie d'une précipitation. Pour ce faire, le sulfate d'ammonium a été ajouté au surnageant progressivement, sous une agitation douce et à froid pendant 2 h jusqu'à 45% de saturation (242 g/L), puis centrifugé à 14000 xg pendant 30 min. Le surnageant ainsi recueilli a été additionné à nouveau du sulfate d'ammonium solide jusqu'à 65 % de saturation (136 g/L). Le précipité a ensuite été récupéré par centrifugation, et le culot résultant a été dissous immédiatement dans un volume de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) additionné de 0,005% de Triton X-100 (tampon A), puis dialysé à 4 °C contre le tampon A pendant une nuit. Quant à la deuxième étape, l'échantillon ainsi obtenu de l'étape précédente a été soumis à une purification par chromatographie d'exclusion-diffusion ou encore appelée chromatographie par perméation de gel ou filtration sur gel, permettant la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Les molécules les plus petites, dont la taille s'échelonne dans les limites d'exclusion du gel, seront éluées du gel dans l'ordre décroissant de leurs masses moléculaires. Les molécules les plus grandes seront exclues du gel et éluées en premier. A cet effet, la préparation enzymatique obtenue après traitement avec du sulfate d'ammonium a été injectée en utilisant une colonne de filtration sur gel ZORBAX PSM 300 (6,2 mm × 250 mm) préalablement équilibrée avec le tampon MOPS-NaOH 25mM (pH 7,5) contenant 2mM CaCl₂. L'éluion des protéines a été réalisée par le même tampon avec un débit de 0,5 mL/min, et la détection a été faite à 280 nm à l'aide d'un détecteur UV-Visible à barrettes de diodes.

Le profil chromatographique montre l'apparition de deux pics d'absorbance à 280 nm, l'un majoritaire (KERZT-A) et le second minoritaire (KERZT-B), éluées à des temps de rétention de 10,4 min et 11,27 min. Les pics correspondant aux fractions obtenues ont été collectés et leurs activités kératinolytiques ont été déterminées.

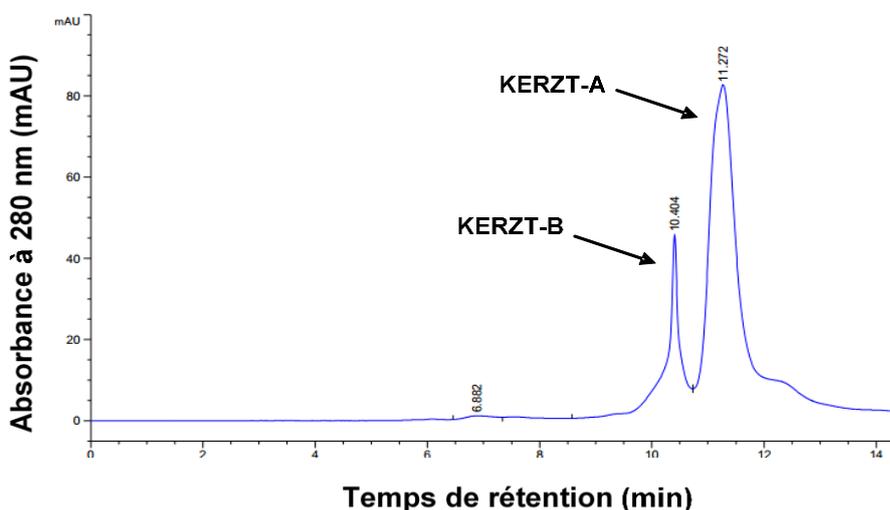


Figure 4.2 : Profil chromatographique des kératinases KERZT-A et B

4.4.2 Bilan de purification

Du fait de l'importance des enzymes kératinolytiques sur le plan de recherche fondamentale et de leurs perspectives d'applications dans le domaine industriel, nous nous sommes intéressés, après avoir optimiser la production de protéases kératinolytiques, à passer par des étapes de purification des enzyme(s) kératinolytique(s) produites. En fait, les enzymes kératinolytiques de *B. amyloliquefaciens* S13 ont été complètement purifiées par deux étapes. L'étape de précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (45 à 65 %) a permis l'obtention d'un rendement d'activité kératynolitique de 82%, d'une activité spécifique de 2634 U/mg avec un facteur de purification de 3,12. Quant à l'étape de purification par CLHP, l'analyse chromatographique a permis l'obtention de deux pics, qui coïncident également avec deux activités, représentant deux enzymes kératinolytiques nommées KERZT-A et B. Les valeurs de rendement des enzymes KERZT-A et B ont été déterminées à 24 et 12,4%, respectivement, avec un facteur de purification et des activités spécifiques de 60 fois et 50526 U/mg pour KERZT-A, et de 45 fois et 38000 U/mg pour KERZT-B en utilisant la kératine azur comme substrat.

Tableau 4.10 : Bilan de purification des enzymes kératinolytiques KERZT-A et B

Étapes de purification	Activité totale (U) $\times 10^3$	Quantité totale de protéine (mg)	Activité spécifique (U/mg protéine)	Rendement de purification (%)	Facteur de purification (fois)
Extrait brut	4000 \pm 17	4751 \pm 32	842	100	1
Précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3200 \pm 12	1215 \pm 45	2634	82	3,12
HPLC KERZT-A	960 \pm 5	19 \pm 2	50526	24	60
HPLC KERZT-B	494 \pm 1	13 \pm 1	38000	12,4	45

4.5 Electrophorèse des protéines et séquençage de l'extrémité NH₂-terminale

4.5.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et non dénaturantes (zymogramme)

La pureté des enzymes et leur taille ont été estimées par électrophorèse dans des conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10% selon la méthode de Laemmli [261]. L'électrophorèse a été menée à 50 V et à un ampérage constant. Le poids moléculaire des enzymes purifiées KERZT-A et B a été déterminé par comparaison avec un marqueur de taille LMW (Amersham) déposé et migré dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons. En fait, ce marqueur de taille contient différents fragments de protéines de tailles connues qui serviront de référence pour estimer la taille de nos enzymes. La révélation des bandes protéiques a été réalisée par coloration au bleu de Coomassie Brilliant R-250 (Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Cette méthode colore les protéines de façon à peu près indépendante de la séquence. Les gels ont été plongés dans une solution de coloration (1g de bleu de Coomassie R250 (BioRad) dans 50 mL d'acide acétique, 250 mL d'éthanol et H₂O q.s.p. 500 mL), et ils ont été ensuite transférés dans une solution de décoloration (100 mL d'acide acétique ; 350 mL d'éthanol et H₂O q.s.p. 1 L). Les gels ont été stockés dans une solution à 20% d'éthanol dans de l'eau, ce qui achève la décoloration et évite l'apparition de bactéries, puis séchés et photographiés.

De même, l'analyse par zymogramme permet de mettre en évidence directement l'activité kératinolytique sur gel d'électrophorèse dans des conditions non dénaturantes. Après migration sur gel de polyacrylamide, la kératine a été incorporée et le gel a été immergé par la suite dans l'eau distillée en présence de 2,5% Triton X-100 pendant 1 h sous agitation douce afin d'éliminer le SDS. Le Triton X-100 a été ensuite éliminé par incubation du gel pendant 3 h à 40 °C en présence du tampon MOPS-NaOH 25mM (pH 7,5). L'activité kératinolytique a été révélée après fixation pendant 1 heure avec du TCA 20% (p/v), coloration au bleu de Comassie R-250 et décoloration par l'eau distillée/méthanol/acide acétique (60:30:1), qui apparaît sous forme de bands claires correspondant à des kératinases ayant dégradés la kératine.

Par comparaison avec les marqueurs de taille, l'analyse par SDS-PAGE (Figure 4.3 (A)) et par Zymogramme sur kératine dans les conditions non dénaturante (Figure 4.3 (B)), montrent que les deux pools enzymatiques obtenus dans la dernière étape de purification présentent deux kératinases sous deux bandes pures et homogènes de taille moléculaire apparente d'environ 28 kDa pour KEZT-A et de 47 kDa pour KERZT-B. Ces masses moléculaires sont en accord avec celles des autres kératinases produites par des bactéries du genre *Bacillus*. Ainsi, les masses moléculaires de ces enzymes sont généralement de l'ordre de 27 à 48 kDa, c'est le cas de la souche *B. tequilensis* Q7 avec 28 kDa [262], *B. circulans* DZ100 avec 32 kDa [263], *B. licheniformis* HK-1 avec 46 kDa [264] et *B. pumilus* CBS 34,5 [247].

L'analyse par zymogramme a relevé également une zone d'activité pour chacune des deux enzymes purifiées, migrant avec des protéines d'une masse moléculaire estimée à 28 et 47 kDa pour KEZT-A et B respectivement, ce qui est en parfait accord avec les tailles déterminées par SDS-PAGE. De même, l'analyse indique que les deux enzymes sont parfaitement pures, et que ce sont des kératinases monomériques actives sur la kératine. Ces résultats suggèrent fortement que les deux enzymes KERZT-A et B sont des protéines monomériques comparables à d'autres kératinases du genre *Bacillus* rapportées dans la littérature [247,262, 263].

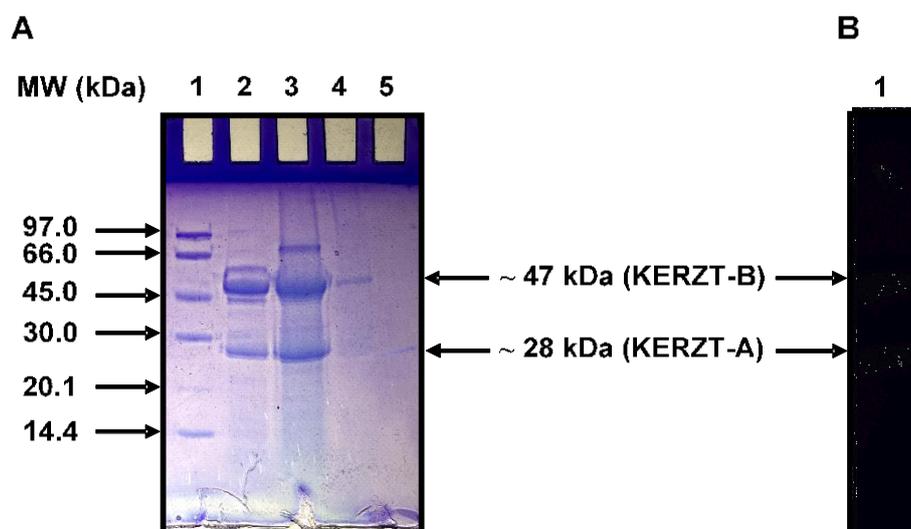


Figure 4.3 : **(A)** Analyse SDS-PAGE des kératinases purifiées. Ligne 1, marqueur de taille Amersham LMW (GE Healthcare Europe GmbH, Fribourg, Allemagne). Ligne 2, extrait total. Ligne 3, échantillon dialysé après précipitation au sulfate d'ammonium (45-65%). Lignes 4 et 5, enzymes KERZT-B et A purifiées. **(B)** Profil zymogramme des kératinases purifiées KERZT-A et B

4.5.2 Détermination de la séquence N-terminale des kératinases purifiées

La détermination de la séquence N-terminale des kératinases purifiées a été réalisée par la méthode automatisée d'Edman en utilisant un biosystème d'application Modèle 473A gaz-phase sequencer [265]. Après migration sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes, les deux bandes correspondant aux kératinases ont été transférées par la suite à ProBlott membrane (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Le séquençage N-terminal des enzymes purifiées KERZT-A et B a permis l'identification des premiers 29 et 19 acides aminés, à savoir AQSVPYGVVSQIRAPALHSQG-YTGSDVKVA et AAATGTRTTLKGKTVSLDI, respectivement. L'analyse comparative de ces séquences par rapport à la base de données Swiss-Prot/TrEMBL (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), montre que la séquence N-terminale de KERZT-A présentait des niveaux d'homologie élevés avec d'autres kératinases à sérine du genre *Bacillus*, atteignant 95, 90, 74, 71 et 62%

avec Subtilisin Novo [266], SAPB. [247], KERUS [267], KERQ7 [262] et KerA [268, 269], respectivement. Cependant, l'alignement de la séquence N-terminale de KERZT-B a montré des niveaux d'homologie élevés qui atteignant une identité de 89% par rapport à ceux trouvés dans les protéases neutres de *Bacillus* qui diffèrent par deux acides aminés. En fait, les résidus Arg7 et Asp18 de KERZT-B ont été remplacés dans les protéases neutres de *Bacillus* par Gly7 et Asn18, respectivement (tableau 4.11). L'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que les enzymes KERZT-A et B de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 appartiennent à la famille de sérine kératinases.

Tableau 4.11 : Alignement des séquences N-terminales des enzymes KERZT-A et B et comparaison avec les séquences N-terminales d'autres kératinases du genre *Bacillus*

Enzyme	Origine	Séquence N-terminal	Identité (%)
KERZT-A	<i>B. amyloliquefaciens</i> S13	AQSVPYGVSQIRAPALHSQGYTGSD VKVA	-
Subtilisin Novo	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AQSVPYGVSQIKAPALHSQGY	95
SAPB	<i>B. pumilus</i> CBS	AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGY	90
KERUS	<i>Br. brevis</i> US575	AQTVPYGIPQIKEPAVHAQGYKGAN VK	74
KERQ7	<i>B. tequilensis</i> Q7	AQTVPYGIPQIKEPAVHAQGY	71
KerA	<i>B. licheniformis</i> PWD-1	AQTVPYGIPLIKADK	62
KERZT-B	<i>B. amyloliquefaciens</i> S13	AAATGTRTTLKGKTVSLDI	-
Protéase neutre	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AAATGT G TTLKGKTVSLNI	89
Protéase neutre	<i>B. velezensis</i> YAU	AAATGT G TTLKGKTVSLNI	89

4.5 Caractérisation physicochimiques des kératinases KERZT-A et KERZT-B

La caractérisation des deux enzymes kératinolytiques KERZT-A et B a été réalisée en utilisant la kératine azure (1%) comme substrat. La caractérisation biochimique a été menée de la même manière que pour les préparations enzymatiques brutes lors de l'étape du criblage.

4.5.1 Effet des inhibitions, des agents réducteurs et des ions métalliques sur l'activité des kératinases

Les effets de divers inhibiteurs et agents réducteurs spécifiques tels que: PMSF, DFP, SBTI, TLCK, TPCK, benzamidine, LD-DTT, 2-ME, DTNB, NEM, l'iodoacétamide, le sel d'hémisulfate de N-leupeptine, la pepstatine A, l'EDTA et EGTA ainsi que plusieurs ions métalliques bivalents Ca^{2+} (CaCl_2), Mg^{2+} (MgSO_4), Zn^{2+} (ZnSO_4), Co^{2+} (CoSO_4), Fe^{2+} (FeSO_4), Mn^{2+} (MnSO_4), Ba^{2+} (BaCl_2), Cu^{2+} (CuSO_4), Ni^{+2} (NiCl_2), Cd^{2+} (CdCl_2) et Hg^{2+} (HgCl_2) sur l'activité des enzymes ont été étudiés en pré-incubant chaque kératinase purifiée pendant 1 heure à température ambiante. Les activités enzymatiques mesurées en absence d'inhibiteurs ou d'ions métalliques ont été considérées comme témoins (100%).

