

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie  
Département Biologie appliquée

كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم البيولوجيا التطبيقية

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences biologiques

**Spécialité :** Bioindustrie, Analyse et Contrôle

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Etude de la production d'un colorant naturel d'origine bactérienne**

---

Présentée par : BOULTIF Ikhlas

Le 22/06/2022

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** Pr. KACEM CHAUCHE Noredine

Pr. Université frères Mentouri Constantine 1.

**Examinatrice 1:** Dr. CHERFIA Radia

MCB. Université frères Mentouri Constantine 1.

**Examinatrice 2 :** Dr. HARZALLAH Bisma

MCB. Université frères Mentouri Constantine 1.

**Tutrice :** Dr. ALLOUN Wiem

Doctorante au LaMyBAM. Université frères Mentouri Constantine 1.

**Année universitaire**  
**2021 – 2022**

## *Remerciements*

Avant toute chose, je remercie « Allah » le miséricordieux et le tout puissant qui nous a donné la force, la bravoure, la volonté et la patience pour effectuer ce modeste travail.

J'adresse ma gratitude et mes remerciements les plus sincères à notre encadreur, Professeur KACEM-CHAOUCHE Noreddine, Chef de Département de la Biologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour son encadrement, ses encouragements, sa confiance, sa patience, sa gentillesse et son soutien ainsi que ses conseils.

Je tiens à exprimer mon profond remerciement à Mme CHERFIA Radia Ainsi que Mme. HARZALLAH Besma qui ont bien voulu faire partie de cet honorable jury, et pour l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail, en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs remarques et leurs propositions.

Je tiens à remercier chaleureusement et du fond du cœur, la doctorante ALLOUN Wiem, mon adorable tutrice, qui m'a appris les méthodes de travail. Ainsi que pour sa disponibilité, son aide, sa patience, ses conseils, ses encouragements et ses suggestions pour réaliser un travail de valeur.

Mes remerciements vont également à tous mes enseignants du cursus ainsi tous les membres du LaMyBAM, enseignants et doctorants. Et tout le personnel et ingénieurs de la faculté SNV.

Finalement je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui m'ont appris une infinité de choses et qui m'ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment.

*Merci*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*À mon cher père Boultif abdelmadjid qui a toujours cru en moi et a eu  
confiance en moi,*

*A ma chère mère Bennaidja Irene qui n'a jamais cessé de prier pour ma  
réussite,*

*A mes chères sœurs Asma, Yousra qui m'ont toujours aidé et soutenu,*

*A mon cher frère Aymen,*

*A mes adorables amies Maroua, Ghozlen qui m'ont soutenu dans les  
moments difficiles,*

*A toute ma famille, A tous mes autres amies.*

*Nelias*

## **Table des matières**

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1- Revue bibliographique</b>	<b>3</b>
1.1- Pigments	3
1.1.1- Définition des pigments	3
1.1.2- Classification des pigments	3
1.1.3- Sources potentielles de pigments microbiens	4
1.1.4- Avantages des pigments naturels	6
1.1.5- Marché mondial des colorants naturels	6
1.1.6- Technologies de production de bio-pigments d'origine microbienne	7
1.1.7- Potentielles applications des bio-pigments	10
1.2- Actinobactéries	13
1.2.1- Généralités sur les Actinobactéries	13
1.2.2- Caractéristiques morphologiques et culturelles	13
1.2.3- Cycle de développement	15
1.2.4- Ecologie et distribution dans la nature	16
1.2.5- Applications biotechnologiques	16
1.2.6- Bio-pigments produit par les actinobactéries	17
<b>2- Matériels et méthodes</b>	<b>20</b>
2.1- Matériel biologique	20
2.1.1- Souche d'actinobactérie	20
2.1.1.1- Réactivation de la souche	20

2.1.1.2- Caractères cultureux et morphologiques de la souche	20
2.1.1.3- Equipement enzymatique	20
2.1.1.4- Caractères biochimiques de la souche	22
2.1.2- Production de pigment	22
2.1.2.1- Culture sur milieu solide conventionnel	22
2.1.2.2- Culture sur milieu liquide conventionnel	23
2.1.3- Méthodes analytiques	23
2.1.4- Caractérisation de pigment	24
2.1.5- Optimisation du milieu de fermentation pour la production de pigment	26
2.1.5.1- Etude de l'influence de 4 facteurs essentiels sur la production de pigment par l'approche traditionnelle	26
2.1.5.2- Criblage et effet combiné de différents facteurs sur la production de pigment par l'approche statistique	28
<b>3- Résultats et discussion</b>	<b>32</b>
3.1- Caractérisation micro et macromorphologique de l'isolat	32
3.2- Equipement enzymatique	37
3.3- Caractères biochimiques de la souche	39
3.4- Méthodes de cultures pour la production du pigment	39
3.5- Méthodes analytiques	41
3.6- Caractérisation de pigment	43
3.7- Optimisation du milieu de fermentation pour la production de pigment	47
<b>Conclusion et perspective</b>	<b>56</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>58</b>
Annexes	
Résumés	

## Liste des abréviations

<b>GC</b>	Guanine-cytosine
<b>MH</b>	Mueller hinton
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>rpm</b>	Rotation par minute
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar
<b>ISP</b>	International <i>streptomyces</i> project
<b>MS</b>	Mycélium de substrat
<b>MA</b>	Mycélium aérien
<b>SSF</b>	Fermentation à l'état solide
<b>SMF</b>	Fermentation submergée
<b>CMC</b>	Carboxyméthylcellulose
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>E.L</b>	Extrait de levure
<b>E.M</b>	Extrait de malt
<b>min</b>	Minute
<b>j</b>	Jour
<b>ml</b>	Millilitre
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>µg</b>	Microgramme
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>OFAT</b>	One factor at time
<b>PBD</b>	Plackett-Burman design
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>RF</b>	Rapport frontal
<b>HHP</b>	Haute pression hydrostatique
<b>PEF</b>	Champ électrique pulsé
<b>RP-TLC</b>	Chromatographie sur couche mince en phase inverse
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>DO</b>	Absorbance
<b>N</b>	Normalité
<b>M</b>	Molaire

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Figure.01	Classification des pigments naturels.	4
Figure.02	Marché en pourcentage des colorants alimentaires.	7
Figure.03	Production, caractérisation et applications des pigments.	9
Figure.04	Aspect morphologique d'isolats d'actinobactéries sur gélose amidon caséine.	14
Figure.05	Croissance abondante d'isolat d'actinobactéries sur milieu gélose amidon caséine.	14
Figure.06	Cycle de développement des actinobactéries.	15
Figure.07	Applications biotechnologiques des Actinobactéries.	17
Figure.08	Pigment diffusible produit par diverses Actinobactéries dans le milieu agar de caséine d'amidon.	17
Figure.09	Caractères microscopiques de la souche d'actinobactérie productrice de pigment (G x 100).	32
Figure.10	Résultats des tests enzymatiques.	38
Figure.11	Activité catalase de la souche productrice de pigment.	39
Figure.12	Production de pigment par fermentation à l'état solide.	40
Figure.13	Production d'un pigment bleu par fermentation submergée.	40
Figure.14	Méthode de la filtration.	41
Figure.15	Pic majeur d'absorbance du filtrat.	41
Figure.16	Méthode d'extraction de pigment par précipitation acide.	42
Figure.17	Résidu sec du pigment extrait par des solvants.	43
Figure.18	Histogramme de l'influence de 4 facteurs sur la concentration de pigment.	47
Figure.19	Histogramme de l'influence des différents facteurs sur la concentration de pigment.	49
Figure.20	Diagramme de Pareto des effets des facteurs sur la concentration de pigment.	51
Figure.21	Diagramme de Pareto des effets des facteurs sur le pH final.	52

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Tableau. 01	Certaines sources microbiennes et les nuances de couleur des pigments qu'elles produisent.	5
Tableau. 02	Fonctions des différents pigments microbiens.	12
Tableau. 03	Actinobactéries productrices des pigments.	19
Tableau. 04	Conditions de culture pour la fermentation liquide selon la méthode OFAT.	28
Tableau. 05	Plan de la matrice randomisée de Plackett-Burman avec les 30 valeurs codées des facteurs.	30
Tableau. 06	Valeurs réelles des facteurs employés dans le plan randomisé de Plackett-Burman.	31
Tableau. 07	Caractères macroscopiques de l'actinobactérie productrice de pigment.	33
Tableau. 08	Aspect macroscopique de l'isolat producteur de pigment sur différents milieux de culture.	34
Tableau. 09	Production de d'enzymes par la souche d'actinobactérie sélectionnée.	37
Tableau. 10	Test de solubilité de différents solvants.	43
Tableau. 11	Valeurs du rapport frontal Rf de chaque échantillon.	44
Tableau. 12	Test de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut du pigment.	45
Tableau. 13	Valeurs de pH du filtrat obtenu par la méthode OFAT.	48
Tableau. 14	Valeurs de pH final par la méthode statistique.	49
Tableau. 15	Coefficients codés et analyse de la variance pour la concentration du pigment en µg/ml.	50
Tableau. 16	Coefficients codés et analyse de la variance pour l'évolution du pH.	52

## Introduction

La couleur possède d'énormes potentiels de marché dans les secteurs alimentaire, agricole, cosmétique, textile, pharmaceutique et nutraceutique (Grewal *et al.*, 2022). Cependant, les applications industrielles non contrôlées des colorants synthétiques peuvent avoir comme conséquence de sérieux risques pour la santé humaine et une source de pollution pour l'environnement. De ce fait, il existe un intérêt mondial pour le développement de procédés de production de pigments à partir de sources naturelles (Unagul *et al.*, 2005) notamment, les plantes et les micro-organismes (Mizukami *et al.*, 1978 ; Papageorgiou *et al.*, 1979). Les pigments naturels autorisés accessibles provenant de plantes présentent de nombreux inconvénients tels que l'instabilité à la lumière, à la chaleur ou à un pH défavorable, la faible solubilité dans l'eau et sont, souvent, indisponibles toute l'année. Toutefois, les pigments produits par voie microbienne constituent une alternative aux pigments synthétiques potentiellement toxiques. Ils ont l'avantage de l'abondance, la sécurité d'utilisation, la facilité et la rapidité de la croissance du microorganisme producteur sur un milieu de culture économique, la biodégradabilité (Cho *et al.*, 2002), l'indépendance vis-à-vis des conditions météorologiques et géographiques, l'absence de risque de contamination de l'eau et de l'environnement, un rendement contrôlable et prévisible et la production des couleurs de différentes teintes. La biotechnologie s'intéresse, actuellement, à la recherche de microorganismes producteurs de bio-pigments pour des fins industrielles variées. Le rôle de la biotechnologie consiste à sélectionner une souche productrice du pigment d'intérêt et à obtenir des rendements améliorés soit par l'optimisation des paramètres de processus afin de maximiser la productivité, soit par l'amélioration génétique de la souche.

Parmi les microorganismes telluriques, la sécrétion de pigments a été distinctement observée dans le groupe des actinobactéries (Hopwood *et al.*, 2007). Les actinobactéries sont des bactéries ubiquitaires, isolées à partir de différents écosystèmes terrestres et marins (Al-Zarban *et al.*, 2002 ; Boughachiche *et al.*, 2005 ; Kitouni *et al.*, 2005). Elles constituent un groupe hétérogène de bactéries à Gram positif caractérisées par leur morphologie filamenteuse et rapport GC% élevé (>55 mol %) (Amsaveni *et al.*, 2015 ; Udhayakumar *et al.*, 2017 ; Tandale *et al.*, 2018 ). Ces bactéries présentent une diversité physiologique due à leur capacité à produire, à synthétiser et excréter de nombreux métabolites primaires et secondaires participant activement à la décomposition de la matière organique (Amsaveni *et al.*, 2015). En raison de leur grande diversité physiologique, les actinobactéries ont un grand

potentiel biotechnologique, notamment dans le domaine de la santé, l'industrie, l'agriculture et l'agro-alimentaire (George *et al.*, 2012 ; Solecka *et al.*, 2012) mais plus spécifiquement, la production des pigments.

Les actinobactéries sont capables de synthétiser une large gamme de pigments brun foncé appelés pigments mélanine/mélanoïdes (Dastager *et al.*, 2014). Certains pigments produits par les actinobactéries sont dans les nuances bleues « *Streptomyces coelicolor* » (Sánchez-Marroquín et Zapata, 1954), brunes « *Streptomyces sp.* » (Dharmik et Gomashe, 2013), vertes « *Actinomyces viscosus* et *Saccharomonospora viridis* » (Greiner-mai *et al.*, 1988 ; Tandale *et al.*, 2018), oranges « *A.naeslundii* » (Tandale *et al.*, 2018), rouges « *Streptomyces echinoruber* » (Schuep *et al.*, 1978 ; Sen *et al.*, 2019), violettes ou pourpres « *Streptomyces mauvecolor* » (Murase *et al.*, 1960) et jaunes « *Streptomyces hygroscopicus* » (Balagurunathan *et al.*, 2009).

La production de pigments est influencée par des facteurs chimiques, physiques et physiologiques (Udhayakumar *et al.*, 2017). Outre leur importance dans les études taxonomiques, ces pigments microbiens ont un large spectre d'activités biologiques notamment antibiotiques, antimicrobiennes, antioxydantes et antitumorales (R. P *et al.*, 2010).

Face à la demande croissante de pigments biologiques, l'identification et le potentiel d'utilisation des pigments actinobactériens considérés comme une cible d'excellence est primordiale (Lingappa et Narasing, 2016).

Ce travail de recherche s'articule sur quatre axes principaux à savoir ; (i) la production d'un pigment à partir d'une souche actinobactérienne isolée à partir du sol sur milieu liquide, suivie d'une caractérisation morphologique et biochimique de la souche productrice, (ii) l'isolement du bio-pigments par procédés de séparation par différentes méthodes d'extraction, (iii) réalisation de quelques essais de caractérisation du pigment, et enfin (iv) élaboration d'un criblage des facteurs et conditions de culture potentiellement influent la production de ce pigment par la souche actinobactérienne et ce, par l'approche classique (OFAT) et l'approche statistique à l'aide du plan expérimental Plackett-Burman (PBD).

## **1- Revue bibliographique**

### **1.1- Pigments**

#### **1.1.1- Définition des pigments**

Les pigments constituent, entre autres, des substances produites par des organismes vivants, qui ont une teinte résultant de l'absorption sélective de la couleur qui convient à certains types d'industries. Ils apparaissent dans les granules à l'intérieur des cellules ou des membranes cellulaires sous forme de dépôts sur les tissus, ou en suspension (Ullmann, 1985). Ils peuvent être organiques ou inorganiques. Ils provoquent des variations de la lumière réfléchie ou transmise à travers l'absorption sélective à une longueur d'onde.

Toute substance constituée de petites particules pratiquement insolubles dans le milieu appliqué, et est utilisée en raison de ses propriétés colorantes, protectrices ou magnétiques est appelée « Pigment » (Ullmann, 1985).

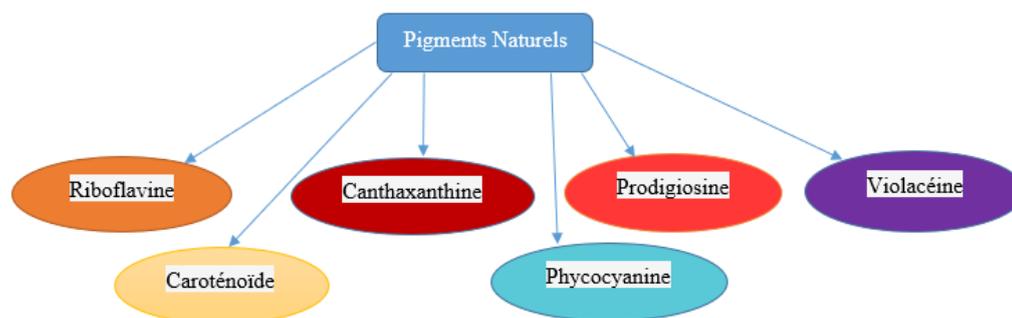
#### **1.1.2- Classification des pigments**

Les pigments sont classés selon leur nature chimique en organiques et inorganiques ou selon leur origine, en naturels et synthétiques.

##### ***1.1.2.1- Pigments naturels***

Les pigments naturels, organiques ou bio-pigments ont une constitution chimique complexe. Ils peuvent être synthétisés par des végétaux, des animaux, des micro-organismes et des microalgues. Les molécules ainsi produites appartiennent principalement aux caroténoïdes, mélanines, flavines et phycocyanine. La stabilité des pigments est influencée par la température, l'acidité, la lumière, l'oxygène, l'activité de l'eau et le temps. A l'inverse, les pigments produits par les micro-organismes sont solubles dans l'eau et peuvent réagir avec les composés d'un milieu, tels que les protéines, les acides aminés et les acides nucléiques (Duffosé *et al.*, 2005).

Les bio-pigments peuvent être regroupés en fonction des affinités structurales et de l'occurrence naturelle. Quelques exemples de bio-pigments sont présentés dans la figure 1.



**Figure 1.** Classification des pigments naturels (Singh, 2017).

### 1.1.2.2- Pigments synthétiques

Les colorants synthétiques les plus utilisés sont de composés azoïques, dérivés de certains acides aminés aromatiques. Ces colorants sont utilisés dans l'industrie du textile, les denrées alimentaires, les cosmétiques, les peintures et les encres (Novotny, 2006). Ces composés sont potentiellement toxiques dans les milieux aquatiques. Cependant, aucune réglementation déterminant la concentration maximale admissible dans l'eau n'existe encore (Ribeiro et Umbuzeiro, 2014). Néanmoins, leur utilisation à l'échelle mondiale a diminué en raison de leur potentiel cancérigène pour la peau ainsi que de nombreuses allergies (Franciscon *et al.*, 2012).

### 1.1.3- Sources potentielles de pigments microbiens

Les micro-organismes constituent pour la biotechnologie une source potentielle de pigments, et présentent de nombreux avantages par rapport aux industriels en termes de disponibilité, de stabilité, de rentabilité, de main-d'œuvre, rendement et traitement en aval. Ils sont de ce fait considérés comme une voie alternative pour la production des colorants naturels. La présence de pigments a été signalée chez les bactéries, les champignons, les levures, les algues et les protozoaires (Tableau 1). Ces bio-pigments suscitent un intérêt croissant en raison du caractère naturel et leur sécurité d'utilisation en raison de la disponibilité de leurs microorganismes producteurs. D'autant plus que leur production est indépendante des saisons et des conditions géographiques, leur rendement est contrôlable et prévisible (Francis, 1987). En outre, les microorganismes producteurs de pigments peuvent être isolés, cultivés et purifiés à partir de différentes niches écologiques et sur des substrats variés (Tuli *et al.*, 2014). Cependant, ils doivent répondre à certains critères notamment, la capacité à utiliser une large gamme de sources de carbone et d'azote, une tolérance à différents pH,

température et salinité. Ils doivent également, produire un rendement de couleur raisonnable, non toxique et à séparation facile à partir de la masse cellulaire (Babitha, 2009).

**Tableau 1.** Certaines sources microbiennes et nuances de couleur des pigments qu'elles produisent.

Groupe	Organisme source	Nom de pigment	Couleur	Références
Bactéries	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Astaxanthine	Rose-rouge	Venil <i>et al.</i> (2013)
	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigoidine	Bleu	Kamla <i>et al.</i> (2012)
	<i>Streptoverticillium rubrireticuli</i>	Prodigiosin	Rouge	Darshan <i>et al.</i> (2015)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxanthine	Jaunedoré	Liu <i>et al.</i> (2005)
	<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosine	Rouge	Deorukhkar <i>et al.</i> (2007)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pyocyanine	Bleu-vert	Fouly <i>et al.</i> (2015)
	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violaceine	Violet	Pantanella <i>et al.</i> (2007)
Mycètes	<i>Aspergillus sp.</i>	$\beta$ - carotene	Orange-rouge	Álvarez <i>et al.</i> (2006)
	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Lycopene	Rouge	Dufossé et de Echanove (2005)
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthine	Rouge	Dawidziuk <i>et al.</i> (2017)
	<i>Monascus sp.</i>	Monascorubramine	Rouge-orange	Wild <i>et al.</i> (2002)
	<i>Blakeslea trispora</i>	Lycopene	Rouge	Jin-Feng <i>et al.</i> (2012)
	<i>Neurospora crassa</i>	$\beta$ - carotene	Jaune-orange	Socaciu, (2007)
	<i>Pacilomyces farinosus</i>	Anthraquinone	Rouge	Velmurugan <i>et al.</i> (2010)
Levures	<i>Saccharomyces neoformans</i>	Mélanine	Noir	Eisenman <i>et al.</i> (2012)
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxanthine	Rose-rouge	Bjerkeng <i>et al.</i> (2007)
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularhodine	Orange-rouge	Buzzini <i>et al.</i> (2001)
Micro-algues	<i>Hematococcus sp.</i>	Canthaxanthin	Jaune-orange	Christaki <i>et al.</i> (2013)
	<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ - carotene	Rouge	Hejazi <i>et al.</i> (2004)
	<i>Chlorococcum sp.</i>	Leutine	Orange	Del Campo <i>et al.</i> (2000)

Les pigments sont produits par voie microbienne sous forme de métabolites secondaires. Ce sont des composés organiques qui ne participent pas directement à la croissance, au développement ou à la reproduction normale de l'organisme (Lin *et al.*, 2008). Certains colorants peuvent être produits à partir de résidus industriels, réduisant ainsi la pollution de l'eau et de l'environnement (Babitha *et al.*, 2004). Ils comprennent les caroténoïdes, les mélanines, les flavines, les phénazines, les quinines, les bactériochlorophylles (en particulier les monascines), la violacéine et l'indigo (Duffosé, 2009).

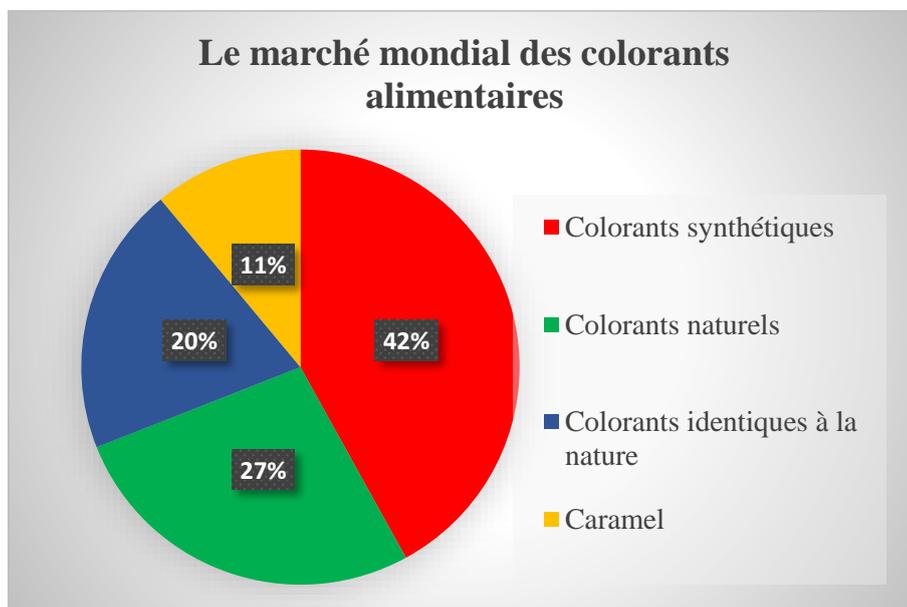
#### **1.1.4- Avantages des pigments naturels (microbiens)**

Les colorants naturels présentent de nombreux avantages sur les colorants synthétiques d'un point de vue sanitaire et économique. Ils sont respectueux de l'environnement, non polluants, non dangereux, non cancérigènes et non toxiques. Contrairement aux pigments synthétiques qui provoquent des allergies, telles que des éruptions cutanées, de graves réactions dans les voies respiratoires, appelées « sensibilisation respiratoire » lors d'une exposition au moment de leur manipulation (Duran *et al.*, 2002). Ainsi, l'utilisation de produits chimiques puissants dans des conditions de travail humides peut également provoquer une dermatite. Un petit nombre de colorants synthétiques à base de benzidine sont soupçonnés de causer le cancer de la vessie chez l'homme (Ozaki *et al.*, 2002). En revanche, les pigments naturels peuvent être recyclés après usage et présentent des avantages en termes de gestion des déchets et une sécurité totale au travail comme ils peuvent produire une large gamme de couleurs.

