

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne



Réf :

Mémoire de fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
Master
Thème

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION
D'ACTINOBACTERIES PRODUCTRICES
D'ENZYMES D'INTÉRÊT INDUSTRIEL**

Présenté par :

BIROUK MOUNIA et BOUCHEBBAH MERIEM

Soutenu le 11-09-2023

Devant le jury composé de :

Mme IDRES N.	MCB	Présidente
Mme BOUCHERBA N.	Pr.	Examinatrice
Mme SOUAGUI S.	MCA	Encadreur

Année universitaire : 2022/2023

Avant tout, on remercie LE BON DIEU le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail

Nous tenons à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, à l'éclairage de leur expertise.

*Nous exprimons notre sincère reconnaissance à **Madame Idres Nacira**, Pour l'honneur qu'elle nous a faite en acceptant la présidence de jury.*

*Nous exprimons également nos sincères remerciements à **Madame Boucherba Nawel**, pour avoir accepté d'examiner ce travail..*

Nos sincères remerciements s'adressent, d'abord, à notre promotrice,

Mme Souagui Samiha

Nous voudrions présenter nos vifs remerciements pour sa disponibilité, son encadrement efficace, ses remarques et ses conseils précieux, sa compréhension, pour la confiance qu'elle nous a toujours témoignée et pour sa grande gentillesse.

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma mère

Ma source du bonheur, l'être le plus cher de ma vie, la femme qui a souffert sans me laisser souffrir qui m'a soutenu durant toutes ces années d'études

A mon père

L'homme le plus précieux qui a toujours été à mes côtés celui qui a fait de moi une femme, qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance

Ma sœur Hamida

Ma moitié, Mon bras droit, merci de si bien accomplir ton rôle et d'être là pour moi, de me suivre dans les moments précieux de ma vie

Mes frères Laid et Koussaila

qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et de me soutenir tout au long de mes études.

Et en fin ma binôme Meriem

qui est plus qu'un binôme pour moi merci d'être là pendant toutes ces années

Mounia

Dédicace

En premier lieu je voudrais rendre hommage à l'être le plus cher à mon cœur, ma grand-mère *Khadidja*, qui était un exemple dans la gentillesse et de la douceur, tu resteras toujours dans nos cœurs grand-mère, que dieu t'accueille dans son vaste paradis

Je dédie ce travail à mes parents, ceux qui m'ont mis au monde, qui m'ont doté d'une éducation digne et ceux grâce à eux je suis arrivée là aujourd'hui.

À ma *mère* la plus douce des toutes qui a toujours été à mes côtés, qui n'a cessé de faire des prières à mon égard,

À mon *père* qui est toute ma force, celui qui m'a toujours épaulé et guidé dans mes choix.

À ma sœur la prunelle de mes yeux *Dounia Fed* et mes chers frères *Djagil* et *Abdrazak* qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans tout ce que je fais,

À ma meilleure amie *Melissa* ma confidente, celle qui a toujours su m'écouter et me comprendre,

À toute ma famille mes tantes et oncles et mes grands-parents qui m'ont toujours encouragé et poussé à aller de l'avant.

Sans oublier ma binôme *Mounia* pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Meriem

Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I. Revue bibliographique	
Actinobactéries	
1. Historique et généralités.	2
2. Taxonomie des actinobactéries	3
2.1. Critères morphologiques	4
2.2. Critères chimio-taxonomiques	4
2.3. Critères physiologiques	5
2.4 Critères moléculaires	5
3. Importances des actinobactéries	6
3.1 Dans le domaine médical, vétérinaire et industriel	6
3.2 Dans le domaine agronomique	6
4. Les enzymes des actinobactéries	6
4.1. Cellulases	7
4.2. Pectinases	7
4.3 Amylases	8
4.4. Chitinases	8
4.5. Lipases	9
4.6. Protéases	10
Chapitre II. Matériels et méthodes	
Matériels et méthodes	
I. Echantillonnage	12
II. Isolement des actinobactéries	12
III. Caractérisation des souches sélectionnées	13
1. Etude des caractères morphologiques	13
1.1. Macromorphologie	13
1.2. Micromorphologie	13
2. Etude de l'activité Enzymatique des souches	13

2.1. Recherche de l'activité amylolytique	14
2.2. Recherche de l'activité cellulosique	14
2.3. Recherche de l'activité lipasique	14
2.4. Recherche de l'activité L-tyrosinase	14
2.5. Recherche de l'activité pectinolytique	14
2.6. Recherche de l'activité chitinolytique	15
2.7. Recherche de l'activité L-asparaginase	15
2.8. Recherche de l'activité protéasique	15
2.8.1. Caséinase	15
2.8.2. Protéases	15
3. Dosage de l'activité enzymatique	15
3.1. Préculture	15
3.2. Estimation de l'activité enzymatique	16
IV. Etude de l'activité antimicrobienne des souches	16
1. Screening de l'activité antimicrobienne des souches étudiées	16
2. Extraction des antibiotiques produits par l'isolat sélectionné	17
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des molécules extraites	17
Chapitre III. Résultats et discussion	
I. Isolement et caractérisation des actinobactéries	18
II. Caractérisation des isolats sélectionnés	19
1. Caractères macromorphologiques	20
2. Caractères micro-morphologiques	25
3. Etude de l'activité enzymatique des souches d'actinobactéries	26
3.1. Recherche de l'activité cellulolytique	26
3.2. Recherche de l'activité amylolytique	27

3.3. Recherche de l'activité lipasique	28
3.4. Recherche de l'activité des estérases	29
3.5. Recherche de l'activité L-tyrosinase	29
3.6. Recherche de l'activité protéasique	30
3.7. Recherche de l'activité chitinolytique	32
3.8. Recherche de l'activité pectinolytique	33
3.9. Recherche de l'activité L-asparaginase	33
4. Dosage des activités enzymatiques	34
I. Activité antimicrobienne des souches d'actinobactéries productrices D'enzymes	35
1. Test des cylindres d'agar	35
2. Activité antimicrobienne des antibiotiques extraits de l'isolat S10 (Test des puits).	38
Conclusion	40
Références bibliographique	
Annexe	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau	Titre de Tableau	pages
Tableau I	Distribution des actinobactéries dans les différents écosystèmes	03
Tableau II	Nombres et caractères morphologiques des actinobactéries isolées sur les milieux d'isolement.	18
Tableau III	Caractères macromorphologiques de l'isolat S1CMC	20
Tableau IV	Croissance des 16 souches sur les milieux ISP	21
Tableau V	Couleur de Mycélium aérien des 16 souches sur les milieux ISP	22
Tableau VI	La couleur du Mycélium de substrat des 16 souches sur les milieux ISP	23
Tableau VII	Les pigments des souches sur les milieux ISP	24
Tableau VIII	Croissance des souches d'actinobactéries sur différents milieux enzymatiques	34
Tableau IX	Diamètres des zones d'inhibition des cylindres d'agar de S10 cultivée sur milieux Mincer et SCA et testés contre les moisissures.	38

Liste des Figures

	Titre de la figure	page
Figure01	Représentation des différentes formes morphologiques des actinobactéries	04
Figure 02	Localisation géographique de l'usine CEVETAL	12
Figure 03	Station traitement des déchets Unité d'ELKSEUR	12
Figure 04	photographie de la souche S1CMC sur milieu CMC agar	19
Figure 05	Aspect de la croissance de mycélium aérien de certaines souches d'actinobactéries sur des milieux ISP	23
Figure 06	Aspect du Mycélium de substrat des souches d'actinobactéries sur les milieux ISP.	24
Figure 07	Observation de la souche S1CMC sous un microscope optique (Gx10) Sur milieu ISP4	25
Figure 08	Observation microscopique sur les milieux ISP en utilisant le grossissement (x10) Sous un microscope optique	25
Figure 9	L'activité cellulolytique de deux souches d'actinobactéries sur milieu CMC	27
Figure 10	Les zones d'hydrolyse de l'amidon par des souches d'actinobactérie productrices d'amylases révélées par la solution Lugol	28
Figure 11	L'activité lipasique des actinobactéries sur milieu tween 20.	29
Figure 12	L'activité estérasique des actinobactéries sur milieu tween 80	29
Figure 13	Dégradation de la tyrosine par des souches d'actinobactéries	30
Figure 14	Activité protéasique des actinobactéries	31
Figure 15	Histogramme de la moyenne des halos d'activité protéasique produ par les souches d'actinobactéries étudiées.	32
Figure 16	Photographie de quelques activités pectinolytiques des souches d'actinobactéries sur le milieu MP7	33
Figure 17	Résultats du test des cylindres d'agar des souches actinobactéries cultivées sur milieu SCA.	36
Figure 18	Résultats du test des cylindres d'agar des souches actinobactéries cultivées sur milieu Mincer	37
Figure 19	Photographies des résultats du test des puits de l'extrait de la souche S10	38
Figure 20	Résultats du test des puits de l'extrait brut de l'isolat S10.	39
Figure 21	Micromorphologie de certains genres d'actinobactéries	Annexe4

Liste des abréviations

CMC	: Carboxy-methyl-cellulose
ISP	: International <i>Streptomyces</i> Project
ADS	: Asparagine – Dextrose – Starch
DNS	: acide 3,5-dinitrosalicylique
SCA	: Starch Casein Agar
UFC/ml	: unité formant colonies/millilitre
Abs	: absent
EC	: enzyme commission
MH	: Mueller Hinton
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline

Résumé

Ce travail s'est intéressé à l'isolement d'actinobactéries productrices d'enzymes à partir de la station des déchets de l'unité d'Elkseur du Complexe CEVITAL d'une part, et leur caractérisation ainsi que 16 autres souches de la collection du laboratoire LMA d'autre part. 28 isolats ont été obtenus sur les différents milieux solides préparés à base de substrats d'enzymes (amylase, cellulase, protéases, pectinase, lipases, chitinase, L-tyrosinase et L-asparaginase) et la souche S1CMC a été purifiée et caractérisée morphologiquement. Les résultats de la recherche de biocatalyseurs ont révélé le potentiel de tous nos isolats à synthétiser plusieurs enzymes d'intérêt. Ces isolats ont présenté une diversité de caractères morphologiques étudiés notamment la micromorphologie distincte de celle des *Streptomyces*. Le test des cylindres d'agar des 16 souches d'actinobactéries testées à l'égard de 9 bactéries pathogènes, et quatre champignons ravageurs de plantes a montré l'activité antimicrobienne importante de toutes les actinobactéries (contre *E. coli*, *S. aureus*, *SARM*, *V. cholerae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*) avec des diamètres de zones d'inhibition dépassant les 18 mm dans la majorité des cas, notamment contre des germes multirésistants tel que *E. coli* ST131 et *Ac. Baumannii*. Se basant sur son excellente activité antimicrobienne ainsi que sa production d'un large éventail d'enzymes, la souche S10 a fait l'objet d'une extraction solide-liquide de ses molécules bioactives. Le test des puits de cet extrait sur les mêmes germes cibles que celles testées pour les cylindres d'agar a révélé de larges zones d'inhibition à l'encontre de toutes les cibles allant dans la majorité des cas jusqu'à 35 mm de diamètre.

Abstract

This work focused on the isolation of enzyme-producing actinobacteria from the waste station of the Elkseur unit of the CEVITAL Complex on the one hand, and their characterization along with 16 other strains from the LMA laboratory collection on the other. 28 isolates were obtained on the various solid media prepared with enzyme substrates (amylase, cellulase, proteases, pectinase, lipases, chitinase, L-tyrosinase and L-asparaginase) and strain S1CMC was purified and morphologically characterized. The results of our biocatalyst research revealed the potential of all our isolates to synthesize several enzymes of interest. These isolates showed a diversity of morphological characters studied, notably micromorphology distinct from that of *Streptomyces*. Agar cylinder testing of the 16 actinobacteria strains tested against 9 pathogenic bacteria, and four plant-pest fungi showed the significant antimicrobial activity of all our actinobacteria (against *E. coli*, *S. aureus*, *MRSA*, *V. cholerae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*) with inhibition zone diameters exceeding 18 mm in the majority of cases, notably against multi-resistant germs such as *E. coli ST131* and *Ac. Baumannii*. Based on its excellent antimicrobial activity and production of a wide range of enzymes, strain S10 was subjected to a solid-liquid extraction of its bioactive molecules. Testing the wells of this extract on the same target germs as those tested for the agar cylinders revealed broad zones of inhibition against all targets, in most cases up to 35 mm in diameter.

Introduction

La hausse et le développement de la technologie dans de divers domaines, a exigé une augmentation de la demande enzymatique d'une part, et d'autre part à générer des déchets qui nécessite une valorisation. L'utilisation des enzymes est d'une grande importance dans la bioremédiation et la gestion des déchets notamment, ceux produits par voie microbienne.

Les microorganismes sont largement exploités en biotechnologie pour la production de molécules bioactives ayant des activités biologiques très importantes, notamment, différentes espèces actinobactéries présentent des capacités de biodégradation des molécules organiques. Cette fonction de biodégradation est due à la variété d'enzymes qu'elles peuvent synthétiser. **(Mc Carthy et al.,1992)** Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses, de structure analogue à celle des champignons auxquels elles étaient autrefois assimilées. Mais malgré leur aspect morphologique de type fongique, leur physiologie et leur organisation cellulaire sont de type procaryote et confirment leur classification parmi les bactéries **(Bousseboua, 2002)**.

Les enzymes sont des biocatalyseurs produits par les cellules vivantes dont la fonction est de favoriser des réactions biochimiques spécifiques, liées aux processus métaboliques des cellules. **(Brahmachari, 2016)**. L'exploitation croissante des enzymes dans les domaines industriels fait appel à un besoin continu pour avoir des conditions de production intéressantes de point de vue quantitatif et qualitatif, ce qui pousse les chercheurs à continuer leurs travaux de screening. En outre les enzymes microbiennes sont plus actives et stables. Les actinobactéries représentent une alternative efficace d'enzymes car ils ont une utilisation étendue dans les différentes industries grâce à la facilité de culture et une production de grande quantité, de plus, sont de nature non toxique et une rentabilité de production plus efficace. Les principales enzymes utilisées sur le marché mondial sont les hydrolases et qui sont : les amylases, les lipases, les protéases, les cellulases. **(Gürkök, 2019)**.

La présente étude est portée sur la recherche des enzymes à intérêt biotechnologique synthétisées par des actinobactéries et la caractérisation de ces derniers. Notre travail s'organise autour de trois chapitres : Le premier chapitre fait état des connaissances existantes sur les enzymes et les actinobactéries Le deuxième chapitre expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour l'isolement et la caractérisation des souches d'actinobactéries, l'étude morphologique, enzymatique et antibiotique Le troisième et dernier chapitre rapporte et discute les résultats obtenus au cours de cette étude, enfin la conclusion revient sur les expériences réalisées et les résultats obtenus.

Chapitre01 : Revue bibliographique

Actinobactéries

I. Historique et généralités

Les actinomycètes ont été décrits pour la première fois par Ferdinand Cohn en 1878. L'ancien nom des actinobactéries était « actinomycètes » provenant du Grec « *aktino -mycètes* » ou « champignons à rayons » ou encore « champignons rayonnants » (**Gottlieb, 1973**).

Depuis que Cohn en 1875 a découvert le premier actinomycète qu'il appela *Streptothrix foeresteri*, d'autres travaux se sont suivis durant la première époque qui a commencé de 1874 à 1900. Au cours de cette période, **Harz en 1877**, isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis*. Durant la seconde période, allant de 1900-1919, **Orla Yensen (1909)** créa la famille des Actinomycétacées qui comprend un seul genre *Actinomyces*. Ce même auteur rapporte que de nombreuses études se sont orientées à la recherche des Actinomycètes du sol. Par la suite, de nombreuses espèces telluriques furent isolées et décrites. **Buchanan (1917)** créa l'ordre des Actinomycetales. A cette époque, les espèces composant le genre *Actinomyces* étaient très différentes et certains auteurs ont commencé par scinder ce genre en plusieurs autres genres. Vient ensuite la troisième période de l'histoire des actinomycètes (1919-1940) et cela grâce aux travaux de recherches de **Orskov (1923)** qui créa le Genre *Micromonospora*, à cette époque une meilleure connaissance des germes d'actinomycètes a été acquise. Ce genre regroupe les actinomycètes qui ne produisaient pas de mycélium aérien. La quatrième et dernière période, qui a commencé en 1940 et qui correspondait à l'époque des antibiotiques produits par les actinomycètes, regroupait les actinomycètes dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores (**Waksman et Henrici, 1943**). Enfin, en 1958, **Ettling et collaborateurs** ont introduit un critère important dans la différenciation des espèces d'actinomycètes, la production des pigments mélanoïdes.

Les actinobactéries font partie du règne des procaryotes à gram positif (**Williams et al., 1993 ; Sanglier et trujillo, 1997**) qui ont un GC% supérieur à 55% (**Goodfellow, 1983**). La plupart sont saprophytes et aérobies et utilisent une variété de sources d'énergie (chimio-organotrophes) mais certains sont des chimio-autotrophes (**Mariat et Seballd, 1990 ; Ensign et al., 1993**). Elles possèdent généralement une structure filamenteuse avec un diamètre des filaments allant de 0,5 à 2 µm (**Lamari, 2006**), qui sont ramifiés en mycélium et présentent des septums, leur cycle biologique est semblable à celui de certains champignons (**Kalakoutski et Agre, 1976**). Le genre *Streptomyces* est le plus étudié dans ce groupe (**Perry et al., 2004**).

Les actinobactéries constituent une proportion importante de la microflore tellurique (**Dommergues et Mangenot, 1970**) mais également rencontrées les milieux aquatiques et dans des sédiments océaniques situés à plus de 4 000 m de profondeur, dans l'air, le fumier et les

composts, le foin et les pailles, les grains de céréales, les débris végétaux, les litières, les résidus fibreux de cannes à sucre, le pollen et bien d'autres substrats. Elles sont réparties dans les sols glaciaires de l'arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols des régions industrielles pollués par du pétrole ou des métaux lourds (Lacey, 1973 ; Breuilland *et al.*, 1974 ; Couch et Bland, 1974 ; Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983). Elles sont Généralement aérobies mais, certaines formes sont aérobies facultatives ou même anaérobies. Ce sont en grande majorité des neutrophiles et poussent de façon optimale dans une gamme de pH allant de 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité. Ils peuvent cependant être prédominants dans certains sols très acides (Takahashi *et al.*, 1996 et Harvey, 1999), dans des lacs extrêmement alcalins et dans certains milieux très salés (Lechevalier, 1981). La distribution des actinobactéries des écosystèmes extrêmes a été rapportée par plusieurs auteurs (Tableau I), dans le but d'étudier leur métabolisme secondaire, ils suggèrent que ces niches abiotiques rares renferment de nouvelles souches et/ou de nouvelles molécules d'intérêt pharmaceutique (Lazzarini *et al.*, 2000 ; Rojas *et al.*, 2009 ; Gurielidze *et al.*, 2010).