Les résultats présentés dans le tableau 4.12 indiquent que parmi les inhibiteurs testés, le PMSF et le DFP, qui sont des inhibiteurs bien connus des protéases à sérine, ont complètement inhibés l'activité kératinolytique. Ceci confirme que les deux kératinases purifiées KERZT-A et B appartiennent à la classe des protéases à sérine commune à la plupart des kératinases décrites dans la littérature [262]. En fait, le résidu essentiel de sérine a été rapporté pour les kératinases du genre *Bacillus* sp. comme dans le cas de la souche *B. licheniformis* PWD-1 [268], *Br. Brevis* US575 [267] et *B. pseudofirmus* FA30-01 [270]. D'autres inhibiteurs, tels que TPCK et TLCK (inhibiteurs de la chymotrypsine), benzamidine (inhibiteur de la trypsine), SBTI (inhibiteur de la trypsine de soja) et pepstatine A (inhibiteur des acides aspartiques) n'ont montré aucun effet. De plus, les activités résiduelles des deux enzymes n'ont pas été affectées par les sulfhydryles (LD-DTT, 2-ME, DTNB, NEM, iodoacétamide et leupeptin), ce qui confirme que les enzymes n'appartiennent pas à la classe des kératinases à thiol. Cependant, les deux enzymes KERZT-A et B ont conservé 82% et 95% de leurs activités initiales en présence d'EDTA (10 mM) et de 80% et 92% en présence d'EGTA (1 mM), respectivement, en tant qu'inhibiteurs des métalloprotéases. Ceci suggère qu'aucun facteur métallique n'est impliqué dans l'activité kératinolytique de ces enzymes. De même, plusieurs travaux ont montré que l'activité enzymatique de certaines protéases kératinolytiques exige la présence de certains ions, tels que le calcium et le magnésium [271].

Tableau 4.12 : Effets de divers inhibiteurs, agents réducteurs et ions métalliques sur l'activité des deux enzymes KERZT-A et B

Inhibiteurs/agents réducteurs/ ions métallique	Concentration	Activité kératinase résiduelle (%)	
		KERZT-A	KERZT-B
Témoin	–	100 ± 2,5	100 ± 2,5
PMSF	1 mM	0 ± 0,0	0 ± 0,0
DFP	2 mM	0 ± 0,0	0 ± 0,0
SBTI	2 mg/mL	98 ± 2,5	96 ± 2,4
TLCK	1 mM	101 ± 2,5	98 ± 2,5
TPCK	1 mM	104 ± 2,5	97 ± 2,4
Benzamidine	2 mM	95 ± 2,4	102 ± 2,5
LD-DTT	1 mM	103 ± 2,5	84 ± 2,0
2-ME	10 mM	101 ± 2,5	92 ± 2,1
DTNB	5 mM	100 ± 2,5	91 ± 2,1
NEM	2 mM	98 ± 2,5	88 ± 2,0
Iodoacetamide	5 mM	102 ± 2,5	97 ± 2,5
Leupeptine	50 µg/mL	95 ± 2,4	100 ± 2,5
Pepstatine A	2 µg/mL	99 ± 2,5	102 ± 2,5
EDTA	10 mM	82 ± 2,1	95 ± 2,4
EGTA	1 mM	80 ± 2,1	92 ± 2,4
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	2 mM	215 ± 2,8	180 ± 3,4
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	2 mM	210 ± 2,6	146 ± 3,1
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	2 mM	146 ± 3,1	15 ± 0,7
Co ²⁺ (CoCl ₂)	2 mM	101 ± 2,5	57 ± 1,5
Fe ²⁺ (FeCl ₂)	2 mM	35 ± 0,8	101 ± 2,5
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	2 mM	55 ± 1,5	287 ± 4,5
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	2 mM	35 ± 1,0	88 ± 2,0
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	2 mM	10 ± 0,7	30 ± 1,0
Ni ²⁺ (NiCl ₂), Cd ²⁺ (CdCl ₂), Hg ²⁺ (HgCl ₂)	2 mM	0 ± 0,0	0 ± 0,0

Les résultats donnés dans le tableau 4.12 montrent que l'enzyme KERZT-A est fortement inhibée par Cu²⁺, Ba²⁺ et Fe²⁺ mais non affectée par Co²⁺ et que l'enzyme KERZT-B est fortement inhibée par Cu²⁺, Co²⁺ et Zn²⁺ et non affectée par Fe²⁺. Les résultats ont donc montré que les ions métalliques divalents Ca²⁺ (215%), Mg²⁺ (210%) et Zn²⁺ (146%) et Ca²⁺ (180%), Mg²⁺ (146%) et Mn²⁺ (287%) ont provoqué une forte activation des kératinases extracellulaires de KERZT-A et B, respectivement. D'autre part, les deux enzymes ont été complètement inhibées par Ni²⁺, Cd²⁺ et Hg²⁺. Ce résultat indique que les ions Ca²⁺ et Mn²⁺ sont les meilleurs inducteurs des activités enzymatiques de KERZT-A et B, respectivement.

De plus, les enzymes kératinolytiques de *B. pumilus* CBS [247], *B. tequilensis* Q7 [262] et *B. pumilus* FH9 [272] ont été rapportées comme étant totalement renforcées par Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} et fortement inhibé par Cd^{2+} , Ni^{2+} et Hg^{2+} . Ces résultats sont en parfait accord avec ceux observés pour les protéases SPVP et SAPLF produites respectivement à partir des souches bactériennes *Aeribacillus pallidus* VP3 et *Lysinibacillus fusiformis* C250R [273, 274].

4.5.2 Effet du pH sur l'activité et la stabilité des deux kératinases

L'effet du pH sur l'activité des enzymes KERZT-A et B a été déterminé en utilisant la kératine azure comme substrat. L'activité enzymatique a été mesurée à des pH allant de 3 à 13 en utilisant les tampons suivants à des concentrations de 100 mM additionnés de 5 mM CaCl_2 pour KERZT-A et de 2 mM MnCl_2 pour KERZT-B: glycine-HCl pour les pH 3 à 5, acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique (MES) pour les pH 5 à 6, acide 4-(2- hydroxy éthyl)-1-piperazine éthane sulfonique (HEPES) pour les pH 6 à 8, Tris-HCl pour les pH 8 à 9, glycine-NaOH pour les pH 9 à 11, bicarbonate-NaOH pour les pH 11 à 11,5, Na_2HPO_4 -NaOH pour les pH 11,5 à 12 et KCl-NaOH pour les pH 12 à 13. La stabilité vis-à-vis du pH a été déterminée après pré-incubation des enzymes pendant 24h en faisant varier le pH de 5 à 9. Les activités résiduelles ont été mesurées dans les conditions optimales de température et de pH.

Les profils d'activité des enzymes à différents pH illustrés par la Figure 4.4 montrent que l'activité kératinolytique de KERZT-A et B est détectable sur une large gamme de valeurs de pH, avec un optimum à pH 6,5 et pH 8, respectivement. Les résultats de la figure 4.4 montrent que la kératinase KERZT-A est hautement active dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,5. Au delà de cet intervalle, l'activité décroît considérablement pour s'annuler à pH 12. En outre, cette enzyme est assez stable dans la gamme de pH de 5 à 6, gardant 100% de son activité initiale après une pré-incubation de 24 h (figure 4.5 (A)) à 50 °C. Selon les résultats obtenus, il a été démontré que KERZT-A est une kératinase acide présentant une activité optimale à pH 6,5, ce qui indique la polyvalence potentielle de telles préparations d'enzymes pour diverses applications, notamment dans le traitement du cuir.

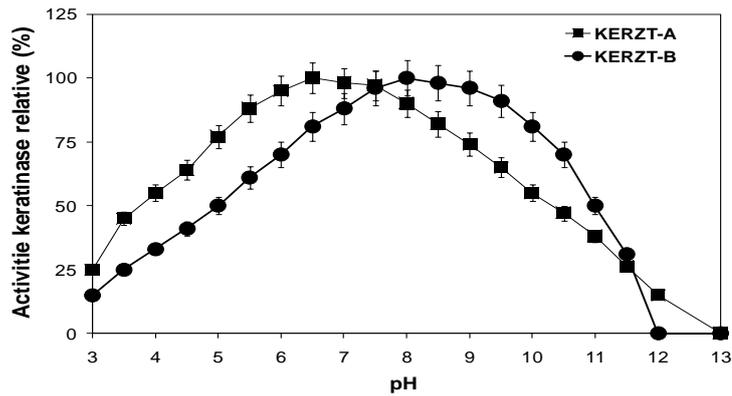


Figure 4.4 : Effet du pH sur l'activité des enzymes kératololytiques KERZT-A et KERZT-B

Les résultats montrent également que l'enzyme KERZT-B est active dans un large intervalle de pH compris entre 7 et 10 et que l'optimum d'activité est obtenu à pH 8. Toutefois, l'activité enzymatique diminue considérablement au delà de cet intervalle. Le pH optimal de l'enzyme KERZT-B dans une gamme légèrement alcaline (pH 8) lui permet d'être plus adapté à diverses applications industrielles. En fait, la plupart des kératinases microbiennes ont un pH optimal dans la gamme neutre à alcaline [262, 267]. La kératinase de la souche *A. viridilutea* DZ50 présente un pH optimal de 11 [275]. Cependant, la kératinase de la souche *B. circulans* DZ100 a un optimum alcalophile extrême à pH 12 [263], et la kératinase de *B. subtilis* a un optimum légèrement acide à pH 6 [276].

En outre, après pré-incubation de l'enzyme à 60 °C pendant 24 h (figure 4.5 (B)), une très faible perte d'activité a été observée dans la gamme allant de pH 6 à 7, indiquant une bonne stabilité du pH dans les conditions étudiées.

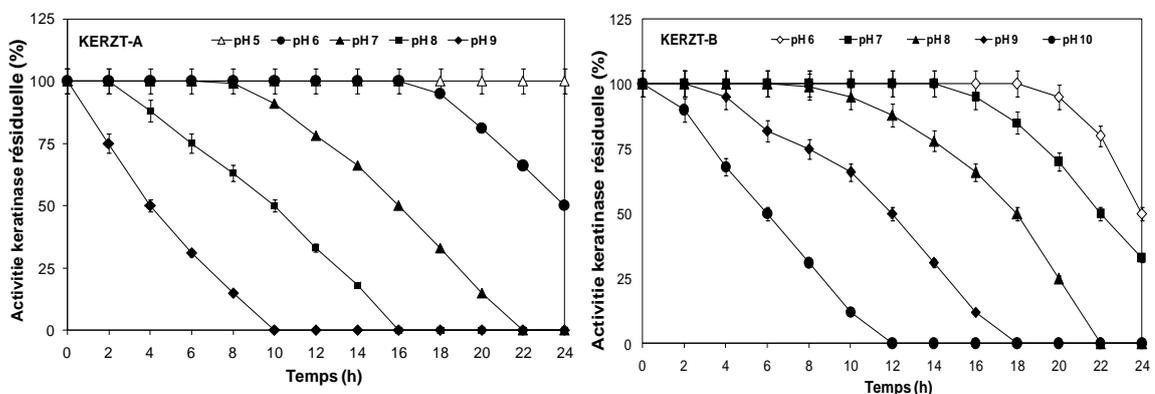


Figure 4.5 : Effet du pH sur la stabilité des enzymes kératololytiques (A) KERZT-A et (B) KERZT-B

4.5.3 Effet de la température sur l'activité et la stabilité des deux kératinases

L'effet de la température sur l'activité des enzymes KERZT-A et B a été testé à des températures allant de 30 à 80 °C en maintenant le pH à des valeurs optimales des deux enzymes. Leur thermostabilité a été examinée, quant à elle, par pré-incubation des enzymes pendant 24 h à différentes températures (entre 60 et 80 °C) en présence et en absence de 5 mM CaCl₂ pour KERZT-A et de 2 mM MnCl₂ pour KERZT-B. Des prélèvements réguliers ont été effectués suivi de la détermination des activités kératinolytiques résiduelles. Les enzymes non pré-incubées ont été considérées comme témoins (100%).

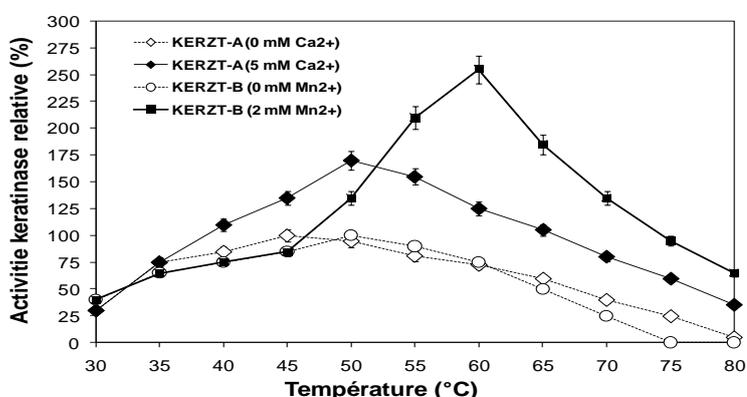


Figure 4.6 : Effet de la température sur l'activité des enzymes kératinolytiques KERZT-A et KERZT-B

Les résultats présentés sur la figure 4.6 montrent que les enzymes KERZT-A et B présentent un maximum d'activité à 50 °C et 60 °C en présence de 5 mM de Ca²⁺ et 2 mM de Mn²⁺ et à 45 °C et 50 °C en absence de Ca²⁺ et Mn²⁺, respectivement. L'activité relative des deux enzymes KERZT-A et B à 30 °C est entre 25 et 40%, et cela en présence et en absence de Ca²⁺ et Mn²⁺, respectivement. Au-delà de 65 °C, l'activité décroît considérablement jusqu'à s'annuler. Cependant, la diminution est plus importante en absence d'ions métalliques.

L'étude de la stabilité thermique de la kératinase KERZT-A en absence de Ca²⁺ montre que les temps de demi-vie sont de 12 h et 2 h à 60 °C et 70 °C, respectivement. Toutefois, ces valeurs augmentent pour atteindre 16 h et 6 h en présence de 5 mM de Ca²⁺ (Figure 4.7 (A)). Ceci prouve clairement l'influence de

CaCl₂ dans le maintien et l'amélioration de la thermostabilité de l'enzyme. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de plusieurs travaux décrits précédemment chez la plupart des bactéries kératinolytiques telles que *A. viridilutea* DZ50 [275] et *C. algeriensis* D2C22T [277].

L'étude de la thermostabilité de l'enzyme KERZT-B en absence de tout additif, montre qu'elle possède des temps de demi-vie qui diminuent avec l'augmentation de la température, à savoir, 8 h et 4 h à 70 °C et 80 °C respectivement. Cependant, la thermostabilité maximale est observée en présence de 2mM de Mn²⁺ (Figure 4.7 (B)), et les temps de demi-vie augmentent à 11 h et 6 h.

La thermoactivité et la thermostabilité des enzymes KERZT-A et B sont plus élevées que celles rapportées chez d'autres kératinases du genre *Bacillus* [278, 279], ceci suggère que les deux enzymes kératinolytiques KERZT-A et B peuvent être des potentiels candidats pour des applications biotechnologiques.

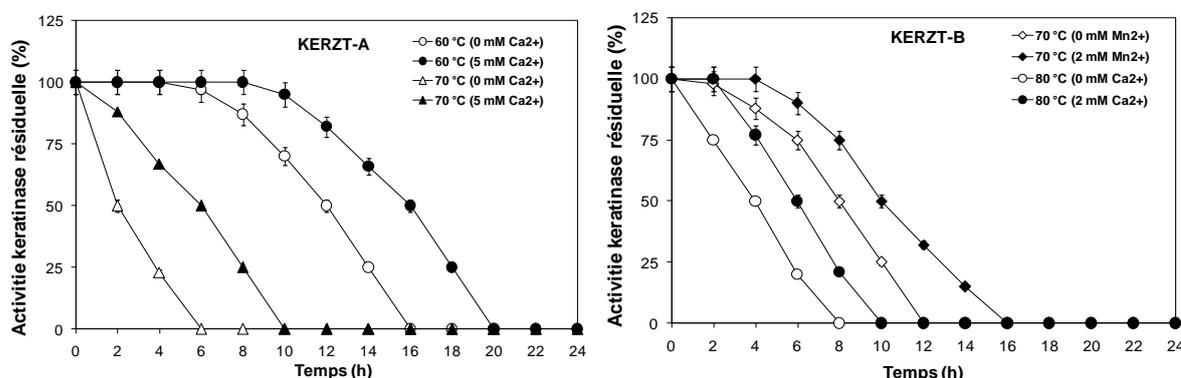


Figure 4.7 : Effet de la température sur la stabilité des enzymes kératinolytiques KERZT-A (A) et KERZT-B (B)

4.6 Etude de la spécificité des enzymes KERZT-A et B vis-à-vis des substrats

La spécificité de clivage de chaque enzyme a été déterminée vis-à-vis de divers substrats protéiques naturels (kératine, élastine-orcéine, gélatine, caséine, albumine et ovalbumine), substrats protéiques modifiés (kératine azure, azo-caséine, azo-albumine, collagène type I et collagène type II) ainsi que des esters (BTEE, ATEE, BAEE, BCEE et TAME). D'autres substrats peptidiques synthétiques

ont également été utilisés pour déterminer la spécificité de l'activité des kératinases KERZT-A et B: Suc-Tyr-Leu-Val-pNA, Suc-(Ala)₂-Ile-pNA, Suc-(Ala)₂-Val-pNA, Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-pNA, Suc-(Ala)₃-pNA, Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-pNA, Suc-(Ala)₂-Pro-Met-pNA, Suc-(Ala)₂-Val-Ala-pNA, Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA et Suc-Phe-(Ala)₂-Phe-pNA.

