



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE
Spécialité : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Par : M^{elle} Darabid Serine Chahinez

Thème

**Recherche de quelques enzymes impliqués dans la
biodégradation des biodéchets chez une Actinobactérie
et des *Bacillus* de l'eau de mer.**

Soutenu le 26/06/2023

Devant le jury composé de :

Président	Mr BOUZNEB Lahcene	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur	Mr DJIBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Examineur	Mr ARABI Abed	MCB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciement

*Je tiens tout d'abord à remercier
ALLAH le tout puissant le
Miséricordieux, qui m'a donné la force
et la patience d'accomplir ce Modeste
travail.*

*Je tiens à remercier très profondément
Mr.DJIBAOUI Rachid,
de m'avoir encadré, conseillé et
encouragé et de m'avoir permis de
travailler dans un cadre très agréable.
Mes vifs remerciements vont également
aux membres du jury
Mr. BOUZNAD.N et Mr. ARABI Pour
avoir accepté d'examiner
Le travail et de l'enrichir par leurs
propositions.*

*Je tiens une importance particulière à
remercier les personnes du laboratoire
de Microbiologie pour leur aide et
l'ambiance
amicale qu'ils ont su créer.*

*Enfin, je tiens également à remercier
toutes les personnes qui ont participé
de près ou de loin à la réalisation de ce
travail.*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

mes chers parents, mes

chères sœurs et Toutes ma

famille.

Liste des abréviations

Na Cl : Chlorure de sodium

B : *Bacillus*

C° : Degrés Celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

EC : Enzyme commission

PH : Potentiel hydrogène

DFP : Disopropyl fluoro phosphate

DAEA : Diéthyl amino éthyle

CM : Carboxyméthyle

PI : Point isoélectrique

ARN : Acide ribonucléique

GN : Gélose nutritive

Liste des figures

Figure 1 : Microscopie représentant les différents groupes de bacilles en fonction de morphologie de spore et de sporange	8
Figure 2: <i>Classificaion des Actinobacteries selon (Paul A. Lawson)</i>	17
Figure 3 : Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes.	18
figure 4: Forme et disposition de sporanges chez quelques genre d'actinomycètes promair.....	20
Figure 5: Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes primaire.....	21
Figure 6 : mécanisme d'action des protéases a serine.....	28
Figure 7 : Mécanisme d'action des protéases à cystéines.	29
Figure 8 : Mécanisme d'action des protéases à aspartique.	30
Figure 9 : Mécanisme d'action des métalloprotéases	31
Figure 10 : Mode d'action de l'alpha-amylase	32
Figure 11 : Mode d'action de l'alpha-amylase	34
Figure 12 : Position de la plage de sidi Mejdoub,Mostaganem sur Google Maps ..	40
Figure 13 : Plage de Sidi MEJDOUB.....	44
Figure 14 : Isolement des Bacillus sur milieu GN à partir d'un sable	45
Figure 15 : Aspect de deux isolats de Bacillus purifiés	46
Figure 16 : Morphologie macro et microscopique de l'actinobactérie.....	47
Figure 17 : Observation après coloration de Gram de l'isolat BM1 sous microscope G (X100)	47
Figure 18 : Test de catalase sur l'actinobactérie (act) et Bacillus (BM9, BM10, BM2).....	48
Figure 19 : Effet du stress salin à 6,5% et 8% de chlorure de sodium sur la croissance de quelques isolats de Bacillus.	50
Figure 20 : Activité enzymatique protéase des Bacillus et actinobacterie étudiier.	52
Figure 21 : Diagramme des diamètres des halos de dégradation de la caséine de chaque isolat.....	53
Figure 22: Activité enzymatique de gélatinasse chez les Bacillus étudiés	53
Figure 23 : Activité d'hydrolyse de la gélatine	54
Figure 24 : Activité enzymatique des Amylases chez quelques Bacillus étudiés	54

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des Bacillus selon (Wang, W et Sun, M, 2009).	5
Tableau 2 :Classification selon le Bergey.	7
Tableau 3 :Résultats de l'étude macroscopique des isolats de Bacillus et actinobactérie.	45
Tableau 4 :Résultats des tests de l'oxydase et de catalase les Bacillus et l'actinobactérie de sable de l'eau de mer	49
Tableau 5 : Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires les Bacillus et l'actinobactérie de sable de l'eau de mer.	50
Tableau 6 :Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires les Bacillus du sol (fournis par le laboratoire de microbiologie et de biologie végétal)	51

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction1

Partie I : Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur le genre *Bacillus*4

I. Le genre *Bacillus* :4

I.1 Taxonomie du genre *Bacillus*6

I.2 Les caractères du groupe *Bacillus*7

I.2.1 Caractères bactériologiques..... 7

I.2.2 Croissance.....8

I.2.3 Habitas.....8

I.2.4 Les caractères écologique du groupe *Bacillus*..... 9

I.2.5 Caractères cultureux..... 9

I.2.6 Caractères biochimiques..... 10

I.3 Les *Bacillus* halophiles et halotolérants.....11

I.4 Les molécules bioactives synthétisé par le groupe *Bacillus* 11

I.5 Intérêt biotechnologique du groupe *Bacillus*..... 12

Chapitre I :Généralité sur les actinobacteries15

I.6 Les Actinobacteries16

I.7 Classification des actinobactéries :..... 16

I.8Morphologie17

I.9 Mycélium végétatif.....18

I.10 Mycélium aérien..... 18

I.11Les spores..... 18

I.12 Ecologie.....20

I.13 Rôles dans la nature 20

Chapitre II : les enzymes du genre *Bacillus*.....23

II.1 Définition des enzymes.....23

II.2 Nomenclature et classification des enzymes :23

II.3 Sources d'enzymes24

II.4 Les activités enzymatiques24

II.4.1Caractères des protéases microbiennes 25

II.5 Types de protéases microbiennes.....25

II.5.1 Protéase alcaline.....26

II.5.2Protéase neutre.....27

II.5.3Protéase acide..... 27

II.6 Les différentes classes de protéase et leurs mécanismes d'action27

II.6.1Protéase a serine28

A. Propriétés.....27

B. Mécanismes d'action	28
II.6.2 Protéase a cystéine.....	28
A. Propriétés.....	28
B. Mécanismes d'action.....	29
II.6.3 Protéase aspartique.....	27
A. Propriétés.....	29
B. Mécanismes d'action.....	30
II.6.4 Métallo protéase	30
A. Propriétés	30
B. Mécanismes d'action	31
II.7 Les enzymes amyliques	32
II.8 Les enzymes cellulitique.....	33
II.9 Les Lipases	35
II.10 Les pectinases.....	35
Partie 2 : Partie expérimentale.....	37
Chapitre I: Matériels et méthodes	39
I.1 Description du site de prelevement	39
I.2 Prélèvement d'échantillon.....	39
I.3 Isolement des bactéries du genre Bacillus.....	40
I.4 Purification	40
I.5 Identification des isolats	40
I.6 Etude macroscopique.....	40
I.7 Etude microscopique.....	40
I.8 Coloration de gram	40
I.9 Etude physiologique	41
I.10 Teste de catalase	41
I.11 Teste cytochrome -oxydase	41
I.12 Tolérance a la salinité	41
I.13 Mise en évidence des activités enzymatiques	41
I.13.1 Proteolyse de la gelatine	41
I.13.2 Hydrolyse de la caseine	42
I.13.3 Hydrolyse de amidon	42
II.1 Isolements et purification des isolats.....	45
II.2 Caracteres morphologiques et culturales.....	47
II.3 Caractères biochimiques	48
II.4 Teste de salinité	49
II.5 Résultats des activités enzymatiques	50
II.6 Production de protéase	51
II.7 Production de gélatinase	53
II.8 Production de l'amylase	54
Conclusion	55
Références bibliographiques	57
Annexes	66

Résumé :

Les biodéchets peuvent avoir un impact environnemental significatif s'ils ne sont pas gérés de manière appropriée, contribuant à la pollution de l'air, de l'eau et des sols. La dégradation efficace des biodéchets est cruciale pour réduire leur impact environnemental. Les enzymes jouent un rôle essentiel dans ce processus de dégradation. Ces dernières sont des protéines qui facilitent les réactions chimiques, en l'occurrence, la dégradation des composés organiques des biodéchets en composant plus simples et plus facilement recyclables par les micro-organismes présents dans l'environnement.

Dans le présent travail la recherche s'est concentrée sur la détection d'enzymes spécifiques tels que (les protéases et les amylases) provenant de 12 isolats de *Bacillus* et d'une actinobactérie isolés du sable de mer de la plage de Sid Mejedoub. Après leurs isolements et leurs purifications sur GN ces derniers font l'objet d'une identification par des examens macroscopiques, microscopiques et quelques examens biochimiques et des tests d'activités enzymatiques.

Les résultats de ces examens ont révélé que les 12 isolats de *Bacillus* sont présents sous forme de bâtonnets à Gram positif, catalase positif, oxydase négatif capable de former des spores et que l'actinobactérie est de forme filamenteuse à Gram positif, Catalase positif, oxydase négative et capable de former des conidies.

La plus part des isolats étudiés présentait au moins deux activités enzymatique hydrolytique, Tous les isolats de *Bacillus* du sable de la plage de sidi mejdoub ont hydrolysé la gélatine mais seulement certaines d'entre ont hydrolysé la protéine du lait et l'amidon. De plus, une évaluation de la tolérance à la salinité a révélé que les deux isolats étaient capables de tolérer des niveaux élevés de salinité (6,5% et 9% de NaCl).

L'étude des de ces bactéries et leur activités enzymatique ouvre des perspectives sur cette flore microbiennes marines pour la recherche de nouveaux biocatalyseurs aux propriétés intéressantes dans le domaine industriel et environnemental. Comprendre les activités enzymatiques spécifiques de ces bactéries peut conduire au développement de méthodes plus efficaces de gestion et de traitement des biodéchets, contribuant ainsi à réduire leur impact environnemental négatif.

Mots clé : *Bacillus*, actinobactérie, bio déchets, enzymes hydrolytiques.

Abstract:

Bio-waste can have a significant environmental impact if not managed appropriately, contributing to air, water and soil pollution. The efficient degradation of bio-waste is crucial to reduce its environmental impact. Enzymes play an essential role in this degradation process. The latter are proteins that facilitate chemical reactions, in this case, the degradation of organic compounds in bio-waste into simpler compounds that are more easily recyclable by micro-organisms present in the environment.

In the present work the research focused on the detection of specific enzymes such as (proteases and amylases) from 12 isolates of *Bacillus* and an actinobacterium isolated from the sea sand of the beach of Sid Mejdoub. After their isolation and purification on GN, the latter were identified by macroscopic and microscopic examinations and some biochemical examinations and enzymatic activity tests.

The results of these examinations revealed that all 12 *Bacillus* isolates are present as Gram-positive, catalase-positive, oxidase-negative rods capable of forming spores and that the actinobacteria were filamentous Gram-positive, catalase-positive, oxidase-like forms negative and capable of forming conidia.

Most of the isolates studied presented at least two hydrolytic enzymatic activities. All *Bacillus* isolates from the sand of the Sidi Mejdoub beach hydrolyzed gelatin but only some of them hydrolyzed milk protein and starch. Additionally, an assessment of salinity tolerance revealed that both isolates were able to tolerate high levels of salinity (6.5% and 9% NaCl). The study of these bacteria and their enzymatic activities opens perspectives on this marine microbial flora for the search of new biocatalysts with interesting properties in the industrial and environmental field. Understanding the specific enzymatic activities of these bacteria can lead to the development of more effective methods of managing and treating bio-waste, thereby helping to reduce their negative environmental impact.

Key words: *Bacillus*, actinobacteria, bio-waste, hydrolytic enzymes.

الملخص:

يمكن أن يكون للنفايات الحيوية تأثير بيئي كبير إذا لم يتم إدارتها بشكل مناسب، مما يساهم في تلوث الهواء والماء والتربة حيث يعد التدهور الفعال للنفايات الحيوية أمراً بالغ الأهمية لتقليل تأثيرها البيئي. تلعب الإنزيمات دوراً أساسياً في عملية التحلل هذه. هذه الأخيرة عبارة عن بروتينات تسهل التفاعلات الكيميائية، وفي هذه الحالة، تحلل المركبات العضوية في النفايات الحيوية إلى مركبات أبسط يمكن إعادة تدويرها بسهولة بواسطة الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في البيئة

تركز البحث في العمل الحالي على الكشف عن إنزيمات معينة مثل (البروتياز والأميلاز) من 12 عزلة من تابعة للجنس *Bacillus* و أكتنوبكتريا من الرمال البحرية لشاطئ سيدي مجدوب. بعد عزلها وتنقيتها على الجيلوز المغذي، تم التعرف على خصائصها والماكرو والميكروسكوبية والبيوكيميائية ونشاطها الأنزيمي. أظهرت نتائج هذه الفحوصات أن جميع عزلات *Bacillus* الـ 12 موجودة على شكل عصيات موجبة الجرام، موجبة للكتلاز، سالبة الأكسيداز قادرة على تكوين الأبواغ وأن الأكتنوبكتريا كانت خيطية موجبة الجرام، موجبة للكتلاز، سالبة الأكسيداز وقادرة على تكوين كونيديا

معظم العزلات المدروسة قدمت على الأقل نشاطين إنزيمين مائيين، كل عزلات *Bacillus* من رمال شاطئ سيدي مجدوب حللت الجيلاتين ولكن بعضاً منها فقط حلل بروتين الحليب والنشاء. بالإضافة إلى ذلك، أظهر تقييم تحمل الملوحة أن كلا العزلة كانت قادرة على تحمل مستويات عالية من الملوحة (6.5% و 9% من كلوريد الصوديوم)

تفتح دراسة هذه البكتيريا وأنشطتها الأنزيمية آفاقاً حول هذه الفلورة الميكروبية البحرية للبحث عن محفزات حيوية جديدة ذات خصائص مثيرة للاهتمام في المجال الصناعي والبيئي و. يمكن أن يؤدي فهم الأنشطة الأنزيمية المحددة لهذه البكتيريا إلى تطوير طرق أكثر فاعلية لإدارة ومعالجة النفايات الحيوية، وبالتالي المساعدة في تقليل تأثيرها السلبي على البيئة

الكلمات المفتاحية: *Bacillus*، الأكتنوبكتريا، المخلفات الحيوية، الإنزيمات المتحللة للماء.

Introduction

Introduction :

L'accumulation croissante du biodéchet constitue un défi majeur pour la société moderne, nécessitant des solutions durables pour leur gestion efficace. La biodégradation, processus naturel de dégradation des composés organiques par des micro-organismes (Roger et Jacq., 2000), offre une approche prometteuse pour atténuer ce problème. Parmi les nombreux micro-organismes impliqués dans la dégradation des biodéchets, les actinobactéries et les *Bacillus* ont émergé comme des agents clés dans ce processus. Leur capacité à produire et à sécréter des enzymes puissantes leur permet de décomposer les composés organiques complexes présents dans les biodéchets en molécules plus simples. Ces enzymes constituent des alternatives aux catalyseurs chimiques toxiques et polluants et sont depuis longtemps reconnues comme des outils extra ordinairement efficaces pour les transformations biologiques et chimiques. (Durand et al.,2017).

L'objectif de la bio dépollution est d'optimiser ces facteurs afin d'augmenter la densité et l'activité des populations microbiennes pour accélérer la décontamination des sites pollués (Chaillou et Combrisson, 2013).

Cette recherche se focalise sur les *bacillus* et une actinobactérie marins et sur une exploration des enzymes spécifiques impliquées dans la biodegradation des biodéchets. En recherchant ces enzymes, cela nous aidera à mieux évaluer le pouvoir de dégradation des bactéries et à optimiser les technologies de gestion des biodéchets.

L'objectif de ce mémoire est de rechercher quelques enzyme hydrolytique produite par le genre *Bacillus* et actinobactérie isolés du sable de l'eau de mer, susceptible de dégrader les bio déchets.

Le manuscrit est structuré en deux parties, la première concerne la recherche bibliographique qui présente des généralité sur le genre *Bacillus* et actinobactérie, les enzymes produites par les micro-organismes et principalement les actinobactérie et *Bacillus*. La deuxième partie concerne le côté pratique dans lequel le matériel et les méthodes suivis dans ce travail sont expliqué, puis ; les résultats sont présentés, discutés, pour tirer à la fin une conclusion.

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le genre *Bacillus* et Actinobacteries.

Chapitre I : Généralité sur le genre *Bacillus*.

I. Le genre *Bacillus* :

Les premières tentatives de classification des espèces *Bacillus* ont été basées sur deux caractéristiques : la croissance aérobie et la formation d'endospores. Ces tentatives ont résulté en le groupement d'un grand nombre de bactéries qui possèdent différents traits physiologiques et génétiques. Cependant, depuis l'avènement des technologies de séquençage, la classification phylogénétique des espèces bactériennes a été rendue possible (O'Sullivan 2005).

