

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Réalisé par :

M^{elle} NEDJAA Atika et M^{elle} ROUAS Zahia

Thème

Contribution l'étude des polysaccharides sécrétés par les
actinobactéries

Soutenu publiquement le : 28 /06/2021

Devant le jury :

Mr BOUAL Zakaria	Pr.	Président	U.K.M Ouargla
M ^{me} BOUAZIZ Sabrina	MCB	Encadreur	U.K.M Ouargla
M ^{elle} HADJADJ Soumia	MCA	Examinatrice	U.K.M Ouargla

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier DIEU « ﺁﻟﻠﻪﻩ » le tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui nous a donné la Force, la patience et nous a permis de mener à bien ce travail

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadreur M^{me} BOUAZIZ SABRINA Maitre de conférence « B » à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université kasdi Marbah Ouargla, pour son encadrement, ses encouragements, ses orientations, pour ses aides, patience et ses conseils scientifiques judicieux.

Nos vifs remerciements pour les membres de jury à commencer par M^{elle} HADJADJ S. Maitre de conférence « A » à la faculté des sciences de la nature et de la vie Université kasdi Marbah Ouargla et M^r BAOUAL ZAKARIA professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie Université kasdi Marbah Ouargla, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.

Nous ne saurons terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dans la contribution de ce travail

Nous tenons aussi à remercier l'ingénieur LAICH et toute l'équipement de laboratoire bidagogique.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos professeurs qui ont tout donné pour nous encouragés et aidés aux moments difficiles au cours de nos études.

Merci à toutes et à nos collègues de la promotion de master microbiologie appliquée. 2020 / 2021

Nos vifs remerciements ET notre profonde reconnaissance vont à tous les Personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents

*A mes chers frères, pour leurs encouragements
permanents et leur soutien moral.*

*A mes chères sœurs, pour leurs
encouragements*

A mon binôme

Tous mes amis

*Toutes les personnes qui m'ont aidé pendant
mes études*

ATIKA

Dédicaces

Je dédie ce travail

*A mes chers parents ; symboles de sacrifice ; tendresse et
d'affection.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous
me portez depuis
mon enfance et j'espère que votre bénédiction
m'accompagnera toujours.*

*A mes chères sœurs et chers frères, pour leurs
encouragements et tous les
moments inoubliables que nous avons partagés ensemble.*

A toute la famille ROUAS et NEDJAA.

A mes très chères amies

Surtout Khadija

A mon binôme.

Zahia

Liste des abréviations

Cas : Caséine

EPS: Exopolysaccharides

M S: Mycélium du substrat

M v: Mycélium végétative

MA : Mycélium aérien

Rha : Rhamnose

Rib : Ribose

Liste des figures

Figure n° 1. Croissance d'une colonie d'actinomycète sur milieu solide (ANDRIAMBELOSON, 2016).....	5
Figure n° 2. Cycle de développement de <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.	7
Figure n° 3. (A) Aperçu taxinomique actuel du phylum Actinobacteria figurant sur la liste des noms procaryotes ayant un statut dans la nomenclature. (B) proposition de taxonomie pour les actinobactéries dans le manuel Bergey'sof Systematic Bacteriology (GAO et GUPTA, 2012).....	8
Figure n° 4. Architecture de surface d'une bactérie à Gram négatif.....	12
Figure n° 5. Teneurs en ose totaux de les souches AB26, ITA1 et I4	25
Figure n° 6. Effet du pH sur la teneur en EPS.	29
Figure n° 7. Teneur en EPS en fonction de la température.	30
Figure n° 8. Effet de différentes concentrations en NaCl sur la teneur des EPS.	31
Figure n° 9. Activité antimicrobienne de l'extrait d'EPS de la souche AB26	33
Figure n° 11. Activité antimicrobienne de l'extrait d'EPS de la souche I4	33

Liste des tableaux

Tableau I. Habitat de certains actinobacteries (ARIRH, 2018).....	6
Tableau II. Rendement et caractéristiques des exopolysaccharides sécrété par les souches AB26, ITA1 et I4.	24
Tableau III. Rendement des EPS en fonction du pH.....	27
Tableau IV. Rendement des EPS en fonction de la température.....	28
Tableau V. Rendement des EPS en fonction de concentration de NaCl.....	28

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	
I.1. Actinobactéries	4
I.1.1. Généralité sur les actinobactéries.....	4
I.1.2. Morphologie.....	4
I.1.3. Distribution des actinobactéries dans l'environnement.....	5
I.1.4. Croissance et développement.....	6
I.1.5. Classification.....	7
I.1.6. Importance	8
I.1.6.1.Eologique	8
I.1.6.2. Pharmaceutiques	9
I.1.6.3. Industrielle	9
I.1.6.4. Agriculture	9
I.2. Polysaccharides	10
I.2.1. Définition des polysaccharides	10
I.2.2. Polysaccharides bactériens.....	10
I.2.3. Classification des polysaccharides bactériens	10
I.2.3.1.Classification selon la composition et la structure.....	10
I.2.3.1.1. Homopolysaccharides	11
I.2.3.1.2. Hétéropolysaccharides	11

I.2.3.2. Classification selon leur localisation	11
I.2.4.Exopolysaccharides.....	12
I.2.5.Biosynthèse des exopolysaccharides	13
I.2.6. Rôle physiologique des exopolysaccharides.....	13
I.2.7. Production des exopolysaccharides par les actinobacteries	14
I.2.7.1. Température	14
I.2.7.2. PH	14
I.2.7.3. Salinité	15
I.2.8.Importance et application des EPS :	15
I.2.8.1. Pharmaceutique.....	15
I.2.8.2. Cosmétologie	16
I.2.8.3.Industrie alimentaire :	16
I.2.8.4. Industries textiles	16
I.2.8.5. Agriculture	16
I.2.9. Activité antimicrobienne.....	17

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Objectif de l'étude	19
II.2. Matériel biologique.....	19
II.3. Repiquage des souches sur milieu solide	19
II.4. Culture des souches sur milieux liquide	19
II.5. Extraction des polysaccharides extracellulaire.....	19
II.6.Dosage des exopolysaccharides.....	20
II.7. Effet du pH, de la température et du NaCl sur la production des EPS	20
II.8. Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des extraits des EPS des différentes isolats d'actinobactéries	20
II.8.1. Standardisation des inoculas.....	21
II.8.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits des EPS	21

II.8.3. Expressions des résultats	21
II.9. Analyse statistique	22

Chapitre III. Résultats et discussions

III.1. Rendement de l'extraction	24
III.2. Dosage des EPS par la méthode de Dubois (1956).....	25
III.3. Effet du pH, de la température et du NaCl sur la production des EPS.....	26
III.3.1. Effet de différents paramètres sur le rendement.....	27
III.3.1.1. Effet du pH sur le rendement	27
III.3.1.2. Effet de la température sur le rendement.....	27
III.3.1.3. Effet de la concentration en NaCl sur le rendement.....	28
III.3.2. Effet de différents paramètres sur la teneur des EPS	29
III.3.2.1. Effet du pH sur la teneur des ESP	29
III.3.2.2. Effet de température sur la teneur des EPS	30
III.3.2.3. Effet de la différente concentration en NaCl sur la teneur en EPS	31
III.4.Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des extraits d'EPS de différentes isolats d'actinobactéries	32
Conclusion.....	37
Références bibliographiques	40
Annexes	46

Introduction

Introduction

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positives à haute teneur en en guanine-cytosine (G+C) qui présentent diverses morphologies, allant des formes unicellulaires aux formes filamenteuses et constitue un phylum majeur au sein du domaine de Bacteria **(Wadaan et al., 2019)**.

Les actinobactéries sont retrouvées dans de multiples niches écologiques terrestres qu'aquatiques. Cette capacité de colonisation est d'une part attribuable à leur cycle de vie complexe qui permet une dispersion efficace et la survie dans des conditions environnementales importantes **(DUBEAU, 2011)**

Les actinobactéries sont bien reconnues pour leur production de métabolites primaires et secondaires, ayants des applications importantes dans divers domaines **(HARIR, 2018)**. Elles présentent diverses propriétés physiologiques et métaboliques, telles que la production d'enzymes extracellulaires et la formation d'une grande variété de métabolites secondaires. En fait, les membres de l'ordre Actinomycetales, notamment le genre *Streptomyces*, restent la source la plus riche de produits naturels, y compris des antibiotiques et des agents antitumoraux cliniquement utiles. Les actinomycètes produisent environ 45% de tous les métabolites secondaires bioactifs microbiens, 80% de ces composés étant produits par le genre *Streptomyces* **(ALVAREZ, 2017)**.

Les polysaccharides extracellulaires bactériens (EPS) sont des polymères biosynthétiques, principalement constitués de glucides sécrétés par des microorganismes et se fixant à des surfaces solides qui les aident à se développer en colonies appelées biofilms. Ces EPS restent soit attaché aux surfaces cellulaires ou être libéré dans l'extracellulaire. En raison de leur intérêt physico-chimique et propriétés rhéologique, l'EPS bactériennes a une large gamme d'applications industrielles telles que la production de textiles, détergents, adhésifs, cosmétiques, produits pharmaceutiques, additifs alimentaires **(MANIVSAGONA et al., 2013)**.

L'objectif du présent travail, est l'étude des EPS sécrété par quelque souche des actinobactéries.

Le travail est structuré en trois chapitres, dont le premier est consacré à une synthèse bibliographique, rappelant des généralités sur les actinobactéries comme première partie suivis d'une deuxième partie sur les exopolysaccharides des actinobactéries. Le second chapitre traite les principes généraux des matériels et méthodes de l'étude des exopolysaccharides extrait à partir des actinobactéries.

La troisième partie du manuscrit présentera les résultats et discussion des principales parties de cette étude et présente aussi les principaux. Et enfin une conclusion et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achèvent ce travail.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1. Actinobactéries

I.1.1. Généralité sur les actinobactéries

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positive avec un pourcentage de G+C supérieur à 55% et qui forment un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (IMENE *et al.*, 2016). Ils se développent par une combinaison d'extension de pointe et de ramification de l'hyphe. C'est ce qui a donné leur nom, qui dérive du mot grec aktis ou aktin qui signifie rayon et mykes signifie champignons (BARKA *et al.*, 2016). Les actinobactéries constituent le groupe de micro-organismes le plus répandu dans la nature ; ils sont considérés comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons (RAMASAMY et RAJENDRANI, 2014). Il possède une distribution cosmopolite, les membres du groupe étant largement distribués dans les écosystèmes aquatiques et terrestres (Kassahun *et al.*, 2013).

La plupart des actinobactéries sont mésophiles, avec une croissance maximale à des températures comprises entre 25 °C et 30 °C, la croissance est très limitée et peut être stoppée

La plupart des actinobactéries poussent dans des sols à pH neutre. Ils poussent mieux à un pH compris entre 6 et 9, avec une croissance maximale autour de la neutralité. Cependant, quelques souches de *Streptomyces* ont été isolées dans des sols acides de pH 3,5 (BARKA *et al.*, 2016). Ils sont saprophytes, mais certains sont pathogènes pour les plantes et les animaux (SYIEMIONG et JHA, 2019).

I.1.2. Morphologie

Les actinobactéries ayant une variété de caractéristiques morphologiques, y compris le cocci, le bâtonnet et l'hyphe de fragmentation complexe qui se développe en mycélium ramifié (JW-LAW *et al.*, 2020). Généralement, il existe deux types de mycélium au cours de développement par les actinomycètes: le mycélium du substrat et le mycélium aérien (WINK *et al.*, 2017).

- Mycélium de substrat

Le mycélium du substrat ou mycélium végétal s'est développé à partir de l'excroissance d'une spore en germination qui pousse à la surface du milieu de culture pour

absorber les nutriments (WINK *et al.*, 2017), elles germent au bout de 2 à 6 heures, pour former des hyphes qui se ramifient intensément donnant ainsi naissance à un mycélium. Ce dernier se développe à la surface et dans le milieu de culture gélosé. Le diamètre et la longueur des hyphes varient considérablement selon les espèces. La longueur varie de 50 à 600 μm et le diamètre de 0,2 à 0,8 μm . La structure du mycélium végétatif varie selon la composition du milieu de culture, les conditions de croissance, spécialement la température et la présence de substances stimulatrices ou inhibitrices (ANDRIAMBELOSON, 2016). Certains de ses structures peuvent produire des pigments responsables des couleurs du substrat (WINK *et al.*, 2017)

- Mycélium aérien

Le mycélium aérien prend naissance après une certaine croissance du mycélium de substrat et sa formation dépend du milieu de culture et des conditions d'incubation. Les hyphes aériens varient beaucoup en longueur et peuvent avoir un diamètre de 1 à 1,4 μm . Ils sont pourvus d'une enveloppe hydrophobe qui donne l'aspect poudreux au mycélium. Le mycélium aérien montre une pigmentation variable : blanche, grise, jaune, orange, rouge, rose, violette, bleue, verte etc. Il couvre toute la colonie sous forme d'une masse cotonneuse ou poudreuse. Chez certaines espèces, il se présente sous forme de zones concentriques autour du mycélium végétatif (ANDRIAMBELOSON, 2016) (figure 01).