Tableau I : Distribution des actinobactéries dans les différents écosystèmes
(Williams *et al.*, 1984)

Actinobactéries	Habitats
<i>Actinoplanes</i> spp	Eau douce, litière végétale, sol.
<i>Frankia</i> spp.	Nodules racinaires des non-légumineuses, sol.
<i>Micromonospora</i> spp.	Eau douce, sédiments, sols (humides ou non).
<i>Nocardia amarae</i>	Boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Déjections animales, eau, sol.
<i>Saccharopolyspora reactivigula</i>	Foin moisi, sol.
<i>Saccharomonospora</i>	Compost, sol.
<i>Streptomyces</i> spp.	Sol, litière végétale, eau.

II. Taxonomie des actinobactéries

Suite à l'application de nouvelles techniques chimiques, biochimiques, moléculaires et numériques, la taxonomie bactérienne a subi plusieurs modifications. En effet, la classification des actinobactéries était principalement basée sur des critères phénotypiques (morphologiques, chimiques et physiologiques).

1. Critères morphologiques

Il s'agit de la fragmentation ou non du mycélium, la présence ou non de mycélium aérien, la production des spores,.... Etc. La structure mycélienne des actinobactéries présente une grande diversité de morphologies. On distingue trois formes (Djaballah, 2010)

- Seul le mycélium végétatif est formé (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*). La croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu.
- Il y a formation de mycélium végétatif puis un mycélium aérien maturé en conidies (exemple : *Streptomyces*). Le mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat.
- Seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que pour le genre *Sporichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachés au substratum par des crampons.

Certaines actinobactéries forment des structures particulières qui sont des sclérotés (*Chainia*), des synnèmes (*Actinosynnema*), des vésicules contenant des spores (*Frankia*) ou des vésicules qui en dépourvues (*Intrasporangium*) (Figure01) (Barka *et al.*, 2016). Sur milieu solide, les actinobactéries forment des colonies très particulières résultant de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas des bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est variable de 1 à 10 mm. L'aspect des colonies peut être compact, sec, lisse, rugueux, à contours lisses ou échancrés. Les colonies sont souvent pigmentées (jaune, violet, blanc, crème, rose, gris, etc) (Perry *et al.*, 2004)

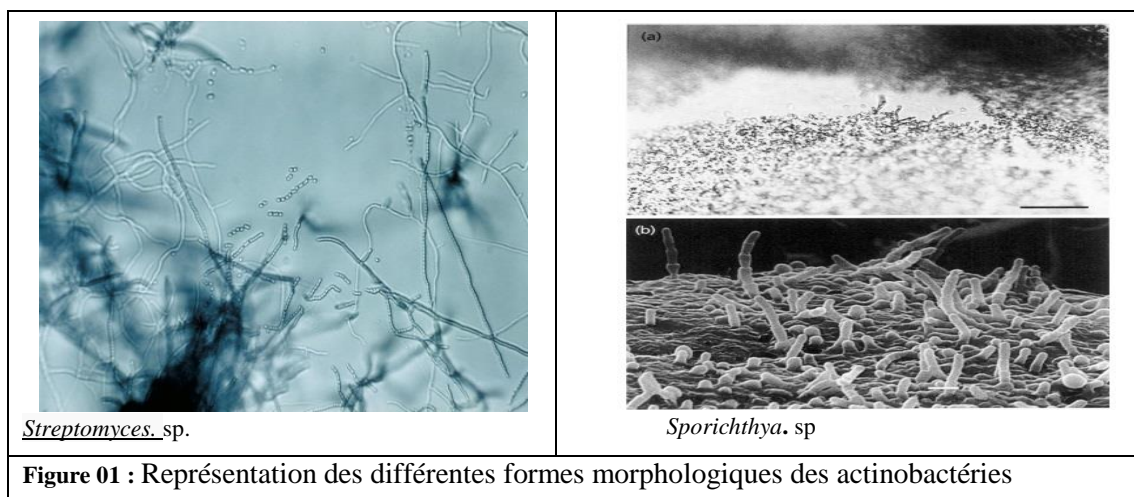


Figure 01 : Représentation des différentes formes morphologiques des actinobactéries

2. Critères chimio-taxonomiques

Le principal critère sur lequel est basée, la chimio-taxonomie est la composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides. Les deux acides aminés pariétaux les plus importants taxonomiquement sont l'acide diaminopimélique (DAP) qui peut être remplacé parfois par la lysine ainsi que la glycine qui peut être présente ou non (**Becker et al., 1965 ; Yamagushi, 1965 ; Prescott, 2003**). Les sucres ayant une importance taxonomique, sont principalement les couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose », « rhamnose galactose » (**Lechevalier et Gerber, 1970**). En outre, les lipides cellulaires tels que les phospholipides, les acides mycoliques pariétaux peuvent être présents ou absents ainsi que les ménaquinones membranaires sont aussi d'une grande importance dans l'identification des actinobactéries (**Lechevalier et al., 1977**).

3. Critères physiologiques

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité)

4. Critères moléculaires

Il n'est plus possible de proposer la création d'une nouvelle espèce sans passer par leur analyse génétique. Ces études génétiques ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes, de grouper ou de séparer des espèces entre elles ou fusionner des genres entre eux (**Zitouni, 2005**). Les principales analyses moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes sont :

➤Le séquençage des ADNr 16S : constitue un outil précieux pour déterminer le degré de relation entre souches, espèces et genres (**Larpen et Gourgau, 1985 ; Larpen, 2000**).

➤Hybridation ADN/ADN : Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance (Taux de réassociation de leurs brins d'ADN) inférieur à 70%. (**Devereux et al., 1990**).

➤Le coefficient de Chargaff ou GC% : C'est un critère important non seulement dans l'identification des genres, mais aussi des familles d'actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55% (**Badji 2006**).

Les actinobactéries sont classées dans le domaine des Bacteria ou *Eubacteria*, le phylum des Actinobacteria, la classe des Actinobacteria et la sous-classe des Actinobacteridae (**Euzéby, 2015**).

III. Importances des actinobactéries

La biodiversité des actinobactéries dans différents écosystèmes a donné naissance à un ensemble de composés bioactifs de haute valeur commerciale et utilisées dans différents domaines (industriels, biotechnologies, pharmaceutiques et alimentaires) (**Bouaziz, 2018**).

Ces microorganismes font partie des procaryotes les plus précieux économiquement. Ils sont responsables de la production d'environ la moitié des métabolites secondaires bioactifs, antibiotiques, agents anticancéreux et enzymes. Environ 23 000 métabolites produits par des microorganismes ont été signalés dont plus de 10 000 sont produits par les actinobactéries, représentant 45% de tous les microorganismes découverts pour leur synthèse de métabolites bioactifs (**Khamna et al., 2010, Sobathra et al., 2012**).

1. Dans le domaine médical, vétérinaire et industriel

Plus de 60% des médicaments approuvés dérivent des composés naturels et la plupart ont été extraits à partir d'actinobactéries (**Demain et Laicini, 2006, Anibo et al., 2008**). En plus de leur effet médical pour lutter contre les maladies infectieuses, les antibiotiques produits par les actinobactéries trouvent également une application dans les élevages industriels d'animaux (**Khachatourians, 1998**).

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinobactéries, certaines sont utilisées à cet effet dans l'industrie alimentaire (glucose isomérase) et dans celle des détergents (protéases). Les glycosidases des actinobactéries jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanases, cellulases) et animales (chitinases) (**Lechevalier, 1981**).

2. Dans le domaine agronomique

Un grand nombre de métabolites d'importances commerciales sont produits par les actinobactéries en plus d'autres potentiels de grande valeur telle que leur implication dans le processus de recyclage, exemple le recyclage de la matière organique. Grâce à leur pouvoir de décomposition des algues bleues et d'autres bactéries et à leur capacité de dégradation des composés organiques complexes, ils sont utilisés dans la bioremédiation (**Pizzul, 2006 ; Zaitlin et Watson, 2006**).

Dans l'agriculture, les actinobactéries protègent les racines des plantes contre les invasions des champignons (**Lamari, 2006**). Il a été rapporté que les actinobactéries influencent la croissance des plantes grâce à leurs activités antimicrobiennes au niveau du sol et augmentent la vitesse de synthèse et de minéralisation de la matière organique, permettant ainsi une bonne nutrition pour les plantes (**Yilma et al., 2008**).

IV. Les enzymes des actinobactéries

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui assurent le déroulement de toutes les réactions métaboliques des organismes vivants en agissant sur une multitude de molécules complexes. Grâce à leur meilleure activité et stabilité que celles végétales et animales, les enzymes microbiennes trouvent des utilisations étendues dans diverses industries. Dans le but de produire différentes enzymes afin de répondre aux exigences actuelles, les industries recherchent continuellement de nouvelles souches bactériennes. En effet, un large éventail d'enzymes synthétisées par différents genres d'actinobactéries et appliquées dans diverses industries a été signalé (**Nawani et al., 2002 ; Zhang et al., 2011**).

1. Cellulases

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de la dégradation de la cellulose dans la nature. Elles sont principalement produites par les champignons, les bactéries, aussi par des organismes représentant le règne animal, (**Khelil, 2017**). Les cellulases se réfèrent à une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1,4 β -D glycosidiques (**Dari, 2013**). L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés, à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment (**Bensmira, 2006**). Aussi utilisées comme additifs dans l'alimentation animale, ajoutées aux aliments pour volailles ou porcins, améliorent leur digestibilité, dans la fabrication des pâtes à papier, dans l'industrie alimentaire, des textiles et des détergents (**Benkerrou et Hamaili, 2012**). Les cellulases sont largement répandues dans la nature. Bien que retrouvées chez certains animaux et plantes, parasites de végétaux ou saprophytes dans le sol, les cellulases sont largement distribuées chez les microorganismes. De plus, les cellulases microbiennes sont très variées, avec de grandes différences dans leur structure, leurs propriétés physicochimiques et leurs activités catalytiques. Les cellulases ont été retrouvées chez les levures, les moisissures et les bactéries, mais plus fréquemment chez ces deux dernières. Chez les moisissures, les cellulases sont fréquemment isolées à partir des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*. Chez les bactéries, elles sont souvent isolées à partir de *Streptomyces* chez les actinomycètes et les genres *Bacillus* et *Clostridium* chez les autres bactéries (**Candace et Weimer 1991**).

2. Pectinases

Les substances pectiques sont des macromolécules contenant des acides galacturoniques polymérisés, de haut poids moléculaire, chargées négativement, largement répandues dans le

règne végétal (**Haberra, 2014**). Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques (**Lamrini, 2012**) et leur production est élaborée par différents genres d'actinobactéries tel que: *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et les *Streptomyces* (**Massaoudi, 2015**). Par définition, les pectinases forment une catégorie d'enzymes qui coupent les liaisons glycosidiques des résidus d'acide galacturonique dans les matériaux pectiques (**Kheder, 2007**). Il est important de mentionner que les pectinases sont classées selon la nature du substrat, le mécanisme de dégradation et le type de clivage (**Lamrini, 2012**). Ces enzymes ont une importance cruciale aussi bien dans le secteur agroalimentaire que biotechnologique. Elles sont utilisées essentiellement dans l'industrie d'élaboration des jus de fruits (extraction de jus, clarification ou stabilisation du jus de fruits et la macération) (**Bennamoun, 2017**).

3. Amylases

L'amidon est un homopolymère de D-glucose. Les unités D-glucosyl sont liées majoritairement par des liaisons de type α (1,4) (95 – 96 %). L'amidon est composé de deux polymères de structure primaire différente : l'amylose, molécule linéaire, et l'amylopectine, molécule ramifiée (**Kara Slimane, 2010**). L'amylose est un polyholoside essentiellement linéaire de glucose puisqu'il possède moins de 1% de branchement α (1-6) (**Mostafa.,2002**) L'amylopectine est le composant majoritaire de l'amidon représentant en moyenne 70 à 80 % de l'amidon sec. Cette macromolécule est, tout comme l'amylose, un homopolymère constitué de glucose majoritairement liés en α (1-4) mais comptant 5 à 6 % de liaisons α (1-6) (**Buléon, 1998**).

Les enzymes amylolytiques sont un groupe étendu d'enzymes appartenant à la famille des glyco-hydrolases (GH). Elles catalysent les réactions hydrolytiques de l'amylose, de l'amylopectine, du glycogène et des polymères de glucose apparentés. Différentes préparations d' α -amylase sont disponibles avec de divers fabricants d'enzymes pour utilisation spécifique dans différentes industries. Par exemple, l'utilisation des α -amylases dans l'industrie du textile permet le désencollage, (**Zoubiri, 2011**).

Ces enzymes sont produites par une diversité d'organismes vivants : animaux, végétaux et microorganismes (bactéries, champignons microscopiques et levures). Du point de vue biotechnologique, les microorganismes restent la source majeure de production des amylases. Ainsi, ces micro-organismes produisent un large éventail d'amylases, intracellulaires et/ou extracellulaires (**Najafi et Kembhavi., 2005**). Bien que les amylases soient produites par plusieurs organismes, celles produites par les champignons et les bactéries dominent les

applications dans le secteur industriel (Garske et al., 2017; Sindhu et al., 2017; Debnath et al., 2019).

Les amylases sont produites par la majorité des actinobactéries et les plus intéressantes sont celles produites par les espèces thermophiles comme *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermomonospora curvata*, *Saccharomonospora viridis* et les espèces du genre *Streptomyces* (Saci, 2011).

4. Chitinases

Les enzymes chitinolytiques ou chitinases sont les enzymes qui hydrolysent la chitine. Elles sont présentes dans de nombreux organismes, virus, bactéries, champignons, insectes, plantes supérieures et mammifères. Elles sont définies comme des enzymes clivant une liaison entre C1 et C4 de deux N-acétylglucosamines consécutives de la chitine (Gokul, 2000) et ont fait l'objet d'études biologiques. Ces enzymes sont regroupées en familles, sur la base de leur similarité de séquence d'acides aminés.

Les chitinases ont suscité un intérêt dans différentes applications biotechnologiques en raison de leur capacité à dégrader la chitine dans la paroi cellulaire des champignons et des insectes, ce qui a conduit à les utiliser en tant qu'agents antimicrobiens ou insecticides. Elles sont également impliquées dans la résistance des plantes contre les pathogènes fongiques en raison de leur nature inductible et activités antifongiques *in vitro* (Taira et al. 2002). Une autre application intéressante de la chitinase est la bioconversion respectivement de la chitine et du chitosane en N-acétylglucosamines et chito-oligosaccharides qui ont des propriétés pharmacologiques.

Plusieurs genres actinomycétales peuvent produire des chitinases, on peut citer par exemple *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (Saci, 2011). La chitinase de *Streptomyces* s'est avérée active dans la génération de protoplastes à partir d'*Aspergillus oryzae* et *Fusarium solani*. Les espèces productrices de chitinases sont utilisées en agriculture pour la lutte biologique contre plusieurs champignons phytopathogènes (Gokul, 2000).

5. Lipases

Les lipases sont des enzymes produites par divers organismes, animaux, végétaux et microbiens (Gonçalves Filho et al., 2019). Ces enzymes jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides (Mireille Alloue et al., 2008). Elles ont été déterminées par Claude Bernad en 1856 dans le jeu pancréatique comme enzyme qui hydrolyse les gouttelettes d'huile insolubles et les convertit en produits solubles. Sur le marché mondial, des enzymes les lipases sont classées après les protéases et les amylases et représentent 5% de ce marché (Ilesanmi, 2020).

Les lipases (EC 3.1.1.3) font partie de la sous-classe des hydrolases spécifiques des esters carboxyliques (EC 3.1.1) et sont définies comme étant des triacylglycérol lipases, donc des enzymes capables d'hydrolyser spécifiquement les liaisons ester carboxyliques des triglycérides (TAGs), qui lient les acides gras au squelette carboné du glycérol. D'un point de vue biochimique, une lipase est obligatoirement une estérase, mais l'inverse n'est pas vrai puisqu'il existe de nombreuses estérases non lipolytiques (**Zallot, 2011**).

Chez les actinobactéries, les lipases endo et exo-cellulaires sont isolées à partir de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*. Des phospholipases sont également isolées avec un taux élevé à partir des espèces du genre *Streptovorticillium* et de l'espèce *Micromonospora chalcea* (**Saci, 2011**). En industrie agro-alimentaire, les lipases interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries. Dans la bioremédiation, l'addition de lipases dans les effluents des industries agroalimentaires souvent riches en lipides, ou même de la culture de Microorganismes les produisant dans ces effluents, permettent de réduire la charge lipidique (**Fickers et al., 2008**).

6. Protéases

Les protéases font partie de la classe des hydrolases. En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (**Guendouz et Belibel, 2014**).

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes comme les bactéries, les levures et les moisissures, mais les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources, car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinobactéries, de moisissures et de levures (**Mekdeour et Haraoui, 2017**) Plusieurs genres d'actinobactéries produisent des kératinases (*Actinomadura, Micromonospora, Nocardiosis, Planomonospora, Planobispora*). Le genre thermophile *Micropolyspora* est capable de produire des protéases alcalines thermostables alors que le genre *Oerskovia* produit des protéases résistantes à la majorité des inhibiteurs de protéases (**Saci, 2011**).

En industrie pharmaceutique, les protéases sont utilisées comme aide digestive, anti-inflammatoire, antalgique et colle chirurgicale. Elles servent pour le débridement et la cicatrisation des plaies, et le traitement des ulcères cutanés et gastriques. Dans le secteur alimentaire, elles sont utilisées dans la production du fromage, du pain, des hydrolysats de soja et l'attendrissement de la viande (**Boukhalifa-lezzar, 2015**)

*Chapitre 02 : Matériels et
Méthodes*

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Géologie de l'Université A. MIRA-Bejaia durant la période allant du 17 Mai au 27 Juin 2023.

I. Echantillonnage

Le prélèvement a été effectué au niveau de la station des déchets du complexe CEVITAL unité d'ELKSEUR, qui se situe dans le sud-ouest de la ville de BEJAIA.