Smith *et al.*, (1946) a rassemblé un ensemble méticuleux et rigoureux de données morphologiques et physiologiques à partir d'une collection de 1134 souches de *Bacillus* spp et a réussi de les placer dans 19 espèces définies. Après cela, Smith et Gordon ont refait encore le même travail sur 206 souches thermophiles qui ont été placées dans deux espèces additionnelles (Gordon et Smith 1949). En 1973, dans la monographie désormais classique le genre *Bacillus* (Gordon *et al.*, 1973), Ruth Gordon et ses collègues ont fourni une description détaillée et précise de 18 espèces de *Bacillus*,

La taxonomie de *Bacillus* est devenue une science logique, ordonnée et lucide (Zeigler et Perkins, 2009). En 1989, Ruth Gordon a été l'auteur d'un chapitre dans le livre *Practical Handbook of Microbiology* (CRC Press) qui a passé en revue la systématique du genre *Bacillus* en utilisant les données les plus extensives à ce moment-là (Gordon *et al.*, 1989).

Ensuite, les différentes espèces de *Bacillus* ont été divisées en trois groupes selon le phénotype des sporanges (ex. déformantes vs. Non-déformantes) et des spores matures (ex. sphérique, cylindrique ou ellipsoïde) et selon des tests biochimiques (ex. catalase, hydrolyse d'amidon) et les propriétés de croissance (ex. croissance à 7% de NaCl). Cependant les espèces au sein de ces groupes étaient très hétérogènes. Depuis ce temps, des reclassifications majeures ont été faites grâce à des méthodes d'analyse plus sophistiquées qui s'appuient notamment sur la comparaison des génomes (Zeigler et Perkins 2009).

La majorité des espèces *Bacillus* avec des noms valablement publiés, sont phylogénétiquement groupées en sous-groupes à l'intérieur du genre. Toutefois, quelques espèces de *Bacillus* validement nommés ne sont pas reliées à l'espèce type *B.*

subtilis, et sont plus proche phylogénétiquement d'autres genres (Ludwig et al., 2009).

Les données récentes montrent clairement que dans le groupe de *B. subtilis*. À l'intérieur Duquella délimitation des espèces est très difficile, des gènes tels que **gyrB** permettent une différenciation sur une base génétique (Wang et al., 2007).

Quand les nouveaux outils de taxonomie moléculaire (tel que le séquençage de l'ARNr16S) ont été appliqués au genre *Bacillus*, les données obtenues ont mis en cause le paradigme existant que le genre était composé d'un petit nombre d'espèces rigoureusement défini identifiable par certaines caractéristiques phénotypiques (Zeigler et Perkins, 2009).

(Ash et al., 1991) ont utilisé cette nouvelle technologie pour analyser minutieusement la majorité des espèces connues de *Bacillus* et ont conclu qu'elles tombent dans cinq groupes distincts selon la similarité des séquences ARNr 16S, et ont conclu que ces groupes correspondent à cinq nouveaux genres.

Les espèces *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, et la plupart des autres espèces connues et étudiées ont été placées dans le même groupe. Cependant il est connu que les séquences de l'ARNr 16S ne permettent pas toujours aux espèces d'être identifiées et que pour cela d'autres techniques sont nécessaires telle que l'hybridation ADN-ADN (Logan et Vos, 2009).

Avec les avancées et le développement des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS), un grand nombre de données de séquençage a été généré dans les dernières années.

Tableau 1 Classification des *Bacillus* selon (Wang, W et Sun, M, 2009).

Groupes	Espèces
I	<i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. safensis</i> , <i>B. licheniformis</i> <i>B. mojavensis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. altitudinis</i> , <i>B. aerophilus</i> , <i>B. sonorensis</i>
II	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> et <i>B. megaterium</i>
III	<i>B. bataviensis</i>
IV	<i>B. infernus</i>
V	<i>B. indicus</i> et <i>B. litoralis</i>
VI	<i>B. macyae</i>
VII	<i>B. arsericus</i> , <i>B. berbericus</i>
VIII	<i>B. saliphilus</i>
IX	<i>B. salarius</i> , <i>B. halophilus</i>

I.1 Taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient au phylum des Firmicutes, découvert pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn. Les membres ce genre sont des bactéries à Gram positif, formant des endospores.

Ils se distinguent des autres bactéries formant des endospores par leur morphologie cellulaire (enforme de bâtonnet généralement), aérobies ou aéro anaérobie facultatifs, par la production de catalase et par leur distribution ubiquitaire (**Nicholson, 2002**). Ce genre englobe une variété d'espèces phénotypiquement hétérogènes, présentant un large éventail de besoins nutritionnels, de diversité physiologique et métabolique ainsi que dans la composition en base d'ADN (**Claus et Berkeley, 1986**). Historiquement, les espèces ont été regroupées en six grands groupes basés sur de nombreux caractères physiologiques, biochimiques et morphologiques), ainsi que sur la capacité à former des spores (**Priest et al.,1993**).

La classification moderne est basée sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S. Des recherches récentes utilisant cette analyse ont confirmé des niveaux élevés d'hétérogénéité phylogénétique dans ce genre (**Garveba et al.,2003**). (**Rossler et al.,1991**) regroupent neuf espèces du genre *Bacillus* en quatre groupes.

(**Ash et al.1991**) ont séparé 51 espèces du genre *Bacillus* en cinq groupes phylogénétiquement distincts. Ce genre regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature.

Les caractérisations génotypiques et phénotypiques complémentaires au niveau des espèces du genre *Bacillus* sélectionnées ont mené à la création de nouveaux genres multiples.

Tableau 2 Classification selon le Bergey.

phylum XIII : Firmicutes	Class I : Clostridia	Ordre I : Clostridiales	famille des Clostridiaceae
			famille des Peptostreptococcaceae
			famille des Eubacteriaceae
			famille des Peptococcaceae
			famille des Acidominococcaceae
	Class II : Mollicutes	Ordre I : Mycoplasmatales	famille des Mycoplasmataceae
		Ordre V : Incerta sedi	famille des Erysipelotrichaceae (genre Erysipelothrix)
	Class III : Bacilli	Ordre I : Bacillales	famille I des Bacillaceae (genres <i>Bacillus</i> , <i>Amphibacillus</i> , <i>Virgibacillus</i> ...)
			famille II des Planococcaceae
			famille IV des Listeriaceae (genre <i>Listeria</i> et <i>Brochothrix</i>)
			famille V des Staphylococcaceae (genres <i>Staphylococcus</i> , <i>Gemella</i> ...)
			famille VII des Paenibacillaceae
		Ordre II : Lactobacillales	famille I des Lactobacillaceae (genres <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> ...)
			famille II des Aerococcaceae
			famille IV des Enterococcaceae (genres <i>Enterococcus</i> ...)
famille V des Leuconostocaceae			
famille VI des Streptococcaceae (genres <i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i>)			

I.2 Les caractères du groupe *Bacillus* :

I.2.1 Caractères Bactériologiques :

Le groupe *Bacillus* englobe des bâtonnets qui forment des endospores en conditions d'aérobiose. Les espèces appartenant à ce groupe présentent une forme droite ou légèrement incurvée, survenant en paire ou en chainettes, mais aussi en longs filaments, généralement à bouts ronds. Toutefois les membres du groupe *Bacillus cereus* ont souvent été décrits comme des bâtonnets à bouts carrés. Le diamètre cellulaire varie de 0,4 à 1,8 µm et la longueur de 0,9 à 10,0 µm. Gram positif ou Gram variable, mobiles au moyen de flagelles péritriches ou immobiles. Certaines espèces comme *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus megateirum* produisent une capsule constituée d'acide poly-D glutamique. Cette capsule contribue à la virulence de *Bacillus anthracis*

La flagellation n'est pas considérée comme un caractère taxonomique particulièrement utile pour la définition du genre, mais la présence ou l'absence de mobilité continue à être indiquée dans la plupart des descriptions d'espèces. Ce caractère est d'une certaine valeur à l'identification. A titre d'exemple, *Bacillus anthracis* et *Bacillus mycoides* sont immobiles tandis que la plupart des souches de *Bacillus cereus* sont mobiles. Les flagelles de *Bacillus thuringiensis* peuvent se lier à des cellules d'insectes et jouer un rôle important dans la virulence de ce dernier (Zhang et al, 1995). Aérobie ou anaérobie facultative, l'accepteur final d'électron est l'oxygène remplaçable par d'autres produits pour certaines espèces. La catalase est produite par la plupart des espèces alors que l'oxydase est variable. Chimioorganotrophe, prototrophe ou auxotrophe, elles nécessitent plusieurs facteurs de

croissance.

La plus part des espèces ont un potentiel peu ou pas pathogène et sont rarement liée à des pathologies humaine ou animale à l'exception de *Bacillus anthracis*, l'agent du charbon bactérien.

D'autres espèces peuvent causer des intoxications alimentaire et des infections opportuniste tel que

Bacillus cereus.

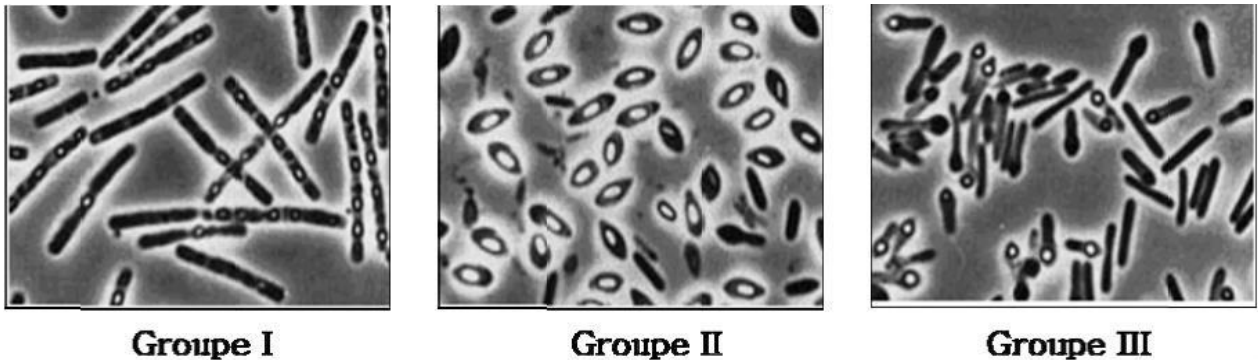


Figure 1 Microscopie représentant les différents groupes de bacilles en fonction de morphologie de spore et de sporange (Gorden et al.,1973)

I.2.2 Croissances

Les bactéries du genre *Bacillus*, sont des mésophiles avec une température optimale entre 30 et 45 C°, mais le genre contient également un certains nombres d'espèces thermophiles avec une température optimale de plus de 65 C°. Au laboratoire, dans des conditions optimales de croissance, les espèces du genre *Bacillus* montrent des temps de génération d'environ 25 minutes (Todar, 2003).

I.2.3 Habitats

L'habitat principal des *Bacillus* est le sol où ils jouent un rôle dans les cycles de carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologiques des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler à partir du sol, de

l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires (Tortora et al., 2003).

Les *Bacillus* spp. sont également présentes dans l'air où ils viennent parfois contaminer les cultures en biotes de Pétri, en travaux pratiques de microbiologie, lorsque les consignes d'ensemencement ne sont pas parfaitement respectées (Camille, 2007).

1.2.4 Les caractères écologiques du groupe *Bacillus*

Les espèces de ce groupe sont ubiquistes et sont largement réparties dans l'environnement. Elles sont retrouvées dans l'air, le sol, les environnements alcalins (**Nielsen et al., 1995**) le fait de dégrader beaucoup de polymères leur confère un rôle important dans le cycle biologique salin (**Ettoumi et al., 2009**), les passages hydrothermaux, l'eau de mer et les cadavres d'insectes (**Yazdani et al., 2009; Aizawa et al., 2010; Alcaraz et al., 2010; Fan et al., 2011**).

Leur large distribution résulte de la longévité de leurs endospores. Deux facteurs environnementaux majeurs sont d'une importance particulière dans l'induction de la sporulation, à savoir, la privation de nutriments et la densité de la population. La température de croissance, le pH, l'aération et la présence de certains minéraux peuvent aussi être à l'origine de ce phénomène.

Les endospores sont métaboliquement en dormance, ceci est la clé de leur résistance à de nombreux agents, tels que la chaleur, le rayonnement et les produits chimiques.

Cette vie au ralenti leur permet de survivre sur de longues périodes dans le sol, les poussières, les aérosols, les aliments ainsi que dans une grande variété d'autres habitats (**Heyndrickx, 2011**). Les micro-organismes formant des endospores sont souvent isolés après un traitement thermique des échantillons afin de sélectionner ces spores, mais il est à noter que la présence de ces dernières dans un sol particulier ne signifie pas nécessairement que les organismes sont métaboliquement actifs. Cependant, il est raisonnable de supposer que la présence d'un grand nombre de spores dans un sol donné reflète des activités anciennes ou actuelles des cellules végétatives se trouvant dans ce même sol (Banat et Marchant, 2011).

I.2.5 Caractères cultureux

Tous les *Bacillus* se développent sur tous milieux usuels non sélectifs. En bouillon, on observe un trouble floconneux avec un voile en surface ou des flocons qui Sédimentent laissant le bouillon liquide dans le cas de *Bacillus anthracis*. En gélose : les colonies présentent une morphologie et une taille variable selon l'espèce, on obtient généralement des colonies assez volumineuses ayant tendance à s'étaler, plates, opaques à surface chagrinée, à bords un peu dentelés dans le cas de *Bacillus subtilis* (Jerome et al., 2004).

I.2.6 Caractères biochimiques

Les *Bacillus* présentent des types métaboliques variés et leur identification est complexe, cette dernière est basée sur les caractères biochimiques (Latour et

Lemanceau, 1997) :

- Catalase +
- Oxydase –
- Aérobie stricts ou anaérobie facultatif suivant l'espèce
- Ils fermentent sans dégagement gazeux le glucose, le saccharose, l'arabinose, le Xylose et le mannitol. Ils utilisent les citrates, produisent des antibiotiques tels que les subtiline, les subténoline, les bacillomycine, les bacitracine, etc.) (Camille, 2007).

Plusieurs tests sont réalisés au laboratoire pour identifier le profil biochimique des *Bacillus sp*,

Comme :

- Réaction de Vogesproskawer (production d'acetyl-methylcarbinol)
- Fermentation des sucres en milieu sans peptone sont particulièrement intéressantes celles de glucose, xylose, arbinose.
- Test de recherche de la catalase
- Test de réduction des nitrates en nitrite (recherche de nitrate réductase)
- Test de recherche de l'uréase
- Test d'hydrolyse de l'amidon (recherche de l'amylase)
- Test d'hydrolyse de la gélatine
- Test d'hydrolyse de lécithine (recherche de lécithinase)
- Test d'hydrolyse de la caséine (recherche de la caséinase)

I.3 Les *Bacillus* halophiles et halotolérants :

Les *Bacillus* halophiles et halotolérants sont largement répartis dans différents environnements salins et hypersalins (McGenity *et al.*, 2000).

Les espèces halophiles du genre *Bacillus* et apparentées sont caractérisées par une croissance optimale dans un milieu contenant 3 à 15% (p / v) de NaCl (Ventosa *et al.*, 1998).

On retrouve des espèces légèrement halophiles comme *Bacillus xiaoxiensis* (Chen *et al.*, 2011), des espèces modérément halophiles comme *Bacillus chagannorensis* (Carrasco *et al.*, 2007a) et *Bacillus coahuilensis* (Cerritos *et al.*, 2008).

De nombreux *Bacillus* halotolérants ont été décrites et qui peuvent croître entre 0 à 10% (p/v) de NaCl comme *Bacillus luteolus* (Shi *et al.*, 2011) et *Bacillus seohaeanensis* (Lee *et al.*, 2006). aussi d'autre espèce qui peuvent croître entre 0 à 25% (p/v) NaCl comme la souche isolé du lac Goléa (Klouche Khelil, 2013) et qui a été affilié au genre *Bacillus*.

I.4 Les molécules bioactives synthétisées par le groupe *Bacillus* :

La grande polyvalence des capacités métaboliques et physiologiques des espèces du groupe *Bacillus* font d'eux des micro-organismes très prometteurs avec un fort potentiel industriel. Les espèces de ce groupe sont utilisées en microbiologie appliquée (comme les principaux micro-organismes industriels) depuis près de mille ans, ce qui coïncide avec la production de natto au Japon à l'aide de *Bacillus subtilis* par fermentation de grains de soja (Hara *et Ueda*, 1982).

En effet, à l'exception de certaines espèces du groupe *B. cereus* qui sont connues pour avoir deux cotés bivalents, vu leurs effets à la fois très utile (exemple de *B. thuringiensis*, agent de lutte biologique) et en même temps pathogène voire même fatal (*B. anthracis* et *B. cereus*) (Daffonchio *et al.*, 2000; Raddadi *et al.*, 2009, 2010).

Plusieurs espèces de ce groupe sont économiquement très importantes et sont utilisées pour la production de plusieurs molécules d'intérêts alimentaire, pharmaceutique, environnementale et agricole (Schallmey *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Vary *et al.*, 2007;

Coutte et al., 2010; Eppinger et al., 2011; Huang et al., 2011; Pérez-García et al., 2011; Sheremet et al., 2011; Yamashiro et al., 2011; Zhang et al., 2011a).