Tableau 4.13 Spécificité des enzymes kératinolytiques KERZT-A et B vis-à-vis des substrats

Substrat	Concentration	Absorbance (nm)	Activité enzymatique relative (%)	
			KERZT-A	KERZT-B
<i>Protéine naturelle</i>				
Kératine	40 g/L	660	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Caséine	40 g/L	660	90 ± 2.2	92 ± 2.2
Elastine-orceine	40 g/L	660	60 ± 1.6	52 ± 1.5
Gélatine	40 g/L	660	44 ± 1.4	40 ± 1.4
Ovalbumine	40 g/L	660	75 ± 2.0	75 ± 2.0
Albumine	40 g/L	660	30 ± 1.2	34 ± 1.3
<i>Protéine modifiée</i>				
Kératine azure	40 g/L	440	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Azo-caséine	40 g/L	440	85 ± 2.0	91 ± 2.1
Albumine azure	40 g/L	440	25 ± 1.1	44 ± 1.4
Collagène type I	10 g/L	490	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Collagène type II	10 g/L	490	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>Ester</i>				
BCEE	10 mM	253	100 ± 2.5	100 ± 2.5
BAEE	10 mM	253	97 ± 2.5	91 ± 2.1
TAME	10 mM	253	65 ± 1.7	60 ± 1.6
BTEE	10 mM	253	0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
ATEE	10 mM	253	0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>Peptide synthétique</i>				
Suc-Tyr-Leu-Val-pNA	5 mM	410	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Suc-(Ala) ₂ -Ile-pNA	5 mM	410	97 ± 2.5	98 ± 2.5
Suc-(Ala) ₂ -Val-pNA	5 mM	410	91 ± 2.1	96 ± 2.4
Suc-(Ala) ₂ -Leu-pNA	5 mM	410	77 ± 1.8	88 ± 2.1
Suc-(Ala) ₃ -pNA	5 mM	410	72 ± 1.8	70 ± 1.8
Suc-(Ala) ₂ -Phe-pNA	5 mM	410	44 ± 1.5	65 ± 1.7
Suc-(Ala) ₂ -Pro-Leu-pNA	5 mM	410	40 ± 1.3	19 ± 1.0
Suc-(Ala) ₂ -Pro-Met-pNA	5 mM	410	25 ± 1.1	12 ± 0.6
Suc-(Ala) ₂ -Val-Ala-pNA	5 mM	410	20 ± 1.0	10 ± 0.6
Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA	5 mM	410	12 ± 0.6	7 ± 0.1
Suc-Phe-(Ala) ₂ -Phe-pNA	5 mM	410	5 ± 0.1	2 ± 0.1

Les résultats présentés dans le tableau 4.13 montrent que parmi les substrats protéiques testés, la kératine et la kératine azure sont les plus hydrolysées par les enzymes KERZT-A et B, suivies par la caséine, azo-caséine, ovalbumine et l'élastine-orcéine. Des niveaux d'activité relativement élevés ont également été observés par la gélatine et l'albumine. Cependant, aucune activité collagénase n'a été détectée sur le collagène de type I ou II. En fait, l'absence de l'activité collagénase est très recherchée dans l'opération de confitage lors de traitement du cuir, ce qui suggère l'utilité potentielle de ces deux enzymes dans l'industrie du cuir particulièrement dans les étapes d'épilage/confitage. Cette spécificité du clivage a été déjà rapportée dans d'autres kératinases. A titre d'exemple, la spécificité de clivage de la kératinase KERUS vis-à-vis de divers substrats protéiques montre que la kératine et la kératine azure sont les plus efficacement hydrolysées par l'enzyme KERUS produite par la souche bactérienne *Br. brevis* US575, suivie par la gélatine, l'élastine, la caséine et l'hémoglobine, et aucune activité collagénase n'a été détectée sur le collagène de type I et II [267]. En outre, les deux enzymes KERZT-A et B peuvent hydrolyser divers esters à 100% pour BCEE suivi par BAEE (97% pour KERZT-A et 91% pour KERZT-B).

Les enzymes kératinolytiques ont montré une préférence pour les acides aminés aliphatiques hydrophobes (valine, isoleucine et leucine) du côté carboxyle en position P1. L'expérience a démontré que les kératinases présentaient la plus grande activité pour le Suc-Tyr-Leu-Val-pNA, le Suc-(Ala)₂-Ile-pNA, le Suc-(Ala)₂-Val-pNA et le Suc-(Ala)₂-Leu-pNA, lorsque les résidus valine, isoleucine et leucine sont placés en position P1. Par ailleurs, les enzymes kératinolytiques ont montré une préférence pour les résidus d'acides aminés aromatiques en position P1 et P3, tels que Phe, Tyr et Ala. De plus, les enzymes ont montré une faible activité pour Suc-(Ala)₂-Pro-Met. -pNA et Suc-(Ala)₂-Val-Ala-pNA avec des taux d'hydrolyse de 12 et 10%, respectivement, lorsque les résidus de méthionine et d'alanine sont placés en position P1. En outre, une diminution du taux d'hydrolyse a toutefois été observée pour le Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-pNA, le Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA et le Suc-Phe (Ala)₂-Phe-pNA lorsque les résidus de proline et d'alanine sont placés en position P2. En fait, la nature de l'acide aminé en position P2 a également influencé la spécificité en position P1, comme l'illustrent les différences observées entre

l'activité de Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-pNA (19%), Suc-(Ala)₂-Leu-pNA (88%), Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA (7%) et Suc-(Ala)₂-Phe-pNA (65%).

Tous les résultats obtenus illustrent clairement que le profil de spécificité de KERZT-A et B est déterminé non seulement par la position P1, mais également par d'autres sous-sites (P2 et P3), une caractéristique précédemment démontrée pour les kératinases microbiennes KERUS [267], SAPB [280], KERCA [277] et KERDZ [275].

4.7 Application biotechnologique des protéases kératinolytiques

Actuellement, les peptidases extracellulaires représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles offrent notamment dans la substitution des agents chimiques toxiques [281]. Dans ce contexte, des efforts ont été consentis afin de développer de nouvelles kératinases avec une forte activité de l'épilage/pelage. En outre, pour pallier aux problèmes environnementaux causés par l'accumulation des plumes de volailles, des kératinases bactériennes ont été utilisées pour gérer et convertir ces plumes en farines de plumes riches en acides aminés, des engrais à usage agricole et des protéines digestibles utilisées comme additifs alimentaires pour animaux [282].

4.7.1 Evaluation des performances des enzymes dans la dégradation des plumes de volailles

La biodégradation des plumes de volailles a été appliquée sur des plumes de poulet et de canard. Elles ont été collectées dans un abattoir, rincées et autoclavées. La capacité de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 à croître sur un milieu à base de plumes de poulet et de canard à raison de 10 g/L comme seule source de carbone et d'azote a été tout d'abord étudiée. Il a été constaté que la souche est capable de croître sur ce milieu de culture et, de produire des kératinases permettant la dégradation et la solubilisation presque totale des plumes, après 42 h de culture (Appendice C).

Après avoir prouvé que la souche *B. amyloliquefaciens* S13 produit une activité kératinolytique extracellulaire nécessaire pour la préparation d'hydrolysats protéiques de plumes, les plumes entières ont ensuite été incubées séparément pendant 42 h à 30 °C et sous une agitation de 200 rpm avec des enzymes semi-purifiées. Après incubation, la kératine en culture a été récupérée par filtration sur papier Whatman N ° 3, lavée deux fois avec de l'eau distillée et séchée à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Le pourcentage de biodégradation des plumes a été calculé à partir des différences de poids des plumes secs résiduelles des échantillons traités et des témoins (plumes sans enzymes semi-purifiées). La concentration en protéines a été mesurée comme décrit par Bradford [282] et la libération de groupes sulfhydryles dans le milieu de culture a été estimée à 412 nm en utilisant du DTNB selon la méthode d'Ellman [283].

En outre, la détection des acides aminés soufrés et d'autres acides aminés a été effectuée par CLHP en utilisant une colonne analytique Eurospher 100-5 C18 (300 mm x 4,6 mm, Knauer, Berlin, Allemagne) avec 50% (v/v) d'acétonitrile dans de l'acétate de sodium 10 mM (pH 4,9) comme éluant à un débit de 1 mL/min. Les acides aminés ont été détectés à une longueur d'onde de 254 nm avec un détecteur UV-Visible à barrette de Diodes.

Les résultats présentés sur la figure 4.8 montrent la présence d'une action efficace des enzymes semi-purifiés sur la plume entière. Elle se traduisait par les différents aspects des plumes au niveau des différents tubes en comparaison aux témoins correspondants, ainsi, par la dégradation totale observée après 42 h d'incubation. Par ailleurs, une augmentation simultanée de la concentration de protéines et de la formation de groupes sulfhydryle a été observée (Tableau 4.14). En fait, au cours du processus de dégradation de la kératine des plumes, les enzymes kératinolytiques agissent sur les liaisons disulfures de la kératine et réduisent la cystine en cystéine. En outre, les résultats de l'analyse CLHP des produits de biodégradation des plumes (Tableau 4.14) ont révélé une augmentation remarquable de la libération d'acides aminés après 42 h d'incubation. Les résultats suggèrent que l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la thréonine,

la phénylalanine et la cystéine sont les principaux acides aminés libérés de plumes de poulet et de canard, tandis qu'aucun acide aminé n'est détecté avec les plumes non traitées (témoin). Les profils d'acides aminés libérés correspondent bien à ceux précédemment rapportés pour les enzymes kératinolytiques produites par les souches *B. licheniformis* PWD-1 [269], *B. pumilus* CBS [280], *B. circulans* DZ100 [263] et *Br. brevis* US575 [267].

Tableau 4.14 : Capacité des enzymes semi-purifiées dans la biodégradation des plumes de volaille (poulet et canard)

Analyses	Plumes	
	Poulet	Canard
Acides aminés libérés	Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Cys	Ala, Val, Leu, Ile, Met, Thr, Phe, Cys
Groupe SH libre (μM)	8.05 ± 0.5	7.12 ± 0.4
Quantité de protéine soluble (mg/mL)	5.86 ± 0.2	6.79 ± 0.3
Activité kératinolytique (U/mL)	8000 ± 35	6500 ± 35
% de biodegradation de la kératine	100 ± 2.5	100 ± 2.5

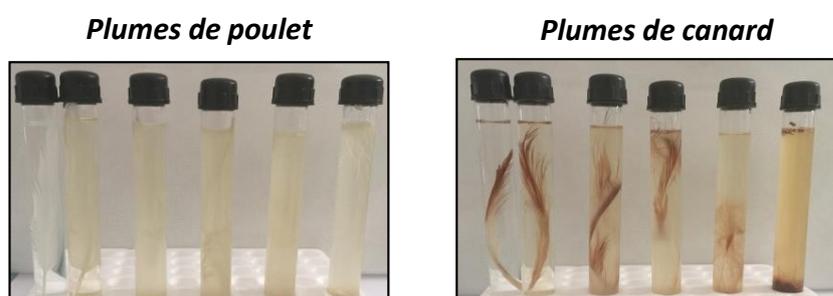


Figure 4.8 : Évaluation de la performance des kératinases semi-purifiées dans la biodégradation des plumes de volaille

Par voie de conséquence, l'utilisation de méthodes enzymatiques pour la biodégradation des plumes s'avère très intéressante car elle offre des conditions de réaction peu coûteuses et représente un traitement écologique de l'industrie avicole par l'amélioration des valeurs nutritionnelles des déchets kératinolytiques par la production de produits de valeur, qui peuvent être utilisés comme additifs dans l'alimentation des animaux ou dans la génération de peptides bioactifs.

4.7.2 Test de l'activité de l'épilage des enzymes semi-purifiées

Le test de l'activité de l'épilage a été effectué en utilisant des peaux brutes de moutons, de chèvres et de bovins provenant d'un abattoir local (abattoir de Blida, Algérie). Les peaux ont été découpées et soigneusement lavées à l'aide d'eau distillée afin d'éliminer les traces de sang. Le test de l'activité de l'épilage consiste à placer des petits morceaux des peaux coupés à une taille de 8 cm x 8 cm dans 100 mL d'enzymes semi-purifiées, à la fin du processus, la qualité de la peau épilée est estimée en fonction de l'aspect observé à l'œil nu. Après 20 h d'incubation à 30 °C, les peaux ont été retirées et les poils ont été éliminés à la main afin de déterminer le pouvoir d'élimination manuelle.

Les résultats illustrés par la figure 4.9 montrent qu'aucun endommagement des constituants du collagène du cuir n'a été observé à l'œil nu. De plus, les peaux traitées conservent leurs textures avec des porosités claires, comparées au témoin qui reste intact (pourvu de poils). En fait, dans le processus enzymatique, les enzymes dissolvent les protéines capillaires sans affecter la structure de la peau.

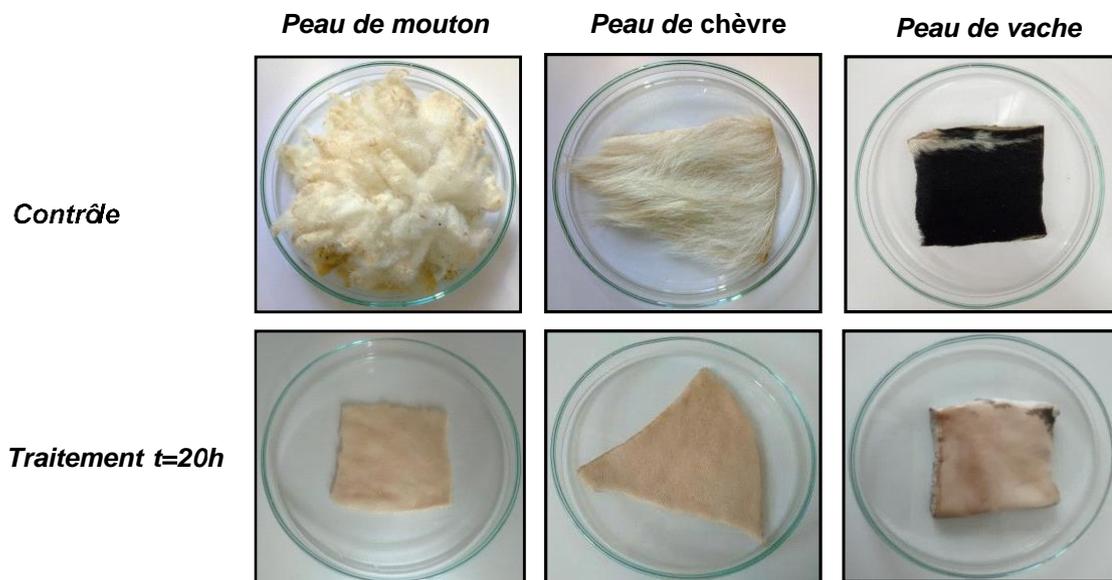


Figure 4.9 : Évaluation de la performance des kératinases semi-purifiées dans l'activité de l'épilage

Des résultats relativement similaires ont été précédemment obtenus par l'enzyme KERUS de *Br. brevis* US575 sur des peaux de moutons, de chèvres et de bovins à pH 8 et à 40 °C [267]. De même, la kératinase alcaline SAPDZ produite par *B. pumilus* CBS à la potentialité d'accomplir toute seule le processus d'épilage sur des petits morceaux des peaux brutes de lapin, de chèvre, de vache et de mouton qui confirme la dégradation des protéines kératinolytiques [280].