#### **1.1.5- Marché mondial des colorants naturels**

La commercialisation des produits naturels à l'échelle internationale est arrivée à une phase d'expansion extraordinaire. Ceci est dû à l'essor des marchés, projeté au-delà de 4 milliards de dollars américains rien qu'en 2000 pour les États-Unis, et l'émergence de nouvelles catégories de substances naturelles qui modifient rapidement et fondamentalement l'idée de la santé et des maladies (Downham et Collins, 2000). Ainsi, une estimation raisonnable serait de 940 millions de dollars pouvant être segmentée comme ci-mentionnée dans la figure 2. Actuellement, la croissance la plus importante a été rapportée dans la catégorie des colorants d'origine naturelle en raison des améliorations de la stabilité ainsi que les industries alimentaires visent à répondre à la perception croissante des consommateurs réclamant que "le naturel est meilleur". Cependant, le coût des colorants naturels est plus élevé que celui des colorants synthétiques de nuances respectives. Toutefois, cet obstacle peut être surmonté

par la production en masse des colorants naturels d'origine microbienne, ce qui pourrait réduire de manière significative le coût de production face à la demande en hausse.



**Figure 2.** Marché en pourcentage des colorants alimentaires (Babitha, 2009).

#### **1.1.6- Technologies de production de bio-pigments d'origine microbienne**

La biotechnologie des bio-pigments possède deux approches fondamentales ; la première consiste en l'isolement et le criblage de microorganismes producteurs de pigments, améliorer les conditions de culture en vue de maximiser le rendement en pigment comme métabolite secondaire. La seconde approche, plus aboutie, consiste à l'amélioration génétique de souches potentiellement productrices et déjà identifiées (Sumathy, 2009). Cependant, des tests de sécurité du produit et la stabilité génétique de la souche sont indispensables.

Ainsi, des tentatives visant la production de colorants alimentaires par l'expression hétérologue de voies biosynthétiques à partir de producteurs de pigments déjà connus ou nouveaux sont en cours d'exécution (Kim *et al.*, 2003 ; Lakrod *et al.*, 2003).

##### ***1.1.6.1- Procédés de fermentation***

La potentielle pigmentation et la croissance du micro-organisme producteur sont significativement affectées par les conditions de fermentation, c'est-à-dire ; la fermentation submergée (SmF) et la fermentation à l'état solide dite Solid State Fermentation (SSF). Dans la production à large échelle, le type SmF est préféré sur la SSF. Cependant, en raison de

son aspect naturel, la fermentation à l'état solide semble être plus prometteuse d'un point de vue économique (Arunachala et Narmadhapriya, 2011).

Les pigments microbiens peuvent être produits soit par fermentation immergée, soit par fermentation à l'état solide. Dans le procédé de fermentation SSF, la biosynthèse des pigments microbiens se produit à la surface du substrat solide (Grossart *et al.*, 2009 ; Araujo *et al.*, 2010). Cette technique de fermentation à l'état solide préserve les eaux usées et produit une plus grande quantité de métabolites. Par contre, dans la fermentation SmF, les micro-organismes sont cultivés en milieu liquide avec une agitation et une aération appropriée permettant une croissance homogène des cellules et bonne distribution des composants du milieu (Cho *et al.*, 2002 ; Heer et Sharma, 2017).

#### ***1.1.6.2- Facteurs influençant la production de pigments***

Différents paramètres tels que la source d'azote et de carbone, le pH, l'aération, et la température sont primordiaux pour la production de pigments.

Le prix élevé des milieux synthétiques a poussé les chercheurs à développer des procédés peu coûteux ainsi que des méthodes d'extraction pour la production de pigments microbiens. Divers efforts ont été faits pour utiliser les déchets des sous-produits agricoles et industriels pour la production à grande échelle des pigments microbiens (Palanichamy *et al.*, 2011 ; Singh, 2017).

#### ***1.1.6.3- Optimisation des paramètres du bioprocédé pigmentaire***

La production massive de bio-pigments à partir des micro-organismes peut être faite avec une technologie de fermentation bien optimisée ainsi que l'ingénierie métabolique (Nielsen et Olsson, 2002). Cette technique vise à maximiser le rendement tout en minimisant le coût de production. Il s'agit de sélectionner, cribler et optimiser les paramètres physicochimiques de croissance de la souche productrice influençant de manière significative le rendement pigmentaire sans avoir recours à l'amélioration génétique de la souche souvent très coûteuses et peu stable.

#### ***1.1.6.4- Méthodes d'extraction et de séparation***

Avec l'émergence de nouveaux domaines de recherche, les nécessités tant qualitatives que quantitatives des pigments microbiens ont augmenté le développement des techniques d'extraction, séparation et purification des pigments représente une étape cruciale.

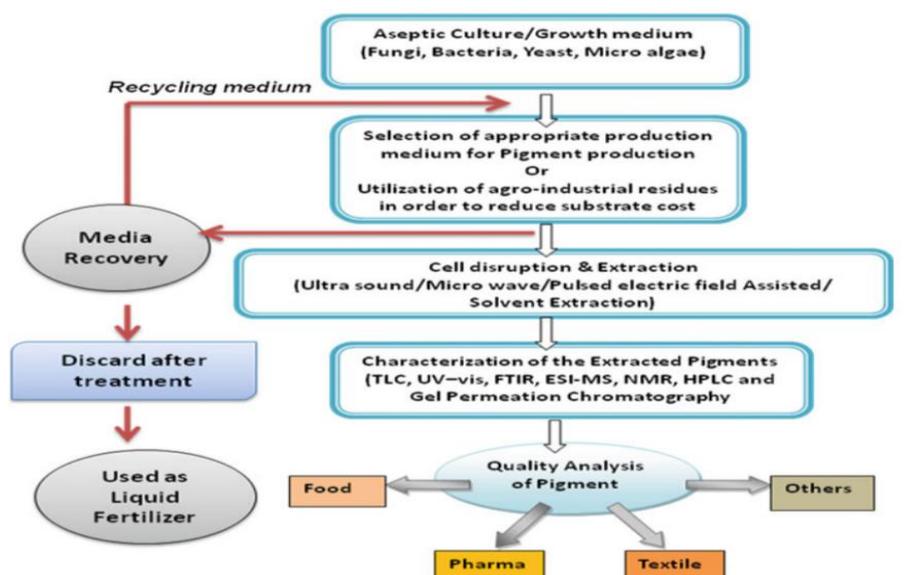
#### 1.1.6.4.1- Extraction par solvants

L'extraction par solvant est la méthode conventionnelle suivie pour extraire les couleurs. Les pigments anthocyanes et bétalaïnes, sont solubles dans l'eau, et souvent extraits de l'eau ou avec méthanol aqueux. L'hexane est utilisé pour l'extraction des caroténoïdes.

Cependant cette méthode consomme une grande quantité de solvant comparé au rendement en pigment pur étant très faible comparé au coût de production. D'autant plus que des traces de solvants pouvant être toxiques pour les organismes vivants, notamment l'acétone ou l'hexane ont été signalés (Dufosse, 2006).

#### 1.1.6.4.2- Adsorption sur résines

Les résines d'adsorption peuvent également être utilisés pour séparer les pigments du milieu de culture sans avoir recours aux solvants (Raina *et al.*, 2011). Cette technologie réduirait le coût de fonctionnement car la consommation de solvants d'extraction d'adsorbants réutilisables a diminué avec une récupération accrue allant jusqu'à (83 %) par rapport à la chromatographie sur gel de silice (50%) et l'extraction conventionnelle (Wang *et al.*, 2004). Ces méthodes peuvent être assisté par d'autres techniques telles que La haute pression hydrostatique (HHP) et Champ électrique pulsé (PEF) (Mason et Zhao, 1994), l'ultrason (Nayak *et al.*, 2007), les irradiations gamma (Sowbhagya et Chitra, 2010), l'extraction enzymatique (Rodriguez *et al.*, 2001) ainsi que les traitements membranaires (Downham et Collins, 2001 ; Spence *et al.*, 2010). Une représentation schématique de la production, de la caractérisation et les applications de divers pigments ont été illustrées à la figure 3.



**Figure 3.** Production, caractérisation et applications des pigments (Mishra *et al.*, 2019).

### ***1.1.6.5- Caractérisation et purification***

Après l'extraction par solvants, les pigments sont par la suite, concentrés sous vide dans un évaporateur rotatif et sujet à purification. L'identification et la quantification du pigment est effectuée par spectrophotométrie ou par les méthodes chromatographiques en raison de leur pouvoir de séparation et de leur sensibilité élevée. De plus, le caractère non volatil et la sensibilité du pigment aux hautes températures ne leur permet d'être analysés par des méthodes autres que les techniques chromatographiques telles que la chromatographie couche mince CCM et chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Elles sont utilisées pour la détermination quantitative de fractions pigmentaires individuelles (Naidu et Sowbhagya, 2012).

Les spectres de masse sont l'un des moyens les plus performants pour l'identification des composés colorés tels que les pigments. L'utilisation combinée de la chromatographie sur couche mince en phase inverse (RP-TLC) et l'HPLC a permis d'identifier un pigment à partir d'une culture de *Trichoderma sp.* (Kiss *et al.*, 2000).

Un pigment violet rougeâtre de *Streptomyces sp.*, a également été extrait avec de l'acétate d'éthyle et purifié par une série de chromatographies sur colonne puis identifié par résonance magnétique nucléaire (RMN) et s'est avéré être une Naphtoquinone (Kamijo *et al.*, 1999).

### ***1.1.7- Potentielles applications des bio-pigments***

Les pigments microbiens qui sont principalement utilisées comme colorants dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et textile sont illustrés dans le tableau 2.

#### ***1.1.7.1- Industrie pharmaceutique***

La production de pigment par *Streptomyces sp. J25*, isolée à partir du sol désertique par la méthode SSF a exhibée une activité antituberculeuse. Le genre *Streptomyces* ou *Serratia* peut produire une substance rouge du squelette pyrrolylpyrométhène, comme la prodigiosine, la métacycloprodigiosine, ou la desméthoxyprodigiosine. Ces substances sont connues pour avoir un effet antibiotique et effet antipaludéen. (Nakamura *et al.*, 1989) ont été les premiers à décrire l'activité immunosuppressive de la prodigiosine. Ces chercheurs ont montré que la présence de prodigiosine inhibe la prolifération polyclonale des lymphocytes T par rapport aux lymphocytes B.

Le pigment violacéine des bactéries Gram négatif comme *Chromobacterium violaceum* et *Pseudoalteromonas luteoviolacea* aurait des propriétés antiprotozoaires, anticancéreuses,

antivirales, antibactériennes et antioxydantes (Ferreira *et al.*, 2004), tandis que la violacéine et la flexirubine, un pigment jaune-orange de *Flavobacterium sp.*, ont toutes les deux montré des effets antimycobactériens (Mojib *et al.*, 2010). La sclérotiorine, pigment jaune-orange, produite par *P. sclerotiorum*, a des activités biologiques importantes, telles que l'activité de liaison aux récepteurs de l'endothéline, inhibition de l'aldose réductase, activité antimicrobienne, activité antifongique, induction de l'apoptose des cellules cancéreuses HCT-116 et effets inhibiteurs sur l'intégrase et la protéase du virus de l'immunodéficience humaine du VIH-1 (Arunpanichlert *et al.*, 2010 ; Giridharan *et al.*, 2012). Le pigment extracellulaire produit par *P. purpurogenum* présente une activité antimicrobienne dans des conditions d'obscurité et pourrait avoir des potentielles applications dans les industries pharmaceutiques (Geweely, 2011).

#### 1.1.7.2- Colorants alimentaires

L'industrie alimentaire s'intéresse de plus en plus à l'utilisation de la technologie microbienne pour produire une large gamme de colorants alimentaires. Ces colorants d'origine microbienne offrent, à la fois, un attrait visuel, des avantages probiotiques pour la santé, une production bon marché, une facilité d'extraction, un rendement élevé grâce à l'amélioration de la souche, une abondance de matières premières et une absence de variation saisonnière (Aberoumand, 2011 ; Zhang *et al.*, 2006).

#### 1.1.7.3- Teinture textile

Comme les colorants textiles ne sont pas contrôlés par autant d'exigences de sécurité que les colorants alimentaires, beaucoup plus de pigments bactériens sont utilisés dans les textiles et autres produits non comestibles. Les pigments rouges et violets, identifiés respectivement comme prodigiosine et violacéine, ont été utilisés comme colorants sur différents tissus, y compris la fibre acrylique, la soie, le coton, le polyester et le polyester microfibre. La solidité de la couleur est la tendance d'un pigment à adhérer à un tissu lorsqu'il est lavé et exposé à la lumière ou à la transpiration. Depuis la découverte de colorants naturels sûrs et efficaces, ils ont été utilisés sur des produits tels que le denim et le fil, remplaçant les colorants synthétiques potentiellement nocifs. Les bio-pigments sont biodégradables et leur production est indépendante de la saison. Les industries peuvent les produire à grande échelle en utilisant des technologies de fermentation contrôlée (Nerurka *et al.*, 2013). Le pigment noir nommé aspergilline, produit à partir d'*Aspergillus niger*, contient des mélanines de haut poids moléculaire capables d'être saturées par dérivé quinoïdepentacyclique (Ray et Eakin,

1975). Le pigment anthraquinone, de *Fusariumoxysporum*, est utilisé pour teindre la laine (Nagia et Mohamedy, 2007), tandis que les pigments purifiés de *P. purpurogenum* sont utilisés dans la teinture naturelle des tissus de coton et ont une bonne portée pour fournir une activité antibactérienne (Velmurugan *et al.*, 2010).

**Tableau 2.** Fonctions des différents pigments microbiens. (Ray et Eakin, 1975) ; (Duran *et al.*, 2002) ; (Mapari *et al.*, 2005) ; (Duffosé, 2006) ; (Teixeria *et al.*, 2012) et (Venil *et al.*, 2013).

Microorganisme	Pigment	Fonction
<b>Actinomycetes</b>		
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Actinorhodine	Additif alimentaire
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Indigoidine	Antibactérien, Antifongique, Antimalaria
<b>Bactéries</b>		
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaxanthine	Additif alimentaire
<i>Bacillus subtilis</i>	Riboflavine	Colorant alimentaire
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violaceine	Antiviral Antibactérien, antitumoral
<i>Chryseobacterium</i>	Flexirubine	Additif alimentaire
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xanthomonadine	Antimicrobien, antibactérien
<b>Mycètes</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	Aspergilline	Colorant alimentaire
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	Acide Néoaspergillique	Teinture textile
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	$\beta$ -carotène	Antibactérien
<i>Fusarium solani</i>	Fusarubine	Colorant alimentaire
<i>Fusarium verticilliodies</i>	Naphthoquinone	Produits pharmaceutiques
<i>Monascus sp.</i>	Monascusones	Anticancer Textile teinture
<i>Penicillium oxalicum</i>	Anthraquinone	Cosmétique
<i>Penicillium purpurgenum</i>	Pencolide	Teinture textile Antifongique Industrie alimentaire
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	Sclerotiorine	Teinture textile
<i>Trichoderma viride</i>	Viridine	Activité antifongique

## 1.2- Actinobactéries

### 1.2.1- Généralités sur les Actinobactéries

Les Actinomycètes, également connus sous le nom des Actinobactéries (Perry *et al.*, 2004), sont des microorganismes procaryotes qui ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons de par les similitudes morphologiques à la fois avec les bactéries et avec les champignons (Andriambololona, 2010). Ce sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires à la morphologie complexe avec la présence d'hyphes (Eunice et Prosser, 1983 ; Colombié, 2005). Ces hyphes ou filaments sont produits par germination d'une spore puis irradient par croissance centrifuge tout autour de ce germe (Gottlieb, 1973 ; Eunice et Prosser, 1983 ; Lechevalier *et al.*, 1981).

Les actinobactéries constituent l'ordre des *actinomycétales*. Ce sont des bactéries formant des filaments minces, ramifiés et septés, bacilles à coloration gram positive (Dgigal, 2003). Elles possèdent un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% ce qui les rendent très stables génétiquement (Larpent, 1989). La plupart des espèces sont immobiles, saprophytes, hétérotrophes mais certaines sont chimio-autotrophes (Ensign *et al.*, 1993). Elles possèdent un équipement enzymatique diversifié leur permettant de dégrader la matière organique (Gupta *et al.*, 1995; Fodil *et al.*, 2011). Le pH optimal de leur croissance est généralement compris entre 5,0 et 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (Williams et Wellington, 1982 a ; Goodfellow et Williams, 1983).

### 1.2.2- Caractéristiques morphologiques et culturelles

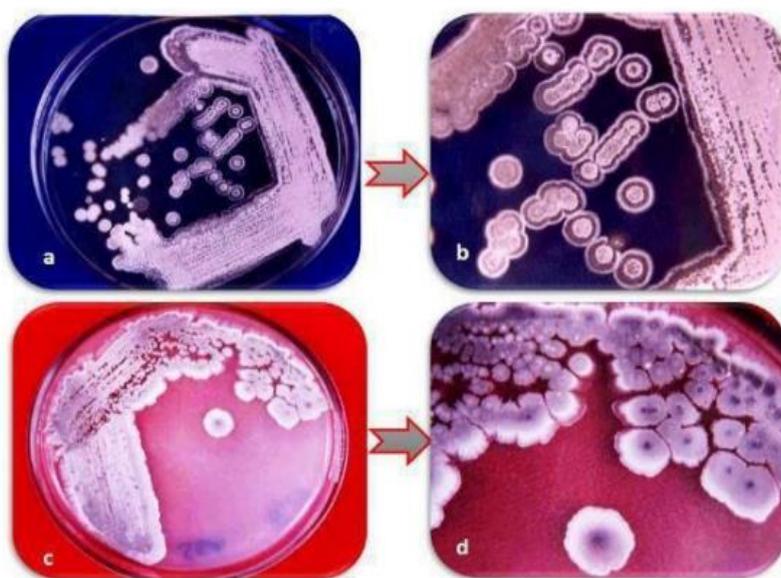
Les actinobactéries sont des bactéries aérobies, formant des spores caractérisées par une croissance du mycélium aérien et de substrat (Chaudhary *et al.*, 2013). Elles se reproduisent par fission binaire, par sporulation ou par formation de conidies. L'aspect morphologique des actinobactéries (Figure 4) est compact, souvent coriace, et croquant donnant un aspect conique avec une surface sèche sur les milieux de culture et sont souvent recouverts de mycélium aérien (Anandan *et al.*, 2016).

Le mycélium aérien est habituellement plus épais que le mycélium du substrat (Figure 5). Le mycélium aérien présente une différenciation suffisante et permet de classer les isolats en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires dans des conditions standardisé. Ce critère est important pour la classification du genre

*Streptomyces* en espèces, comprenant une structure (cotonneuse, veloutée ou en poudre), une formation d'anneaux ou de zones concentriques et une pigmentation distinguée.

Le mycélium de substrat des Actinobactéries se présente sous différentes tailles, formes et épaisseur (Figure 5). Sa couleur varie du blanc ou pratiquement incolore au jaune, marron, rouge, rose, orange, vert, ou noir.

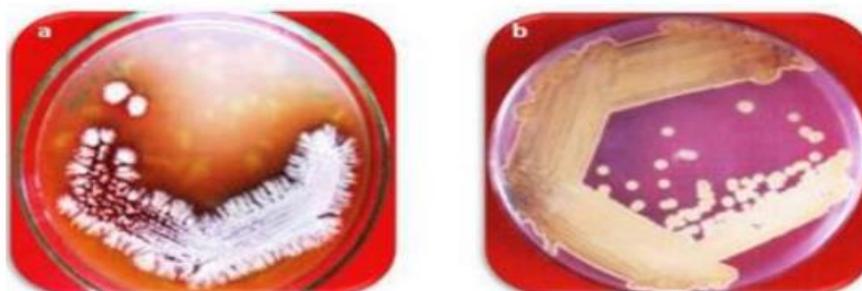
Tous les changements phénotypiques induits par des influences environnementales aideront les actinobactéries car ils se vantent de morphologies de colonies distinctives et produisent une variété de pigments et de filaments de ramification appelés hyphes aériens (Goodfellow *et al.*, 2012), ce qui leur confère une apparence caractéristique floue.



**Figure 4.** Aspect morphologique d'isolats d'actinobactéries sur gélose amidon caséine.

(a) et (c) Tapis mycéliens des isolats actinobactériens.

(b) et (d) Morphologie des colonies individuelles (Anandan *et al.*, 2016).



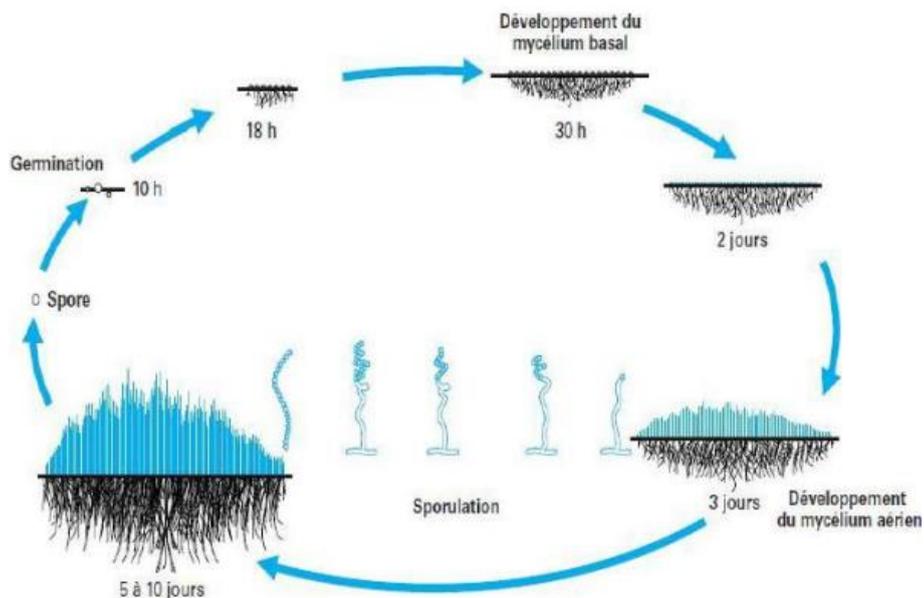
**Figure 5.** Croissance abondante d'isolat d'actinobactéries sur milieu gélose amidon caséine.

