



جامعة البويرة

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



جامعة البويرة

Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2024

## MEMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

**Domaine :** SNV **Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Microbiologie Appliquée

**Présenté par :**

**DJOUADI Soulaf & BECHEKER Roudaina**

**Thème**

**Caractérisation des souches isolées à partir de graines de  
*Moringa oleifera* et de *Pinus halpensis***

**Soutenu le : 27 / 06 / 2024**

**Devant jury composé de :**

| <b>Nom et Prénom</b> | <b>Grade</b> | <b>Université</b> | <b>Jury</b>  |
|----------------------|--------------|-------------------|--------------|
| Dr IDER Djamila      | MCB          | Univ. de Bouira   | Présidente   |
| Dr BACHIRI Taous     | MCB          | Univ. de Bouira   | Promotrice   |
| Dr MEDBOUA Chafiaa   | MCB          | Univ. de Bouira   | Examinatrice |

**Année universitaire : 2023 / 2024**



## **Remerciements**

*Au terme de ce parcours académique, c'est avec une immense gratitude que nous désirons rendre hommage à tous ceux qui nous ont accompagnés et soutenues dans la réalisation de ce mémoire. Nous tenons tout d'abord à exprimer notre gratitude envers ALLAH pour nous avoir guidées et soutenues tout au long de notre cheminement.*

*Un merci vibrant est dédié à notre chère promotrice Dr BACHIRI Taous, pour son accompagnement exemplaire, les précieux conseils, et le suivi très rigoureux durant toute les étapes de réalisation de notre mémoire de fin d'étude*

*Nos sincères remerciements s'adressent également au Dr IDER Djamila pour l'honneur de sa présidence au sein du jury pendant notre soutenance.*

*Nous manifestons notre profonde gratitude au Dr MEDBOUA Chafiaa pour sa bienveillance à faire partie de jury et par l'enrichissement apporté par son expertise à l'évaluation de notre mémoire.*

*Nous ne saurions conclure sans exprimer notre reconnaissance aux Ingénieurs des laboratoires de notre faculté pour leur soutien technique indispensable et leur précieuse expertisent qui nous ont permis de réaliser les expérimentations et analyses requises pour ce mémoire.*

*Enfin, merci du fond du cœur à chacun d'entre vous ayant partagé cette aventure académique, qui restera une expérience significative de notre vie. Avec toute notre gratitude.*



## **Dédicace**

***Je dédie ce travail :***

***A mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien constant et leurs sacrifices, qui m'ont façonnée et encouragée à réaliser mes rêves.***

***A Imane, ma soeur, compagne de chaque instant, qui a su avec amour et patience m'écouter et me soutenir. Ta présence à mes côtés ont été des sources inépuisables d'inspiration et de courage.***

***Et au petit Rayane, étoile de notre famille, dont les éclats de rire et les moments de joie ont illuminé les jours les plus sombres de cette aventure.***

***A ma famille, pour leur réconfort constant et leur foi inébranlable en mon potentiel.***

***A mon binome soulaf, en ces mots, je tente de capturer l'essence de notre voyage commun, un parcours semé d'apprentissages, de défis et d'innombrables succès.***

***Ensemble, nous avons traversé les épreuves, célébré nos victoires et appris l'un de l'autre avec une sincérité et une honnêteté qui définissent les véritables partenariats.***

***A mes amis, pour leur encouragement, leur compagnie et les rires qui ont embelli mes journées d'étude.***

***Et surtout Amel se démarque de manière spéciale, ton amitié est un cadeau sans prix.***

***Aux enseignants qui ont joué un rôle pivotant dans ma formation académique et professionnelle, en particulier ma chère enseignante Fadila, pour son inspiration, sa guidance et son dévouement remarquable.***

***Ce document est la cartographie de mon cheminement, où chaque point représente une personne, un rire, une larme, un succès. Cette réussite est autant la vôtre que la mienne. Vous avez tous laissé une empreinte indélébile sur mon parcours, et avec une profonde gratitude que je partage ce succès avec chacun d'entre vous***

**Roudaina**



## ***Dédicace***

***Avec toute l'affection et la gratitude qui emplissent mon cœur,  
je dédie ce travail :***

***À ma chère maman, source inépuisable de soutien et d'amour,  
pour son sacrifice et sa foi indéfectible en moi. Que chaque page  
de ce mémoire soit le reflet de ta lumière.***

***À la mémoire de mon père et de ma tante Wardia avec l'espoir que  
vous reposez en paix dans les bras de l'au-delà.***

***À mes soeurs, Kamilia, Wiam et Samra pour vos sourires qui  
éclairent mes jours et vos encouragements qui fortifient ma  
volonté. Votre amour fraternel est mon ancrage et ma  
motivation.***

***À mes amis, véritables trésors de ma vie, pour vos voix  
rassurantes et vos gestes tendres aux moments où en j'avais le  
plus besoin. Votre amitié est mon refuge et ma joie.***

***À mon binôme Roudaina, compagne de cette aventure  
académique, pour les moments partagés, les défis relevés et les  
succès célébrés ensemble. Cette réussite est aussi la tienne.***

***À toute la promo de 2024, pour l'esprit de camaraderie, l'entraide  
et les souvenirs indélébiles que nous avons créés. Ensemble, nous  
avons tissé une toile d'expériences qui restera gravée dans ma  
mémoire.***

***Ce mémoire n'est pas seulement le fruit de mon travail, mais  
également le témoignage de ces liens indissolubles qui m'ont  
soutenu et enrichi durant ce voyage. Chacun de vous a été une  
lumière sur mon chemin, et ce succès vous appartient autant qu'à  
moi.***

***Soulaf***

# Tables des matières

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction** ..... 1

**Revue de la littérature**

I-*Moringa oleifera*..... 3

1-Généralités sur *Moringa oleifera* ..... 3

2-Ecologie et distribution géographique du *Moringa oleifera* ..... 3

3-classification de *Moringa oleifera* ..... 4

4-La description botanique de *Moringa oleifera*..... 5

• L'arbre ..... 5

• Les fleurs ..... 5

• Les grains ..... 6

• Les racines ..... 6

• Les feuilles..... 7

5-La valeur nutritionnelle des graines de *Moringa oleifera* ..... 7

6-La teneur en acides aminés des graines de *Moringa oleifera*..... 8

|  |    |
|--|----|
| 7- Bienfaits et utilisation de <i>Moringa oleifera</i> ..... | 8  |
| II- <i>Pinus halepensis</i> .....                            | 9  |
| 1- Généralités sur <i>Pinus halepensis</i> .....             | 9  |
| 2- Répartition géographique de <i>Pinus halepensis</i> ..... | 10 |
| 3- La classification de <i>Pinus halepensis</i> .....        | 10 |
| 4- La description botanique de <i>Pinus halepensis</i> ..... | 10 |
| • l'arbre .....  | 11 |
| • L'écorce.....  | 11 |
| • les feuilles et les aiguilles .....                        | 12 |
| • les grains .....   | 12 |
| • le cône.....   | 13 |
| 5- La composition chimique des graines de pin d'Alep .....   | 13 |
| 6- Les bienfaits de <i>Pinus halepensis</i> .....            | 14 |
| III- Le microbiote des plantes.....                          | 15 |
| IV- Les bactéries d'intérêt industrielles enzymes .....      | 16 |
| V- les enzymes .....   | 17 |
| 1- Généralités et origine des enzymes industrielles .....    | 17 |
| 2- les enzymes bactériennes.....                             | 18 |
| • Protéase.....  | 18 |
| • Amylase.....   | 19 |

|                        |    |
|------------------------|----|
| • Xylanase .....       | 19 |
| • Cellulase .....      | 20 |
| • Autres enzymes ..... | 21 |

## **Matériels et méthodes**

|  |    |
|--|----|
| I- Objectif de l'étude.....  | 23 |
| II- Etude microbiologique .....  | 23 |
| 1-Origin de souches bactériennes .....                                   | 23 |
| 2-Revivification des souches bactériennes .....                          | 24 |
| III- Extraction des protéines extracellulaires et intracellulaires ..... | 25 |
| IV- Dosage des extraits protéiques .....                                 | 26 |
| V- Mise en évidence de l'activité enzymatique .....                      | 27 |
| a. La recherche de l'activité protéolytique.....                         | 27 |
| b. La recherche de l'activité amylolytique.....                          | 27 |
| c. La recherche de l'activité cellulolytique .....                       | 28 |
| d. La recherche de l'activité pectinolytique .....                       | 28 |
| VI- Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....                  | 29 |

## **Résultats**

|  |    |
|--|----|
| 1. Résultats de souches bactériennes.....                      | 31 |
| 2. Résultats de la concentration des extraits protéiques ..... | 33 |
| 3. Résultats de l'activité enzymatique.....                    | 34 |
| 4. Résultats de l'activité antibactérienne .....               | 37 |

**Discussion** .....38

**Conclusion** .....43

**Références bibliographiques**

**Annexes**

**Résumés**

**Liste des abréviations**

**BN** : Bouillon nutritif.

**BSA** : Albumine sérum bovin.

**CMC** : Carboxyméthylcellulose

**ED** : Eau distillée.

**EMB** : Eosine bleu de Méthylène

**M** : Unité Molaire.

**MO** : Micro-organismes.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**ONG** : Organisation non gouvernementales.