À cet égard, les deux enzymes KERZT-A et B peuvent être considérées comme des potentiels candidats dans les opérations de rivières (épilage enzymatique) lors du traitement du cuir afin de réduire essentiellement l'utilisation des réactifs chimiques polluants pour l'environnement.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de la publication n°2 parue dans « International Journal of Biological Macromolecules », dont l'intitulé est : Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les objectifs assignés à ce travail étaient d'une part l'étude chimique et l'investigation des potentialités antioxydantes des métabolites phénoliques isolés de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, et d'autre part, la valorisation des bactéries isolées à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii* dans la production des métabolites primaires et secondaires d'intérêt bioactif, environnemental et industriel. Pour atteindre ces objectifs, les travaux réalisés durant cette thèse ont été décrits dans quatre chapitres qui ont été successivement développés dans ce manuscrit.

Le premier chapitre a été consacré à une synthèse bibliographique dans laquelle nous avons tenté de donner, une approche générale sur les algues brunes et les microorganismes associés. Elle a permis de passer en relief la classification des algues marines, l'étude systématique de l'espèce étudiée *Zonaria tournefortii*, la composition phénolique des algues brunes et la diversité microbienne des microorganismes autoctones des algues brunes. Ensuite nous avons abordé l'étude des composés bioactifs dérivés de microorganismes dans laquelle nous avons essayé de rassembler les étapes et les procédures nécessaires pour la recherche et la découverte de composés bioactifs d'origine microbienne, suivie par les principales études antérieures rapportant les différents composés bioactifs produits par des microorganismes d'algues brunes. Nous avons complété cette partie par la présentation de notions relatives aux enzymes kératolytiques produits par des microorganismes et leurs applications biotechnologiques dans les différents domaines.

Le deuxième chapitre a été réservé d'une part à l'étude chimique et à l'investigation des potentialités antioxydantes des métabolites phénoliques isolés de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, et d'autre part à l'isolement et la caractérisation phénotypique des souches bactériennes cultivables de *Zonaria tournefortii*.

L'étude chimique de l'extrait lipidique de *Zonaria tournefortii* nous a permis l'isolement des dérivés du phloroglucinol en particulier les acylphloroglucinols déjà isolés par les chercheurs italiens à partir de la même espèce récoltée en Sicile. Nous avons réalisé leur identification par comparaison de leurs données RMN avec celle de la littérature. Nous avons évalué par la suite le potentiel antioxydant des produits phénoliques isolés au moyen de cinq méthodes complémentaires, à savoir : le piégeage du radical DPPH^{*}, le piégeage du radical-cation ABTS^{**}, la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC, le blanchiment de β -carotène et le pouvoir chélateur des ions ferriques. Les résultats ont montré que tous les composés testés avaient une activité antioxydante potentielle. Dans les méthodes DPPH et ABTS, les acylphloroglucinols (1) et (2) se sont révélés être les composés les plus actifs avec des valeurs de CE₅₀ de $42,76 \pm 0,26$ et $50,46 \pm 0,12$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ par la méthode DPPH et de $12,04 \pm 1,60$ et $12,73 \pm 1,47$ $\mu\text{g. mL}^{-1}$ par le test ABTS, respectivement. En revanche, dans les méthodes β -carotène et CUPRAC, les dérivés chromones (3) et (4) ont montré les activités antioxydantes les plus élevées avec des valeurs de CE₅₀ de $23,76 \pm 0,63$ et $20,99 \pm 2,70$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ dans l'essai du β -carotène et $19,06 \pm 0,11$ et $17,72 \pm 0,26$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ dans l'essai de CUPRAC, respectivement. Par ailleurs, tous les dérivés phénoliques étudiés ont démontré une puissante capacité de chélation des ions ferreux, avec un niveau d'activité plus au moins identique. En outre, tous les produits ont montré une activité relativement élevée par rapport au contrôle positif EDTA.

Ainsi, nous avons pu obtenir, à travers deux techniques d'isolement, trente souches bactériennes cultivables en milieu de culture VNSS, à partir de l'algue *Zonaria tournefortii* récoltée sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique « Corne d'Or » à Tipaza. Nous avons réalisée par la suite une caractérisation préliminaire des souches bactériennes isolées en utilisant des méthodes conventionnelles qui font appel aux caractères d'identification classique (caractéristiques macroscopiques, microscopiques, biochimiques et métaboliques). Les tests bactériologiques préliminaires nous ont permis de rattacher les isolats aux genres *Staphylococcus* (14 isolats), *Bacillus* (12 isolats) et *Acinetobacter* (2 isolats), et à la famille des *Entérobacteraceae* (2 isolats).

Le troisième chapitre a été dédié à l'étude de production et de caractérisation chimique des métabolites antimicrobiens diffusibles et volatils de la souche *B. amyloliquefaciens* S13. Il a été organisé selon l'ordre suivant : nous avons exposé dans la première partie un programme de criblage de trente souches bactériennes isolées à partir de l'algue *Zonaria tournefortii* par évaluation de leur capacité de production de métabolites antimicrobiens diffusibles et volatils sur milieu solide. L'examen de l'ensemble des résultats obtenus, a conduit à la sélection d'une souche bactérienne identifiée en tant que *Bacillus amyloliquefaciens* S13. Nous avons enchaîné par l'optimisation de la production en milieux liquides des métabolites antimicrobiens de la souche bactérienne choisie. Il en ressort que cette souche a été apte à donner une meilleure croissance bactérienne et une production de métabolites antimicrobiens après une culture à 30 °C pendant 48 h dans un milieu Luria-Bertani (LB) additionné de 15 ‰ NaCl, avec un pH initial de 7,2 sous agitation à 180 tours par minutes.

Nous avons ensuite abordé l'étude chimique de métabolites antimicrobiens volatils et diffusibles. Les métabolites antimicrobiens volatils ont été extraits à partir du surnageant de culture par hydrodistillation en utilisant un cleverger et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les principaux composés volatils identifiés sont l'oxyde de 13-épi-manoyle (29,39%), le manool (17,39%), 15,16-dinorlabd-8 (20)-en-13-one (13,17%), labda-8 (17), 13Z-dién-15-ol (9,51%) et oxyde de 3 α -hydroxy-13-épi-manoyle (5,26%) appartenant à la classe des diterpènes de type labdane. D'autres composés représentant différentes classes chimiques ont également été identifiés dans la composition chimique. Nous avons ainsi testé l'activité antimicrobienne de la fraction volatile produite, et déterminé sa concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis de microorganismes pathogènes. Les résultats ont indiqué que parmi les microorganismes testés, *Saccharomyces cerevisiae* (24 \pm 0,3 mm; CMI = 64 μ g/mL) était la souche la plus sensible, suivie par *Agrobacterium tumefaciens* (20 \pm 0,5 mm; CMI = 128 μ g/mL) et *Bacillus subtilis* (18 \pm 0,8 mm; CMI = 128 μ g/mL).

Concernant les métabolites antimicrobiens diffusibles, nous avons effectué l'extraction en utilisant deux méthodes destinées à l'extraction des métabolites antimicrobiens extracellulaires et intracellulaires. Après avoir testé les différents extraits par antibiographie, il a été montré que l'extrait obtenu par le culos bactérien n'a présenté aucune activité, tandis que les extraits organiques du surnageant de culture ont révélé des activités antimicrobiennes envers tous les germes-cibles. Il a été montré également que l'acétate d'éthyle s'est révélé être le meilleur solvant d'extraction suivi par le dichlorométhane. En fin, nous avons réalisé la déréplication des extraits de culture obtenus par l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (CL/ESI-SMHR) afin d'évaluer leur potentiel de nouveauté par la détermination de la composition chimique de ces extraits et la détection de la présence de métabolites secondaires déjà décrit dans la littérature et qui pourraient expliquer les activités biologiques observées. Les résultats ont montré que les extraits privilègent essentiellement le métabolisme des composés dipeptidiques cycliques de la famille de 2,5-dicétopipérazines (DKP), dont les principaux composés sont : cyclo-(L-proline-L-leucine), cyclo-(L-proline-L-isoleucine), cyclo-(L-proline-L-phénylalanine), cyclo-(L-Leucine,L-Tyrosine) et le cyclo-(L-isoleucine-L-isoleucine).

Le quatrième chapitre a été réalisé dans le cadre du projet de recherche tuniso-algérien « TNDZMicrooZymes 2012-2016 ». Nous avons rapporté dans ce chapitre une étude de production, purification et caractérisation biochimique de deux kératinases thermostables, nommées KERZT-A et KERZT-B, produites par *B. amyloliquefaciens* S13 isolée à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*. Les deux kératinases ont été purifiées à partir d'une culture de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 sur un milieu optimisé à base de farine de plume de poulet. L'analyse SDS/PAGE des deux enzymes pures a montré qu'elles sont sous forme d'un seul monomère ayant une taille estimée de 28 kDa pour KERZT-A et 47 kDa pour KERZT-B. Leurs résidus NH₂ terminales ont montré une homologie élevée avec ceux des kératinases du genre *Bacillus*. La caractérisation biochimique des deux enzymes a montré que les valeurs optimales de pH et de température sont de 6,5, 50 °C et 8, 60 °C pour KERZT-A et KERZT-B, respectivement. Nous avons montré également que la thermoactivité et thermostabilité de la KERZT-A et KERZT-B sont

améliorées respectivement en présence de 5mM de Ca^{2+} et 2 mM de Mn^{+2} . En outre, nous avons montré que les deux enzymes KERZT-A et B appartiennent à la famille des kératinases à sérine. Les caractéristiques biochimiques intéressantes de KERZT-A et KERZT-B nous ont permis de conclure que ces enzymes pourrait ouvrir de nouvelles opportunités prometteuses pour l'opération d'épilage enzymatique, une étape clé pour le traitement des cuirs, et pour la valorisation des déchets kératinolytiques des industries avicole et la réduction de ses impacts sur l'environnement.

Les perspectives envisageables au terme de cette thèse concernent divers objectifs:

- Etude pharmacologique (activités anti-diabétique, anticholinestérase, anti-inflammatoire, ...) des dérivés d'acylphloroglucinol isolés de *Zonaria tournefortii*.
- Identification moléculaire du gène de l'ARNr 16S des souches bactériennes isolées de *Zonaria tournefortii*.
- Optimisation des conditions de culture et de production de métabolites antimicrobiens par utilisation de l'approche OSMAC (One Strain-Many Compounds).
- Optimisation des conditions de culture et de production à l'échelle fermenteur des kératinases KERZT-A et B et application des deux enzymes dans le traitement du cuir à l'échelle semi-industrielle.
- Clonage, séquençage et expression des gènes qui codent pour les deux enzymes.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications internationales

1. **Hamiche, S.**, Badis, A., Jaouadi, B., Bouzidi, N., Daghbouche, Y., Utczás, M., Mondello, L. et El Hattab, M., "Identification of antimicrobial volatile compounds produced by the marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 newly isolated from brown alga *Zonaria tournefortii*", Journal of Essential Oil Research, (2019), in press.
2. **Hamiche, S.**, Mechri, S., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., Badis, A. et Jaouadi, B., "Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities", International Journal of Biological Macromolecules, V. 122, (2019), 758-769.
3. **Hamiche, S.**, Bouzidi, N., Daghbouche, Badis, A., Garriguesn, S., et El Hattab, M., "Eucalyptol-based green extraction of brown alga *Zonaria tournefortii*", Sustainable Chemistry and Pharmacy, V.10, (2018), 97-102.

Communications internationales

1. **Hamiche, S.**, Mechri, S., Omrane Benmrad, M., Badis, A., Jaouadi, B. et El Hattab, M., "Production and biochemical characterisation of two keratinolytic serine protease from *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 dor feayher biodegradation process", Journées Internationales de Biotechnologie, Décembre 2016, Tunisie.
2. **Hamiche, S.**, Nessal, A., Badis, A. et El Hattab, M., "Isolation and identification of antimicrobial volatile compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 isolated from the brown algae *Zonaria tournefortii*", 1er Congrès International sur les biotechnologies au service du développement durable, Octobre 2017, Boumerdes.

3. **Hamiche, S.**, Bouzidi, N., Daghbouche, Y., Badis, A. et El hattab, M., "Etude chimique et valorisation biologique de l'extrait brut et de l'huile essentielle de l'algue brune *Zonaria tournefortii*", 3ème Congrès International de la SAN, Novembre 2017, Constantine.
4. **Hamiche, S.**, Badis, A., Bensouici, C., Gali, L., El hattab, M., " An assessment of in vitro antioxidant activities of acylphloroglucinols derivatives isolated from brown algae *Zonaria tournefortii*", 4èmes Journées Internationales de Chimie Organique, Décembre 2018, Annaba.
5. **Hamiche, S.**, Djellouli, N., Bouzidi, N., Daghbouche, Y. et El Hattab, M., "Etude phytochimique de la fraction volatile de *Laurencia obtusa* : Détermination de l'activité antimicrobienne", Troisièmes journée internationales de Chimie organique, Décembre 2015, Annaba.
6. 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.
7. Saidani, F., Beichi, M., Ferradji, F.Z., Mesbaiah, F.Z., **Hamiche, S.**, Badis, A. et El Hattab, M., "Contribution à l'étude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène par des souches de genre *Bacillus* et *Streptomyces*", 1er Congrès International sur les biotechnologies au service du développement durable, Octobre 2017, Boumerdes.
8. 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.
9. Saidani, F., Beichi, M., Ferradji, F.Z., **Hamiche, S.**, Badis, A., El Hattab, M., "New production of bioactive compounds by biotransformation of α -pinene using the marine bacteria", Colloque International Biosciences, Octobre 2018, Oran.

Communications nationales

1. **Hamiche, S.**, Mechri, S., Omrane Benmrads, M., Badis, A., Jaouadi, B. et El Hattab, M., "Production et caractérisation biochimique de deux protéases kératinolytiques de *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 d'intérêt biotechnologique dans la dégradation des plumes", 2^{ème} Journées de Biologie des Systèmes Microbiens, Novembre 2016, Kouba.
2. **Hamiche, S.**, Khelouia, L., Mechri, S., Badis, A., Jaouadi, B. et El Hattab, M., "Novel serine keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 exhibiting promising potential hide dehairing abilities", Séminaire National de Génie de Procédés, Novembre 2018, Blida.
3. **Hamiche, S.**, Boubekri, S., Bouzidi, N., Daghbouche, Y. et El Hattab, M., "Phytochemical study and antimicrobial activity of the essential oil of *Gigartina pistillata*", Séminaire National sur les Substances Bioactives, Novembre 2015, Bejaia.
4. Khelouia, L., **Hamiche, S.**, Mokdad, K., Edouaouda, K. et Badis, A., "Etude de la double production (protéase-biosurfactant) chez une souche bactérienne isolée localement : Application en agroalimentaire", 1^{ere} Journée Nationale de l'Agroalimentaire, Engineering et environnement, Avril 2017, Blida.
5. Khelouia, L., Edouaouda, K., **Hamiche, S.**, Nait Bachir, Y., El Hattab, M. et Badis, A., "Caractérisation physico-chimique et structurale d'un biosurfactant issu d'une souche thermophile isolée localement", Séminaire National de Génie de Procédés, Novembre 2018, Blida.