(a) Mycélium aérien ; (b) Verso (revers) de la boîte montrant le mycélium du substrat (Anandan *et al.*, 2016).

### 1.2.3- Cycle de développement

Le mode de croissance des actinobactéries implique généralement un cycle biologique complexe. La plupart des actinobactéries produisent un réseau d'hyphes septés et ramifiés, à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat (gélose) pour former un tapis dense d'hyphes (mycélium végétatif ou de substrat). Chez de nombreuses actinobactéries, les hyphes végétatifs se développent vers le haut formant un mycélium aérien qui donne un aspect floconneux aux colonies. Généralement, le mycélium aérien forme des chaînes de spores par septation. Une fois mures, elles sont déliées dans l'environnement (exospores). Il existe deux types de spores selon leur localisation dans la cellule. Si les spores sont localisées dans un sporange, on parle de sporangiospores. Ces spores peuvent avoir des formes très variables (Prescott *et al.*, 2018).

La plupart des actinomycètes sont immobiles. Cependant, certains produisent des spores flagellées, appelées zoospores, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques. Les spores d'actinomycètes présentent une grande variété d'arrangements (Belyagoubi, 2014), notamment isolées (*Micromonospora*), à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînettes (*Actinomadura*), et enfin en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. Elles peuvent également être rayonnantes autour d'hyphes sporophores.



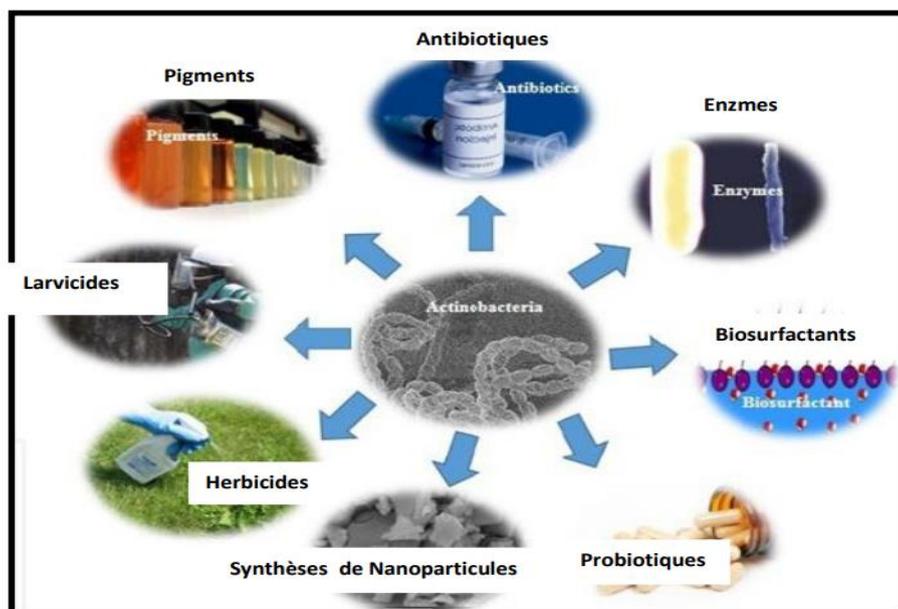
**Figure 6.** Cycle de développement des actinobactéries (Delaunay *et al.*, 2003 ; Scherr et Nguyen, 2009).

#### 1.2.4- Ecologie et distribution dans la nature

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires, largement distribuées dans la nature et sont généralement saprophytes. Cependant, quelques formes sont pathogènes pour l'homme, les plantes ou les animaux. Elles colonisent différentes niches écologiques, notamment les écosystèmes terrestres, aquatiques (eaux douces et salines et air) et aériens. Les actinobactéries sont significativement abondant dans le sol avec une proportion dominante du genre *Streptomyces* qui est le plus isolé. La majorité des actinobactéries vivent dans des conditions d'humidité peu élevées où l'activité de l'eau est très faible (Belyagoubi, 2014). Physiologiquement, les formes aérobies des actinobactéries sont les plus répandues. Néanmoins, les formes anaérobies se trouvent primitivement chez les animaux et l'homme. Les actinobactéries préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, elles sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles ou thermotolérants pouvant se développer dans des températures avoisinant les 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Boucheffa, 2011).

#### 1.2.5- Applications biotechnologiques

Les actinobactéries sont reconnues pour leur production d'une panoplie de métabolites primaires et secondaires à grands intérêts biotechnologique et d'applications importantes dans divers domaines. Ils sont également une source prometteuse d'une large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle. Une grande fraction d'antibiotiques commercialisés sur le marché provient des actinobactéries, notamment la Streptomycine et la rifamycine (Boughachich, 2012). Ils produisent des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement du cancer et les immunomodifiants qui améliorent la réponse immunitaire. Ils ont la capacité de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aromatiques et aliphatiques (Sokolovska *et al.*, 2003). Ils effectuent des transformations microbiennes de composés organiques, un domaine de grande valeur commerciale. Les membres de nombreux genres d'actinobactéries peuvent être potentiellement utilisés dans la bioconversion des déchets agricoles et urbains sous-utilisés en produits chimiques de haute valeur. Les actinobactéries antagonistes des agents pathogènes pour les plantes sont également d'une grande importance en biotechnologie végétale. Ainsi, ces souches peuvent être employées dans la lutte biologique contre différentes maladies des cultures. Leur potentiel métabolique offre un domaine de recherche vaste et prometteur. La figure 7 représente une brève description des applications phares des actinobactéries.

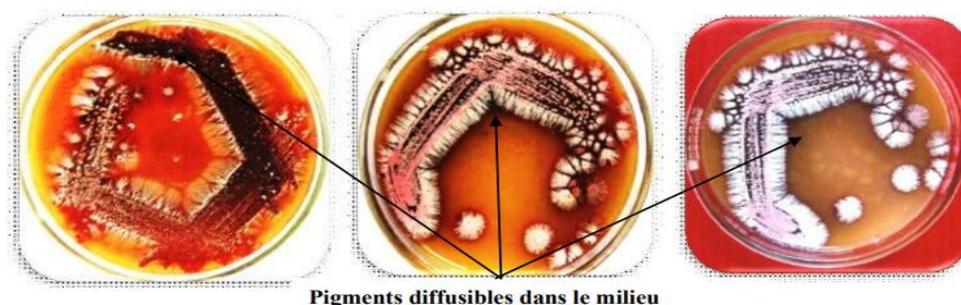


**Figure 7.** Applications biotechnologiques des Actinobactéries (Anandan *et al.*, 2016).

### 1.2.6- Bio-pigments produit par les actinobactéries

Les pigments naturels produits par les actinobactéries constituent d'alternatives écologiques, moins dangereuses et peu coûteuses contrairement aux colorants chimiques de synthèse. Ainsi, les limites présentées par les colorants synthétiques s'orientent généralement autour des dangers que posent les produits chimiques constituant la matière première aux producteurs et main d'œuvre industrielle. La gestion des déchets toxiques issus du processus de production des pigments chimiques, notamment des pigments micro-orientés est très préoccupante et nécessite des dispositions spécifiques.

Les actinobactéries sont caractérisées par la production de divers pigments sur les milieux naturels ou synthétiques (Figure 8). Ces pigments diffusibles dans la gélose représentent comme un caractère cultural important dans la description et identification de ces microorganismes (Goodfellow *et al.*, 2012).



**Figure 8.** Pigment diffusible produit par diverses Actinobactéries dans le milieu agar de caséine d'amidon (Anandan *et al.*, 2016).

Ces pigments apparaissent habituellement sous différentes nuances de bleu, violet, rouge, rose, jaune, vert, brun et noir (Anandan *et al.*, 2016), et peuvent être dissouts dans le milieu de culture ou retenu dans le mycélium de l'actinobactérie productrice. Les espèces du genre *Streptomyces* peuvent produire deux types de pigments, à savoir les endopigments (liés à certaines structures cellulaires), et/ou des exopigments (excrétés dans le milieu environnant). Certains antibiotiques produits par les Actinobactéries sont considérés comme des pigments.

La synthèse des pigments par voie microbienne est influencée par différents facteurs extrinsèques, physicochimiques, liées aux paramètres culturels mais également intrinsèques, génétiques, liés au génome de la souche elle-même (Palanichamy *et al.*, 2011). Sa formation est également liée aux mécanismes respiratoires, aux mécanismes de défense et à la protection aux ultraviolettes. Le tableau 3 résume quelques bio-pigments produits par les actinobactéries.

**Tableau 3.** Actinobactéries productrices des pigments.

<b>Microorganismes</b>	<b>Pigments</b>	<b>Références</b>
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigoidine	Starr, (1958) ; Reverchon <i>et al.</i> (2002) ; Chu <i>et al.</i> (2010)
<i>Streptomyces</i> sp.	Undécyle- prodigiosine	Liu <i>et al.</i> (2005a) ; Ju <i>et al.</i> (2005b) ; Stankovic <i>et al.</i> (2012)
<i>Corynebacterium michigannense</i>	Zéaxanthine	Konuray et Erginkaya (2015)
<i>Arthrobacter</i>	Indigoidine	Sutthiwong <i>et al.</i> (2014)
<i>Streptomyces</i>	Mélanine	Dastager <i>et al.</i> (2006) ; Silva <i>et al.</i> (2019) ; Wang <i>et al.</i> (2019)
<i>Streptomyces</i> sp.	Caroténoïde	Galaupet <i>et al.</i> (2005) ; Dufossé <i>et al.</i> (2005)
<i>Micromonospora lupine</i>	Anthraquinone	Igarashi <i>et al.</i> (2007)
<i>Streptomyces glaucescens</i> NEAE-H	Mélanine	El-Naggar <i>et al.</i> (2017)
<i>Streptomyces vietnamensis</i>	Violet-bleu	Zhu <i>et al.</i> (2007)
<i>Streptomyces shaanxiensis</i>	Bleu	Lin <i>et al.</i> (2012)
<i>Streptomyces caeruleatus</i>	Bleu foncé	Zhu <i>et al.</i> (2011)
<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	Rouge	M. Assia <i>et al.</i> (2018)
<i>Arthrobacter</i> sp.	Caroténoïde	S. Afra <i>et al.</i> (2017)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Astaxanthine	Henke <i>et al.</i> (2018)
<i>Micrococcus luteus</i>	Sarcinaxanthine	Netzer <i>et al.</i> (2010)
<i>Streptomyces iakyrus</i>	Phenazinomycine	Qin <i>et al.</i> (2014)
<i>Streptomyces gramineus</i>	Mélanine	Lee HJ <i>et al.</i> (2012)
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Doxorubicine	Han AR <i>et al.</i> (2011)
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Jaune	Selvameenal <i>et al.</i> (2009)
<i>Streptomyces peucetius</i>	Doxorubicine	Niraula <i>et al.</i> (2010)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Actinorhodine	Charkoudian <i>et al.</i> (2010) ; Sánchez-marroquína et Zapata (1954)
<i>Streptomyces lividans</i>	Actinorhodine	Shima <i>et al.</i> (1996)
<i>Arthrobacter oxydans</i>	Indigoidine	Giuffrida <i>et al.</i> (2016)
<i>Streptomyces</i> sp.	Brin	Dharmikp et gomashea (2013)
<i>Actinomyces viscosus</i>	Vert	Tandalea <i>et al.</i> (2018)

## **2- Matériel et méthodes**

### **2.1- Matériel biologique**

#### **2.1.1- Souche d'actinobactérie**

Le matériel bactérien nous a été aimablement fourni par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), lieu du stage. Il s'agit d'une souche d'actinobactérie, appartenant au genre *Streptomyces*, isolée à partir de la rhizosphère du blé dur.

##### **2.1.1.1- Réactivation de la souche**

La réactivation de la souche est effectuée par une série de repiquages successifs sur gélose GLM (Annexe1). Ainsi, le mycélium aérien/masse sporale d'une colonie pure a été prélevé(e) aseptiquement à l'aide d'une anse de platine puisensemencé(e) en surface de la gélose par la méthode des stries. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C pendant 6 jours. Une observation régulière est effectuée pour vérifier la pureté de la souche.

##### **2.1.1.2- Caractères culturels et morphologiques de la souche**

###### **2.1.1.2.1- Observation microscopique**

L'examen microscopique de la souche a été réalisé par l'observation d'un frottis réalisé à partir d'une culture de 6 jours après coloration de Gram (Annexe 2). L'observation a été effectuée au grossissement x100 (Motic), avec l'huile à immersion pour permettre l'observation des formes sporales ainsi que le mycélium.

###### **2.1.1.2.2- Observation macroscopique**

L'étude de l'aspect macroscopique de la souche d'intérêt est réalisée selon la méthode décrite par Shirling et Gottlieb (1966). Elle consiste en une observation à l'œil nu des différents caractères phénotypiques, notamment, la taille de la colonie, la couleur du mycélium de substrat (MS) et le mycélium aérien (MA), aussi la présence de pigments diffusibles dans la gélose. Ainsi, la caractérisation macromorphologique est effectuée sur les milieux gélosés spécifiques ISP (*International Streptomyces Project*) ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7 et ISP9 (Annexe 1) après 6 jours d'incubation à 28°C.

###### **2.1.1.3- Equipement enzymatique**

Ces tests visent à mettre en évidence quelques activités enzymatiques impliquées dans la

dégradation de la matière organique permettant la survie de la souche d'actinobactérie et permettent d'élaborer son profil métabolique.

#### ***2.1.1.3.1- Activité amylolytique***

L'activité amylolytique est évaluée selon la méthode modifiée de Kurup et Fink (1975), sur le milieu minimal additionné d'amidon soluble à 1% (w/v) (Annexe 1) comme seule source de carbone. L'ensemencement est réalisé par spot (touche) au centre et à la surface de la gélose. Après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C, les boîtes ont été inondées avec une solution au Lugol. Les zones colorées en violet indiquent la présence d'amidon tandis que les halos (zone jaune autour de la colonie) indiquent la présence d'une activité amylolytique.

#### ***2.1.1.3.2- Activité cellulolytique***

La bactérie a étéensemencée par spot au centre de la gélose CMC (Annexe 1) contenant du Carboxyméthyl cellulose à 1% (w/v) comme une seule source de carbone. Après 5 jours d'incubation à 28°C, les boîtes sont inondées avec une solution au rouge de Congo à 0,1% pendant 30 min. Les boîtes sont par la suite rincées avec une solution de NaCl 1M pendant 5min. L'hydrolyse de la cellulose a été révélée par l'apparition d'un halo jaune autour de la colonie (Budihal *et al.*, 2015).

#### ***2.1.1.3.3- Activité xylanolytique***

Afin de détecter l'activité xylanolytique directement sur milieu solide, la bactérie a étéensemencée par spot au centre d'une gélose additionnée de 1% (w/v) de Xylane de maïs (ou hémicellulose) (Annexe 1) comme une seule source de carbone. Après 5 jours d'incubation à 28°C, les boîtes sont inondées par une solution au rouge de Congo à 0,1% (Annexe 1) pendant 30 min puis sont rincées avec une solution de NaCl 1M pendant 15min. L'hydrolyse de xylane a été révélée par l'apparition d'un halo autour de la colonie bactérienne.

#### ***2.1.1.3.4- Activité protéolytique***

L'hydrolyse de la caséine du lait est mise en évidence par l'ensemencement en spot de la bactérie sur gélose contenant 10% de lait écrémé (v/v) (Annexe 1) suivie d'une incubation à 28°C pendant 3 jours. L'hydrolyse de la caséine est confirmée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie signifiant la dégradation de la caséine (Gordon et Smith, 1953 ; Williams et Cross, 1971).

### **2.1.1.3.5- Activité lipolytique**

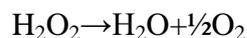
L'hydrolyse de la lécithine et les lipoprotéines est recherchée sur une gélose Braid Parker au jaune d'œuf (Annexe 1) car il est composé de lécithine, triglycérides et d'une lipoprotéine. L'ensemencement des boîtes est réalisé par spot (touche) au centre de la gélose ensuite les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours.

- L'apparition d'un halo opaque, blanc jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à la limite, indique la présence de lécithinases.
- En absence de lécithinases toute opacité floue à la surface de la colonie indique la présence d'une lipase.
- La présence lipoprotéinases est révélée par l'apparition d'un halo huileux, brillant clair autour de la colonie.

### **2.1.1.4- Caractères biochimiques de la souche**

#### **2.1.1.4.1- Recherche de la catalase**

La production de catalase est révélée par un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles issues de la production d'O<sub>2</sub> provenant de la dégradation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction suivante (Delarras, 2007) :



Pour cela, une colonie bactérienne a été frottée énergiquement contre une lame contenant une goutte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 volumes). L'absence de mousse/bulles indique l'absence de catalase.

### **2.1.2- Production de pigment**

La production du bio-pigment est recherchée sur le milieu synthétique ISP2 en gélose par ensemencement en surface (Fermentation état solide ; SSF), et par une culture en milieu liquide (Fermentation en condition submergée ; SmF).

#### **2.1.2.1- Culture sur milieu solide conventionnel**

Afin de produire le pigment directement sur milieu solide, la souche a été repiquée sur le milieu GLM, après 10 jours d'incubation à 28°C, la production de pigment est révélée par l'observation à l'œil nu de la couleur bleue diffusible dans la gélose.

### ***2.1.2.2- Culture sur milieu liquide conventionnel***

#### ***2.1.2.2.1- Milieu de fermentation***

Afin d'étudier la production de pigment par la souche, le milieu ISP2 liquide à pH 7,2 a été utilisé. Le milieu a été réparti en volumes de 100 ml dans des erlenmeyers de 250 ml.

#### ***2.1.2.2.2- Préparation de l'inoculum***

L'inoculum a été réalisé par grattage à l'aide d'une anse de platine de la masse sporale de colonies jeunes de 6-8 jours ou la présence de pigment a été confirmée puis introduite dans un flacon contenant 40ml de l'eau physiologique stérile (Annexe 1). Le flacon a été homogénéisé pendant 15 minutes pour permettre le détachement des spores. La concentration sporale a été ajustée à  $3.10^7$  spores.ml<sup>-1</sup> à l'aide d'une cellule de comptage de type Thoma. Cette concentration sporale a été maintenue pour tous les essais de fermentation.

#### ***2.1.2.2.3- Inoculation et incubation***

Les erlenmeyers préparés précédemment, ont été inoculés avec 1 ml de la suspension sporale ( $3 \times 10^7$  spores.ml<sup>-1</sup>). Les erlenmeyers ont été incubés à 28°C dans des conditions statiques dans une étuve de stabilisation de type BINDER.

### **2.1.3- Méthodes analytiques**

Après fermentation, différents paramètres ont été opérés afin d'évaluer la croissance microbienne et la production de métabolite d'intérêt ; le bio-pigment.

#### ***2.1.3.1- Evaluation de la biomasse produite***

La masse mycélienne a été estimée par séparation du milieu de culture via filtration sur papier filtre wattman n°1 préalablement pesé. Les papiers filtres ont été séchés au four pasteur à 50 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

#### ***2.1.3.2- Mesure du pH***

Au cours de la fermentation, la mesure du pH a été effectuée sur le filtrat de culture à l'aide d'un pH-mètre (Jenway, UK).

#### ***2.1.3.3- Dosage spectroscopique***

Afin de déterminer le pic majeur d'absorbance du filtrat contenant le pigment, un scan balayage des longueurs d'onde 300-900 nm a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre

UV/VISIBLE (Jenway).

#### **2.1.3.4- Extraction de pigment**

##### *2.1.3.4.1- Extraction par la méthode de précipitation acide*

Le pigment a été isolé du filtrat par la méthode de la précipitation acide. Ainsi le reste du filtrat a été par la suite récupéré dans des tubes falcons de 50 ml préalablement pesés puis acidifié à pH 2 avec de l'acide hydrochlorique HCl 12 N. Un précipité rouge a été obtenu après incubation à 4°C pendant 30 min. Ce dernier a été recueilli par centrifugation à 5500 rpm pendant 30 min à 4°C (Ortoalresa « Digicen 21 R », Spain). Le culot a été récupéré puis séché à l'étuve à 30°C. La dernière étape consiste à peser les tubes falcons pour déterminer le rendement.

##### *2.1.3.4.2- Extraction par solvants*

L'extraction liquide/liquide a été effectuée par macération du filtrat dans un mélange à base de méthanol 90° et de chloroforme (50:50) (v/v). La phase méthanolique a été récupérée et évaporée sous vide avec un évaporateur rotatif à 50°C (rotavap de type Heidolf, Germany). Le rendement a été calculé et le résidu a été conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.

#### **2.1.4- Caractérisation de pigment**

##### *2.1.4.1- Test de solubilité*

La solubilité du pigment sec dans plusieurs solvants organiques à différents degrés de polarité a été vérifiée. Ces solvants consistent en : eau, éthanol, hexane, isopropanol, acétone, benzène, diméthylsulfoxyde (DMSO), acide sulfurique, acide acétique, butanol, dichlorométhane, acétate d'éthyle, acide phosphorique, dioxan, acétonitrile, méthanol, chloroforme et éther de pétrole.

##### *2.1.4.2- Chromatographie sur couche mince (CCM)*

La chromatographie sur couche mince a été effectuée pour séparer et vérifier la pureté du pigment brut (Balagurunathan et Subramanian, 2001). Différents systèmes de solvant ont été utilisés pour sélectionner le plus performant en matière de séparation des composés du pigment brut. Ces systèmes sont principalement constitués de différentes proportions de solvants représentés en (v/v) comme suit : acide acétique-benzène (9:1), acétone-benzène (1:2), n-hexane-chloroforme (60:40), butanol-acide acétique-eau (70:20:10), isopropanol-eau (9:1), dichlorométhane-méthanol-eau (90:8:2), méthanol-chloroforme-acide acétique-

eau (10:90:0,5:1), acétate d'éthyle-acide acétique-eau (88:6:6) (70:20:10) et (60:30:10) et chloroforme-méthanol (60:40, 50:50, 70:30, 30:70, 80:20 et 20:80).

Les échantillons à séparer sont constitués du pigment brut dissous dans une mixture à base de méthanol et de chloroforme (1:1) (v/v) et considéré comme l'échantillon N°1, le filtrat de culture comme échantillon N°2, le filtrat de culture au pH basique avec du NaOH comme échantillon N°3, et enfin le pigment brut dissous dans un mélange méthanol-eau (8:2) (v/v) comme échantillon N°4.

Les échantillons ont été déposés sur une ligne de dépôt dessinée à 1,5cm du bas de la plaque du gel de silice (10x20 cm) à l'aide d'un tube capillaire. La plaque a été par la suite insérée dans une cuve à élution contenant la phase mobile, recouverte d'un couvercle afin d'éviter l'évaporation des solvants. La migration est arrêtée lorsque le solvant atteint les 2cm du bord supérieur de la plaque CCM.