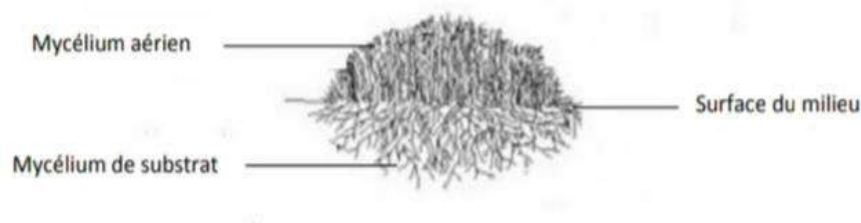


Figure n° 1. Croissance d'une colonie d'actinomycète sur milieu solide (ANDRIAMBELOSON, 2016).

I.1.3. Distribution des actinobactéries dans l'environnement

Les actinobactéries sont également présents dans les sols, l'eau douce et salée, et l'air. Ils sont plus abondants dans les sols que dans les autres milieux, en particulier dans les sols alcalins faisant partie intégrante de la population microbienne (BARKA *et al.*, 2021).

Les actinobactéries peuvent être trouvées à la fois à la surface du sol et à des profondeurs de plus de 2 m sous le sol. La densité de population des actinobactéries dépend de leur habitat et des conditions dominantes du climat. Ils sont typiquement présents à des densités de l'ordre de 10^6 à 10^9 cellules par gramme de sol : les populations du sol sont dominées par le genre *Streptomyces*, qui représente plus de 95% des souches actinomycetales isolées du sol (BARKA *et al.*,2021)

Les actinobactéries sont des répandus dans des environnements extrêmes (y compris des températures extrêmement élevées et basses, un pH extrêmement élevé ou bas, une concentration élevée en sel,etc. (BIRATU *et al.*,2013) (tableau I).

Tableau I. Habitat de certains actinobactéries (ARIRH, 2018)

Actinobactéries	Habitats
<i>Actinoplanes</i>	L'eau douce, la litière végétale, le sol
<i>Frankia</i>	Les nodules racinaires des non-légumineuses
<i>Micromonospora</i>	L'eau douce, les sédiments, les sols humides
<i>Nacrodia/amarae</i>	Les boues activées
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Les déjections animales.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin.
<i>Streptomyces</i>	Le sol. La litière végétale, l'eau.
<i>Thermoactinomyces</i>	Le compost

I.1.4. Croissance et développement

Les actinobactéries ont un cycle de développement complexe qui se divise en plusieurs étapes (ANDRIAMBELOSON, 2016). Il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé des hyphes qui se ramifie et non fragmenté et se développent par croissance apicale. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores (HARIR, 2018).

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire. Les actinobactéries, peuvent sporuler dans cet environnement. La différenciation est

généralement physiologique ; tandis que sur milieu solide, une différenciation morphologique est observée (formation du mycélium aérien)(ANDRIAMBELOSON, 2016)(figure 02).

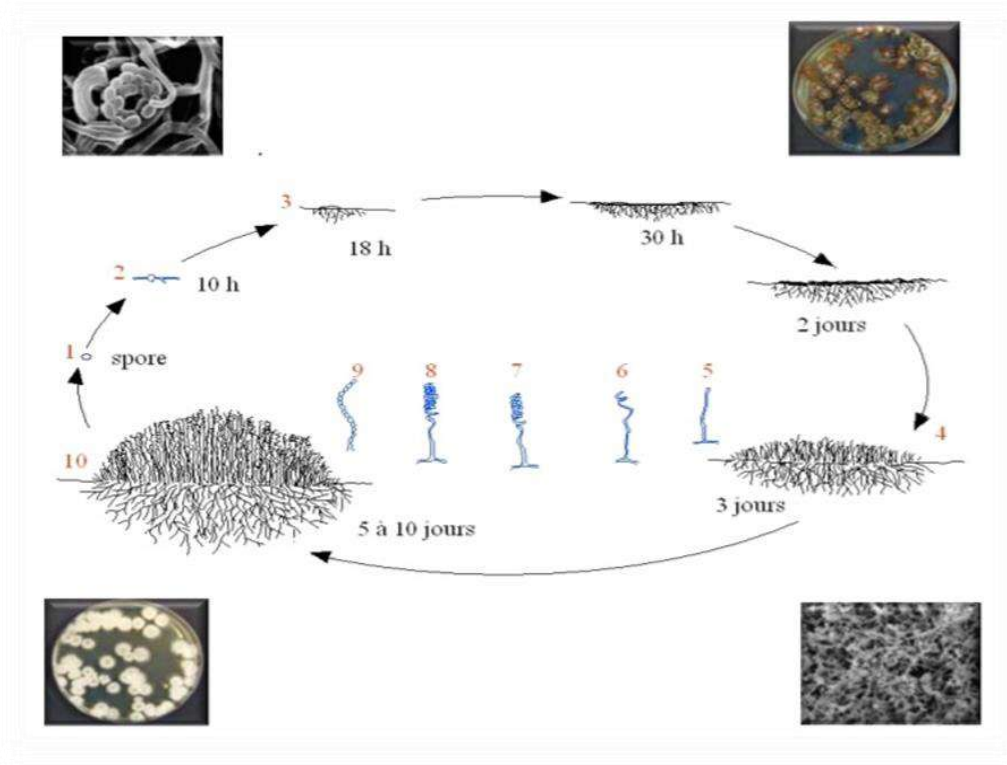


Figure n° 2. Cycle de développement de *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood et al., 1985).

I.1.5. Classification

Les principales caractéristiques utilisées pour délimiter la taxonomie des actinobactéries au niveau du genre et de l'espèce sont la morphologie microscopique et la chimiotaxonomie. La dernière de ces caractéristiques concerne principalement la composition de la paroi cellulaire et la distribution des sucres dans l'ensemble de la cellule, bien que la composition des phospholipides et le type de ménaquinone (BARKA et al., 2021). La position taxonomique du phylum Actinobacteria est bien proposée par les analyses d'ARNr 16S (WINK et al., 2017)

Il existe six classes dans les phylum actinobactéries, notamment le *Rubrobactéries*, la *Thermoléophilie*, les *Coriobactéries*, l'*Acidimicrobiie*, la *Nitriliruptorie* et les *Actinobactéries* ; 5 sous-classes, 6 ordres et 14 sous-ordres (WINK et al., 2017). La classe Actinobacteria contient 16 ordres, y compris les deux ordres proposés précédemment,

Actinomycetales et *Bifidobacteriales* (BARKA et al.,2021). L'ordre des *Actinomycetales* appartient à la classe des Actinobactéries qui est désormais limitée aux membres de la famille des *Actinomycetaceae*. Cependant 43 familles du phylum Actinobacteria sont classées dans la classe *Actinobacteria*, les 5 autres classes ne constituent que 10 familles (WINK et al ., 2017) (fig. 03).

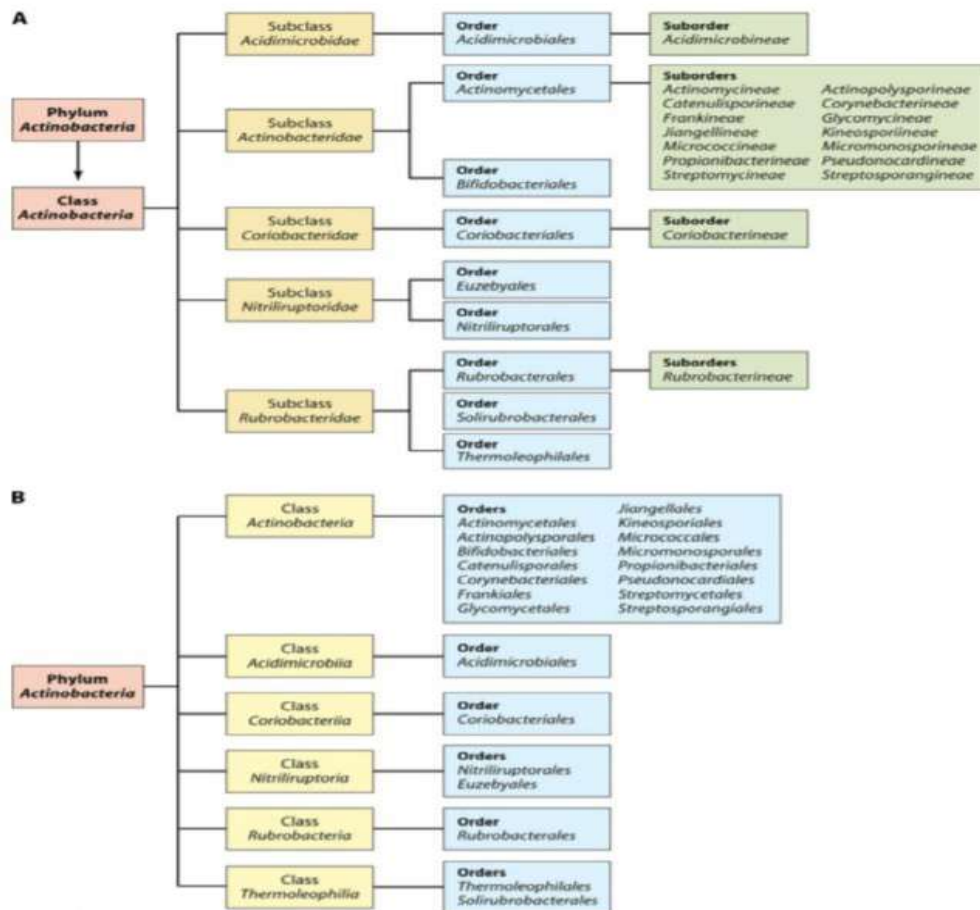


Figure n° 3. (A) Aperçu taxinomique actuel du phylum Actinobacteria figurant sur la liste des noms procaryotes ayant un statut dans la nomenclature. (B) proposition de taxonomie pour les actinobactéries dans le manuel Bergey'sof Systematic Bacteriology (GAO et GUPTA, 2012).

I.1.6. Importance

I.1.6.1.Eologique

Dans l'environnement, les actinobactéries jouent un rôle important dans le recyclage des substances, car ils sont capables de métaboliser des matières organiques complexes. Le

rôle écologique important joué par les actinobactéries est démontré par leur capacité à éliminer les composés xénobotiques, tels que les pesticides et les métaux lourds, et autres substances. (ALVAREZ *et al.*, 2017).

I.1.6.2. Pharmaceutiques

Les actinomycètes produisent approximativement 2/3 de des biomolécules. De nombreuses actinobactéries du sol synthétisent des substances antimicrobiennes, celles-ci montrent un rôle antagoniste élevé. 75% et 60% des antibiotiques produits par les actinomycètes sont utilisés respectivement en médecine et en agriculture, les streptomycètes sont à l'origine de 75% des antibiotiques produits. Le genre *Streptomyces* est considéré en réalité l'une des sources majeures des produits naturels. (LIC *et al.*, 2007), 60% des composés antifongiques et antibactériens et de phytohormones sont produits par *Streptomyces* (AMEUR, 2014)

I.1.6.3. Industrielle

Les actinobactéries produisent une variété d'enzymes avec une bonne stabilité à une température plus élevée et à un état alcalin. Les actinobactéries sont responsables de la digestion des glucides résistants tels que la chitine et la cellulose (ARUMUGAM *et al.*, 2017). Des espèces de *Streptomyces* produisent des amylases, d'autres sont capables de dégrader la lignine. *Streptosporangium sp.* isolé à partir des feuilles de maïs, produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon (HASEGAWA *et al.*, 2006). Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycétales, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, en monoglycérides, en glycérol et en acides gras. Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 65% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents (AMEUR, 2014).

I.1.6.4. Agriculture

Les actinobactéries effectuent des transformations des composés organiques. De nombreux genres d'actinobactéries peuvent être potentiellement utilisés dans la bioconversion des récoltes et déchets agricoles et urbains sous-utilisés en produits chimiques de haute valeur. Les actinobactéries sont également importantes dans le domaine de la biotechnologie végétale en effet, certaines sont utiles dans la lutte. Les souches à activité antagoniste contre les agents phytopathogènes sont utiles dans le cadre de la lutte biologique (ANANDAN *et al.*, 2016)

I.2. Polysaccharides

I.2.1. Définition des polysaccharides

Les EPS sont des polymères constitués d'unités de monosaccharides dont la nature et le degré de polymérisation varient selon la source. Les propriétés des EPS dépendent de la nature des monosaccharides, de la liaison glucosidique qui relie ces unités et leur poids moléculaire (**RINALDI, 2013**).

Les polysaccharides possèdent un squelette osidique pouvant comporter de plusieurs sucres. Lorsque le nombre de résidus est inférieur à 10, le composé se nomme alors oligosaccharide (**BERTIN, 2014**).