**Liste des figures**

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Arbre de <i>Moringa oleifera</i> .....  | 5  |
| Figure 2 : Fleurs de <i>Moringa oleifera</i> .....   | 5  |
| Figure 3 : Graines de <i>Moringa oleifera</i> .....  | 6  |
| Figure 4 : Racines de <i>Moringa oleifera</i> .....  | 6  |
| Figure 05 : Feuilles de <i>Moringa oleifera</i> .....  | 7  |
| Figure 06 : Répartition de <i>Pinus halepensis</i> .....   | 10 |
| Figure 07 : Arbre de <i>Pinus halepensis</i> .....   | 11 |
| Figure 08 : Ecorce d'un pin d'Alep .....   | 11 |
| Figure 09 : Aiguilles de Pin d'Alep .....  | 12 |
| Figure 10 : Graines de <i>Pinus halepensis</i> .....   | 12 |
| Figure 11 : Cônes de Pin d'Alep.....   | 13 |
| Figure 12 : Variation de la composition de microbiote en fonction de l'espèce de plante et des techniques de culture .....   | 15 |
| Figure 13 : Schéma récapitulatif des étapes de la revivification des souches bactériennes Isolées à partir de deux plantes.....  | 24 |
| Figure 14 : Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction des protéines intracellulaires et extracellulaires des souches isolées à partir des graines des deux plantes ..... | 26 |
| Figure 15 : Schéma globales de dosage des extraits protéiques.....   | 27 |
| Figure 16 : Schéma récapitulatif des étapes de la mise en évidence des activités enzymatiques .....  | 29 |
| Figure17 : Schéma récapitulatif des étapes de la mise en évidence de l'activité antibactérienne .....  | 30 |
| Figure 18 : Graphique récapitulatif de taux des souches revivifiées.....   | 33 |

## *Liste des figures*

|  |    |
|--|----|
| Figure 19 :Graphique de taux des concentrations protéiques des extraits intracellulaire .....  | 33 |
| Figure 20 :Graphique de taux des concentrations protéiques des extraits extracellulaire .....  | 34 |
| Figure 21 :Résultats de l'activité protéolytique .....   | 35 |
| Figure 22 : Résultats de l'activité cellulolytique .....   | 36 |
| Figure 23 : Histogramme comparative des profils enzymatiques des deux extraits protéiques .....  | 36 |
| Figure 24 : Résultats de l'activité antibactérienne vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> ( <b>A</b> )<br><i>Escherichia coli</i> ( <b>B</b> )..... | 38 |

**Liste des tableaux**

|  |    |
|--|----|
| Tableau I : Position systématique de <i>Moringa oleifera</i> .....   | 4  |
| Tableau II : Teneur en éléments minéraux dans les graines de <i>Moringa oleifera</i> .....   | 8  |
| Tableau III: Position taxonomique de <i>Pinus halepensis</i> Mill .....  | 10 |
| Tableau IV: Composition chimique des graines de <i>Pinus halepensis</i> .....  | 13 |
| Tableau V : Tableau récapitulatif de certains enzymes microbiens d'intérêts industriels.....   | 23 |
| Tableau VI : Origine des souches bactériennes isolées à partir des graines de <i>Moringa oleifera</i><br>.....   | 23 |
| Tableau VII : Origine des souches bactériennes isolées à partir des graines de <i>Pinus halepensis</i><br><i>Mill</i> .....  | 24 |
| Tableau VIII : Nombre de souches bactériennes déjà isolées et revivifiées .....  | 31 |
| Tableau IX :Apparition de chaque souche bactérienne .....  | 32 |
| Tableau X :Diamètres des zones d'inhibition.....   | 37 |
| Tableau XI :Diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents extraits extracellulaire et<br>intracellulaire vis-à-vis différentes souches bactériennes testées..... | 40 |

# *Introduction*

Dans les écosystèmes terrestres, les graines de plantes jouent un rôle pivotant non seulement en tant que moyens de reproduction des espèces végétales, mais aussi comme matrices biologiques abritant des communautés microbiennes diversifiées. Parmi les plantes d'intérêt significatif pour leurs propriétés médicinales et phytochimiques, *Moringa oleifera*, connue sous le nom d'arbre de vie, et *Pinus halepensis*, le pin d'Alep, se distinguent comme des sources prometteuses de souches microbiennes aux potentialités biotechnologiques remarquables. (Mutar, 2021).

La caractérisation phénotypique et génétique des souches bactériennes isolées à partir de ces graines permet de comprendre non seulement leur rôle dans l'écologie de la graine, mais aussi les possibilités d'exploiter ces organismes pour leur activité enzymatique. L'utilisation des protéines extraites à partir de souches isolées de graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis* représente un intérêt majeur dans le domaine de la biotechnologie et de la médecine. (Gagnon, 2023).

Le présent travail décrit les méthodes employées pour caractériser les souches endophytes des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis*. En dévoilant les secrets microbiens cachés au sein des graines de ces espèces végétales, notre étude aspire à enrichir la bibliothèque des ressources enzymatiques et antimicrobienne et à promouvoir une meilleure appréciation de ces bioressources naturelles qui restent largement sous-explorées.

Dans ce contexte nous avons orienté notre étude sur la caractérisation des souches isolées à partir des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis* en suivant la démarche expérimentale suivante :

- Contribution à la caractérisation des souches isolées à partir des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis*.
- Extraction des protéines à partir des souches bactériennes selon leurs localisations cellulaires.
- Quantification et détermination de la concentration des extraits protéiques intracellulaires et extracellulaires.
- Mettre en évidence de l'activité enzymatique de deux extraits intracellulaires et extracellulaires.
- Tester l'activité antibactérienne des deux extraits intracellulaires et extracellulaires

*Revue de la littérature*

## **I-Moringa oleifera :**

### **1-Généralités sur Moringa oleifera :**

*Moringa oleifera* (synonyme de *Moringa pterigosperma* Gearther). Est plus communément appelé *Moringa* à travers le monde (**Choi, 2015**). On le retrouve également sous diverses appellations :

Selon (**Agroconsult , 2016**), le nom scientifique est “*Moringa oleifera Lamark*” en 1795.

- Le nom initial :

En raison de sa résistance à la sécheresse, elle est connue en anglais sous les noms

« arbre Drumstick »; « arbre indien du West » ou « arbre indéfectible » (**Hêdji et al., 2014**).

- En arabe, le terme "Rawag" (**Yusoff, 2016**). est également appelé "Shagara Al Ruwag" (**Yongabi et al., 2012**).

IL s'agit d'un arbre offrant de nombreux avantages : médicinaux, nutritionnels et même industriels. Différents chercheurs ont mentionné l'importance de *Moringa Oleifera* dans l'alimentation humaine et animale, la pharmacologie et les produits cosmétiques, les médicaments, la protection des sols, les pesticides, la purification de l'eau, l'industrie et l'art paysager. (**Tamhane, 2023**).

### **2-Ecologie et distribution géographique du Moringa oleifera :**

*Moringa oleifera* est une plante originaire d'Inde. Elle pousse dans les zones tropicales et subtropicales. Courant en Afrique, est passé, en une décennie, du statut de plante inconnue à celui de nouvelle ressource alimentaire et économique pour les pays du Sud (**Atakpama et al., 2014**).

Cette dernière est très largement répandue à travers le monde (**Broin, 2005**). elle suscite plus d'intérêts auprès des organisations non gouvernementales (ONG) ; des scientifiques et même des entrepreneurs (**Olson et al., 2001**)

Cet Arbuste très résistant à la sécheresse son adaptation à la sécheresse (**Price, 2007**).

Se retrouve au niveau des zones très arides comme le Sahara mais il préfère les climats semi-tropicaux humides. Son introduction en Afrique de l'Est a eu lieu au début du 20<sup>ème</sup> siècle par le biais du commerce et des échanges maritimes durant cette période

**(Foidl et al., 2001).**

**3-Classification de *Moringa oleifera* :**

*Moringa oleifera* fait partie de la famille *Monogénérique* des arbustes et arbres des Moringaceae, qui compte environ 14 espèces, dont la plus célèbre et répandue est l'espèce *Moringa oleifera* **(Chukwuebuka et al., 2015)**. La systématique est représentée dans le tableau I .

**Tableau I :** Position systématique de *Moringa oleifera* **(Chukwuebuka et al.,2015)**.

| <b>Taxonomie</b> | <b>Description</b>      |
|------------------|-------------------------|
| Règne            | Plantae                 |
| Sous-règne       | Tracheobionta           |
| Division         | Magnoliophyta           |
| Classe           | Magnoliopsida           |
| Ordre            | Brassicales             |
| Famille          | Moringaceae             |
| Genre            | <i>Moringa</i>          |
| Espèce           | <i>Moringa oleifera</i> |

#### 4- La description botanique de *Moringa oleifera* :

- L'arbre de *Moringa oleifera* :

Est un arbuste de 12 mètres de hauteur ( figure 01) et son diamètre peut attendre jusqu'à 40 centimètres (Delpha, 2011).



**Figure 01** : Arbre de *Moringa oleifera* (Delpha, 2011)

- Les fleurs :

Les fleurs est de couleur blanc crème (figure 02) se composent de 5 sépales, 5 pétales inégaux, 5 étamines et 5 staminodes. L'ovaire a une seule loge et trois placentas pariétaux. (Roloff et al.,2009). Après de 8 à 12 mois, l'arbre commence à fleurir sur une base continue .tout au long de l'année. (Price, 2007).



**Figure 02** : Fleurs de *Moringa oleifera*. (Price, 2007).

- **Les graines :**

Les graines sont rondes, de couleur blanchâtre. Les trois ailes blanches de cette capote s'étendent de la base au sommet, avec une distance de 120 degrés entre elles (figure 03).

Entre 15 000 et 25 000 graines peuvent être produites par an par chaque arbre. La coque représente 25 % du poids total d'une graine, et une graine pèse en moyenne 0,3 g. (Fodil *et al.*, 2001).



**Figure 03 :** Graines de *Moringa oleifera* (Fodil *et al.*, 2001)

- **La racine :**

La racine est de couleur blanche, gonflée, tubéreuse (figure 04).avec une odeur piquante distinctive ; latérales plutôt peu développées. (Roloff *et al.*, 2009).



**Figure 04 :** Racines de *Moringa oleifera* (Roloff *et al.*, 2009)

- **Les feuilles :**

Le *Moringa* est un arbre, à feuilles caduques ces dernières sont bipennées ou plus couramment tripennées, jusqu'à 45 cm de long (figure 05), et sont alternes et disposées en spirale sur les rameaux (Roloff *et al.*,2009).



**Figure 05** : Feuilles de *Moringa oleifera* (Roloff *et al.*, 2009).

#### **5-La valeur nutritionnelle des graines de *Moringa oleifera* :**

Plusieurs recherches ont mis en évidence la richesse nutritionnelle des gousses et des graines de *M. oleifera*. Pour 100 g de ces graines de *M. oleifera* nous pouvons trouver environ 9,98-51,80 g de protéines brutes, 17,26-20,00 g de fibres brutes, 3,36-18,00 g de glucides, 38,67-43,60 g de lipides et 3,60-5,00 g de cendres. Les gousses renferment une grande quantité de fibres alimentaires, une faible teneur en matières grasses et une quantité raisonnable d'acides gras insaturés et essentiels, notamment l'acide oléique (Falowo *et al.*, 2018).

La teneur des éléments minéraux dans les graines de *Moringa oleifera* est montrée dans le tableau II.