Les espèces de *Bacillus spp* sont des micro-organismes industriels attrayants pour une variété de raisons, y compris leur forte croissance (taux important) à court temps de cycle de fermentation, leur capacité à sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire et leur statut GRAS (généralement considérés comme sûrs ; Generally Recognized As Safe) car elles ont l'avantage d'être non pathogènes et sont inoffensives pour l'homme (*Adams et Marteau, 1995*).

Ces dernières années un intérêt croissant est porté aux espèces halophiles appartenant à ce groupe.

L'adaptation de leurs métabolismes leur a permis de développer des propriétés uniques et désirables en biotechnologie.

I.5 Intérêts biotechnologiques des *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien présentant un intérêt crucial en biotechnologie. Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour produire des molécules qui ont divers applications industrielles.

Il s'agit notamment de la production industrielle d'enzymes. En effet, plus de deux tiers d'enzymes produites industriellement par des bactéries impliquent les *Bacillus* (*Devine, 1995*).

Les bactéries du genre *Bacillus* produisent les enzymes comme les protéases intra et extracellulaires, qui sont l'une des classes d'enzymes les plus intensivement étudiées et largement appliquées dans les processus industriels (**Gupta et al., 2002**). Les protéases sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires et pharmaceutiques, dans les industries de tannage de cuir et dans la gestion des déchets (**Karbalaei-Heidari et al., 2009**). *B. safensis* par exemple est reconnue pour produire les protéases et bien d'autres enzymes comme les lipases et cellulases (**Agbaje et al, 2016**).

Les *Bacillus* sont également impliquées dans la production de métabolites primaires tels que les vitamines et les ribonucléosides; des métabolites secondaires comme les bactériocines et les biosurfactants.

En effet, les biosurfactants produits par les *Bacillus* spp. sont utilisés dans l'industrie pétrolière, pharmaceutique et alimentaire.

Ces biosurfactants peuvent être des glycolipides, des lipopeptides, des lipopolysaccharides et des glycoprotéines (**Makkar RS et al., 2011**).

Parmi ces derniers, les lipopeptides sont les meilleurs comprenant entre autres la surfactine, l'iturine, la fengycine, la lichenysine, la mycosubtiline et bacilomycine (**Maier RM, 2003**).

Les lipopeptides sont connus pour avoir des activités antibactériennes, antivirales, et permettent également de lutter contre les tumeurs (**Cameotra et al., 2004**). Il a été clairement démontré que les biosurfactants ont des applications thérapeutiques intéressantes, avec notamment la surfactine qui est le lipopeptide le plus étudié (**Stein T., 2005**).

Elle est en particulier attrayante pour plusieurs applications médicales. Ses activités biologiques ont été démontrées comprenant l'inhibition de la fibrine dans la formation des caillots et donc constitue un moyen de lutte contre les maladies cardiovasculaires comme les thromboses, elle a aussi des activités antivirale, anti-inflammatoire et antitumorale (**Rodrigues et al., 2006**). Il a été rapporté que *B. pumilus* produit aussi la surfactine (**Slivinski et al., 2012**), ce qui supposerait que cette bactérie ait aussi des propriétés dans les applications thérapeutiques.

Certaines souches de *B. pumilus* possèdent des propriétés probiotiques pour l'humain et

les animaux et peuvent également éliminer les insectes nuisant aux plantes (**Perez et al., 2011**). Cette bactérie pourrait servir dans la formulation des biopesticides. *B. safensis* est connue pour produire les nanoparticules ayant des propriétés anticoagulantes, anti-thrombotiques et permettent de lutter contre les candidoses (**Agbaje et al., 2016**).

Ces capacités uniques de *B. safensis* font d'elle un candidat idéal pour diverses applications biotechnologiques (**Lateef et al., 2015**). Ainsi, elle est applicable en tant que bactérie favorisant la croissance des plantes (**Kothari et al., 2013**), mais également comme probiotique (**Nath et al., 2012a**).

Les *Bacillus* spp sont les principaux acteurs de la fermentation des feuilles de manioc (Voudibio, 2016).

En effet, la présence des *Bacillus* du groupe I constitue un avantage du fait qu'elles réduisent la toxicité des feuilles de manioc (**Kobawila et al., 2005**) par l'élimination de 70% des glucosides cyanogéniques après fermentation, améliorant ainsi la qualité hygiénique et organoleptique de cet aliment (**Louémbé et al., 2003**). Ces souches de *Bacillus* ont également présenté des bons profils fermentaires et probiotiques, elles peuvent ainsi être utiles pour constituer un ferment destiné à la bioconversion des feuilles de manioc (**Vouidibio, 2016**).

Chapitre I :

Généralités sur actinobacteries

Chapitre I : Généralités sur actinobacteries

I.6 Les Actinobacteries :

Les actinobactéries constituent un groupe bactérien très varié, dont l'appartenance à un genre donné est très délicate à établir. Pour séparer ces microorganismes avec une grande précision en groupes et genres différents pour les identifier jusqu'au niveau de l'espèce ou de la souche, un ensemble de données phénotypiques et génotypiques doivent être rassemblées, en reposant sur les techniques classiques qui sont l'étude de la culture, de la morphologie, de la physiologie, de la chimiotaxonomie et les méthodes génotypiques (Silini, 2012 ; Zerizer, 2014).

I.7 Classifications des actinobactéries :

Les actinomycètes ou actinobactéries appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes (LARPENT, 2000). Selon la classification présentée dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ils sont rattachés au phylum des Actinobacteria, à la classe des Actinobacteria, à la sous classe des Actinobacteridae, et l'ordre des Actinomycetales crée par Buchanan en 1917.

Le phylum « Actinobacteria » représente l'une des plus larges unités taxonomiques parmi les 18 lignes majeurs connues actuellement dans le domaine des bactéries (Barka et al., 2016).

Le phylum Actinobacteria (bactéries à Gram positif et G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « Actinobacteria ».

En 1997, Stackebrandt et al ont collecté toutes les séquences de l'ADN/ARNr 16S disponibles pour les membres d'Actinomycètes et en se basant sur l'analyse phylogénétique, ils ont proposé d'établir la classe « Actinobacteria » qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80 % de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S. Cette proposition ne change pas les descriptions courantes des espèces et des genres. En effet, leur classification est basée sur des caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques ou physiologiques, a été vérifiée pendant ces 20 dernières années. Elle est en accord avec le regroupement phylogénétique basé sur l'ADNr/ ARNr 16S (Kiel, 2009; Aouar, 2006). Cette classe est divisée en 5 sous-classes (Tableau 6) : Acidimicrobidae, Rubrobacteridae, Coriobacteridae, Sphaerobacteridae, Actinobacteridae.

Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des Actinobacteridae, l'ordre des Actinomycetales est subdivisé en 10 sous-ordres : Actinomycineae, Micrococcineae, Corynebacterineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae, Streptosporangineae, Frankineae et Glycomycineae (Stackebrandt et al., 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2000).

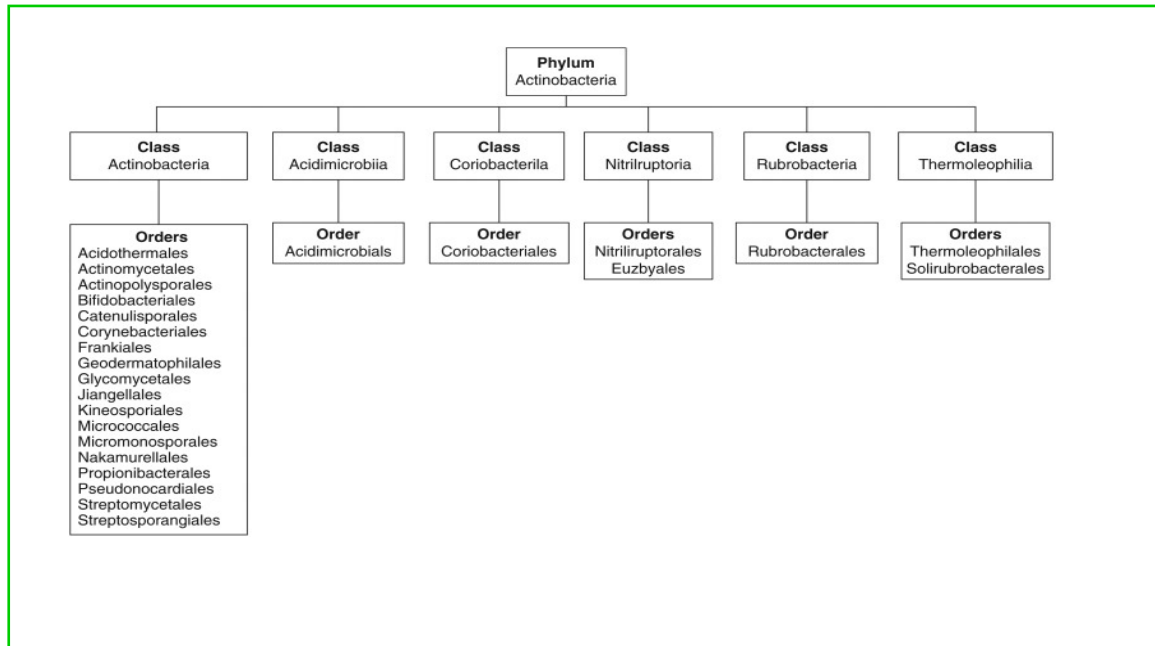


Figure 2 : Classification des Actinobacteries selon (Paul A. Lawson)

Livre « Les bifidobactéries et organismes apparentés Biologie, Taxonomie, Applications 2018, Pages 1-8. »

I.8 Morphologie :

Chez les actinomycètes, on peut rencontrer en plus des filaments ramifiés, des bacilles et aussi des coccobacilles comme *Rhodococcus* et *Mycobacterium* (Avril et al., 1992). La plupart des genres sont des bâtonnets, non sporulant, de forme irrégulière, Ces bâtonnets peuvent être droits ou légèrement incurvés (Prescott, 2003). Le mycélium des actinomycètes est varié morphologiquement, On rencontre le mycélium rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), le mycélium fugace, qui se fragmente (certaines *Nocardia*), et enfin le mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*. (Djaballah, 2010) Les mycéliums fragmentaire et permanent sont illustrés sur la figure.

Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif et/ou en mycélium aérien (Djaballah, 2010).

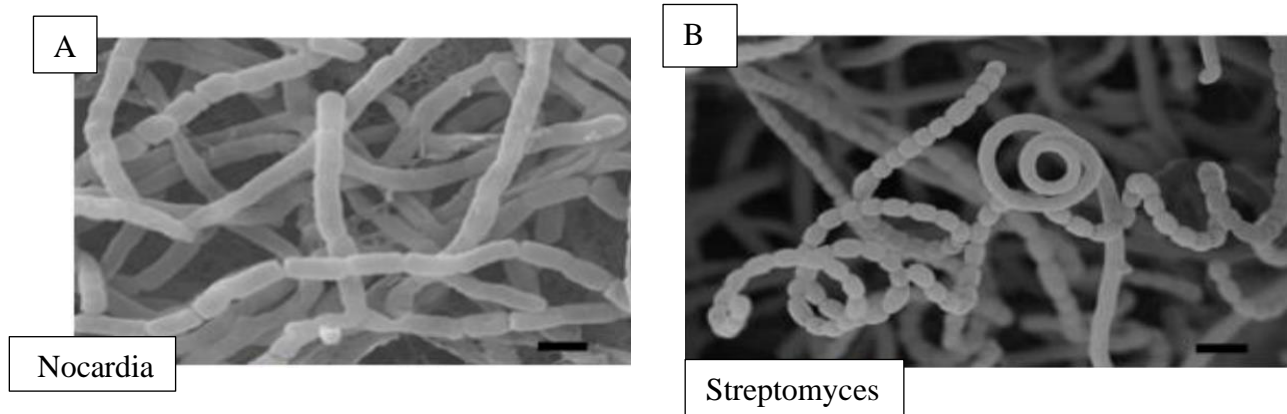


Figure 3 : Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1 µm (Belyagoubi, 2014)

I.9 Mycélium végétatif :

Le mycélium végétatif est appelé aussi mycélium primaire, mycélium de substrat ou mycélium intra-matriciel, c'est un ensemble de filaments multi-nucléaires formés à partir du tube germinal (hyphe) issue d'une spore. Cette hyphe s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises. Son développement, sur la surface et à l'intérieur du milieu solide, donne naissance à des jeunes colonies, formées par des filaments attachés en matrice complexe (Miguelé et al., 2000).

I.10 Mycélium aérien :

Le mycélium aérien est appelé aussi mycélium secondaire, il se forme lorsque la colonie sera plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches spécialisées qui se développent loin de la surface de la colonie en donnant un mycélium reproductif dans l'air. Contrairement à celui du substrat, le mycélium aérien est plus épais et peu ramifié, il est protégé par sa paroi hydrophobe et peut se développer sur milieu pauvre en sources nutritionnelles, dans la plupart des cas, par la dégradation du mycélium de substrat dont les produits assurent un apport de nutriments pour sa croissance loin de la colonie (Miguelé et al., 2000).

I.11 Les Spores :

Les hyphes aériens des actinomycètes subissent une série de changements développementaux qui donneront naissance aux spores (Wildermuth et Hopwood, 1970; Williams et al., 1972; Miguelé et al., 2000). Elles se développent par septation des extrémités du filament, habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs. La

plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative (Prescott et al, 2003). Les conidies (ou spores asexuées, qui sont des chlamidiospores ou des sporangiospores non intercalaires) d'actinomycètes présentent une grande variété d'arrangements. Les spores peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînettes (*Actinomadura*), ou en longues chaînettes (*Streptomyces*) (**Fig4**). Ils peuvent être rassemblés dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. Elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. On rencontre également une importante diversité au niveau de la surface des spores : lisse, ridée, avec piquants ou d'aspect velu (**Fig 5**).

Chez certains genres, les spores sont contenues dans un sporange (Belyagoubi, 2014).

Des exospores naissent de la formation de parois transversales à partir des hyphes existantes. Une subdivision supplémentaire est également réalisée selon la présence ou l'absence d'une enveloppe qui recouvre la paroi de l'hyphe sporogène (Kitouni, 2007). Les endospores naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles et sont semblables, morphologiquement et chimiquement, à celles des *Bacillaceae*. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. La germination des spores est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative. Trois événements distincts sont décrits : L'activation, L'initiation, L'émergence du tubegerminal et en fin la croissance (Djaballah, 2010).

Un sporange est un compartiment qui se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore (Belyagoubi, 2014). Il peut être rencontré sur le mycélium aérien ou à l'intérieur du milieu solide (Holt et al., 1994).

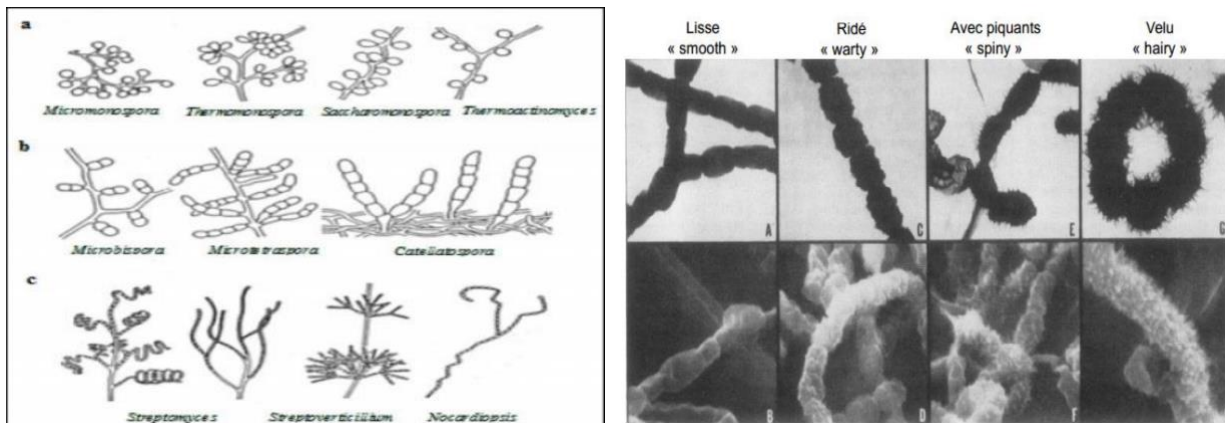


Figure 4 : *Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes (Larpen et Sanglier, 1989) a: sur le mycélium secondaire, b: sur le mycélium primaire, 1: spores nombreuses, 2: spores en nombres limités*

I.12 Ecologie :

Les actinobactéries sont largement répandues dans le monde (Theilleux, 1993). Elles sont adaptées à divers milieux écologiques (Goodfellow et Williams 1983).

Ces bactéries peuvent être présentes dans les eaux douces ou salines, dans l'air et surtout dans le sol. (Loqman, 2009). De plus, Certains genres ont été isolés à partir de composts, tel que *Thermoactinomyces* (Lacey, 1997 ; Song et al., 2001).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols avec un pourcentage de 80 à 95% du total des actinomycètes (Lacey, 1973 ; Elwan et al., 1985).