Figure 02 : Localisation géographique de l'usine CEVITAL



Figure 03 : Station traitement des déchets Unité d'ELKSEUR

Trois échantillons des déchets d'usine de CEVITAL unité d'ELKSEUR ont été récupérés (déchets de la mayonnaise, de la pulpe des jus et déchets globale) aseptiquement dans des pots stériles et transférés au laboratoire dans le but d'isoler des actinobactéries productrices d'enzymes.

II. Isolement des actinobactéries

Dans cette étude, huit milieux de cultures préparés à base de différents substrats pour les enzymes recherchées, ont été utilisés pour l'isolement d'actinobactéries productrices d'enzymes. Il s'agit de la gélose à l'amidon, à la cellulose, MP7 (à base de pectine), au lait écrémé, à la L-Tyrosine, à la L-Asparagine, à la chitine ; et à la caséine. La composition de ces milieux est donnée en **annexe 1**.

Pour isoler des actinobactéries présentés dans notre échantillon nous avons utilisé la méthode des suspensions dilutions (**Badji et al., 2005**). Cette technique consiste à dissoudre 10 g d'échantillon dans 90 ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette suspension, des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-6}) sont réalisées dont la solution mère est la première dilution. Un volume de 100 μ l, prélevé à partir des dilutions, est étalé sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 21 jours et la lecture

est réalisée quotidiennement à partir du 3^{ème} jour d'incubation. Après incubation, seules les souches présentant des critères macromorphologiques des actinobactéries (colonies dures et incrustées dans la gélose, présence du mycélium du substrat (MS) et mycélium aérien (MA) ont été sélectionnées. Ces dernières sont ainsi ensemencées par la méthode des stries serrées sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

III. Caractérisation des souches sélectionnées

Dans le but de leur caractérisation, les isolats sélectionnés pour leur aptitude de production d'enzymes ont fait l'objet, d'une part, d'une étude des différents caractères morphologiques et culturels telle que préconisé par l'International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling et Gottlieb, 1966) et le Manuel de la systématique bactériologique (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Locci, 1989) et d'autre part, par une étude de deux activités biologiques, à savoir leur pouvoir antimicrobien (antibactérien et antifongique) par le test préliminaire (cylindres d'agar) et un dosage de deux activités enzymatiques (amylase et cellulase).

1. Etude des caractères morphologiques

Cette étude est basée sur les caractères culturels des colonies (croissance, couleur des mycéliums aériens et du substrat) et la micromorphologie qui consiste en l'étude de la fragmentation ou pas du mycélium ainsi que le type, la forme et de la taille des spores.

1.1. Macromorphologie

Cette étude consiste à déterminer la couleur des mycéliums aériens et du substrat ainsi que la production de pigments solubles produits sur différents milieux de culture préconisés par l'« International *Streptomyces* Project » ou ISP (Shirling et Gottlieb, 1966) (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 et ISP7).

1.2. Micromorphologie

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment ont été observés à l'aide d'un microscope optique à grossissements (x10), après 7 à 14 jours d'incubation à 30°C. Ces observations ont été réalisées directement sur les boîtes de Pétri (*in situ*) et ce pour étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation, caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation du mycélium du substrat (Williams *et al.*, 1989).

2. Etude de l'activité Enzymatique des souches

A cause de la contrainte du temps et la disponibilité du matériel nécessaire pour refaire l'isolement vu que les résultats de ce dernier été non satisfaisants, le matériel biologique de cette partie de l'étude comporte 16 souches d'actinobactéries faisant partie de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

Les souches étudiées ont été revivifiées et purifiées par des repiquages successifs, sur le milieu Mincer (**Annexe 1**) jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

2.1. Recherche de l'activité amylolytique

La recherche de cette activité a été réalisée sur une gélose contenant de l'amidon comme seule source de carbone. Les souches ont étéensemencées par la méthode des stries puis incubé à 30°C pendant 7 et 10 jours. La lecture a été réalisée après inondation des cultures par une solution de lugol. Les zones contenant de l'amidon (non dégradé) apparaîtront colorées sur la boîte de pétri. Tandis que l'absence de coloration autour des colonies signifie que l'amidon présent dans le milieu a été dégradé.

2.2. Recherche de l'activité cellulosique

L'activité cellulosique a été recherchée sur une gélose additionnée de carboxy-méthyl cellulose (CMC) (**Annexe 1**). Après 7 à 10 jours d'incubation à 30°C, la production des cellulases a été détectée en ajoutant une solution de rouge Congo à 0,9% (**Annexe 1**) sur les cultures. Après 15 min, la solution a été drainée et les milieux ont été lavés avec du NaCl (1 M). Après 30 minutes, une formation d'un halo orange autour de la colonie indique une activité cellulosique.

2.3. Recherche de l'activité lipasique

La production des estérases et des lipases a été évaluée selon la méthode décrite par Sierra sur une gélose additionnée de tween 80 et tween 20 respectivement (**Annexe 1**). Après 7 à 10 jours d'incubation à 30°C, l'apparition d'un halo opaque autour des colonies traduit la présence d'une estérase et d'une lipase (**sierra, 1957**).

2.4. Recherche de l'activité L-tyrosinase

La L-tyrosinase a été recherchée sur une gélose à la tyrosine (**annexe 1**). Après 7 à 21 jours d'incubation, Les boîtes sontensemencées par la méthode des stries à 30°C, la dégradation de la tyrosine se manifeste par une auréole de coloration marron autour des colonies qui peut se transformer graduellement en noire (**Gourdon et al., 1974**).

2.5. Recherche de l'activité pectinolytique

L'activité pectinolytique a été détectée en utilisant une gélose Mp7 (**Annexe1**) après incubation à 30°C pendant 7 à 21 jours. La production de pectinase a été détectée par l'observation d'un halo transparent causé par l'hydrolyse de la pectine, indiquant une activité pectinolytique positive.

2.6. Recherche de l'activité chitinolytique

Le milieu utilisé pour la recherche des chitinases, est une gélose additionnée à la chitine (**Annexe1**). L'incubation dure 7 jours au minimum à 30°C. L'activité chitinolytique se manifeste par l'apparition d'un halo transparent autour des disques (**Kopečný et al., 1996**).

2.7. Recherche de l'activité L-asparaginase

L'activité L-asparaginase a été recherchée sur un milieu contenant de l'asparagine (**Annexe1**), après une incubation à 30°C pendant 7 jours, le résultat se révèle positif par un virage de couleur de la gélose du jaune au rose autour des colonies.

Le virage de la couleur du milieu gélosé ADS, autour des colonies développées, indique l'alcalinisation par production d'ammoniac. Comme la seule source d'azote du milieu est la L-Asparagine, son hydrolyse est à l'origine de la production d'ammoniac. L'hydrolyse de cet acide aminé dans les milieux de cultureensemencés, contrairement au résultat négatif, peut s'expliquer par la production de l'enzyme L-asparaginase (**Imada et al., 1973 ; Meena et al., 2015**). Le même résultat a été obtenu par **Konečná et al. (2004)** qui avaient isolé, sur gélose ADS, une souche d'actinobactéries appartenant au genre *Arthrobacter* et produisant la L-asparaginase sur gélose ADS modifiée. Les mêmes auteurs ont réalisé l'optimisation de la production de l'enzyme, en tenant compte de la température et de la composition chimique du milieu de culture. (**Chergui ; 2018**)

2.8. Recherche de l'activité protéasique

2.8.1 Protéases

Pour la recherche de l'activité protéolytique, les souches d'actinobactéries ont étéensemencées par la méthode des stries sur une gélose additionnée au lait écrémé (**Annexe1**), l'ensemble est incubé dans une étuve à 30°C pendant 7 jours. Le principe de ce test est basé sur l'observation des zones d'hydrolyses sous forme de halos translucides entourant les colonies.

3. Dosage de l'activité enzymatique

3.1. Préculture

Des précultures de la souche active retenue ont été obtenues en raclant les spores contenues dans une culture de l'actinobactérie âgée de 7 jours d'incubation à 30°C sur le milieu solide

contenant le substrat de l'enzyme à doser (amylase ou cellulase), puis inoculées dans 3 ml du même milieu liquide. Après 48h d'incubation à 30°C et sous agitation à 140 rpm, ces précultures ont été utilisées pour inoculer le milieu de production. 50 mL de ce dernier contenu dans un Erlenmeyer de 250 mL est inoculé par les précultures à raison de 10%. Après 7 jours d'incubation à 30°C sous agitation à 140 rpm, les cultures ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 20 minutes. Les surnageants de cultures ainsi récupérés ont fait objet du dosage de l'activité enzymatique (amylase ou cellulase selon le milieu utilisé)

3.2. Estimation de l'activité enzymatique

Les activités amylolytique et cellulolytique ont été dosées par la méthode DNS. (Annexe 2) en mélangeant 50 µL d'extrait enzymatique brute avec 450µL du substrat soluble (à 1%) de l'enzyme étudiée (d'amidon soluble ou de CMC soluble) préparé dans un tampon phosphate de sodium à 0,02 M. Après incubation à 30°C pendant 30 minutes, la réaction a été stoppée par addition de 2 ml du réactif acide 3,5-dinitrosalicylique et l'absorbance a été mesurée à 540 nm par un spectrophotomètre UV/Vis. Le glucose libéré a été déterminé à partir de la courbe standard (Annexe 2).

IV. Etude de l'activité antimicrobienne des souches

1. Screening de l'activité antimicrobienne des souches étudiées

L'activité antimicrobienne des souches étudiées a été recherchée à l'égard de neuf bactéries pathogènes : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ST131, SARM ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 14028 et *Vibrio cholerae* ATCC ATCC 14035 *Acinetobacter baumannii* ; de trois moisissures phytopathogènes : *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis* sp et enfin d'une levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

Les souches étudiées ont été ensemencées par des stries serrées sur deux différents milieux Minceur (Mincer *et al.*, 2002) et le milieu SCA (Starch Casein-Agar) (Küster et Williams, 1964) dont les compositions sont données en annexe 3, puis incubés à 30°C pendant 7 jours. Après incubation, des cylindres d'agar de 6mm de diamètre ont été prélevés et déposés sur milieu Muller-Hinton (annexe 3) préalablement ensemencé par des bactéries pathogènes à raison de 10⁷ UFC/mL une de et 10⁶ UFC/ml (levure ou spore/ml) sur le milieu Sabouraud (annexe 3) pour les Champignons (Bastide *et al.*, 1986). Ont été mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances actives éventuellement produites, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et la levure et à 25°C /48-72h pour les

champignons filamenteux. Les diamètres des zones d'inhibitions (en mm et le diamètre du cylindre étant pris en compte) ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. La souche présentant la meilleure activité antimicrobienne a été sélectionnée pour la suite de l'étude.

2. Extraction des antibiotiques produits par l'isolat sélectionné

L'actinobactérie sélectionnée par le test des cylindres d'agar a été d'abord cultivée sur 20 boîtes de Pétri contenant le milieu Mincer solide. Après 7 jours d'incubation à 30°C, le contenu des boîtes de Pétri (correspondant à 500 ml de milieu de culture) a été découpé stérilement en petits cubes et soumis à une extraction (solide-liquide) avec un volume équivalent (500 ml) de l'acétate d'éthyle, le mélange est ensuite couvert avec du papier aluminium et laissé sous agitation à température ambiante. Après six heures de macération, le contenu de l'Erlenmeyer est filtré à l'aide du Papier Wattman n°1 et le filtrat organique ainsi obtenu a été évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Heidolph**) sous vide et à 40°C. Le résidu sec a été récupéré dans 3ml de méthanol.

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des molécules extraites

L'activité antimicrobienne de l'extrait organique brut de la souche active sélectionnée a été évaluée par la méthode des puits contre les mêmes germes cibles précédemment cités, sur le milieu Muller Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les champignons) préalablement ensemencé par écouvillonnage avec le germe cible à raison de 10^7 UFC/mL (Bactéries) ou 10^6 spores / mL (Champignons). Des puits de 6 mm de diamètre ont été formés à l'aide d'un emporte-pièce et un volume de 30 µl de l'extrait méthanolique a été testé. Le même volume de méthanol à 95% a été utilisé comme témoin négatif. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2h afin de permettre la diffusion des substances bioactives éventuellement produites avant d'être incubées à 25°C pendant 3 jours pour les moisissures et à 37°C pendant à 24h pour les bactéries et la levure. Le diamètre des zones d'inhibitions formées autour des puits a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

Résultats et discussions

Dans cette partie, seront discutés les différents résultats obtenus dans ce travail dont le but était d'isoler des actinobactéries dotées d'une aptitude de production d'enzymes d'intérêts industriels, à partir d'échantillons de déchets de l'unité d'Elkseur du Complexe CEVITAL. En outre, l'activité enzymatique de seize souches de la collection de Mme SOUAGUI épouse BOUDRIES Samiha ont fait objet d'une étude de screening de production de quelques enzymes et d'antibiotiques.

I. Isolement et caractérisation des actinobactéries

Dans cette étude, un échantillon provenant de la station des déchets de CEVITAL unité d'ELKSEUR, willaya de BEJAIA est utilisé pour isoler des souches d'actinobactéries productrices d'enzymes d'intérêts industriels en utilisant différents milieux contenant le substrat de chaque enzyme.

Après environ quatre semaines d'incubation à 30°C, au total 28 souches d'actinobactéries ont été obtenues sur les différents milieux utilisés. Celles-ci étaient sélectionnées selon l'aspect des colonies représentant un aspect morphologique caractéristique aux actinobactéries. Les souches apparaissent sèches, colorées ou non, incrustées dans la gélose, rudes avec parfois production de pigments diffusibles. Le Tableau II illustre le nombre de souches d'actinobactéries issues de chaque milieu d'isolement.

Tableau II : Nombres et caractères morphologiques des actinobactéries isolées sur les milieux d'isolement.

MILIEUX	CROISSANCE	NOMBRE DE COLONIE	MACROMORPHOLOGIE	DIAMETRE (MM)
TWEEN 20	+++	12	Colonies avec un halo transparent	(2-4)
CMC	++	6	Colonies noires	(2-5)
LAIT ECREME	++	7	Colonies noires de grande taille	(1-3)
MP7	+	3	Colonies grises	(2-4)

+++ : Très bonne croissance, ++ : croissance modérée et + : croissance faible.

D'après les résultats du tableau II, nous remarquons que le nombre le plus élevé des souches (12/28) sont isolées sur le milieu Tween 20 suivi du milieu lait écrémé (7/28), du milieu à la carboxyméthylcellulose (6/28) puis en dernier le milieu MP7 à base de pectine sur lequel sauf 3 isolats sont obtenus. L'unité d'Elkseur (CEVITAL) est le siège de production de sauces

(mayonnaise, moutardes et d'autres sauces), et le jus TCHINA ce qui explique la présence de substrats lipidiques, celluloses et pectiques dans l'échantillon utilisé pour notre isolement. Ces substrats peuvent être dégradés par les enzymes des actinobactéries isolées sur chaque milieu.

A cause de la contrainte du temps ainsi que la limite en matériel disponible au laboratoire, une souche d'actinobactéries a été choisie issue de la dilution 10^{-5} sur le milieu CMC (S1CMC), et ce en raison de ces caractéristiques morphologiques non ordinaires telle que l'aspect très rude des colonies, la couleur noire des mycéliums du substrat (MS) et celui aérien (MA). Après la purification, l'isolat S1 CMC est gardé pour la suite de l'étude.

La figure 04 illustre l'aspect morphologique de la S1CMC. La croissance de cette actinobactérie sur ce milieu signifie l'aptitude de cette dernière à synthétiser des cellulases.



Figure 04 : Photographie de la souche S1CMC sur milieu CMC agar

La durée d'incubation des boîtes peut être critique sachant que les non-Streptomycètes poussent plus lentement que les actinobactéries du genre *Streptomyces* (Cross, 1982). Dans ce travail, la croissance de certains isolats a été relativement plus lente (4, 7, 20 jours) que d'autres. Ce qui suggère qu'ils pourraient probablement appartenir aux non-Streptomycètes, car selon Goodfellow (1983) les *Streptomyces* sont connues pour leur croissance relativement rapide.

II. Caractérisation des isolats sélectionnés

L'identification des genres d'actinobactéries repose sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques ajoutés à d'autres examens au microscope électronique qui doivent également être effectués afin de déterminer l'ornementation des parois sporaes (Larpen et Sanglier, 1989). En outre, cette identification prend en considération d'autres critères

chimiotaxonomiques basés sur les caractères chimiques de la paroi cellulaire, à savoir des acides aminés, des glucides et des lipides membranaires (O'donnell, 1988).

Dans cette étude, seuls les caractères macro et micromorphologiques des souches sont étudiés. Cependant, pour une étude complète, la caractérisation chimiotaxonomique et physiologique est primordiale dans le but d'une identification du genre.

1. Caractères macromorphologiques

L'aspect phénotypique et les caractères cultureux des isolats ont été déterminés sur les milieux de culture ISP (International *Streptomyces* Project) recommandés par (Shirling et Gottlieb, 1966). L'importance de la croissance, le développement et la couleur des mycéliums (aérien et végétatif) sur chaque milieu ainsi que la présence ou non de pigments diffusibles dans la gélose ont été observés après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30°C. Le tableau III illustre la macromorphologie de l'isolat S1CMC poussant sur les différents milieux de culture testés.

Tableau III : Caractères macromorphologiques de l'isolat S1CMC

Milieu x	Croissance	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium du substrat	Pigments diffusibles
ISP1	++	noir	noir	Abs
ISP2	+	noir	noir	Abs
ISP3	++	noir	noir	Abs
ISP4	++	gris-verdâtre	noir	Abs
ISP5	+	noir	noir	Abs
ISP7	+	noir	noir	Abs

D'après les résultats présents sur le tableau ci-dessus, nous remarquons une croissance moyenne de la souche S1CMC après 21 jours d'incubation à 30°C sur les trois milieux ISP (ISP1, ISP3, ISP4) alors qu'une faible croissance de cet isolat a été notée sur le reste des ISP. Aucune pigmentation n'a été notée sur les différents milieux étudiés.

L'isolat S1CMC a produit des mycéliums aériens et de substrats sur les différents milieux de culture utilisés. Les mycéliums aériens produits sont de couleur noire sauf sur le milieu ISP4 où la couleur est grise verdâtre. Par ailleurs, le mycélium du substrat est de couleur noire sur tous les milieux ISP ensemencés.