La plaque a été maintenue à température ambiante pour le séchage complet puis les spots ont été visualisés sous UV (à 365 et 254 nm). Le rapport frontal Rf des spots est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = (D_s / D_e)$$

D'où :

D<sub>s</sub> : représente la distance parcourue par le pigment

D<sub>e</sub> : représente la distance parcourue par le front de solvant

### **2.1.4.3- Activité biologique du pigment**

Le pigment brut a été criblé pour son activité biologique contre les agents pathogènes bactériens, notamment *E.coli* ; *Klebsiella sp.* ; *Enterococcus sp.* ; *Pseudomonas sp.* ; *Staphylococcus sp.* et fongiques avec *Fusarium oxysporum spp* ; *Fusarium culmorum* ; *Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporumf.sp Lycopersici (Fol)* et *Alternaria alternata* par la méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits) et la méthode des cylindres d'Agar (méthode des disques).

#### **2.1.4.3.1- Réactivation des agents pathogènes**

La réactivation des souches bactériennes et fongiques est effectuée par une série de repiquages par stries et par piqure centrale, sur gélose MH (Mueller Hinton Agar) et PDA (Potato dextrose agar) (Annexe 1), respectivement, en prélevant aseptiquement une colonie pure ou le fragment d'un mycélium. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24-

48h pour les bactéries et à 30°C pendant 5 à 7 jours pour les mycètes. Une observation régulière est effectuée pour vérifier la pureté des souches bactériennes et fongique.

### *2.1.4.3.2- Méthode de diffusion sur gélose*

Cette technique, également appelée la méthode des puits, est utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien. Les géloses MH et PDA sont ensemencées, respectivement, par des suspensions bactériennes et fongiques obtenues à partir de colonies jeunes. L'ensemencement se fait par écouvillonnage. Après le séchage des boîtes, la gélose est perforée au centre à l'aide d'un perforateur pour obtenir des cavités de 6mm de diamètre. Un volume égal à 40 µL du pigment d'une concentration de 20mg/ml (w/v) (200 µl méthanol + 800 µl eau) est injecté dans chaque puit. Les boîtes ont été incubés à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances bioactives et sont par la suite incubées à 30°C pendant 7 j pour les souches fongiques, et à 37°C pendant 24-48h pour les bactéries. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats est effectuée par mesure des diamètres des zones d'inhibition. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (ELA *et al.*, 1996). Des boîtes contenant l'agent pathogène en l'absence d'extrait du pigment constituent le témoin négatif.

### *2.1.4.3.3- Méthode des cylindres d'agar*

Cette technique est réalisée selon la même procédure précédemment décrite dans la section *2.1.4.3.2-Méthode de diffusion sur gélose* en substituant la réalisation de puits par le dépôt instantané d'un disque d'agar de 6 mm de diamètre contenant le pigment prélevé à partir d'une colonie jeune de la souche actinobactérie. L'incubation suit les mêmes conditions que celles pour la technique des puits. Les résultats sont obtenus de la même manière.

## **2.1.5- Optimisation du milieu de fermentation pour la production de pigment**

### *2.1.5.1- Etude de l'influence de 4 facteurs essentiels sur la production de pigment par l'approche traditionnelle*

L'approche traditionnelle, dite OFAT (One Factor At Time) permet l'évaluation de l'effet des facteurs essentiels, à savoir la source de carbone, la source d'azote, le NaCl et le pH, sur la production de pigment en terme de concentration en µg/ml. Elle permet également de faire un criblage des facteurs influençant de manière significative la production de pigment sur

un milieu basal en étudiant l'effet d'un facteur à la fois tout en gardant les autres facteurs constants.

Un milieu minimal constitué de CaCO<sub>3</sub>, extrait de malt et extrait de levure et exempt de source de carbone et d'azote et de NaCl est utilisé. Ces éléments seront par la suite additionnés séparément à différentes concentrations en gardant les 3 autres facteurs constants à un niveau moyen. Le pH est également évalué à 3 niveaux. Les conditions sont décrites en détail dans le tableau 4.

### *2.1.5.1.1- Effet de la source de carbone*

Le glucose constitue la source de carbone à tester sur la production du pigment. Ainsi, il est additionné au milieu minimal à 3 concentrations, à savoir 0,2 %, 0,5%, 1% (w/v) en gardant la source d'azote (%) et le pH 7,2 constants.

### *2.1.5.1.2- Effet de la source d'azote*

La source d'azote est représentée par le Peptone de caséine et a été évaluée à trois différents niveaux, à savoir 0,1 %, 0,3%, 0,6% (w/v) en gardant la source de carbone (%) et le pH 7,2 constants.

### *2.1.5.1.3- Effet du pH*

Le pH a été ajusté à 5,6 ; 7,2 ; 9,1 en gardant la source de carbone (%) et d'azote (%) constants.

### *2.1.5.1.4- Effet de NaCl*

Différentes concentrations d'NaCl ont été utilisées, à savoir 1%, 3%, 6% (w/v) en gardant la source de carbone (%), d'azote (%) et le pH 7,2 constants.

L'effet de ces facteurs a été évalué dans des Erlenmeyers de 100ml contenant 50 ml de milieu minimal. Un erlenmeyer contenant le milieu GLM liquide au pH 7,2 a servi comme témoin. L'inoculation est réalisée avec 1% (v/v) d'une suspension sporale d'une concentration de  $3 \times 10^7$  spores.ml<sup>-1</sup>. Les cultures sont par la suite incubées à 28°C sous agitation orbitale permanente à 150 rpm pendant 7-14 jours. Après 14 jours, les cultures ont été observées visuellement pour vérifier l'intensité du pigment. La biomasse a été filtrée et le poids sec déterminé comme précédemment décrit dans la section (*2.1.3.1- Evaluation de la biomasse produite*).

**Tableau 4.** Conditions de culture pour la fermentation liquide selon la méthode OFAT.

Essai	Glucose	Peptone	E.M	E.L	CaCo3	NaCl	pH	T°	Agitation
1	0,2%					/			
2	0,5%	0,5%				/			
3	1%					/			
4		0,1%				/	7,2		
5		0,3%				/			
6		0,6%				/			
7			0,3%	0,3%	0,1%	/	5,6	28°C	150rpm
8						/	7,2		
9	1%					/	9,1		
10		0,5%				1%			
11						3%			
12						6%	7,2		
13						/			

#### 2.1.5.2- Criblage et effet combiné de différents facteurs sur la production de pigment par l'approche statistique

Le design expérimental de Plackett-Burman a été utilisé pour cribler 16 paramètres et déterminer la composition du milieu la plus influente sur la production du bio-pigment (Sun *et al.*, 2014 ; Nutaratat *et al.*, 2016). Ces paramètres sont constitués de onze facteurs nutritifs (glucose, extrait de malt, extrait de levure, amidon soluble, peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ) (Zhao *et al.*, 2013) et quatre conditions de culture, notamment le pH, la température de croissance (°C), la période d'incubation (jours) et l'obscurité partielle/l'obscurité totale. Toutes les variables indépendantes ont été évaluées à deux intervalles largement espacés, exprimées en valeurs négatives (minimum, - 1) et en

valeurs positives (maximum, + 1) dans un total de 20 expériences. Chaque ligne représente un essai, et deux réponses Y qui ont été sélectionnées correspondant à la variation de la concentration du pigment en  $\mu\text{g/ml}$  à 537nm comme réponse Y1 et la variation de la valeur de pH final comme réponse Y2.

La concentration du pigment a été évaluée par rapport à une courbe d'étalonnage en utilisant les concentrations 0,25 ; 0,5 ; 1, 2 mg/ml.

Les valeurs réelles et codées des facteurs sont répertoriées respectivement dans les tableaux 5 et 6. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicate. L'analyse statistique du modèle a été effectuée pour calculer l'analyse de la variance (ANOVA). La signification des variables a été déterminée en calculant la valeur  $p$  avec un niveau de signification seuil de 5 % ( $P < 0,05$ ) et les niveaux de confiance par une analyse de régression standard. Toutes les analyses statistiques et la matrice de criblage Plackett-Burman ont été réalisées avec Minitab 19.0.

**Tableau 5.** Plan de la matrice randomisée de Plackett-Burman avec les valeurs codées des facteurs.

Essai	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
2	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
3	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
4	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
5	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
6	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
7	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
8	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
9	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
10	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
11	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
12	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
15	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
16	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
17	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
18	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
19	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
20	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+

A : glucose                      B : peptone                      C : amidon soluble                      D : extrait de Malt  
 E : extrait de levure                      F : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>                      G : NaCl                      H : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 J : MgSO<sub>4</sub>                      K : CaCO<sub>3</sub>                      L : pH                      M : NaNO<sub>3</sub>  
 N : agitation (rpm)                      P : température  
 Q : période d'incubation  
 O : obscurité partielle/totale

**Tableau 6.** Valeurs réelles des facteurs employés dans le plan randomisé de Plackett-Burman.

<b>Facteur</b>	<b>-1</b>	<b>+1</b>
<b>Glucose %</b>	0,5%	1%
<b>Peptone %</b>	0,3%	0,6%
<b>Amidon %</b>	0,5%	1%
<b>Extrait de Malt %</b>	0,25%	0,5%
<b>Extrait de Levure %</b>	0,25%	0,5%
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> %</b>	0,05%	0,1%
<b>NaCl %</b>	0,1%	0,5%
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> %</b>	0,03%	0,07%
<b>MgSO<sub>4</sub> %</b>	0,02%	0,05%
<b>CaCO<sub>3</sub> %</b>	0,1%	0,15%
<b>pH</b>	7,1	8,9
<b>NaNO<sub>3</sub> %</b>	0,05%	0,1%
<b>Agitation (rpm)</b>	0	150
<b>Obscurité partielle/totale</b>	0	600
<b>Température °C</b>	28	30
<b>Incubation (Jours)</b>	12	18

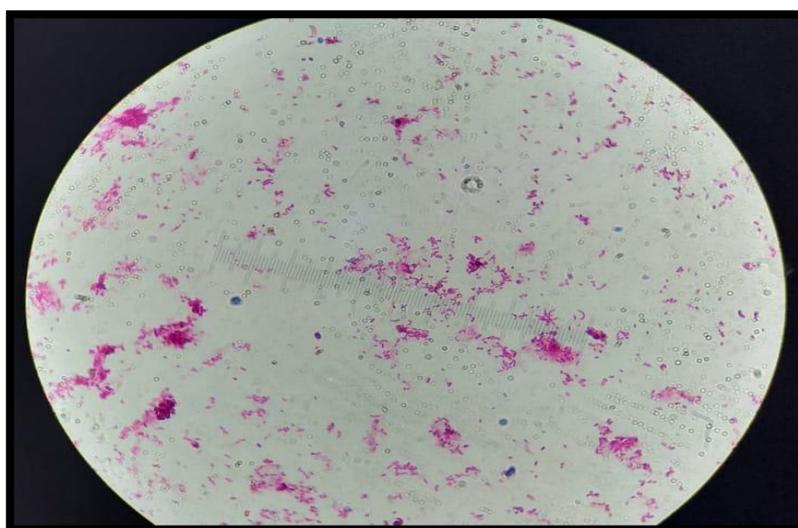
### 3- Résultats et discussion

Le présent travail est une ébauche sur les colorants d'origine bactérienne. En effet, l'intérêt est porté ici, sur la production d'un pigment par un isolat d'actinobactérien.

#### 3.1- Caractérisation micro et macromorphologique de l'isolat

Les tests développés pour l'identification phénotypique de l'isolat susceptible de produire de colorant ont abouti les résultats suivants :

La figure 9 représente l'observation microscopique du frottis coloré par la technique de Gram de la souche étudiée. Cette observation microscopique a confirmé que cet isolat est une bactérie filamenteuse à Gram positif.



**Figure 9.** Caractères microscopiques de la souche d'actinobactérie productrice de pigment (G x 100).

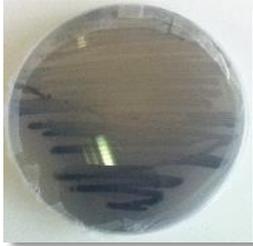
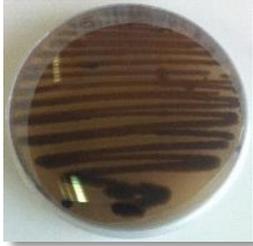
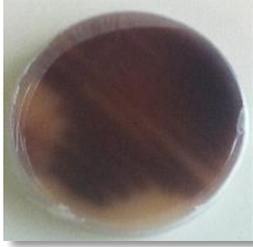
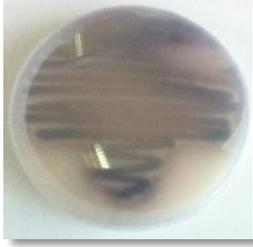
L'identification du genre est basée sur l'étude des caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinobactéries. Selon Shirling et Gottlieb (1976), l'identification des actinobactéries repose en grande partie sur les caractéristiques phénotypiques qui sont considérées comme des caractères stables. L'observation microscopique de la souche après coloration de Gram (Figure 9) confirme l'appartenance de cet isolat aux groupes des bactéries Gram positif. Cette observation permet d'apprécier un certain nombre de caractères tels que l'aspect des filaments et les spores. Cet aspect filamenteux enchevêtrés avec présence de spores en chaînettes plus ou moins longues mais également de spores isolées, dispersées ou rassemblées en amas, les rapproche des actinobactéries filamenteux (Flårdh et Bruttner, 2009) et plus précisément des Streptomycètes, tel qu'il a été établi par (Kitouni *et al.*, 2005).

L'étude de caractères phénotypiques ainsi que l'aspect macroscopique de l'actinobactérie effectuée sur différents milieux (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7 et ISP9) selon Shirling et Gottlieb (1966) est récapitulée dans les tableaux 7 et 8, respectivement.

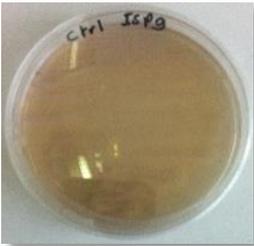
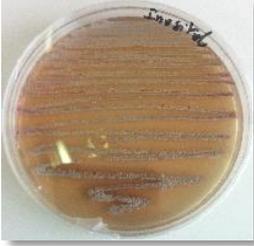
**Tableau 7.** Caractères macroscopiques de l'actinobactérie productrice de pigment.

Milieu	Croissance	Taille de la colonie	Couleur du MA	Couleur du MS	Pigment
<b>ISP1</b>	+	Petite	Grise claire	Bleue	Bleu à vert
<b>ISP2</b>	+++	Moyenne	Grise	Marron à noir	/
<b>ISP3</b>	+++	Moyenne	Grise	Grenat à marron	Rose
<b>ISP4</b>	++	Moyenne	Grise	Grise à noir	/
<b>ISP5</b>	+++	Petite	Blanche grisâtre	Rose foncé	Rose à violet
<b>ISP6</b>	+++	Petite	Crème à orange	Beige	/
<b>ISP7</b>	+++	Petite	Grise	Marron rosâtre	/
<b>ISP9 (Glu)</b>	+++	Moyenne	Grise	Marron	/
<b>ISP9 (Gal)</b>	+++	Petite	Grise	Marron et rose	Rose
<b>ISP9 (Man)</b>	+++	Moyenne	Blanche et rose	Rose orangé	/
<b>ISP9 (Ino)</b>	+++	Petite	Grise	Marron et rose	/
<b>ISP9 (Lac)</b>	+++	Petite	Grise	Orange	/
<b>ISP9 (Fru)</b>	+++	Petite	Grise	Marron orangé	/
<b>ISP9 (Sac)</b>	+++	Petite	Blanche	Beige à marron	Violet
<b>ISP9 (Rha)</b>	+++	Petite	Grise Blanche et grise	Marron et rose	/
<b>ISP9 (Temoin)</b>	++	Petite	Beige	Beige	/

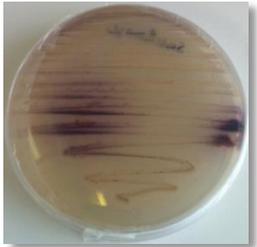
**Tableau 8.** Aspect macroscopique de l'isolat producteur de pigment sur différents milieux de culture.

Milieu	Recto	Verso
ISP1		
ISP2		
ISP3		
ISP4		
ISP5		
ISP6		

**Tableau 8.** Aspect macroscopique de l'isolat producteur de pigment sur différents milieux de culture (Suite).

ISP7		
ISP9		
ISP9 (Glucose)		
ISP9 (Mannitol)		
ISP9 (Inositol)		
ISP9 (Fructose)		

**Tableau 8.** Aspect macroscopique de l'isolat producteur de pigment sur différents milieux de culture (Suite).

<b>Isp9 (Lactose)</b>		
<b>ISP9 (Rhamnose)</b>		
<b>ISP9 (Saccharose)</b>		
<b>ISP9 (Galactose)</b>		

La caractérisation macroscopique (Tableau 7 et 8) de la souche étudiée montre qu'elle se développe lentement sur tous les milieux de culture. La croissance est optimale sur ISP2, ISP3, ISP5, ISP6, IP7 et ISP9. En revanche, elle est moins importante sur ISP1, ISP4. Ces souches sont donc, capables d'utiliser une large gamme de sources de carbone tel que le glucose présent dans le milieu ISP2, l'avoine dans le milieu ISP3 et le galactose, le mannitol, l'inositol, le fructose, le saccharose, le glucose, le lactose, le rhamnose additionnés séparément dans le milieu ISP9. L'utilisation de l'asparagine présente dans le milieu ISP5, la tyrosine dans ISP7 comme source d'azote a également été confirmée. La couleur du mycélium aérien de la souche varie selon les constituants du milieu de culture, entre une masse sporale grise, blanche, crème ou beige. La couleur de mycélium de substrat varie selon

les constituants du milieu de culture entre les couleurs bleue, marron à noir, grenat à marron, gris à noir, rose foncé, beige, marron rosâtre, marron, rose orangé, orange, marron orangé, beige à marron accompagné de la présence de pigments diffusibles dans la gélose.

La production des pigments solubles par la souche dans les milieux ISP1 est de couleur bleue à vert, de couleur rose à violette sur ISP5, de couleur rose sur ISP3 et de couleur rose et violette sur ISP9 galactose, ISP9 saccharose, respectivement. Les couleurs et la nature des pigments varient selon les sources de carbone et d'azote présentes dans les milieux de culture (Reddy et Umamaheshwara, 2016) et sont également affectés par la température d'incubation, l'aération et le pH initial du milieu (Kheiralla *et al.*, 2016). Ainsi, d'après (Locci *et al.*, 1989) et (Thakur *et al.*, 2007), les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieu de culture, montrent généralement une morphologie typique des *Streptomyces*.

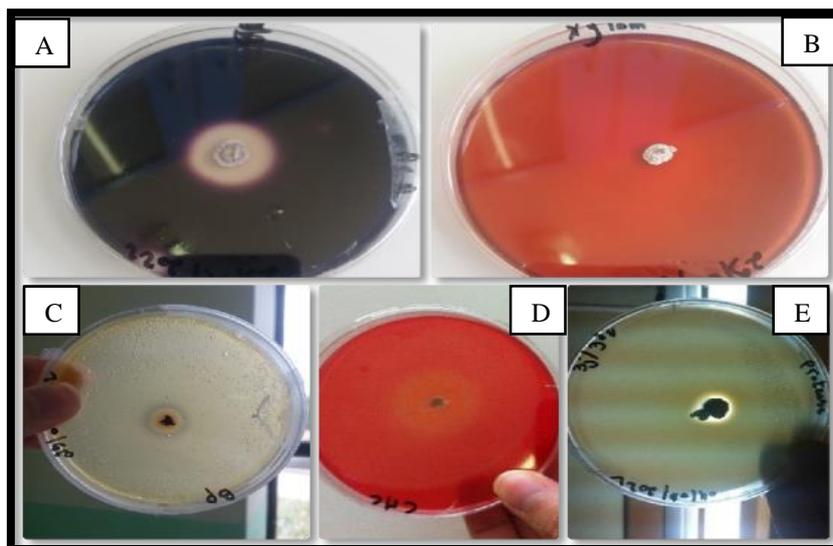
La souche présente un aspect poudreux dû à l'abondance des spores. Les colonies sont plates ou bombées de tailles petites à moyennes, sèches, ridées et en choux fleur. Ces caractères se rapprochent de ceux rapportés par (Kheiralla *et al.*, 2016) et (Djemouai *et al.*, 2022) qui les rapprochent aux *Streptomyces*.

### 3.2- Equipement enzymatique

Le tableau 9 présente les résultats concernant la production de cellulases, amylases, protéases, xylanases, lecithinases, lipase et lipoprotéinases d'enzymes par l'isolat.

**Tableau 9.** Production d'enzymes par la souche d'actinobactérie sélectionnée.

Activité	Résultat	Diamètre du halo (mm)
Hydrolyse d'amidon	Amylases (+)	22
Hydrolyse de la cellulose	Cellulases (+)	34
Hydrolyse du Xylane de Beerchwood	Xylanases (-)	00
Hydrolyse de la caséine du lait	Protéases (+)	18
Hydrolyse de la lécithine, triglycérides et lipoprotéines	Lecithinases (+)	13
	Lipases (-)	00
	Lipoprotéinases (+)	18



**Figure 10.** Résultats des tests enzymatiques.

A : activité amylolytique, B : activité xylanolytique, C : activité lipolytique, D : activité cellulolytique, E : activité protéolytique.

La souche possède un équipement enzymatique diversifié. Elle produit l'amylase, une production est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies sur milieu contenant de l'amidon comme seule source de carbone. Le diamètre de la zone d'hydrolyse d'amidon signifie de manière indirecte la quantité d'enzyme produite. La zone estimée 22 mm de diamètre. La souche dispose également des cellulases mise en évidence sur milieu CMC avec un diamètre de lyse égal à 34 mm.

D'autres enzymes ont également été signalées, notamment les enzymes lipolytiques à savoir la lécithinase et la lipoprotéinase. Cette production est mise en évidence par l'apparition de zones opaques et claires autour des colonies. Les zones sont notées sur le milieu Braid Parker au jaune d'œuf avec 13 et 18 mm de diamètre; respectivement. L'activité protéolytique (caseinase) de la souche a été révélée sur le milieu à base de la caséine de lait avec un diamètre de 18 mm.

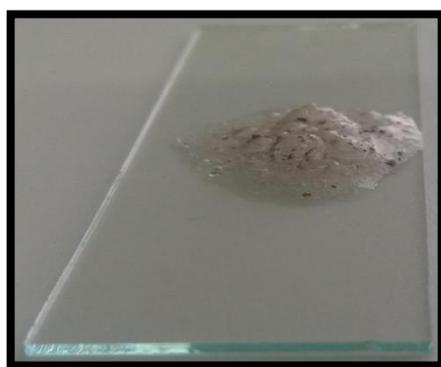
Enfin, on remarque que la souche ne présente aucune activité xylanolytique car absence de l'apparition d'un halo clair autour de la colonie qui traduirait la dégradation de xylane, cela montre que la souche testée ne possède pas une xylanase.

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Kashiwagi *et al.*, (2014); Lim *et al.*, (2016); Sharma *et al.*, (2016); Thomas *et al.*, (2017); Sindhu *et al.*, (2017); Spasic *et al.*, (2018); Boran, (2018) et Alokika et Singh, (2019), qui ont discuté la capacité des actinobactéries à

produire une large gamme d'enzymes nécessaires pour leur métabolisme. Ces enzymes ont été utilisées dans plusieurs domaines en biotechnologie comme dans l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et cosmétique, l'industrie du textile, la bioconversion des déchets et la production de biocarburants. Ainsi, les bactéries du genre *Streptomyces* sont de grandes productrices de cellulase extracellulaire, xylanases, amylases, lipases, et d'autres hydrolases (Kumar *et al.*, 2019 a, b).