APPENDICES

Appendice A : Liste des abreviations

ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AND	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATEE	<i>N</i> -acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate
ATCC	American Type Culture Collection
BAEE	<i>N</i> -benzol-L-arginine ethyl ester
BCEE	<i>S</i> -benzyl-L-cysteine ethyl ester hydrochloride
BHA	Hydroxyanisol butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
BTEE	<i>N</i> -benzol-L-tyrosine ethyl ester
CCMHP	Chromatographie sur couche mince haute performance
CE	Conseil d'Energie
CE ₅₀	Concentration efficace médiane
CIM	Concentration minimale inhibitrice
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CL/ESI- SMHR	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution
CLSA	Closed Loop Stripping Analysis
COVs	Composés organiques volatils
CUPRAC	Cupric ion reducing antioxidant capacity
DAD	Détecteur a barrette de diodes
DFP	Diisopropylfluoro-phosphate
DKP	2,5-dicétopipérazines
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EPG	Phloroglucynol Equivalence
FDA	Food and Drug Administration

FPP	Farine de plume de poulet
GNFP	Gélose nutritive à base de farine de plumes
GNL	Gélose nutritive au lait
HEPES	Acide 4-(2- hydroxy éthyl)-1-piperazine éthane sulfonique
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier
LB	Luria-Bertani
LD-DTT	LD-dithiothreitol
2-ME	2-mercaptoethanol
NEM	Ethylmaleimide
MES	Acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSMAC	One Strain-Many Compounds
PBS	Phosphate buffered saline
pCMB	p-chloromercuribenzoate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phénylméthylsulphonyl fluoride
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive oxygen species
%RSA	Radical Scavenger Activity
SBTI	Soybean trypsin inhibitor
SDE	Simultaneous Distillation Extraction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SM	Spectrométrie de masse
SPME	Solid Phase Microextraction
TAME	<i>N</i> _α - <i>p</i> -tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride
TCA	Acide trichloracétique
TLCK	<i>N</i> _α - <i>p</i> -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
TPCK	<i>N</i> _α - <i>p</i> -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
UFC	Unités formant colonies
UV	Ultrat violet
VNSS	Väätänen Nine Salt Solution

Appendice B: Données RMN ^1H à 600 MHz dans le DMSO- d_6 des produits isolés de l'algue *Zonaria tournefortii*

- Données RMN ^1H (600 MHz) des composés 1, 2, 3 et 4 dans le DMSO- d_6

N° H	1	2	N° H	3	4
	^1H DMSO- d_6 600 MHz δ (ppm)	^1H DMSO- d_6 600 MHz δ (ppm)		^1H DMSO- d_6 600 MHz δ (ppm)	^1H DMSO- d_6 600 MHz δ (ppm)
1'	--	--	--	--	--
2'	--	--	2'	--	--
3'	--	--	3'	6.13	2.59 and 2.73 Sys. AB
4'	5,86 s large	5.87 s	4'	--	--
5'	--	--	5'	--	--
6'	5,86 s large	5.87 s	6'	6.31 d	6.13
--	--	----	7'	--	--
--	--	--	8'	6.16 d	6.31 d
--	--	--	9'	--	--
--	--	--	10'	--	--
1	--	--	1	2.61 t	5.26-5.40 m
2	3,06 t (7)	3.04 t (7)	2	1,71 quint	1.23 q large
3	1,76 quint (7)	1.73 quint. (7)	3	2.12 q	2.17 q
4	2,16 q (7)	2.13 q (7)	4	5,22-5,44 m	5,26-5,40 m
5	5,29-5,45 m	5.29 - 5.47 m	5	5,22-5,44 m	5,26-5,40 m
6	5,29-5,45 m	5.29 - 5.47 m	6	2,72-2.83 m	2,71-2.83 m
7	2,76-2,88 m	2.78 t large	7	5,22-5,44 m	5,26-5,40 m
8	5,29-5,45 m	5.29 - 5.47, m	8	5,22-5,44 m	5,26-5,40 m
9	5,29-5,45 m	5.29 - 5.47, m	9	2,72-2.83 m	2,71-2.83 m
10	2,76-2,88 m	2.92 q (7)	10	5,22-5,44 m	5,26-5,40 m
11	5,29-5,45 m	5.29- 5.47 m	11	5,22-5,44 m	2,71-2.83 m
12	5,29-5,45 m	5.97 t (11)	12	2,72-2.83 m	5,26-5,40 m
13	2,76-2,88 m	6.58 dd (11; 15)	13	5,22-5,44 m	2,71-2.83 m
14	5,29-5,45 m	5.71 dd (6,5; 15)	14	5,22-5,44 m	2,71-2.83 m
15	5,29-5,45 m	4.31 q (6,5)	15	2,72-2.83 m	5,26-5,40 m
16	2,76-2,88 m	2.37 m	16	5,22-5,44 m	2,71-2.83 m
17	5,29-5,45 m	5.58 dt (6,5; 10,5)	17	5,22-5,44 m	2,71-2.83 m
18	5,29-5,45 m	5.29 - 5.47 m	18	2.01 quint	1.97 quint
19	2,08 quint. (7)	2.05 quint. (7)	19	0,85 t	0,85 t
20	0,97 t (7)	0.95 t (7)	20	12.80 (OH)	12.83 (OH)

- Données RMN ^1H (600 MHz) du composé 5 dans le DMSO- d_6

N° H	5
	^1H DMSO- d_6 600 MHz δ (ppm)
1'	--
2'	--
3'	--
4'	5,86 s large
5'	--
6'	5,86 s large
1	--
2	3,06 t (7)
3	1,76 quint (7)
4	2,16 q (7)
5	5,29-5,45 m
6	5,29-5,45 m
7	2,76-2,88 m
8	5,29-5,45 m
9	5,29-5,45 m
10	2,76-2,88 m
11	5,29-5,45 m
12	5,29-5,45 m
13	2,76-2,88 m
14	5,29-5,45 m
15	5,29-5,45 m
16	2,76-2,88 m
17	5,29-5,45 m
18	5,29-5,45 m
19	2,08 quint. (7)
20	0,97 t (7)

Appendice C: Composition des milieux de culture

Le milieu VNSS

NaCl	17,60 g
Na ₂ SO ₄	1,47 g
NaHCO ₃	0,08 g
KCl	0,25 g
KBr.....	0,04 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	1,87 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,41 g
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g
H ₃ BO ₃	0,01g
Peptone.....	1,00 g
Extrait de levure.....	0,50 g
Glucose.....	0,50 g
Amidon soluble.....	0,50 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01 g
Na ₂ HPO ₄	0,01 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 mL

Le milieu Zobell

Peptone	5 g
Extrait de levure.....	1 g
Eau de mer filtrée.....	800 mL
Eau ultra-pure	q.s.p. 1000 mL

Le milieu LB

Peptone.....	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl.....	15 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 mL

Le milieu 333

Glucose.....	5 g
Peptone.....	3 g
Extrait de levure.....	3 g
Amidon.....	10 g
CaCo ₃	2 g
NH ₄ NO ₃	3 g
Eau distillée.....	q.s.p 1000 mL

Le milieu Bennett

Glucose.....	10 g
Peptone.....	2 g
Extrait de levure.....	1 g
Extrait de viande.....	1 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1000 mL

Le milieu gélose nutritive au lait (GNL)

Extrait de levure.....	3 g
Peptone.....	5 g
Agar.....	15 g
Lait écrémé (0 % MG).....	250 mL
Eau distillée	q.s.p. 1000 mL

Le milieu gélose nutritive à la farine de plumes (GNFP)

Farine de plumes.....	5 g
Peptone de soja.....	2 g
Extrait de levure.....	3
Agar.....	15 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 mL

Tampon phosphate salin PBS (x1)

NaCl.....	5 g
KCl.....	2 g
Na ₂ HPO ₄	3
KH ₂ PO ₄	15 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 mL

Appendice D: Dégradation des substrats kératinolytiques par la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 (A) : plumes de poulets, (B) : plumes de canards

(A)



(B)



Après 42 h de culture



30°C



37°C



45°C



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Gordon, M.C. et David, J.N., "Natural products: A continuing source of novel drug leads", *Biochimica et Biophysica Acta*, V. 1830, (2013), 3670-3695.
2. Daniel, A.D., Sylvia, U. et Ute, R., "A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery", *Metabolites*, V. 2, (2012), 303-336.
3. Nicholas, E.T., Dimakatso, A.S., Arielle, R., Daniella, M., Palesa, S., Alfred, M. et Kevin D., "Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery", *International Journal of Molecular Sciences*, V. 19, (2018), 1578-1606.
4. 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.
5. Brent, E., Janet, E.N. et Paul, W., "Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals", *Biotechnology Journal*, V. 7, (2012), 176-185.
6. Lucas, F.S., Broennimann, O., Febbraro, I. et Heeb, P., "High Diversity among Feather-Degrading Bacteria from a Dry Meadow Soil", *Microbial Ecology*, V. 45, (2003), 282-290.
7. Ribier, J., et Godineau, J.C, "Les algues-Connaissances, utilisation, culture", Paris : Ed. Flammarion, (1984), 281p.
8. Gayral, P. et Cosson, J., "Connaitre et reconnaitre les algues marines", Ouest France : (1986), 222p.
9. De Reviers, B., "Biologie et phylogénie des algues", Paris : Ed. Belin, (2002).
10. 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, (1985), 119-129.
11. Lûning, K., "Seaweeds Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology", John Wiley and Sons, Inc, (1990), 527p.
12. Boudouresque, C.F., Meinesz, A. et Verlaque, M., "Guide des algues des mers d'Europe : méditerranée", Paris : Ed. Delachaux et Niestlé, (1992), 239-226.

13. 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.
14. 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, (2019), 100450.
15. Round, F.E., "The taxonomy of the Chlorophyta", *British Phycological Bulletin*, V. 4, (2007), 224-235.
16. 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, (2017), 322-332.
17. 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.
18. Wehr, J.D., "Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification, A volume in Aquatic Ecology", Academic Press, (2015), 851-871.
19. Kornprobst, J.M. "Substances naturelles d'origine marine, chimiodiversité, pharmaco-diversité, biotechnologie", Ed. TEC & DOC, (2005), 160-191.
20. Debray, F., "Catalogue des algues du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie", Alger : Ed. HJourdan, (1893), 78p.
21. 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, (1997), 303-311.
22. 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.
23. Cabioc'h, J., Fločh, 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.
24. Bruneton, J., "Pharmacognosie: Phytochimie-Plantes médicinales", Paris : 4^{ème} Ed. Lavoisier Tec & Doc., (2009), 261p.

25. Bruneton, J., "Pharmacognosie: Phytochimie-Plantes médicinales", Paris : 3^{ème} Ed. Lavoisier Tec & Doc., (1999), 1120p.
26. Imbsa, T.I. et Zvyagintseva, T.N., "Phlorotannins are Polyphenolic Metabolites of Brown Algae", Russian Journal of Marine Biology, V. 44, (2018), 263-273.
27. Venkatesan, J., KumarKeekan, K., Anil, S., Bhatnagar, I., KwonKim, S., "Phlorotannins", Encyclopedia of Food Chemistry, (2019), 515-527.
28. Amico, V., "Marine brown algae of family Cystoseiraceae: Chemistry and Chemotaxonomy", Phytochemistry, V. 39, (1995), 1257-1279.
29. Gutiérrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Castillo-López, R.I., Heredia, J.B., "Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility", Archivos Latinoamericanos de Nutrición, V. 66, (2016), 87-100.
30. Pullaiah, C.P, Thyagaraju, K., Nelson, V.K., Kumar, G.V.N., Babu, G.B., Reddy, D., "Phlorotannins and their biological significances", Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences, V. 9, (2018), 4893-4904.
31. Machéix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., "Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique", PPUR, Presses polytechniques et Universitaires Romandes, (2005).
32. Ye, H., Zhou, C., Sun, Y., Zhang, X., Liu, J., Hu, Q. et Zeng, X., "Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*", Journal of European Food Research and Technology, V. 230, (2009), 101-109.
33. Shahid, M., Yusuf, M. et Mohammad, F., "Plant Phenolics: A Review on Modern Extraction Techniques", Analytical and Processing Techniques, V. 41, (2015).
34. Suwal, S. et Marciniak, A., "Technologies for the Extraction, Separation and Purification of polyphenols - A Review", Nepal Journal of Biotechnology. V. 6, (2018), 74-91.
35. Khoddami, A., Wilkes, M.A. et Roberts, T.H., "Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds", Molecules, V. 18, (2013), 2328-2375.
36. Sung-Hwan, E., Young-Mog, K. et Se-Kwon, K., "Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae", Food and Chemical Toxicology, V. 50, (2012), 3251-3255.
37. Ragan, M. A., "Physodes and the Phenolic Compounds of Brown Algae, Composition and Significance of Physodes in vivo", Botan ica Marina, (1976), 145-154.

38. Ragan, M.A. et Glombitza, K.W., "Phlorotanins, brown algal polyphenols», Progress in Phycological research", 4, (1986), 129-241.
39. Glombitza, K.W. et Zieprath, G., "Phlorotanins from the brown alga *Analipus japonicus*", Planta Medica., V. 55, (1989), 171-175.
40. Glombitza, K.W. et Rösener, H.U., "Bifuhalol: ein diphenyläther aus *Bifurcaria bifurcata*", Phytochemistry, V. 13, (1974), 1245-1247.
41. Glombitza, K.W., Schnabel, C. et Koch, M., "Antibiotica aus algen. 27. Mitt. niedermolekulare phlorotannine der braunalge *Cystoseira baccata* (Gmelin) Silva -Teil II. ", Archiv der Pharmazie, V. 314, (1981), 602-608.
42. Glombitza, K.W. et Schmidt, A., "Trihydroxyphlorethols from the brown alga *Carpophyllum angustifolium*", Phytochemistry, V. 51, (1999), 1095-1100.
43. Koch, M. and Gregson, R.P., "Brominated phlorethols and nonhalogenated phlorotannins from the brown alga *Cystophora congesta*", Phytochemistry, V. 23, (1984), 2633-2637.
44. Geiselman, J.A. et Mcconnell, O.J., "Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*", Journal of Chemical Ecology, V. 7, (1981), 1115-1133.
45. Glombitza, K.W., Rauwald, H.W. et Eckhardt, G., "Fucophlorethole, polyhydroxyoligo-phenyläther aus *Fucus vesiculosus*", Planta Medina, V. 32, (1977) 33-45.
46. Amico, V., Currenti, R., Oriente, G., Piattelli, M. et Tringali, C., "A phloroglucinol derivative from the brown alga *Zonaria tournefortii*", phytochemistry, V. 20, (1981), 1451-1453.
47. Amico; V., Nicolosi, G., Oriente, G., Piatelli, M. et C. Tringali, "A novel acylphloroglucinol from the brown alga *Zonaria tournefortii*", Phytochemistry, V. 21, (1982), 739-741.
48. Tringali, C. et Piatelli, M. "Two chromone derivatives from the brown alga *Zonaria tournefortii*", Tetrahedron letters, V.23, (1982), 1509-1512.
49. Tringali, C. et Piatelli, M., "Further metabolites from the brown alga *Zonaria tournefortii*", Gazzetta Chimica Italiana, V. 112, (1982), 1509-1512.
50. El Hattab, M., Bouzidi, N., Ortao-Magné, A., Daghbouche, Y., Richou, M., Chitour, S.E., Reviers, B. et Piovetti, L., "Eicosapentaenoic acid: Possible precursor of the phloroglucinol derivatives isolated from the brown alga *Zonaria*

- tournefortii* (J.V. Lamouroux) Montagne”, *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 37, (2009), 55-58.
51. Gerwick, W. et Fenical, W., “Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales”, *Phytochemistry*, V. 21, (1982), 633-637.
 52. Wisespongpan, P. et Kuniyoshi, M., “Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana*”, *Journal of Applied Phycology*, V. 15, (2003), 225-228.
 53. Kusumi, T., Ooi, T. et Uchimura, H., “The conformation of the 17-O-MTPA Eicosatetraenoyl chain of a marine acylphloroglucinol”, *Tetrahedron Letters*, V. 35, (1994), 3127-3128.
 54. Blackman, A.J. et Rogers, G.I., “Phloroglucinol derivatives from three Australian marine algae of the genus *Zonaria*”, *Journal of natural products*, V. 51, (1988), 158-160.
 55. Quéguineur, B., Goya, L., Romos, S., Martin, M.A., Mateos, R. et Bravo, L., “Phloroglucinol: antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line”, *Food chemical Toxicology*, V. 50, (2012), 2886-2893.
 56. Laird, D.W., Bennett, S., Bian, B., Sauer, B., Wright, K., Hughes, V. et Altena, I.A., “Chemical investigation of seven Australasian Cystophora species: New chemistry and taxonomic insights”, *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 38, (2010), 187-194.
 57. 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).
 58. 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.
 59. Kebede, B., Wrigley, S.K., Prashar, A., Rahlff, J., Wolf, M., Reinshagen, J., Gribbon, P., Imhoff, J.F., Silber, J., Labes, A. et Ellinger, B., “Establishing the Secondary Metabolite Profile of the Marine Fungus: *Tolyposcladium geodes* sp. MF458 and Subsequent Optimisation of Bioactive Secondary Metabolite Production”, *Marine Drugs*, V. 15, (2017), 84-104.