De même que pour la souche S1CMC, l'aspect phénotypique et les caractères morphologiques des seize souches d'actinobactéries de la collection de Mme SOUAGUI ont été déterminés sur les milieux ISP (international *Streptomyces* Project). Les caractéristiques révélées des souches sont rapportées dans les Tableaux IV-VII. Ces caractéristiques fournissent une indication sur le genre d'actinobactéries (Ludwig et al., 2012).

Tableau IV : Croissance des 16 souches sur les milieux ISP

Les souches	Croissance					
	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	ISP7
OCD S1	++	+++	++	++	++	+++
OCD S2	++	++	+++	+++	+	+++
OCD S3	++	+++	+++	+	++	+++
OCD S4	+	-	+++	+++	++	+++
OCD S5	++	++	+	+++	+++	+++
OCD S9	++	+++	+++	+++	+++	+++
OCD S10	++	+++	+++	+++	+++	+++
OZN S1	+	-	++	++	+	+++
OZN S2	+	+	+	+	+	+
OZN S3	-	-	+	++	+	+++
OZN S4	++	+	+	+	-	+
OZN S5	++	++	-	++	+	+++
BZN S5	++	+	+	++	+	-
BCR S2	++	++	-	++	++	++
BCR S4	+	+	+	+	+	+
S10	+++	++	+++	+++	+++	+++

+++ :bonne , ++ :moyenne , + : faible , - : absence.

D'après nos résultats, un très bon développement des isolats OCDS1, OCDS2, OCDS3 OCDS9, OCDS10, S10, OZNS5 et BCRS2 a été noté sur tous les milieux testés. Cependant les souches restantes ont présenté une croissance modérée sur les six milieux ISP.

La couleur des mycéliums aérien (MA) et du substrat (MS) des souches étaient de couleurs variables selon l'actinobactérie et dépendant du milieu de culture (Tableau IV). L'isolat S10 à titre d'exemple (présentant une croissance significative sur tous les milieux), a présenté un MA de couleur blanche sur les milieux ISP1, ISP2 et ISP6, beige-jaunâtre sur les milieux ISP3, ISP4 et blanc grisâtre sur les milieux ISP5 et ISP7. L'isolat S10 a produit une masse de spores blanches sur les milieux ISP1, ISP2, ISP3 et ISP7, tandis que des spores jaunâtres et grisâtres ont été produites sur les milieux ISP4 et ISP5, respectivement.

Tableau V : Couleur du Mycélium aérien des 16 souches sur les milieux ISP

Mycélium aérien						
Les souches	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	ISP7
OCD S1	Blanc	Blanc à contour gris	Vert	Blanc	Blanc verdâtre	Blanc jaunâtre
OCD S2	Blanc	Blanc	Gris	Marron claire	Marron verdâtre	Beige à contour verdâtre
OCD S3	Beige	Gris	Vert gris	/	Marron	Marron
OCD S4	/	–	Marron à contour gris	Marron	Beige à contour marron	Marron rosé
OCD S5	–	Marron	/	Beige	Marron claire	Marron
OCD S9	beige	Marron	Vert	Blanc marron	Marron	Beige
OCD S10	marron	Marron	Gris vert	Blanche à contour marron	Marron	Beige
OZN S1	/	–	Gris noir	Marron claire	Marron	Gris
OZN S2	Beige	Blanc cassé	–	blanche	–	–
OZN S3	–	–	–	Beige	/	Blanc cassé
OZN S4	Blanc	–	/	Gris	–	/
OZN S5	blanc	beige	–	Beige a contour marron	/	Marron gris
BZN S5	Blanc	–	–	Blanc	Beige	–
BCR S2	Blanc	Blanc	–	Blanc	Beige	Blanc
BCR S4	–	–	–	–	–	–
S10	Blanc	Blanc	beige-jaunâtre	beige-jaunâtre	blanc grisâtre	blanc grisâtre

/ : contamination

D’après les résultats présentés dans le tableau V, nous remarquons une croissance significative du mycélium aérien des seize souches d’actinobactéries après 14 jours d’incubation à 30°C sur les milieux ISP. La sporulation et la croissance des bactéries sont deux paramètres fortement liés et dépendant directement à la composition du milieu de culture. En effet, certaines de nos souches (OCDS1, OCDS2, OCDS3, OCDS4, OCDS5, OCDS9, OCDS10, OZnS3, OZnS5 et S10) sont capables de former des mycéliums aériens de couleurs variées (gris, blanc, beige, marron) selon le milieu de culture utilisé, alors que les autres isolats montrent moins de diversité (faible croissance). La figure 05 illustre la macromorphologie de certains isolats (OZnS3, OCDS2 et OCDS5) poussant sur le milieu ISP

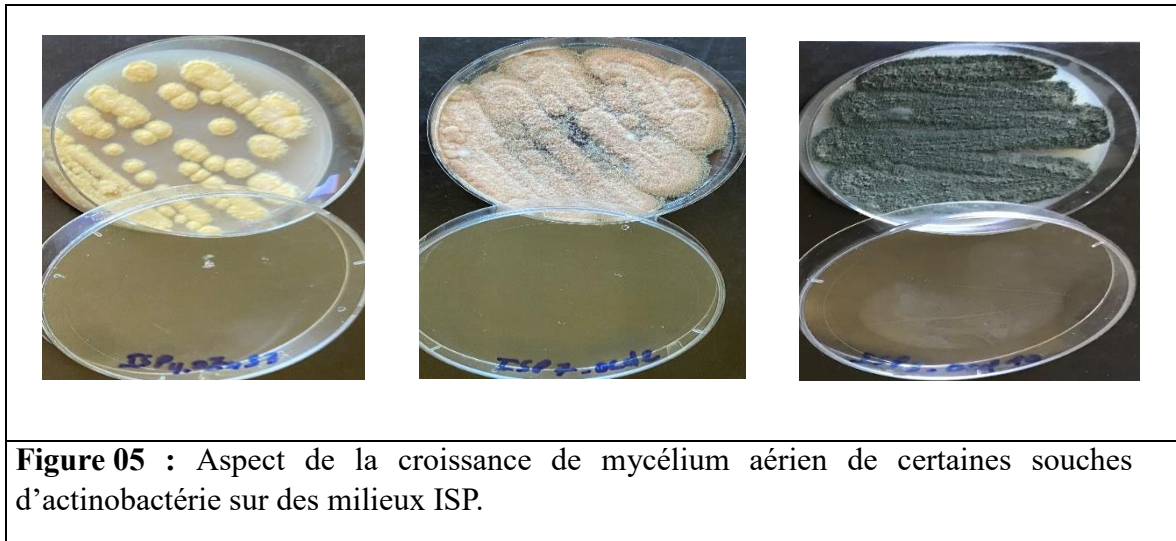


Figure 05 : Aspect de la croissance de mycélium aérien de certaines souches d'actinobactérie sur des milieux ISP.

De même que les MA de nos souches, leurs mycéliums de substrat (MS) étaient de diverse couleur. Le tableau VI résume les résultats de la couleur des différentes souches étudiées.

Tableau VI : Couleur du Mycélium de substrat des 16 souches sur les milieux ISP

Souches	ISP 1	ISP 2	ISP3	ISP 4	ISP 5	ISP 7
<i>OCD S1</i>	blanc	Marron	Gris	Blanc jaunâtre	Beige	Marron
<i>OCD S2</i>	Blanc	Blanc	Gris	Beige	Blanc	Marron
<i>OCD S3</i>	Marron claire	Beige	Marron	Blanc	Jaune	Marron
<i>OCD S4</i>	Blanc	–	Marron	Marron	marron	Marron
<i>OCD S5</i>	–	Marron	Blanc	Marron foncé	Jaune	marron
<i>OCD S9</i>	Beige	Marron	Marron claire	Marron foncé	Marron claire	Marron
<i>OCD S10</i>	Beige	Marron	Beige	Marron	Marron claire	Marron
<i>OZN S1</i>	###	Blanc	Marron gris	Beige	Marron	Beige
<i>OZN S2</i>	Blanc	beige	Blanc	Beige	Blanc	Blanc
<i>OZN S3</i>	Blanc	Blanc	Blanc	Jaune	Blanc	Marron
<i>OZN S4</i>	Blanc	Blanc	Blanc	Noire	Blanc	Blanc
<i>OZN S5</i>	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc cassé	###	–
<i>BZN S5</i>	Blanc	Blanc	Blanc	Beige gris	Beige	–
<i>BCR S2</i>	Blanc	Beige jaunâtre	–	Blanc	Blanc grisâtre	Jaune
<i>BCR S4</i>	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc grisâtre	Blanc grisâtre	Blanc grisâtre
<i>S10</i>	Marron	Marron	Marron	Marron claire	Jaune	Marron

Après 14 jours, d'incubation nous remarquons que les souches ensemencées sur les milieux ISP ont formé des mycéliums de substrat de différentes couleurs telles que montrent les souches sur l'ISP 1 les souches OCDS1, OCDS2, OZNS5, BCrS2 sont de couleurs blanches, sur ISP2 la couleur des souches OCDS2, OZNS3, BCRS2 vire vers marron beige, sinon pour les autres ISP (ISP3, ISP4, ISP5, ISP7) les souches présentent un mycélium marron allant vers le gris. Les résultats montrent que la couleur du mycélium du substrat des souches change en fonction des milieux ISP sur lequel elle a été ensemencée. La couleur du mycélium du substrat de certaines de nos souches cultivées sur les ISP est illustrée dans la figure 06

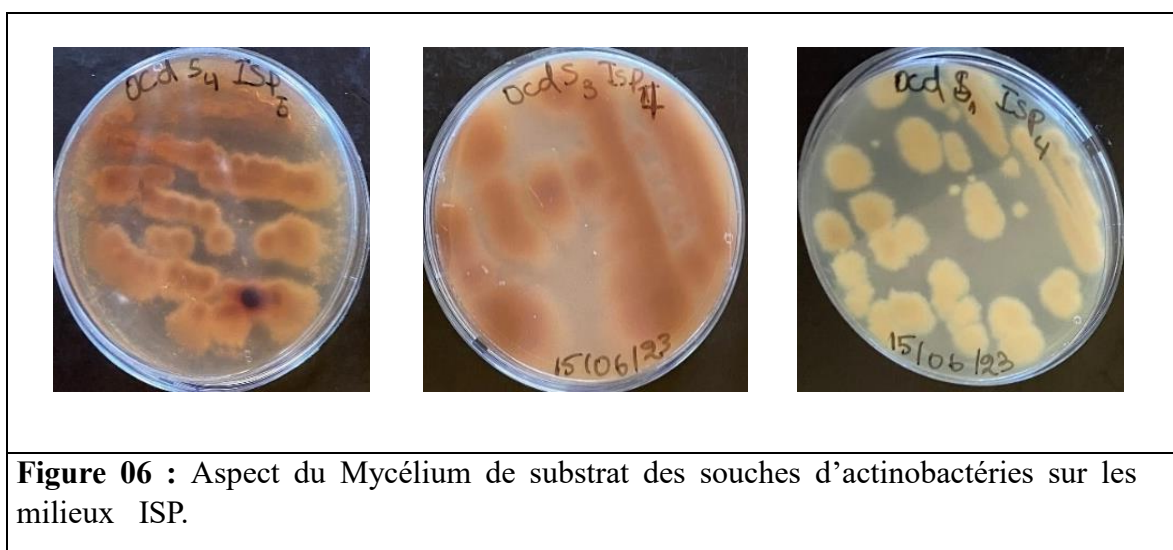


Figure 06 : Aspect du Mycélium de substrat des souches d'actinobactéries sur les milieux ISP.

Les pigments mélanoides sont des produits de la transformation de la tyrosine en DOPA-mélanine, responsable de la couleur. Ils possèdent des propriétés radio-protectrices, antioxydantes et peuvent protéger le microorganisme contre les ultraviolets (Vianarov et al., 2002). Nos résultats illustrés dans le tableau VII révèlent la production de pigments marron par les souches S10 et OCDS2, OCDS3, OCDS4, OCDS5, OCDS9 et OCDS10 sur le milieu ISP7. Cependant, aucune production de pigments diffusibles n'a été observée sur les autres milieux

Tableau VII : Les pigments des souches sur les milieux ISP

M : Marron, MC : Marron clair, MJ : Marron jaunâtre

Isolat	OC D S1	OC D S2	OCD S3	OCD S4	OCD S5	OC D S9	OCD S10	OZn S1	OZ nS2	OZ nS3	OZ nS4	OZ nS5	BZn S5	BCr S2	BCr S4	S10
Pigment	-	M	MC	M	M	M	M	-	-	-	/	-	-	-	-	0

2. Caractères micro-morphologiques

L'observation *in situ* des boîtes de Pétries sous microscope optique en utilisant (Gx10) sur le milieu ISP4, après 21 jours d'incubation à 30°C (**figure07**) révèle que la souche S1CMC présente un mycélium de substrat incrusté dans la gélose et un mycélium aérien à filaments courts, fins, ramifiés, surenroulés avec des sporanges sous forme de boucles aux extrémités des MA rappelant ainsi les caractéristiques micromorphologiques des genres *Streptosporangium*, *Spirillospora* et *Micromonospora* (**Annexe 4**). Ce type de filament a également été noté chez certains isolats (OCD, BCRS4 et BCRS2). Cependant, l'isolat S10 ayant formé un mycélium de substrat ramifié qui s'est fragmenté en éléments coccoïdes. Les hyphes aériens étaient en forme de zigzag au début de la sporulation et se sont fragmentés à maturité en chaînes de spores ramifiées et droites à flexueuses avec des spores en forme de bâtonnets, ces propriétés sont compatibles avec l'attribution des isolats au genre *Nocardioopsis* (**Meyer, 1976**).

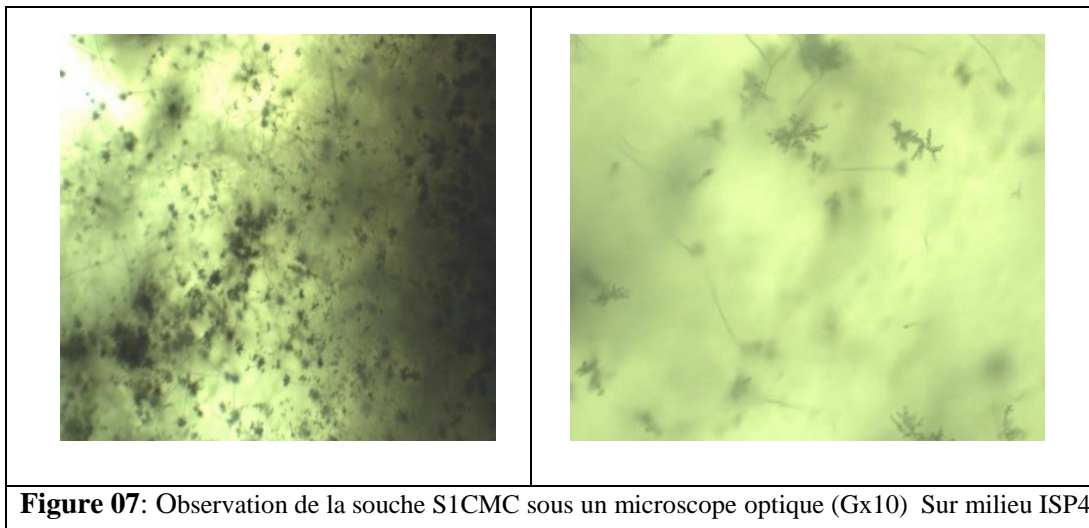


Figure 07: Observation de la souche S1CMC sous un microscope optique (Gx10) Sur milieu ISP4

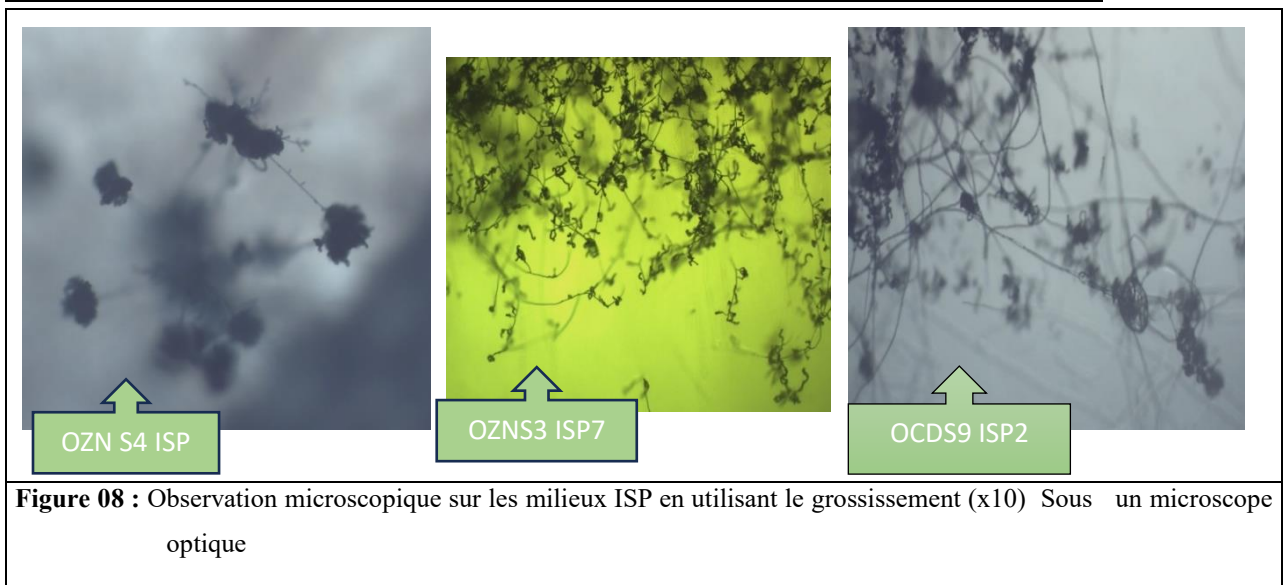


Figure 08 : Observation microscopique sur les milieux ISP en utilisant le grossissement (x10) Sous un microscope optique

Le rattachement de nos isolats à un genre d'actinobactéries n'est possible que par des tests complémentaires à ceux réalisés. Il s'agit de l'étude chimiotaxonomique et physiologique. Cette dernière couplée à l'identification de l'ADNr 16S pourrait identifier l'espèce de chacune de nos souches.