### 3.3- Caractères biochimiques de la souche

Le teste de la catalase montre un résultat positif pour la souche. La présence de la catalase est détectée par la production de bulles d'air lors d'un contacte de la culture avec l'eau oxygénée (Figure 11). Les actinobactéries sont aérobies et possèdent toute une catalase. Un résultat négatif mériterait plus d'attention.



**Figure 11.** Activité catalase de la souche productrice de pigment.

Le teste de la catalase montre un résultat positif pour la souche étudiée révélant le caractère aérobie des *Streptomyces* comme l'a été rapporté par de nombreuses études antérieures Faheem *et al.*, (2015); Kaushal *et al.*, (2018) ; Gopalakrishnan *et al.*, (2020).

L'utilisation des sucres comme source de carbone est déterminée par la capacité de la souche à se développer sur le milieu minimal ISP9 additionné de différents sucres est mentionnée dans le tableau 7 précédemment présenté dans la page 32.

### 3.4- Méthodes de culture pour la production du pigment

#### 3.4.1- Culture solide sur milieu conventionnel

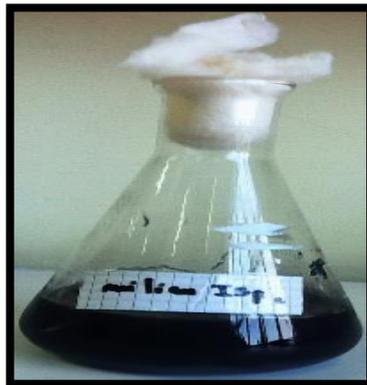
La capacité de la souche à se développer sur un milieu solide et à produire le pigment a été recherché par l'ensemencement sur gélose GLM. La production d'un pigment diffusible de couleur bleu observable à l'œil nu a été obtenue après une période d'incubation de six jours (Figure 12).



**Figure 12.** Production de pigment par fermentation à l'état solide.

### 3.4.2- Fermentation liquide sur milieu conventionnel

En culture submergée sur milieu ISP2, la souche se développe sous forme de petites pelettes d'environ 0,5mm avec présence d'un anneau sporal repérées dès les premières 72h uniquement sur les bords de l'erlenmeyer. Après une période d'incubation allant de 14-21 jours, l'apparition d'une croûte flottante constituant la masse sporale sur le milieu de culture a été remarquée (Figure 13). La variation de la couleur du milieu de culture du marron au bleu foncé a été constatée.



**Figure 13.** Production d'un pigment bleu par fermentation submergée.

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont connues pour leur capacité à produire une diversité de métabolites secondaires. Beaucoup de ces composants sont utilisés comme antibiotiques ; certains d'entre eux sont des pigments sensibles au pH. Cette souche se rapprochant du genre *Streptomyces* a été sélectionnée pour une éventuelle production de pigments indicateurs de Ph. Les résultats ont indiqué que l'isolat pouvait produire un pigment de couleur bleu sur milieu solide GLM et sur un milieu liquide ISP2 avec un rendement de pigment de 300mg/100ml à pH 8,9.

### 3.5- Méthodes analytiques

#### 3.5.1- Biomasse produite

La masse mycélienne a été séparée du milieu de culture et estimée après filtration (Figure 14) sur papier filtre wattman n°1 afin de pouvoir récupérer le métabolite d'intérêt (le bio-pigment). Le pH du filtrat contenant le pigment en suspension a varié de 7,2 à un pH basique 8,9 ce qui pourrait avoir un rapport avec la couleur diffusée par le pigment dans le milieu de culture à la fin de la fermentation.



Figure 14. Méthode de la filtration.

#### 3.5.2- Dosage spectroscopique

La figure 15 représente le pic majeur d'absorbance du filtrat contenant le pigment qui est signalé à 537 nm après avoir effectué le scan balayage à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VISIBLE.

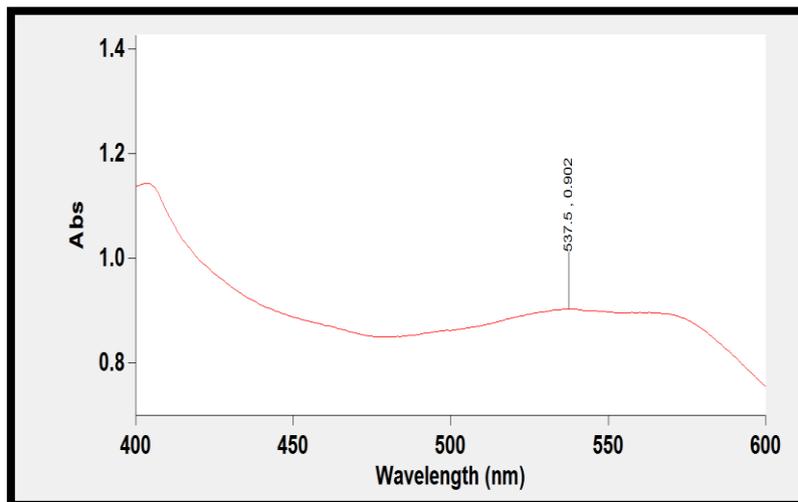


Figure 15. Le pic majeur d'absorbance du filtrat.

Le pic majeur d'absorption du pigment des filtrats de culture était à 537 nm. Ce résultat corrobore avec ceux rapporté par (Coisne *et al.*, 1999) qui est à 535 nm.

### 3.5.3- Extraction de pigment

#### 3.5.3.1- Précipitation acide

Le filtrat acidifié à un pH 2 a permis d'obtenir un précipité rouge, comme il est présenté dans la figure 16. Ce précipité a été récupéré par décantation à froid puis centrifugation et séchage. Le rendement de pigment obtenu à partir d'un volume de 40ml a été estimé à 352,6 mg. La valeur du pH était un facteur important pour le changement de couleur du pigment. Dans des conditions acides, le pigment était de couleur rouge et à pH 7 prend la couleur d'amarante alors que dans des conditions alcalines à partir d'un pH proche de 8 le pigment a viré au bleu. L'augmentation de l'intensité de la couleur a été corrélée positivement avec des pH plus basiques. Ces informations révèlent le caractère spécifique de ce pigment qui est l'indication du pH. Ce qui lui procure des applications dans le domaine de la recherche en biologie.



**Figure 16.** Méthode d'extraction de pigment par précipitation acide.

#### 3.5.3.2- Méthode d'extraction par solvant (traditionnelle)

L'extraction liquide/liquide du pigment avec un mélange de méthanol 90° et de chloroforme (50 :50) (v/v) suivie d'une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 50°C a permis l'obtention d'un résidu pigmentaire de couleur pourpre à rouge tel qu'il est montré dans la figure 17.



**Figure 17.** Résidu sec du pigment extrait par des solvants.

### 3.6- Caractérisation du pigment

#### 3.6.1- Solubilité dans différents solvants

Les résultats du test de solubilité sont représentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 10.** Test de solubilité de différents solvants.

Solvant	Solubilité	Solvant	Solubilité
Eau	+++	Butanol	-
Ethanol	+++	Dichlorométhane	-
Hexane	-	Acétate d'éthyle	+
Isopropanol	-	Acide phosphorique	-
Acétone	-	Dioxan	-
Benzène	-	Acétonitrile	-
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	-	Méthanol	+++
Acide sulfurique	-	Chloroforme	++
Acide acétique	-	Ether de pétrole	-

+ : solubilité modérée, ++ : bonne solubilité, +++ : très haute solubilité, - : non soluble

Le pigment est soluble dans une solution aqueuse et solvants organiques (Mohanasrinivasan *et al.*, 2013) tels que le méthanol, l'éthanol, le chloroforme. Il est faiblement soluble dans l'acétate d'éthyle et insoluble dans le dioxan, le butanol, l'éther de pétrole, l'acide sulfurique, l'acide acétique, l'acide phosphorique, l'hexane, l'isopropanol, le dichlorométhane, l'acétone, l'acétonitrile, le benzène et le DMSO.

### 3.6.2- Chromatographie sur couche mince et séparation du pigment

Parmi tous les solvants utilisés dans la CCM comme systèmes d'élution, le mélange chloroforme : méthanol (50 :50) s'est avéré le plus efficace pour séparer le pigment des autres constituants du filtrat de culture.

**Tableau 11.** Valeurs du rapport frontal Rf de chaque échantillon.

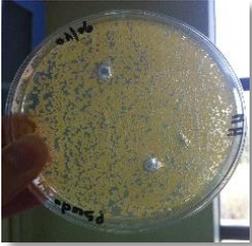
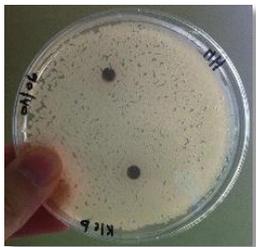
Echantillons	1	2	3	4
Rf	0,27	0,54	0,49	0,76

L'analyse des Rf obtenus par la chromatographie sur couche mince étant 0,27 pour l'échantillon 1 contenant du pigment brut dissous dans une mixture à base de méthanol et de chloroforme (1:1) (v/v), 0,54 pour l'échantillon 2 contenant le filtrat de culture, 0,49 pour l'échantillon 3 contenant le filtrat de culture au Ph basique avec du NaOH, et enfin 0,76 pour l'échantillon 4 contenant le pigment brut dissous dans un mélange méthanol-eau (8:2) (v/v). La valeur Rf de 0,27 est comparable à la valeur Rf de la molécule  $\gamma$ -Actinorhodine et les valeurs Rf de 0,54 et 0,49 sont analogue à la valeur Rf de Actinorhodine lorsque la CCM est effectuée en utilisant du méthanol et chloroforme avec un rapport de 50:50. Selon (Bystrykh *et al.*, 1996), un Rf égal à 0,28 indique la présence du dérivé lactone de l'Actinorhodine dans les filtrats de culture, c'est-à-dire la  $\gamma$  Actinorhodine. A la fois pigments intra et extracellulaires, nettement différent de celui des authentiques Actinorhodine (Rf 0,52). Concernant la valeur Rf de 0,76 ; le spot obtenu pourrait être un autre composé dérivé d'Actinorhodine.

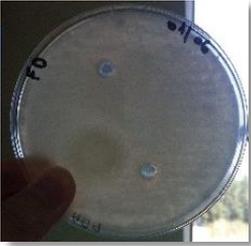
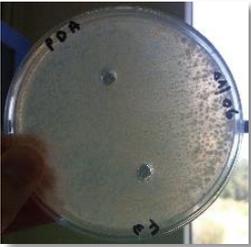
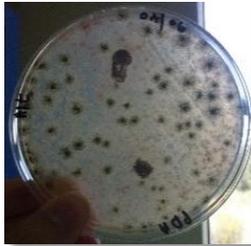
### 3.6.3- Activités biologiques du pigment brut

L'extrait de pigment brut a montré une activité antibactérienne contre *Pseudomonas sp.* et *Staphylococcus sp.* En utilisant la méthode des cylindres de colonie sur agar. En effet, des zones d'inhibition de 16 mm et 7 mm respectivement ont été obtenues. Cependant, aucune activité n'a été révélée vis-à-vis des autres microorganismes comme : *E.coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum f.sf Lycopersici (Fol)*, *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum sp.*.

**Tableau 12.** Test de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut du pigment.

Microorganismes	Méthode des puits	Méthode des cylindres
<i>Pseudomonas sp.</i>		
<i>Staphylococcus sp.</i>		
<i>E.coli</i>		
<i>Klebsiella sp.</i>		
<i>Enterococcus sp.</i>		
<i>Fusarium culmorum</i>		

**Tableau 12.** Test de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut du pigment (Suite).

<i>Fusarium solani</i>		
<i>Fusarium oxysporum f.sp Lycopersici (Fol)</i>		
<i>Fusarium oxysporum sp.</i>		
<i>Alternaria alternata</i>		

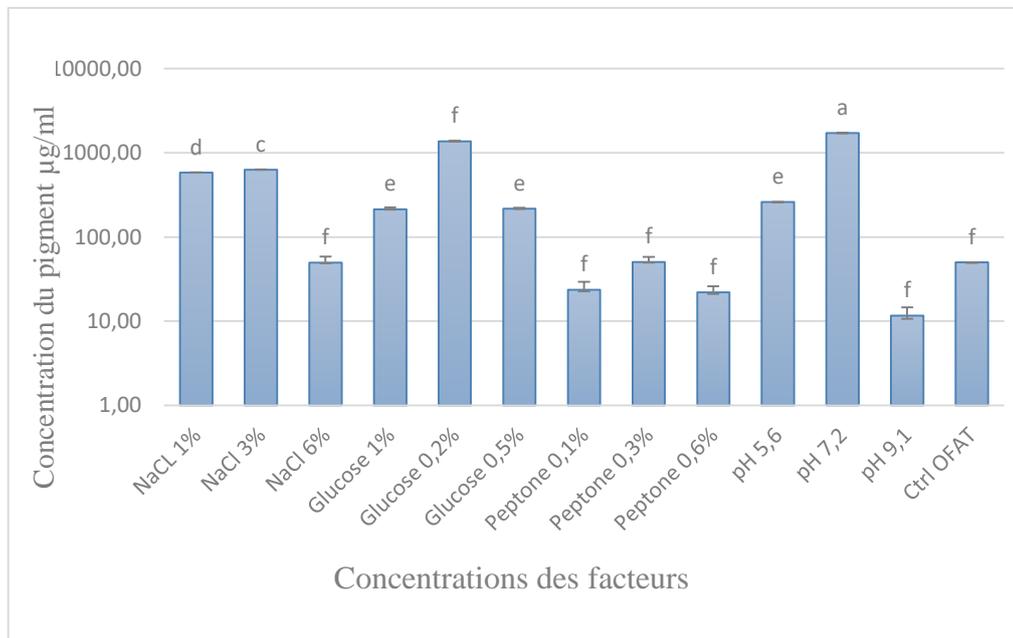
Dans la recherche préliminaire de l'activité antibiotique et antifongique par la méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits), l'extrait de pigment à une concentration de 20mg/ml n'a montré aucune activité contre les agents pathogènes bactériens, notamment *E.coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, et fongiques contre *Fusarium oxysporum spp*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum f.sp Lycopersici (Fol)* et *Alternaria alternata*. Cependant, dans la méthode des cylindres d'agar (méthode des disques), le pigment a montré une activité antibactérienne sur *Pseudomonas sp.* Et *staphylococcus sp.* Avec absence d'activité antibactérienne et antifongique sur le reste des agents pathogènes bactériens et fongiques. Ce qui signifie que le métabolite secondaire produit par la souche *Streptomyces sp.* n'a pas

d'activité antifongique. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par (Wright et Hopwood, 1976) qui suggèrent l'activité inhibitrice de l'Actinorhodine produite par *S. coelicolor* A3(2) sur *Staphylococcus aureus*. L'activité inhibitrice de la substance de type Actinorhodine liée à la structure chimique de cet antibiotique qui affecte la synthèse des protéines (protéine ribosomale) des bactéries Gram + et Gram – (Kirby *et al.*, 1975).

**3.7- Optimisation du milieu de fermentation pour la production de pigment**

Les figures 18 et 19 représentent les concentrations du pigment dans différentes conditions de culture par la méthode traditionnelle (OFAT) et statistique (PBD), respectivement. Les tableaux 13 et 14 concernent les valeurs du pH du filtrat obtenu après centrifugation de la culture bactérienne pour les deux méthodes, OFAT et PBD respectivement. Pour chaque analyse statistique effectuée, les résultats sont exprimés en moyenne de trois répétitions ± SE (Ecart type standard). Les moyennes ont été comparées par ANOVA suivi du test à plages multiples de Tuckey. La différence significative a été considérée à P < 0,05 et la concentration du pigment est exprimée en µg/mL.

**3.7.1- Influence des composantes du milieu sur la production de pigment par l'approche traditionnelle (OFAT)**



**Figure 18.** Histogramme de l'influence de 4 facteurs sur la concentration de pigment.

Les valeurs des colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes à p<0,05 ; selon le Tucky (5 %).

L'histogramme de la figure 18 correspond aux concentrations de pigment obtenus après incubation sur différents milieux.

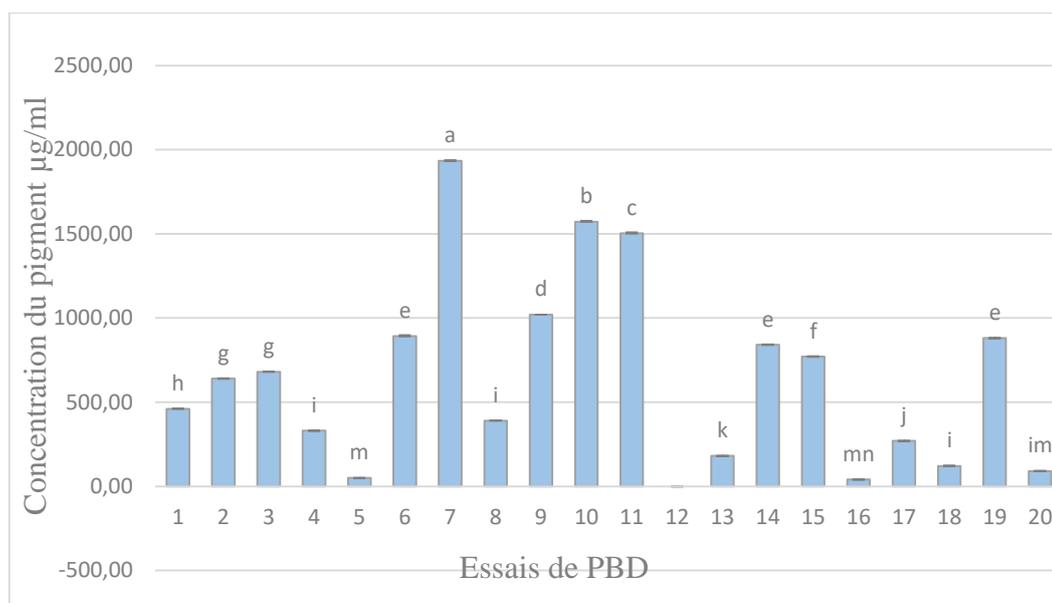
On remarque une variation significative des concentrations du pigment sous l'influence de différentes conditions de culture.

**Tableau 13.** Valeurs de pH du filtrat obtenues par la méthode OFAT.

Concentrations des nutriments	pH
Glucose 0,2%	9,42
Glucose 0,5%	5,49
Glucose 1%	5,54
Peptone 0,1%	5,17
Peptone 0,3%	5,17
Peptone 0,6%	5,54
NaCl 1%	5,09
NaCl 3%	5,12
NaCl 6%	5,52
pH=5,6	4,58
pH=7,2	8,94
pH=9,1	5,2
Témoin	5,14

On remarque une variation progressive des pH des cultures actinomycétales qui évoluent de 7,2 à 5 pour les milieux à pH neutres, à savoir (témoin ; glucose 0,5% ; glucose 1% ; peptone 0,1% ; peptone 0,3% ; peptone 0,6% ; NaCl 1% ; NaCl 3% et NaCl 6%) et de 7,2 à 9 pour les milieux (glucose 0,2% et l'essai pH =7,2), et de 5,6 à 4,58 pour l'essai pH 5,6, et enfin de 9,1 à 5,2 pour l'essai pH =9,1

**3.7.2- Criblage et effet combiné de différents facteurs sur la production du pigment par l'approche statistique**



**Figure 19.** Histogramme de l'influence des différents facteurs sur la concentration de pigment. Les valeurs des colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$  ; selon le Tucky (5 %).

L'histogramme de la figure 19 correspond aux concentrations de pigment obtenus après incubation sur différentes combinaisons de paramètres indépendants affectant potentiellement la production du pigment.

On remarque une variation significative des concentrations du pigment sous l'influence de différentes conditions de culture.

**Tableau 14.** Valeurs de pH finales par la méthode statistique.

Essais	pH	Essais	pH
PBD 1	8,9	PBD 11	8,02
PBD 2	7,85	PBD 12	8,87
PBD 3	8,89	PBD 13	8,26
PBD 4	9,16	PBD 14	7,78
PBD 5	8,76	PBD 15	8,89
PBD 6	8,28	PBD 16	9,11
PBD 7	7,78	PBD 17	8,51
PBD 8	8,56	PBD 18	9,07
PBD 9	8,43	PBD 19	8,5
PBD 10	8,05	PBD 20	8,95
PBD (ISP2)	8		

On remarque une augmentation progressive des pH des cultures actinomycétales qui évoluent de 7,1 à 9 pour les combinaisons (PBD1, PBD2, PBD8, PBD10, PBD12, PBD13, PBD15, PBD17, PBD18 et PBD19) et une diminution de 8,9 à 7,78 pour les combinaisons

(PBD5, PBD6, PBD7, PBD9, PDB11 et PBD 14) et une augmentation de 8,9 à 9,16 pour les combinaisons (PBD4, PBD16 et PBD20) et enfin une stabilité de pH à 8,9 pour la combinaison PBD3

**3.7.3- Régression factorielle des réponses Y en fonction de 16 facteurs indépendants (PBD)**

L'effet des facteurs sur la production du pigment (en µg/ml) et le pH final, la valeur de T, la valeur de F et la valeur de P ainsi que le R<sup>2</sup> et R<sup>2</sup> ajusté des deux modèles est mentionné dans les tableaux 15 et 16, respectivement.