Enghusen (1956) explique l'abondance de ce genre par la résistance à la dessiccation de ses spores qui dure plus de trois ans (Waksman, 1959). Les genres *Nocardia* et *Micromonospora* sont aussi fréquents (Dommergues et Mangenot, 1970).

I.13 Rôle dans la nature :

Les actinomycètes ont un rôle dominant au sein des écosystèmes, Leur fonction écologique principale est la décomposition des substances organiques (Prescott et al., 2010). Ils ont une capacité importante à produire une large gamme d'enzyme hydrolytique, comme les protéases, les nucléases, les lipases...etc (Prakash et al., 2012). D'autres enzymes sont également produites par ces microorganismes il s'agit principalement des enzymes pour l'hydrolyse des sucres complexes ou même la dégradation de la carapace chitineuse des cadavres d'insectes (Maier & al, 2009).

Les actinomycètes font partie des relations symbiotiques au niveau de la rhizosphère, notamment avec les racines des plantes, en contribuant à la croissance de ces derniers par des effets directs et indirects (Barreto et al., 2008). Les effets directs se résument dans la solubilisation du phosphate, la fixation d'azote et la production de phytohormones, (El-Mehalawy & al, 2004). Par ailleurs, les effets indirects peuvent être liés à la production des métabolites secondaires au bénéfice des plantes, comme les antibiotiques qui contribuent à la lutte contre les agents pathogènes (Barreto et al., 2008). Ils peuvent limiter la prolifération de ces derniers par la compétition nutritionnelle (Getha et al., 2005).

Chapitre II : les enzymes du Genre *Bacillus et actinobacterie*

Chapitre II : les enzymes du genre *Bacillus*.

Le genre *Bacillus* est connu pour sa capacité de produire une large gamme d'enzymes comme (les protéase, gélatinase, pectinase, amylase, cellulase ...)

II.1 Définition des enzymes

Une enzyme est une protéine capable d'accélérer les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Elle appartient à la famille des catalyseurs. Elle agit sur la vitesse de réaction mais ne change pas avec cette dernière. Une enzyme, toute comme une protéine est synthétisée par les cellules vivantes à partir des informations codées dans l'ADN. Il existe plus de 3500 enzymes (**Drouin, 2005 ; Robinson, 2015**).

II.2 Nomenclatures et classifications des enzymes :

Le premier schéma de nomenclature enzymatique a été présenté au Congrès international de Biochimie en Bruxelles, où « La Commission Enzymatique (CE) » a été définie ; en 1961 la première version a été publiée. En 1992, l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire a publié la sixième édition comprenant 3196 enzymes différentes (**De souza Vandenberghe et al., 2020**). La classification des enzymes suit le numéro EC. Elles sont classées selon les réactions catalysées où le nom correspond à une seule protéine enzymatique et peut également être liée à un groupe de protéines ayant la même propriété catalytique. Six classes d'enzymes ou six niveaux d'EC ont été définis, y compris les oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases. En août 2018, EC a inclus une septième enzyme catégorie (EC 7), qui regroupait les translocases (**De souza Vandenberghe et al., 2020**).

La classification des séquences d'enzymes et structures a été soutenue par des modèles évolutifs et biophysiques, ce qui a permis la connaissance de séquence et similitude structurelle.

Le Numéro d'EC, est composé de quatre (4) chiffres :

- Premier nombre indique la classe de l'enzyme ;
- Deuxième nombre donne la sous-classe ;

- Troisième numéro indique la sous-sous-classe ;
- Quatrième numéro est le numéro de série de l'enzyme dans sa sous-sous-classe.

II.3 Sources d'enzymes

L'étape initiale de la production de toute enzyme concerne le choix de la source. Dans certains cas où l'activité catalytique souhaitée n'est disponible que dans une source unique, bien que dans la plupart des cas où l'activité souhaitée peut être obtenue à partir de plusieurs sources (**Walsh et Headon, 1994**). De nombreuses protéines sont obtenues à partir de microorganismes. Un nombre limité de microorganismes sont considérés comme des producteurs appropriés des protéines destinées à des fins appliquées.

Les microorganismes les plus fréquemment utilisés comme producteurs d'enzyme comprennent des bactéries et des champignons, Les microorganismes représentent une source attrayante d'enzymes car ils peuvent être cultivés en grande quantité dans un délai relativement court selon les méthodes de fermentation (**Walsh et Headon, 1994**). Les autres sources d'enzymes peuvent être végétales ou animale.

II.4 Les activités enzymatiques

II.4.1 Les enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). 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 au niveau extracellulaire et intracellulaire (**Kumar et al., 2008b**).

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (**Pelmont, 1995**). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (**Kumar et al., 2008a**).

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (**Sandhya et al., 2005**). Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures (**Devi et al., 2008**). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (**Sandhya et al., 2005**).

II.4.2 Caractéristiques des protéases microbiennes

Les microorganismes vivent dans un environnement où les nutriments disponibles sont sous forme macromoléculaires (protéines, lipides et glucides), ils doivent donc les convertir en plus petites molécules. La décomposition de ces macromolécules est accomplie par l'action de différents types d'enzymes.

Les protéases sont des classes d'enzymes les plus importantes qui convertissent les protéines complexes en peptides plus petits ou en acides aminés (**Banerjee et Ray, 2017**). Celles produites par des sources microbiennes sont classées en groupes selon leurs propriétés acides ou basiques. Elles sont également classées en fonction de la présence de groupes fonctionnels et la position de la liaison peptidique.

Un grand nombre de protéases intracellulaires sont produites par des microorganismes jouant un rôle vital dans la différenciation, le renouvellement des protéines, la régulation hormonale et le groupe de protéines cellulaires.

Quant aux protéases extracellulaires, elles sont importantes dans l'hydrolyse des protéines, par exemple dans le traitement des films photographiques, la synthèse enzymatique sur la base de solvant et de détergents, dans la tolérance thermique et la production d'hydrolysats de zéine. Les enzymes protéolytiques trouvées dans les microorganismes et les systèmes mammaliens sont de petites tailles, denses et structurellement sphériques.

Habituellement, les protéases alcalines extracellulaires sont sécrétées par le producteur dans le bouillon liquide à partir duquel ces protéases sont purifiées pour obtenir un produit final.

En comparaison, les protéases produites par les plantes et les animaux demandent plus de travail que les protéases produites par les microorganismes (**Razzaq et al., 2019**). Ces enzymes rentrent dans la régulation de plusieurs réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tel que la décomposition des lipides et des glucides.

Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnelles) (**Réginald, 2000 ; Bedykt et Katarzyna, 2008**).

II.5 Types de protéases microbiennes

II.5.1 Protéases alcalines

Le genre *Bacillus* est un producteur essentiel de la protéase alcaline (EC 3.4.21-24.99), commercialement importante qui est active à un pH alcalin compris entre 9 et 11.

Ces producteurs de protéases alcalines sont distribués dans l'eau, le sol et les conditions hautement alcalines. L'industrie des détergents consomme le plus de protéases alcalines, qui sont des protéases à sérine dont le pH est alcalin.

Les protéases alcalines sont uniques par leur activité et maintiennent un pH alcalin constant tout en étant exploitées pour différentes formulations dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et autres. Un large éventail d'applications de ces protéases alcalines fait l'objet d'une plus grande attention des chercheurs dans l'espoir de découvrir de nouvelles souches avec des propriétés uniques et une activité substantielle.

Deux types essentiels de protéases alcalines telles que la subtilisine Carlsberg et la subtilisine novo, sont obtenues à partir de *Bacillus* Sp. qui peuvent être utilisées comme enzyme industrielle pour produire des hydrolysats de zéine.

Dans les sources halophiles, différentes espèces microbiennes sécrétant des protéases alcalines à base de sérine sont également rapportées.

Une souche de *Salinivibrio* Sp., AF2004, produit une protéase de type métallo avec une tolérance thermique raisonnable et une large gamme de pH (5 - 10). Il s'agit d'une souche hautement recommandée en raison de ses propriétés thermiques et halophiles.

Une autre souche, *Bacillus clausii*, est également recommandée pour une utilisation à l'échelle commerciale pour la production de protéase alcaline avec l'utilisation de peptone, et du fructose comme seule source d'énergie. Le pH optimal et la température recommandés sont de 8 - 9 et 37-40°C respectivement (**Razzaq et al., 2019**).

II.5.2 Protéase acide

Les protéases acides sont stables et actives entre pH 3,8 et 5,6 et sont fréquemment utilisées dans la sauce soja, les hydrolysats de protéines, les aides digestives et dans la production d'assaisonnements. Le pH optimal des protéases acides est de (3 à 4) et le point isoélectrique (PI) se situe entre 3 et 4,5 avec un poids moléculaire de 30 à 45 kDa.

En comparaison aux protéases alcalines, ces protéases acides extracellulaires sont principalement produites par des espèces fongiques, comme *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus saitoi*. La plupart des protéases acides extracellulaires fongiques sont connues sous le nom d'opepsines d'*Aspergillus*. Les protéases aspartiques sont des protéases acides constituées de 380 à 420

longues chaînes de résidus d'acides aminés constituant le site actif pour l'activité catalytique. Ces protéases acides sont des endopeptidases et sont regroupées en trois familles : pepsine, rétropepsine et enzymes des para rétrovirus.

Une grande spécificité des protéases acides se manifeste contre les résidus d'acides aminés aromatiques situés des deux côtés de la liaison peptidique. Ces résidus d'acides aminés aromatiques avec des liaisons peptidiques sont similaires à la pepsine mais moins rigoureux dans leur action.

De manière générale, les protéases acides sont divisées en deux groupes : les enzymes de type pepsine et les enzymes de type rénine produites par *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Endothia* et *Mucor* (Razzaq et al., 2019).

II.5.3 Protéases neutres

Les protéases neutres sont définies telles qu'elles sont et sont actives à un pH allant de 5 à 8. La plupart des protéases neutres appartiennent au genre *Bacillus* et ont une thermotolérance relativement faible.

Elles génèrent moins d'amertume lors de l'hydrolyse des protéines alimentaires en raison d'une vitesse de réaction moyenne ; elles sont donc précieuses dans les industries alimentaires.

La neutrase est incorporée dans l'industrie brassicole en raison de son insensibilité aux inhibiteurs de protéinase des plantes. Sur l'affinité élevée pour les acides aminés hydrophobes, les protéases neutres sont identifiées et caractérisées. Pendant la production d'hydrolysats alimentaires, il est légèrement avantageux de contrôler la réactivité des protéases neutres en raison de leur faible résistance à la chaleur. Un ion métallique divalent est nécessaire pour l'activité des protéases neutres appartenant au type métalloprotéase (Razzaq et al., 2019).

II.6 Les différentes classes de protéases et leurs mécanismes d'action

II.6.1 Les protéases à sérine

A. Propriétés

Les protéases à sérine possèdent un groupe sérine sur leur site actif. Elles sont abondantes et largement répandues parmi les virus, bactéries et eucaryotes, ce qui suggère leur importance vitale pour les organismes. Les protéases à sérine sont inactivées par les esters de

phosphate organiques qui acylent le résidu actif de la sérine. Les protéases à sérine sont généralement actives à pH neutre et alcalin, ayant un optimum entre 7 et 11 (Chander, 2019).

B. Mécanismes d'action

Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine à une telle façon que le groupement carbonyle soit proche de la sérine (figure 2). Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine prend le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se met en place, ensuite l'enzyme est désacylée et l'extrémité C-terminale est cédée (Lopez, 2008).

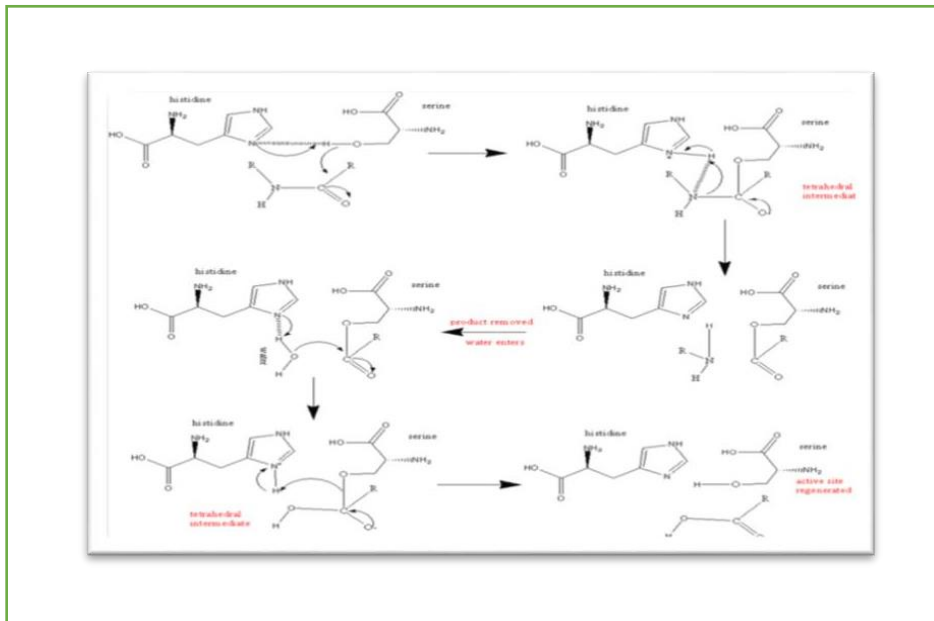


Figure 5 : Mécanisme d'action des protéases à sérine (Snellios, 2006)

II.6.2 Protéase à cystéine

A. Propriétés

Les protéases à cystéine sont présentes aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Elles possèdent de la cystéine dans leur site actif et ont un pH optimal compris entre 6 et 8. Elles sont activées par des agents réducteurs tels que l'acide cyanhydrique et sont inhibées par des agents oxydants. Elles sont sensibles à l'agent thiol (SH) mais ne sont pas affectés par le DFP et les agents chélateurs de métaux. L'activation par les agents réducteurs est due à la régénération du groupe SH.

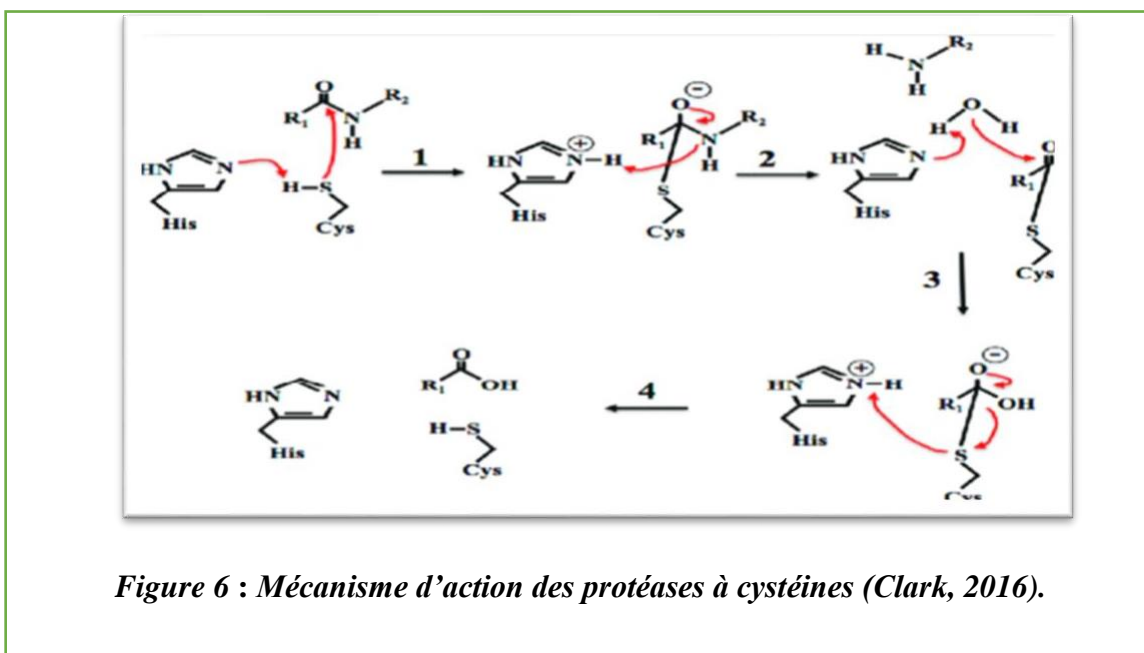
Leur température optimale se situe entre 50 et 70°C (Chander, 2019).

B. Mécanismes d'action

Le mécanisme catalytique primordial des protéases à protéase est la déprotonisation d'un groupement thiol dans le site actif de l'enzyme qui est effectué par un acide aminé adjacent possédant une chaîne latérale basique (parfois c'est une histidine) (Figure7).

Le deuxième mécanisme consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupement carbonyle du substrat.

Au cours de cette étape, un fragment du substrat est libéré du coup l'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme déprotonisée et un intermédiaire thiolester lie l'extrémité carboxy-terminale du substrat à la cystéine. La liaison de thiolester est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (Lopez, 2008).



II.6.3 Les protéases aspartiques

A. Propriétés

Ces protéases sont largement répandues dans les cellules des animaux, des levures et des moisissures, mais on les trouve rarement dans les bactéries.