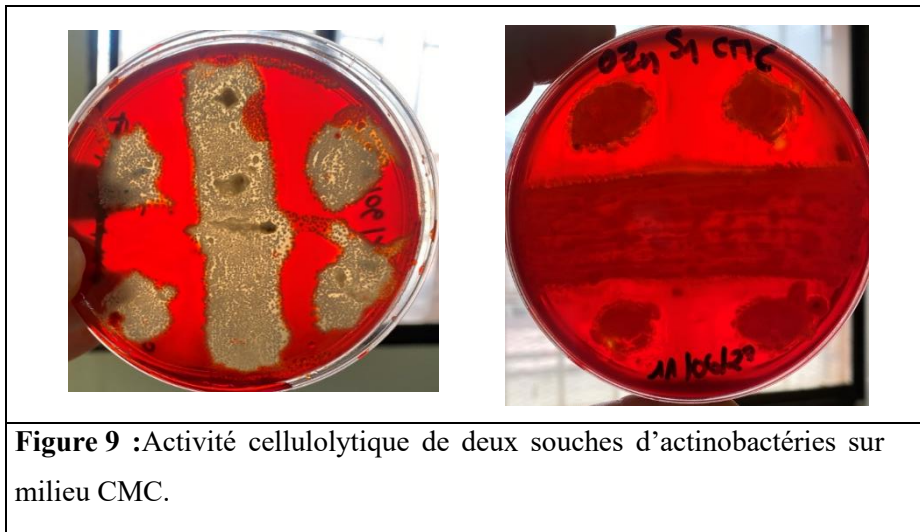
3. Etude de l'activité enzymatique des souches d'actinobactéries

Les actinobactéries sont connues pour leur capacité à produire diverses enzymes d'importance industrielle, telles que les amylases, les protéases, les lipases, les cellulases, ... Ces enzymes jouent un rôle très important dans de nombreux processus industriels, tels que la production alimentaire, la transformation des déchets, la fabrication de produits pharmaceutiques et cosmétiques, et bien d'autres encore (Passari et al., 2016 ; Salwan, 2018). Dans cette étude, neuf activités enzymatiques ont été recherchées sur milieux solides pour seize souches d'actinobactéries. En outre, les activités amylolytiques et cellulolytiques ont été dosées sur milieu liquide pour la meilleure souche productrice de ces deux enzymes.

3.1. Recherche de l'activité cellulolytique

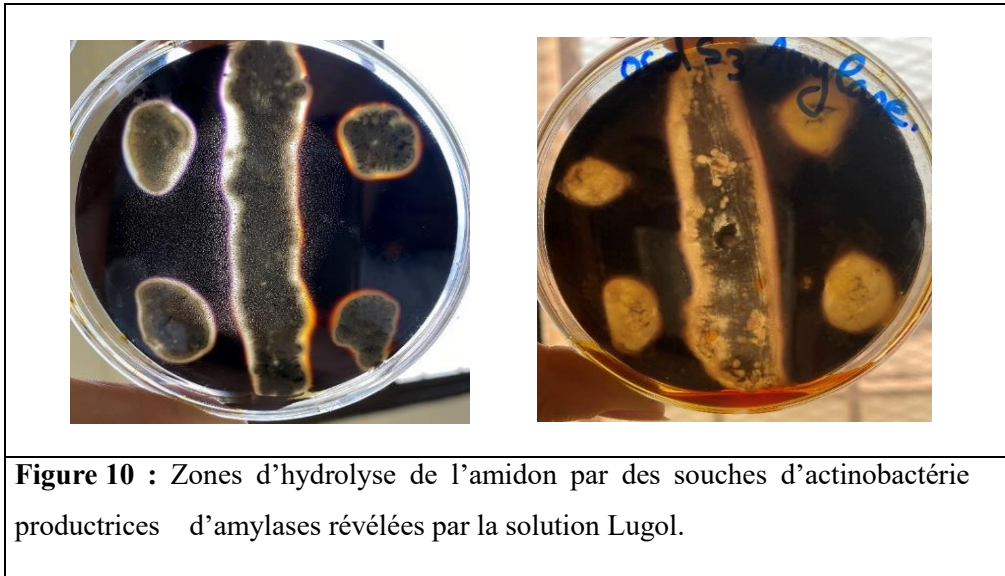
La bioconversion de la cellulose offre une alternative intéressante pour fournir des carburants de substitution de deuxième génération, des protéines microbiennes ou des métabolites à haute valeur ajoutée tels que les enzymes et les antibiotiques. Cependant, la rentabilité économique de toutes ces transformations biologiques est étroitement liée à la production de cellulases ainsi que les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose (Roussos, 1987).

Dans le cadre de la recherche des cellulases des actinobactéries, les 16 souches ont étéensemencées sur le milieu CMC agar puis incubées pendant 7 jours à 30°C. Après inondations des cultures par la solution de rouge de Congo à 0,9%, des zones claires (Figure 9) sont apparues autour des colonies de toutes les souches étudiées, indiquant ainsi l'aptitude des 16 isolats d'actinobactéries à dégrader la cellulose. Différentes cellulases ont été mises en évidence dans différents genres appartenant aux actinomycètes, il s'agit principalement de *Streptomyces* (Jang and Chenks, 2003 ; Loliam et al., 2013), *Micromonospora* (De Menezes et al., 2008, 2012), *Cellulomonas* (Saratale et al.,2010) et (Stutzenberger , 1988)



3.2. Recherche de l’activité amylolytique

L’amylase est une macromolécule, de type endoglucanase de la classe des hydrolases, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon (**Wang et al., 1989 ; Scriban, 1999 ; Nouadri , 2011**). Elle est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes. A l’échelle industrielle, les amylases sont produites à partir de cultures microbiennes (milieu liquide et solide) ou par maltage des céréales (**Khady.2013**). Dans le but de mettre en évidence leur activité amylolytique, les cultures de nos souches sur milieu à base d’amidon ont été inondées par la solution lugol. Le traitement de la surface du milieu solide, par une solution de Lugol, donne avec l’amidon un composé bleu violacé, tandis que la zone claire non colorée indique qu’à cet endroit l’amidon a été hydrolysé (**Sudo.et al., 1994 ; Solis . et al., 1993**). D’après le résultat obtenu et illustré dans la figure 10, cette activité a été observée chez tous nos isolats. Plusieurs études ont rapporté la production importante de différentes amylases par des actinomycètes (**Lam, 2006 ; Ramesh et Mathivanan, 2009**). Les données bibliographiques ont mentionné que « l’ α -amylase » est le type d’enzyme amylolytique le plus produit par les actinomycètes. Il est élaboré par différents genres tels que *Streptomyces* ; *Nocardiopsis* et *Streptosporangium* (**Vigal et al., 1991 ; Stamford et al., 2001 ; Hakraborty et al., 2009**).



3.3. Recherche de l'activité lipasique

D'après **Jaeger et al. (2002)** ; les lipases sont définies comme étant des carboxyl-estérases catalysant l'hydrolyse et la synthèse d'esters formés de glycérine et des acides gras de longues chaînes (**Reis. et al., 2008**). Ces enzymes ressemblent aux estérases, mais elles se différencient par leur capacité d'agir sur les esters insolubles dans l'eau. Les lipases microbiennes présentent comme avantages, d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux (**Jaeger et Eggert (2002)**). De nombreux travaux de recherche ont rapporté la capacité des actinobactéries à hydrolyser les huiles et les graisses (**Patel et al., 2021 ; Benhoula et al., 2023**).

Après incubation à 30°C pendant 7 jours, un halo opaque autour des colonies de nos souches est apparu (Figure 12) confirmant ainsi l'activité lipasique de ces dernières. Une plus grande attention a été portée aux lipases d'origine actinobactérienne (**Govindharaj et al., 2016**). En effet, **Chakrabartty et al. (2009)** ont rapporté la production de lipase par plusieurs souches de *Streptomyces*.

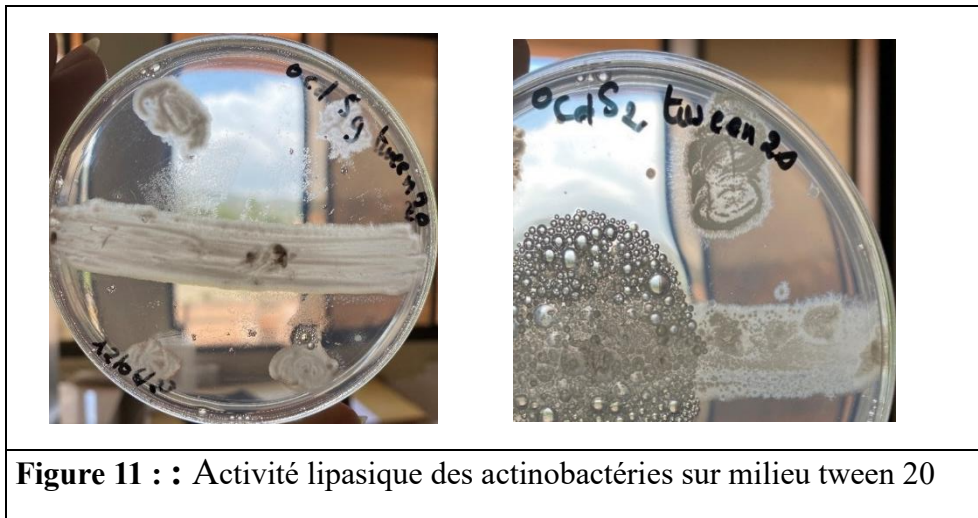


Figure 11 : : Activité lipasique des actinobactéries sur milieu tween 20

3.4. Recherche de l'activité des estérases

L'estérase est une enzyme qui décompose les esters en alcool et acide au cours d'une réaction chimique accompagnée de la production d'eau. Un grand nombre d'estérases différentes dans leur structure peuvent exister. Cette différence structurale peut être accompagnée d'une différence de leur spécificité, leurs fonctions biochimiques et biologiques (Krisch, 1971 ; Wong, 2006)

Après incubation à 37°C pendant 7 jours les 16 souches ensemencées sur gélose au tween 80, présentent un halo opaque autour des colonies révélant une activité estérasique positive (Figure 12).

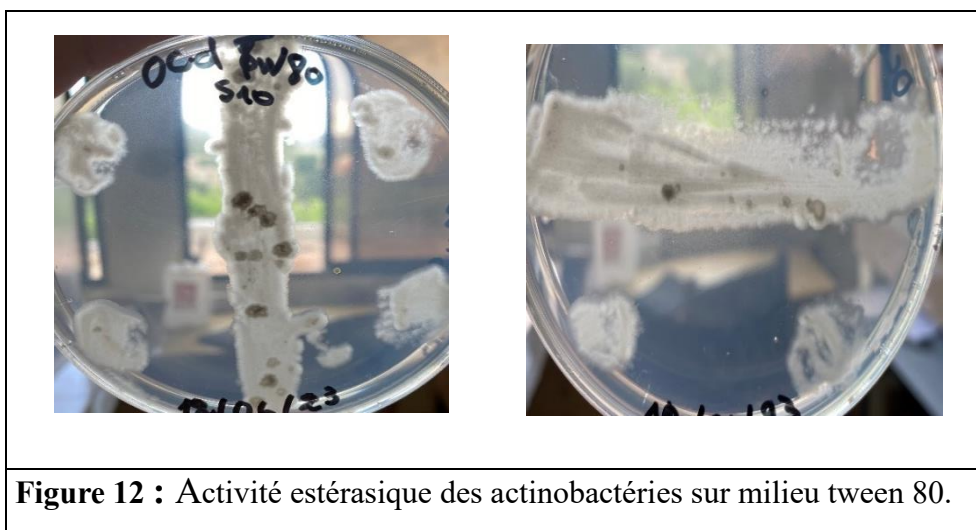


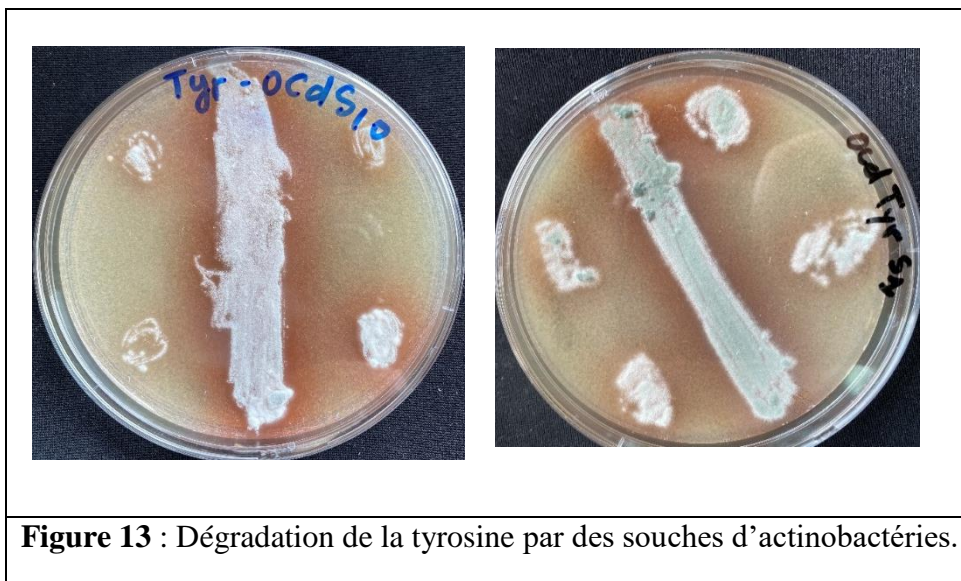
Figure 12 : Activité estérasique des actinobactéries sur milieu tween 80.

3.5. Recherche de l'activité L-tyrosinase

La tyrosine fait partie des vingt acides aminés formant les protéines du vivant. Il est dit non-essentiel car il peut être synthétisé par l'organisme à partir de l'hydroxylation d'un autre acide aminé : la phénylalanine. Cette molécule existe sur plusieurs formes mais, la forme la plus étudiée est sa forme naturelle, la L-tyrosine (ou para-tyrosine). Le terme « tyrosinase » (EC 1.14.18.1) fait référence à son substrat naturel, la L-tyrosine, présente dans plusieurs organismes vivants, notamment chez divers procaryotes ainsi que chez les plantes, les champignons, les arthropodes et les mammifères (Chang, 2009).

La tyrosinase bactérienne est impliquée dans la production de mélanine. L'enzyme a été signalée chez d'autres espèces telles que *Rhizobium*, *Symbiobacterium thermophilum*, *Pseudomonas maltophilia*, *Sinorhizobium meliloti*, *Marinomonas mediterranea*, *Thermomicrobium roseum*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida* (Liu. et al 2005, McMahon .et al 2007). Les tyrosinases des *Streptomyces* sont les enzymes d'origine bactérienne les mieux caractérisées (Della-Cioppa .et al ,1998).

La production de la tyrosinase s'est traduite par l'apparition d'une zone marron autour des colonies de nos isolats, principalement due à la production de la mélanine (Figure 14). Ce résultat corrobore avec ceux rapportés dans la littérature scientifique pour la production de cette enzyme par diverses espèces de *Streptomyces* (Popa et Bahrim, 2011 ; Roy et al., 2014 ; Harir et al., 2017)

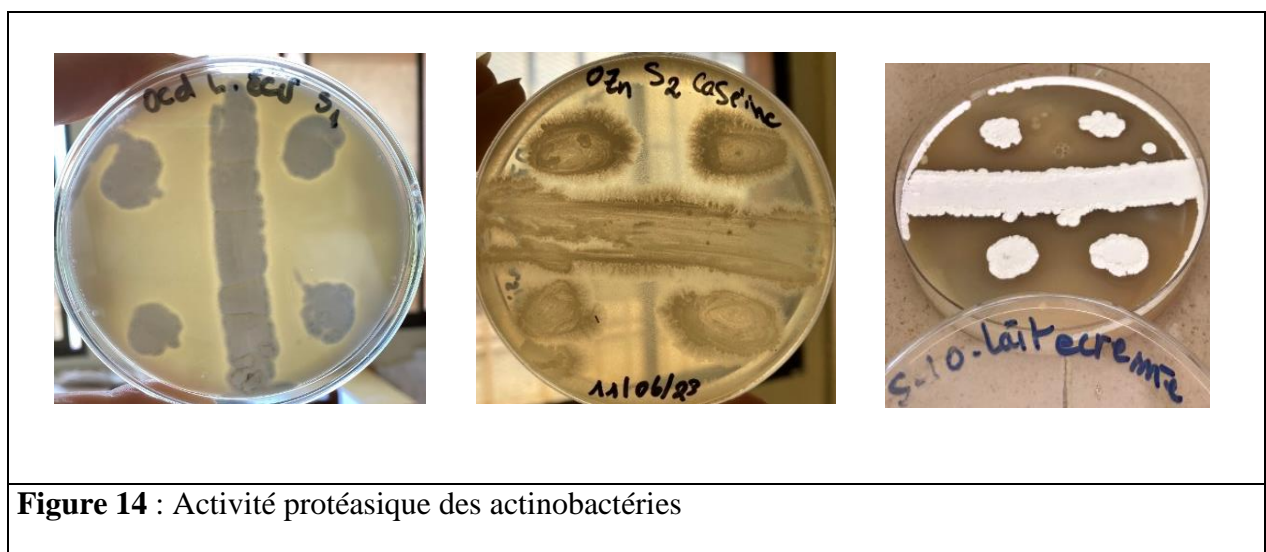


3.6. Recherche de l'activité protéasique

Les protéases ou enzymes protéolytiques peuvent être rencontrées chez tous les organismes vivants, elles occupent une place privilégiée sur le plan physiologique et commercial (Mala et Rao *et al.*, 1998 ; Dvořák *et al.*, 2008). Ces enzymes sont indispensables à la vie des organismes et essentielles à la croissance et à la différenciation cellulaire. En effet, elles interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques complexes, à savoir : la régulation de nombreux processus métaboliques (Gupta *et al.*, 2002 ; Bayot *et al.*, 2008), le processus de transport et de sécrétion des protéines à travers les membranes et la formation des spores et leur germination chez les bactéries (Rao *et al.*, 1998).