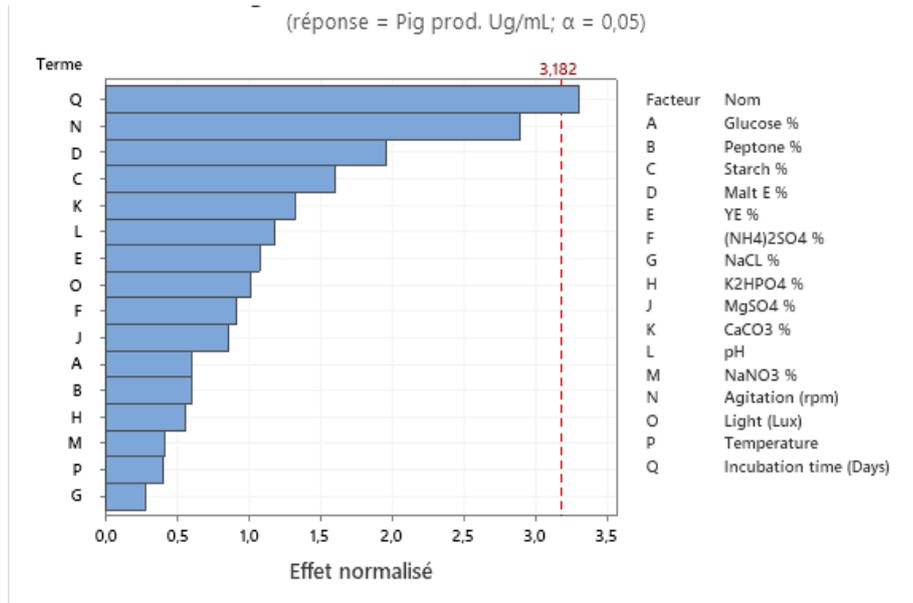
**3.7.3.1- Concentration du pigment en µg/ml**

L'équation de régression de la production du pigment (en µg/ml) en unités non codées est représentée comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Production de pigment en } \mu\text{g/ml} &= -2400 - 214 \text{ Glucose \%} + 357 \text{ Peptone \%} + 570 \text{ Amidon \%} + 1388 \text{ E Malt \%} \\ &+ 764 \text{ E Levure \%} + 3260 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ \%} + 127 \text{ NaCl \%} \\ &+ 2475 \text{ K}_2\text{HPO}_4 \text{ \%} + 5100 \text{ MgSO}_4 \text{ \%} + 47000 \text{ CaCO}_3 \text{ \%} + 116,1 \text{ pH} \\ &- 1460 \text{ NaNO}_3 \text{ \%} - 3,42 \text{ Agitation (rpm)} - 17,9 \text{ Lumière (Lux)} \\ &+ 35,5 \text{ Température} - 83,6 \text{ Temps d'incubation (jours)} \end{aligned}$$

**Tableau 15.** Coefficients codés et analyse de la variance pour la concentration du pigment en µg/ml.

Terme	Effet	Coef	Coef ErT	Valeur de T	Valeur F	Valeur de p
Modèle					2,13	0,292
Linéaires					2,13	0,292
Constante		632,5	88,5	7,15	2,13	0,006
Glucose %	-107,0	-53,5	88,5	-0,60	0,37	0,588
Peptone %	107,0	53,5	88,5	0,60	0,37	0,588
Amidon %	285,0	142,5	88,5	1,61	2,59	0,206
E Malt %	347,0	173,5	88,5	1,96	3,84	0,145
E levure %	191,0	95,5	88,5	1,08	1,16	0,360
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %	163,0	81,5	88,5	0,92	0,85	0,425
NaCl %	51,0	25,5	88,5	0,29	0,08	0,792
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> %	99,0	49,5	88,5	0,56	0,31	0,615
MgSO <sub>4</sub> %	153,0	76,5	88,5	0,86	0,75	0,451
CaCO <sub>3</sub> %	235,0	117,5	88,5	1,33	1,76	0,276
pH	209,0	104,5	88,5	1,18	1,39	0,323
NaNO <sub>3</sub> %	-73,0	-36,5	88,5	-0,41	0,17	0,708
Agitation (rpm)	-513,0	-256,5	88,5	-2,90	8,40	0,063
Lumière (Lux)	-179,0	-89,5	88,5	-1,01	1,02	0,386
Température	71,0	35,5	88,5	0,40	0,16	0,715
Incubation (j)	-585,0	-292,5	88,5	-3,30	10,92	0,046
		<b>S</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> (ajust)</b>		
<b>Modèle</b>		395,835	91,92%	48,85%		



**Figure 20.** Diagramme de Pareto des effets des facteurs sur la concentration de pigment.

Le diagramme de Pareto représente l'effet standardisé des facteurs criblés pour la détermination des conditions optimales pour la production du pigment. Un facteur « la période d'incubation » est considéré significatif à  $P < 0,05$  et potentiellement influençant la concentration du pigment produit par la souche.

### 3.7.3.2- Evolution de pH

L'équation de régression du pH en unités non codées est représentée comme suit :

$$\begin{aligned}
 \text{pH final} = & 5,117 + 0,0320 \text{ Glucose \%} - 0,3400 \text{ Peptone \%} - 0,3960 \text{ Amidon \%} \\
 & - 1,3440 \text{ E Malt \%} + 0,6080 \text{ E Levure \%} - 2,120 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \% \\
 & - 0,2200 \text{ NaCl \%} - 0,500 \text{ K}_2\text{HPO}_4 \% + 0,600 \text{ MgSO}_4 \% + 0,00 \text{ CaCO}_3 \% \\
 & - 0,01667 \text{ pH} + 0,760 \text{ NaNO}_3 \% + 0,004440 \text{ Agitation (rpm)} \\
 & + 0,00040 \text{ Lumière (Lux)} + 0,12600 \text{ Température} + 0,04114 \text{ Temps} \\
 & \text{d'incubation (jours)}
 \end{aligned}$$

Tableau 16. Coefficients codés et analyse de la variance pour l'évolution du pH.

Terme	Effet	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur F	Valeur de p
Modèle					434,92	0,000
Linéaires					434,92	0,000
Constante		8,53100	0,00535	1593,35	2,23	0,232
Glucose %	0,01600	0,00800	0,00535	1,49	90,73	0,002
Peptone %	-0,10200	-0,05100	0,00535	-9,53	341,90	0,000
Amidon %	-0,19800	-0,09900	0,00535	-18,49	984,56	0,000
E Malt %	-0,33600	-0,16800	0,00535	-31,38	201,49	0,001
E Levure %	0,15200	0,07600	0,00535	14,19	97,99	0,002
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %	-0,10600	-0,05300	0,00535	-9,90	67,53	0,004
NaCl %	-0,08800	-0,04400	0,00535	-8,22	3,49	0,159
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> %	-0,02000	-0,01000	0,00535	-1,87	2,83	0,191
MgSO <sub>4</sub> %	0,01800	0,00900	0,00535	1,68	0,00	1,000
CaCO <sub>3</sub> %	0,00000	0,00000	0,00535	0,00	7,85	0,068
pH	-0,03000	-0,01500	0,00535	-2,80	12,59	0,038
NaNO <sub>3</sub> %	0,03800	0,01900	0,00535	3,55	3868,22	0,000
Agitation (rpm)	0,66600	0,33300	0,00535	62,20	0,14	0,734
Lumière (Lux)	0,00400	0,00200	0,00535	0,37	553,81	0,000
Température	0,25200	0,12600	0,00535	23,53	723,35	0,000
Incubation (j)	0,28800	0,14400	0,00535	26,90	434,92	0,000
<b>Modèle</b>	<b>S</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> (ajust)</b>			
	0,0239444	99,96%	99,73%			

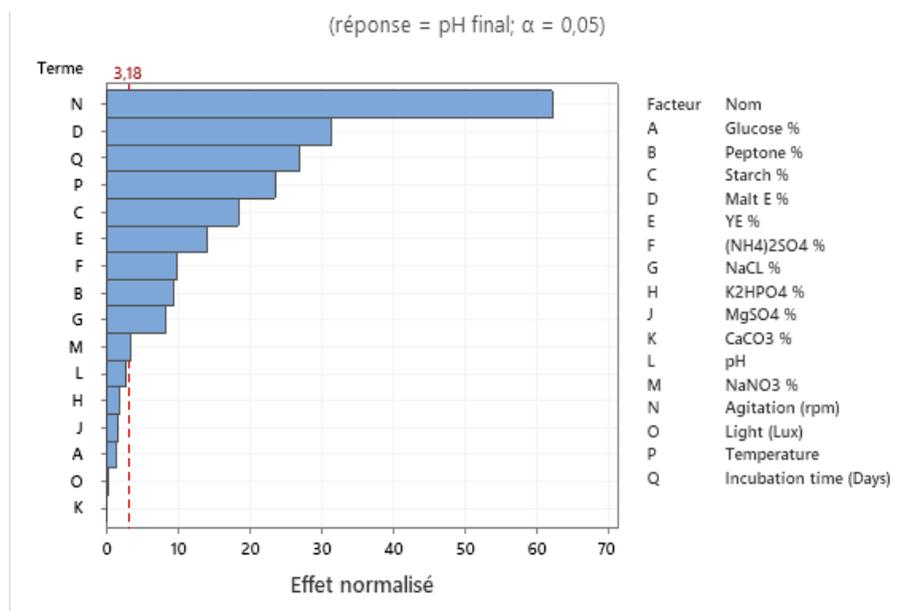


Figure 21. Diagramme de Pareto des effets des facteurs sur le pH final.

Le diagramme de Pareto représente l'effet standardisé des facteurs criblés pour la détermination des conditions optimales pour la production du pigment. Dix facteurs sont

considérés significatifs à  $P < 0,05$  et potentiellement influençant la concentration du pigment produit par la souche y compris «  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ , peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrait de levure, amidon, température, période d'incubation, extrait de malt et agitation).

Dans le but d'optimiser la production de pigment, deux approches ont été suivies, la méthode traditionnelle à un facteur à la fois OFAT et l'approche statistique à l'aide du plan de criblage Plackett-Burman assisté par le logiciel Minitab 19. La première méthode permet d'avoir une vue globale sur les facteurs potentiellement influent la production de pigment. Cependant, cette méthode consomme beaucoup de temps et de produits car les facteurs sont testés séparément. La comparaison des moyennes par l'analyse de la variance suggère que la différence entre les valeurs obtenues considérée à  $P < 0,05$  est hautement significative. Après 14 jours d'incubation, les conditions optimales permettant d'obtenir un maximum de rendement en termes de concentration de pigment estimée à  $1719\mu\text{g/ml}$  dans le milieu GLM avec les proportions suivantes : 1% glucose, 0,5% peptone, 0,3% extrait de malt, 0,3% extrait de levure, 0,1%  $\text{CaCO}_3$  dans des conditions de culture à pH 7,2 ;  $28^\circ\text{C}$  et sous agitation permanente à 150 rpm. Le pH du milieu de fermentation ayant augmenté de 7,2 à 8,94. Dans des conditions sub-optimales, la concentration minimale en pigment est estimée à  $11,67\mu\text{g/ml}$ . Le pH du milieu de fermentation à diminuer de 9,1 à 5,2. Ce résultat minimal de production de pigment est obtenu dans le milieu GLM aux proportions suivantes : 1% glucose, 0,5% peptone, 0,3% extrait de malt, 0,3% extrait de levure, 0,1%  $\text{CaCO}_3$  dans des conditions de culture à pH 9,1 ;  $28^\circ\text{C}$  et sous agitation à 150 rpm. Le pH, la concentration de la source de carbone et d'azote représentent des facteurs essentiels dans la production de pigment par la souche *Streptomyces sp.* Nos résultats rejoignent ceux de (Palanichamy *et al.*, 2011) ayant constaté que la production des pigments et la croissance microbienne étaient positivement influencées par une grande variété de sources de carbone comme le glucose et des sources d'azote comme la peptone. Néanmoins, seule une gamme étroite de pH de 7,6 à 8 et de température à  $30^\circ\text{C}$  semble efficace pour la production de pigment. Par conséquent, l'observation visuelle de l'intensité du pigment a servi de moyen pour estimer approximativement cette production.

Pour le meilleur de notre connaissance, l'optimisation de la production d'Actinorhodine en utilisant l'approche statistique de Plackett-Burman est réalisée pour la première fois en Algérie et dans le monde, ce qui explique les lacunes en termes de références et de rapports antérieurs. La comparaison des moyennes obtenues de la concentration de pigment produit par *Streptomyces sp.* par l'analyse de la variance ANOVA a permis de sélectionner la

meilleure combinaison possible des 16 facteurs criblés et leurs niveaux (concentrations) permettant d'avoir un meilleur rendement. La concentration maximale a été obtenue dans l'essai PBD7 (Figure 19) et est estimée à 1933,33 µg/ml dans les conditions suivantes : 0,5% glucose, 0,6% peptone, 1% amidon, 0,5% extrait de malt, 0,5% extrait de levure, 0,05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% NaCl, 0,07% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,1% CaCO<sub>3</sub>, 0,1% NaNO<sub>3</sub> dans des conditions de culture pH 8,9 à 28°C, à l'obscurité totale, sans agitation et 12 jours d'incubation. Le pH de la culture actinobactérienne ayant diminué de 8,9 à 7,78.

Dans des conditions suboptimales, à savoir l'essai PBD12, la production de pigment était nulle (0µg/ml). Pendant ce temps, le pH du bouillon de fermentation a également diminué de 8,9 à 7,78. La combinaison des facteurs défavorable pour la production de pigment est la suivante : 0,5% glucose, 0,6% peptone, 0,5% amidon, 0,5% extrait de malt, 0,25% extrait de levure, 0,1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5% NaCl, 0,07% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,1% CaCO<sub>3</sub>, 0,1% NaNO<sub>3</sub> dans des conditions de culture pH 7,1 à 30°C, à l'obscurité totale, sous agitation à 150 rpm et 18 jours d'incubation.

Selon l'analyse ANOVA des résultats obtenus par Plackett-Burman, et selon le diagramme de Pareto, aucun effet singulier des 16 facteurs n'a été signalé. Par conséquent, les facteurs n'affectent pas séparément la production du pigment mais simultanément et en combinaison. Selon l'analyse des données effectuée sur les 20 expériences, la meilleure combinaison permettant l'obtention d'un maximum de rendement de pigment est la combinaison PBD7. Selon l'effet des facteurs représenté par les coefficients codés des variables testés, il existe une corrélation négative entre le temps d'incubation et la concentration du pigment produite. Ainsi, lorsque la période d'incubation augmente la concentration de pigment diminue. Le pH joue également un rôle très important dans la production de pigment.

La régression factorielle de la réponse Y1 (Concentration du pigment µg/mL) en fonction de 16 facteurs indépendants montre que d'après les coefficients codés et l'analyse de la variance pour la différence entre les moyennes obtenues considérée à P < 0,05 est hautement significative. Pourtant, les facteurs indépendants n'ont d'effet significatif sur la concentration du pigment que lorsqu'ils sont en combinaison. Ces facteurs sont : l'amidon, l'extrait de malt, l'extrait de levure, le NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, le MgSO<sub>4</sub>, le CaCO<sub>3</sub>, le pH, l'agitation, la période d'incubation et la lumière.

D'après le diagramme des effets normalisés pour la concentration de pigment en µg/ml, le seul facteur influençant significativement le rendement est le temps d'incubation. Selon

l'ANOVA, ce modèle de régression factorielle de la réponse Y1 qui est la concentration de pigment en  $\mu\text{g/ml}$  possédant un  $R^2 = 91,92\%$  qui est largement supérieur à  $R^2 > 60\%$  est de ce fait considéré comme valide.

Concernant la régression factorielle Y2 du pH final en fonction de 16 facteurs indépendants et d'après les coefficients codés et l'analyse de la variance il existe une différence significative entre les moyennes ayant été considérée à  $P < 0,05$ . La valeur de pH est influencée par plusieurs facteurs tels que le glucose, l'extrait de malt, l'extrait de levure, le  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , le NaCl, le  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , le pH et l'agitation. Selon l'ANOVA, ce modèle de la régression factorielle de la réponse Y2 qui est le pH final possède un  $R^2 = 99,96\%$  qui est largement supérieur à  $R^2 > 60\%$  est de ce fait considéré comme valide.

D'après le diagramme des effets normalisés pour l'évolution du pH final, plusieurs facteurs influencent significativement cette réponse. Ces facteurs sont classés par ordre décroissant des effets normalisés comme suit : l'agitation, l'extrait de malt, le temps d'incubation, la température, l'amidon, l'extrait de levure, le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la peptone, le NaCl et le  $\text{NaNO}_3$ .

## Conclusion

Les actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces* sont potentiellement explorées pour leur capacité à produire différents types de métabolites tels que ; les antibiotiques, les enzymes et les pigments. Ces dernières possèdent une très grande importance dans le domaine alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et textile.

Les caractères phénotypiques, biochimiques et enzymatiques utilisés dans ce travail rapprochent l'isolat étudié au genre *Streptomyces*. Cette isolat possède une capacité à produire et à sécréter un pigment d'intérêt sur milieux GLM et ISP2 solides et en condition de culture submergée ce qui ouvre la voie vers une production à plus grande échelle.

Il est outre, à signaler que le développement abondant de l'isolat sur différents milieux de fermentation s'accompagne d'une production considérable du pigment bleu d'intérêt. Ce pigment agit comme indicateur de pH, et vire du bleu au rouge lorsque le pH vire de basique vers acide. Le piquement en question possède une activité antibactérienne vis-à-vis de *Pseudomonas sp.* et *Staphylococcus sp.* comme il pourrait jouer le rôle de précurseur la synthèse de biomolécules actives à usage pharmaceutique.

Le rendement de la production de pigment par l'isolat sélectionné sur milieu ISP2 à pH 7,2 est estimé à 300mg/ml et peut être séparé soit par extraction par solvants, soit par précipitation acide à pH 2. Les deux méthodes se sont avérées efficaces et la pureté des deux extraits bruts du pigment a été confirmée par CCM avec le système d'élution à base de méthanol et de chloroforme. Le pic majeur d'absorbance du pigment bleu était signalé à 537nm. La production du pigment par *Streptomyces sp.* est principalement, influencée par des facteurs essentiels comme le pH et le temps d'incubation.

La méthode traditionnelle OFAT suggère que le facteur le plus influent de la production de pigment est le pH à 7,2 avec un maximum de production rapporté à 1713µg/ml. Cependant, aucun effet singulier des 14 facteurs indépendants criblé à l'aide de la matrice Plackett-Burman n'a montré un effet significatif sur la concentration du pigment produit, excépté pour le temps d'incubation. Un effet combiné pourrait être à l'origine de la production maximale signalée à Plackett-Burman design 7 (PBD7) par la combinaison suivante : 0,5% glucose ; 0,6% peptone ; 1% amidon ; 0,5% extrait de malt ; 0,5% extrait de levure ; 0,05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>0</sub><sub>4</sub> ; 0,1% NaCl ; 0,07% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,05% MgSO<sub>4</sub> ; 0,1% CaCO<sub>3</sub> ; 0,1% NaNO<sub>3</sub> dans des conditions de culture pH 8,9 à 28°C, à l'absence totale de la lumière, sans agitation et 12 jours d'incubation.

Les deux méthodes sont complémentaires et permettent d'obtenir des informations utiles sur les facteurs influant significativement la production du pigment en vue de l'optimisation du bioprocédé pour maximiser le rendement.

En perspectives, des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer les meilleures conditions de culture pour un meilleur rendement.

Notamment :

- Un criblage des différentes sources de carbone et d'azote.
- Une caractérisation du pigment produit.
- Effectuer des essais de fermentation et de production à plus grande échelle.
- Une exploration des applications biotechnologiques et industrielles possible de pigment.
- L'isolement du gène codant la synthèse du pigment et son expression pour une production massive de pigment.

## Références bibliographiques

## A

- Aberoumand A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World J Dairy Food Sci.* 6(1) : 71–78.
- Alokika SB. (2019). Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. *App Microbiol Biotechnol.* 103 : 8763–8784. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10108-6>
- Alvarez V., Rodríguez-Sáiz M., De la Fuente J.L., Gudiña E.J., Godio R.P., Martín J.F., and Barredo J.L. (2006). The crtS gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of  $\beta$ -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet Biol.* 43 : 261–272.
- Al-Zarban S.S., Al-Musllam A.A., Abbas I., Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M. (2002). *Saccharomonosporhalophilasp.nov*, a novel halophilicactinomycete isolated from marsh soil in Kuwait . *Int J Sys EvMicrobiol.* 52 : 555-558.
- Amsaveni R., Sureshkumar M., Vivekanandhan G., Bhuvaneshwari V. et Kalaiselvi M. (2015). Criblage et isolement des actinomycètes produisant des pigments à partir d'échantillons de sol. *Revue internationale des biosciences et des nanosciences.* 2 : 24-28.
- Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P. (2016). An Introduction to Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.* 4-37.
- Andriambololona T. (2010). Etude biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe. P 5-10.
- Arunachala C., Narmadhapriya D. (2011). *Monascus* fermented rice and its beneficial aspects: a new review. *Asian J Pharm Clin Res.* 4 : 29–31
- Arunpanichlert J., Rukachaisirikul V., Sukpondma Y., Phongpaichit S., Tew-trakul S., and Rungjindamai N. (2010). Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. *Chem Pharma Bull.* 58 : 1033–1036.

## B

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Babitha S., Sandhya C., Pandey A. (2004). Natural food colorants. *Appl Bot Abstracts*. 23(4) : 258–266
- Babitha S. (2009). Microbial pigments. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. Springer, Dordrecht. pp. 147-162.
- Balagurunathan R., Subramanian A. (2001). Antagonistic streptomycetes from marine sediments. *Adv Biosci*. 20 : 71-6.
- Balagurunathan R., Selvameenal L. et Radhakrishnan M. (2009). Pigment antibiotique des actinomycètes du sol du désert; activité biologique, purification et criblage chimique. *Journal indien des sciences pharmaceutiques*. 71 : 499. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.58174>
- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. P 14-17.
- Bjerkeng B., Peiskerb M., von Schwarzenbergc K., Ytrestøyla T., and Åsgårda T. (2007). Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. *Aquaculture*. 269 : 476–489.
- Boran R. (2018). Detergent compatible extracellular lipase from *Streptomyces cellulosa* AU-10: a green alternative for the detergent industry. *J Surfact Deterg*. 21 : 565–573. <https://doi.org/10.1002/jsde.12049>
- Boucheffa K. (2011). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques nonpolygéniques : identification des souches productrices et essai de caractérisation des antifongiques produits. Thèse de Magister. Université Abderrahmane Mira-Bejaia. P 12-14.
- Boughachiche F. (2012). Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebka. Thèse doctorat : Université Mentouri Constantine. 150 p.
- Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zirezer H., Kitouni M., Boudemaghet A., Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycètes productrices de substances antibactériennes à partir de la sebka de Ain Mlila. *Science & Techno*. 23 : 5- 10.
- Budihal S R., Agsar D., and Patil S R. (2015). Enhanced production and application of

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. *Bioresource Technology*. 200 : 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.09>
- Buzzini P. (2001). Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*–*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *J Appl Microbiol*. 90 : 843–847.
- Bystrykh L.V., Fernández-Moreno M.A., Herrema J.K., Malpartida F., Hopwood D.A. and Dijkhuizen L. (1996). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of bacteriology*. 178(8) : 2238-2244.

## C

- Charkoudian LK., Fitzgerald JT., Khosla C., Champlin A. (2010). In living color: bacterial pigments as an untapped resource in the classroom and beyond. *Plos Biol*. 8(10) : e1000510.
- Chaudhary H., Soni B., Shrivastava A., Shrivastava S. (2013). Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. (3) : 83-94.
- Cho YJ., Hwang HJ., Kim SW., Song CH., Yun JW. (2002). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *J Biotechnol*. 95 : 13–23.
- Cho Y.J., Park J.P., Hwang H.J., Kim S.W., Choi J.W., & Yun J.W. (2002). Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*. 3 : 195–202.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I., and Florou-Paneri P. (2013) Functional properties of carotenoids originating from algae. *J Sci Food Agri*. 93 : 5–11.
- Chu M.K., Lin L.F., Twu C.S., Lin R.H., Lin Y.C., Hsu S.T., et al. (2010). Unique features of *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) RA3B genes involved in the blue indigodine production. *Microbiol. Res*. 165 : 483–495.
- Coisne S., Bechet M. and Blondeau R., (1999). Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in iron-restricted media. *Letters in applied microbiology*. 28(3) : 199-202.
- Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.