Un sucre peut présenter deux formes d'énantiomères L ou D. Un ose peut par ailleurs posséder deux niveaux de cyclisation (pyranose ou furanose) et deux formes anomériques α ou β . L'enchaînement en oses peut présenter une composition plus ou moins complexe que ce soit dans la composition en monosaccharides ou leurs branchements linéaires ou ramifiées. Cette composition peut éventuellement être diversifiée par des substituants organiques ou inorganiques, tels que des acides aminés, des sulfates ou encore des phosphates, greffés sur les sucres (**BERTIN, 2014**). Les EPS sont obtenues de différentes sources telles (**RINALDI, 2013**), les plantes (cellulose, pectine et amidon), les algues (alginate et carragène) et les bactéries (alginate, dextrane, gellane, pullulane et xanthane) (**JAISWAL et al., 2014**).

I.2.2. Polysaccharides bactériens

Les polysaccharides bactériens synthétisés et sécrétés dans l'environnement externe ou sont synthétisés de manière extracellulaire par des enzymes ancrées dans la paroi cellulaire désignées par l'EPS (**JAISWAL et al., 2014**). Ils peuvent être exposés à la surface de la cellule de manière plus ou moins lâche ou être libérés dans le milieu (**BERTIN, 2014**).

I.2.3. Classification des polysaccharides bactériens

I.2.3.1. Classification selon la composition et la structure

Selon la nature de leurs composants. Deux classes sont définies : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides (**BERTIN 2014**)

I.2.3.1.1. Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides (HoPS) sont constitués d'un monosaccharide (**JAISWAL et al., 2014**) (glucose, fructose ou galactose). Ils se divisent en quatre groupes selon le résidu impliqué dans la composition : les α -D-glucanes, les β -D- glucanes, les fructanes et les polygalactanes composés respectivement d' α -glucose, de β -glucose, de fructose et de galactose (**BERTIN, 2014**)

I.2.3.1.2. Hétéropolysaccharides

La plupart des exopolysaccharides d'origine bactérienne sont des hétéropolysaccharides (HéPS). Ils sont constitués de polymère contenant des sous-unités répétitives à longue chaîne de deux ou plusieurs monosaccharides (**BENHADRIA et al., 2017**) différentes, avec différents degrés de ramification. Les composants les plus couramment trouvés dans les EPS sont les pentoses à savoir (l'arabinose, le ribose et le xylose) et les hexoses (glucose, galactose, mannose, allose, rhamnose, fucose) les sucres aminés (D-glucosamine et D-galactosamine) ou les acides uroniques (D- acides glucuroniques, acides D-galacturoniques). Des alternatives organiques ou inorganiques telles que le sulfate, le phosphate, l'acide acétique, l'acide succinique et l'acide pyruvique peuvent également être présents (**ANDHARE, 2012**)

I.2.3.2. Classification selon leur localisation

Sur la base de leur localisation dans la cellule, les polysaccharides microbiens sont divisés en (**ANDHARE, 2012**) :

- Polysaccharides structuraux ou pariétaux,
- Polysaccharides capsulaires (CPS),
- Exopolysaccharides (EPS) ou « slime » (**BERTIN, 2014**) (fig 04).

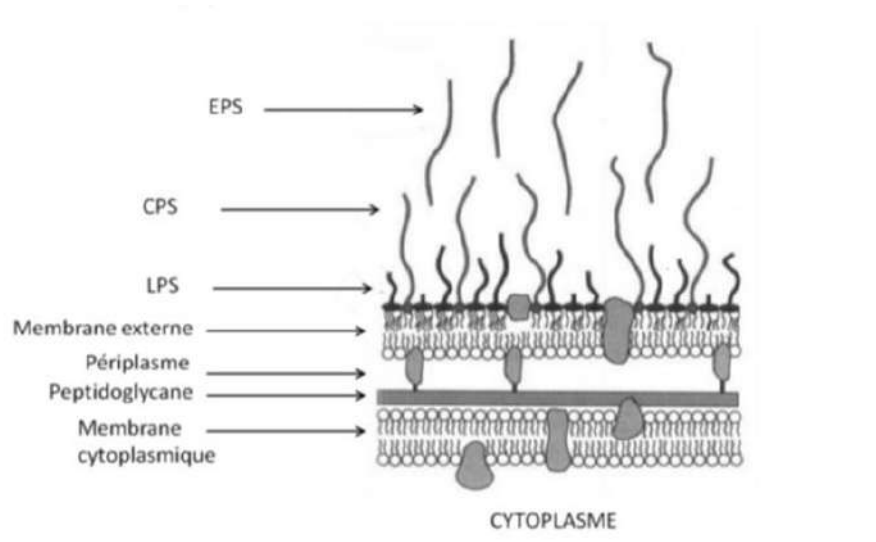


Figure n° 4. Architecture de surface d'une bactérie à Gram négative (BERTIN. 2012).

I.2.4. Exopolysaccharides

Le terme exopolysaccharide (EPS) a été inventé par (Sutherland, 1972) pour décrire des polymères d'hydrates de carbone de haut poids moléculaire produits par de nombreuses bactéries marines. Depuis lors, l'EPS a également été utilisé pour désigner des composés plus largement définis appelés substances polymères extracellulaires (ANDHARE *et al.*, 2012).

Les exopolysaccharides (EPS) sont des biopolymères structurellement et fonctionnellement précieux sécrétés par différents microorganismes procaryotes et eucaryotes (SATHIYANARAYANANA *et al.*, 2017). Les EPS sont généralement hétéropolymère (composé de différentes unités monomères), contenant des composants non sucres comme l'acide uronique, les esters méthyliques, les sulfates, les pyruvates, les protéines, les acides nucléiques et les lipides (JAISWAL *et al.*, 2014). Ces biopolymères sont principalement composés d'hydrates de carbone, le glucose, le galactose et le mannose étant les monomères les plus courants, d'autres sucres neutres par exemple le rhamnose et le fucose, certains acides uroniques, principalement les acides glucuronique et galacturonique et les sucres aminés N-acétylamine sont également fréquemment présents (FREITAS *et al.*, 2011).

I.2.5. Biosynthèse des EPS

La biosynthèse des EPS bactériens est un processus complexe impliquant un grand nombre d'enzymes et de protéines régulatrices (JAISWAL *et al.*, 2014). Elle se produit dans différentes phases de croissance, dépend de conditions environnementaux. (MADHURI et PRABHAKAR, 2014)

La voie de biosynthétique est divisée en (MADHURI et PRABHAKAR, 2014) quatre arrêts majeurs de réaction distinctes (JAISWAL *et al.*, 2014). Il s'agit du transport du sucre dans le cytoplasme, de la synthèse des sucres-1-phosphates, de l'activation et du couplage des sucres et des processus impliqués dans l'exportation de l'EPS (MADHURI et PRABHAKAR, 2014).

La biosynthèse des EPS, commence par le transport du sucre à partir du milieu environnant (MADHURI et PRABHAKAR, 2014). Chez les bactéries à Gram négative, le phosphate d'undécaprényle est un support lipidique pour l'assemblage d'EPS. L'assemblage de l'unité récurrente basique se produit au niveau de la membrane cytoplasmique et implique le transfert séquentiel des précurseurs de nucléotides de sucre diphosphate à un support lipidique isoprénoïde, l'undécaprényl phosphate (MADHURI et PRABHAKAR, 2014). Une fois que l'unité de répétition de base est assemblée, les intermédiaires liés aux lipides sont généralement transférés à travers la membrane et polymérisés à l'extérieur de la cellule. Ensuite, l'EPS peut être lié de manière covalente à la surface cellulaire pour former une capsule, ou libéré dans le milieu sous forme de *slime*. Le phosphate d'undécaprényle joue également un rôle important dans la biosynthèse de l'EPS chez les bactéries Gram positives (MADHURI et PRABHAKAR, 2014).

Les HoPS sont synthétisées par des enzymes extracellulaires qui sont sécrétées par les bactéries ou situées à la surface cellulaire où la synthèse de HePS est complexe. Ils sont produits en utilisant des précurseurs formés de manière intracellulaire au niveau de la membrane cytoplasmique (MADHURI et PRABHAKAR, 2014).

I.2.6. Rôle physiologique des EPS

Le rôle physiologique des EPS est influencé par l'habitat du micro-organisme producteur et les niches écologiques (ANDHARE *et al.*, 2012). Ils peuvent également être

impliqué dans l'adhésion aux surfaces et la formation de biofilm et aux mécanismes d'adhésion / reconnaissance cellulaire (JAISWAL *et al.*, 2014).

L'EPS permet également la protection des micro-organismes contre les stress environnementaux tels que les toxines (ANDHARE *et al.*, 2012) de la dessiccation, de l'invasion des métaux toxiques, des antibiotiques, de la phagocytoseetc. (RAWAL, 2016). Ainsi, ils forment une couche protectrice pour les cellules contre les conditions environnementales externes difficiles telles que les températures élevées et basses, la salinité, les radiations, les pH élevés et bas,etc. (ANDHARE *et al.*, 2012)

I.2.7. Production des EPS par les actinobactéries

La production d'EPS dépend de la souche bactérienne et des conditions de culture : la température, le pH du milieu et la concentration du sel (FREITAS *et al.*, 2011).

I.2.7.1. Température

La température affecte considérablement la croissance et le métabolisme des actinomycètes (XIONGA *et al.*, 2019). Une étude montrée que la production maximale d'EPS (0,08 g/L) de *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 518 se produisait à 28 °C. De plus, la souche était encore capable de produire des EPS à des températures plus ou moins élevées, ce qui peut être liée à sa nature auto-adaptative à une large plage de températures (XIONGA *et al.*, 2019). Une autre étude montrée que, la production maximale des EPS chez *Streptomyces violaceus* MM72 a été déterminée à 30 °C, après cette valeur, une tendance à la baisse a été observée.

Auparavant, de nombreux chercheurs ont été rapporté que les EPS ne sont produits que dans les plages de températures de 24 à 35 °C (MANIVASAGANA *et al.*, 2013).

I.2.7.2. PH

Le pH est un facteur physique essentiel dans la biosynthèse des EPS qui peut affecter l'absorption de divers nutriments et la biosynthèse des EPS (ARUN *et al.*, 2014). Une souche a présenté un meilleur rendement d'EPS dans un environnement alcalin. La production maximale d'EPS de cette souche a été détectée étaient à pH de 7,5 (XIONGA *et al.*, 2019),

après cette valeur, une diminution de la production d'EPS est observée (MANIVASAGANA *et al.*, 2013).

I.2.7.3. Salinité

Les actinobactéries sensibles au chlorure de sodium peuvent augmenter leur tolérance à des concentrations plus élevées (MANIVASAGANA *et al.*, 2013). L'augmentation de la salinité dans le milieu entraîne une augmentation de la production d'EPS (CHAMBI *et al.*, 2021).

I.2.8. Importance et application des EPS :

Les EPS bactériens sont largement applicables dans diverses industries telles que les secteurs médical, pharmaceutique, alimentaire, cosmétiqueetc. en raison de leurs propriétés de matériaux commercialement pertinentes (SATHIYANARAYANANA *et al.*, 2017).

I.2.8.1. Pharmaceutique

De nos jours, les polysaccharides bactériens sont utilisés comme immuno-stimulateurs, immuno-modulateurs, comme antitumoraux, agents antiviraux, anti-inflammatoires et antioxydants dans diverses industries médicales et pharmaceutiques (RAWA *et al.*, 2016).

En raison de leurs propriétés uniques et réglables, plusieurs EPS bactériens jouent un rôle important dans le développement de nouveaux produits pharmaceutiques, non seulement en raison de leur capacité à former des matrices polymères, mais également en raison de leur activité biologique inhérente. Par exemple, le xanthane, le dextrane sulfaté et le l'eurdlan sulfaté sont utilisés comme agents antiviraux et anticancéreux (FREITAS *et al.*, 2011).

D'autre part, l'encapsulation des médicaments par les EPS est une méthode viable pour les protéger de l'hydrolyse et pour faciliter leur libération contrôlée ou prolongée. Les EPS sont largement utilisées pour préparer des films polymères, en particulier des revêtements comestibles pour les produits alimentaires et des applications d'emballage (SATHIYANARAYANANA *et al.*, 2017).

I.2.8.2. Cosmétologie

En cosmétologie, les EPS sont largement utilisées dans les crèmes et lotions comme hydratants car ils ont une plus grande capacité de rétention d'eau et améliorent ainsi l'hydratation de la peau, Ils sont utilisé dans l'hydrogel dans les tissus de soins de la peau, où ils sont implantés dans les tissus pour conférer des effets hydratants, blanchissants, éclaircissants et même anti-âge sur la peau humaine (ANDHARE *et al.*, 2012).