Elles sont communément appelées protéases acides et possèdent des résidus d'acide aspartique sur leur site actif. Elles présentent une spécificité envers les résidus d'acides aminés aromatiques ou volumineux des deux côtés de la liaison peptidique et ont des pH optimal 5 compris entre 3 et 4 les protéases aspartiques sont inhibées par la pepstatine.

Les protéases aspartiques microbiennes sont encore divisées en deux groupes, produits par les moisissures et les levures : protéases de type pepsine et protéase de type rénine

(Chander, 2019).

B. Mécanismes d'action

Leurs mécanismes d'action est généralement de type acide-base, basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif (Figure 8).

Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbone carbonyle du substrat dans la liaison à cliverdonnant alors un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (Lopez, 2008).

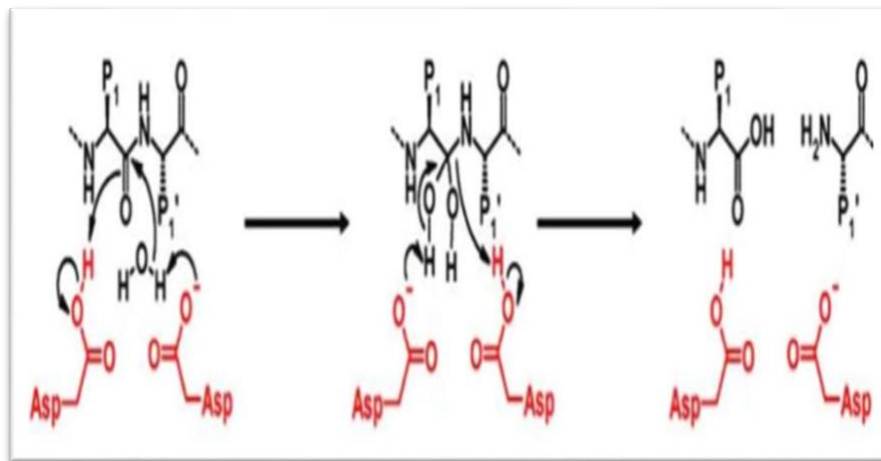


Figure 7 : Mécanisme d'action des protéases à aspartique (Mandujano-González et al., 2016).

II.6.4 Métallo protéases

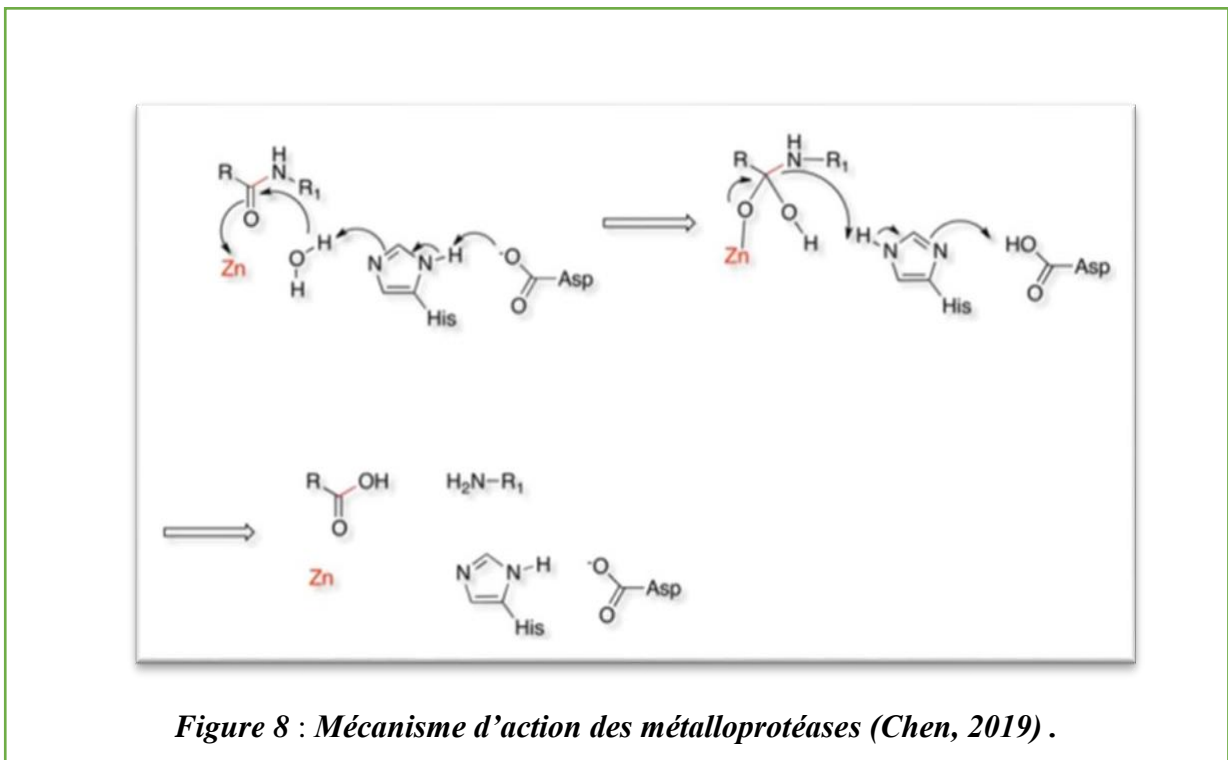
A. Propriétés

Les métalloprotéases sont les plus diversifiées des types catalytiques de protéases. Elles sont caractérisées par le besoin d'un ion divalent pour leur activité. Ces enzymes sont sensibles aux agents chélateurs mais insensibles aux agents sulfhydriques, les esters de phosphate ont un ion métallique impliqué dans leur mécanisme catalytique. Les protéases neutres et alcalines de nombreuses sources microbiennes appartiennent à ce groupe d'enzymes (Chander, 2019).

B. Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action des métalloprotéases (Figure 5) se fait en trois étapes :

- L'histidine est rendu plus basique grâce à l'acide aspartique (protéase à sérine).
- L'histidine active une molécule d'eau. La molécule d'eau à son tour attaque la liaison peptidique.
- Le zinc stabilise l'état intermédiaire SP3 et négatif (stabilisation de l'oxyanion). La partie C- terminale se dissocie et le proton de l'histidine est transféré vers l'azote de la liaison peptidique.
- L'azote N-terminal est basique, le groupe carboxylique C-terminale est acide et comme la réaction est rapide, il y a échange de protons entre les deux groupes (**Lopez,2008**).



II.7 Les enzymes Amylytiques

Les amylases sont des enzymes capable d'hydrolysées les molécules d'amidon en une variété produits comprenant des dextrines et des polymères composés de plus petits d'unités de glucose qui donne un sirops riches en fructose, en glucose et en maltose

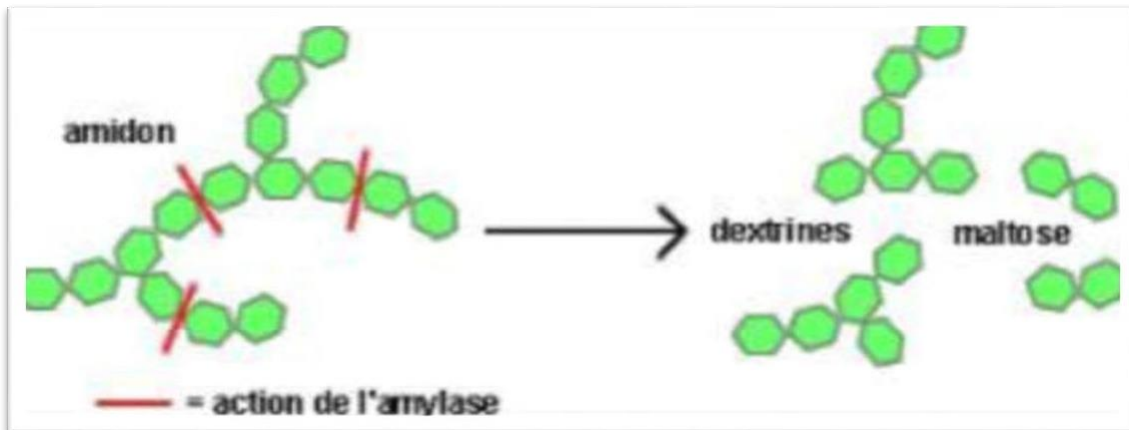


Figure 9 Mode d'action de l'*alpha*-amylase (Florimont, 2013 in Meziani et Mahcene, 2017)

Ces enzymes amylytiques sont capables d'hydrolysées l'amidon (amylose et amylopectine) et ses produits de dégradation sont dextrine, oligosaccharides.

Les amylases jouent un rôle majeur dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et le textile. Dans l'industrie papetière environ 25% des amylases sont demandées sur le marché mondial des enzymes, les amylases peuvent provenir de plantes, d'animaux et de microbes.

Les enzymes d'origine microbienne répondent généralement à une forte demande dans les industries (Janaki, 2017).

II.8 Les enzymes cellulolytiques

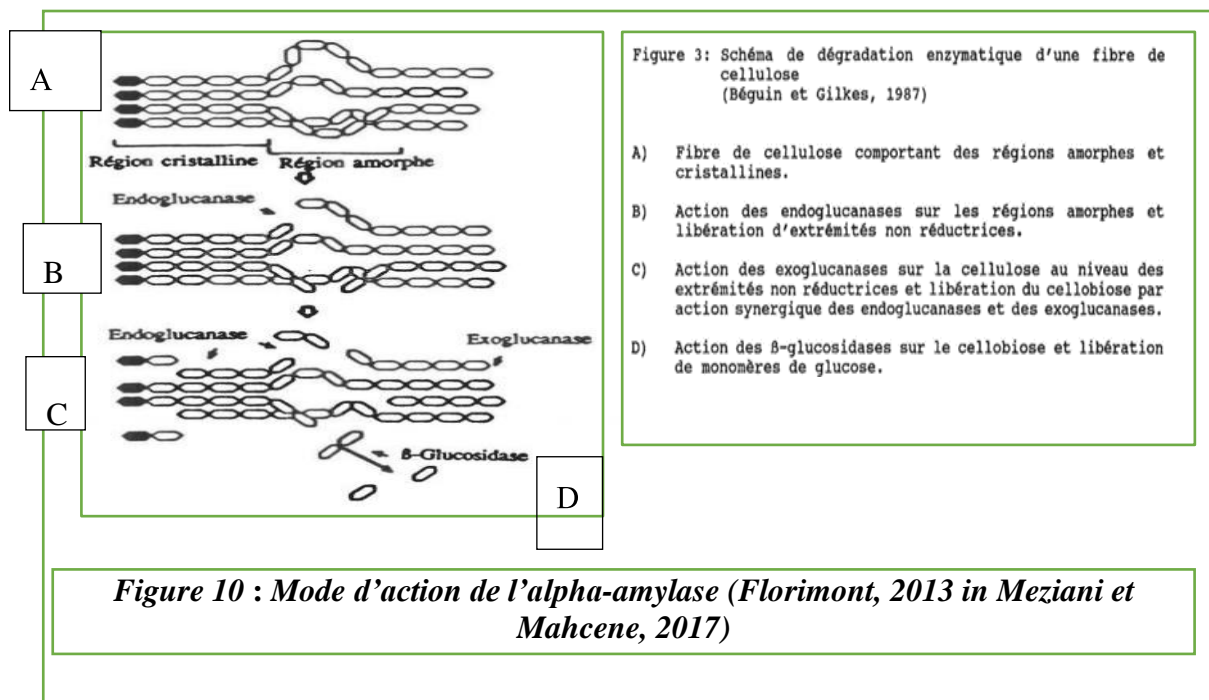
Les cellulases se rapportent à un groupe d'enzymes qui agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (Korish, 2003).

C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes :

- Endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase,
- Exo β (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase,
- β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (Wang et al.,2002).

Actuellement la biotechnologie des cellulases occupe environ 20 % du marché mondial de enzymes (Bhat, 2000; Lekchiri et al., 2006). Les cellulase produits par les champignons filamenteux présentes plusieurs intérêts en industrie agro-alimentaire les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques manipulées par cetype d'industrie (Scriban, 1993).

Les cellulases sont employées dans l'industrie du textile pour donner l'aspect aux vêtement en jean après lavage (Gusakov et al., 2000), aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pourramollir les tissus (Aygan et Arikian, 2008).L'addition de cellulases aux suspensions de pâtes (encours de lavage) ou en suspension de pâtes de papiers de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1999).



II.9 Les Lipases

Les lipases caractérisées par leur stabilité et leur activité dans les solvants organiques sont des biocatalyseurs importants, particulièrement adaptés pour des applications industrielles (**Schmidt *et al.*, 2004**).

Elles sont utilisées pour le développement de saveur pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat du lait et bonbons) (**Najjar, 2010**) et elles interviennent dans la maturation des fromages (**Hasan *et al.*, 2006**).

Leur utilisation dans les détergents (Lessives ménagères) est le champ d'application le plus important des lipases (**Jaeger et Reetz, 1998**). Les lipases sont largement mises en œuvre dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse des Médicaments (**Jaeger et Eggert, 2002**).

II.10 Les Pectinases

Les enzymes pectinolytiques « pectinases » constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine, (Tatiana et Flevo, 2005).

Elles sont essentiellement d'origine microbienne. Les pectinases sont utilisées plus particulièrement en industrie agro-alimentaire (industrie des jus de fruit et industrie oléicole) (Lang et Dornenburg, 2000), ces enzymes sont utilisées dans la dégradation des macromolécules pectiques qui restent en suspension à la suite de pressage de fruits (Thibault et Petit, 1979; Larpent-Gourgaud et Sangler, 1992), aussi en industrie du textile et du papier (Lang et Dornenburg, 2000).

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1 Description du site de prélèvement

La plage de Sidi Mejdoub est située au pied du mausolée Sidi el Mejdoub situé lui-même au nord-est de la ville de Mostaganem, à environ 3 km à l'est du port de Mostaganem. De nombreuses maisons entourent cette zone qui est aussi fréquentée par la population presque toute l'année en raison de sa facilité d'accès aux touristes.



Figure 11 : position de la plage de sidi Mejdoub, Mostaganem sur Google Maps



Figure 12 : Plage de Sidi

I.2 Prélèvement d'échantillon :

Un échantillon de sable mouillé par les vagues de mer a été prélevé de la plage de Sidi Mejdoub (Mostaganem) le 24 Avril 2023. L'échantillonnage de ce sable humide a été réalisé à quelques centimètres de profondeur à l'aide d'une petite pelle de jardin désinfectée. Les échantillons ont été placés dans un récipient en plastique, étiqueté et transporté directement au laboratoire pour analyse.

I.3 Isolement des bactéries du genre *Bacillus*

10 g de sable de mer humide ont été suspendus dans 90ml d'eau physiologique. Le flacon est alors mis en agitation, puis une série de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-4}) est effectuée. Les différentes dilutions sont soumises à un traitement thermique dans un bain marie à 80°C pendant 30 min, avant l'ensemencement sur le milieu GN. Ce prétraitement permet de

tuer les formes végétatives et l'isolement sélectif des formes sporulés des *Bacillus* (Zhao *et al.*, 2013). Dans une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive, 0,1 ml de chaque dilution est déposé et étalé avec un étaleur stérile. Après l'ensemencement les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48h.

I.4 Purification

Après incubation, l'aspect des colonies des *Bacillus* ayant poussés sur les milieux de cultures est examiné selon leurs caractères macroscopiques ensuite purifiés sur un milieu de gélose nutritive.

I.5 Identifications des isolats

Pour cette étude, 12 isolats de *Bacillus* et une actinobactérie originaire aussi de sable de mer de la plage de Sidi Mejdoub ont été retenus pour faire l'objet d'une identification par des examens macroscopiques et microscopiques et par l'étude de quelques caractères biochimiques. 2 souches de référence : *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Bacillus cereus* ATCC 11778 fournis

par le laboratoire de microbiologie et biologie végétale ont été inclus dans cette étude.

1.6 Étude macroscopique :

L'examen macroscopique des cultures isolées est le premier aspect de l'identification. Il consiste à observer directement à l'œil nu et à la loupe binoculaire (4×10 Zeiss 475022), les colonies obtenues sur gélose nutritif après 24 à 48 heures d'incubation (Ripert., 2013).

Les critères suivants ont été pris en compte : **la taille, la forme des colonies, le relief, le bord, l'aspect, la consistance, la couleur de la culture et de son verso et l'opacité des colonies.**

I.7 Etude microscopique

L'observation microscopique à l'état frais et après coloration de Gram a été effectuée. Elle permet de définir certains caractères morphologiques et organisationnels des bactéries : forme (coque, bacille ou spirale), taille, le mode de regroupement (organisés en chaînette ou isolés), le Gram, la mobilité et la position forme de la spore (Alexandre *et al.*, 2008).

I.8 Coloration de Gram :

Les cultures jeunes, de 24 heures isolées sont fixées sur des lames recouvertes de violet de gentiane pendant 2 mn ensuite une solution de Lugol est ajoutée deux fois pendant 30 secondes, suivi d'une décoloration rapide à l'alcool puis d'un rinçage à l'eau distillée et enfin

une contre coloration par fuchsine pendant une minute. Les lames sont rincées, séchées et observées au microscope optique (Perryet *et al.*, 2004; Camille, 2007).