**Tableau II** : Teneur en éléments minéraux dans les graines de *Moringa oleifera*. (Falowo et al., 2018).

| Éléments minéraux | Teneur en (mg/kg)       | Éléments minéraux | Teneur en (mg/kg)    |
|-------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| <b>K</b>          | <b>2,3557.71 ± 1.87</b> | <b>Cd</b>         | <b>0.018 ± 0.002</b> |
| <b>Cu</b>         | <b>3.29 ± 0.21</b>      | <b>Ca</b>         | <b>121.14 ± 0.87</b> |
| <b>Na</b>         | <b>1,074.09 ± 1.56</b>  | <b>Pb</b>         | <b>0.015 ± 0.001</b> |
| <b>As</b>         | <b>0.01 ± 0.001</b>     | <b>Fe</b>         | <b>36.20 ± 0.79</b>  |
| <b>Mg</b>         | <b>972.06 ± 1.23</b>    | <b>Sn</b>         | <b>0.07 ± 0.001</b>  |

#### 6-La teneur en acides aminés des graines de *Moringa oleifera* :

La teneur en acides aminés des graines de *Moringa oleifera* est de 0,824 g/100 g, ce qui représente 25,65% de la teneur totale en acides aminés. Les graines de *M. oleifera* contiennent sept acides aminés essentiels : la thréonine, la tyrosine, la valine, la méthionine, l'isoleucine, la leucine et la phénylalanine. (Liang et al., 2019).

#### 7-Les propriétés nutritionnelles et bienfaits de *Moringa oleifera* :

Presque toutes les parties de l'arbre ont été utilisées dans le cadre de la médecine traditionnelle. Les fleurs, les feuilles et les racines sont utilisées pour traiter l'ascite, les rhumatismes et les morsures venimeuses, ainsi que comme stimulants cardiaques et circulatoires dans les remèdes populaires (Olagbemide et al., 2014). L'huile est appliquée en externe pour les maladies de la peau (Foidl et al., 2001).

Les racines du jeune arbre ainsi que l'écorce des racines sont rubéifiantes et vésicantes (Anwar et al., 2003).

Le jus de feuilles est utilisé contre le hoquet (émétique à fortes doses) les feuilles cuites sont données contre la grippe. L'écorce de racine est utilisée comme antivirale, anti-inflammatoire et analgésique. L'écorce de la tige et les fleurs sont hypoglycémiques. L'infusion de graines est anti-inflammatoire, antispasmodique et diurétique, également prescrit dans les maladies vénériennes (**Mishra et al., 2011**).

De plus *Moringa* soutient un système cardiovasculaire sain, favorise une glycémie normale, neutralise les radicaux libres responsables du cancer, fournit un excellent soutien aux mécanismes anti-inflammatoires du corps, enrichit le sang anémique et soutient le système immunitaire ; Il améliore également la vue, la vigilance mentale et la solidité des os. Il présente des avantages potentiels en cas de malnutrition, de faiblesse générale, de mères allaitantes, de ménopause, de dépression et d'ostéoporose (**Mahmood et al., 2010**).

## **II- *Pinus halepensis* :**

### **1- Généralités sur *Pinus halepensis* :**

Le pin d'Alep, également connu sous le nom de halepensis, est un conifère appartenant à la famille des Pinacées et a été décrit par le botaniste écossais Philip Miller en 1768.

IL s'agit d'un arbre qui se développe spontanément autour du bassin méditerranéen, à l'exception d'Égypte. Cette espèce a été connue localement sous le nom vernaculaire de 'Senouber'. (**Quezel , 2000**).

### **2- Répartition géographique de l'espèce :**

Il semble être principalement largement présent en Afrique du Nord (figure 06) ; en particulier en Algérie et en Tunisie où il représente les massifs les plus importants. Ses forêts couvrent plus de 2,5 millions d'hectares. Cette espèce est extrêmement adaptable et peut survivre et se développe dans différents milieux (**Quezel , 2000**).

En effet il se développe pendant deux saisons (automne et printemps) (**Fotelli et al., 2019**). D'un point de vue bioclimatique, IL est présent dans les zones bioclimatiques méditerranéennes (au sens d'emberger) arides supérieures, semi-arides, sub-humides et humides. Néanmoins, il demeure principalement une caractéristique de l'étage semi-aride et de sa forme moyenne (**Trstenjak et al., 2020**).



**Figure 06 :** Répartition géographique de *pinus halepensis* (Cheikh, 2006).

### 3-Taxonomie de *Pinus halepensis* :

*Pinus halepensis* fait partie de la famille des pinaceae, il appartient au genre Pinus qui comprend nombreuses autres espèces de pins.

La taxonomie est représentée dans le tableau III.

**Tableau III :** Position taxonomique de *Pinus halepensis* Mill. (Quezel, 2000).

| Taxonomie          | Description                  |
|--------------------|------------------------------|
| Règne              | Plante                       |
| Embranchement      | Spermaphytes                 |
| Sous-embranchement | Gymnospermes                 |
| Classe             | Pinobsida                    |
| Ordre              | Pinale                       |
| Famille            | Pinaceae                     |
| Sous famille       | Pinoidée                     |
| Genre              | <i>Pinus</i>                 |
| Espèce             | <i>Pinus halepensis</i> Mill |

#### 4-Description botaniques du *pin d'Alep* :

- **L'arbre :**

L'arbre de *Pinus halepensis* Mill peut atteindre une hauteur de 20 à 30 mètres. ( Figure 07). Il fleurit au printemps et donne des fruits en été dès l'âge de 10 à 12 ans. Cependant, les graines produites ne peuvent germer que jusqu'à l'âge de 18 à 20 ans. (Bernard, 2013).



**Figure 07** : Arbre de *Pinus halepensis* Mill . (Bernard, 2013).

- **L'écorce :**

La texture de l'écorce est lisse et grise au départ lisse et grise au début (figure 08), puis épaisse et crevassée, se transformant en un brun rougeâtre au fil des années. Puis est très riche en tannin. (Bernard, 2013).



**Figure 08** : Ecorce d'un pin d'Alep (Bernard, 2013).

- **Les feuilles ou les aiguilles :**

Taille de 6 à 10 cm de long avec une largeur moins de 1 mm, (figure 09) sont fines, groupées par 2 en pinceaux à l'extrémité des rameaux ; vert jaunâtres (**Bernard, 2013**).



**Figure 09 :** Aiguilles du pin d'Alep. (**Ladjal, 2012**).

- **Les graines :**

Les graines sont de 5 à 7 mm de long, à aile longue et brun gris sur une face et gris moucheté de noir sur l'autre face (figure 10). La graine comestible de l'arbre de *pin d'Alep*, dite «Zgougou », est aussi utilisée pour la fabrication d'une crème très populaire en Tunisie. (**Bernard, 2013**).



**Figure 10 :** Graines du pin d'Alep. (**Bouaaza, 2013**).

- **Le cône :**

A une longueur de 8 à 12 cm et une largeur de 3,5 à 4,5 cm (figure 11). Le changement de couleur des cônes de vert à rouge violacée est un indicateur de leur maturité. À l'âge adulte, ils deviennent brun rougeâtre à jaunâtre. (Fekih *et al.*, 2014).



**Figure 11 :** Cônes de pin d'Alep immature. (Ladjal, 2012).

### 5-La composition chimique des graines de pin d'alep :

Les matières grasses, les glucides et les protéines jouent un rôle crucial dans la croissance, le développement et la reproduction d'une espèce. Les graines de pin d'Alep ont fait l'objet de nombreuses recherches. La composition chimique des graines de *Pinus halepensis* Mill d'Alep est résumé dans le tableau IV.

**Tableau IV :** Composition chimique des graines du *Pinus halepensis* Mill

| Composition                  | Algérie (Kadri <i>et al</i> ., 2015) | Tunisie (Cheikh <i>et al.</i> , 2006) | Jordanie (Tukan <i>et al</i> ., 2011) |
|------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| matière sèche(%)             | 92,13 ± 0,042                        | 94,8 ± 0,1                            | 95,5 ± 0,6                            |
| lipides (g/100g)             | 36,73 ± 1,420                        | 43,3 ± 0,5                            | 32,1 ± 1,5                            |
| protéines (g/100g)           | 26,62 ± 0,129                        | 22,7 ± 0,5                            | 29,8 ± 1,8                            |
| hydrates de carbone (g/100g) | 13,83 ± 0,21                         | 25,7 ± 0,2                            | 13,9 ± 2,07                           |

Les minéraux représentent environ 4 % de la masse corporelle d'un individu et jouent un rôle crucial dans de multiples fonctions : Les minéraux sont essentiels pour minéraliser, réguler l'équilibre en eau, les systèmes enzymatiques et hormonaux, les systèmes musculaires, nerveux et immunitaires. Ils ont également un rôle crucial dans la croissance, la photosynthèse, ainsi que dans la résistance aux maladies (**Cheikh et al., 2006**)

#### **6-Les bienfaits et usage traditionnel de pin d'Alep :**

Les rameaux feuillés de *Pinus halepensis* renferment une huile essentielle riche en pinène, puissant antiseptique utilisé en cas d'affections respiratoires, dépuratifs en décoction, balsamique et amère (appréciés alors en cas d'inflammation intestinale (**Kızılarslan, 2013**).

L'huile de pin est utilisée en aromathérapie dans les massages de la peau ; dans le soulagement de problèmes gastro-intestinaux comme les ulcères de l'estomac. Cette huile se comporte également comme un inhibiteur de l'appétit, un stimulant de l'absorption des protéines, ainsi comme un produit naturel dans le traitement des maladies cardio-vasculaires parce qu'elle contient l'acide pinolénique ; qui régule le taux des lipides totaux du sang, en réduisant la consolidation des plaquettes, ce qui aboutit à une diminution de la pression sanguine. (**Boullard et al.,2001**).

Elle renferme également des antioxydants qui apportent des avantages à l'organisme dans son ensemble (**Kadri., 2013**).

Dans le traitement de la leishmaniose, l'huile essentielle est employée pour traiter différentes espèces de parasites protozoaires du genre leishmania (**Dahham et al., 2015**).

Dans le but de soulager l'asthme, la bronchite et la toux, on utilise la décoction des bourgeons, de l'écorce et des cônes matures ou jeunes, ainsi que la poudre des résines et des cônes verts (**Kızılarslan, 2013**).

D'après la tradition kabyle, la prise de trois cuillères à soupe de résine pilée et tamisée, associée à un pot de miel pur de 500g, constitue une solution complète pour traiter la bronchite (**Hammiche, 2015**).