Les protéases sont largement distribuées dans la population microbienne, à savoir les bactéries dont les actinomycètes, virus et les champignons. Les microorganismes représentent environ les deux tiers de la production de protéases dans le monde. La plupart des protéases commercialisées sont d'origine microbienne (Gupta *et al.*, 2002; Parakasham *et al.* 2006)

Les résultats obtenus montrent qu'après incubation pendant 3 jours à 30°C, les souches d'actinobactéries étudiées se développent facilement sur une gélose additionnée de lait écrémé et présentent un halo translucide autour des colonies. En effet, le diamètre du halo est proportionnel à la quantité de protéases secrétées (Benhouli *et al.*, 2015) Tel que montre la figure 14 Une large proportion des protéases commerciales disponibles, essentiellement les protéases neutres et alcalines sont d'origine bactérienne et particulièrement des souches du genre *Bacillus* (Tian, Xu *et al.* 2019) et des Actinobactéries (L. Wang *et al.*, 2019)



L'estimation des protéases synthétisées par nos isolats sur milieu solide a été réalisée par la mesure du halo claire entourant la colonie et les moyennes obtenues de cette mesure sont représentées en histogramme dans la figure 15

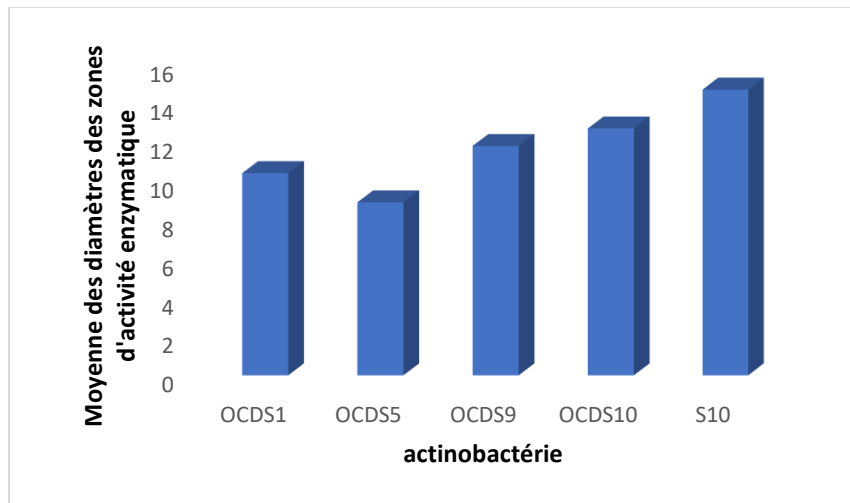


Figure 15 : Histogramme de la moyenne des halos d'activité protéasique produits par les souches d'actinobactéries étudiées.

Selon la moyenne des diamètres des halos mesurés, nous constatons une variation des valeurs allant de 9 mm pour l'isolat OCDS5 à 16 mm pour la souche S10 indiquant ainsi une différence entre la capacité de nos isolats dans la production de protéases.

3.7. Recherche de l'activité chitinolytique

La chitine est une fibre naturelle de nature cristalline de la famille des polysaccharides azotés. La formule chimique de la chitine est très proche de celle de la cellulose, la seule différence entre les deux structures est la présence de l'acétamide sur le C2 dans la chitine remplacée par l'hydroxyle dans la cellulose (**Boudouaia Nacer ., 2019**)

Les chitinases sont un groupe d'enzymes hydrolytiques qui assurent la rupture des liaisons β -1,4 glycosidiques qui lient les carbones C1 et C4 de deux résidus N-acétyl-glucosamine consécutifs (**Nopakarn et al., 2007 et Setthakaset et al., 2008**). La mise en évidence de l'activité chitinolytique, consiste à ensemencer les souches d'actinobactéries sur un milieu gélosé additionné de chitine, après 3 jours d'incubation à 30°C, la production des chitinases se traduit par l'apparition des zones claires autour des colonies. Les souches qui montrent les plus grands diamètres d'hydrolyses sont les souches les plus productrices de la chitinase. Pratiquement toutes nos souches ont montré l'aptitude de produire l'enzyme chitinolytique, l'activité positive a été observée par l'apparition des halos claires autour des

colonies, à l'exception des deux souches OZNS5, BCRS4 qui ont montré aucune aptitude à produire cette enzyme. (Gupta et al., 1995) a rapporté que l'espèce *Streptomyces venezuelae* produit les chitinases.

3.8. Recherche de l'activité pectinolytique

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases (E.C 3.2.1.15 et E.C 3.2.1.67) sont un groupe hétérogène d'hydrolases des substances pectiques et leur production est élaborée par différents genres d'actinomycètes tels que : *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et les *Streptomyces* (Lamrini, 2012 ; Massaoudi, 2015).

L'activité pectinolytique est mise en évidence sur un milieu MP7 contenant la pectine comme seule source de carbone. Après incubation à 30°C pendant 3 jours, l'apparition d'un halo clair autour des colonies de nos 16 isolats confirme la dégradation de la pectine.

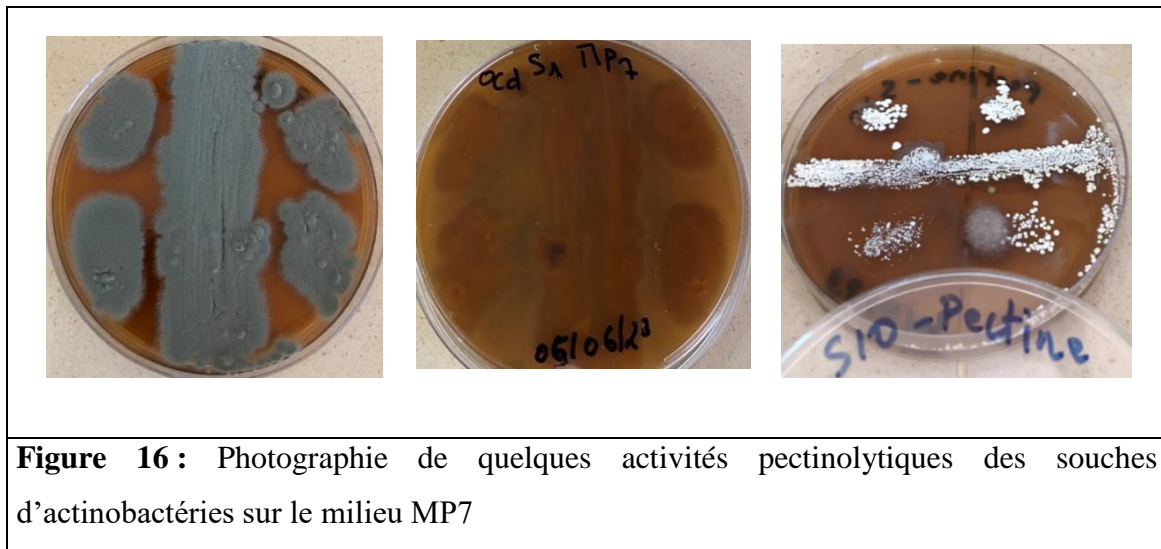


Figure 16 : Photographie de quelques activités pectinolytiques des souches d'actinobactéries sur le milieu MP7

3.9. Recherche de l'activité L-asparaginase

Afin de mettre en évidence l'activité L-Asparaginase, les souches ont été ensemencées sur une gélose contenant la L-asparagine. Une activité L-Asparaginase positive est traduite par un virage de couleur de la gélose au rose sont repérées autour des colonies bactériennes (Shukla et Mandal, 2013) indiquant l'alcalinisation du milieu, en présence d'ammoniaque produit par hydrolyse de la L-asparagine par une L-asparaginase.

Après 7 jours d'incubation à 30°C, à l'exception de la culture de la souche OCDS10, aucun virage du milieu de culture n'a été remarqué autour des colonies des 15 autres souches étudiées, confirmant ainsi la non-production de la L-asparaginase par ces isolats. La synthèse de cette enzyme par l'isolat OCDS10 en plus de toutes les autres enzymes recherchées, démontre l'intérêt de cette souche pour la production d'enzymes. La production de cette enzyme par plusieurs germes a été rapportée : *Pseudomonas fluoresces*, *Mycobacterium phlai*

(Ramakrishnan et al.,1996), *Rhodosprium toruloides*, *Rhodotorula sp* (Sarquis et al., 2004)

L'ensemble des résultats des activités enzymatiques recherchées pour les seize actinobactéries étudiées est résumé dans le tableau IX ci-dessous.

Tableau VIII : Croissance des souches d'actinobactéries sur différents milieux enzymatiques

Isolat	Oc dS1	Oc dS2	Ocd S3	Ocd S4	Ocd S5	Ocd S9	Ocd S10	Ozn S1	Oz nS2	Oz nS3	Oz nS4	Ozn S5	Bzn S5	Bcr S2	Bcr S4	S10
Tyr	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	++	-	+	-	++	-	+++
Amy	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	++	+++
CMC	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	/	/	++	/	+++
Case	++	+	+	-	++	++	++	++	+++	+++	-	-	-	+	+	++
Chiti	++	+	++	+	++	++	++	+	+	++	+	-	+	+	-	+++
MP7	+	+++	+++	++	++	+++	+++	+	+	+++	+	++	+	++	-	+++
Twe 20	+++	++	++	+	++	++	+++	+++	+++	+++	/	+++	+++	+++	+++	+++
Twe 80	+++	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Lait écré	+++	+	-	-	++	+++	+++	+	-	++	-	/	/	-	+	/
ASP	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D'après le tableau VIII nous remarquons, d'une part, que les souches présentent de fortes activités enzymatiques sur les milieux à base d'amidon, CMC, tween 20, tween 80 ce qui indique une bonne production des : amylases, cellulases, lipases et estérases respectivement. Cependant, une moyenne à faible croissance des souches étudiées a été notée sur le reste des milieux testés. D'autre part, les souches OCDS1, OCDS9, OCDS10, OZNS3 et la S10 présentent une forte croissance sur tous les milieux témoignant ainsi de la production d'enzymes dégradants ces différents substrats par ces isolats

4. Dosage des activités enzymatiques

Deux activités enzymatiques de l'isolat S10 sélectionnée pour son bon développement sur tous les milieux utilisés dans cette étude ainsi que sa large production sur milieu solide, des enzymes recherchées. Les activités amylolytiques et cellulolytiques ont été déterminées par la méthode colorimétrique en utilisant le réactif DNS en utilisant l'amidon et la CMC comme substrats respectivement. Cette méthode est basée sur le pouvoir réducteur des groupes aldéhydes et cétones libres des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orange absorbant à une longueur d'onde de 540 nm. L'intensité de la coloration varie selon la quantité du produit libéré (sucres réducteurs) présents dans le milieu réactionnel (Khacheba., 2014 ; Alexis et Joachim., 2016).

L'activité enzymatique a été estimée selon la courbe d'étalonnage de sucres invertis déterminée dans les mêmes conditions opératoires que le test (**Annexe 2**) et calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité du sucres inverti (U/ml)} = \frac{(C_x - C_t) \cdot D}{t}$$

Où :

C x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (µmole/ml).

C t : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (µmole/ml).

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

Le nombre en Unité enzymatique obtenue pour les deux activités enzymatiques dosées été très faibles et non significatives. Nos résultats restent non concluants vue la non-adéquation des conditions opératoires dans lesquelles les cultures ont été réalisées. En effet, après 7 jours d'incubation à 30°C sous agitation à 120 rpm (limitation technique du matériel utilisé), l'isolat S10 a présenté une faible croissance sur les deux milieux liquides (amylase et CMCase). Ceci pourrait être dû à la faible agitation vue, cette dernière devait être de 240 rpm selon une étude préalable réalisée par Mme SOUAGUI S, la non-stabilité de la température du bain-Marie agitateur durant la durée d'incubation ou alors la mauvaise dissolution de l'amidon utilisé pour le dosage de l'activité amylolytique ou encore à la durée d'incubation de la souche, relativement faible.

III. Activité antimicrobienne des souches d'actinobactéries productrices

D'enzymes

1. Test des cylindres d'agar

Parmi les caractéristiques des actinobactéries, leur activité antimicrobienne. Dans le but de tester cette activité des souches étudiées et cultivées sur deux milieux différents (Mincer et SCA), 9 bactéries et 1 levure ont été ciblées par la méthode des cylindres d'agar. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) apparues autour des cylindres d'agar des actinobactéries cultivées sur le milieu SCA et Mincer testées à l'égard des bactéries cibles et de *C. albicans* sont résumés dans les figures 16 respectivement.

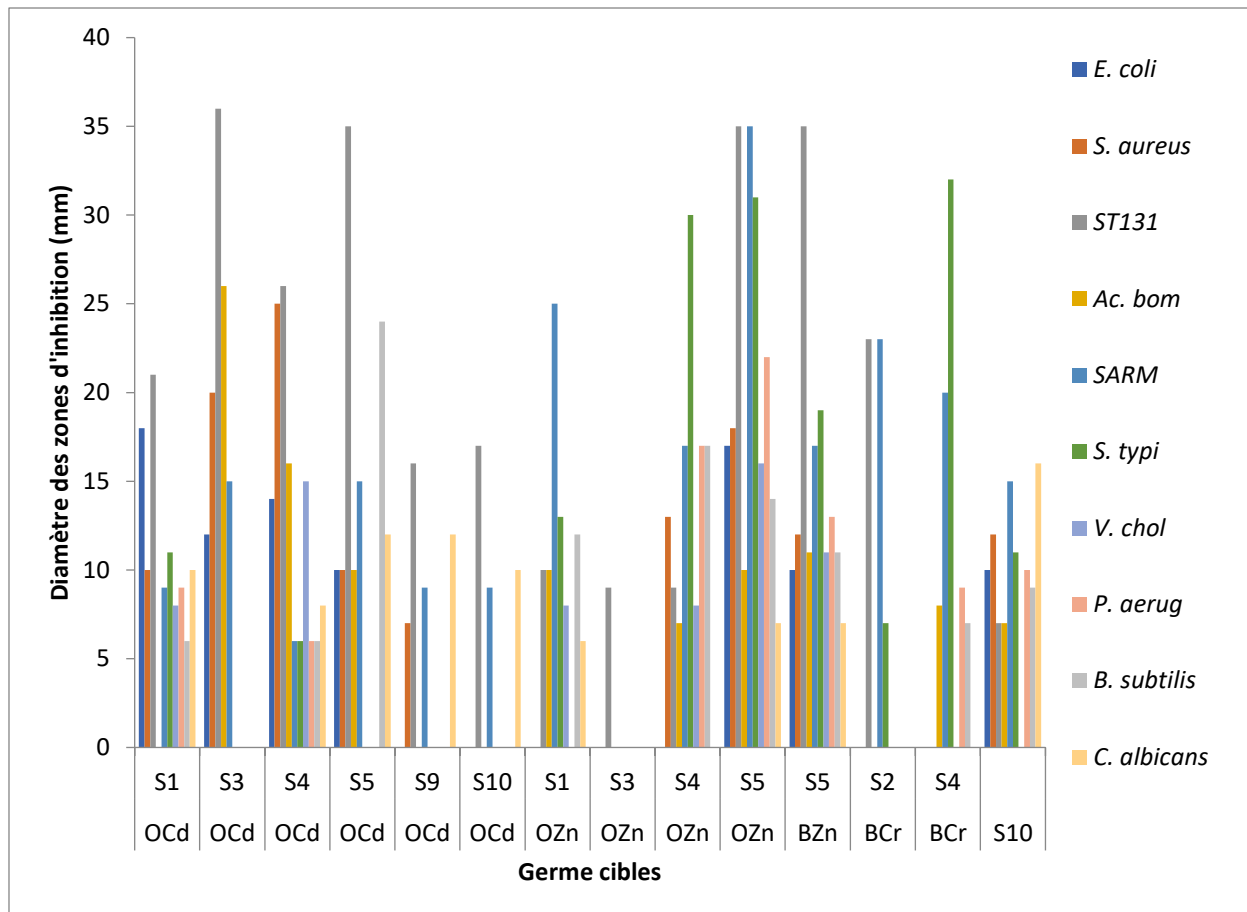


Figure 17 : Résultats du test des cylindres d'agar des souches actinobactériennes cultivées sur milieu SCA.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que sur le milieu SCA, les souches OCDS1, OCDS4, OZNS4, OZNS5, BZNS5 et S10 se sont révélées les plus actives sur l'ensemble des germes cibles testés enregistrant des diamètres des zones d'inhibition allant en moyenne de 9 mm, pour OCDS1, OCDS4 et OZNS4 à l'égard de SARM, *C. albicans* et *E. coli* ST131 respectivement à 35 mm, pour OZNS5 et BZNS5 contre *E. coli* ST131. Ces actinobactériennes ont montré une très forte activité contre toutes les cibles. Par ailleurs, une activité modérée a été notée pour les isolats OCDS3, OCDS5 et OZNS1 allant de 8 mm, pour OZNS1 à l'égard de *V. cholerae* à 36 mm, pour OCDS3 contre *E. coli* ST131 étant le diamètre le plus élevé noté pour ce test. Cependant, le reste des actinobactériennes ont montré de faibles activités (à l'encontre de 4 germes au maximum parmi 10 testés).

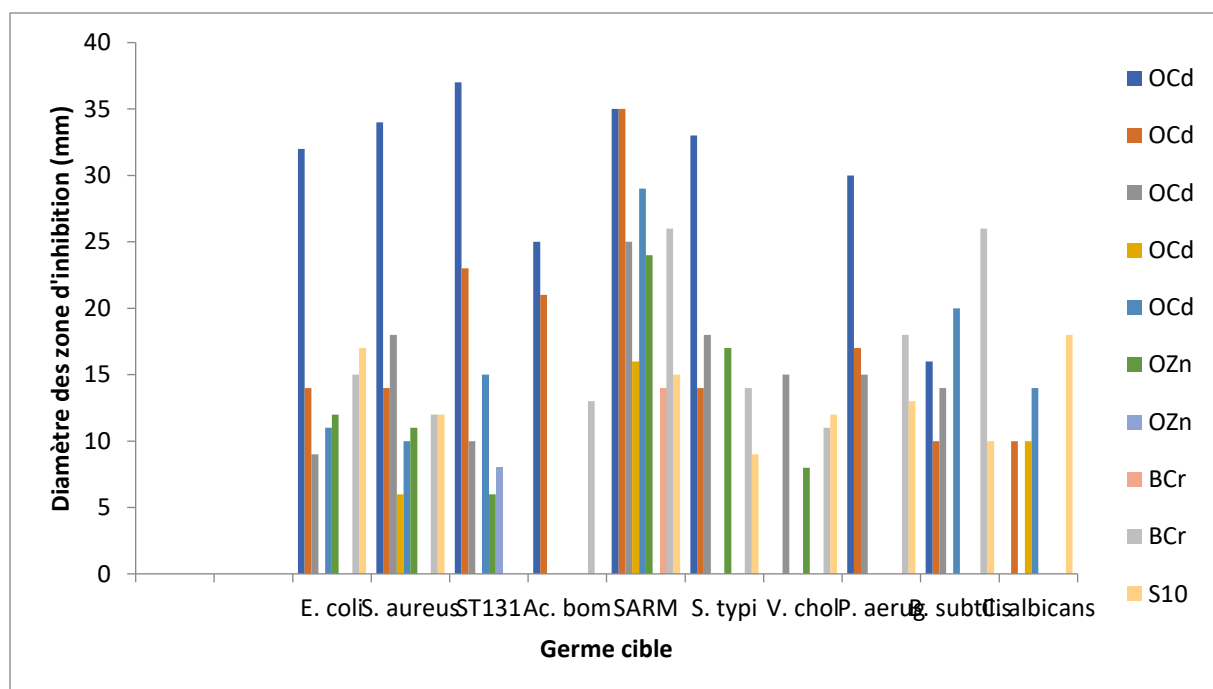


Figure 18 : Résultats du test des cylindres d'agar des souches actinobactériennes cultivées sur milieu Mincer.