I.2.8.3. Industrie alimentaire :

Les EPS confèrent un grand potentiel d'utilisation dans l'industrie alimentaire, à savoir comme épaississant, stabilisant, émulsifiant ou liant comme dans les glaçages, les confitures, les gelées, pâtisseries, fromage, sauces, aliments pour animaux de compagnie, vinaigrette, ...etc. (ANDHARE *et al.*,2012). Les EPS comme le pullulane, sont utilisés en remplacement partiel de l'amidon dans les pâtes ou les produits de boulangerie. Les solutions de pullulane sont de viscosité relativement faible, utilisées dans les boissons et les sauces (ANDHARE *et al.*, 2012). Les EPS sont largement utilisées pour préparer des films polymères, en particulier des revêtements comestibles pour les produits alimentaires et des applications d'emballage (SATHIYANARAYANANA *et al.*, 2017).

I.2.8.4. Industries textiles

Dans les industries textiles, les EPS sont utilisées comme liant avec des colorants ou de l'hydrogel en raison de ses propriétés telles que la viscosité, le stabilisant et sa capacité de réticulation avec les tissus. Les tissus intelligents sont l'une des nouvelles applications des EPS (ANDHARE *et al.*, 2012).

I.2.8.5. Agriculture

La fertilité et la productivité des sols peuvent être améliorées par l'accumulation de bactéries productrices des EPS dans la rhizosphère des plantes cultivées, puisque les bactéries productrices d'EPS sont impliquées dans le sol adhérent aux racines, l'eau ainsi que le flux de nutriments à travers les racines des plantes. Les rendements très élevés observés dans la croissance des pousses et des racines des plantes en raison de l'inoculation bactérienne produisant des EPS (ANDHARE *et al.*, 2012).

I.2.9. Activité antimicrobienne

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (**BEN ABDALLAH1 et al., 2019**). La résistance accrue des microorganismes aux antimicrobiens actuellement utilisés a conduit à l'évaluation d'autres agents qui pourraient avoir une activité antimicrobienne (**SA PAULO et al., 2010**). Le EPS a montré une activité antimicrobienne par inhibition de différentes bactéries pathogènes et fongiques. Cette activité antibactérienne est exploitée pour différentes applications pharmaceutiques (**ABDRABO et al., 2018**).

Chapitre II
Matériel et méthodes

II.1. Objectif de l'étude

La présente de notre travail s'oriente sur l'étude des EPS sécrétées par trois souches d'actinobactéries isolées du sol de la région d'Ouaragla.

Notre étude porte sur :

- L'extraction des EPS.
- Optimisation des conditions de production
- Evaluation l'activité antimicrobien des EPS sécrétées par les souches isolées.

II.2. Matériel biologique

Les souches d'actinobactéries utilisées pour réaliser nos travaux pratiques ont été fournies par M^{me} Bouaziz S. Elles ont été isolées à partir du sol de la région de Ouargla, l'isolement a été effectué sur 2 milieux solides ; Milieu Williams et Kuster (M2) et le milieu Bennett (annexe 01).

Les souches isolées ont été purifiées et conservées en gélose inclinée sur les mêmes milieux d'isolement recouverts d'huile de paraffine, pour une bonne et longue conservation. Il s'agit des souches ayant pour code **ITA1, I4 et AB26**.

II.3. Repiquage des souches sur milieu solide

Les souches sélectionnées sont ensemencées en stries serrées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu M2 et Bennett, puis incubées à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 7 à 10 jours (**JUBI et al., 2017**).

II.4. Culture des souches sur milieux liquide

Les spores raclées à partir des inoculums en boîtes de Pétri incubées de 7 à 10 jours sont mises en cultures dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu M2 et Bennett liquide pendant 10 jours d'incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous agitation de 200 à 240 rpm.

II.5. Extraction des polysaccharides extracellulaire

Une centrifugation à 5000 rpm/10 min à 4°C a été réalisée, à la suite de laquelle 2 volumes d'éthanol sont ajoutés dans chaque surnageant de culture récupéré pour précipiter les EPS synthétisés. Les mélanges sont ensuite maintenus durant toute la nuit à 4°C . Après

précipitation à l'éthanol, une deuxième centrifugation à 7000 rpm /30 min à 4°C est effectuée. Les culots récupérés sont suspendus dans de l'eau distillée (HENNANE et KARI, 2013)

II.6. Dosage des exopolysaccharides

La quantité d'EPS est déterminée par le taux de sucres contenus dans les précipités en utilisant la méthode de Dubois et al. (1956) : dosage des sucres totaux phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme standard (HENNANE et KARI, 2013).

Le principe de la méthode consiste qu'en milieu acide et à chaud, les liaisons glycosidiques des sucres sont hydrolysées. Les oses simples ainsi libérés subissent une déshydratation intramoléculaire pour des dérivés furfuraux (furfural et hydroxyméthyl furfural). La fonction aldéhyde des furfuraux se condense ainsi en milieu acide avec l'hydroxyl d'un composé phénolique pour donner des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent dans le visible de 450 à 500 nm (HENNANE et KARI, 2013).

II.7. Effet du pH, de la température et du NaCl sur la production des EPS

Pour étudier les effets du pH, de la température et du NaCl sur la production d'EPS, on a utilisé un Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de culture. Les cultures ont été incubées à différentes températures 05 °C, 15 °C et 45 °C, à différents pH à savoir 3,5 et 9 et différentes concentrations en NaCl 0,5%, 2,0% et 4,0%, les erlenmeyers sont ensuite incubés à 28 °C pendant 7 jours et à 200 rpm. Les quantités des EPS obtenus ont été déterminées par la méthode de phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme standard (PANCHANATHAN et al., 2013).

II.8. Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des extraits des EPS des différents isolats d'actinobactéries

L'activité antimicrobienne des extraits d'EPS sécrétés par les souches d'actinobactéries a été évaluée par la méthode des disques vis à vis cinq microorganismes pathogènes à savoir : *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* MRSA9314, *Pseudomonas aeruginosa* ACC9027 et *Fusarium sporotrichioides*, l'activité a été évaluée quantitativement en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions après 24h pour les bactéries et 72h pour les champignons.

II.8.1. Standardisation des inoculas

Pour utiliser une charge identique pour tous les microorganismes cibles, il est nécessaire de standardiser tous les inoculas. A partir d'une culture de 18h sur milieu Muller Hinton, une suspension dans l'eau physiologique de chaque bactérie cible est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0,5 McFarland (une densité optique égale à 0,5 à 650 nm) de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/ml après incorporation dans le milieu (CAVALLA et EBERLIN, 1994).

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, un écouvillon est trempé dans la suspension et son contenu est étalé à la surface entière de la gélose Mueller Hinton à trois reprises.

II.8.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits des EPS

Des disques de papier Wattman N°3 stériles de 5 mm de diamètre, imprégnés chacun de 10µl dissoute dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO), ou de solution mère (10 mg/10ml) ou de solution fille (gamme de concentration de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16), correspondant respectivement à 1000, 500, 250, 125 et 62.5 µg d'extraits par disque, sont déposés à l'aide d'une pince à la surface du milieu gélosé. Ils doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement au-dessus de la surface des disques (HADJADJ, 2017). Les boîtes de Pétri sont d'abord maintenues pendant 2h à 4°C au réfrigérateur pour une prédiffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h pour les bactéries et 72 h pour les champignons. Tous les essais sont répétés trois fois.

II.8.3. Expressions des résultats

A la sortie de l'étuve, l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour du disque d'un halo translucide correspondant à l'absence de la croissance bactérienne. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi et al., 2006). La lecture s'effectue

par la mesure du diamètre d'inhibition observé et les résultats sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type.

II.9. Analyse statistique

Toutes les analyses sont effectuées en triple exemplaire et les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm d'écart type des trois mesures parallèles.

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1. Rendement de l'extraction

Le tableau ci-dessous illustre les résultats de rendement et les propriétés des extraits bruts des exopolysaccharides sécrété par les souches **AB26**, **ITA1** et **I4**.

Tableau II. Rendement et caractéristiques des exopolysaccharides sécrété par les souches **AB26**, **ITA1** et **I4**.

Souches	Aspect	Couleur	Rendement (%)
AB26	Pâteux	Brune	0,29
ITA1	Pâteux	Brune	0,10
I4	Pâteux	Blanchâtre	0,02



AB26



ITA1



I4

Photo 01. Extrait brut des exopolysaccharides des souches **I4**, **ITA1** et **AB26**.

D'après les résultats de **tableau n° II**, les exopolysaccharides (EPS) sécrété par les souches **AB26**, **ITA1** et **I4** ont un aspect pâteux et de couleur brune et blanchâtre.

Le rendement relatif est calculé par rapport au volume du milieu de culture liquide (**BEJAR et al., 1998**). Il apparait que le rendement massique de les extraits des EPS sécrété par les trois souches est varié, il est de l'ordre de **0,29%** enregistré chez la souche **AB26**, de **0,08%** chez la souche **ITA1** et une valeur de **0,02%** est enregistrée chez la souche **I4** (**Tableau n° II**)

Discussion

D'après les résultats obtenus, le rendement massique de l'extraction d'EPS sécrété par la souche **AB26** est estimé à **0,29%**, ce résultat est similaire à celui rapporté par (**XIONG et**

al., 2019), qui ont travaillé sur l'action bactérie *Glutamicibacter halaphytocola* KLBMP5180. Tandis qu'il est supérieur à celui rapporté par (ROSAN et HAMMOND, 1974) qui ont trouvé un rendement de **0,01%** à partir de *Actinomyces iscosus* actinomycète marine.

Le rendement de l'extrait d'EPS sécrété par la souche **ITA1** est estimé à **0,08%**, ce résultat est inférieur à celui rapporté par (XIONG *et al.* 2019) qui est de **0,29%**, et supérieur de celui trouvé par (ROSAN et HAMMOND, 1974), qui est estimé par **0,01%**.

Le rendement de l'extrait d'EPS sécrété par la souche **I4** est proche à celui rapporté par (ROSAN *et HAMMOND*, 1974) (**0,01%**) et celui des souches **AB26** et **ITA1**.

D'autre part (MANIVASAGAN *et al.*, 2013), ont trouvé des rendements compris entre **1,58%** à **5,64%** à partir de *Streptomyces violaceus* MM72 actinobactérie marin, ces valeurs sont plus élevées à ceux trouvés dans la présente étude.

La variation du rendement des EPS obtenus est influencée par les conditions de culture à savoir, le pH, la température, le temps d'incubation et la composition du milieu (CAGGIANIELLO *et al.*, 2016)

III.2. Dosage des EPS par la méthode de Dubois (1956)

Les résultats de dosage des EPS des extraits bruts sécrétés à partir des souches **AB26**, **ITA1** et **I4** sont résumés dans la figure n° 05

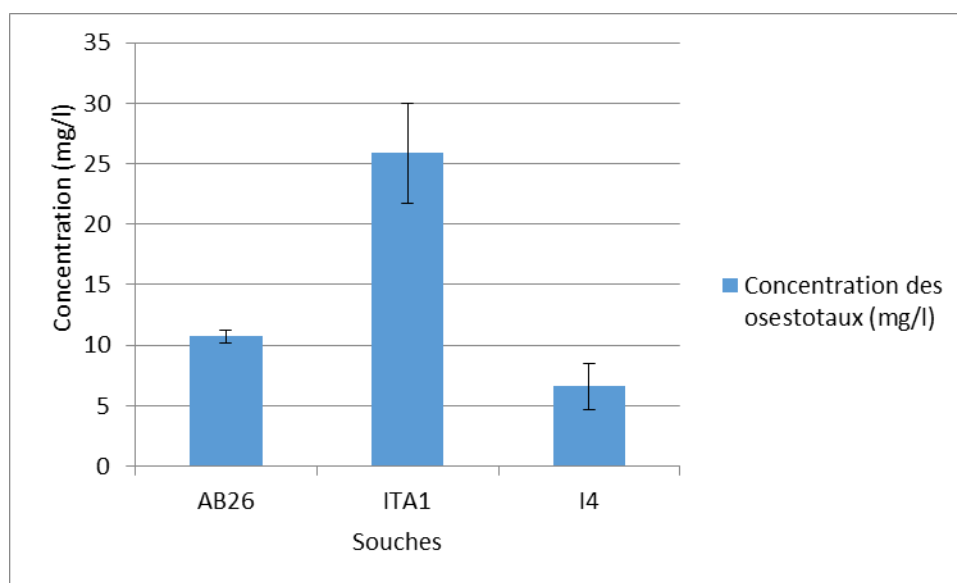


Figure n° 5. Teneurs en oses totaux de les souches **AB26**, **ITA1** et **I4**.

Les teneurs en exopolysaccharides des extraits obtenus sont variées entre les trois souches, la concentration la plus faible est enregistrée chez la souche **I4** avec une teneur de **6,60±1,92 mg/l**, suivi de la souche **AB26** avec une teneur de l'ordre de **10,75±0,54 mg/l** et en fin la concentration la plus élevée est observé chez la souche **ITA1** avec une teneur totale en ose de **25,87±4,15 mg/l**.