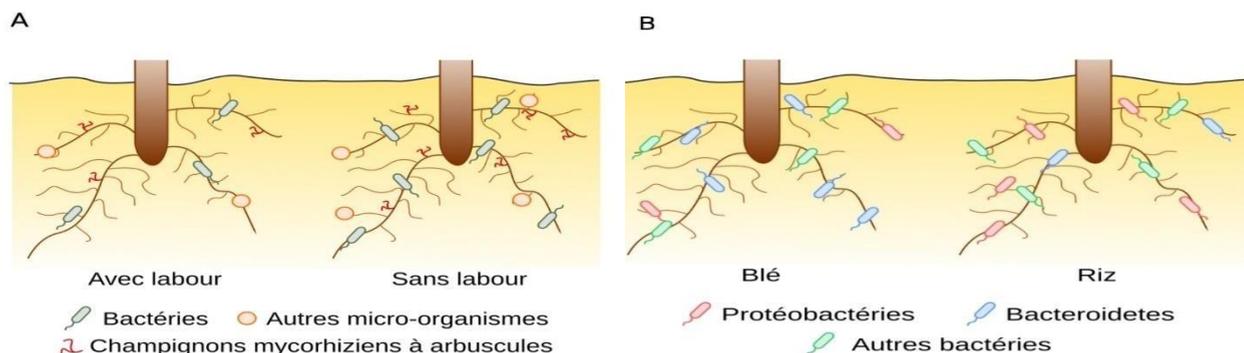
### III-Le microbiote des plantes :

Les plantes se développent dans un milieu où il y a une abondance de micro-organismes provenant de diverses sources (comme le sol, l'air, l'eau, les insectes) et qui peuvent entrer en contact avec les tissus végétaux (Delgado *et al.*, 2018).

Ainsi, chaque plante interagit avec un environnement comprenant une grande variété de micro-organismes regroupant les bactéries, les archées (Karimi *et al.*, 2018), les champignons) et les protistes (Geisen *et al.*, 2020).

La composition du microbiote des plantes diffère considérablement en fonction du génotype de la plante (de l'espèce végétale et de la variété cultivée), des caractéristiques de son environnement de croissance (type de sol, climat et autres facteurs environnementaux), ainsi que de la capacité génétique des micro-organismes environnants à interagir avec la plante (Větrovský *et al.*, 2020).

Par exemple, Le microbiote des grains de riz cultivé en Asie diffère de celui de blé cultivé en Afrique, comme le montrent les différences dans le nombre d'espèces ou leur répartition sur un arbre phylogénétique (figure 12). Plus précisément, dans le blé, les bactéries du phylum Bacteroidetes sont prédominantes par rapport aux Proteobacteria tandis que l'inverse est constaté dans le cas du riz. (Anne, 2022)



**Figure 12 :** Variation de la composition de microbiote en fonction de l'espèce de plante et des techniques de culture (Anne, 2022).

**A :** Effet d'un facteur environnemental (la pratique du labour) sur le microbiote bactérien et fongique racinaire.

**B :** Effet du génotype de la plante (riz ou blé) sur le microbiote bactérien racinaire.

Ainsi, la variété des micro-organismes présents dans le sol évoluera en fonction de la localisation géographique et des techniques agricoles, ce qui en fera un lieu unique pour la formation du microbiote de la plante. (Anne, 2022).

#### **IV- Les bactéries d'intérêt industriel :**

Les bactéries d'intérêt industriel présentent un avantage majeur en termes de coût opérationnel réduit pour de nombreuses applications industrielles. Leur utilisation peut contribuer à des processus de fabrication plus économiques et durables pour les raisons suivantes :

- Croissance rapide : Les bactéries ont des temps de génération courts, ce qui signifie qu'elles se reproduisent rapidement. Cela permet des cycles de production plus rapides et une utilisation plus efficace des ressources.
- Conditions de croissance simples : De nombreuses bactéries d'intérêt industriel peuvent se développer dans des conditions relativement simples et peu coûteuses. Elles peuvent souvent prospérer dans des milieux de culture simples et nécessiter des nutriments de base pour leur croissance (Nigamen, 2009).
- Facilité de manipulation génétique : Les bactéries peuvent être génétiquement modifiées pour améliorer leur rendement ou leur capacité à produire des composés spécifiques. Cette capacité de manipulation génétique peut être un atout pour la production à faible coût de divers produits.
- Production à grande échelle : Les bactéries peuvent être cultivées en grands volumes dans des bioréacteurs, ce qui permet une production à grande échelle de manière rentable.
- Capacité à utiliser une variété de substrats : Certaines bactéries sont capables de se nourrir d'une grande variété de substrats organiques, ce qui peut réduire les coûts liés à l'approvisionnement en matières premières.

- Stabilité à long terme : Les bactéries peuvent être stockées et conservées pendant de longues périodes sans perdre leur activité, ce qui peut réduire les coûts associés à la gestion des cultures microbiennes.

Dans l'ensemble, l'utilisation de bactéries d'intérêt industriel peut offrir des solutions rentables et efficaces pour divers processus de production, contribuant ainsi à des opérations industrielles plus durables et économiques. (Assam, 2023).

## **V- Les enzymes :**

### **V-1 Généralités et origine des enzymes industrielles :**

Les enzymes se caractérisent par leur grande masse moléculaire. Elles sont présentes dans les cellules de tous les êtres vivants, où elles jouent un rôle vital dans de nombreux processus métaboliques.(Granner, 2008).

Les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (Meunier, 2000) Elles sont spécifiques en ce qui concerne le type de réaction catalysée et d'un seul substrat ou d'un petit ensemble de substrats fortement apparentés (Granner, 2008).

En industrie, les enzymes sont privilégiées car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et d'améliorer les relations grâce à leur faible consommation d'énergie et de rapport coûts-efficacité des procédés. Également, les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental elles interviennent dans la biodégradabilité, et dans la formation de sous-produits compatibles avec l'environnement grâce à leur faible toxicité. (Barnabe, 2003).

En fonction de leur mode d'action spécifique, les enzymes sont classées en différentes classes. La classe des hydrolases est la plus exploitée, utilisée dans le domaine industriel. parmi ces derniers les protéases représente le groupe le plus connus, le plus vendu sur le marché mondial des enzymes et le plus employé dans le domaine de la biotechnologie industrielle (Poole et al., 2009).

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne. L'extraction à partir des plantes et des animaux sont cependant limités par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production d'enzymes à partir de microorganismes est privilégiée par les producteurs, puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants (**Benkhedda, 2022**).

Différents processus commerciaux utilisent déjà de nombreuses enzymes provenant de sources microbiennes. Des micro-organismes, tels que des bactéries, des champignons et des levures, ont été étudiés à l'échelle mondiale pour la bio-synthèse de préparations économiquement viables de diverses enzymes pour des applications commerciales. (**Pandey et al., 2000**).

## **VI-2 Les enzymes bactériennes :**

- **Protéase :**

Les systèmes bactériens produisent trois catégories de protéases : acides, neutres alcalines. Les protéases alcalines sont efficaces lorsque le pH est alcalin et se manifestent par un résidu de sérine sur leur site actif (**Gupta et al., 2002**).

Les protéases alcalines de sérine sont les plus utilisées. Car elles présentent une grande attractivité et sont adaptés à différentes applications, en présentant une activité et une stabilité élevées dans des conditions physiologiques extrêmes. (**Vijayalakshmi et al., 2011**).

Plusieurs bactéries peuvent être des sources principales de protéase ; mais la subtilase, produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres similaires, est la principale source de protéases bactériennes. (**Johnvesly et al., 2001**). Cette bactérie a démontré sa grande capacité à générer des enzymes qui présente des caractéristiques particulières telles que sa forte affinité pour les alcaloïdes, affinité modérés pour les halophiles, sa thermophile et sa capacité à être une enzyme protéase thermostable. Lorsqu'elles sont employées dans les détergents, les protéases alcalines présentent une grande stabilité dans leur activité enzymatique. (**Hadj et al., 2007**).

La production de protéase alcaline à partir de *Bacillus* et d'autres micro-organismes a connu une plus grande utilisation dans les domaines bio-industriels tels que les poudres à laver, la tannerie, l'industrie alimentaire, le traitement du cuir, les produits pharmaceutiques, ainsi que pour les études de biologie moléculaire et de peptides. (**Pandey et al., 2000**).

- **Les amylases :**

Les amylases jouent un rôle crucial dans la conversion de l'amidon industriel (**Nigam et al., 1995**). Les enzymes amylolytiques comme l'alpha-amylase (EC3.2.1.1) sont des enzymes qui permettent l'hydrolyse des liaisons alpha-1, 4-glycosidiques présentes dans l'amidon afin de générer des produits tels que le glucose et le maltose. Il s'agit d'une enzyme métallo- calcium (**Sundarram et al.,2014**).

Les enzymes amylolytiques ont été synthétisées par divers micro-organismes. L'α-amylase est principalement produite par le genre *Bacillus*, même si diverses espèces de microorganismes peuvent la produire.

Les α-amylases sont synthétisées par *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus amyloliquefaciens*. (**Sivaramakrishnan et al., 2006**)

L'application de ces enzymes a été établie dans les industries de la liquéfaction de l'amidon, du papier, de l'alimentation, du sucre et des produits pharmaceutiques. Dans l'industrie alimentaire, ces enzymes sont impliquées dans la production de sirops de glucose, de sirops de maïs à haute teneur en fructose, de sirop de maltose, de réduction de la viscosité des sirops de sucre, de réduction de la turbidité pour produire Jus de fruits clarifiés pour une durée de conservation plus longue, une solubilisation et une saccharification de l'amidon dans l'industrie brassicole (**Pandey et al., 2000**).

L'industrie de la boulangerie utilise des amylases pour retarder le stabilisation du pain et d'autres produits, L'enzyme amylase est utilisée dans l'industrie textile pour le dimensionnement des fibres textiles et utilisée comme aide digestive dans l'industrie pharmaceutique (**Sivaramakrishnan et al., 2006**).

- **Xylanase :**

L'hémicellulose joue un rôle essentiel dans la composition des résidus et des plantes agricoles, ainsi que la cellulose, la lignine et la pectine (**Nigamini et al., 2009**).

Le xylan est le principal constituant de l'hémicellulose, composé de résidus de d-xylopyranosyle. Le xylan dans les matières végétales est hydrolysé par un mélange d'enzymes hydrolytiques tels que l'endo-β-1,4-xylanase et la B-D-xylosidase (**Polizeli et al., 2005**).