Les résultats illustrés dans la figure 17 indiquent une importante activité antibactérienne des souches OCDS3, OCDS4, OCDS5, BCRS4 et S10, enregistrant ainsi des diamètres des zones d'inhibition entre 10 mm pour OCDS4 à l'égard de *B. subtilis* et 37 mm pour OCDS3 contre *E. coli* ST131. Le reste de nos actinobactéries se sont révélées modérément actives sur l'ensemble des cibles testées. Contrairement au milieu SCA sur lequel 9 isolats sur 14 testés ont produit des anti-*C. albicans*, seuls OCDS9, OCDS10 et S10 ont inhibé la croissance de la levure pathogène avec des diamètres de 10, 14 et 18 mm respectifs.

D'après l'ensemble des résultats, nous notons que le milieu SCA est celui favorisant la production des antibiotiques pour nos actinobactéries de manière générale. Cependant, le milieu Mincer s'est révélé être le meilleur pour la souche S10. Ce dernier a été sélectionné pour une extraction solide-liquide des antibiotiques produit par la souche S10.

Pour élargir l'étude du spectre d'activité de l'isolat S10, un test des cylindres d'agar sur 3 moisissures phytopathogènes, complémentaire aux précédents a été réalisé et les diamètres des zones d'inhibition de la croissance d'*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis. sp* sont notés dans le tableau IX

Tableau IX : Diamètres des zones d'inhibition des cylindres d'agar de S10 cultivée sur milieux Mincer et SCA et testés contre les moisissures.

Champignons		F. oxysporum	A. niger	Botrytis. sp
S10	SCA	13	10	11
	Mincer	10	10	14

Les deux milieux de culture favorisent la production d'antifongiques par la souche S10 avec une légère préférence pour le milieu Mincer vue la meilleure production d'anti-*C. albicans* signalée précédemment.

Les résultats de cette partie de l'étude, montrent l'importante activité antimicrobienne de tous nos isolats. En outre, l'activité de nos souches à l'égard des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques (*E. coli* ST131, *Acinetobacter. Baumannii*, et SARM) les sélectionnées pour leur application dans la production d'éventuelle nouvelles molécules bioactives dans le but de répondre à la problématique mondiale de la résistance aux antibiotiques, notamment concernant ces germes causant de sérieux problèmes dans les traitements des infections.

2. Activité antimicrobienne des antibiotiques extraits de l'isolat S10 (Test des puits).

L'extrait brut de l'isolat S10 obtenu après macération dans l'acétate d'éthyle de la culture de l'isolat S10 sur milieu Mincer solide à 30°C/ 7 jours, a été testé par la méthode des puits contre les mêmes germes utilisés dans le test des cylindres d'agar. Les figures 18 illustrent les résultats du test des puits de l'extrait brut de S10 à l'égard des germes cibles testés.

Figure 19 : Photographies des résultats du test des puits de l'extrait de la souche S10



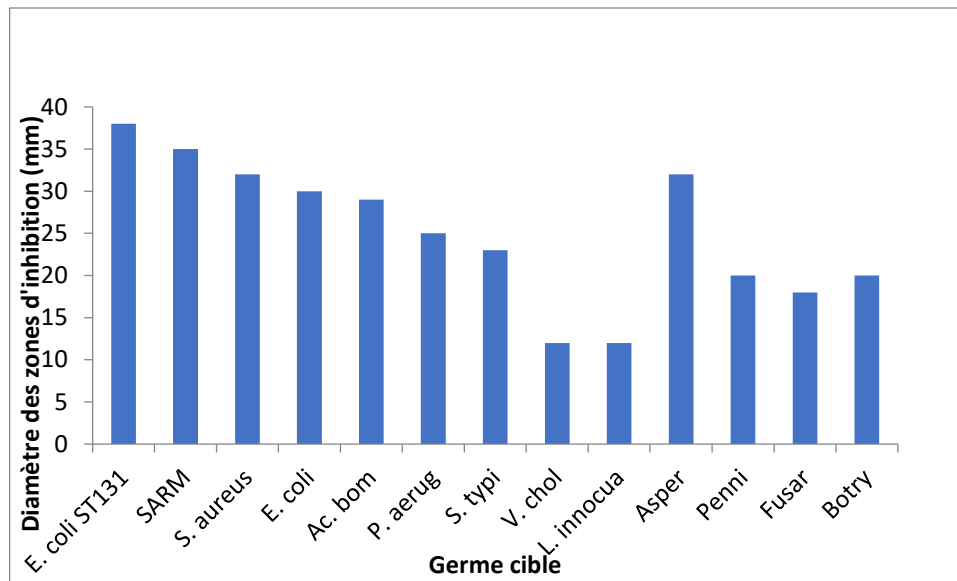


Figure 20 : Résultats du test des puits de l'extrait brut de l'isolat S10.

Nous notons une forte activité antimicrobienne de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de l'isolat S10 cultivé sur Mincer sur tous les germes cibles testés. Ces résultats sont d'une grande importance vue la forte sensibilité des souches très pathogènes pour l'Homme et l'animal (*E. coli* ST131, SARM, *Ac. baumannii*, *V. cholerae*) ou alors les moisissures phytopathogènes à l'extrait de notre souche. Dans le contexte actuel de la santé mondiale, l'émergence de maladies infectieuses dues à des agents pathogènes multirésistants et le nombre limité d'agents antifongiques disponibles nécessitent la découverte de nouveaux antimicrobiens. Dans le cadre de la découverte de médicaments naturels, les actinobactéries font l'objet d'une bioprospection croissante, car elles constituent l'une des sources les plus importantes de divers composés principaux (Manivasagan et al., 2014 ; Saket et al., 2021).

Le large spectre d'action des antibiotiques produits par S10 sur ce milieu pourrait être dû à la présence de divers antimicrobiens ou alors à une molécule à large spectre. La purification des molécules produites ainsi que leur identification confirmera l'une des hypothèses précédentes.

Conclusion

Dans le cadre de recherche de métabolites secondaires bioactifs des actinobactéries, le présent travail a visé l'isolement et la caractérisation d'actinobactéries productrices d'enzymes d'intérêt industriel à partir des effluents industriels de déchets de l'unité d'Elkseur du Complexe CEVITAL.

Dans cette étude, neuf milieux de culture solides préparés chacun à base d'un substrat d'enzyme donnée (amidon, cellulose, caséine, pectine, chitine, Tween 80, Tween 20, L-Tyrosine et L-Asparagine) ont été utilisés pour l'isolement de 28 actinobactéries productrice de diverses enzymes dont le nombre le plus important des isolats a été obtenu sur les milieux à base de lipides, cellulose et pectine. Ceci peut être dû à la composition des échantillons riches en ces substrats d'enzymes vue l'activité industrielle de cette usine (sauces, jus et confiture de fruits). Parmi ces isolats obtenus, une seule souche a été sélectionnée à partir de la dilution 10^{-5} et purifiée sur le milieu CMC qu'on a nommé S1CMC. Cette dernière comme seize autres actinobactéries faisant partie de la collection de Mme SOUAGUI S. ont fait objet d'une recherche des 9 enzymes précédemment citées, une caractérisation morphologique et une étude de leur activité antimicrobienne.

Les souches S10 et OCS10 ont montré une très bonne activité enzymatique pratiquement sur tous les milieux enzymatiques, tandis que les souches OZNS4 et BZNS5 sont moins actives. Se basant sur son activité enzymatique sur milieu solide, son intéressante activité antimicrobienne sur milieu solide aussi bien que sur milieu liquide, l'isolat S10 a fait objet d'un dosage de l'activité amylolytique et cellulolytique sur milieu liquide qui n'a malheureusement pas été significatif à cause des contraintes techniques rencontrées.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'isolat S10 par la technique des cylindres d'agar a révélé un potentiel antimicrobien remarquable de cette souche avec des zones d'inhibition importantes allant de 17 mm jusqu'à 36 mm à l'égard d'*E. coli* ST131, *S. typhi*. Cependant, *B. subtilis* et *V. cholerae* se sont révélés plus résistants.

L'extrait brut de la souche S10 a montré une très intéressante activité antibactérienne, notamment à l'encontre de germes très pathogènes (d'*E. coli* ST131, *S. typhi*, *V. cholerae*, *Ac. baumannii*, SARM ...etc.) et antifongique contre la levure pathogène *C. albicans* responsable de plusieurs infections tenaces et trois moisissures phytopathogènes.

Les résultats obtenus au terme de ce travail sont d'un grand intérêt et plusieurs études Complémentaires s'imposent. Il s'agit de :

- La réalisation de tous les tests effectués pour la souche S1CMC afin de compléter son profil ;
- Refaire les tests du dosage d'activités amylolytique et cellulolytique ainsi que le dosage du reste des activités enzymatiques après sélection de la meilleure activité pour chaque souche ;
- Compléter l'étude taxonomique des souches présentant un aspect morphologique différent des *Streptomyces* ;
- Purification et caractérisation de l'extrait brut de l'isolat S10 ainsi que de tester d'autres activités biologiques (anti-biofilm, anti-oxydantes, antiinflammatoire ,...etc).

Annexe 01

• La gélose à la cellulose

Cellulose.....	5 g
NaNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	0,015 g
Extrait de levure.....	0.5 g
Agar.....	15 g
pH.....	7

• La gélose nutritive additionnée de chitine

Chitine.....	5 g
Extrait de levure.....	0,5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ -7H ₂ O.....	1 g
FeSO ₄ -7H ₂ O.....	0,1 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	7

• Milieu amylolytique

Amidon.....	20g
Extrait de bœuf.....	5g
Peptone.....	3g
Agar.....	15g

• Gélose à L-asparagine

Na ₂ HPO ₄ ,2H ₂ O.....	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl.....	0,5g
L-asparagine.....	5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O à 1M.....	2ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O à 0,1M.....	1ml
Agar.....	20g
Rouge de phénol dans l'éthanol.....	0,009%

• **Le milieu de Sierra additionné de tween 80**

Peptone.....	10 g
NaCl.....	5g
CaCl ₂ - 1H ₂ O.....	0.1g
Eau distillée.....	1000 ml
Agar.....	18 g
Tween 80.....	10 ml
pH.....	7.4

• **La gélosé au lait écrémé**

Peptone.....	10 g
NaCl.....	5 g
Extrait de levure.....	3 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 mL
Lait écrémé.....	100 g
Eau distillée.....	1000 mL
pH.....	6.5-7.2

• **la gélose à la tyrosine**

Peptone.....	05 g
Extrait de viande.....	3 g
L-tyrosine.....	5 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	7

• **La gélose MP7**

Glucose.....	5g
Pectine.....	5g
KH ₂ PO ₄	4g
Na ₂ HPO ₄	6g
Extrait de levure.....	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
FeSO ₄ _7H ₂ O.....	0.001g (01mg)
MgSO ₄	0.2 g

- **Milieu ISP1**
 - Tryptone 5g
 - Extrait de levure..... 3g
 - Agar 15g
 - H₂O..... 1000ml
 - pH 7.2
- **Milieu ISP 2**
 - Glucose 4g
 - Extrait de levure..... 4g
 - Extrait de malt..... 10g
 - H₂O..... 10g
 - Agar 1000ml
 - Ph 7.2
- **Milieu ISP 3**
 - Farine d'avoine..... 20g
 - Solution saline standard 1ml
 - Agar 20g
 - H₂O..... 1000ml
 - PH 7.2
- **Milieu ISP4**
 - amidon 10g
 - K₂HPO₄ 1g
 - MgSO₄..... 1g
 - NaCl..... 1g
 - (NH₄)₂SO₄ 2g
 - CaCO₃ 2g
 - solution saline standard..... 1ml
 - Agar 20g
 - H₂O..... 1000ml
 - pH 7.2
- **Milieu ISP 5**
 - Agar 20g
 - Glycérol 10g/l
 - L- asparagine 1g/l
 - K₂HPO₄ 1g/l
 - Eau distillée 1000ml
 - Solution saline 1ml
 - PH 7.2
- **Eau physiologique stérile.**
 - NaCl 9g
 - Eau distillée..... 1000 ml
 - Autoclavage 120°C/20min
- **Solution saline stantard***
 - FeSO₄,7H₂O..... 1g/L
 - ZNSO₄,7H₂O..... 1g/L

MnCl ₂ ,4H ₂ O.....	1g/L
H ₂ O.....	1000ml

• **Solution saline standard**

FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,1g
MnCl ₂ ,4H ₂ O.....	0,1g
ZnSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,1g

NaOH : 10g de NaOH dans 250 ml d'eau distillée.

HCl : 200 ml d'HCL dans 16.40 ml d'eau distillée.

Colorants

• **La solution aqueuse de Rouge Congo**

Rouge Congo.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

• **La solution de lugol**

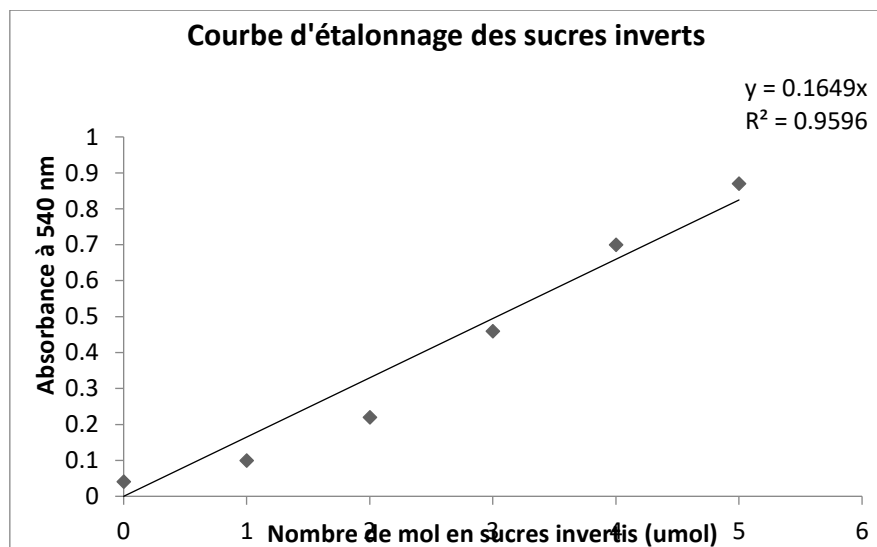
Iodure de potassium (KI).....	2g
Iode métalloïde (I ₂).....	1g
Eau distillée.....	100ml

Annexe 02

Préparation de la solution DNS

1 g de DNS dissous dans 50 ml de sel de Rochelle ou tartrate de sodium et de potassium tétrahydrate), puis on a ajouté 20ml de NaOH 2M, la couleur de la solution est devenue jaune orangé transparent, le volume final a été complété à 100 ml par d'eau distillée

Solution d'amidon : une solution d'amidon soluble à 1 % a été préparée en dissolvant 1,0 g d'amidon soluble dans 100 ml de tampon phosphate de sodium 0,02 N (pH, 6,9). Cette solution a été solubilisée par chauffage et agitation simultanée pendant 15 min. Après refroidissement, la solution a été conservée à son volume d'origine (100 ml) par addition d'eau distillée.



Annexe 03

- **Milieu Mincer (MEM)** (Minceur et al.,2002).

Amidon.....	10g
Peptone.....	2g
Extrait de levure.....	4g
Eau distillé.....	1000 ml
PH : 7,2	

- **Milieu Muller Hinton (MH)** (John Horward Mueller et Jane Hinton,1941)

Boite de 250g de Muller Hinton.....	38g
H2O distille.....	1000ml
pH : 7,2.	