Discussion

D'après les résultats obtenus (**figure n° 05**) on remarque que la teneur des EPS des différentes souches est variable. La souche **ITA1** possède un teneur des oses élevés de l'ordre de **25,87± 4,16mg/l (33,60%)** par rapport à la souche **AB26** qui représente une teneur de **10,76±0,54mg/l (3,60%)** et la souche **I4** qui a une teneur des oses de **6,61± 1,93 mg/l (31,46%)**, et qui représente la teneur la plus faible. Ces valeurs sont inférieures à ceux trouvées par (**SIVASSKARET et al. 2018**), (**62,4%**) chez la souche *Streptomyces violaceus* MM72, actinobactérie marine. Alors que (**BEJOR et al., 1998**) ont signalé des teneurs comprise dans un intervalle de (**20%**) à (**50,4%**) chez la souche *Halomonas eunrchehnce*, bactérie halophile. Ces valeurs sont inférieurs a ceux obtenu (**SAVGOADO.2004**) avec les souches *Streptococcus thermophilus (35%)* et *Lactobacillus lactis sub. Sp.cremoris (80%)*.

La teneur faible au oses totaux de la souche **I4**, peut être dû au temps d'incubation insuffisant et de la nature de source de carbone (**JAIWAL et al., 2014**).

D'autre part (**SIVASSKARET et al., 2018**), ont indiqué que les quantités des EPS produites par les bactéries lactiques sont supérieur à celle du polymère produit par des autres bactéries non lactiques.

III.3. Effet du pH, de la température et du NaCl sur la production des EPS

Les effets du pH, de température et différentes concentrations en NaCl ont été réalisé sur le rendement et la teneur en EPS des différentes souches d'actinobactéries étudiées. Les souches **I4**, **ITA1** et **AB26** ont été incubé dans les milieux liquide M2 et Bennet pendant 07 jours à **28°C ± 02°C** et **200rpm/mn** et cela à différents pH : **3**, **5** et **9**, différentes températures à savoir **5°C**, **15°C** et **45°C** et a différentes concentrations en NaCl : **0,5%**, **02%** et **04%**.

III.3.1. Effet de différents paramètres sur le rendement

III.3.1.1. Effet du pH sur le rendement

Les résultats de l'effet du pH sur le rendement des EPS sont illustrés dans le tableau IV

Tableau III. Rendement des EPS en fonction du pH.

PH	I4	AB26	ITA1
Témoin (7.3)	0,02%	0,29%	0,10%
03	1.86%	1.22%	0.45%
05	0.05%	0.8%	3.39%
09	0.78%	1.66%	2.58%

D'après les résultats obtenus, il est remarqué que :

- **Au pH 3** : le rendement d'EPS de la souche **I4** est de **1,86%**, pour la souche **AB26**, il a été signalé un rendement de **1,22%** et **0,45%** pour la souche **ITA1**.
- **Au pH 5** : le rendement d'EPS chez la souche **I4** est de l'ordre **0,05%**, de **0,8%** chez la souche **AB26** et pour la souche **ITA1**, il a été estimé un rendement de **3,39%**.
- **Au pH 9** : Les résultats ont montré que les souches **AB26** et **ITA1** ayant des rendements de l'ordre de **1,66%** et de **2,58%** pour la souche **I4**.

Il est remarqué une augmentation considérable dans le rendement a différente pH de tous les souches par rapport aux résultats principales obtenus.

III.3.1.2. Effet de la température sur le rendement

Les résultats de l'effet de température sur le rendement sont résumés dans le tableau V

Tableau IV. Rendement des EPS en fonction de la température

Temperature (°C)	I4	AB26	ITA1
Témoin (28)	0,02%	0,29%	0,10%
05	0.05%	0.07%	2.57%
15	0.64%	0.22%	0.63%
45	1.37%	137%	2.59%

D'après le tableau, il est observé :

- A température 5°C : le rendement d'EPS est de **2,75%** observé chez la souche **ITA1**, de **0,07%** chez la souche **AB26** et de **0,05%** chez la souche **I4**.
- A température 15°C : un rendement d'EPS enregistré de **0,64%** chez la souche **I4**, de **0.63%** chez la souche **ITA1** et de **0,22%** chez la souche **AB26**.
- A température 45°C : Le rendement d'EPS a considérablement augmenté au niveau des trois souches, il est estimé de **1,37%** chez la souche **I4**, de **1,15%** chez la souche **AB26** et de **2,59%** chez la souche **ITA1**.

Selon les résultats précédents, on ressort qu'il y a une augmentation considérablement au niveau de rendement par rapport au résultat primaire surtout au niveau de température 45°C, donc il y a proportionnalité directe entre la température et taux de rendement.

III.3.1.3. Effet de la concentration en NaCl sur le rendement

Le tableau VI regroupe les résultats de l'effet de différentes concentrations en NaCl sur le taux de rendement.

Tableau V. Rendement des EPS en fonction de concentration de NaCl.

NaCl (%)	I4	AB26	ITA1
Témoin (0.2)	0,02%	0,29%	0,10%
0.5	0.78%	0.79%	0.09%
02	0.02%	1.46%	1.78%
04	1.36%	1.44%	1.04%

Selon le tableau VI, il est observé le suivant :

- A concentration de **0,5%** en NaCl : le rendement de production d'EPS est chez la souche **AB26** est de **0,79%**, de **0,78%** chez la souche **I4** et chez la souche **ITA1**, le rendement d'EPS est estimé à **0,09%**.
- A concentration de **02%** en NaCl : Le rendement d'EPS est estimé de **1,46%** chez la souche **AB26** et **1,78%** chez la souche **ITA1**. Par contre est faible de l'ordre de **0,02%** observé chez la souche **I4**.
- A concentration de **04%** en NaCl : un rendement élevé enregistré chez les 03 souches estimées de **1,36%** chez la souche **I4**, de **1,44%** chez la souche **AB26** et de **1,04%** chez la souche **ITA1**.

Les résultats obtenus on permit de ressortir, une augmentation importante au niveau de rendement chez tous les souches à la concentration **4%** en NaCl.

III.3.2. Effet de différents paramètres sur la teneur des EPS

Les résultats des teneurs en EPS de différentes souches d'actinobactéries sont enregistrés dans les Figures 06, 07 et 08.

III.3.2.1. Effet du pH sur la teneur des ESP

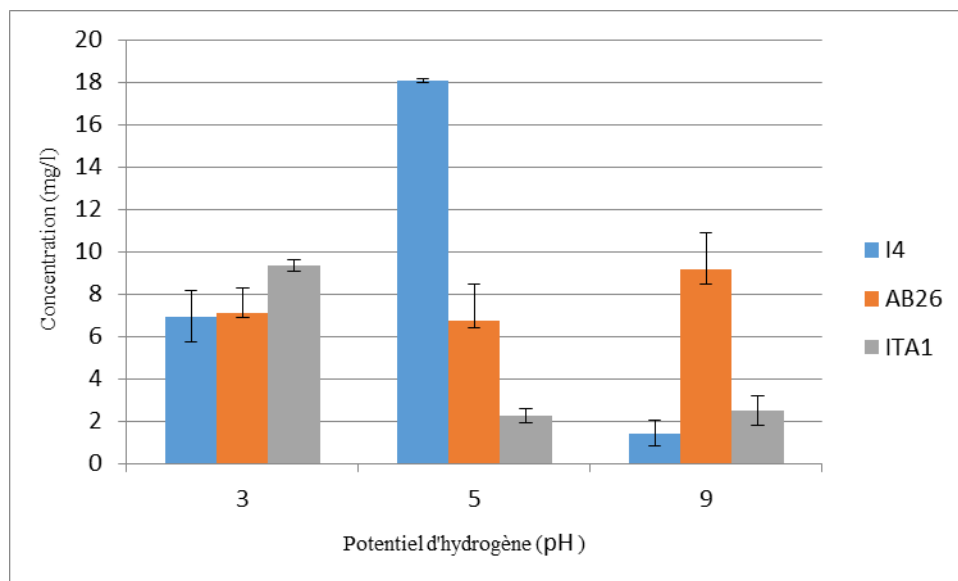


Figure n° 6. Effet du pH sur la teneur en EPS.

D'après les résultats obtenus (Figure n° 06), on remarque que : à **pH 3**, les teneurs d'EPS sécrétés par les trois souches sont faibles par rapport aux résultats primaire obtenu, il est estimé de **6,95±1,2 mg/l** chez la souche **I4**, de l'ordre de **7,13±1,18 mg/l** chez la souche **AB26** et de **9,34±0,25 mg/L** chez la souche **ITA1**. Ainsi qu'à **pH 5** le teneur d'EPS est de **6,77±1,71 mg/l** chez la souche **AB26**, et chez la souche **ITA1**, elle est de **2,25±0,35 mg/l**. Par contre, le teneur d'EPS est augmenté chez la souche **I4**, elle est de **18,06 ±0,08 mg/l**.

A **pH 9**, on observe que le teneur en oses est diminué chez les trois souches : elle est de **1,43±0,61 mg/l** chez **I4**, chez **AB26**, elle est de **9,19±1,71 mg/l** et chez la souche **ITA1**, elle est de **2,59±0,72 mg/l**.

III.3.2.2. Effet de température sur la teneur des EPS

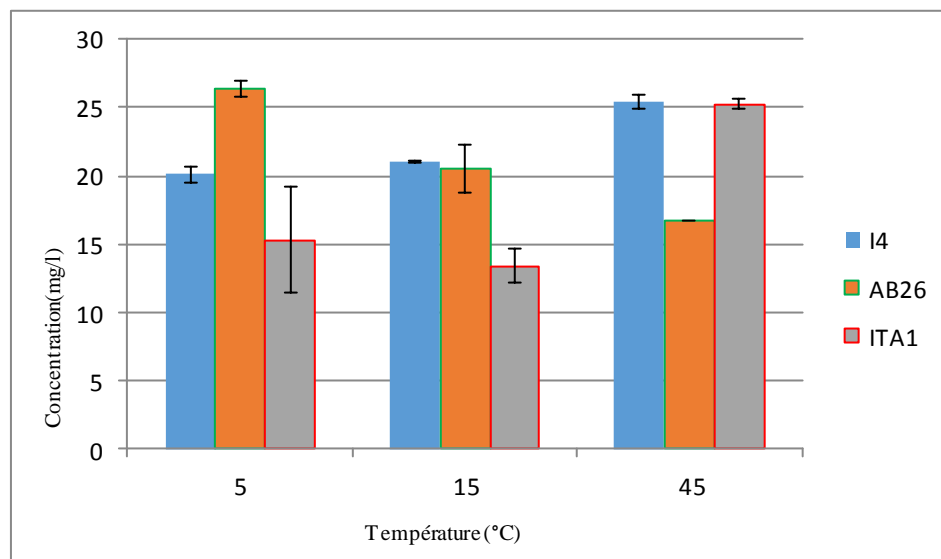


Figure n° 7. Teneur en EPS en fonction de la température.

Les résultats de l'effet de température sur teneur d'EPS sécrété par les souches d'actinobactéries sont illustrés dans la figure n° 07.

La Figure n° 07 montre que, chez la souche **I4** à température **5°C**, la teneur en oses a été estimée par **22,11±0,16 mg/l**. Ces valeurs ont augmenté avec l'augmentation de la température, elles sont de **21,05±0,07mg/l** à **15°C** et **25,37±0,52mg/l** à **45°C**. De même pour la souche **ITA1**, la teneur en oses augmente progressivement selon la température, elle est de

15,30±3,84 mg/l à **05°C** et de **25,26±0,36 mg/l** à **45°C**, avec une diminution à **15°C** à **13,36±0,37 mg/l**. Par contre, la teneur aux oses chez la souche **AB26** diminue avec l'augmentation de la température, elle est de **26,39±0,55 mg/l** à **05 °C**, **20,53±1,71 mg/l** à **15°C** et **16,68±0,00 mg/l** à **45°C**.

III.3.2.3. Effet de la différente concentration en NaCl sur la teneur en EPS

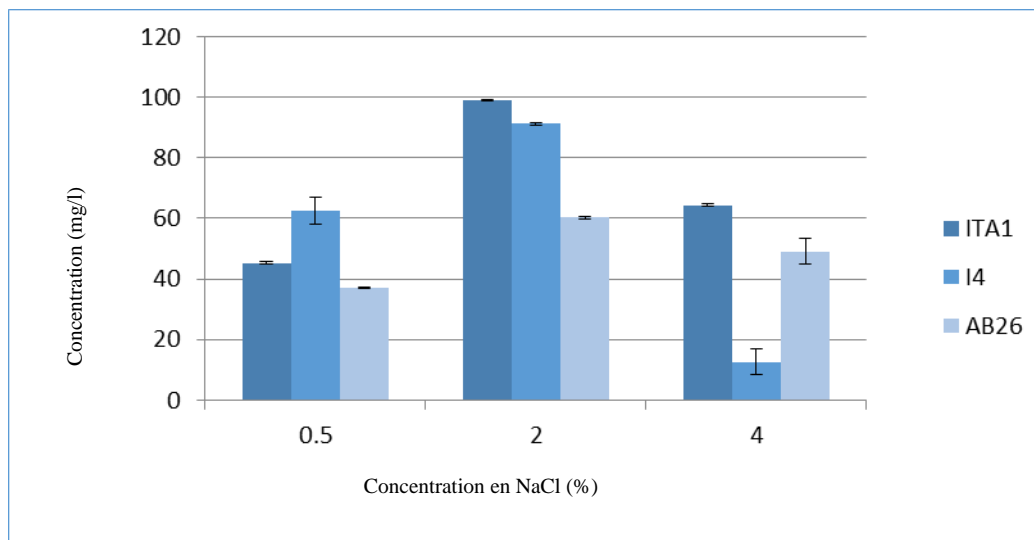


Figure n° 8. Effet de différentes concentrations en NaCl sur la teneur des EPS.