En raison de ses utilisations biotechnologiques pour la production de pentose, la clarification des fruits et du jus de fruits, l'amélioration de la digestion du rumen et la bioconversion des résidus agricoles lignocellulosiques en carburants et produits chimiques, la xylanase a connu une augmentation significative de son effet (**Nigameni et al., 2009**).

Différentes souches bactériennes comme *Bacillus spp.*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Rhodothermus marinus*, *Micrococcus spp.* et *Streptomyces roseiscleroticus*, sont identifiées lors de l'exploration de micro-organismes qui produisent des niveaux élevés d'activité xylanase à un pH alcalin et à une température élevée. Les xylanases de *Caldocellum saccharolyticum*, une bactérie anaérobie stricte thermophile, sont actifs à des pH de 5,5 et 6,0, ainsi qu'à une température de 70 °C (**Subramaniyan et al., 2000**).

- **Cellulases :**

La cellulose est la ressource naturelle la plus abondante à travers le monde pour la transformation en de nombreux produits dans le domaine de la bio-industrie à grande échelle. IL est nécessaire d'adopter une stratégie de saccharification efficace en utilisant des enzymes cellulolytiques pour une bioconversion efficace. L'enzyme cellulase est constituée de trois enzymes essentielles qui coopèrent de manière synergique en raison de la structure cristalline et amorphe de la cellulose. Grâce à leur synergie, ces enzymes transforment la cellulose en cellulobiose, glucose et oligosaccharides. (**Poonam, 2013**).

La première action de l'enzyme endoglucanase est d'attaquer les fibres de cellulose amorphe, en attaquant de manière aléatoire la chaîne de glucose-polymère, ce qui libère de petites fibres avec des extrémités libres et non réductrices; La chaîne expose ensuite les extrémités libres à l'activité de l'enzyme exoglucanase, ce qui entraîne la formation de la cellobiose. La  $\beta$ -glucosidase est le troisième élément de la cellulase, qui hydrolyse le cellobiose et génère le glucose en tant que résultat final de la saccharification de la cellulose. (**Kong, 2019**).

La cellulase est produite par plusieurs types de bactéries, tels que *Bacillus*, *Acidothermus*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, *Clostridium*; y compris les espèces *C.thermocellum* et *C.acetobutylium*, *Rhodothermus* et *R.marinus*, ainsi que par certaines bactéries aérobies telles que *Cytophaga*, *Cellumonas* et *Cellovibrio*, qui ont la capacité de décomposer la cellulose en culture pure (**Imran, 2016**).

- **Autres enzymes bactériennes :**

Différentes enzymes, en dehors de celles mentionnées précédemment, jouent un rôle essentiel dans la liste des micro-organismes. Les enzymes ont trouvé leur utilité dans les secteurs bio-industriels. Les lipases ont fait l'objet d'une vaste étude en raison de leurs caractéristiques et de leur utilisation dans divers secteurs industriels (**Snaiki et al., 2006**) L'importance des pectinases dans les secteurs des fruits et des jus a été établie (**Nelson, 2018**). Dans l'industrie pharmaceutique, certaines enzymes particulièrement nécessaires pour les kits de diagnostic et les tests analytiques (**Roman, 2020**).

Le tableau suivant représente certaines enzymes microbiennes d'importance industrielle.

**Tableau V** : Tableau récapitulatif de certaines enzymes microbiennes d'importance industriel.

| <b>Enzymes</b>                           | <b>Propriétés</b>  | <b>Microbes producteur</b>  | <b>Applications</b>  | <b>Références</b> |
|--|--|---|--|-------------------|
| Protéase<br>(activité protéolytique)     | Acide neutre ; alcalin ; thermophile ;<br>Actif en présence de composés inhibiteurs                                      | <i>Bacillus</i> ;<br><i>pseudomonas</i><br><i>Clostridium</i> ;<br><i>rhizopus</i> ;<br><i>Penicillium</i> ;<br><i>aspergille</i> | Lessives en poudre ; détergents ; tannerie ; industrie alimentaire ; traitement de cuir ; médicaments ; biologie moléculaire ; synthèse peptidique | (Nigamen, 2009)   |
| Kératinase<br>(Activité keratinolytique) | Protéolytique spécifique<br>activités pour insolubles des protéines fibreuses dans les fourrures, les plumes ; la laine. | <i>Actinomyces</i> ;<br><i>Bacillus</i>   | Industrie de amidon ; papier ; industrie alimentaire ; industrie textile   | (Nigamen, 2009)   |
| Amylase<br>(Activité amylolytique)       | Enzyme thermotolérantes ; thermostable ;<br>Alcalin ; résistant endo-dermofication                                       | <i>Bacillus sp</i> ;<br><i>Geobacill</i>  | Industrie de amidon ; papier ; industrie alimentaire ; industrie textile   | (Nigameni, 2009)  |
| Xylanases<br>(activités xylanasiqne)     | Extermophile ; alcalophile ;<br>Thermophile et<br>Thermostable   | <i>Humicola</i> ;<br><i>bacillus</i>  | Production de pentose ; clarification ; industrie pipterie   | (Nigameni, 2009)  |

***Matériels et méthodes***

**I -Objectif de l'étude :**

L'objectif principal de notre étude est basé sur la caractérisation des souches isolées à partir des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis*. Cette étude consiste à développer une Stratégie d'extraction des protéines selon leurs localisations cellulaires ; de quantifier leurs concentrations, de mettre en évidence quatre activités enzymatiques et de tester leurs potentiel antibactérien contre deux souches pathogènes *Staphylococcus aureus* et *E. coli*. Ce travail a été effectué durant la période allant de mars à mai dans le laboratoire de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Bouira.

**II - Etude microbiologique :**

**1-Origine des souches :**

27 souches ont été sélectionnés pour cette étude ; il s'agit de :

- 08 isolats sélectionnés pour les graines de *Moringa oleifera* qui proviennent de l'Egypte. Le tableau VI montre plus spécifiquement leurs origines.

**Tableau VI :** Origine de chaque souche bactérienne isolées à partir des graines de *Moringa oleifera* .

| <b>Souches bactériennes</b>   | <b>Origine</b>                            |
|---|---|
| 04 souches appartenant au genre<br><i>d'Enterobacter</i>                              | d'origine des graines                     |
| 02 souches de <i>Staphylococcus aureus</i><br>02 de <i>Staphylococcus epidermidis</i> | d'origine de poudre des graines dilipidés |

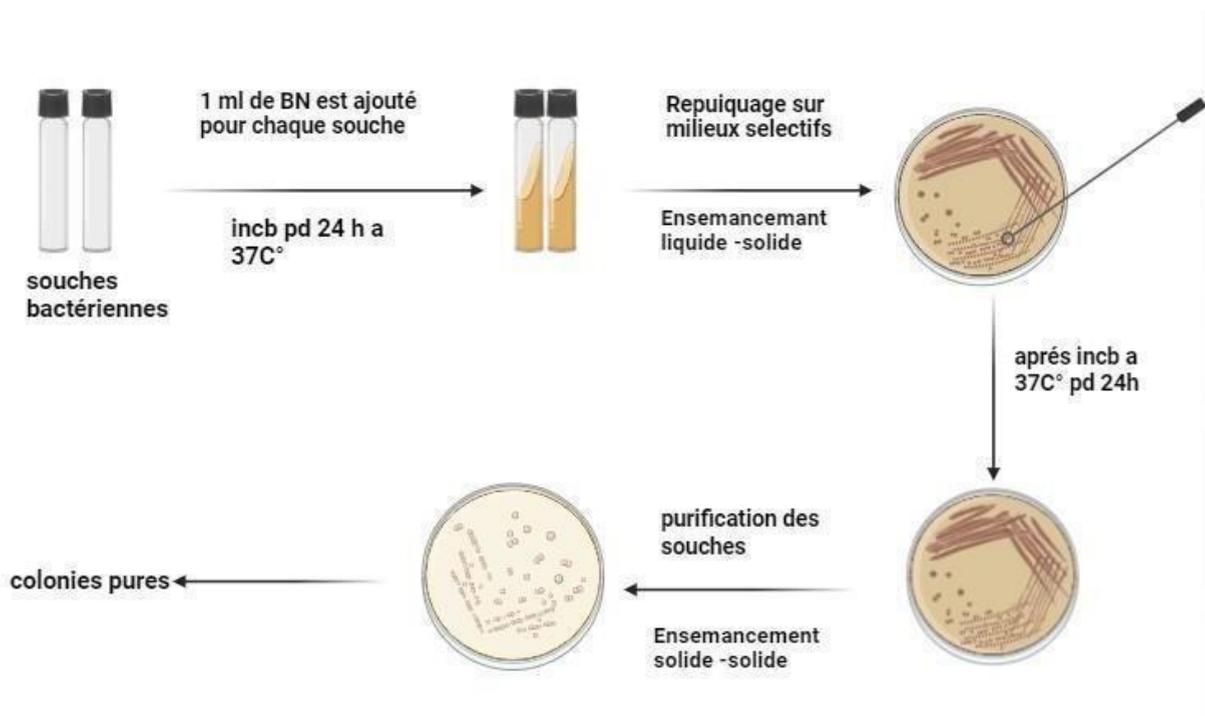
- 19 isolats sélectionnés pour les graines de *pinus halepensis*. dans le tableau VII.

**Tableau VII :** Origine de souches isolées à partir des graines de *Pinus halepensis*

| Souches bactériennes                       | Origines   |
|--|--|
| 09 souches d' <i>E. coli</i>               | Provenant à partir des graines isolées d'Erriche et Haizer |
| 04 souches de <i>staphylococcus aureus</i> | Provenant des localités de Zbarbar et L'akhdharia          |
| 06 souches de <i>klebseilla pneumoniae</i> | Provenant des localités de Tikejda et Bouaklane            |

**2-Revivification des souches bactériennes :**

Les isolats sélectionnés ont été revivifiés (figure 13), par l'ajout de 1 ml de bouillon nutritif pour chaque isolat les souches par la suite ont été incubé à 37 C° pendant 24 heures. Puis chaque souche a été repiquée sur un milieu sélectif.



**Figure 13 :** Schéma Récapitulatif des étapes de revivification des souches

### **III- Le protocole optimisé pour l'extraction des protéines bactériennes :**

#### **III-1 Les proteines extracellulaires :**

Selon le Protocole d'extraction des protéines extracellulaire développé par Hazim en 2021) :

Les souches sont été incubées à 37 C° pendant environ 18 à 24h dans 20 ml de bouillon nutritif cela aide à encourager la croissance des cellules bactériennes pour quelle atteignent une phase de croissance dense, souvent la phase logarithmique ou stationnaire de leur cycle de croissance. les cellules bactériennes ont été par la suite séparer des débris de milieu de culture par une centrifugation a une vitesse de 7000 x g pendant 20 minutes.