**D**

- Darshan N., Manonmani HK. (2015). Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol.* 52 : 5393–5407.
- Dastager S.G., Li W.J., Dayanand A., Tang S.K., Tian X.P., Zhi X.Y., Xu L.H., Jiang C.L. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *Afr. J. Biotechnol.* 5 : 1131–1134.
- Dastager S., Li W.J., Tian X.P. et Zhi X.Y. Séparation. (2014). Identification et analyse de la production de pigments (mélanine) dans *Streptomyces*. Établissement de la « Collection culturelle nationale du Pakistan (NCCP) » Voir le projet Étude comparative de la diversité, de la phylogénie moléculaire et du potentiel bioactif des endophytes associés aux plantes médicinales du Xinjiang et de l'Ouzbékistan Projet View. 1131–1134.
- Dawidziuk A., Popiel D., Lubońska M., Grzebyk M., Wisniewski M., Koczyk G. (2017). Assessing contamination of microalgal astaxanthin producer *Haematococcus* cultures with high-resolution melting curve analysis. *J Appl Genet.* 58 : 277–285.
- Del Campo JA., Moreno J., Rodríguez H., Vargas MA., Rivas J., Guerrero MG. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J Biotechnol.* 76 : 51–59.
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier. 476 p.
- Delaunay S., Rondags E., Germain P. (2003). Production d'antibiotiques par biotechnologies, techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique. J6 008 : 1-1.
- Deorukhkar A.A., Chander R., Ghosh S.B., and Sainis K.B. (2007). Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*. *Res Microbiol.* 158(5) : 399–404.
- Dgigal D. (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp: 157.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dharmikp et gomashea. (2013). Isolement, identification et activité antioxydante du pigment de mélanine d'Actinomycète (espèce Streptomyces) isolé du sol de jardin, district de Nagpur, Inde. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology* 18 : 69–72.
- Djemouai N., Meklat A., Gaceb-Terrak R., Oulad Hadj Youcef K., Nacer A., Mokrane S., Bouras N. and Verheecke-Vaessen, C. (2022). Biological activities of Streptomyces sp. Bts40 isolated from the rhizosphere of Artemisia herba-alba Asso.
- Downham A., Collins P. (2000). Coloring our foods in the last and next millennium. *Int. J Food Sci Technol.* 35 : 5–22.
- Dufossé L., De Echanove MC. (2005). The last step in the biosynthesis of aryl carotenoids in the cheese ripening bacteria *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (*Brevibacterium aurantiacum* sp. nov.) involves a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Food Res Int.* 38 : 967–973
- Dufossé L., Galaup P., Carlet E., Flamin C., Valla A. (2005). Spectrocolorimetry in the CIE L\*a\*b\* color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses. *Food Res Int.* 38 : 919–24.
- Dufossé L. (2006). Microbial production of food grade pigments. *Food Technol Biotechnol.* 44 : 313–321.
- Dufossé L. (2009). Pigments, microbial. In: Schaechter, M. (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, vol. 4. Philadelphia, PA: Elsevier. 457–471.
- Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad S.M., Blanc P., Murthy K.N.C., and Ravishankar G.A. (2005). Microorganism and microalgae as source of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trend Food Sci Technol* 16 : 389–406.
- Duran N., Tixeira M.F.S., DeConti R., and Esposito E. (2002). Ecological-friendly pigments from fungi. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 42 : 53–66.

## *E*

- Eisenman HC., Casadevall A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 93 : 931–940.
- Ela M.A., El-Shaer N.S. et Ghanem N.B. (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie.* 51 : 993- 995.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- El-Fouly MZ., Sharaf AM., Shahin AAM., El-Bialy HA., Omara AMA. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Radiat Res Appl Sci.* 8 : 36–48.
- El-Naggar N.E.A., & El-Ewasy S.M. (2017). Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific reports.* 7(1) : 1-19.
- Ensign J.C., Normand P., Burden J.P., Yallop C.A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* 144 : 657-660.
- Eunice J. A., Prosser J. I. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of genetic microbiology.* (129) : 2029-2036.

### *F*

- Faheem M., Raza W., Zhong W., Nan Z., Shen Q., Xu Y. (2015). Evaluation of the biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol Cont.* 81 : 101–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.012>
- Ferreira C.V., Bos C.L., Versteeg H.H., Justo G.Z., Duran N., and Peppelenbosch M.P. (2004). Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood.* 104 : 1459–1467.
- Flärdh K., et Bruttner M.J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature. Rev.* 7 : 36-49.
- Fodil D., Badis A., Jaouadib B., Zarai N., Ferradji FZ., Boutoumi H. (2011). Purification and characterization of two extracellular peroxidases from *Streptomyces* sp. strain AM2, a decolorizing actinomycetes responsible for the biodegradation of natural humic acids. *Int Biodeterior Biodegrad.* 65 : 470–478.
- Francis FJ. (1987). Lesser known food colorants. *Food Technol.* 41: 62–68
- Franciscon E., Grossman M.J., Paschoal J.A.R., Reyes F.G.R., and Durrant L.R. (2012). Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated *Brevibacterium* sp. strain VN-15. *New York: Springer Plus.* 1–37.

## G

- Galaup P., Flamin C., Carlet E., Dufossé L. (2005). HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the 'Protected Designation of Origin' french-red-smear soft cheeses munster, epoisses, reblochon and livarot. *Food Res Int.* 38 : 855–60.
- George M., Anjumol A., Mohamed Halta A.A. (2012). Distrubition and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *African Journal of Microbiology Research.* 6 (10) : 2265-2271.
- Geweely N.S. (2011). Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent-producing fungal species. *Life Sci J.* 5 : 697–711.
- Giridharan P., Verekar S.A., Khanna A., Mishra P.D., and Deshmukh S.K. (2012). Anticancer activity of sclerotiorin, isolated from an endophytic fungus *Cephalotheca faveolata* Yaguchi, Nishim, & Udagawa. *Ind J Exp Biol.* 50 : 464–468.
- Giuffrida D., Sutthiwong N., Dugo P., Donato P., Cacciola F., girardvalenciennes E., Le Mao Y., Monnet C., Fouillaud M., Caro Y. (2016). Characterisation of the C50 carotenoids produced by strains of the cheese-ripening bacterium *Arthrobacter arilaitensis*. *Int Dairy J.* 55 : 10–16.
- Goodfellow M., Kampfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Suzuki K., Ludwig W., Withman W.B. (2012). *Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria* (2emeEds) vol. V, part A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. p. 2083.
- Goodfellow M., Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annuals Review of Microbiology* (37) : 189-216.
- Gopalakrishnan S., Srinivas V., & Prasanna S.L. (2020). *Streptomyces. Beneficial Microbes in Agro-Ecology.* 55–71.  
doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00005-8
- Gordon R.E. et Smith M.M. (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei* .*J.Bact.* 66 : 41-48.
- Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the Actinomycetales. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance.* Edited by G. Sykes and F. A. Sk.
- Greiner-mai E., Korn-Wendisch F., et Kutzner HJ. (1988). Révision taxonomique du genre *Saccharomonospora* et description de *Saccharomonospora glauca* sp. nov.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- International Journal of Systematic Bacteriology. 38 : 398–405.  
<https://doi.org/10.1099/00207713-38-4-398>
- Grewal J., Wołacewicz M., Pyter W., Joshi N., Drewniak L., and Pranaw K. (2022). Colorful Treasure From Agro-Industrial Wastes: A Sustainable Chassis for Microbial Pigment Production. *Frontiers in Microbiology*. 13 : 832918-832918.  
doi: 10.3389/fmicb.2022.832918
  - Grossart HP., Thorwest M., Plitzko I., Brinkhoff T., Simon M., Zeeck A. (2009). Production of a blue pigment (glaukothalin) by marine rheinheimera spp. *Int J Microbiol*. 2009 : 1–7.
  - Gupta R., Saxena RK., Chaturvedi P., Viridi VS. (1995) .Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J Appl Bacteriol*. 78 : 378–383.

## *H*

- Han AR., Park JW., Lee MK., Ban YH., Yoo YJ., Kim EJ., Kim E., Kim BG., Sohng JK., Yoon YJ. (2011). Development of a *Streptomyces venezuelae*-based combinatorial biosynthetic system for the production of glycosylated derivatives of doxorubicin and its biosynthetic intermediates. *Appl Environ Microbiol*. 77(14) : 4912–4923.
- Heer K., Sharma S. (2017). Microbial pigments as a natural color: a review. *Int J Pharm Sci Res*. 8 : 1913–1922.
- Hejazi MA., Holwerda E., Wijffels RH. (2004). Milking microalga *Dunaliella salina* for beta-carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnol Bioeng*. 85 : 475–481.
- Henke N. A., Wiebe D., Pérez-García F., Peters-Wendisch P., and Wendisch V. F. (2018). Coproduction of cell-bound and secreted value-added compounds: Simultaneous production of carotenoids and amino acids by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour. Technol*. 247. 744–752.
- Hopwood C.J., Morey L.C., Rogers R., and Sewell K. (2007). Malingering on the Personality Assessment Inventory: Identification of specific feigned disorders. *J. Pers. Assess*. 88(1) : 43-48.

**I**

- Igarashi Y., Trujillo M. E., Martinez-Molina E., Yanase S., Miyanaga S., Obata T., et al. (2007). Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. Nov. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 : 3702–3705.
- Iu, R., Cui, C.B., Duan, L., Gu, Q. Q., et Zhu, W.M. (2005b). Puissante activité anticancéreuse in vitro de la métacycloprodigiosine et de l'undécylprodigiosine d'un actinomycète dérivé d'une éponge *Saccharopolyspora* sp. Nov. *Arch. Pharm. Rés.* 28 : 1341–1344.

**J**

- Jin-Feng W., Xiu-Ji L., Rui-Sang L., Hong-Mei L., Ya-Jie T. (2012). Optimization of the mated fermentation process for the production of lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) and NRRL 2896 (-). *Bioprocess Biosyst Eng.* 35 : 553–564.

**K**

- Kamijo M., Suzuki T., Kawai K., Fujii T., and Murase H. (1999). Ytterbium-decreasing *Streptomyces* sp. and its naphthoquinone-pigment production in the presence of rare-earth elements. *J Biosci Bioeng.* 87 : 340–343.
- Kamla M., Jayanti T., Sneha G. (2012). Microbial pigments: a review. *Int J Microb Resour Technol.* 2012 : 361–365
- Kashiwagi N., Miyake M., Hirose S., Sota M., Ogino C., Kondo A. (2014). Cloning and starch degradation profile of maltotrioseproducing amylases from *Streptomyces* species. *Biotechnol Lett.* 36 : 2311– 2317.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-014-1611-5>
- Kaushal J., Mehandia S., Singh G., Raina A., Arya SK. (2018). Catalase enzyme: application in bioremediation and food industry. *Biocatal Agric Biotechnol.* 16 : 192–199.  
<https://doi.org/10.1016/j. bcab.2018.07.035>
- Kheiralla ZH., Hewedy MAH., Mohammed HR. and Darwesh OM. (2016). Isolation of pigment producing actinomycetes from rhizosphere soil and application it in textiles dyeing. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 7(5) : 2128-2136.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kim SJ., Park DH., Ryu YW. (2003). High-level production of astaxanthin by fed-batch culture of mutant strain *Phaffia rhodozyma* AJ-6-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13 : 175–181.
- Kiss G.C., Forgacs E., Cserhatia T., and Vizcaino J.A. (2000). Colour pigments of *Trichoderma harzianum*. Preliminary investigations with thin-layer chromatography, infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 896 : 61–68.
- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine. 89 P.
- Kitouni M. (2005). Identification d'une Actinomycétales, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides des régions de Biskra. *Sciences & Technologie.*
- Konuray G., Erginkaya Z. (2015). Antimicrobial and antioxidant properties of pigments synthesized from microorganisms. In: Mendez-Vilas A., editor. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs.* FORMATEX. Pp. 27–33.
- Kumar A., Gudiukaite R., Gricajeva A., Sadauskas M., Malunavicius V., Kamyab H., Pant D. (2019a). Microbial lipolytic enzymes: promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. *Energy.*  
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116674>
- Kumar M., Kumar P., Das P., Kapur MK. (2019b). Draft genome of *Streptomyces* sp. strain 130 and functional analysis of extracellular enzyme producing genes. *Mol Biol Rep.*  
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04960-y>
- Kurup U.P., Barboriak J. J., Fink J. N., and Lechevalier M. P. (1975). *Thermocactinomyces candidus*, a new species of thermophilic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25 : 150-154.

## L

- Lakrod K., Chairisook C., Skinner DZ. (2003). Expression of pigmentation genes following electroporation of albino *Monascus purpureus*. *J. Ind. Microbiol.* 30 : 369–374.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- Larpent J.P., Sanglier J.J., (1989). Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris. p. 481.
- Lechevalier M.P., De Bievre C., Lechevalier H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 5 : 249-260.
- Lee HJ., Han SI., Whang KS. (2012). *Streptomyces gramineus* sp. Nov., an antibiotic-producing actinobacterium isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4) : 856–859.
- Lim J., Lee C., Dhakshnamoorthy V., Park JS., Hong S. (2016). Molecular characterization of *Streptomyces coelicolor* A(3) SCO6548 as a cellulose 1,4- $\beta$ -cellobiosidase. *FEMS Microbiol Lett.* 363(3) : 1–8.  
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnv245>
- Lin Y.B., Wang X.Y., Fang H., Ma Y.N., Tang J., Tang M., et al. (2012). *Streptomyces shaanxiensis* sp. Nov., a blue pigment-producing streptomycete from sewage irrigation soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 : 1725–1730.
- Lin Y.L., Wang T.H., Lee M.H., and Su N.W. (2008). Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77 : 96573.
- Lingappa K., et Narasing RM. (2016). Production biotechnologique de biocolor à partir de micro-organismes. Département de microbiologie de l'université Gulbarga. 1-110.  
<https://doi.org/http://hdl.handle.net/10603/96411>
- Liu G.Y., Essex A., Buchanan J.T., Datta V., Hoffman H.M, Bastian J.F., et al. (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.* 202 :2 09–215.
- Locci R. (1989). Streptomycetes and related genera. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie*. Eds: S.T.Williams, M.E. Sharpe et J.G. Holt.. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 4 : 2451-2508.

**M**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mapari S.A.S., Nielsen K.F., Larsen T.O., Frisvad J.C., Meyer A.S., and Thrane U. (2005). Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr Opin Biotechnol.* 16 : 231–238.
- Mason T., and Zhao Y. (1994). Enhancement of ultra sonication cavitation yield by multi frequency sonication. *Ultrasonics Sonochemistry.* 29(5) : 567.
- M. Assia, A. Hasnaa, M. Sara, M. Jamal, M. Mohammed. (2018). Physico-chemical characterization of a pink red-like pigments produced by five new bacterial soil strains identified as *Streptomyces coelicoflavus*. *Am. J. Microbiol. Res.* 6 : 67-72.
- Mishra B., Varjani S., & Karthikeya Srinivasa Varma G. (2019). Agro-industrial by-products in the synthesis of food grade microbial pigments: An eco-friendly alternative. In *Green Bio-processes*. Springer, Singapore. 245-265.
- Mizukami H., Konoshima M., and Tabata M. (1978). Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures, *Phytochem.* 17: 95-97.
- Mohanasrinivasan V., SriramKalyan P., Nandi I., Subathradevi C., Selvarajan E., Suganthi V., and Naine J.S. (2013). Fermentative production of extracellular pigment from *Streptomyces coelicolor* MSIS1. *Research journal of biotechnology.* 8(4) : 31-41.
- Mojib N., Philpott R., Huang J.P., Niederweis M., and Bej A.K. (2010). Antimycobacterial activity of in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. *Antonie vanLeeuwenhoek* . 98(4) : 531–540.
- Murase M., Hrkiji T., Nitta K. (1960). TakeljchiYandUmezawaH. Peptimycine, un produit de *Streptomyces*exhibant l'inhibition apparente contre le carcinome d'Ehrlich. *Le journal des antibiotiques, Ser. A.* 14 : 113-118.

## N

- Nagia F.A., and El-Mohamedy R.S.R. (2007). Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. *Dyes Pigments.* 75 : 550–555.
- Naidu M., and Sowbhagya H. (2012). Technological Advances in Food Colors. *Chemical Industry Digest.* 79-88.
- Nakamura A., Magae J., Tsuji R.F., Yamasaki M., and Nagai K. (1989). Suppression of cytotoxic T cell induction in vivo by prodigiosin 25-C. *Transplantation.* 47(6) : 1013–1016.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nayak C., Suguna K., Chethana S., Narasimhamurthy K., and Rastogi N. (2007). Enhanced mass transfer during solid liquid extraction of gamma-irradiated red beetroot. *Journal Food Engineering*. 79 (3) : 765.
- Nerurka M, Vaidyanathan J, Adivarekar R, and Langdana Z.B. (2013). Use of natural dye from *Serratia marcescens* subspecies *marcescens* in dyeing of textile fabrics. *Octa J Environ Res* 1 : 129–135.
- Netzer R., Stafsnes MH., Andreassen T., Goksøy A., Bruheim P., Brautaset T. (2010). Biosynthetic pathway for  $\gamma$ -cyclic sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases. *J Bacteriol*. 192(21) : 5688–5699.
- Niraula NP., Kim SH., Sohng JK., Kim ES. (2010). Biotechnological doxorubicin production: pathway and regulation engineering of strains for enhanced production. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(4) :1187–1194.
- Nielsen J., Olsson L. (2002). An expanded role for microbial physiology in metabolic engineering and functional genomics: moving towards systems biology. *FEMS Yeast Res*. 2 : 175–181.
- Nutaratat P., Srisuk N., Arunrattiyakorn P., Limtong S. (2016). Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Arch Microbiol*. 198 : 429–437.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-016-1202-z> PMID: 26899734.

### *O*

- Ozaki A., Kitano M., Furusawa N., Yamaguchi H., Kuroda K., and Endo G. (2002). Genotoxicity of gardenia yellow and its components. *Food Chem Toxicol*. 40 : 1603–1610.

### *P*

- Palanichamy V., Hundet A., Mitra B., and Reddy N. (2011). Optimization of cultivation parameters for growth and pigment production by *Streptomyces* spp. isolated from marine sediment and rhizosphere soil. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 1(3) : 158-170.
- Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C., and Schippa S. (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J Appl Microbiol*. 102 : 992–999.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Papageorgiou V.P., Winkler A., Sagredos A.N., and Digenis G.A. (1979). Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of naphthoquinones and other constituents of *Alkanna tinctoria*. *Planta Med.* 35 : 56-60.
- Perry J.J., Staley J.T., Lory S. (2004). *Microbiologie*. Dunod, Pais. 497–498.
- Prescott L.M., Willey J.M., Sherwood L.M., et Woolverton C. J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck supérieur. France. p1120.

### *Q*

- Qin Z., Wang X., Rateb ME., Ass'ad LA., Jaspars M., Deng Z., Yu Y., Deng H. (2014). Disruption of a methyltransferase gene in actinomycin G gene cluster in *Streptomyces iakyrus* increases the production of phenazinomycin. *FEMS Microbiol Lett.* 352(1) : 62–68.

### *R*

- R. P., Shobha R et Onkarappa R. (2010). Diversité fascinante et activités biologiques puissantes des métabolites de l'actinomycète. *Journal of Pharmacy Research.* 3 : 250-256.
- R. Kirby, L.F. Wright and D.A. Hopwood. (1975). Plasmid determined antibiotic synthesis and resistance in *Streptomyces colicolor*. *Nature.* 254 : 265-267.
- Raina S., Murphy T., Vizio D., Reffatti P., Keshavarz T. (2011). Novel strategies for over-production of microbial products. *Chem Eng Trans.* 24 : 847–852
- Ray A.C. and Eakin R.E. (1975). Studies on the biosynthesis of Aspergillin by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol* 30 : 909–915.
- Reddy P., and Umamaheshwara RV. (2016). Mycelial and Pigmentation studies of Dibenzothiophene desulfurizing *Streptomyces* species isolated from oil contaminated sites. *Int J Pharm Biol Sci.* 11(5) : 143-146.
- Reverchon S., Rouanet C., Expert D., and Nasser W. (2002). Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrsanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 184 : 654–665.
- Ribeiro A.R., and Umbuzeiro G.A. (2014). Effects of a textile azo dye on mortality, regeneration, and reproductive performance of the planarian, *Girardia tigrina*. *Eur Sci Eur.* 26 :1-8.

- Rodriguez S., Giusti L., Durst R., and Wrolstad R. (2001). Development and process optimization of red raddish concentrate extract as potential natural red colorant. *Journal of Food Processing Preservation*. 25 : 165.

**S**

- Sánchez-marroquína et Zapata M. (1954). Observations sur le pigment de *Streptomyces coelicolor*. *Microbiologie appliquée*. 2 : 102–107.
- S. Afra, A. Makhdoumi, M.M. Matin, J. Feizy. (2017). A novel red pigment from marine *Arthrobacter* sp. G20 with specific anticancer activity *J. Appl. Microbiol.* 123 : 1228-1236.
- Scherr Nicole & Nguyen Liem. (2009). *Mycobacterium* versus *Streptomyces* we are different, we are the same, *Current Opinion in Microbiology* 12 : 699-707.
- Schuep W., Blount J., Williams T., and Stempel A. (1978). Production d'un nouveau pigment rouge, la rubrolone, par *Streptomyces echinoruber* sp. NOV. II chimie et élucidation de la structure. *Le journal des antibiotiques*.
- Selvameenal L., Radhakrishnan M., Balagurunathan R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological R. Mumtaz et al. 1 3 activity, purification and chemical screening. *Indian J Pharm Sci.* 71(5) : 499–504.
- Sen T., Barrow C.J., and Deshmukh S.K. (2019). Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward. *Devant. Nutr.* 6 : 7.  
doi: 10.3389/fnut.2019.00007.
- Sharma A., Tewari R., Rana SS., Soni R., Soni SK. (2016). Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 179 : 1346–1380.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>
- Shima J., Hesketh A., Okamoto S., Kawamoto S., Ochi K. (1996). Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 178(24) : 7276–7284.
- Shirling E.B., et Gottlieb D., (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16 : 3313-3340.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Silva C., Santos A., Salazar R., Lamilla C., Pavez B., Meza P., Hunter R., Barrientos L. (2019). Evaluation of dye sensitized solar cells based on a pigment obtained from Antarctic *Streptomyces fildesensis*. *Sol. Energy*. 181 : 379–385.
- Sindhu R., Binod P., Pandey A. (2017).  $\alpha$ -Amylases. In: Pandey A, Negi S, Soccol CR (eds) *Current developments in biotechnology and bioengineering*. 3–24.  
doi:10.1016/ b978-0-444-63662-1.00001-4
- Singh, O. V. (Ed.). (2017). *Bio-pigmentation and Biotechnological Implementations*. John Wiley & Sons.
- Smaoui S. (2010). *Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés*. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.
- Socaciu C. (2007). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sokolovska I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhelt P.G., Agathos S.N., Wattiau. (2003). Carbon source-induced modification in mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* El. Application. *Environment. Microbiology*. 69. 701.
- Solecka J., Zajko J., Postek M., and Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of Biology*. 7 : 373-390.
- Sowbhagya H., and Chitra V. (2010). Extraction of flavourings and colorants from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50(2) : 146-148.
- Spasic J., Mandic M., Djokic L., Nikodinovic-Runic J. (2018). *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox. *Appl Microbiol Biotechnol*.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8884-x>
- Spence, Levitan, Shankar, and Zampini. (2010). The multi sensory perception of flavour. [www.thepsychologist.org.uk](http://www.thepsychologist.org.uk). 23(9) : 720-722.
- Stankovic N., Radulovic V., Petkovic M., Vuckovic I., Jadranin M., Vasiljevic B., et al. (2012). *Streptomyces* sp. JS520 produit des quantités exceptionnellement élevées d'undécylprodigiosine avec des propriétés antibactériennes, antioxydantes et protectrices des UV. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 96 : 1217–1231.
- Starr M.P. (1958). Le pigment bleu de *Corynebacterium insidiosum*. *Arch Mikrobiol*. 30 : 325- 334.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sumathy B. (2009). Microbial pigments. In: Singh-Nee Nigam P, Pandey A (eds) Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer, Netherlands.
- Sun P., Fang W., Shin L., Wei J., Fu S., Chou J. (2014). Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. PLoSOne. 9 : e114196.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114196>.
- Sutthiwong N., Fouillaud M., Valla A., Caro Y., Dufossé L. (2014). Bacteria belonging to the extremely versatile genus *Arthrobacter* as novel source of natural pigments with extended hue range. Food Res. Int. 65 : 156–162.