L'analyse de la figure n° 08 montre que le teneur maximal des oses est obtenu à concentration **2%** de NaCl, elle est de **99,07±0,9 mg/l** chez la souche **ITA1**, de **91,21±0,38 mg/l** chez la souche **I4** et de **60,28±0,4 mg /l** chez la souche **AB26**. A concentration **0,5 %** en NaCl, une teneur des oses moins élevé que celle note à **2%**. Elle atteinte une valeur de **45,31±0,44 mg/l** chez la souche **ITA1**, de **62,52±4,48mg /l** chez la souche **I4** et **37,09±0,13 mg/l** chez la souche **AB26**. A concentration **2%** en NaCl, une diminution remarquable aux teneurs des oses atteinte la valeur **64,39±0,55mg/l** chez la souche **ITA1**, **12,54±4,21 mg/l** chez la souche **I4** et **48,14±4,19 mg/l** chez la souche **AB26**, mais comme même, elle reste plus élevée par rapport aux valeurs normale.

Discussion générale

Selon (**MANIVSAGONA et al., 2013**), la teneur en oses secrété par la souche *Streptomyces violaceus* MM72 actinobactérie marine, a été déterminé à **30°C**, le taux de production d'EPS est diminué.

Par contre nos résultats montrent qu'il y a une augmentation considérablement au niveau de rendement par rapport au résultat primaire surtout au niveau de température à **45°C**, donc il y a proportionnalité directe entre la température et taux de rendement sauf pour la souche **ITA1** à **15°C (1,43±0,61mg/l)**. Cela peut être due aux plusieurs facteurs tels que les espèces utilisées, les conditions de culture et l'âge des cultures.

Les résultats de (**RAUAL *al.*, 2016**) montre que la production d'EPS est plus faible à pH alcalin ou acide et plus élevée à pH proche de la neutralisation, chez la souche **P11**, la production d'EPS est estimée à **4,2 à 4,6 g/l** à pH **6 à 8**.

Les travaux de (**CHOMBI *et al.*, 2021**), montrent que la concentration élevée de NaCl résultant une production d'EPS plus élevée chez la souche **BU-4** bactérie halophile. Ces résultats sont similaires à nos résultats et à ceux rapporté par (**RAUAL *et al.*, 2016**), qui ont affirmés que la production maximale d'EPS (**4,5 g/L**) chez la souche **P11**

Dans la présente étude, une meilleure production des EPS a été enregistrée à une concentration de **02%** en NaCl, la température optimale est **5°C** et **45°C** avec pH optimal **7,3**.

La production d'EPS est largement utilisée comme une stratégie de réponse utilisées par les microorganismes pour résister aux stress environnementaux, tel que : la température, le pH et de la salinité (**CHOMBI *et al.*, 2021**). La diminution de la production d'EPS à pH alcalin ou acide due à une désactivation de l'activité enzymatique et de la production d'EPS (**RAUAL *al.*, 2016**) L'augmentation de NaCl favorise la production de nouveau métabolite chez les actinobactéries (**MANIVSAGONA *et al.*, 2013**)

III.4.Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des extraits d'EPS de différents isolats d'actinobactéries

L'activité antimicrobienne des extraits d'EPS sécrétés par les souches d'actinobactéries a été évaluée par la méthode des disques sur un panel de cinq microorganismes pathogènes à savoir : *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* MRSA9314, *Pseudomonas aeruginosa* ACC9027 et *Fusarium sporotrichioides*, l'activité a été évaluée quantitativement en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions après 24h pour les bactéries et 72h pour les champignons. Les résultats de l'activité antimicrobienne sont résumés dans les tableaux suivants : ont été insérés dans les figures n°10, 11 et 12.

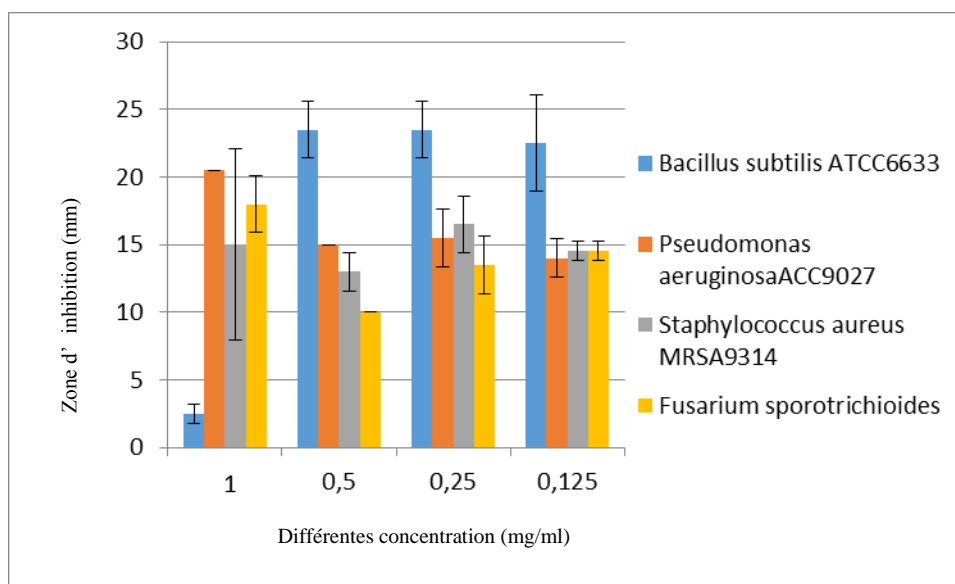


Figure n° 9. Activité antimicrobienne de l'extrait d'EPS de la souche **AB26**

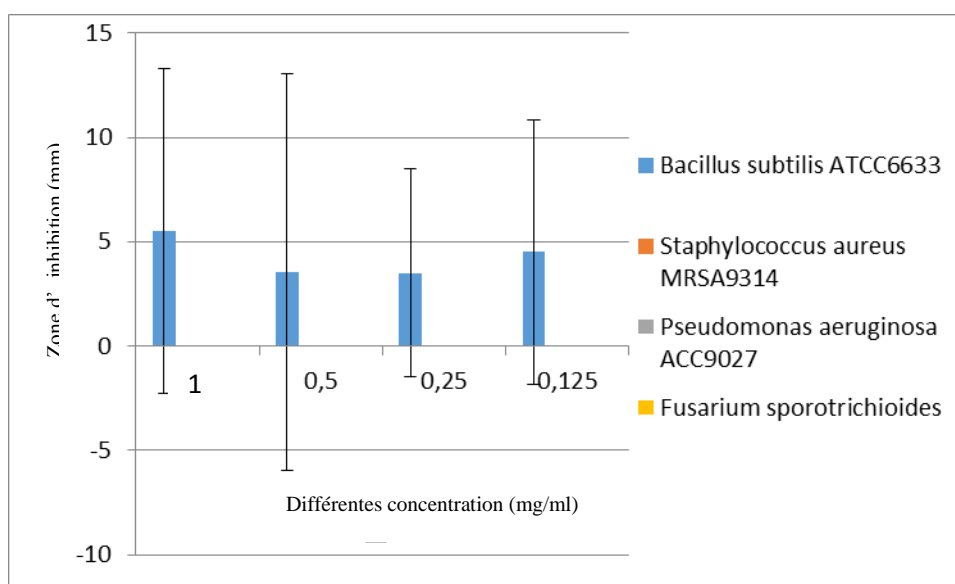


Figure n° 10. Activité antimicrobienne de l'extrait d'EPS de la souche **I4**.

Les résultats d'activité antimicrobienne révèlent des zones d'inhibition qui varient entre une minimale de $3,50 \pm 5$ mm enregistrée chez la souche **I4** contre *Bacillus subtilis* ATCC6633 et un maximale de $23,50 \pm 2,12$ mm observée chez la souche **AB26** vis-à-vis la même souche.

D'après les résultats obtenus (**Figure 11**), nous avons noté que l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ACC9027 est sensible aux différentes concentrations de l'extrait d'EPS sécrété par la souche **AB26**, dont les diamètres des zones d'inhibition enregistré sont de $20,50 \pm 0,00$

mm, $15,00 \pm 0,00$ mm, $16,50 \pm 2,12$ mm et $22,50 \pm 3,54$ mm correspond aux concentrations 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25mg/ml et 0,125mg/ml respectivement.

L'extrait d'EPS sécrété par la souche **AB26** présente une activité inhibitrice importante vis-à-vis *Bacillus subtilis* ATCC6633 avec un diamètre d'inhibition de $23,50 \pm 2,12$ mm, $23,50 \pm 2,12$ mm et $22,50 \pm 3,54$ mm correspond aux concentrations 0,5 mg/ml, 0,25mg/ml et 0,125mg/ml respectivement sauf pour la concentration 1 mg/ml avec un diamètre d'inhibition de $2,50 \pm 0,71$ mm.

Selon (Figure n°11) l'espèce *Staphylococcus aureus* MRSA9314, est sensible aux différentes concentrations de l'extrait d'EPS sécrété par la souche **AB26** avec des diamètres d'inhibitions de $15,00 \pm 7,07$ mm, $13,00 \pm 1,41$ mm, $16,50 \pm 2,12$ mm et $14,50 \pm 0,71$ mm correspond aux concentrations 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml et 0,125mg/ml respectivement

L'activité antifongique de l'extrait d'EPS sécrété par la souche **AB26** enregistré vis à vis *Fusarium sporotrichioides* a donné des diamètres d'inhibitions de l'ordre de $18,00 \pm 2,12$ mm, $10,00 \pm 0,00$ mm, $13,50 \pm 2,12$ mm et $14,50 \pm 0,71$ mm correspond aux concentrations 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml et 0,125 mg/ml respectivement.

Par contre aucune activité inhibitrice observée de l'extrait d'EPS sécrété par la souche **ITA1** et la souche **I4** contre les tous les germes testés, sauf une faible activité inhibitrice observée de l'extrait d'EPS sécrété par la souche **I4** contre l'espèce *Bacillus subtilis* ATCC6633 avec un diamètre d'inhibition de $5,50 \pm 0,71$ mm $09,50 \pm 3,54$ mm, $03,50 \pm 5,00$ mm t04, $50 \pm 6,36$ mm.

Discussion

Les résultats obtenus montre que l'extrait d'EPS sécrété par la souche **AB26** possède une forte activité antimicrobienne contre les espèces *Staphylococcus aureus* MRSA9314, *Pseudomonas aeruginosa* ACC9027, *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Fusarium sporotrichioides*, avec des diamètres d'inhibitions de $2,50 \pm 0,71$ mm et $23,50 \pm 2,12$ mm, tandis qu'aucune activité inhibitrice observée de l'extrait d'EPS sécrété par les souches **ITA1** et **I4** contre les germes testés.

(**ABDRABO et al., 2018**), ont trouvés des résultats similaires, dans les qu'elles ils ont montré que l'extrait d'EPS sécrété par la souche *Halomonas saccharevitans* AB2, bactérie marine possède une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et avec des diamètres d'inhibitions de **9,7 mm** et **14.1 mm**, de plus des activités antifongiques contre *Condida albicans* ATCC10231 et *Aspirgillus niger* ATCC16404 ont été enregistré. Par contre aucune activité antimicrobienne n'a été enregistré contre (*Klebsiella pneumonia* ATCC43816, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Staphylococcu saureus* ATCC6538, et *Bacillus subtius* ATCC33018).

A ce jour les études sur l'activité antimicrobienne d'EPS bactérienne sont limitées. Il existe des travaux sur la synthèse des nanoparticules à base d'EPS bactérienne et les métaux (nanoparticules d'agent AgNO) (**SIVASANKAR et al., 2018**)

(**SELVAKUMAR et al., 2014**), affirment que les nanoparticules synthétisées à partir d'EPS de la souche *Bacillus subtilis* MTCC 2422 possèdent une forte activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* que *Pseudomonas aeruginosa*, Les zones d'inhibitions était de **11, 16,5, 18,5 et 21 mm** et **10,0, 11,5. 13,25, 13,75 mm** pour *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement avec une concentration de nanoparticules croissante de 50 à 300.

Conclusion

Conclusion

La présente étude vise à une contribution à l'étude des EPS sécrété par des actinobactéries isolées à partir de sol de la région d'Ouargla.

L'extraction des EPS a été réalisé à partir de trois souches d'actinobactérie codé **I4**, **ITA1** et **AB26** appartenant à la collection des bactéries de M^{me} BOUAZIZ S. Le rendement d'extraction par rapport au volume de milieu de culture liquide a été estimé de **0,29%**, **0,07%** et **0,02%** pour les souches **AB26**, **ITA1** et **I4** respectivement.