Après la centrifugation le surnageant, qui contient l'extrait protéique extracellulaire été récupérer.

#### **III-2 Les protéines intracellulaires :**

Selon le protocole développé par Saumaya Bhaduri en 1983 :

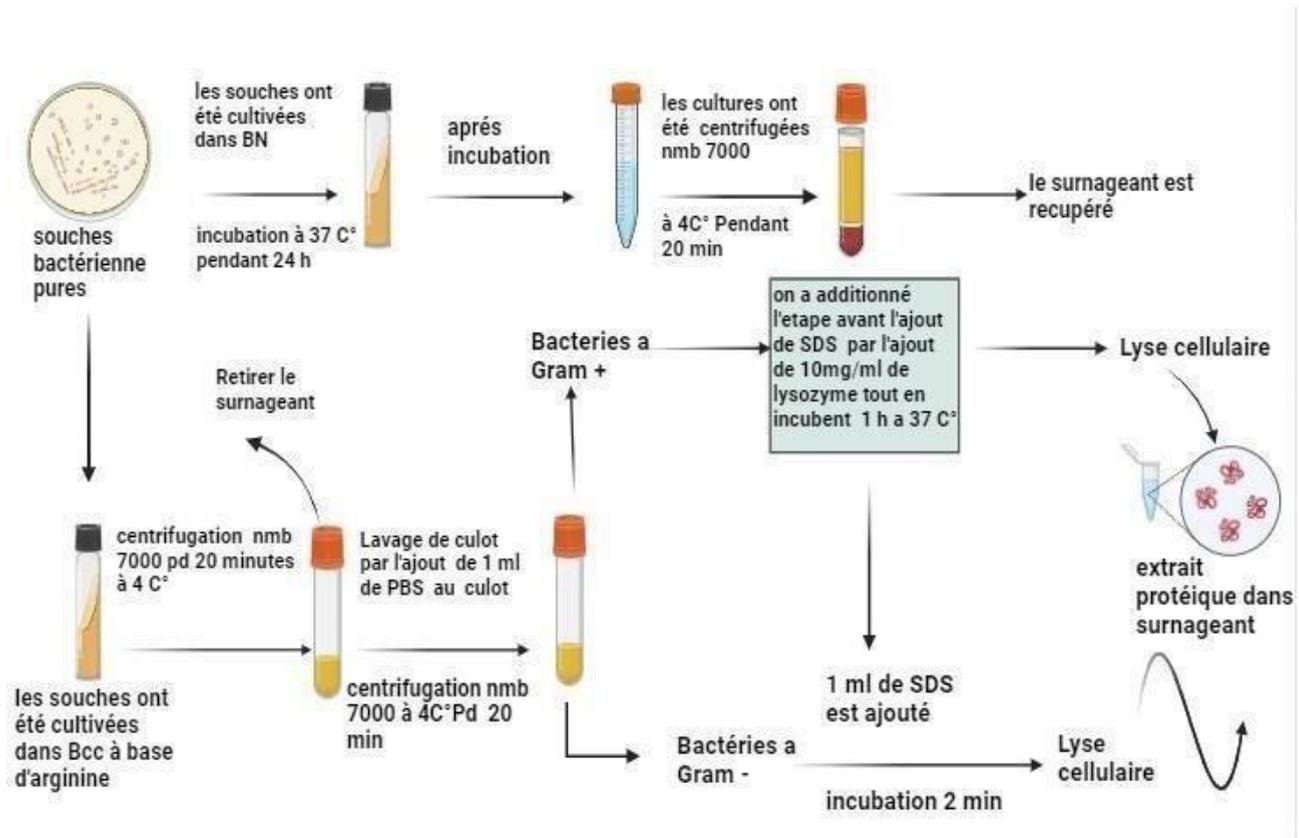
Les souches bactériennes sont été incubées à 37 C° pendant environ 18 à 24 h dans le bouillon Coeur Cerval enrichi à base de 1% d'arginine ,(figure 14)

Les cultures ont été centrifugées à une vitesse de 7000xg pendant 20 minutes pour séparer les cellules bactériennes du surnageant. Le surnageant est éliminé et le culot a été lavées deux fois par l'ajoute de 1 ml de tampon phosphate salin (PBS) sans mg<sup>+</sup> ni ca<sup>+</sup> au culot.

Pour les bactéries a Gram négatifs la lyse cellulaire été effectuer par l'ajout de 1 ml de dodecyl sulfate de sodium (SDS), Après l'ajout de SDS les cellules bactériennes ont été incubées pendant 2 minutes.

Pour les bactéries a Gram positifs : nous avons additionné cette étape de lyse cellulaire par l'ajoute de 10 mg /ml de lysozyme pour chaque culot tout en incubant une heure à 37C°cette action est très spécifique et ne détruit pas les protéines intracellulaire ce qui permet de préserver l'intégrité des protéines à extraire (**Mohammed, 2017**).

La centrifugation été effectuée de nouveau afin de récupérer les protéines ou se précipitent dans le Surnageant.

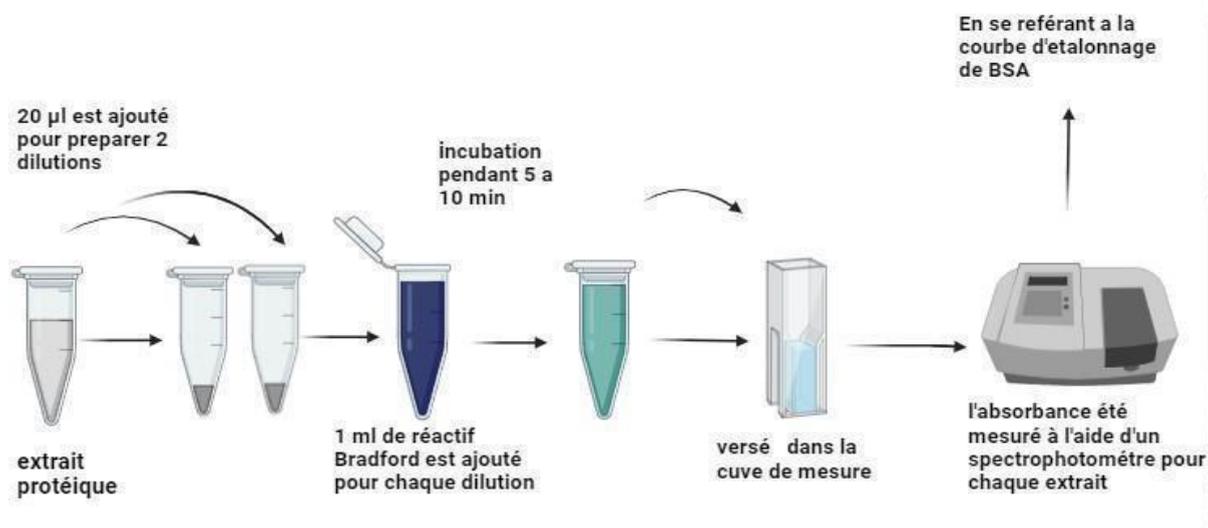


**Figure 14 :** Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction des protéines intracellulaires des souches isolées à partir des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis*.

#### IV- Dosage et quantification de l'extrait protéique :

Le dosage des protéines été effectuée selon la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**). Cette méthode été basé le changement d'absorbance après la fixation d'un colorant, manifestant par le changement de la couleur du Bleu de Coomassie après lisons (complexification) avec les acides aminés basiques et les résidus hydrophobes des acides aminés (aromatiques) présentes dans les protéines (figure 15).

- On a préparé 2 dilutions dans lesquelles 20 µL de l'extrait protéiques été transférer dans un chaque tube eppendorf puis on a ajouté 1ml de réactif de Bradford.
- on a laissé les extraits environ 5 min à 10 min. on a mesuré le contenu des protéines totales à l'aide d'un spectrophotomètre en se référant à la courbe d'étalonnage dressée à partir des concentrations connues de BSA (Annexe 05).



**Figure 15 :** Schéma globale de dosage des extraits protéiques

## V- Mise en évidence de l'activité enzymatique :

### A. L'activité protéolytique :

Afin de mettre en évidence l'activité protéolytique nous avons utilisé un milieu gélosé Contenant une concentration de 5% de lait écrémé (Annexe 03) ; ensuite des disques en papier Whatman 1 stérile de 6 mm de diamètre sont imprégnés d'un volume de 5µl de chaque extrait protéique extracellulaire et intracellulaire,(figure 16) est déposés à la surface du milieu solidifié et incubé à 37°C pendant 48h,(Devos, 2009) Après incubation , La Présence d'une zone claire ou transparente autour de chaque disque indique la présence d'une activité protéolytique.(Gordon, 1973).

### B. L'activité amylolytique :

Afin de mettre en évidence l'activité amylolytique, nous avons utilisé une gélose nutritive Contenant 1% d'amidon soluble (Annexe 03). (Gordon, 1973). Ensuite des disques en papier Whatman 1 stérile de 6 mm de diamètre sont imprégnés dans un volume de 5µl de chaque extrait protéique extracellulaire et intracellulaire et déposés à la surface du milieu solidifié et incubé à 37°C pendant 48h (figure 16).

Après incubation nous avons effectué une révélation en recouvrant le milieu gélosé d'une solution de Lugol Pendant 30 secondes, suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée (Annexe 04).