I.9 Etudes physiologiques :

I.10 Test de catalase :

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir de l' H_2O_2 une libération d'oxygène gazeux selon la réaction : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ (Denis., 2007). A l'aide d'une anse de platine stérile on prélève une colonie bien isolée et on la dépose dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame bien propre.

La présence de la catalase se traduit par le dégagement immédiat de bulles d'oxygène.

I.11 Cytochrome-oxydase :

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Le principe consiste à déposer une colonie de la souche sur un disque imprégné du réactif oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine de couleur rose. La présence de l'enzyme se traduit par un virage de la couleur rose vers un violet noirâtre.

I.12 Tolérance a la salinité :

Afin de pouvoir déterminer l'effet de la salinité sur la croissance des bactéries étudiées, ces isolats ont été ensemencés dans des boîtes Pétri contenant le milieu GN contenant des concentrations de NaCl (à 8% et 6,5%) et incubé à 30°C pendant 24 à 48H (Guiraud, 2003).

I.13 Mise en évidence des activités enzymatiques :

I.13.1 Protéolyse de la gélatine :

La gélatine est un produit protéiné obtenu par hydrolyse partielle du collagène. Ce test est utilisé pour la mise en évidence de l'enzyme gélatinase. Il est étudié sur gélose nutritive additionnée de gélatine à raison de 4g/l. Couler le milieu gélosé à la gélatine en boîte de Pétri, ensemencer en touche ou en stries par anse à la surface du milieu étant bien sec, et incubé à 30°C pendant 24 h. Après l'incubation, verser sur le milieu 1 ou 2ml du réactif chlorure de mercure II (réactif de Frazier) ou de sulfate d'ammonium saturé. Les boîtes

sont inondées par l'un de ces réactifs pour précipiter la gélatine non hydrolysée, ce qui rend les zones claires par hydrolyse de gélatine plus faciles à voir. Les résultats sont souvent observés dans les 5 à 10 minutes après l'inondation l'addition du réactif.

I.13.2 Hydrolyse de la caséine :

La caséine, protéine du lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes ; la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Bacillus*. Le milieu gélose au lait écrémé estensemencé par des stries à partir d'une suspension des souches isolées. L'incubation est réalisée à la température adéquate 30°C pendant 24 heures. Les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat positif. L'absence de telles zones exprime un test négatif (Delarras, 2014).

I.13.3 Hydrolyse de l'amidon :

L'amidon est un polysaccharide, constitué d'amylose et d'amylopectine. La gélose à l'amidon est une gélose nutritive, additionnée de 1% d'amidon. Elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polysaccharide par certaines espèces appartenant notamment au genre *Bacillus*. Les boîtes contenant le milieu sontensemencées par des stries avec les souches à caractériser. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24 heures. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour de chaque colonie l'observation est plus nette en inondant la surface du milieu avec du Lugol (solution iodurée). Zone claire jaunâtre (couleur du Lugol autour des colonies) : amidon hydrolysé test positif. Présence de zone bleue : amidon non hydrolysé (négatif) (Delarras, 2014).

Chapitre II : Résultats et conclusion

Chapitre II : Résultats et conclusion

II.1 Isolements et purifications des isolats :

Après avoir subi un traitement thermique à 80 °C pendant 30 min, les dilutions décimales ont été ensemencées sur une gélose nutritive et incubées à 30C° pendant 48 heures. Des colonies à différents aspect macroscopique ont été obtenus (fig.14 et tableau 3). Les colonies sont majoritairement circulaires, élevées à bords réguliers et crémeuses, de couleur blanc et translucide.



*Figure 12 : Isolement des Bacillus sur milieu GN à partir d'un sable
Mouillé de la plage de sidi Medjdoub*

Tableau 3 Résultats de l'étude macroscopique des isolats de Bacillus et actinobactérie.

Souche	Aspects des colonies						
	Taille	forme	relief	contour	surface	opacité	couleur
BM1	Grosse 10mm	Bord dentelé	Plate	Irrégulier	Lisse brillante	Opaque	Blanc
BM2	Petite 1mm	Ronde	Bombé	Régulier	Lisse brillante	Opaque	Blanc ivoire
BM3	Petite 3mm	Ovoïde	Bombé	Régulier	Lisse brillante	Opaque	Blanc ivoire
BM4	Petite 2mm	Ronde	Bombé	Régulier	Lisse brillante	Opaque	Blanc ivoire
BM5	Grosse 2 cm	Bords dentelé	Plate	Irrégulier	Lisse brillante	Translucide	Blanc
BM6	Grosse 10mm	Bords Dentelé	Plate	Irrégulier	Lisse brillante	Translucide	Blanc
BM7	moyenne 5mm	Ovoïde	Bombé	Régulier	Lisse brillante	Opaque	Blanc ivoire

BM8	Petite 3mm	Ronde	Plate	Irrégulier	Lisse brillante	Opaque	Blanc ivoire
BM9	Petite 4mm	Ronde	Bombé	Régulier	Lisse brillante	Opaque	Blanc
BM10	Grosse 4 cm	Bords dentelé	Plate	Irrégulier	Lisse brillante	Translucide	Blanc ivoire
BM11	Petite 4mm	Ronde	Bombé	Régulier	Lisse brillante	opaque	Beige citron soie
BM12	Petite 4mm	Ronde	Bombé	Régulier	Lisse brillante	opaque	Beige citron soie
ACT	moyenn e5mm	Ronde	Bombé	Régulier	Rugueuse	opaque	Recto : blanc grisée Verso : Jaune Orangée

12 colonies ont été choisies et désignées selon un code composé de lettres et de numéros (de BM1 jusqu'à BM12) ensuite purifiées sur gélose nutritive (fig.15)



Figure 13 Aspect de deux isolats de Bacillus purifiés

L'actinobactérie originaire de sable de mer de la plage de Sidi Mejdoub incluse dans cette étude est caractérisé par un mycélium, blanc jaunâtre qui vire au marron avec le temps. Les hyphes sont ramifiés portant des chaînes de conidies (fig.16).

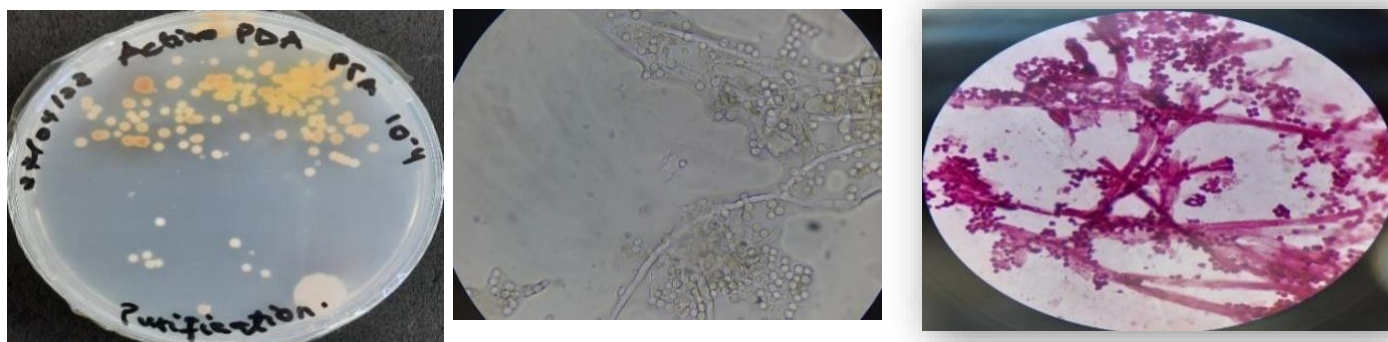


Figure 14 : Morphologie macro et microscopique de l'actinobactérie.

1= Aspect macroscopique 2= observation microscopique à l'état frais

3= observation microscopique après coloration de Gram

II.2 Caractérisations morphologiques et culturelles :

Les résultats de l'observation microscopique à l'état frais, et après coloration de Gram des isolats du genre *Bacillus* sélectionnées à partir de l'eau de mer de la plage de Sidi Mejdoub a révélé que ces des isolats se présente sous forme de bâtonnets, de petites tailles droites. Leurs extrémités arrondies, regroupés sous formes de diplobacilles ou chainettes à Gram positifs (fig17). Avec une endospore ovale, subcentrale, non déformante. D'après (Gugliandolo *et al.*, 2003), les *Bacillus* possèdent la capacité de produire les spores qui vont permettre de résister aux conditions défavorable. Ces cellules ont une forme d'une petite sphère dont la paroi est épaisse.

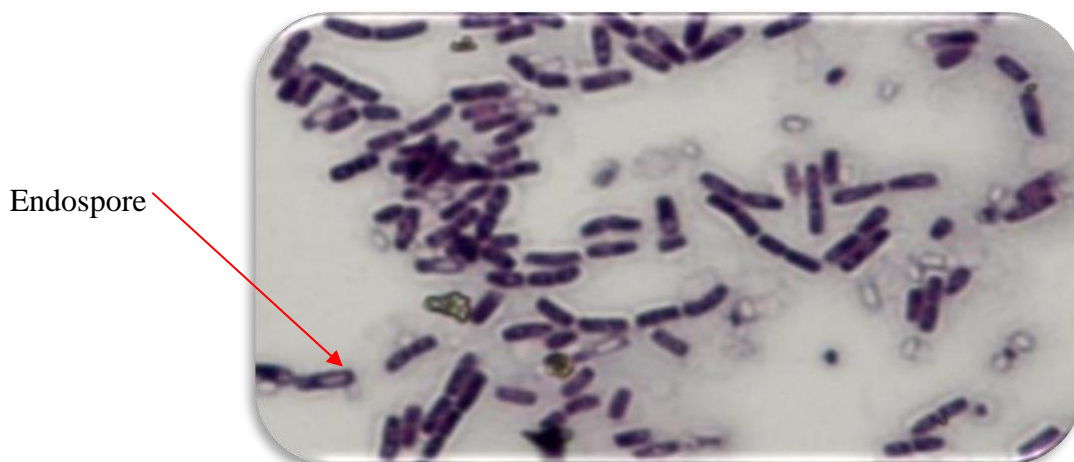


Figure 15 Observation après coloration de Gram de l'isolat BM1 sous microscope G (X100)

L'observation macroscopique et microscopique a révélé que les souches présentent des critères de *Bacillus* qui sont principalement des bâtonnets à Gram positif capables de former des spores.

II.3 Caractères biochimiques :

Tous les *Bacillus* et l'actinobactérie testées pour la production d'une catalase, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se traduit par le dégagement des bulles (Tableau 4 et fig.18). Ces résultats confirment l'aérobiose des bactéries isolées (Oren, 2002). Ces isolats n'ont pas provoqués le virage de N-diméthyl paraphénylène-diamine vers un violet noirâtre ce qui indique l'absence de cytochrome oxydase chez ces isolats.

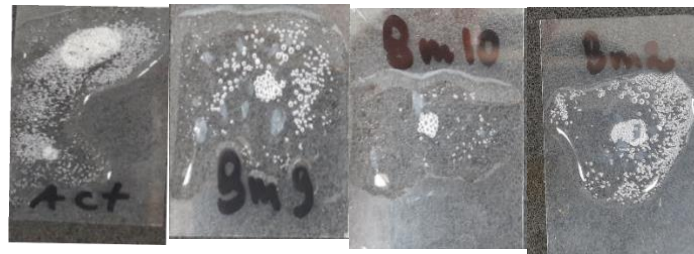


Figure 16 : Test de catalase sur l'actinobactérie (act) et *Bacillus* (BM9, BM10, BM2).

Tableau 4 : Résultats des tests de l'oxydase et de catalase les *Bacillus* et l'actinobactérie de sable de l'eau de mer

Souche	Catalase	Oxydase
Bm1	+	-
Bm2	+	-
Bm3	+	-
Bm4	+	-
Bm5	+	-
Bm6	+	-
Bm7	+	-
Bm8	+	-
Bm9	+	-
Bm10	+	-
Bm12	+	-
ACT	+	-
	(-) absence	(+) présence

II.4 Test de salinité :

Les résultats de croissance des bactéries étudiés dans un milieu GN +6,5% de NaCl et GN+8% de NaCl montrent une croissance dans toutes les boîtes de Pétri. Ceci indique la capacité de ces isolats d'origine marine à tolérer ces conditions salines (**fig. 19**) Ces résultats montrent aussi que ces bactéries halotolérants peuvent largement tolérer la salinité de la mer méditerranée. Plusieurs travaux ont indiqués que les bactéries marines ont des exigences pour le chlorure de sodium à des concentrations voisines à celles retrouvées dans l'eau des mers (McGenity *et al.*, 2000). Les espèces halophiles du genre *Bacillus* et apparentées sont caractérisées par une croissance optimale dans un milieu contenant 3 à 15% (p / v) de NaCl (Ventosa *et al.*, 1998). On retrouve aussi des espèces légèrement halophiles comme *Bacillus xiaoxiensis* (Chen *et al.*, 2011), des espèces modérément halophiles comme *Bacillus chagannorensis* (Carrasco *et al.*, 2007) et *Bacillus coahuilensis* (Cerritos *et al.*, 2008). De nombreux *Bacillus* halotolérants ont été décrites et qui peuvent croître entre 0 à 10% (p / v) de NaCl comme *Bacillus luteolus* (Shi *et al.*, 2011) et *Bacillus seohaeanensis* (Lee *et al.*, 2006). aussi d'autre espèce qui peuvent croître entre 0 à 25%(p/v) NaCl comme la souche isolé du lac de Goléa (Klouche Khelil, 2013) et qui a été affilié au genre *Bacillus*.



Figure 17 : Effet du stress salin à 6,5% et 8% de chlorure de sodium sur la croissance de quelques isolats de Bacillus.

II.5 Résultats des activités enzymatiques :

Les activités amylase, protéase, gélatinase ont été mises en évidence en utilisant les milieux :gélose a amidon 1%, Gélose au lait et gélose a Gélatine 1,5 %, respectivement, les résultats sont mentionnés dans le tableau 5 :

Tableau 5 : résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des Bacillus et l'actinobactérie de sable de l'eau de mer.

Activité enzymatique			
souche	Protéase	Amylase	Gélatinas
BM1	+	-	++
BM2	-	-	++
BM3	-	-	+
BM4	-	-	+
BM5	-	+	+
BM6	-	+	+
BM7	+	+	+
BM8	-	+	+
BM9	+	+	+
BM10	-	-	+
BM11	+	-	+
Bm12	-	++	+
ACT	+	+	+

Tableau 5 : Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des *Bacillus* du sol (fournis par le laboratoire de microbiologie et de biologie végétal)

Souche	Activité enzymatique		
	Protéase	Amylase	Gélatinas
Bc1	++	+	++
Bc2	+	+	++
Ba2	++	-	++
Ba4	++	+	++
Bb5	++	-	++
Bb9	++	+	++
BG	++	-	++
BF	++	-	++

+ : résultats faiblement positif - : résultats négatif
 +++ : Résultats fortement positif ++ : moyennement positif

- **Ba2, Ba4, Bb5, Bb9, BF** : Isolats isolés d'un sol agricole. (Rhizosphère)
- Ajouté au testes pour comparait les résultats.

II.6 Production de protéase :

12 isolats du genre *Bacillus* plus une actinobactérie ont été ensemencés en touches (en spot) au centre de la gélose nutritive au lait. La présence d'une activité protéolytique se traduit clairement par formation d'un halo claire autour des colonies, résultant de la dégradation des protéines du lait par l'exo protéase ((**Harrigan et Mccance, 1976**). Après la mesure des zonesde diamètres différents ont été obtenues suivant la capacité de chaque bactérie à dégrader la protéine du lait (**Tableau 5** et **fig.20, 21**). Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour produire des d'enzymes. En effet, plus de deux tiers d'enzymes produites industriellement par des bactéries impliquent les *Bacillus* (Devine, 1995). Ils produisent les enzymes comme les protéases intra et extracellulaires, qui sont l'une des classes d'enzymes les plus intensivement étudiées et largement appliquées dans les processus industriels (**Gupta et al., 2002**). Une souche, de *Bacillus clausii*, est également recommandée pour une utilisation à l'échelle commerciale pour la production de protéase alcaline avec l'utilisation de peptone, et du fructose comme seule source d'énergie. Le pH optimal et la température recommandés sont de 8 - 9 et 37- 40°C respectivement (**Razzaq et al., 2019**). Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toute les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (**Sandhya et al., 2005**). Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les

actinomycètes, de moisissures et de levures (Devi *et al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya *et al.*, 2005). Dans cette étude on peut constater que les les *Bacillus* de l'eau de mer ont montré une activitéprotéasique moins que , les *Bacillus* du sol Cela suggère une adaptation spécifique de ces micro- organismes à leurs environnements respectifs. (Tortora *et al.*, 2003)

Les isolats soumis au test protéolytique dégradent la caséine du lait avec différents diamètresdes halos. Les diamètres des isolats sont ainsi représentés dans la figure (20).