La teneur en ose totaux (EPS) des différentes souches d'actinobactéries a été effectuée par la méthode du Dubois, suite aux résultats obtenus, il apparait qu'il y a une variabilité au niveau des résultats. La teneur en oses chez les souches est estimé de **10,75±0,54 mg/l**, **25,87±4,15mg/l** et **6,60±1,92 mg/l** pour les souches **AB26**, **ITA1**, **I4** respectivement

Les effets des différents paramètres à savoir pH, température et concentration en NaCl sur la de production des EPS, a montré que le pH optimal de la production est 7,3 pour toute les souches étudié. L'augmentation ou la baisse de la température favorise la production d'EPS, ainsi que la concentration de NaCl est un facteur important pour une production optimale des EPS.

L'étude l'activité antimicrobienne des extraits d'EPS sécrété par les souches **AB26**, **ITA1** et **I4** a été testée par la méthode de diffusion sur agar en milieu solide contre trois bactéries pathogène à savoir : *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* MRSA9314, *Pseudomonas aeruginosa* ACC9027 et un champignon *Fusarium sporotrichioides*.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne une activité antimicrobienne importante chez l'extrait polysaccharidique de la souche **AB26** des extraits d'EPS relevé contre *Bacillus subtilis* ATCC6633 avec des diamètres d'inhibitions de **23,50±2,12 mm** à **2,50±0,71mm**, *Staphylococcus aureus* MRSA9314 avec des diamètres d'inhibitions de **16,50±2,12 mm** à **13,00±1,41 mm**, *Pseudomonas aeruginosa* ACC9027 avec des diamètres d'inhibitions compris entre **22, 50 ±3,54mm** à **15,00±00 mm** et *Fusarium sporotrichioides* avec des diamètres d'inhibitions de **18,00±2,12 mm** à **10,00± 0,00mm**.

Les actinobactéries devraient être évalués pour découvrir des EPS physiologiquement et biotechnologiquement efficaces pour remplacer les produits de synthèse chimiques. Un examen plus approfondi permettra d'identifier le domaine d'application le plus approprié.

Le présent travail est une étude préliminaire, il nécessite à être approfondir encore plus. Les perspectives d'étude sont nombreuses et diversifiées :

- tester d'autres méthodes d'extraction pour obtenir un extrait plus pur ;
- l'utilisation d'autres germes cibles ;
- réalisation des tests complémentaires tel que : activités antitumorale, antivirale, inhibition d'enzymes, ...etc. ;
- purification et identification de la composition de ces EPS.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

AbdElgawad.H.,Saleh.A.M.,Jaouni.S.A.,Selim.S.,Hassan.M.O.Wadaan.M.A.M.,Shuikan. A.M., Mohamed.H.S ETHozzein.W.N. (2019).Utilization of actinobacteria to enhance the production and quality of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits in a semi-arid environment

ANALIA ALVAREZ.A., SAEZ.J.M.,COSTA.J.S. ,COLIN.V.L., FUENTES.M.S., CUOZZO.S.A., BENIMELI.C.S.,POLTI.M.A., MARIA JULIA AMOROSO.M.J, (2017).

Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals

ANDHARE.P. , CHAUHAN.K, DAVEI.M. et PATHAK. H.,(2014). ,Microbial Exopolysaccharides: Advances in Applications and Future Prospects .P :2

ARUMUGAM.T., KUMAR.P.S., KAMESHWAR.R., et PRAPANCHANA.K.,(2017)

Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. p :225

ARUN. J., SATHISKUMAR. R.et MUNESWARAN.T.,(2014) Optimization of extracellular polysaccharides production in *Halobacillus truepeii* AJSK using response surface methodology.vO. p: 4450

BARKA.E.A., VATSA.P., SANCHEZ.L., VAILLANT.N.G., JACQUARD.C., KLENK.H.P, CLEMENT.C, OUHDOUCH.Y.,GILLES P.,WEZELD.V.,(2021).Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria.p :1-2

BE´JAR.V. , LLAMAS.I., CALVO.C et QUESADA.E.(1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina* p :139-140.

BEN ABDALLAH.R., FRIKHA.D, MAALEJ.S et SASSLS.(2019).Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines in vitro evaluation of the antibacterial and antifungal activities of marine algae. (31). p:39

BERTI.C.(2014). Etude de la synthèse des exopolysaccharides sécrétés par les mycoplasmes du groupe «mycoïdes» eton, notamment, par *Mycoplasma mycoïdes* subsp. *mycoïdes*, agent de la péripneumonie contagieuse bovine. Thèse Doctorat. Ecole Doctorale : E2M,p : 51-54.

Biratu et al., J Plant Pathol Microb (2013)., In vitro Evaluation of Actinobacteria against Tomato Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum* EF Smith) in West Showa, Ethiopia p: 1-4

BIRATU.K.S.,SELVARA.T et HUNDUMA.T.(2013).In vitro Evaluation of Actinobacteria against Tomato Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum* EF Smith) in West Showa, Ethiopia.

CANTABRANA.C.H, SANCHEZ.B., MILANI.C., VENTURA.M., MARGOLLES.A., MADIEDOA.P.R.,(2014).Genomic Overview and Biological Functions of Exopolysaccharide Biosynthesis in *Bifidobacterium* spp.

CHAMBI .D., ROMERO-SOTO .L. , VILLCA.R., OROZCO-GUTIERREZ.O., VEGA-BAUDRIT.J. , QUILLAGUAMAN.J 4, HATTI-KAUL.R , MARTIN.C ET CARRASCO.C.,(2021).. Exopolysaccharides Production by Cultivating a Bacterial Isolate from the Hypersaline Environment of Salar de Uyuni (Bolivia) in Pretreatment Liquids of Steam-Exploded Quinoa Stalks and Enzymatic Hydrolysates of Curupaú Sawdust.p :10-16.

CHOUANA .T,(2017) .Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bungep* :.

FREITAS.F., VITOR D., ALVES.V.D. ET REIS.M.A.M.(2011).

Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications
Vol. 29. (8) P: 393

GAO.B et GUPTA.R.S., (2012).Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. Vol 76 (01).p :62-63.

HADJADJ. S.,(2017).Analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du Sahara septentrional Est Algérien.thèse de Doctorat Université Kasdi Merbah- Ouargla .p : 72-78

HARIR.M.(2018).Caracteresation des molecules bioatives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi arides. Thèse de doctorat.p:40

JAISWAL.P., SHARMA.R., SANODIYA.B.S ET BISEN.P.B.,(2014)

Microbial Exopolysaccharides: Natural Modulators of Dairy Products. Vol.4 (10), p :106-107

LAW.J.W.F., LETCHUMANAN.V., TAN.L.T.H.,SERI.H.L, GOH.B.H., LEE.L.H(2020)

The Rising of “Modern Actinobacteria” Era

MADHURI.K.V ET PRABHAKAR.K.V.,(2014).. Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. Vol. (3): P: 1402

MANIVASAGANA.P., SIVASANKARC.P., VENKATESANB.J., SENTHILKUMARB.S., SIVAKUMARC.K, ET KIMA.S.K,(2013)..Production and characterization of an extracellular polysaccharide from *Streptomyces violaceus* MM72 (59). p 30-36.

MELLOUK I., MEKLAT., NALUBEGA F, CHAABANE. C. F., AIT YAHIA. A., BOURAS. N., MOKRANE. S., MATHIEU. F et SABAOU N., (2016).Description et potentiel antagoniste d'une nouvelle souche d'actinobactérie isolée de la cote de Tipaza Vol.9(1) .P :66

ONJA.A.H.,(2016). Selection et caracterisation de souches d'actinomycetes isolees a partir des rhizomes et du sol rhizospherique de gingembre ayant des activites biologiques comparables a elles de son huile essentielle.p:16-18

RAWAL .P.M., CHAUHAN.P.B, PRAJAPATI.H., GAHLOUT.M.,(2016).Evaluation of cultivation condition for enhanced production of exopolysaccharide by bacterial isolate P 11 under submerged culture condition. Vol.3. (5). p : 184

RAWAL.P.M, POONAM, CHAUHAN.P.B, PRAJAPATI.H.P ET GAHLOUT.M, (2016).Evaluation of cultivation condition for enhanced production of exopolysaccharide by bacterial isolate P 11 under submerged culture condition. Vol 3.p: 185-188.

RINALDI.L.,(2013). Impact de l'ajout de polysaccharides dans des matrices laitières gélifiées acides sur la digestion gastro-intestinale des protéines et des réponses métaboliques associées. Thèse Doctorat en Sciences et technologie des aliments - Philosophiae Doctor p : 22-23

ROSAN.B et HAMMOND.B.F., (1974).Polysaccharides extracellulaires d'actinobactéries. Vol(10) 2.P : 304

SATHIYANARAYANANA.G., DINESHKUMAR.B.K, et **YANGA.Y.H.,** (2017).Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles.,P :1

SATHIYANARAYANANA.G., DINESHKUMAR.B.K et YANGA.Y.H.,(2017)..Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles

SAYAH.Z ., (2018) Caractéristiques physico - chimiques et biochimiques et activités biologiques de quelques dattes sèches, molles et demi - molles de la cuvette de Ouargla au stade Routab et Tmar.thèse de Doctorat Université Kasdi Merbah- Ouargla .P :88-97

SELVAKUMA.R. , ARAVINDH.S. , ASHOK.A.M ET BALACHANDRA.Y.L.(2014)A facile synthesis of silver nanoparticle with SERS and antimicrobial activity using *Bacillus subtilis* exopolysaccharides Vol. 9(10).p:1078.

SYIEMIONG.D ET JHA1.D.K.,(2019)Antibacterial potential of Actinobacteria from a Limestone Mining Site in Meghalaya, India.P:790

VIJAYAKUMAR.R et MALATHI.R.,(2014)Isolation, characterization and antibacterial activity of actinobacteria from dye polluted soils of tirupur .p :43

VIJAYAKUMAR.R et MALATHI.R.,(2014). Isolation, characterization and antibacterial activity of Vol. 16,(1) , p :43-48.

WINK.J., PANAH.F.M ET HAMED1.J.,(2011). Biology and of Actinobacteria .P :51

XIONG.A.Y.W.,JUA.X., LI.X.Y., GONG.Y.,XU.M.J, ZHANG.C.M., YUANA.B.. LV.Z.P et **QI.S.(2019)**.Fermentation conditions optimization, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides obtained from the plant growth- promoting endophytic actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 518.p :4.

ZISU.B et SHAH.N.P.,(2003).Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275

Annexes

Annexe 01. Méthode de dosage

Dosage des EPS par la méthode de Dubois

Mode opératoire

Préparation de la solution mère de l'extrait exopolysaccharidique 0,01% :

La solution est préparée avec 10 mg de l'extrait brut exopolysaccharidique dans 10ml d'eau distillée ; puis 1ml de mélange est complété par 9 ml d'eau distillée (**Boudoumi et Lati .2018**)

Préparation de la solution du phénol 5% :

La solution est préparée avec 1g du phénol dans 20ml d'eau distillée selon la méthode de **DUBOIS et al, (1956)** modifiée (**FOUKAZ et DERBALI, 2018**)

Préparation de la solution mère de glucose 0,01% :

La préparation est effectuée par 0,01g du glucose dans 100ml d'eau distillée **FOUKAZ et DERBALI, 2018**)

Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose 0,001% à 0,01% selon **DUBOIS et al.**

Tableau n VI. Gamme d'étalonnage de glucose

	Blanc	0,001%	0,002%	0,003%	0,005	0,008
Eau distillée(ml)	200	180	160	140	100	40
Glc0,01%(ml)	0	20	40	80	100	160
Concentration(mg/l)	0	10	20	50	80	100

Dans des tubes en verres placer un mélange de 200µl de solution d'exopolysaccharide à doser, de concentrations de 0,01%, ainsi que des solutions de glucose constitutives de la gamme d'étalonnage sont préparées simultanément dont les concentrations varient de 0,001 à 0,01% et 200µl de phénol 5% est ajoutée. Après homogénéisation, 1ml d'acide sulfurique H₂SO₄ (96%), est rapidement introduit dans le milieu réactionnel. Les tubes sont ensuite incubés au bain Marie à 100°C pendant 5 mn. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace pendant 30 mn à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 490 nm (**Boudoumi et Lati, 2018**).

Annexe 02. Souches utilisées.



Photos 02. Souches I4, AB 26 et ITA1



Photo03. Repiquage les souches I4, AB 26 et ITA1 en milieu liquide.