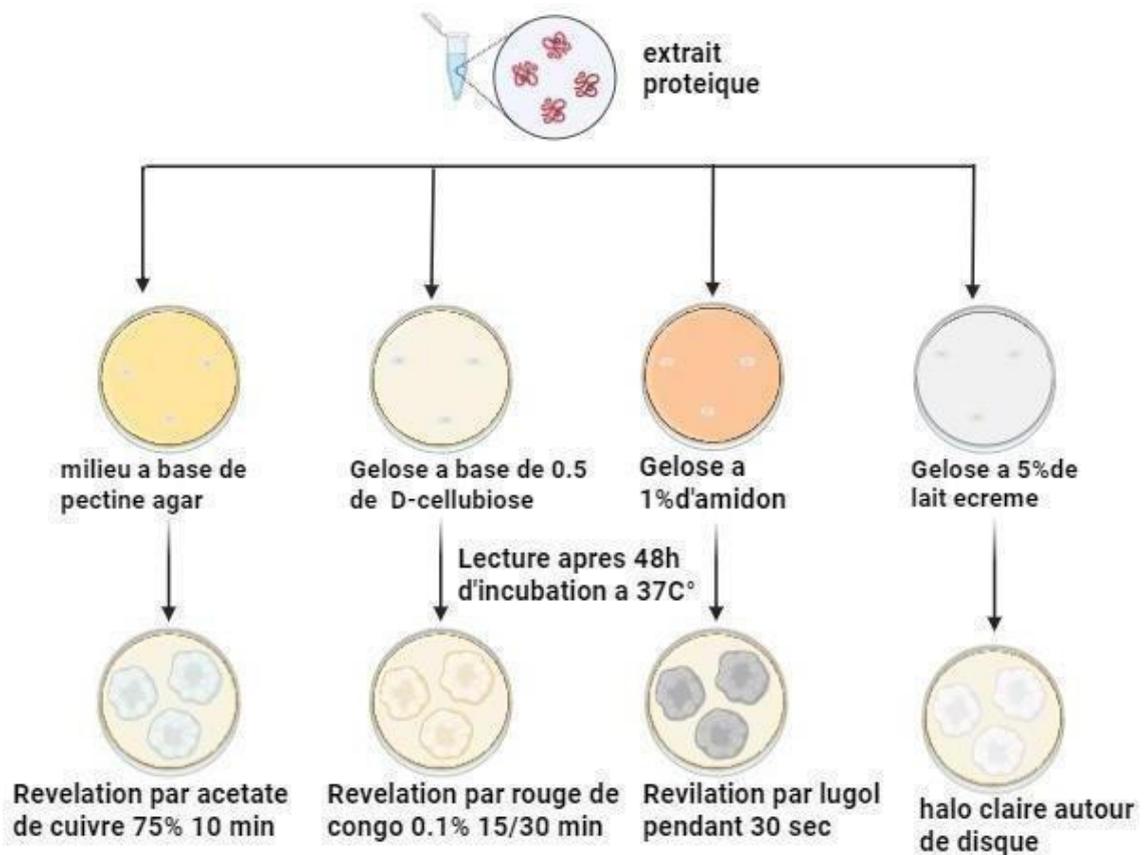
La Présence d'une zone claire ou transparente autour de chaque disque indique la présence d'une activité amylolytique. (Devos, 2009).

**C. L'activité cellulolytique :**

Afin de mettre en évidence l'activité cellulolytique, nous avons préparé un milieu de base Auquel nous avons ajouté 0,5% (p/v) de cellobios (Annexe 03). Ensuite les disques de papier Whatman 1 stérile de 6 mm de diamètre sont imprégnés dans un volume de 5µl de chaque extrait protéique extracellulaire et intracellulaire et déposés à la surface du milieu solidifié et incubé à 37°C pendant 48h (figure 16). Après l'incubation, nous avons rempli les boîtes de Pétri avec une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v) et nous avons les placées à 37°C pendant 15 à 30 minutes. Par la suite, nous avons effectué un lavage des boîtes avec une solution de NaCl à 1M pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. (Annexe 04).L'activité cellulase se manifeste par l'apparition de zones claires autour de chaque disque (Bragger *et al.*, 1989).

**D. La recherche de l'activité pectinolytique :**

Afin de mettre en évidence l'activité pectinolytique, nous avons utilisé le milieu d'Agar Pectine (Annexe 03). Les disques en papier Whatman 1 stérile de 6 mm de diamètre sont imbibés dans un volume de 5µl de notre extrait protéique extracellulaire et intracellulaire et déposés à la surface du milieu solidifié et incubé à 37°C pendant 48h. (Figure 16) Après l'incubation, nous avons inondé les boîtes avec une solution d'Acétate cuivre à 75% pendant 10 minutes (Annexe 04). Un résultat positif est caractérisé par la présence d'un halo clair bien défini autour des disques (Snaiki, 2006).



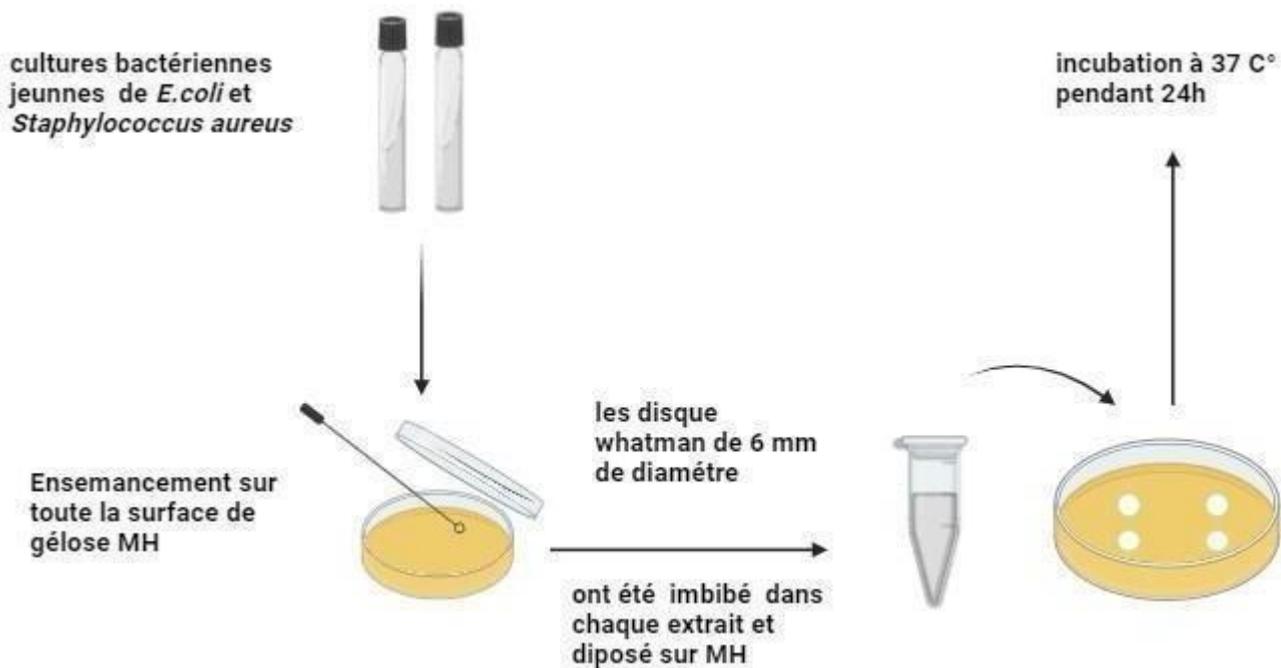
**Figure 16** : Schéma récapitulatif des étapes de la mise en évidence des activités enzymatiques.

#### VI- Mise en évidence de l'activité antibactérienne :

Dans des boîtes de Pétri stériles contenant de gélose (Muller Hinton) ont été préparé Après solidification, sur chaque milieu de culture à l'aide d'un écouvillon stérile environ 1ml de chaque suspensions bactériennes jeunes de *Esherechia.coli* et *Staphylococcus aureus* (Annexe06) étéensemencé sur toute la surface des boites (**Shunying et al., 2009**).

Par la suite des disques de papier Whatman 1 stérile de 6 mm de diamètre (**Bekhechi et al., 2008**) sont imbibé dans un volume de 5µl de chaque extrait protéique extracellulaire et intracellulaire et disposés à la surface du milieu solidifié (figure 17).

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures ; l'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour de chaque disque.



**Figure 17 :** Schéma récapitulatif des étapes de la mise en évidence de l'activité antibactérienne

*Résultats*

**1-Souches bactériennes :**

Toutes les souches bactériennes déjà isolées et conservés ont été revivifiées Après le repiquage sur les milieux sélectifs ; Les résultats ont révélé la présence de 27 souches bactériennes.

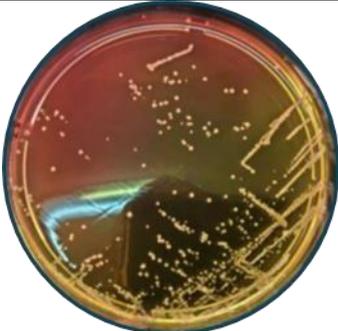
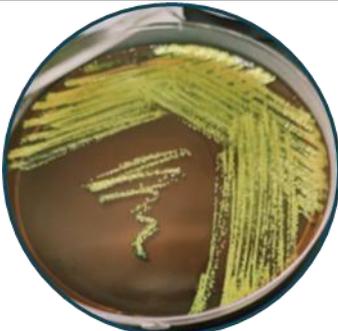
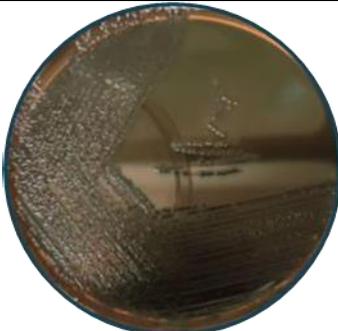
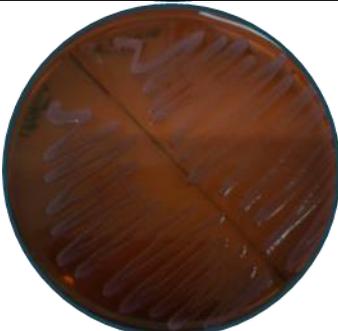
Le tableau suivant montre plus précisément le nombre de chaque souche bactérienne

**Tableau VIII :** Nombre des souches bactériennes déjà isolées et revivifiées.

| Nombre de souches                  | Souches                           |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Graines de Pinus halepensis</i> |                                   |
| 09                                 | <i>D'Esherichia coli</i>          |
| 06                                 | <i>Klebseila pneumoniae</i>       |
| 04                                 | <i>Staphylococcus aureus</i>      |
| <i>Graines de Moringa oleifera</i> |                                   |
| 02                                 | <i>Staphylococcus aureus</i>      |
| 02                                 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 04                                 | <i>D'Enterobacter</i>             |

L'apparition de chaque souche bactérienne est représentée dans le tableau IX :

Tableau IX : L'apparition de chaque souche bactérienne.

| Souches<br>Milieux                | EMB   | Chapman   | Apparition  |
|-----------------------------------|---|---|---|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Absence de colonies   |   | Petites colonies rondes avec une couleur allant de blanc au crème.          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | Absence de colonies   |  | Petites colonies rondes avec une couleur jaune doré.                        |
| <i>Esherichia coli</i>            |  | Absence de colonies   | Petites colonies rondes en couleur noire avec un éclat métallique verdâtre. |
| <i>Klebseilla pneumonie</i>       |  | Absence de colonies   | Colonies de taille moyenne, avec une couleur mauve.                         |
| <i>Enterobacter</i>               |  | Absence de colonies   | Colonies grandes en couleur rose claire.                                    |

Le graphique qui montre le taux des souches revivifié est représenté dans la figure 18.