60. 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.
61. 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*, (2012), 1-16.
62. Beleneva, I.A. et 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.
63. Nedashkovskaya, O.I., Vancanneyt, M., Van-Trappen, S., Vandemeulebroecke, K., Lysenko, A.M., Rohde, M., Falsen, E., Frolova, G.M., Mikhailov, V.V., Swings, J., “Description of *Algoriphagus aquimarinus* sp. nov., *Algoriphagus chordae* sp. nov. and *Algoriphagus winogradskyi* sp. nov., from sea water and algae, transfer of *Hongiella halophila* Yi and Chun 2004 to the genus *Algoriphagus* as *Algoriphagus halophilus* comb. nov. and emended descriptions of the genera *Algoriphagus* Bowman et al. 2003 and *Hongiella* Yi and Chun 2004”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 54, (2004), 1757-1764.
64. Ivanova, E.P., Nedashkovskaya, O.I., Chun, J., Lysenko, A.M., Frolova, G.M., Svetashev, V.I., Vysotskii, M.V., Mikhailov, V.V., Huq, A. et Colwell, R.R., “*Arenibacter* gen. nov., new genus of the family *Flavobacteriaceae* and description of a new species, *Arenibacter latericius* sp. nov.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 51, (2001), 1987-1995.
65. Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Han, S.K., Snauwaert, C., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, K.O., Lysenko, A.M., Rohde, M., Frolova, G.M., Mikhailov et V.V. et Bae, K.S., “*Winogradskyella thalassocola* gen. nov., sp. nov., *Winogradskyella epiphytica* sp. nov. and *Winogradskyella eximia* sp. nov., marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 55, (2005), 49-55.
66. Manmadhan, K., Hideaki, S., Haldar, S., Shinji, Y. et Shinichi, N., “Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan”, *Annals of Microbiology*, V. 56, (2006), 167-173.

67. Lee, H.S., Kwon, K.K., Yang, S.H., Bae, S.S., Park, C.H., Kim, S.J. et Lee, J.H., "Description of *Croceitalea* gen. nov. in the family *Flavobacteriaceae* with two species, *Croceitalea eckloniae* sp. nov. and *Croceitalea dokdonensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the marine alga *Ecklonia kurome*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 58, (2008), 2505-2510.
68. Bae, S.S., Kwon, K.K., Yang, S.H., Lee, H.S., Kim, S.J. et Lee, J.H., "Flagellimonas eckloniae gen. nov., sp. nov., a mesophilic marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from the rhizosphere of *Ecklonia kurome*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 57, (2007), 1050-1054.
69. Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.A., Zhukova, N.V., Gorshkova, N.M., Buljan, V., Nicolau, D.V., Mikhailov, V.V. et Christen, R., "*Bacillus algicola* sp. nov., a novel filamentous organism isolated from brown alga *Fucus evanescens*", *Systematic and Applied Microbiology*, V. 27, (2004), 301-307.
70. Ivanova, E.P., Christen, R., Alexeeva, Y.V., Zhukova, N.V., Gorshkova, N.M., Lysenko, A.M., Mikhailov, V.V. et Nicolau, D.V., "*Brevibacterium celere* sp. nov., isolated from degraded thallus of a brown alga", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 54, (2004), 2107-2111.
71. Johansen, J.E., Nielsen et P. et Sjøholm, C., "Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 49, (1999), 1231-1240.
72. Prieto, M.L., O'Sullivan, L., Pin-Tan, S., McLoughlin, P., Hughes, H., O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Lawlor, P.G. et Gardiner, G.E., "Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived *Bacillus* spp.", *Marine Drugs*, V. 10, (2012), 2280-2299.
73. Sakai, T., Kimura, H. et Kato, I., "Purification of Sulfated Fucoglucuronomannan Lyase from Bacterial Strain of *Fucobacter marina* and Study of Appropriate Conditions for Its Enzyme Digestion", *Marine Biotechnology*, V. 5, (2003), 380-387.
74. Salaün, S., Kervarec, N., Potin, P., Haras, D., Piotto, M. et La-Barre, S., "Whole-cell spectroscopy is a convenient tool to assist molecular identification of

- cultivable marine bacteria and to investigate their adaptive metabolism”, *Talanta*, V. 80, (2010), 1758-1770.
75. Sawabe, T., Tanaka, R., Iqbal, M.M., Tajima, K., Ezura, Y., Ivanova, E.P. et Christen, R., “Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 50, (2000), 265-271.
76. Nedashkovskaya, O.I., Suzuki, M., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Lysenko, A.M., Mikhailov, V.V. et Swings, J., “*Zobellia amurskyensis* sp. nov., *Zobellia laminariae* sp. nov. and *Zobellia russellii* sp. nov., novel marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 54, (2004), 1643-1648.
77. Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M.M., Yumoto, I., Ezura, Y. et Christen, R., “*Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*”, *International journal of systematic bacteriology*, V. 48, (1998), 769-774.
78. Zifeng, W., Tian, X., Shaojun, P., Min, L. et Haidong, Y., “Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species”, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, Vol. 27, (2009), 487-492.
79. Wiese, J., Thiel, V., Gärtner, A., Schmaljohann, R., Imhoff, J.F., “*Kiloniella laminariae* gen. nov., sp. nov., a new alphaproteobacterium from the marine macroalga *Laminaria saccharina*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 59, (2009), 350-356.
80. Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y., Yamasat, K. “*Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides”, *International journal of systematic bacteriology*, V. 42, (1992), 621-627
81. Yoon, J., Matsuo, Y., Adachi, K., Nozawa, M., Matsuda, S., Kasai, H., et Yokota, A. “Description of *Persicirhabdus sediminis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ishigakijimensis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ponti* sp. nov., *Roseibacillus persicicus* sp. nov., *Luteolibacter pohnpeiensis* gen. nov., sp. nov. and *Luteolibacter algae* sp. nov., six marine members of the phylum ‘*Verrucomicrobia*’, and emended descriptions of the class *Verrucomicrobiae*,

- the order *Verrucomicrobiales* and the family *Verrucomicrobiaceae*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 58, (2008), 998-1007.
82. Nishijima, M., Takadera, T., Imamura, N., Kasai, H., An, K.D., Adachi, K., Nagao, T., Sano, H. et 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, (2009), 1696-1707.
 83. Yoon, J., Matsuo, Y., Katsuta, A., Jang, J.H., Matsuda, S., Adachi, K., Kasai, H. et Yokota, A., “*Haloferula rosea* gen. nov., sp. nov., *Haloferula harenae* sp. nov., *Haloferula phyci* sp. nov., *Haloferula helveola* sp. nov. and *Haloferula sargassicola* sp. nov., five marine representatives of the family *Verrucomicrobiaceae* within the phylum ‘*Verrucomicrobia*’”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 58, (2008), 998-1007.
 84. Jamal, M.T. et Mudarris, M.S.A., “Separation of YbdN Bioactive Protein from *Bacillus subtilis* Isolated from the Red Sea algae *Sargassum* sp. with Bioactivity against Antibiotic Resistant Bacterial Pathogens”, *Journal of King Abdulaziz University-Marine Sciences*, V. 21, (2010), 53-64.
 85. Lee, S.H., Park, M.S., Jung, J.Y. et Jeon, C.O., “*Leuconostoc miyukkimchii* sp. nov., isolated from brown algae (*Undaria pinnatifida*) kimchi”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 62, (2012), 1098-1103.
 86. Lee, S.D., “*Phycococcus jejuensis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from seaweed”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 56, (2006), 2369-2373.
 87. Lee, Y.K., Jung, H.J. et Lee, H.K., “Marine Bacteria Associated with the Korean Brown Alga, *Undaria pinnatifida*”, *Journal of Microbiology*, V. 44, 2006, 694-698.
 88. 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, (2016), 1-43.
 89. Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. et Tillequin, F., “New dithiopyrrolone antibiotics from

- Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities”, *Journal of Antibiotics*, V. 55, (2002), 696-701.
90. Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. et Lebrihi, A., “Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities”, *Journal of Antibiotics*, V.57, (2004), 367-372.
91. Romano, S., Jackson, S.A., Patry, S. et Dobson, A.D. W., “Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms”, *marine drugs*, V. 16, 2018, 244-272.
92. Rateb, M.E., Houssen, W.E., Harrison, W.T.A., Deng, H., Okoro, C.K., Asenjo, J.A., Andrews, B.A., Bull, A.T., Goodfellow, M., Ebel, R. et Jaspars, M., “Diverse Metabolic Profiles of a *Streptomyces* Strain Isolated from a Hyper-arid Environment”, *Journal of Natural Product*, V. 74, (2011), 1965-1971.
93. Benndorf, R., Guo, H., Sommerwerk, E., Weigel, C., Garcia-Altare, M., Martin, K., Hu H., Küfner, M., Wilhelm de Beer, Z., Poulsen, M. et Beemelmans, C., “Natural Products from, Actinobacteria Associated with Fungus-Growing Termites”, *Antibiotics*, V. 7, (2018), 83-107.
94. Zani, C.L. et Carroll, A.R., “Database for Rapid Dereplication of Known Natural Products Using Data from MS and Fast NMR Experiments”, *Journal of Natural Product*, V. 80, (2017), 1758-1766.
95. Hubert, J., Nuzillard, J.M. et Renault, J.H., “Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?”, *Phytochemistry Review*, V. 16, (2017), 55–95.
96. Sashidhara, K.V. et Rosaiah, J.N., “Various Dereplication Strategies Using LC-MS for Rapid Natural Product Lead Identification and Drug Discovery”, *Natural product communications*, V. 2, (2007), 193, 202.
97. Carrano, L. et Marinelli, F., “The relevance of chemical dereplication in microbial natural product screening”, *Journal of Applied Bioanalysis*, V. 1, (2015), 55-67.
98. Gunatilaka, A.A.L. et Wijeratne, E.M.K., “Natural products from bacteria and fungi”, *Phytochemistry and Pharmacognosy*. Edits., J. Pezutto and M. Kato, p. 27, UNESCO, University of Arizona (2012).
99. Popova, A.A., Koksharova, O.A., Lipasova, V.A., Zaitseva, J.V., Katkova-Zhukotskaya, O.A., Eremina, S.I., Mironov, A.S., Chernin, L.S. et Khmel, I.A., “Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and

- Serratia on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*", BioMed Research International, V. 1, (2014), 1-11.
100. Schulz, S. et Dickschatb, J.S., "Bacterial volatiles: the smell of small organisms", National Product Reports, V. 24, (2007), 814-842.
 101. Meruva, N.K., Penn, J.M., Farthing, D.E., "Rapid identification of microbial VOCs from tobacco molds using closed-loop stripping and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, V. 31, (2004), 482-488.
 102. Michael J. McGuire, Stuart W. Krasner, Cordelia J. Hwang, and George Izaguirre, "Closed-loop stripping analysis as a tool for solving taste and odor problems", Research and Technology, (1981), 530-537.
 103. Osemwengie, L.I., Steinberg, S., "Closed-loop stripping analysis of synthetic musk compounds from fish tissues with measurement by gas chromatography-mass spectrometry with selected-ion monitoring", Journal of Chromatography A, V. 993, (2003), 1-15.
 104. Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.M. et Ghigo, J.M., "Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology", FEMS Microbiology Reviews, V. 39, (2014), 222-233.
 105. Merkle, S., Kleeberg, K.K. et Fritsche, J., "Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis-A Review", Chromatography, V. 2, (2015), 293-381.
 106. Morath, S.U., Hung, R. et Bennett, J. W., "Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential", Fungal Biology reviews, V. 26, (2012), 73-83.
 107. Chaintreau, A., "Simultaneous distillation–extraction: from birth to maturity-review", Flavour and Fragrance Journal, V. 16, (2001), 136-148.
 108. Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberg, T. et Imhoff, F., "Diversity of Antibiotic-Active Bacteria Associated with the Brown Alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea", Marine Biotechnology, V. 11, (2009), 287–300.
 109. 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, (2016).

110. Lunggani, A.T., Darmanto, Y.S., Radjasa, O.K. et Sabdono, 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, (2018), 012088.
111. Kanagasabhpathy, 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, (2006), 167-173.
112. Djinni, I., Defant, A., Kecha, M. et Mancini, I., "Antibacterial Polyketides from the Marine Alga-Derived Endophytic *Streptomyces sundarbansensis*: A Study on Hydroxypyrrone Tautomerism", *Marine Drugs*, V. 11, (2013), 124-135.
113. Jiang, Z., Boyd, K.G., Mearns-Spragg, A., Adams, D.R., Wright, P.C. et Burgess, J.G., "Two diketopiperazines and one halogenated phenol from cultures of the marine bacterium, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*", *Natural Product Letters*, V. 14, (2000), 435-440.
114. Chakraborty, K., Thilakan, B., Chakraborty, R.D., Raola, V.K. et Joy, M., "O-heterocyclic derivatives with antibacterial properties from marine bacterium *Bacillus subtilis* associated with seaweed, *Sargassum myriocystum*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 101, (2017), 569-583.
115. Uzair, B., Mena, F., Ali Khan, B., Mohammad, F.V, Viqar Uddin, A., Djeribi, R. et Mena, B., "Isolation, purification, structural elucidation and antimicrobial activities of kocumarin, a novel antibiotic isolated from actinobacterium *Kocuria marina* CMG S2 associated with the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*", *Microbiological Research*, V. 206, (2018), 186-197.
116. Imamura, N., Nishijima, M., Takadera, T., Adachi, K., Sakai, M. et Sano, H., "New anticancer antibiotics Plagiomicins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*", *The Journal of Antibiotics*, V. 50, (1997), 8-12.
117. Chakraborty, K., Thilakan, B., Kizhakkekalam, V.K., "Antibacterial aryl-crowned polyketide from *Bacillus subtilis* associated with seaweed *Anthophycus longifolius*", *Journal of Applied Microbiology*, V. 124, (2018), 108-125.
118. Miao, F.P., Li, X.D., Liu, X.H., Cichewicz, R. H. et Ji, N.Y., "Secondary Metabolites from an Algicolous *Aspergillus versicolor* Strain", *Marine Drugs*, V. 10, (2012), 131-139.