### *T*

- Tandale A., Khandagale M., Palaskar R., et Kulkarni S. (2018). Production de baume à lèvres à partir d'actinomycètes produisant des pigments. IAETSD Journal for Advanced Research in Applied Sciences. 5 : 556-562.
- Teixeira M.F.S., Martins M.S., Silva J.C.D., Kirsch L.S., Fernandes O.C., Carneiro A.L.B., et al. (2012). Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. Curr Trend Biotechnol Pharma. 6 : 300–311.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., Bora T.S. (2007). Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. J. Microbiol. Médi. 17 : 242-249.
- Thomas L., Joseph A., Singhania RR., Patel AK., Pandey A. (2017). Industrial enzymes: xylanases. In: Pandey A, Negi S, Soccol CR (eds) Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00006-3>
- Tuli H.S., Chaudhary P., Beniwal V., and Sharma A.K. (2014). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. J Food Sci Technol. 52 : 4669–4678.

### *U*

- Udhayakumar K., Ramalingam S., Saravanan R., et B D. (2017). Extraction du pigment actinomycètes (*streptomyces* sp) et évaluation de sa propriété anticancéreuse sur la lignée cellulaire HeLa. Der Pharma Chemica. 9 : 106-113.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ullmann F. (1985). Ullmann Encyclopedia of Industrial Chemistry 2nd ed, Edit., VCH Weinheim. p 245.
- Unagul P., Wongsaporn P., Kittakoop P., Intamas S., Srikitikulchai P., and Tanticharoen M. (2005). Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32 : 135-140.

### V

- Velmurugan P., Kim M.J., Park J.S., Karthikeyan K., Lakshmanaperumalsamy P., Lee K.J., et al. (2010). Dyeing of cotton yarn with five water soluble fungal pigments obtained from five fungi. Fibers Polymers. 11 : 598–605.
- Velmurugan P., Lee Y.H., Nanthakumar K., Kamala-Kannan S., Dufossé S.A., and Oh B.T. (2010). Water-soluble red pigments from *Isaria farinosa* and structural characterization of the main colored component. J Basic Microbiol. 50 : 581–590.
- Venil C.K., Zakaria Z.A., & Ahmad W.A. (2013). Bacterial pigments and their applications. Process Biochemistry. 48(7) : 1065-1079.

### W

- Wang L., Li Y., Li Y. (2019). Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24. Int. J. Biol. Macromol. 123 : 521–530.
- Wang X., Tao J., Wei D., Shen Y., Tong W. (2004). Development of an adsorption procedure for the direct separation and purification of prodigiosin from culture broth. Biotechnol Appl Biochem. 40 : 277–280.
- Wild D., Tóth G., and Humpf H.U. (2002). New *Monascus* metabolite isolated from red yeast rice (angkak, red koji). J Agri Food Chem. 50 : 3999–4002.
- Williams S.T. and Cross T. (1971). Actinomycetes in «Methods in microbiology» Academic Press, Éd. London. Vol. (4) : 295-334.
- Williams S.T., Wellington E.M.H. (1982a). Actinomycetes. In: Eds. Page A.L., Miller R.H., Keency O.R.: Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties, second ed. American. Society of Agronomy/Soil Science Society of America. Madison. pp. 969–987.
- Williams S.T., Wellington E.M.H., (1984). Ecology of Actinomycetes. In: Goodfellow, M., (Eds.), the biology of the Actinomycetes. London. p. 481-528.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wright L.F. and Hopwood D.A. (1976). Actinorhodin is a Chromosomally-determined Antibiotic in *Streptomyces coelicolor*A3 (2). *Microbiology*. 96(2) : 289-297.

### **Z**

- Zhang H., Zhan J., Su K., and Zhang Y.A. (2006). Kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound –  $\lambda$  actinorhodin. *Food Chem*. 95 : 186–192.
- Zhao J., Wang X., Sun W., Mou Y., Peng Y., Zhou L. (2013). Medium optimization for palmarumycin C13 production in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 using response surface methodology. *Electron J Biotechnol*. 16(6) : 16.
- Zhu H.H., Guo J., Yao Q., Yang S.Z., Deng M.R., and Li T.H. (2011). *Streptomyces caeruleatus* sp. Nov., with dark blue diffusible pigment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 61 : 507–511.
- Zhu H.H., Guo J., Yao Q., Yang S.Z., Deng M.R., Phuong le T.B., et al. (2007). *Streptomyces vietnamensis* sp. Nov., a streptomycete with violet blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 57 : 1770–1774.

## Annexe 1. Composition des milieux de cultures

### ISP2

Composition	Quantité
Glucose	4 g
Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Agar	18 g

### GLM

Composition	Quantité
Glucose	10 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
CaCO <sub>3</sub>	1 g
Peptone	5 g
Agar	18 g

### Mueller Hinton

Composition	Quantité
Mueller Hinton agar	38 g
pH	7,6 ± 0,2

### PDA (Potato-Dextrose-Agar)

Composition	Quantité
Glucose	20 g
Extrait de pomme de terre	200 g /eau distillée
Agar	20 g

---

**ISP1**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Tryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Agar	16 g

---

**ISP 4**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Amidon soluble	10 g
Di -potassium phosphate	1 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1 g
Chlorure de sodium	1 g
Sulfate d'ammonium	2 g
Carbonate de calcium	2 g
Sulfate ferreux heptahydraté	0,001 g
Chlorure de manganèse	0,001 g
Sulfate de zinc	0,001 g
Agar	20 g
pH	7,2 ± 0,2

---

---

**ISP3**

---

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Avoine	20 g
Solution des traces de sels	1ml
• Sulfate ferreux heptahydraté	0,001g
• Chlorure de manganèse tétrahydraté	0,001g
• Sulfate de zinc heptahydraté	0,001g
Agar	18 g

---

---

**ISP5**

---

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
L. Asparagine	1g
Glycerol	10 g
Dipotassium phosphate	1g
Agar	20 g
Solution des traces de sels	1ml
• Sulfate ferreux heptahydraté	0,001g
• Chlorure de manganèse tétrahydraté	0,001g
• Sulfate de zinc heptahydraté	0,001g
pH	7,6 ± 0,2

---

---

**ISP6**

---

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Peptone	20 g
Dipotassium phosphate	1g
Extrait de levure	1g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Thiosulfate de sodium	0,08 g
Agar	15 g
pH	7,6 ± 0.2

---

---

**ISP7**

---

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
L. Asparagine	1g
Glycerol	15g
L. tyrosine	0,5g
Dipotassium phosphate	0,5g
Magnesium sulfate	0,5g
Sodium chloride	0,5g
Agar	20g
Solution des traces de sels	1g
• Sulfate ferreux .7 H <sub>2</sub> O	1,36mg
• Chlorure de cuivre.2H <sub>2</sub> O	0,027mg
• Chlorure de cobalt.6 H <sub>2</sub> O	0,04mg
• Molybdate de sodium .2 H <sub>2</sub> O	0,025mg
• Chlorure de zinc	0,02mg
• Acideborique	2,85mg
• Chlorure de manganèse. 4 H <sub>2</sub> O	1,80mg
• Tartrate de sodium	1,77mg
pH	7,3 ±0,1

---

---

**ISP9**

---

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Dipotassium phosphate	5,65 g
Sulfate d'ammonium	2,64 g
Monopotassium phosphate	2,38g
Magnesium sulfate	1g
Agar	18 g
Solution des traces de sels	1ml
• Sulfate ferreux .7 H <sub>2</sub> O	0,0079 g
• Sulfate de cuivre. 5 H <sub>2</sub> O	0,0064 g
• Sulfate de zinc. 7 H <sub>2</sub> O	0,0015 g
• Chlorure de manganèse.4 H <sub>2</sub> O	0,0011g
Solution des glucides	100 ml
• Glucose	1,25 g
• Galactose	1,25 g
• Mannitol	1,25 g
• Inositol	1,25 g
• Fructose	1,25 g
• Saccharose	1,25 g
• Lactose	1,25 g
• Rhamnose	1,25 g
pH	7 ± 0,2

---

**Braid parker**

---

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Braid parker agar	58 g
Jaune d'oeuf	50 ml
pH	6,8 ± 0,2

---

---

**Amidon caséine agar**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Amidon soluble	10 g
Caséine (sans vitamine)	0,30 g
KNO <sub>3</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
NaCl	2 g
CaCO <sub>3</sub>	0,02 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	18 g

---

**Gélose xylane**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Xylane	10 g
NaNO <sub>3</sub>	1.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.05 g
Mn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.001 g
Agar	18 g
pH	7

---

---

### Gélose lait écrémé

Composition	Quantité
Peptone	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1 g
Lait écrémé	100 ml
Agar	15 g

### CMC (carboxyméthylcellulose)

Composition	Quantité
CMC	10 g
NaNO <sub>3</sub>	1,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,05 g
Mn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 g
Agar	18 g
pH	7

---

### Rouge Congo à 0.1%

Composition	Quantité
Rouge Congo	0,1 g
Eau distillée	100 ml

---

### Eau physiologique

Composition	Quantité
NaCl	9 g
Eau distillée	1 L

---

---

<b>NaCl (1M)</b>	
<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
NaCl	38 g
Eau distillée	1 L

---

N.B. l'ajustement du pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou Solution d'HCL 1N selon le cas.

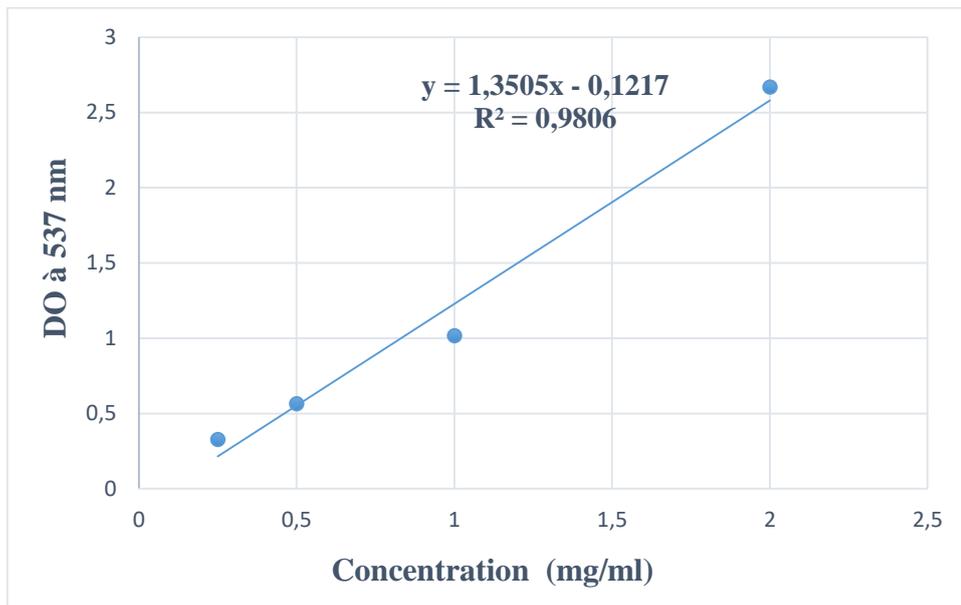
## **Annexe 2. Coloration de Gram**

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste Danois Hans Christian Gram qui mis au point le protocole en 1884.

Cette technique s'effectue en trois principales étapes :

- ↳ Le frottis, séché et fixé à la chaleur, est recouvert de violet de Gentiane (cristal violet) phénolé, durant environ 1min, ensuite ce colorant est éliminé par un lavage à l'eau distillée, suivi par l'ajout de lugol pendant 30 sec, un deuxième lavage est effectué.
- ↳ Faire agir l'éthanol à 0.95% durant 10 secondes et faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à décoloration, puis laver à l'eau distillée.
- ↳ Une Coloration à la Fuchsine phénolée est faite de quelques secondes à 1min selon sa concentration, puis un autre lavage à l'eau distillée.
- ↳ L'observation à l'immersion est réalisée après séchage de la lame, à l'objectif x100. La couleur violette due au violet de Gentiane est l'aspect caractéristique des bactéries à Gram positif, alors que les bactéries Gram négatif se colorent en rose par la Fuchsine.

### Annexe 3. Courbe d'étalonnage de pigment



Courbe d'étalonnage de pigment.

## Résumé

Dans cette étude, un isolat actinobactérien a été sélectionné pour son aptitude détectée à produire un pigment bleu violacé sur milieu synthétique ISP2. L'identification de cet isolat a été effectuée par l'étude phénotypique des caractères morpho-macroscopiques, culturels et microscopiques, l'élaboration de son profil enzymatique et par quelques tests biochimiques. Les résultats de ces essais ont permis de supposer son appartenance au genre *Streptomyces*. Les essais d'extraction du pigment produit ont été réalisés par précipitation acide avec de l'HCl et par des solvants en l'occurrence ; le méthanol et le chloroforme. Des tests de caractérisation du pigment, notamment, son spectre majeur d'absorbance noté à 357nm, sa solubilité dans différents solvants organiques et son affinité pour l'eau, le méthanol et le chloroforme ainsi que son activité biologique vis-à-vis des bactéries appartenants aux genres *Pseudomonas* et *staphylococcus* ont été vérifiées. La purification du pigment a été réalisée par la chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant différents systèmes d'élutions dont le mélange méthanol-chloroforme (1 :1) (v/v) qui s'est avéré le plus performant. Les Rf de 0,27 ; 0,49 et 0,54 rapprochent la substance colorée de la famille des Actinorhodines. Les essais visant l'optimisation des conditions de culture pour maximiser la production de pigment par l'isolat étudié a été élaboré selon deux approches, à savoir la méthode traditionnelle One Factor At Time (OFAT) et la méthode statistique avec le plan d'expérience Plackett-Burman. La comparaison par ANOVA des moyennes des concentrations du pigment produit pour les deux méthodes a montré qu'il existe une différence significative suggérant un effet combiné des facteurs sur le rendement pigmentaire. Les conditions optimales de productions ont été déterminées à pH 7,2 pour la méthode OFAT avec une concentration maximale de 1713µg/ml et à l'essai Plackett-Burman design 7 (PBD7) avec une concentration maximale de 1933,33 µg/ml. Cependant, aucun effet significatif des facteurs étudiés séparément n'a été constaté.

Cette étude vise à produire un colorant organique comme alternative biologique aux colorants synthétiques généralement toxiques et polluants.

**Mots clés.** *Streptomyces*, Bio-pigment, Optimisation, Plackett-Burman design, Chromatographie sur couche mince (CCM).

## **Abstract**

In this study, an actinobacterial isolate was selected for its detected ability to produce a purplish-blue pigment on synthetic medium ISP2. The identification of this isolate was carried out by the phenotypic study of the morpho-macroscopic, cultural and microscopic characters, the development of its enzymatic profile and by some biochemical tests. The results of these tests made it possible to suppose that it belonged to the genus *Streptomyces*. The extraction tests of the pigment produced were carried out by acid precipitation with HCl and by solvents in this case; methanol and chloroform. Pigment characterization tests, in particular, its major absorbance spectrum noted at 357nm, its solubility in different organic solvents and its affinity for water, methanol and chloroform as well as its biological activity against bacteria belonging to the *Pseudomonas* and *Staphylococcus* genera were verified. The purification of the pigment was carried out by thin layer chromatography (TLC) using different elution systems including the methanol-chloroform mixture (1:1) (v/v) which proved to be the most efficient. The  $R_f$  of 0.27; 0.49 and 0.54 bring the colored substance closer to the Actinorhodin family. The tests aimed at optimizing the culture conditions to maximize the production of pigment by the isolate studied were developed according to two approaches, namely the traditional One Factor At Time (OFAT) method and the statistical method with the experimental Plackett-Burman design. The ANOVA comparison of the average concentrations of the pigment produced for the two methods showed that there is a significant difference suggesting a combined effect of the factors on the pigment yield. The optimal production conditions were determined at pH 7.2 for the OFAT method with a maximum concentration of 1713  $\mu\text{g/ml}$  and for the Plackett-Burman design 7 (PBD7) test with a maximum concentration of 1933.33  $\mu\text{g/ml}$ . However, no significant effect of the studied factors was separately found.

This study aims to produce an organic pigment as a biological alternative to synthetic pigments that are generally toxic and polluting.

**Keywords.** *Streptomyces*, Bio-pigment, Optimization, Plackett-Burman design, Thin-layer chromatography (TLC).

## ملخص

في هذه الدراسة ، تم اختيار عزلة *Actinobactérie* لقدرتها المكتشفة على إنتاج ملون أزرق أرجواني على وسط صناعي ISP2 . تم التعرف على هذه العزلة من خلال دراسة النمط الظاهري للصفات المورفو- الماكروسكوبية والميكروسكوبية ، و تطوير الانظمة الأنزيمية الخاصة بها وكذلك بواسطة بعض الاختبارات البيوكيميائية. جعلت نتائج هذه الاختبارات من الممكن افتراض انها تنتمي إلى جنس *Streptomyces*. تم اجراء اختبارات استخلاص الملون الناتج عن طريق الترسيب الحمضي مع حمض الهيدروكلوريك والمذيبات في هذه الحالة الميثانول والكلوروفورم. اختبارات خصائص الملون ، ولا سيما طيف الامتصاص الرئيسي الذي لوحظ عند 537 نانومتر ، وقد تم التحقق من قابلية الذوبان في المذيبات العضوية المختلفة خاصة مع الماء والميثانول والكلوروفورم بالإضافة إلى نشاطه البيولوجي ضد البكتيريا التي تنتمي الى اجناس *Pseudomonas* و *Staphylococcus* تم التحقق منها. تم فصل و تنقية الملون عن طريق كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام أنظمة شطف مختلفة ، بما في ذلك خليط الميثانول والكلوروفورم (1 : 1) (حجم / حجم) و الذي اثبت أنه الأكثر كفاءة . سمحت قيم RF التي تساوي 0.27 ؛ 0.49 و 0.54 من تقريب المادة الملونة من عائلة الأكتينورودين. هدفت الاختبارات إلى تحسين ظروف الاستزراع لزيادة إنتاج الملون بالعزلة المدروسة، وفقاً لمنهجين ، وهما طريقة عامل واحد في الوقت التقليدية (OFAT) والطريقة الإحصائية مع التصميم التجريبي بلاكيت-بورمان. أظهرت المقارنة بواسطة ANOVA لمتوسط تركيزات الملون المنتج للطريقتين أن هناك فرقاً معنوياً يشير إلى تأثير مشترك للعوامل على مردود الملون. تم تحديد ظروف الإنتاج المثلى عند درجة الحموضة 7.2 لطريقة OFAT بتركيز أقصى 1713 ميكروغرام / مل وعند PBD7 تصميم بلاكيت بورمان 7 بتركيز أقصى 1933.33 ميكروغرام / مل. ومع ذلك ، لم يتم العثور عن أي آثار معنوية للعوامل التي تمت دراستها بشكل منفصل . تهدف هذه الدراسة إلى إنتاج ملون عضوي كبديل بيولوجي للملونات الاصطناعية السامة والملوثة بشكل عام.

**الكلمات المفتاحية.** *Streptomyces* ، ملون ، تحسين ، بلاكيت-بورمان ، كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة.

Nom et prénom: <b>BOULTIF Ikhlas</b>	Le : <b>22/06/2022</b>
Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Filière : Sciences biologiques Spécialité : Bioindustrie, Analyse et Contrôle	
<b>Thème : Etude de la production d'un colorant naturel d'origine bactérienne</b>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Dans cette étude, un isolat actinobactérien a été sélectionné pour son aptitude détectée à produire un pigment bleu violacé sur milieu synthétique ISP2. L'identification de cet isolat a été effectuée par l'étude phénotypique des caractères morpho-macroscopiques, culturels et microscopiques, l'élaboration de son profil enzymatique et par quelques tests biochimiques. Les résultats de ces essais ont permis de supposer son appartenance au genre <i>Streptomyces</i>. Les essais d'extraction du pigment produit ont été réalisés par précipitation acide avec de l'HCl et par des solvants en l'occurrence ; le méthanol et le chloroforme. Des tests de caractérisation du pigment, notamment, son spectre majeur d'absorbance noté à 357nm, sa solubilité dans différents solvants organiques et son affinité pour l'eau, le méthanol et le chloroforme ainsi que son activité biologique vis-à-vis des bactéries appartenants aux genres <i>Pseudomonas</i> et <i>staphylococcus</i> ont été vérifiées. La purification du pigment a été réalisée par la chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant différents systèmes d'élutions dont le mélange méthanol-chloroforme (1 :1) (v/v) qui s'est avéré le plus performant. Les Rf de 0,27 ; 0,49 et 0,54 rapprochent la substance colorée de la famille des Actinorhodines. Les essais visant l'optimisation des conditions de culture pour maximiser la production de pigment par l'isolat étudié a été élaboré selon deux approches, à savoir la méthode traditionnelle One Factor At Time (OFAT) et la méthode statistique avec le plan d'expérience Plackett-Burman. La comparaison par ANOVA des moyennes des concentrations du pigment produit pour les deux méthodes a montré qu'il existe une différence significative suggérant un effet combiné des facteurs sur le rendement pigmentaire. Les conditions optimales de productions ont été déterminées à pH 7,2 pour la méthode OFAT avec une concentration maximale de 1713µg/ml et à l'essai Plackett-Burman design 7 (PBD7) avec une concentration maximale de 1933,33 µg/ml. Cependant, aucun effet significatif des facteurs étudiés séparément n'a été constaté. Cette étude vise à produire un colorant organique comme alternative biologique aux colorants synthétiques généralement toxiques et polluants.</p>	
<p><b>Mots clés.</b> <i>Streptomyces</i>, Bio-pigment, Optimisation, Plackett-Burman design, Chromatographie sur couche mince (CCM).</p>	
<p><b>Laboratoire de recherche :</b> Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).</p>	
<p><b>Jury d'évaluation</b></p> <p><b>Encadreur :</b> Pr. KACEMCHAOUCHE Noredine Pr. Université frères Mentouri Constantine 1.</p> <p><b>Examinatrice 1 :</b> Dr. CHERFIA Radia MCB. Université frères Mentouri Constantine 1.</p> <p><b>Examinatrice 2 :</b> Dr. HARZALLAH Besma MCB. Université frères Mentouri Constantine 1.</p> <p><b>Tutrice :</b> Dr. ALLOUN Wiem Doctorante au LaMyBAM Université frères Mentouri Constantine 1.</p>	