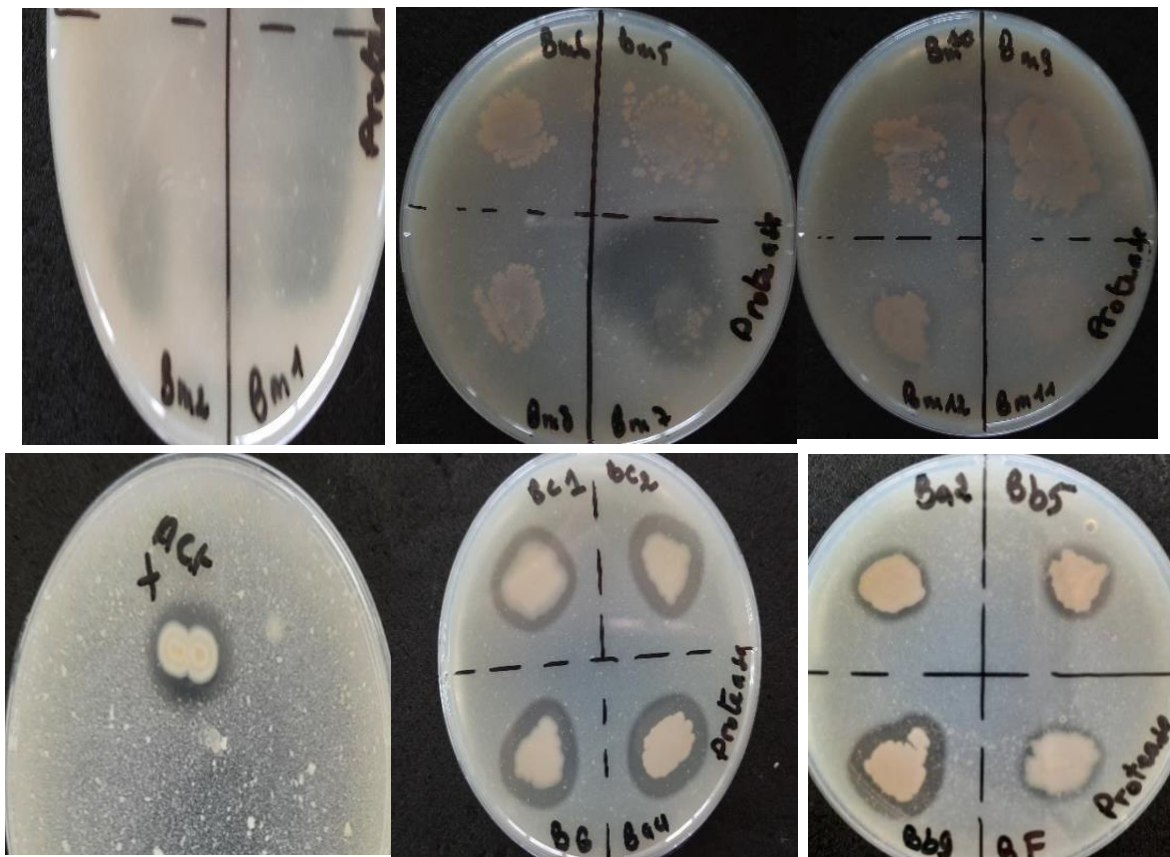


Figure 18 : Activité enzymatique protéase des *Bacillus* et actinobacterie étudié.

- Isolats de *Bacillus* du sol agricole tous ont une activité protéolytique (**Ba2, Ba4, Bb5, Bb9, BF**) à l'inverse pour les isolats du sable d'eau de mer de sidi Majdoub que act et Bm1 Bm7) ont une activité protéolytique positif.

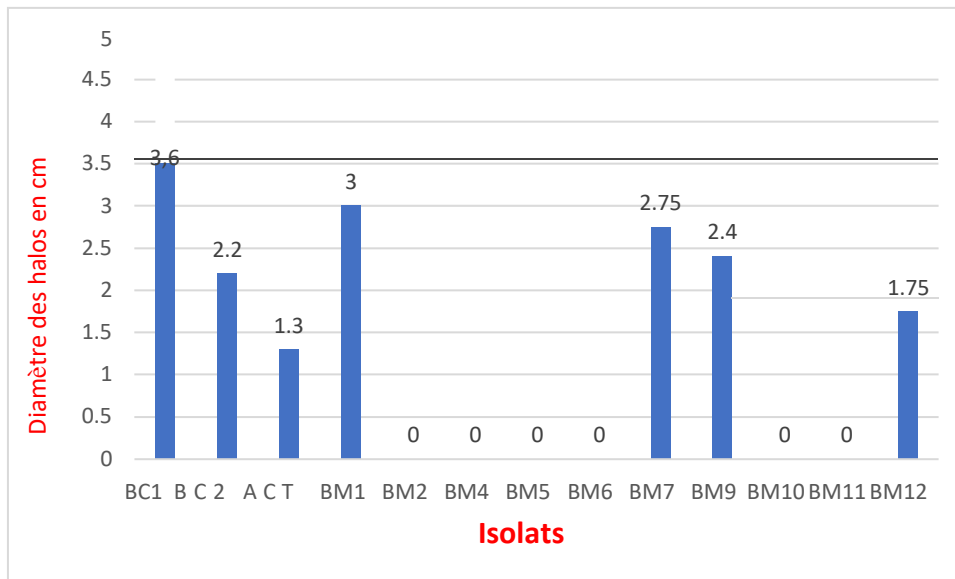


Figure 19 : des diamètres des halos de dégradation de la caséine de chaque isolat

- La fig (21) représente diamètres des halos en cm résultants de la dégradation de la caséine des souches isolés du sable de la plage de sidi Mejdoub , la plus grande valeur de dégradation est de 3,6 cm attribué à BC1 et la petite valeur de diamètre de dégradation et a actinobacterie de 1,3 cm .Ps :(le diamètre de la colonie avec la zone de lyse sont calculer.)

II.7 Production de gélatinase :

Les isolats soumis au test hydrolyse de la Gélatine dégrade la gélatine avec différents diamètres des halos. Les diamètres des isolats sont ainsi représentés dans la figure (22).

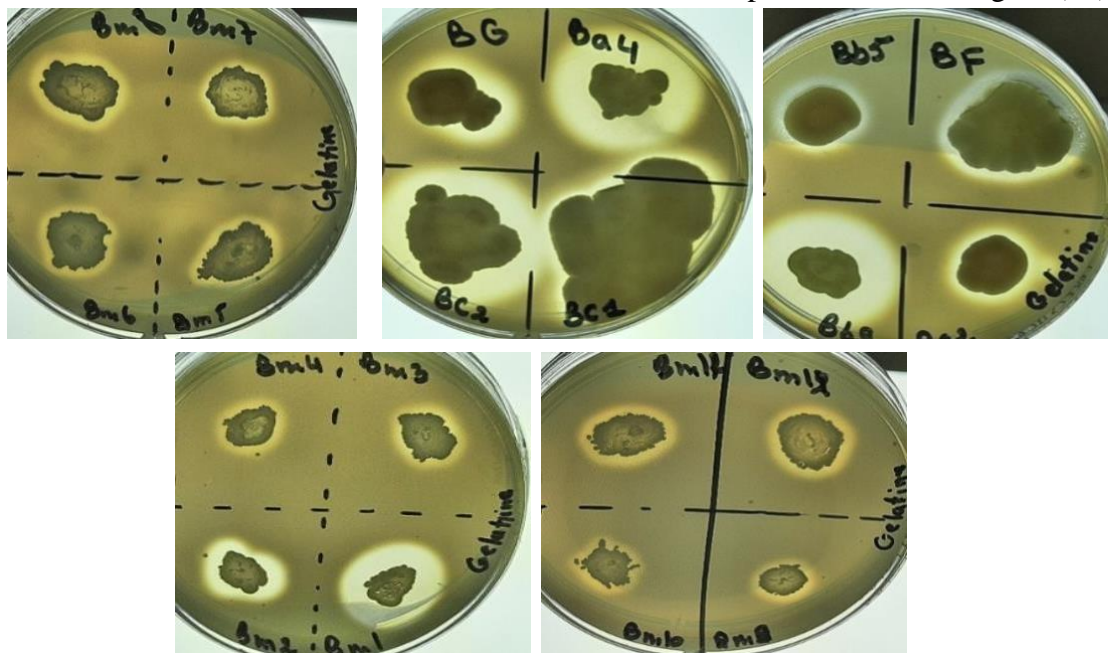


Figure 20: Activité enzymatique de gélatinasse chez les Bacillus étudiés

- La fig (23) représente le diagramme des diamètres des halos résultants de la dégradation de la gélatine des souches isolées du sable de la plage de Sidi Mejdoub, la plus grande valeur de dégradation est de 4 cm attribuée à BC1 et la plus petite valeur de diamètre de dégradation est de 0,6 mm attribuée à BM10. Ps : (le diamètre de la colonie avec la zone de lyse sont calculés.)

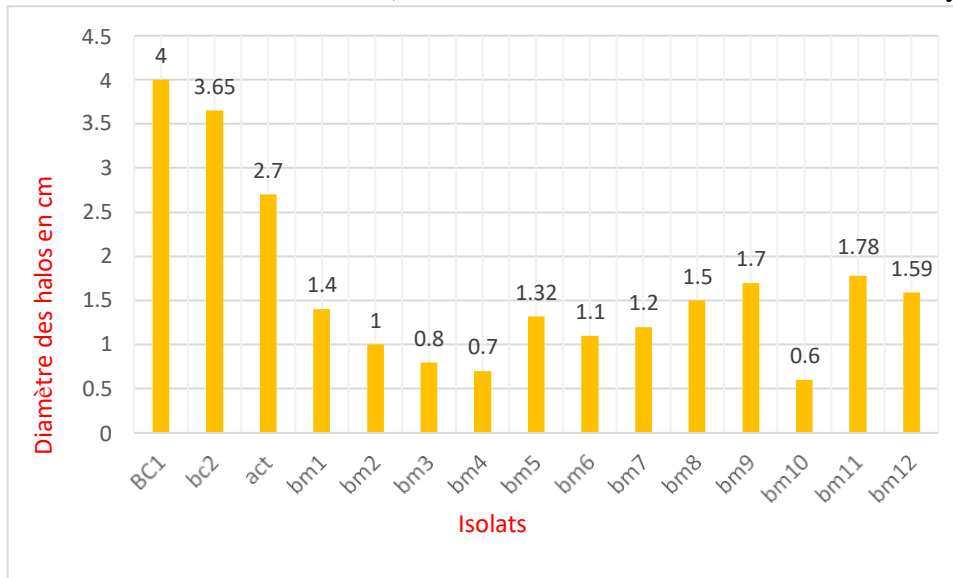


Figure 21 : Activité d'hydrolyse de la gélatine

II.8 Production d'amylase

L'hydrolyse de l'amidon par l'amylase, entraînera : l'amidon hydrolysé qui ne formera pas de couleur bleue avec l'iode autour de la colonie et formera une zone claire, l'absence de zone claire autour des colonies indique une réaction entre les réactifs iodés et l'amidon non hydrolysés (Risandi *et al.*, 2019).

Cette étude a montré que la majorité des *Bacillus* isolés du sable de mer ne dégradent pas l'amidon. Quelques isolats seulement ont montré une faible dégradation.



2

1

Figure 22 : Activité enzymatique des Amylases chez quelques *Bacillus* étudiés

1 : Représente BM5, BM6, BM7, BM8.

2 : Représente BM12, BM9 résultats positifs, BM11, BM10 négatifs

Conclusion

Les organismes vivants dans les milieux aquatique en particulier les microorganismes telleque le genre *Bacillus* et Actinobacterie présente un répertoire de vois métabolique et de biomolécules leur permettent non seulement de vivre et survivre mais aussi de jouer un rôle dans la biodégradation et gestion de bio déchets .

L'intérêt apporté a c'est bactéries a aboutis à la découverte de leur propriété de biomoléculeà savoir les enzymes extracellulaire.

L'objectif essentielle de ce travail étai de rechercher quelque enzyme impliqués dans la biodégradation des bio déchets, chez une actinobacterie et des *Bacillus* isolés du sable de l'eaude mer de la plage de sidi mejdoub.

Un screening de trois activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires (amylase, gélatinase et protéase) a été effectué sur 12 isolats retenus aprêt le traitement thermique sur les dilutions décimale, effectués dans un bain marie à 80°c pendant 30 min.

Après purification sur milieu GN on a procédé à l'observation macroscopique et microscopique et rechercher la catalase et oxydase. Cette étude a révélé que les 12 souches sont des bâtonnets à Gram positif, catalase positif, oxydase négatif capable de former des sporesce qui les rapproche du genre *Bacillus*. L'actinobactérie choisis dans cette étude une bactérie aGram positif, a catalase positif, oxydase négatif , filamenteuse, capable de formée des conidies.Sur le plan de la production d'enzymes, Il est intéressant de signaler que parmi les 12 souchessélectionnées de *Bacillus* et l'actinobacterie, , plus de la moitié des souches possèdent des activités hydrolytiques combinées, d'où leur importance biotechnologique.

Tous les isolats étudiés ont montrés une production de gélatinase par contre seule quelque souche (BM7, BM1, BM12, et l'actinobacterie, BC1 et BC2) ont produit des protéases sur la gélose du lait écrémé. Aussi la majorité des isolats n'ont pas dégradé l'amidon seulement quelques isolats (BM5, BM6, BM7, Bm8, Bm9, Bm12 et les souches de référence *Bacillus cereus* ATCC1087 et *Bacillus cereus* ATCC11778) ont montré une faible dégradation.

De plus les souches (*Bacillus* et actinobacterie) isolée du sol d'eau mer de sidi mejdoub : enmontré une croissance positif sur les milieux (GN+6,5%de Nacl et GN+8% de Nacl). ces résultats indique la capacité de ces isolats d'origine marine a tolérer les conditions salines .Cetted contribution à l'étude phénotypique, biochimique et la mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires de souches microbiennes isolées du sable de l'eau de mer de sidimejdoub a donné des résultats encourageants qui devront être complétés par une analyse poly phasique plus approfondie en introduisant de la chimiotaxonomie couplée à l'approche

moléculaire.

L'objectif de ce travail a été en petite partie atteint, bien que certains paramètres ou certaines techniques prévues à effectuer n'ont pas pu être réalisées en raison de non disponibilité de matériels, moyens et de temps.

- les résultats de cette étude ouvrent la voie à plusieurs possibilités d'applications pratiques. Par exemple, nous pourrions exploiter les enzymes identifiées pour développer des formulations enzymatiques spécifiques, adaptées à la dégradation des biodéchets dans des systèmes de compostage ou de biodigestion.

- L'utilisation d'enzymes spécifiques pour la dégradation de ces derniers pourrait améliorer l'efficacité des processus de traitement existants et pourraient être ajoutées aux biodéchets pour accélérer leur dégradation, réduisant ainsi le temps de compostage ou de biodigestion nécessaire.)

- Les enzymes trouvées pourraient être utilisées dans des processus de bioconversion pour produire des bioproduits à partir de biodéchets, tels que des biocarburants, des enzymes industrielles ou des produits chimiques à valeur ajoutée.

- En favorisant une dégradation plus rapide et complète des biodéchets, nous pourrions réduire la quantité de déchets organiques envoyée dans les décharges, contribuant ainsi à la réduction des émissions de gaz à effet de serre et à la préservation des ressources naturelles.

Références bibliographiques

1. Adams, M.R. and Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Inter JFood Microbiol.*, 27: 263-264.
2. Aizawa, T., Urai, M., Iwabuchi, N., Nakajima, M. and Sunairi, M. (2010). *Bacillus trypoxylicola* sp. nov. xylanase-producing alkaliphilic bacteria isolated from the guts of Japanese horned beetle larvae (*Trypoxylus dichotomus septentrionalis*) . *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60: 61- 66.
3. Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L. and Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics .*BMC Genomics*, 11: 332.
4. Alexandre Hervé., Granvalet Cosette., Guilloux-Benatier., Michèle Remize Barnavon Fabienne., Tourdot-Marechal Raphaëlle., (2008). *Les bactéries lactiques en œnologie*. Edition Lavoisier p : 113.
5. Aouar L. (2006). Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Diplôme de Magister, Université Mentouri Constantine.
6. Ash C., Priest F. G. and Collins D., (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*; 64: 253–260.
7. Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. and Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol.*, 13: 202-206.
8. Avril J.L., et al. (1992). *Bactériologie clinique*. 2 éd. Paris : ellipses. Pp. 511.
9. Aygan A., Arıkan B. 2008. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake. *Int J Agric Biol* 10, pp. 369-374.
10. Banat, I.M. and Marchant, R. (2011). *Geobacillus* activities in soil and oil contamination remediation. In: Logan, N.A., De Vos, P. *Endospore forming soil bacteria (Soil Biology 27)*. (ed) Springer, Heidelberg, :259-270.
11. Banerjee, G., Ray, A.K. 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*.
12. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 80(1):1- 43.