119. Zhang, Y., Li, X.M., Feng, Y. et Wang, B.G., "Phenethyl-a-pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algal endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13", *Natural Product Research*, V. 24, (2010), 1036-1043.
120. Cueto, M., Jensen, P.R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E., et Clardy, J., "Pestalone, a New Antibiotic Produced by a Marine Fungus in Response to Bacterial Challenge", *Journal of Natural Products*, V. 64, (2001), 1444-1446.
121. Nguyen, H.P., Zhang, D., Lee, U., Kang, J.S., Choi, H.D. et Son, B.W., "Dehydroxychlorofusarielin B, an Antibacterial Polyoxygenated Decalin Derivative from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp.", *Journal of Natural Products*, V. 70, (2007), 1188-1190.
122. Du, F.Y., Li, X.M., Li, C.S., Shang, Z., Wang, B.G., "Cristatamins A–D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, V. 22, (2012), 4650-4653.
123. Yang, R.Y., Li, C.Y., Lin, Y.C., Peng, G.T, She, Z.G. et Zhou, S.N., "Lactones from a brown alga endophytic fungus (No. ZZ36) from the South China Sea and their antimicrobial activities", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, V. 16, (2006), 4205-4208.
124. Rani, K., Rana, R. et Dat, S., "Review on latest overview of proteases", *International Journal of Current Life Sciences*, V. 2, (2012), 12-18.
125. Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S., Shih, J.C. "Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain", *Applied and Environmental Microbiology*, V. 58, (1992), 3271-3275.
126. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. et Deshpande, V.V., "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, V.62, (1998), 597-625.
127. Gonzales, T. et Robert-Baudouy, J., "Bacterial aminopeptidases: Properties and functions", *FEMS Microbiology Reviews*, V. 18, (1996), 19-344.
128. Breddam, K., "Serine carboxypeptidases. a review", *Carlsberg Research Communications*. V. 51, (1986), 83-128.
129. Patel, S., "A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator", *Allergologia et Immunopathologia*, V. 45, (2017), 579-591.

130. Clynen, E., Schoofs, L. et Salzet, M., "Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in Insects and Gut Leeches: an update", *Current Pharmaceutical Design*, V. 8, (2002), 483-91.
131. Savitri, D.K, Thakur, N., Verma, R. et Bhalla, T.C., "Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive", *Research Journal of Microbiology*, V. 3, (2008), 661-672.
132. Liu, J., Sharma, A., Niewiara, M.J., Singh, R., Ming, R. et Yu, Q., "Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: lineage-specific gene duplication and expansion", *BMC Genomics*, V. 19,(2018), 26-37.
133. Otto, H.H. et Schirmeiste, T., "Cysteine Proteases and Their Inhibitors", *Chemical Reviews*, V. 97, (1997), 133-171.
134. Szecsi, P.B., "The aspartic proteases", *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, V. 52, (1992), 5-22.
135. Polgar, L., "The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis", *Discussion Letter*, V. 219, (1987), 1-4.
136. Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S. et Djadid, N.D., "Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, V. 6, (2016), 975-981.
137. Seemuller, E., Lupas, A., Zuhl, F., Zwickl, P. et Baumeister, W., "The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease", *FEBS Letters*, V. 359, (1995), 173-8.
138. Zwickl, P., Lottspeich, F. et Baumeister, W., "Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*", *FEBS Letters*, V. 312, (1992), 157-60.
139. SeemOller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. et Baumeister, W., "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease", *Science*, V. 268, (1995), 579-582.
140. Orłowski, M. et S. Wilk. "Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V.415, (2003), 1-5.
141. Singh, I. et Kushwaha, R.K.S., "Keratinases and microbial degradation of Keratin", *Advances in Applied Science Research*, 2015, V. 6, 74-82.
142. Łaba, W., Żarowska, B., Chorążyk, D., Pudło, A., Piegza, M., Kancelista, A. et Kopeć, W., "New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste", *AMB Express*, V. 8, (2018), 9-22.

143. Gopinath, S.C.B., Anbu, P., LakshmiPriya, T., Tang, T.H., Chen, Y., Hashim, U., Ruslinda, A.R. et Arshad, M.K.M., "Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production", *BioMed Research International*, V. 2015, (2015), 140726-140736.
144. Singh, I., Mishra, A et Kushwaha, R.K.S., "Dermatophytes, related keratinophilic and opportunistic fungi in indoor dust of houses and hospit", *Indian Journal of Medical Microbiology*, V. 27, (2009), 242-246.
145. Aneja, K.R., Joshi, R., Sharma, C., Surain, P. et Aneja, A., "Biodiversity of dermatophytes: an overview", *Indian Society of Mycology and Plant Pathology*, V. 5, (2012), 299-314.
146. Santos, R.M.D.B., Firmino, A.A.P., De sa, C.M., Felix, C.R., "Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus fresenius*", *Current Microbiology*, V.33, (1996), 364-370.
147. Filipello-Marchisio, V., "Karatinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates", In: Kushawaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. *Rev. Iber. Micol*, 17, (2000).
148. Gupta, R., Ramnani, P., "Microbial keratinases and their prospective applications: an overview", *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 70, (2006), 21-33.
149. Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Badea Doni, M., Arsene, M.L., Oancea, F., Jecu, L., Lazăr, V., "Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi", *Electronic Journal of Biotechnology*, V. 28, (2017), 101-112.
150. Lange, L., Huang, Y., Busk, P.K., "Microbial decomposition of keratin in nature- a new hypothesis of industrial relevance", *Applied Microbiology Biotechnology*, V. 100, (2016), 2083-2096.
151. Adelere, I.A. et Lateef, A., "Keratinases: emerging trends in production and applications as novel multifunctional biocatalysts", *Kuwait Journal of Science*, V. 43, (2016), 118-127.
152. Sinkiewicz, I., S'liwin'ska, A., Staroszczyk, H., Kołodziejska, I., "Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers", *Waste Biomass Valor*, V. 8, (2017), 1043-1048.

153. Bragulla, H.H. et Homberger, D.G., "Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia", *Journal of Anatomy*, V. 214, (2009), 516-559.
154. Magina, T.M., Vijayaraja, P. et Leube, R.E., "Structural and regulatory functions of keratins", *Experimental Cell Research*, V. 313, (2007), 2021-2032.
155. Danciulescu, C., Nick, B. et Wortmann, F.J., "Structural Stability of Wild Type and Mutated α -Keratin Fragments: Molecular Dynamics and Free Energy Calculations", *Biomacromolecules*, V. 5, (2004), 2165-2175.
156. Wang, B., Yang, W., McKittrick, J. et Meyers, M.A., "Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration", *Progress in Materials Science*, V. 76, (2016), 229-318.
157. Fraser, R.D. et Parry, D.A. "The three-dimensional structure of trichocyte (hard α -) keratin intermediate filaments: Features of the molecular packing deduced from the sites of induced crosslinks", *Journal of Structural Biology*, V. 155, (2006), 375-378.
158. Alibardi, L., Knapp, L.W. et Sawyer, R.H., "Beta-keratin localization in developing alligator scales and feathers in relation to the development and evolution of feathers", *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, V. 38, (2006), 175-192.
159. Olsen, H.S. et Falholt, P., "The Role of Enzymes in Modern Detergency", *Journal of Surfactants and Detergents*, V. 1, (1998), 555-567.
160. Neethu, S.K, Sreeja-Devi, P.S et Arun, S.N, "A review on microbial proteases", *International Journal of Advanced Research*, V. 4, (2016), 2048-2053.
161. Vidmar, B. et Vodovnik, M., "Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications", *Food Technology Biotechnology*, V. 56, (2018), 312-328.
162. Shen, J., Rushforth, M., Cavaco-Paulo, A., Guebitz, G. et Lenting, H., "Development and industrialisation of enzymatic shrink resist process based on modified proteases for wool machine washability", *Enzyme and Microbial Technology*, V. 40, (2007), 1656-61.
163. Queiroga, A.C., Pintado, M.E., Malcata, F.X., "Search for novel proteolytic enzymes aimed at textile and agro-industrial applications: An overview of current and novel approaches", *Biocatalysis and Biotransformation*, V. 30, (2012), 154-69.

164. Paul, T., Das, A., Mandal, A., Halder, S.K., DasMohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C., "Biochemical and Structural Characterization of a Detergent Stable Alkaline Serine Keratinase from *Paenibacillus Woosongensis* TKB2: A Potential Additive for Laundry Detergent", *Waste and Biomass Valorization*, V.5, (2014), 563–574.
165. Sivakumar, V., Swaminathan, G., Rao, P.G., Muralidharan, C., Mandal, A.B., Ramasami, T., "Use of ultrasound in leather processing Industry: Effect of sonication on substrate and substances New insights", *Ultrasonics Sonochemistry*, V.17, (2010), 1054-1059.
166. Wang, Y., Zeng, Y., Zhou, J., Zhang, W., Liao, X., Shi, B., "An integrated cleaner beamhouse process for minimization of nitrogen pollution in leather manufacture", *Journal of Cleaner Production*, V. 112, (2015), 2-8.
167. Furhan, J. et Sharma, S., "Microbial alkaline proteases: findings and applications", *International journal of inventions in pharmaceutical sciences*, V. 2, (2014), 823-834.
168. Teresa, K.K et Justyna, B., "Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects", *Waste Management*, V. 31, (2011), 1689-1701.
169. Gupta, S., Nigam, A. et Singh, R., "Purification and characterization of a *Bacillus subtilis* keratinase and its prospective application in feed industry", *Acta Biologica Szegediensis*, V. 59, (2015), 197-204.
170. Lateef, A., Oloke, J.K., Gueguim Kana, E.B., Sobowale, B.O., Ajao, S.O. et Bello, B.Y., "Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil", *International Biodeterioration & Biodegradation*, V. 64, (2010), 162-165.
171. Brebu, M. et Spiridon, I., "Thermal degradation of keratin waste", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, V. 91, (2011), 288-295.
172. Friedrich, J., Gradišar, H., Vrecl, M. et Pogačnik, A., "In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*", *Enzyme and Microbial Technology*, V. 36, (2005), 455-60.
173. Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I. et Jerala, R., "Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases", *Applied and Environmental Microbiology*, V. 71, (2005), 3420-3426.

174. Kumar, T.P. et Raju, P.N., "Transungual drug delivery: A promising route to treat nail disorders", International journal of pharmaceutical sciences review and research, V. 2, (2013), 22-33.
175. Mohorčič, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J. et Murdan, S., "An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery", International Journal of Pharmaceutics, V. 332, (2007), 196-201.
176. Rajendra, V.B., Baro, A., Kumari, A., Dhamecha, D.L., Lahoti, S.R. et Shelke, S.D., "Transungual drug delivery: An overview", Journal of Applied Pharmaceutical Science, V. 2, (2012), 203-209.
177. Gupta, R., Rajput, R., Sharma, R. et Gupta, N., "Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases", Applied Microbiology and Biotechnology, V. 97, (2013), 9931-9940.
178. Blanca, N., Haucharda, D., Audibert, L. et Ar Gall, E., "Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: an electrochemical approach", Talanta, V.84, (2011), 513-518.
179. Keyrouz, R., Abasq, M.L., Le Bourvellec, C., Blanc, N., Audibert, L., ArGall, E. et Hauchard, D., "Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany", Journal of Food Chemistry, V.126, (2011), 831-836.
180. Molyneux, P., "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity", Songklanakain Journal of Science and Technology, V.26, (2004), 211-219.
181. Nunes, N., Ferraz, S., Valente, S., Barreto, M.C. et Pinheiro de Carvalho, M.A.A., "Biochemical composition, nutritional value, and antioxidant properties of seven seaweed species from the Madeira Archipelago", Journal of Applied Phycology, V. 29, (2017), 2427–2437.
182. Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y. et Zhang, C., "Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase", Food Research International, V. 113, (2018), 288-297.
183. Lopez-Hortas, L., Gannon, L., Moreira, R., Chenlo, F., Domínguez, H. et Torres, M.D., "Microwave hydrodiffusion and gravity (MHG) processing of

- Laminaria ochroleuca* brown seaweed”, *Journal of Cleaner Production*, V. 197, (2018), 1108-1116.
184. Zubia, M, Fabre, M.S., Klervi Le Lann, V.K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M. et Deslandes, E., “Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts”, *Food Chemistry*, V. 116, (2009), 693-701.
185. Blois, M.S., “Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical”, *Nature*, V. 4617, (1958), 1119-1200.
186. Kedare, S.B. et Singh, R.P., “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay”, *Journal of Food Science and Technology*, V. 48, (2011), 412-422.
187. Popoola, O.K., Marnewick, J.L., Rautenbach, F., Iwuoha, E.I. et Hussein, A.A., “Acylphloroglucinol Derivatives from the South African *Helichrysum niveum* and Their Biological Activities”, *Molecules*, V. 20, (2015), 17309-17324.
188. Alam, M.N., Bristi, N.J. et Rafiquzzaman, M., “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, V. 21, (2013), 143-152.
189. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., et Rice-Evans, C.E., “Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology & Medicine*, V. 26, (1999), 1231-1237.
190. Marco, G.J., “A rapid method for evaluation of antioxidants”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. V. 45, (1968), 594-598.
191. Frankel, E.N. et Meyer, A.S., “The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V. 80, (2000), 1925-1941.
192. Ozyurek, M., Guclu, K., Apak, R., “The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement”, *Trends in Analytical Chemistry*, V. 30, (2011), 652-664.
193. Apak, R., Guclu, K. , Ozyurek, M., et Karademir, S.E., “Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 52, (2004), 7970-7981.

194. Decker, E.A. et Welch, B., "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 38, (1990), 674-677.
195. Mordechai L. Kremer, "Mechanism of the Fenton reaction. Evidence for a new intermediate", *Physical Chemistry Chemical Physics*, V. 1, (1999), 3595-3605.
196. Vartoukian, S.R., Palmer, R.M. et Wade, W.G., "Strategies for culture of 'unculturable' bacteria", *FEMS Microbiol Letters*, V. 309, (2010), 1-7.
197. Agrawal, P.K., Agrawal, S. et Shrivastava, R., "Modern molecular approaches for analyzing microbial diversity from mushroom compost ecosystem", *3 Biotech*, V. 5, (2015), 853-866
198. Claus, D. et Berkeley, R.C.W., "*Genus Bacillus* 1986: In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*", Baltimore, Vol. 2. (1872), 1105-1139.
199. Leersnyder, I.D, Gelder, L.D, Driessche, I.V et Vermeir, P., "Influence of growth media components on the antibacterial effect of silver ions on *Bacillus subtilis* in a liquid growth medium", *Scientific Reports*, V. 8, (2018), 9325-9335.
200. Jafarzade, M., Yahya, N.A., Shayesteh, F., Usup, G., et Ahmad, A., "Influence of Culture Conditions and Medium Composition on the Production of Antibacterial Compounds by Marine *Serratia* sp. WPRA3", *Journal of Microbiology*, V. 51, (2013), 373-379.
201. Bellon-Maurel, V., Orliac, O. et Christen, P., "Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochemistry*", V.38, (2003), 881-896.
202. Dasn M.P., Bhowmick, M., Reynolds, M., "Optimization of culture conditions for production of antibacterial metabolite by marine bacteria", *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, V. 38, (2016), 227-231.
203. Korenblum, E., Von der Weid, I., Santos, A.L.S., Rosado, A.S., Sebastian, G.V., Coutinho, C.M.L.M., Magalhaes, F.C.M., De Paiva, M.M., Seldin, L., "Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil", *Journal of Applied Microbiology*, V. 98, (2005), 667-675.
204. Vijayakumari, S.J., Sasidharannair, K.N., Nambisan, B. et Mohandas, C., "Optimization of media and temperature for enhanced antimicrobial production by bacteria associated with *Rhabditis* sp.", *Iranian Journal of Microbiology*, V. 5, (2013), 136-141.