Annexe 03. Gammes d'étalonnages



Photos03. Dosage les oses totaux par spectromètre UV

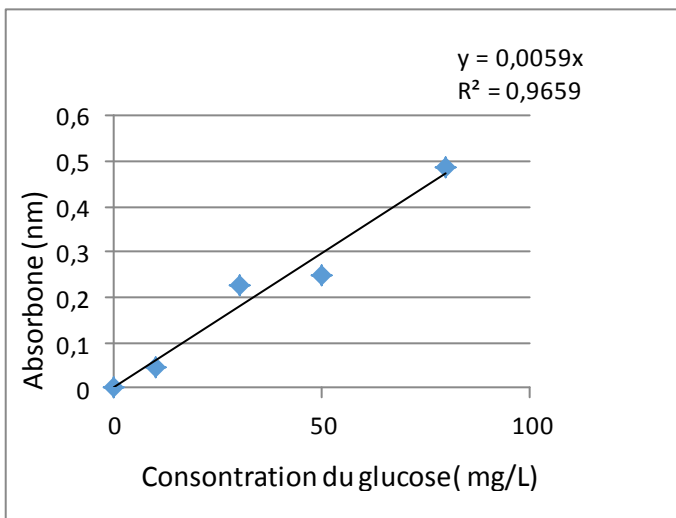


Figure 11. Courbe d'étalonnage du glucose.

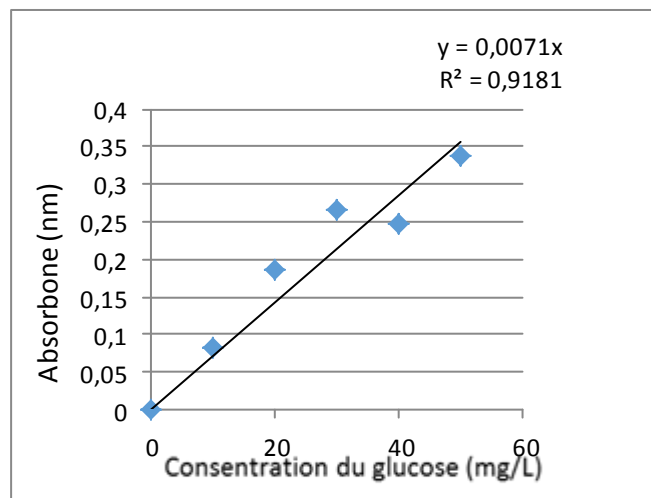


Figure 12. Courbe d'étalonnage du de déférente concentration de NaCl

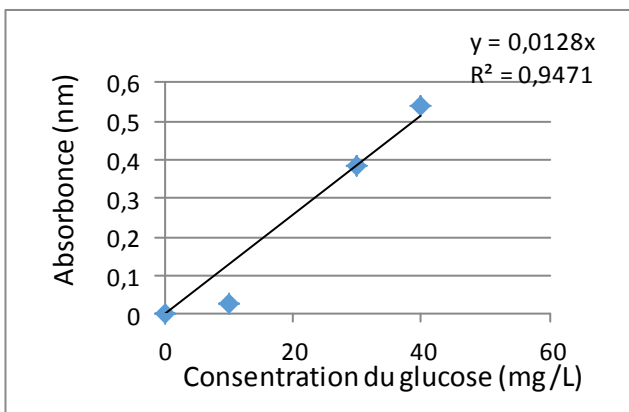


Figure13. Courbe d'étalonnage de déférente Valeur de pH.

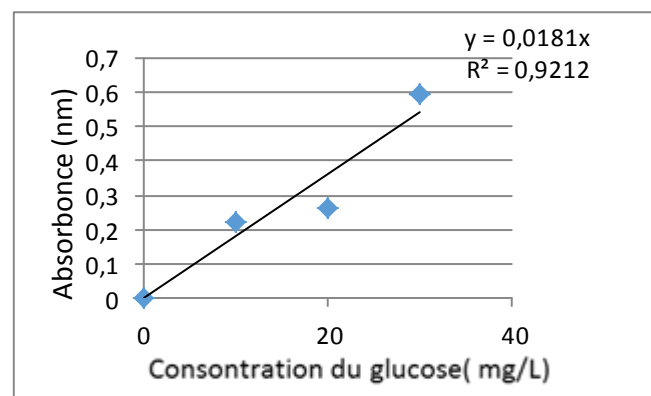


Figure 14. Courbe d'étalonnage du glucose de déférente températures.

Annexe 04. Milieux de culture utilisée**M2 Solide :**

Amidon.....	10g
Caséine.....	0, 3g
KNO ₃	2g
NaCl.....	2g
K ₂ HPO ₄	2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0, 05g
CaCO ₃	0, 02g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0, 01g
Agar.....	15g
Glucose	1g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	7, 2

M2 Liquide :

Amidon.....	10g
Caséine	0, 3g
KNO ₃	2g
NaCl	2g
K ₂ HPO ₄	2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,05g
CaCO ₃	0, 02g
FeSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,1g
Glucose	1g
Eau distillés q.s.q.....	1000 ml
pH	7, 2

Muller Hinton (MH) :

Infusion de viande de bœuf	300 m
Peptone de caséine	17.5 g/l
Amidon de maïs	1.5 g/l
Agar.....	17g/l
Eau distillé.....	1000 ml
pH	7,2.

Sabouraud (Sb)

Peptone	10 g/l
Glucose massé.....	20 g/l
Agar.....	15 g/l
Vitamine et facteur de croissance	10 g/l
Eau distillé.....	1000 ml
pH.....	5,6

Résumé

La présente étude s'intéresse à l'évaluation de taux des exopolysaccharides secrétés par des actinobactéries isolées à partir du sol de la région de Ouargla, Sud-Est de l'Algérie. Trois souches d'actinobactéries codés **I4**, **ITA** et **AB26** ont été isolées à partir de sols provenant de deux écosystèmes différents, il s'agit de palmeraie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et de Chott Ain Beida.

La mise en évidence de la production des exopolysaccharides totaux a été réalisée par la méthode de Dubois. Les résultats révèlent que toutes les souches d'actinobactéries ont une capacité de production des EPS, dont la production maximale est observée chez de la souche **AB26** avec **10.750.84mg/l**, alors que l'activité minimale est remarquée chez la souche **I4** avec une production de l'ordre de **6.60±1.92 mg/l**.

La stabilité de production des EPS totaux a été réalisée à différentes pH (3, 5 et 9), température (5°C, 15°C et 45°C) et différente concentration en NaCl à savoir 0.5%, 2% et 4%. Les résultats révèlent que la production des EPS de la souche **AB26** a considérablement augmenté aux différentes concentrations de NaCl, d'où la production maximale est obtenue avec la concentration de 2% avec **60,28±0,39 mg/l**, de même pour la souche **ITA1** et **I4**, dont la production maximale est obtenue avec la même concentration de NaCl, avec des teneurs de l'ordre de **99,07±0,098mg/l** et **91,27±0,381mg/l** respectivement. La production des EPS a ainsi augmenté dans les différentes températures pour les souches **AB26** et **ITA1** avec des teneurs maximales de **26,39±0,55 mg/l** à température 5°C et **25,37±0,52 mg/l** à température 45°C pour les deux souches respectivement.

La teneur en EPS aux différents pH a permis de remarquer une diminution de la production, d'où une maximal production a été observé à pH 9 avec **9,18±0,25 mg/l** de la souche **AB26** et de **9,34±0,48 mg/l** à pH 3 de la souche **ITA1**.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré une forte activité antimicrobienne vis à vis les 4 germes pathogènes (*B.subtilis*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *F.sporotrichioides*), chez la souche **AB26** avec un diamètre d'inhibition maximal de **23,50±2,12 mm** à concentration 0,5 mg/ml, vis à vis *B.subtilis*, par contre aucune activité antimicrobienne n'a été obtenue chez les souches **I4**, **ITA1** contre les quater germes cible, sauf une faible activité a été remarqué chez la souche **I4** avec un diamètre de 9,50 mm vis à vis *B.subtilis* à concentration 0,5 mg/ml.

ملخص

تهدف الدراسة بتقييم تركيز متعدد السكريات الخارجية التي تفرزها البكتيريا الشعاعية المعزول من تربة منطقة ورقلة جنوب شرق الجزائر تم عزل ثلاث سلالات من البكتيريا المشفرة ب **AB26**, **I4** و **ITA1** تم إجراء تقييم الإنتاج الإجمالي للمتعدي السكريات الخارجية بطريقة دوبوا. كشفت النتائج أن جميع سلالات البكتيريا الشعاعية لديها قدرة إنتاجية لـEPS حيث قدر أقصى إنتاج لها ب **10,750,84 ± 0,39** مللي جرام/لتر لدى السلالة **ITA1**, بينما لوحظ الحد الأدنى من النشاط لدى السلالة **I4** بإنتاج يقارب **6,60 ± 1,92** مللي جرام / لتر

تم تحقيق استقرار الإنتاج الإجمالي عند درجات حموضة مختلفة (**3 و 5 و 9**) ودرجات حرارة (**5 و 15 و 45** درجة مئوية) وتركيز مختلفة من كلور الصوديوم **0,5 % و 2 % و 4 %** كشفت النتائج أن الإنتاج زاد بشكل كبير عند التركيزات المختلفة من كلور الصوديوم ، وبالتالي تم الحصول على أقصى إنتاج بتركيز **2 %** لدى السلالة **AB26** قدر ب **60,28 ± 0,39** مللي جرام/لتر ونفس الشيء لدى السلالتين

I4 و **ITA1** قدر ب **91,27 ± 0,381** مللي جرام/لتر و **99,07 ± 0,098** مللي جرام/لتر على التوالي وقد ارتفع إنتاج EPS عند مختلف درجات الحرارة لدى السلالتين **ITA1** و **I4** بحد أقصى للإنتاج قدر ب **26,39 ± 0,55** مللي جرام/لتر عند درجة حرارة مئوية **5** و **25,37 ± 0,52** مللي جرام / لتر عند درجة حرارة مئوية **45** على التوالي

وقد سجل انخفاض ملحوظ عند مختلف درجات pH حيث قدر أعلى إنتاج عند درجة **pH 9** بقيمة **9,18 ± 0,25** مللي جرام/لتر لدى السلالة **AB26** و **9,34 ± 0,48** مللي جرام/لتر عند قيمة **pH 3** لدى السلالة **ITA1**

وقد أظهر تقييم النشاط المضاد للمكروبات نشاطا قويا ضد الجراثيم الأربعة الممرضة في السلالات (*B.subtilis*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *F.sporotrichioides*) لدى السلالة **AB26** مع أكبر قطر تثبيط بلغ **23,50 ± 2,12** مم بتركيز **0,5 مللي جرام/قرص** ومن ناحية أخرى لم يسجل أي نشاط مضاد للمكروبات لدى السلالتين **I4** و **ITA1** ضد البكتيريا المستهدفة باستثناء نشاط ضعيف لوحظ عند السلالة **I4** بقطر تثبيط **9,50** مم ضد *B.subtilis* بتركيز **0,5 مللي جرام / مل**

الكلمات المفتاحية: البكتريا الشعاعية، التربة، الصحرَاء، الاستخلاص، متعدد السكريات الخارجية، النشاط المضاد للمكروبات

Abstract

The present study is interested in the evaluation of the level of exopolysaccharides secreted by actinobacteria isolated from the soil of the region of Ouargla, South-East of Algeria. Three strains of actinobacteria coded 14, ITA and AB26 were isolated from soils coming from two different ecosystems, it is palm grove of the faculty of the sciences of nature and life and Chott Ain Beida. The demonstration of the production of total exopolysaccharides was carried out by the Dubois method. The results reveal that all the strains of actinobacteria have a production capacity of EPS, the maximum production of which is observed in strain AB26 with 10.750.84 mg / l, while the minimum activity is observed in strain 14 with a production of around 6.6011.92 mg / l. The production stability of total EPS was achieved at different pH (3, 5 and 9), temperature (5 ° C, 15 ° C and 45 ° C) and different NaCl concentration namely 0.5%, 2% and 4% . The results reveal that the production of EPS of the AB26 strain increased considerably at the different concentrations of NaCl, hence the maximum production is obtained with the concentration of 2% with 60.2810.39 mg / l, the same for the strain ITA1 and 14, whose maximum production is obtained with the same NaCl concentration, with contents of the order of 99.07 ± 0.098 mg / l and 91.2710.381 mg / l respectively. The production of EPS thus increased in the different temperatures for the strains AB26 and ITA1 with maximum levels of 26.3910.55 mg / the temperature 5 ° C and 25.3710.52 mg / the temperature 45 ° C for both. strains respectively. The EPS content at different pHs made it possible to notice a decrease in production, from which a maximum production was observed at pH 9 with 9.1810.25 mg / l of the AB26 strain and 9.34 ± 0, 48 mg / l at pH 3 of the ITA1 strain. The evaluation of the antimicrobial activity showed a strong antimicrobial activity against the 4 pathogenic germs (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *F. sporotrichioides*), in the AB26 strain with a maximum inhibition diameter of 23, 50 ± 2.12 mm at a concentration of 0.5 mg / ml and MIC 1.25 µl / disc, with respect to *B. subtilis*, on the other hand no antimicrobial activity was obtained in strains 14, ITA1 against the target four bacteria , except a weak activity was noticed in strain 14 with a diameter of 9.50 nm with respect to *B. subtilis* at a concentration of 0.5 mg / ml.