- **Gélose Sabouraud (Raymond J.A. Sabouraud,1892)**

Boite de 500g de Sabouraud déshydraté.....	38g
H2O distillé.....	1000
ml	

- **strach casein agar (SCA)** (Kuster et Williams,1964)

Amidon.....	10g
Caseine.....	0,3g
KNO3.....	2g
K2HPO4.....	2g
NaCl.....	2g
MgSo4, 7H2O.....	0,05g
CaCO3.....	0,02g
FeSO4 7HO2.....	0,01g
Agar.....	18g
Eau	
distillée.....	1000m

Annexe 04

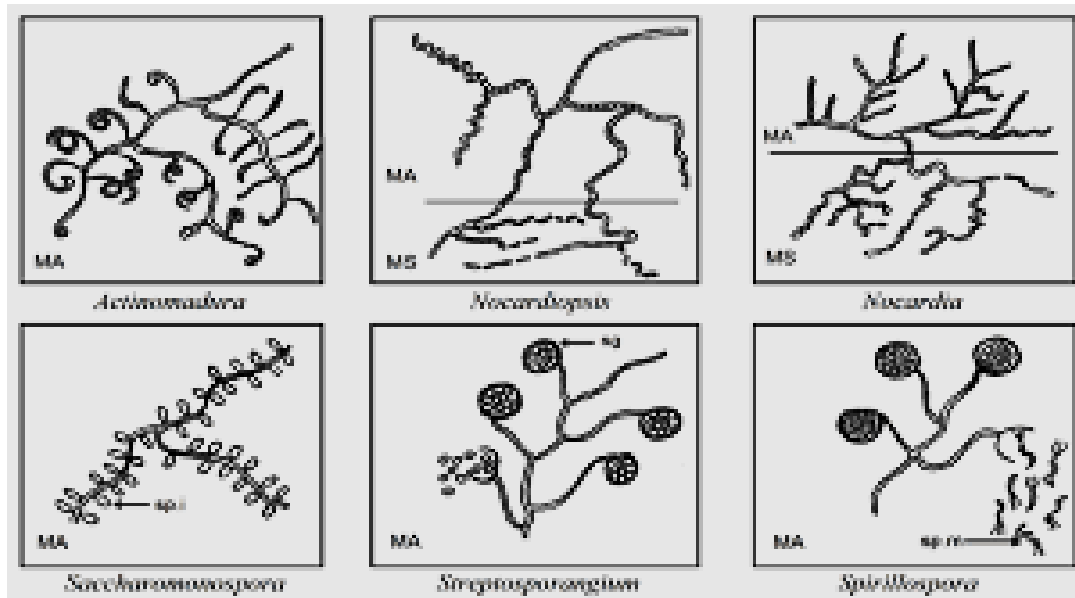


Figure 21 : Micromorphologie de certains genres d'actinobactéries

- Addou-Amara N.** (2009). Les Actinobactéries Thermo-halophiles : isolement, systématique et production de métabolites bioactifs. Thèse de Doctorat. Université des sciences et des technologies Houari Boumedién. P : 19-22.
- Alarcón-Gutiérrez. E.** (2007). Influence de facteurs abiotiques sur la régulation des paramètres microbiens impliqués dans la dégradation de la matière organique d'une litière forestière méditerranéenne. Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne. Aix-marseille III. France. P :241.
- Amoroso M. J., Benimeli C. S. and Cuozzo S. A.** (2013). Actinobacteria application in bioremediation and production of industrial enzymes. Edition CRC.Press, New York. 298p.
- Anibou, M., Chait, A., Zyad, A., Taourirt, M., Ouhdouch, Y., et Benherref, A** (2000). Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. appliquées de Toulouse Vol 52: 455-63. P : 59
- Badji, B.** (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.226p.
- Badji.B, Riba. A, Mathieu. F, Lebrihi. A, Sabaou. N.** (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie Médicale. Vol 15. 211–219p.
- Barka E.A.** (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 80 n°1. P 3-4.
- Bastide. A ; de Méo. M ; Andriantsoa. M; Laget. M; and Duménil. G.** (1986). - Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. Mircen. Journal, 2, 453-466.
- Bayot, A., Basse, N., Lee, I., Gareil, M., Pirotte, B., Bulteau, A. L., . . . Reboud-Ravaux, M.** (2008). Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial Lon protease inhibitors versus proteasome inhibitors. Biochimie, 90(2), 260-269.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E., and Lechevalier, H.A**(1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strain of various from genera of aerobic actinomycetes ; 13, 236-24

- Belyagoubi L.** (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. P : 14-17.
- Benkerrou. F., Hamaili. K.,** (2012). Etude de la croissance et la production des cellulases par *Bjerkandera sp.* Sur le son et la paille de blé. Mémoire de stage pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie biologique. Université Abderrahmane MIRA - Bejaia. p 8-10
- Bennamoun L.** (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir). Productrices de polygalacturonase : purification et caractérisation enzymatique. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri-Constantine 1. P : 37-4.
- Bensmira. S.,** (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrême (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de Magister en Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Frères Mentouri - Constantine. bordeaux 2. n° 1840 .P 11-1
- Bornsheur U. T., Bessler C., Srinivas R. & Krishna S. H.** (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in biotechnology. 20 : 433-437.
- Bouaziz S.** (2018). Recherche de souches bactériennes locales productrices de substances antimicrobiennes : isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. P : 4-13.
- Boudouaia N.** (2019), Thèse en doctorat : Modification, caractérisation et valorisation d'un matériau d'origine naturelle le chitosane pour la dépollution des eaux, UNIVERSITE DJILLALI LIABES FACULTE DES SCIENCES EXACTES SIDI BEL ABBES, Algérie.
- Boukhalfa-Lezzar H.** (2015). Etude de la production de la protéase par *Aspergillus oryzae* sur milieu solide en fermenteur fujiwara. Utilisation des déchets de tomate comme substrat de fermentation. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri-Constantine. P : 24-31.
- Breuilland, J., Lemoine, A., Michel, G et Olle,** (1974). Etude des actinomycetes aérobies. Rencontrées dans l'air de Toulouse. Rev. Inst. Pasteur, Lyon, Fr., 7: P:269-27
- Buchanan RE.** (1917) Studies in the nomenclature and classification of the bacteria: II. The primary subdivisions of the *Schizomycetes*. J Bacteriol.;2:155–164.

- Candace H. H. and Weimer P. J.** (1991). Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker (Ed), INC, New York, pp. 164- 522
- Cawley, E.I.** (2013)., Dopamine and light: dissecting effects on mood and motivational states in women with subsyndromal seasonal affective disorder. *J Psychiatry Neurosci.*, 38(6): p. 388-97.
- Chakraborty, A., Uechi, T., Higa, S., Torihara, H. et Kenmochi, N.** (2009) La perte de la protéine ribosomale L11 affecte le développement embryonnaire du poisson zèbre par le biais d'une réponse apoptotique dépendante de p53.
- Chakraborty S, Khopade A, Kokare C, Mahadik K, Chopade B.** (2009). Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces sp.* D1. *J Mol Catal B Enzyme.* ;58 :17-23.
- Claire. F.** (2012). Rôle des *Pseudomonas fluorescens* dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg. P :102
- Couch, J.N. and Bland, C** (1974). E. Family IV. Actinoplanaceae. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 th Ed., Buchanan R.E. and Gibbon N.E. (Eds). Williams and Wilkins C. O. Baltimore.; 706-72
- Cross, T** (1981). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. d'inhibition sur l' α - amylase et l' α – glucosidase des extraits naturels de la plante.; 50 : pp397-423
- Danilenko. V.N; Mironov. V.A; and Elizarov. S.M.** (2005). - Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 319–329. dans la transformation des produits amylacés. Thèse doctorat : Sciences agronomiques
- Dari. R.,** (2013). Dénombrement de la biomasse microbienne des sols arides exemple d'un sol salé sous deux types de cultures. Mémoire de stage pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en sciences Agronomiques. Université Kasdi Merbah - Ourgla. p 4-2
- Debnath, T., Kujur, R. R. A., Mitra, R., & Das, S. K.** (2019). Diversity of microbes in hot springs and their sustainable use. In *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. Springer, Singapore, 159-186

Demain A. L., Solomon N.A., Koch A.L., Schaechter M., Palleroni N.J., Bulla L.A., Hoch J.A., Zeikus J.G. et al (1985). Biology of industrial microorganisms. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. P: 291-357.

Demain, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol Adv*, 18(6) : 499-514.

Dickner-Ouellet L. (2018). Optimisation de l'usage des coproduits dans l'alimentation des porcs en croissance : impact du type de fibre et de la xylanase sur la digestion des nutriments. Thèse de Doctorat. Université LAVAL Québec-Canada. Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol. P : 36-38

Djaballah C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérantes isolées de la sebkha d'Ain Mlila. Thèse de Magister. Université Mentouri-Constantine. P : 5-7.

Dvořák, J., Mashiyama, S. T., Braschi, S., Sajid, M., Knudsen, G. M., Hansell, E, Mackenzie, B. (2008). Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie*, 90(2), 345-358.

Ensing, J. C., Normand, P., Burden, J. P., et Yallop, C. A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Review microbiology* ; 144, 657-660 et *ingénierie biologique*. Liege : GAB,148p.

Fickers P, Destain J, Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol Agron Soc Environ*.119-130

Garske, A. L., Kapp, G., & Mcauliffe, J. C. (2017). Industrial enzymes and biocatalysis. In *Handbook of industrial chemistry and biotechnology*. Springer, Cham, 1571-1638.

Gassara F. (2012). Production économique d'enzyme ligninolytique par fermentation à l'état solide des déchets agro-industries et leurs applications. Thèse de Doctorat. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau-Terre-Environnement Genista. (Doctoral dissertation, L'École Normale Supérieure de Kouba-Alger ; 255) P : 11-14

Ghribi M. (2019). La biodiversité microbienne des déchets (boues, papetières et huiles usées) et son potentiel d'application enzymatique. Thèse de Doctorat. Université du Québec à TroisRivières. P : 2.

- Gokul B.** (2000). A review of characterization and application of chitinase from *Trichoderma harizinum*. *Bioprocess Engineering*. Vol. 23. P: 691-694.
- Goodfellow M., Parte A., Whitman W; B., Kampfer P., Busse H-J., Trujillo M. E., Ludwig W., Suzuki K-I.** (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology: The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media. volume 5. 2083p.
- Gottlieb D.,** (1973). General considerations and implications of the actinomycetes. In: Sakes G., Skinner FA. *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. (Eds). Academic Press, New York. pp 1–10.
- Govindharaj V., Ramasamy V. and Dharmadurai D.** (2016). Actinobacteria — A Biofactory of Novel Enzymes In “Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. IntechOpen., (Eds) <http://dx.doi.org/10.5772/61436> pp 329- 352
- Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P.** (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59(1), 15-32.
- Gurielidze M, Pataraya D, cholokava N, Nutsubidze.N,** (2010), Extremophilic Actinomycetes, Distributed in Various Types of Soils of Georgia and their Protease Activity. *Bulletin of the Georgian National Academy of science* ;4(3) :81-85
- Haberra S.** (2014). Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. Thèse de Doctorat. Faculté Des Science Département De Biochimie.17p
- Hasan, F., Shah A. A. and Abdul Hameed.** (2006). Industrial application of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*.<http://www.bacterio.cict.fr/>.Vol. 39. P: 235-251
- Jang HD and Chang KS** (2005). “Thermostable cellulases from *Streptomyces* sp: scale-up production in a 50-lfermenter,” *Biotechnology Letters*, 27(4), pp. 239–242.
- Jaeger K. E. & Eggert T.** (2002). Lipase for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 13: 390-397.
- Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M. V & Misset O.** (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology reviews*. 15:29-63
- Kalakoutski, L.V. et Agree, N.S.** (1976). Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. *Bacterial. Rew .;* 40: 469-525

Kara Slimane A. (2010). Préparation des copolymères hydrosolubles à base d'amidon, Modification et contrôle des propriétés. Thèse magister : Chimie et Physico-Chimie Organique Macromoléculaire. TLEMCEM : Université Abou-Bakr Belkaid, 106 p

Khachaturians. G.G. (1998); Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Candidan Medical Association* 159, 1129- 1136

Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., (2010). Lumyong S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *Eur Asian Journal of BioSciences.*; 4: 23-32.

Kheder F.(2007). Production et Purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse d'esters phénoliques. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique De Lorraine.4-39p

Khelil. O., 2017. Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de: Le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoïdes et des biosurfactants. Thèse de doctorat en Biotechnologie Végétale. Université Mohamed Boudiaf - Oran, p 14.

Kopečný J., Hodrová B. and Stewart C. S. (1996). The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 195-19

Lamari, L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algérie)

Lamrini S. (2012). Etudes préliminaires des propriétés physico-chimiques de cellulases et pectinases chez des isolats microbiens. Mémoire de magéster. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.14-28p

Lazzarini A, Cavaletti, Toppo G, Marinelli F (2000), Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* ;78 :399-4

Lechevalier, A.H. (1981). Introduction to the order Actinomycetales, (volume 2). Springer-Verlag Edition Berlin : 1915-1922.

Lechevalier, M.P., De bievre, C. et Lechevalier, H.A. (1981). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* (1977); 5, 249-260. (volume2).

- Lechevalier, M-P. et Lechevalier. H-A.** (1970). Composition of wal-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. The actinomycetales H.Prause, (Ed) G Fisher Verlage, Jana. (1970); 331-316.
- Liu Z, Liu Y, Yang H, Yang Y, Shen G, Yu R** (2005). A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta.*;533(1):3–9.
- Locci, R.** (1989). *Streptomyces* and related genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 4, 2451-2508
- Logan N. A.** (1994). *Bacterial Systematics*. Edition Blackwell Scientifique Publications. London. 272 p
- Manivasagan, P., Kang, KH., Sivakumar, K., Li-Chan, EC., Oh, HM., Kim, SK** (2014). Marine actinobacteria: an important source of bioactive natural products. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, , 38: 172–188. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.01>.
- Mariat, F. et Sebald, M.** (1990). Actinomycètes In : *Bactériologie Médicale*. Le Minor L. et Véron M. (Eds), 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949.
- Massaoudi Y.** (2015). Contribution à la recherche et l'isolement de *Dickeya sp.* (*Erwinia chrysanthemi*) et à la caractérisation des bactéries productrices d'enzymes hydrolytiques et à effet antagoniste de *Dickeya sp.* Mémoire de Magister. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.13p
- Materials and Minerals. Meyer, J.** (1976). *Nocardiopsis*, a new genus of the order Actinomycetales. *Int J Syst Bacteriol.*, 26: 487-493. <https://doi.org/10.1099/00207713-26-4-487>, Vol 18, n°2, pp. 53-56
- Matsumura M., Matthews B.** (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*. vol. (342) : 291-293p
- Mc Carthy A. J. and Williams S. T.** (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation. *Environm. review*. 115 (1-2): 189-192
- McMahon AM, Doyle EM, Brooks S** (2007), O'Connor KE. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology.*;40(5):1435–1441.

- Messaoudi, O., Wink, J., & Bendahou, M.** (2020). Diversity of Actinobacteria Isolated from Date Palms Rhizosphere and Saline Environments: Isolation, Identification and Biological Activity Evaluation. *Microorganisms*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121853>
- Nawani N., Kapadnis B., Das A., Rao A. and Mahajan S.** (2002). Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora sp.* V2. *J Appl Microbiol* 93(6): 965–975
- neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Nocardia autotrophica* and norcardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 54-63p
- Nouadri T.** (2011). L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Thèse de Doctorat : Biotechnologies. Constantine: Université Mentouri, 147 p.
- O'Gara F., Dowling D. N., Boesten B.** (2008). *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs.* John Wiley & Sons: Weinheim. Pp: 192.
- Orla-Jensen**, 1909 in Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date (PNU). Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/oclygu> accessed via GBIF.org on 2023-08-26.
- Perry, J.J., Staley, J.T. et Lory, S.** (2004). *Microbiologie.* Edition Dunod Petersen M. & Daniel R. (2006). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphom.* *World journal of microbiology & Biotechnology.* 22 : 431-435
- Pizzul. L.** (2006). - Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp 39 .
- Prescott L.M., Willey J. M., Sherwood L. M. et Woolverton C. J.** (2018). *Microbiologie.* De Boeck supérieur. France. 1120p.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V.** (1998a). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 597-635.
- Rojas J.L, Martin J, Tormo J.R, Vicente F, Brunati M, Ciciliato I, Losi D, Van Trappen S, Mergaert J, Swings J, Marinelli F, Genilloud O** (2009). Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Mar Genomics* ; 2(1): 33-41. Dol : 10.1016/.margen. 2009.03.005.

Saci A. (2011). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Thèse de Magister. Université Mentouri Constantine. P : 10-12.

Sahoo K., Sahoo R. K., Gaur M. et Subudhi E. (2019). Isolation of cellulase genes from thermophiles. A novel approach toward new gene discovery. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. P : 151-169

Saket, S., Jamuna Bai, A., Mahadevaswamy, G K., Subba Rao, VM., Ravishankar, RV (2021). Diketopiperazine derivative from marine actinomycetes *Nocardioopsis* sp. SCA30 with antimicrobial activity against MRSA. *Arch. Microbiol.*, , 203: 6173–6181
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02582-2>

Sanglier, J.J., et Trujillo, M. (1997) Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol.* ;12 : 13

Scriban R. (1999). *Biotechnologies. Techniques et Documentation Lavoisier .5ème édition..*
Cité par Benaouida K. (2008). 157p

Shirling, E.T., Gottlieb, D., (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16, 313–340

Shukla S. and Mandal S. K. (2013). Production purification and characterization of extracellular anti-leukaemic L-Asparaginase from isolated *Bacillus subtilis* using solid-state fermentation. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*.4: 89-9

Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017). α -Amylases. In *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 3-24

Smaoui S., (2010) Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. En vue de l'obtention du doctorat. Toulouse: 22p

Souagui, S., Djoudi, W., Boudries, H., Béchet, M., Leclère, V., & Kecha, M. (2019). Modeling and Statistical Optimization of Culture Conditions for Improvement of Antifungal Compounds Production by *Streptomyces albidoflavus* S19 Strain of Wastewater Origin. *Anti-Infective Agents*, 17(1), 39–49. <https://doi.org/10.2174/2211352516666180813102424>

Soussou, S. (2013). Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques

de Hedysarum coronarium. Thèse de Doctorat. Université de Sousse. Streptomyces yeochonensis sp.nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 54, 211-214

Subathra Devi, C., Kumari, A., Jain, N. (2012) Novel bioactive compounds from mangrove derived Actinomycetes. Asian journal of Pharmaceutical and Clinical Research.; Vol 5, Suppl 4. Sydney, Tokyo, Sao Paulo. pp. 481–528.

Taira T, Ohnuma T, Yamagami T, et al (2002) Antifungal Activity of Rye (Secale cereale) Seed Chitinases: the Different Binding Manner of Class I and Class II Chitinases to the Fungal Cell Walls. Biosci Biotechnol Biochem 66:970–977. doi:

Takahashi, Y. et Omura, S (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. J. Gen. Appl. Microbiol. ; Vol :49, 141-154

Theilleux, J. (1993) les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria. ; V 612p, pp 425

Vinarov, A.U., Robysheva, Z.N., Sidorenko, T.E., Dirina, E.N., (2002). Biotechnology of pigment melanin, in: Proceedings of the 1st International Congress “Biotechnology State of the Art and Prospects of Development”. P75.

Waksman S.A. and Henrici A.T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. J. Bacteriol., 46, 337-341.

Wang T., Lin L., Hsu W. (1989). Cloning and expression of Schwanniomyces occidentalis - amylase gene in Saccharomyces cerevisiae. Applid and Environmental Microbiology. vol. 55 (12) : 3167-3172p.

Williams, S.T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, D.I., Kuznetsov, V.D., Le Monnier, F.J., Long, P.F., Maycroft, K.A., Palma, R.A., Quaroni, S., Todd, J.I. et West, M (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. Microbiology.; Vol:144, 653-656 with shelfish waste, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol103, n°6, pp

Yamagushi, T. (1965). Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. J. Bacteriol; Vol: 38, 444-453.

Yilma S, Cannon Sykora J, Samoylov A, Loc T, Liu N, Brinker C J, Neely W C, andVodyanoy V. (2008). Large-conductance cholesterol–amphotericin Bchannels inreconstituted lipid bilayers. Biosensors Bioelectron. 22: 1359–1367p

Zaitlin B and Watson S.B (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths. *Water research*. 40.1741-1753

Zallot R. (2011). Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat en Biologie Végétale, L'université bordeaux 2. n° 1840

Zhang J., Siika-Aho M., Puranen T., Tang M., Tenkanen M. and Viikari L. (2011). Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. *Biotechnol Biofuels* 4(1):1

Zoubiri L. (2011). Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Thèse de Magister. Université Mentouri-Constantine. P : 7-8