205. Carvalho, C. et Fernandes, P., "Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment", *Marine Drugs*, V.8, (2010), 705-727.
206. Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J.G. et Sermswan, RW., "Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*", *AMB Express*. V. 7, (2017), 16-26.
207. Ignea, C., Ioannou, E., Georgantea, P., Loupassaki, S., Triikka, F.A., Kanellis, A.K., Makris, A.M., Roussis, V. et Kampranis, S.C., "Reconstructing the chemical diversity of labdane-type diterpene biosynthesis in yeast", *Metabolic Engineering*, V. 28, (2015), 91-103.
208. Demetzos, C. et Dimas, K.S., "Labdane-type diterpenes: chemistry and biological activity", *Studies in Natural Products Chemistry*, V. 25, (2001), 235-292.
209. Demetzos, C., Kolocouris, A. et Anastasaki, T., "A simple and rapid method for the differentiation of c-13 manoyl oxide epimers in biologically important samples using GC-MS analysis supported with NMR spectroscopy and computational chemistry results", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, V. 12, (2002), 3605-3609.
210. Motohashi, K., Ueno, R., Sue, M., Furihata, K., Matsumoto, T., Dairi, T., Omura, S. et Seto H., "Studies on terpenoids produced by *actinomyces*: oxaloterpins A, B, C, D, and E, diterpenes from *Streptomyces* sp. KO-3988", *Journal of Natural Products*, V. 70, (2007), 1712-1717.
211. Wang, Y., Zhang, L., Wang, F., Li, Z.H., Dong, Z.J. et Liu, J. K., "New diterpenes from cultures of the fungus *Engleromyces goetzii* and their CETP inhibitory activity", *Natural Product Bioprospect*, V. 5, (2015), 69-75.
212. Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-Ya, K., Omura, S., Cane, D.E. et Ikeda, H., "Terpene synthases are widely distributed in bacteria", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V. 112, (2015), 857-862.
213. Bian, X., Bai, J., Hu, X., Wu, X., Xue, C., Han, A., Su, G., Hua, H. et Pei, Y., "Penioxalicin, a novel 3-nor-2,3-seco-labdane type diterpene from the fungus *Penicillium oxalicum* TW01-1", *Tetrahedron Letters*, V. 56, (2015), 5013-5016.
214. Larsen, T.O. et Frisvad, L.C., "Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa", *Mycological Research*, V. 99, (1995), 1153-1166.

215. Palazzolo, E., Saiano, F., Laudicina, V.A., Gargano, M.L. et Venturella, G., "Volatile organic compounds in wild fungi from Mediterranean forest ecosystems", *Journal of Essential Oil Research*, V. 29, (2017), 385-390.
216. Ziegenbein, F.C., König, W.A. et Hanssen, H.P., "Volatile metabolites from the wood-inhabiting fungi *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum*, and *Stereum hirsutum*", *Journal of Essential Oil Research*, V. 22, (2010), 116-118.
217. Padmavathia, R., Abinaya, B. et Pandian, S.K., "Phenol, 2, 4-bis(1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens*", *Biofouling*, V. 30, (2014), 1111-1122.
218. Griffin, M.A., Spakowicz, D.J., Gianoulis, T.A. et Strobel, S.A., "Volatile organic compound production by organisms in the genus *Ascocoryne* and a re-evaluation of myco-diesel production by NRRL 50072", *Microbiology*, V. 156, (2010), 3814-3829.
219. Kramer, R. et Abraham, W.R., "Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for? ", *Phytochemistry Review*, V. 11, (2011), 15-37.
220. Dickschat, J.S., Martens, T., Brinkhoff, T., Simon, M. et Schulz, S., "Volatiles released by a *Streptomyces* species isolated from the North Sea", *Chemistry and Biodiversity*, V. 2, (2005), 837-865.
221. Miller, J.A., Thompson, P.A., Hakim, I.A., Chow, H.S. et Thomson, C.A., "D-limonene: a bioactive food component from *Citrus* and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment", *Oncology Reviews*, V. 5, (2010), 31-42.
222. Jongedijk, E., Cankar, K., Buchhaupt, M., Schrader, J., Bouwmeester, H. et Beekwilder, J., "Biotechnological production of limonene in microorganisms", *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 100, (2016), 2927-2938.
223. Adams, R.P., "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy", 4th edn, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL (2007).
224. Gonzalez, A., Fraga, B.M., Hernandez, M.G. et Lurs, J.G., "New diterpenes from *sideritis canariensis*", *Phytochemistry*, V. 12, (1973), 1113-1116.
225. Konishi, T., Azuma, M., Itoga, R., Kiyosawa, S., Fujiwara, Y. et Shimada, Y., "Three new labdane-type diterpenes from wood, *Excoecaria agallocha*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, V. 44, (1996), 229-231.

226. Saïdana, D., Mahjoub, M.A., Boussaada, O., Chriaa, J., Chéraif, I., Daami, M., Mighri, Z. et Helal, A.N., "Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarixboveana* (Tamaricaceae)", *Microbiological Research*, V. 163, (2008), 445-455.
227. Wilkinson, J.M., Hipwell, M., Ryan, T. et Cavanagh, H.A., "Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 51, (2003), 76-81.
228. Deng, J., He, B., He, D. et Chen, Z., "A potential biopreservative: chemical composition, antibacterial and hemolytic activities of leaves essential oil from *Alpinia guinanensis*", *Guinanensis Industrial Crops and Products*, V. 94, (2016), 281-287.
229. Singh, M., Pal, M. et Sharma, R.P., "Biological activity of the labdane type diterpenes", *Planta Medica*, V. 65, (1999), 2-8.
230. Da Silva, L.L.D., Nascimento, M.S., Cavalheiro, A.J., Silva, D.H.S., Castro-Gamboa, I., Furlan, M. et Da Silva, V.B., "Antibacterial activity of labdane diterpenoids from *Stemodia foliosa*", *Journal of Natural Products*, V. 71, (2008), 1291-1293.
231. Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Chinou, I., Charvala, C. et Skaltsounis, A.L., "New hemisynthetic manoyl oxide derivatives with antimicrobial activity", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, V. 49, (2001), 814-817.
232. Farjama, M.H., Rustaiyan, A., Ezzatzadeh, E. et Jassbi, A.R., "Labdane-type diterpene and two flavones from *Salvia Sharifi Rech. f. and Esfan.* and their biological activities", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, V. 12, (2013), 395-399.
233. Hui, X., Yan, G., Tian, F.L., Li, H. et Gao, W.Y., "Antimicrobial mechanism of the major active essential oil compounds and their structure-activity relationship", *Medicinal Chemistry Research*, V. 26, (2017), 442-449.
234. Elaissi, A., Rouis, Z., Mabrouk, S., Bel Haj Salah, K., Aouni, M., Larbi Khouja, F., Farhat, M., Chemli, R. et Harzallah-Skhiri, F., "Correlation Between Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Fifteen Eucalyptus Species Growing in the Korbous and Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia)", *Molecules*, V. 17, (2012), 3044-3057.

235. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters L. et Vlietinck, A.J., "Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 79, (2002), 213-220.
236. Mohammed, B., Said, C., Fouzia, F.R., Kawtar, F.B., Zoubida, H., Abdelilah, O., Mohammed, E. et Ghizlane, E., "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus Ladanifer Var. Maculatus Dun*", *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, V. 8, (2018), 925-930.
237. Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. et Chalier, P., "Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure", *Letters in Applied Microbiology*, 43, (2006), 149-154.
238. Mancini, E., Senatore, F., De Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., Snoussi, M., De Feo, V., "Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils", *Molecules*, V. 20, (2015), 12016-12028.
239. Kalemba, D. et Kunicka, A., "Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils", *Current Medicinal Chemistry*, V. 10, (2003), 813-829.
240. Urzúa, A., Rezende, M.C., Mascayano, C. et Vásquez, L., "A structure-activity study of antibacterial diterpenoids", *Molecules*, V. 13, (2008), 882-891.
241. Ulubelen, A., Topcu, G., Eris, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S. et Johansso, C.B., "Terpenoids from *Salvia sclarea*", *Phytochemistry*, V. 36, (1994), 971-974.
242. Reid, D.J., Diesing, J.M., Miller, M.A., Perry, S.M., Wales, J.A., Montfort, W.R., Marty, M.T., "MetaUniDec: High-Throughput Deconvolution of Native Mass Spectra", *J Am Soc Mass Spectrom.* V. 30, (2019), 118-127.
243. Abdelkader, M.S.A., Philippon, T., Asenjo, J.A., Bull, A.T., Goodfellow, M., Ebel, R., Jaspars, M. et Rateb, M.E., "Asenjonamides A–C, antibacterial metabolites isolated from *Streptomyces asenjonii* strain KNN 42.f from an extreme-hyper arid Atacama Desert soil", *Journal of Antibiotics*, V. 71, (2018), 425-431.
244. Kumar, S.N., Mohandas, C., Siji, J.V., Rajasekharan, K.N. et Nambisan, B., "Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against

- major plant pathogenic fungi”, *Journal of Applied Microbiology*, V. 113, (2012), 914-924.
245. El-Gendy, B.E.M. et Rateb, M.E., “Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, V. 25, (2015), 3125-3128.
246. Wei, H., Lin, Z., Li, D., Gu, Q. et Zhu, T., “OSMAC (one strain many compounds) approach in the research of microbial metabolites--a review”, *Acta microbiologica Sinica*, V. 50, (2010), 701-709.
247. 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, (2008), 1291-1305.
248. Zhang, X.Y., Han, X.X., Chen, X.L., Dang, H.Y., Xie, B.B., Qin, Q.L., Shi, M., Zhou, B.C. et Zhang, Y.Z., “Diversity of cultivable protease-producing bacteria in sediments of Jiaozhou Bay, China”, *Frontiers in Microbiology*, V.6. 2015, 1021.
249. Torres de Oliveira, C., Pellenz, L., Pereira, J.Q., Brandelli, A., Daroit, D.J., “Screening of Bacteria for Protease Production and Feather Degradation”, *Waste Biomass Valor*, V. 7, (2016), 447-453.
250. Peterson, G.L., “A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable”, *Analytical Biochemistry*, V. 83, (1977), 346-356.
251. Abdel-Fattah, A.M., El-Gamal, M.S., Ismail, S.A., Emran, M.A. et Hashem, A.M., “Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1”, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, V.16, (2018), 311-318.
252. Rekik, H., Zraï-Jaouadi, N., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., Bejar, S. et Jaouadi, B., “Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12”, *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 121, (2019), 1227-1239.
253. Zhang, R.X., Gong, J.S., Su, C., Zhang, D.D., Tian, H., Dou, W.F., Li, H., Shi, J.S. et Xu, Z.H., “Biochemical characterization of a novel surfactant-stable

- serine keratinase with no collagenase activity from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798”, *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 93, (2016), 843-851.
254. Su, C., Gong, J.S., Zhang, R.X., Tao, L.Y., Dou, W.F., Zhang, D.D., Li, H., Lu, Z.M., Xu, Z.H., Shi, J.S., “A novel alkaline surfactant-stable keratinase with superior feather-degrading potential based on library screening strategy”, *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 95, (2017), 404-411.
255. Kublanov, I., Tsiroulnikov, K.B., Kaliberda, E.N., Rumsh, L.D., Haertlé, T. et Bonch-Osmolovskaya, E.A., “Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal Rift zone”, *Microbiology*, V. 78, (2009), 67-75.
256. Tork, S.E., Shahein, Y.E., El-Hakim, A.E., Abdel-Aty, A.M., Aly, M.M., “Purification and partial characterization of serine-metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* NRC21”, *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 86, (2016), 189-196.
257. Singh, S., Masih, H., Jeyakumar, G.E., Lawrence, R. et Ramteke, P.W., “Optimization of Fermentative Production of Keratinase by *Bacillus subtilis* Strain S1 in Submerged State Fermentation Using Feather Waste”, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, V. 6, (2017), 1499-1510.
258. Khodayari, S. et Izadeh, F.K., “Separating Keratinase Producer Bacteria from the Soil of Poultry Farms and Optimization of the Conditions for Maximum Enzyme Production”, *European Journal of Experimental Biology*, V. 8, (2018), 35.
259. Saggi, S.K. et Mishra, P.C., “Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil”, *PLoS ONE*, V. 12, (2017), e0188724.
260. Bhunia, B., Basak, B. et Dey, A., “A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp.”, *Journal Of Biochemical Technology*, V. 3, (2012), 448-457.
261. Laemmli, U.K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, V. 227, (1970), 680-685.
262. Zraï-Jaouadi, N., Rekik, H., Ben Elhoul, M., Zohra Rahem, F., Gorgi Hila, C., Slimene Ben Aicha, H., Badis, A., Toumi, A., Bejar, S. et Jaouadi, B., “A novel

- keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process”, *International Journal of Biological Macromolecules*, V.79, (2015), 952-964.
263. Benkiar, A., Zaraï Jaouadi, N., Badis, A., Rebzani, F., Boulkour Touiou, S., Rekik, H., Naili, B., Ferradji, F.Z., Bejar, S. et Jaouadi, B., “Biochemical and molecular characterization of a thermo-and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation proces”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, V. 83, (2013), 129-138.
264. Korkmaz, H., Hür, H. et Dinçer, S., “Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from poultry waste”, *Annals of Microbiology*, V. 54, (2004), 201-211.
265. Hunkapiller, M.W. et Hood, L.E., “Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography”, *Biochemistry*, V. 17, (1978), 2124-2133.
266. Jacobs, M.F., “Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*”, *Gene*, V. 152, (1995), 69-74.
267. Zaraï-Jaouadi, N., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhou, M., Yahiaoui, A.B., Aicha, H.B., Toumi, A., Bejar, S. et Jaouadi, B., “Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities”, *PLoS One*, V. 8, (2013), e76722.
268. Lin, X., Kelemen, D.W., Miller, E.S. et Shih, J., “Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1”, *Applied and Environmental Microbiology*, V. 61, (1995), 1469-1474.
269. Lin, X., Wong, S., Miller, E. et J. Shih, “Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, V. 19, (1997), 134-138.
270. Kojima, M., Kanai, M., Tominaga, M., Kitazume, S., Inoue, A. et Horikoshi, K., “Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01”, *Extremophiles*, V. 10, (2006), 229-235.

271. Ramakrishna, R.M., Sathi, R.K., Ranjita, C.Y., Hameeda, B. et Gopal, R., "Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive", *Bioresource Technology*, V. 243, (2017), 254-263
272. Abdel-Naby, M.A., El-Refai, H.A. et Ibrahim, M.H.A., "Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of keratinase from *Bacillus pumilus* FH9", *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 105, (2017), 973-980.
273. Mechri, S., Kriaa, M., Ben Elhoul-Berrouina, M., Omrane-Benmrads, M., Zaraï-Jaouadi, N., Rekik, H., Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Chebbi, A., Sayadi, S., Chamkha, M., Bejar, S. et Jaouadi, B., "Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R", *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 101, (2017), 383-397.
274. Mechri, S., Ben Elhoul-Berrouina, M., Omrane-Benmrads, M., Zaraï-Jaouadi, N., Rekik, H., Moujehed, E., Chebbi, A., Sayadi, S., Chamkha, M., Bejar, S. et Jaouadi, B., "Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest", *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 94, (2017), 221-232.
275. Ben Elhoul, M., Zaraï-Jaouadi, N., Rekik, H., Benmrads, M.O., Mechri, S., Moujehed, E., Kourdali, S., El Hattab, M., Badis, A., Bejar, S. et Jaouadi, B. "Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomadura viridilutea* DZ50", *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 92, (2016), 299-315.
276. Balaji, S., Kumar, M.S., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar, R. et Sehgal, P., "Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102)", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 24, (2008), 2741-2745.
277. Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Zaraï-Jaouadi, N., Joseph, M., Hacene, H., Ollivier, B., Fardeau, M.L., Bejar, S. et Jaouadi, B., "Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities", *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 86, (2016), 321-328.

278. Brouta, F., Descamps, F., Fett, T., Losson, B., Gerday, C. et Mignon, B., "Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*", *Medical Mycology*, V. 39, (2001), 269-275.
279. Sanghvi, G., Patel, H., Vaishnav, D., Oza, T., Dave, G., Kunjadia, P. et Sheth, N., "A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation", *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 87, (2016), 256-262.
280. Zaraï-Jaouadi, N., Jaouadi, B., Aghajari, N. et Bejar, S., "The overexpression of the SAPB of *Bacillus pumilus* CBS and mutated sapB-L311/T33S/N99Y alkaline proteases in *Bacillus subtilis* DB430: new attractive properties for the mutant enzyme", *Bioresource Technology*, V. 105, (2012), 142–151.
281. 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.
282. Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, V. 72, (1976), 248-254.
283. Ellman, G.L., "Tissue sulfhydryl groups", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V. 82, (1959), 70-77.