13. Bautista Angeli (2019) <Etude de faisabilité de la micro-méthanisation par co-digestion à l'échelle des quartiers>. Thèse. à l'Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique Bretagne Pays de la Loire, dans le cadre de Sciences de l'ingénierie et des systèmes (Centrale Nantes).
14. Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat : Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse. Tlemcen : Université Aboubakr Belkaïd. 146 P.
15. Benedykt, W., Katarzyana, P. 2008. Regulation of bacterial protease activity. Cellular & Molecular Biology Letters, 13, 212-229.
16. Bhat M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in Biotechnology. Biotechnol Adv. 18, pp. 355-383.
17. Burgess, Sara A., Denise Lindsay, and Steve H. Flint., (2010) "Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing." International journal of food microbiology 144.2: 215-225.
18. Camille D. (2007) Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures www.edition.lavoisier.fr .
19. Carrasco I. J., Márquez M. C., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D. and Ventosa A. (2007) a. *Bacillus chagannorensis* sp. nov., a moderate halophile from a soda lake in Inner Mongolia, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 2084–2088.
20. Chaillou S, Combrisson j, « BIODÉPOLLUTION », Encyclopædia Universalis [en ligne], consulté le 8 novembre 2013. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/biodepollution/>
21. Chander M. 2019. Recent advances in microbial production of proteases. International Journal of Environmental Analytical Chemistry.
22. Chen L., Wang G., Bu T., Zhang Y., Wang Y., Liu M., Lin X. 2010. Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). World J. Microbiol. Biotechnol., 26:879–888.
23. Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G. and Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nat Biotechnol., 25:1007-1014.
24. Claus D. and Berkeley R.C.W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn (1872), 174AL. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, USA.

25. Coutte, F., Lecouturier, D., Yahia, S. A., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, Ph. and Dhulster,
26. Daffonchio, D., Cherif, A. and Borin, S. (2000). Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S–23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol.*, 66:5460–5468
27. Delarras C.,(2007). *Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D’analyses Ou De Contrôle Sanitaire*, 1ère édition, Paris : Edition tec et doc, 476 p.
28. De Souza Vandenberghe, L.P., Karp, S.G., Pagnoncelli, B.M.G. 2020. Classification of enzymes and catalytic properties. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, 11-3
29. Delgado, S., Rachid, C. T., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, Á., Peixoto, R. S., & Mayo, B., (2013). Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food microbiology*, 36(1), 103-111.
30. Denis F., Ploy M.C., Martin M., Bingen E., Quentin R., (2007). *Bactériologie Médicale. Techniques usuelles*. Edn Elsevier Masson. P. 631.
31. Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Palaniswamy M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and it’s compatibility with commercial detergents. *Indian J.Sci. Technol.*, 1(7); 1–6.
32. Djaballah, C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M’lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 73 p
33. Dommergues Y., Mangenot F. (1970). *écologie microbienne du sol* .Masson et Cie, paris, pp9-72(796).
34. Drouin, M. 2005. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d’épuration municipales comme substrat. Thèse de magistère.
35. Durand Mathieu, Jean-Baptiste Bahers et Hélène Beraud, « La mise en territoire de l’économie circulaire : comment mettre en œuvre la proximité dans la circulation des déchets ? », *Géocarrefour* [En ligne], 91/3 | 2017, mis en ligne le 30 mai 2017, consulté le 12 juillet 2023.
36. Dussault, David (2017). « Biodégradation par saprotrophes fongiques des matières résiduelles de textiles synthétiques : enjeux environnementaux et économiques » Thèse. Montréal (Québec, Canada), Université du Québec à Montréal, Doctorat en sciences de l’environnement.
37. Elwan S.H., Dab A. and Al-Gounaim Y. (1985). Ecology of the Streptomycetes flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 99-104.
38. Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M. A., Edirisinghe, J. N., Kutumbaka, K. K., Koenig, S. S., Huot Creasy, H., Rosovitz, M. J., Riley, D. R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L. D., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball,

- B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J. and Vary, P. S. (2011). Genome sequences of the biotechnologically important *B. megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *J Bacteriol.*, 193: 4199-4213.
39. Ettoumi, B., Raddadi, N., Borin, S., Daffonchio, D., Boudabous, A. and Cherif, A. (2009). Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments. *J Basic Microbiol.*, 49:1-11.
40. Fan, L., Bo, S., Chen, H., Ye, W., Kleinschmidt, K., Baumann, H. I., Imhoff, J. F., Kleine, M., and Cai, D. (2011). Genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b, isolated from the Indian Ocean. *J Bacteriol.*, 193:1276-1277.
41. Garveba P., Van Veen L.A. and Van Elsas J.D., (2003). Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*;45:302- 31.
42. Goodfellow, M., Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.*37, 189-216.
43. Gordon, R. H. W. C, Haynes, W. and Pang, C. (1973). The genus *Bacillus*. US Department of Agriculture Handbook. 427: 109-126.
44. Gugliandolo C., Maugeri T., Caccamo D., and Stackebrandt E., (2003). *Bacillus aeolius* sp. nov. a Novel Thermophilic, Halophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands (Italy). *System. Appl. Microbiol.* 26, 172-176.
45. Gusakov A. V., Sinitsyn A. P., Markov A. V., Skomarovsky A. A., Sinitsyna O. A., Berlin A.G., Ankudimova N. V.2000. Indigo-binding domain in cellulase molecule.
46. Hara, T. and Ueda, S. (1982). Regulation of polyglutamate in *Bacillus subtilis* (natto): transformation of high PGA productivity. *Agric Biol Chem.*, 46: 2275-2281.
47. Hasan F., Ali Shah A. and Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology.* 39, pp. 235-251.
48. Heyndrickx, M. (2011). Dispersal of aerobic endospore-forming bacteria from soil and agricultural activities to food and feed. In: Logan, N.A. and De Vos, P. *Endospore forming soil bacteria (Soil Biology 27)*. (ed) Springer, Heidelberg,: 135-156.
49. Hitesh J., Nimita U., Darshan D., Manthan K., Shilpa S., and Jagdish P. (2016). Isolation, Optimization and Production of Cellulase by *Aspergillus niger* from Agricultural Waste. *Journal of pure and applied microbiology*. Vol. 10(2), Pp. 1159-1166.
50. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J. et Williams S.T.(1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, USA: 611-703.
51. Huang, B., Qin, P., Xu, Z., Zhu, R. and Meng, Y. (2011). Effects of CaCl₂ on viscosity of culture broth, and on activities of enzymes around the 2-oxoglutarate branch, in *Bacillus subtilis* CGMCC 2108 producing poly-(γ -glutamic acid). *Bioresour Technol.*, 102: 3595-3598.

52. Jaeger K. E. and Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 13, pp. 390-397.
53. Jaeger K. E. and Reetz M. T. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends biotechnol.* 16, pp. 396-403.
54. Janaki T. (2017). Enzymes From Actinomycetes. *International Journal of Chem Tech Researc.*10(2): 176-182.
55. Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystème extrême. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état en Microbiologie appliquée. Université des frères Mentouri Constantine. P: 14- 15-16-23.
56. Korish M., 2003. Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Thèse de doctorat d'état, university Mainz ,Egypt ,131p.
57. Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinozynnzmataceae* fam. *Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 331-336.
58. Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 2*, 231-51.
59. Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* 4, 113-121.
60. Lang C. et Dornenburg H. 2000. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, no.4, pp. 366–375.
61. Larpent J. P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux groupes bactériens. Lavoisier. France.4, 183-212
62. Larpent J.P. and Sanglier J.J. (1989). *Biotechnology of antibiotics*. Masson edition, School of biotechnology, Strasbourg, France.
63. Larpent-Gourgaud M., Sanglier J.J. 1992. *Biotechnologies : principes et méthodes – Collection Biosciences et techniques*. Ed. Doin.Paris. 571 ; pp. 61-64.
64. Latour, X., & Lemanceau, P. (1997). Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 9(17), 427-443.
65. Lentzen G., Schwarz T. (2006). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 623–634.
66. Logan, N. A. and De Vos, P. (2009). Taxonomic Outline of the Prokaryotes: Family I. Bacillaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York Berlin Heidelberg, 399p.
67. Loqman S. (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols

- rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc : Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie. Pp: 253.
68. Ludwig, W., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. (2008). Revised road map to the phylum Firmicutes. In: de Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whitman W.B. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, 2nd ed, The firmicutes. Springer, New York,: 1-13.
69. Lyons A.J., Pridham T.G. (1971). *Streptomyces torulosus* sp. n., an unusual knobbspored taxon. *Appl Microbiol.* 22(2), 190–3.
70. McGenity T.J., Gemmell R.T., Grant W.D., Stan-Lotter H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* 2: 243-250.
71. Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. (2000). Streptomycetes: A new model to study cell death. *J. Cell. Biol.* 3, 153-158.
72. Mukherjee AK, Bordoloi NK. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2011 mars;18(3):471-8. doi : 10.1007/s11356-010-0391-2. Publication en ligne du 12 septembre 2010. PMID : 20835890
73. Najjar A. 2010. Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse. Microbiologie et Biotechnologies.
74. Nicholson W.L., (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Science*; 59: 410–416.
75. Oren A., (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* ; 28:56-63..0
76. P. (2010). Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 87: 499-507.
77. Pelmont J. (1995). *Enzymes: catalyseurs du monde vivant*. Presse Universitaire de Grenoble. pp.7; 621; 652–654.
78. Perez-Fons, L., Steiger, S., Khaneja, R., Bramley, P.M., Cutting, S.M., Sandmann, G. and Fraser, P.D. (2011). Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Biochim Biophys Acta.*, 1811: 177-185.
79. Prakash A., Satyanarayana T., Johri B.N. (2012). *Microorganisms in Environmental Management*. Springer. Pp: 819.
80. Prescott L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. (2003). *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp 506–517-537-542-573.
81. Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. (2010). *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088.
82. Priest F.G., Sonenshein A.L., Hoch J.A. and Losick R., 1993. *Bacillus subtilis and Other Gram Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Washington

- D.C., American Society for Microbiology, USA.
83. Raddadi, N., Belaouis, A., Tamagnini, I., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Boudabous, A., Cherif, A. and Daffonchio, D. (2009). Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. *J Basic Microbiol.*, 49: 293-303.
 84. Raddadi, N., Rizzi, A., Brusetti, L., Borin, S., Tamagnini, I. and Daffonchio, D. (2010). *Bacillus*. In: Liu, D. (ed) *Molecular detection of foodborne pathogens*. CRC Press, Boca Raton,,: 129-144.
 85. Rajeeva G., Soni T. (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG07. *Journal of BMC Biotechnology*. Vol15:19.
 86. Ramesh C., Rishi G., and Ajay S. (2011). *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications*. Journal of SAGE-Hindawi. 10 pages. vol 10.4061.
 87. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf M. 2019. *Microbial proteases applications*. *Bioengineering and Biotechnology*.
 88. Reginald, H., Garrett, C., Grisham, M. 2000. *Biochimie*, (Vol : 1). Belgique : Edition de Boeck Supérieure .
 89. Reiss E, Hearn VM, Poulain D & Shepherd MG (1992) Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1: 143-156.
 90. Ripert Christian. (2013). *Mycologie médicale*. Edition Lavoisier. p : 327.
 91. Robinson, P.K. 2015. *Enzymes : principes and biotechnological applications*. *Essays Biochem.*, 59, 1-41.
 92. Roger P, Jacq V. *Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air*. Université de Provence Aix-Marseille 1. 2000. 99p.
 93. Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A. (2005a). *Microbial proteases*. *Methods Biotechnol.*, 17; 165–179.
 94. Schallmey, M., Singh, A. and Ward, O.P. (2004). *Developments in the use of Bacillus species for industrial production*. *Can J Microbiol.*, 50: 1-17.\$
 95. Schmidt B. M., Baumann M., Henke E., Konarzycka-Bessler M. and Bornscheuer U.T. 2004. *Directed evolution of Lipases and Esterases*. *Methods in enzymology*. 388, pp. 199-207.
 96. Scriban R. 1999. *Biotechnologies*. 5ème édition. *Techniques et Documentation Lavoisier*. pp.149-157.
 97. Scriban R. 1993. *Biotechnologie*. 4ème édition. *Technique et Documentation–Lavoisier*, Paris. 40 p.
 98. Selegato DM, Castro-Gamboa I. *Front Microbiol*. 2023 Feb 1;14:1117559. doi: 10.3389/fmicb.2023.1117559. eCollection 2023. PMID: 36819067 Free PMC article.
 99. Sheremet, A.S., Gronskiy, S.V., Akhmadyshin, R.A., Novikova, A.E., Livshits, V.A.,

- Shakulov, R.S. and Zakataeva, N.P. (2011). Enhancement of extracellular purine nucleoside accumulation by *Bacillus* strains through genetic modifications of genes involved in nucleoside export. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 38: 65-70.
100. Shimane Y., Hatada Y., Minegishi H., Echigo A., Nagaoka S., Miyazaki M., Ohta Y., Maruyama T., Usami R., Grant W.D., Horikoshi K. (2011). *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea isolated from commercial salt. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(9):2266-2270.
101. Silini S. (2012). Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'El-Atmania. Mémoire de Magister : Ecologie. Constantine : Université Mentouri. 101 p.
102. Snellios. 2006. Serine protease mechanism.
103. Song J., Weon H.Y., Yoon S.H., Parrk D.S., Go S.G. and Suh J.W. (2001). Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinomycetes isolated from mushroom composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 97-102.
104. Stackebrandt E. and Schumann P. (2000). Description of *Bogoriellaceae* fam. Nov., *Dermacocaceae* fam. Nov., *Rarobacteraceae* fam. Nov. and *Sanguibacteraceae* fam. Nov. and emendation of some families of the suborder *Micromcoccineae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50, 1279-1285.
105. Tanveer Pirzadah., Shashank Garg., Joginder Singh., Ashish Vyas., Manish Kumar., Naseem Gaur., Madhu Bala., Reiaz Rehman., Ajit Varma., Vivek Kumar., and Manoj Kumar., 2014. Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *Journal of Spirnger.* Vol 3:622.
106. Tatiana da Costa RP, and Flevo F. 2005. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Food Chem.* 89, P : 85-92.
107. Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in : *Microbiologie Industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel.* Lavoisier, Tech et Doc, 612p.
108. Thibault J.F., Petit R. 1979. Les substances pectiques : généralités et domaines d'application dans les industries alimentaires, 12 ; pp. 233-251.
109. Todar, K. (2003) *The Genus Bacillus*, Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison.
- Tortora, G., Caputo, R., Damiano, V., Melisi, D., Bianco, R., Fontanini, G., & Ciardiello, F. (2003). Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 and

protein kinase A antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. Clinical cancer research, 9(4), 1566-1572.

URL :<http://journals.openedition.org/geocarrefour/10217> ; DOI :<https://doi.org/10.4000/geocarrefour.10217>

110. Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde M., Deckwer, W. D. and Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 76: 957-967.
111. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998). *Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504–544.
112. Waksman S.A. (1959). *The actinomycetes, The Williams and Wilkins company, Baltimore.1, 327 p.*
113. Wang X., XU X., WU M., and Yang Y. 2002. Induction and regulation of cellulase formation in two strains of fungi by different carbon sources. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 8(6), 653-657
114. Wang, C. Y., Ng, C. C., Tzeng, W. S. and Shyu, Y. T. (2009). *Marinobacter szutsaonensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59: 2605-2609.
115. Wildermuth H. and Hopwood D.A. (1970) Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 60, 51-59.
116. Williams S.T., Bradshaw R.M., Costerton J.W. and Forge A.(1972). Fine structure of the spore sheath of some *Streptomyces* species. *J. Gen. Microbiol.* 72(2), 249-2
117. Yamashiro, D., Yoshioka, M, and Ashiuchi M. (2011). *Bacillus subtilis* pgsE (Formerly ywtC) stimulates poly- γ -glutamate production in the presence of zinc. *Biotechnol Bioeng.*, 108: 226- 230.
118. Yazdani, M., Naderi-Manesh, H., Khajeh K., Soudi, M. R., Asghari, S. M. and Sharifzadeh, M. (2009). Isolation and characterization of a novel gamma-radiation-resistant bacterium from hot spring in Iran. *J Basic Microbiol.*, 49: 119-127.
119. Yuan X, Zhang X, Chen X, Kong D, Liu X, Shen S. *Bioresour Technol.* 2018 septembre;264:190-197. doi : 10.1016/j.biortech.2018.05.072. Publication en ligne le 19 mai 2018. PMID : 29803810..
120. Zerizer H. (2014). Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Constantine 1. 154 p.
121. Zhang, G., Deng, A., Xu, Q., Liang, Y., Chen, N. and Wen, T. (2011a). Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of guanosine and ribavirin. *J Bacteriol.*, 193: 3142-3143.
122. Zhou J., Xia B., Treves D.S., Wu L.-Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V., Denis F., Ploy M.C., Martin M., Bingen E., Quentin R., (2007). *Bactériologie Médicale.*

Annexe :

Annexe 01 : Préparation des milieux de cultures utilisés

Gélose nutritive

Peptone	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium.....	05g
Agar	20g
Eau distillée.....	1000ml

PH = 6,8-7,4

Gélose à amidon

Gélose nutritive.....	100ml
Amidon.....	01g

PH = 7

Gélose au lait (jauadi et al.,2008)

Lait 0% matière grasse	250g
Extrait de levure	3g
Peptone.....	5g
Agar	250
Eau distillé.....	1000ml

PH =