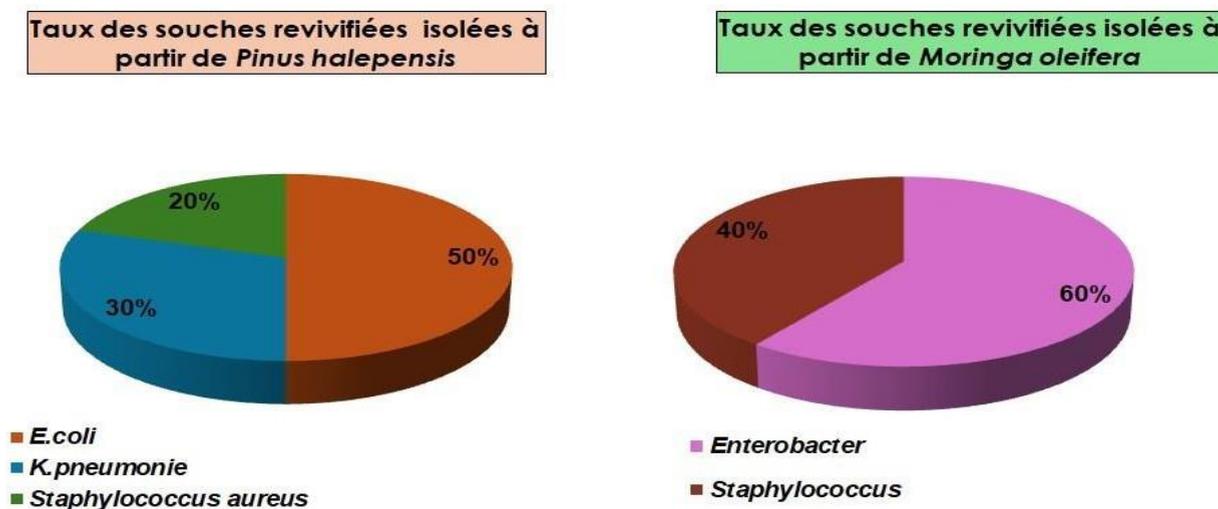


Figure 18 : Graphique récapitulatif de taux de souches revivifiées.

2-Résultats de la concentration des extraits protéique intracellulaire et extracellulaire après le dosage : sont représenté sur les figures 19 et 20 respectivement.

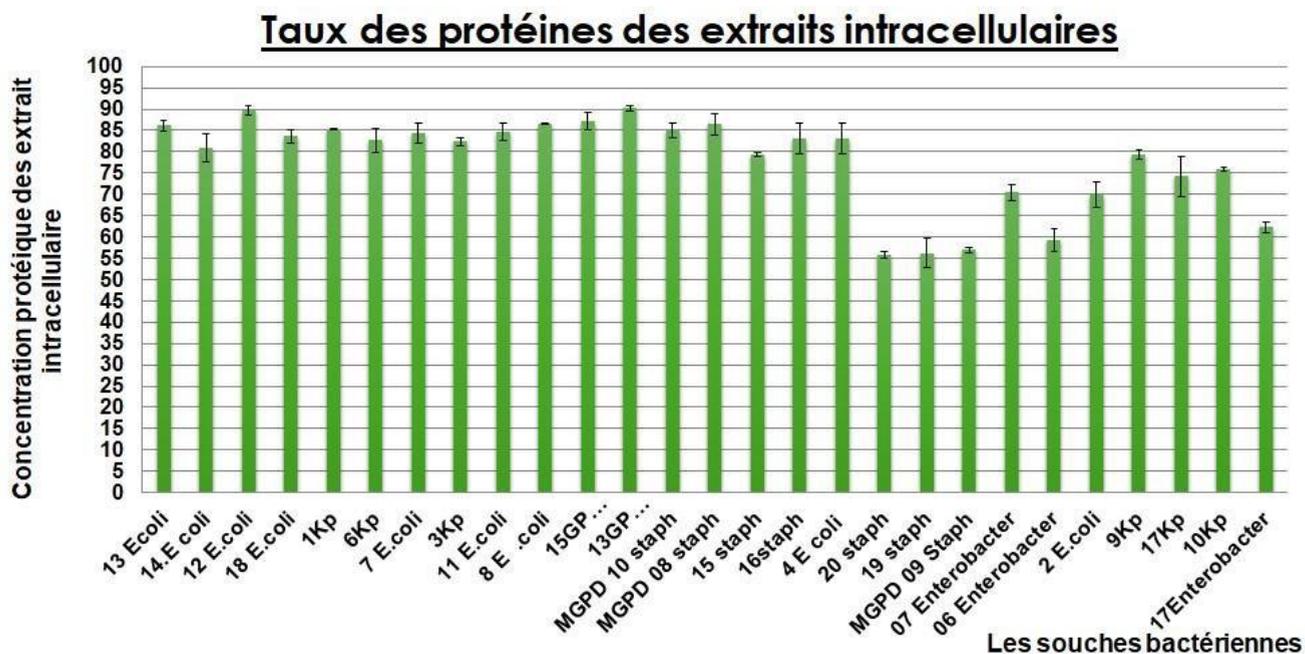
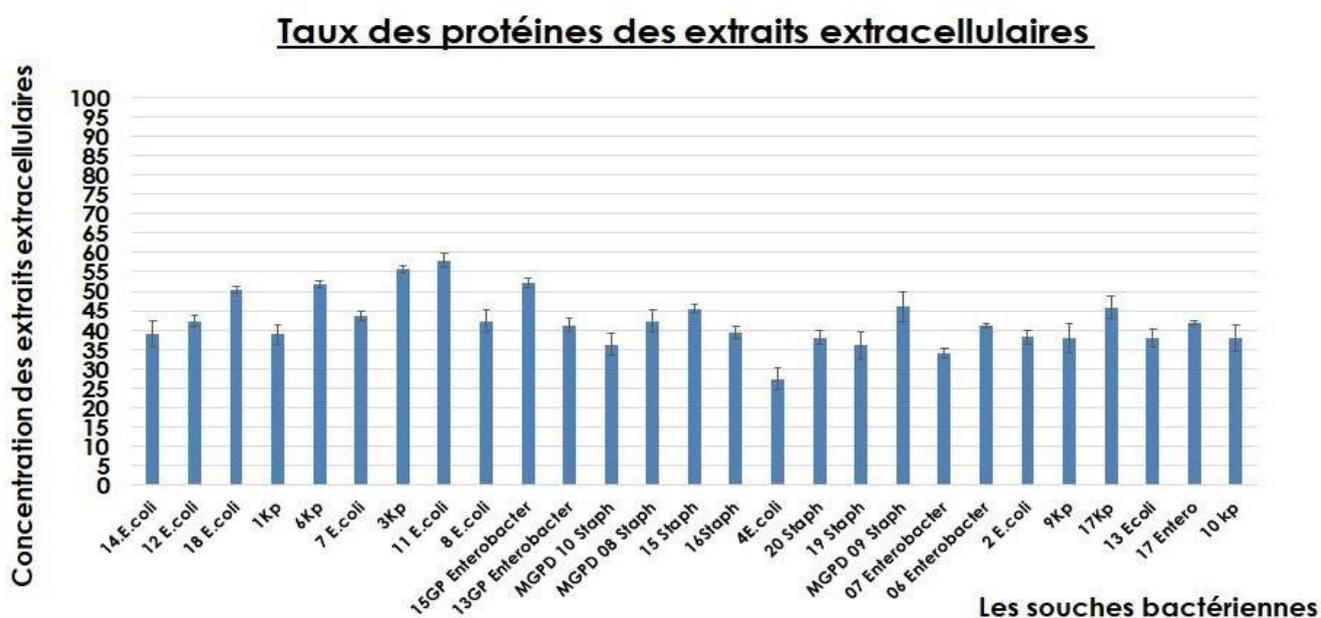


Figure 19 : Représente le taux des protéines dans les extraits intracellulaire.



**Figure 20 :** Taux des protéines dans les extraits extracellulaire

**3-Résultats de l'activité enzymatique des extraits protéiques intracellulaire et extracellulaire de souches isolées à partir des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis* :** (figures 21 et 22)

- Pour les extraits des souches isolées à partir des graines des *Pinus halepensis* Les extraits protéiques issus de neuf souches *d'Escherichia coli* ont tous manifesté des activités protéolytiques et cellulolytiques.
- Parmi ces extraits, les extraits intracellulaires, ont révélés une activité positive en matière de dégradation des protéines. Pour les extraits protéiques extracellulaires, cette activité était généralement non-détectée.
- L'activité cellulolytique apparaît sauf dans tous les extraits protéiques extracellulaires qui ont capacité à dégrader le cellulose.
- Les résultats de l'étude sur les extraits protéiques de *Klebsiella pneumoniae* indiquent :
  - que pour les extraits intracellulaires chacun a montré une capacité à dégrader les protéines. Cependant, on a noté l'absence d'activité protéolytique dans les extraits protéiques extracellulaires.
  - Tous les extraits protéiques extracellulaires présentent une activité cellulolytique en revanche cette activité et non détecté dans les extraits intracellulaires.

- Concernant les extraits obtenus à partir des souches de *Staphylococcus* des graines de pin, on a observé :
  - Les extraits intracellulaire démontre une activité protéolytique positive ; et absente dans l'extrait extracellulaire.
  - L'activité cellulolytique apparaisent dans les extraits extracellulaire seulement
- Pour les extraits protéiques intracellulaires extraits de *staphylococcus aureus* et *staphylococcus epidermis* issus de souches des graines de *Moringa,oleifera* on a détecté :
  - une activité protéolytique positive dans les extraits intracellulaires en revanche cette activité était absente dans les extraits protéiques extracellulaires.
  - Concernant l'activité cellulolytique, été positive dans l'ensemble des extraits protéiques extracellulaires et non détecté dans les extraits intracellulaires.
- Pour les extraits issus d'*Enterobacter*, D'une façon similaire, les extraits protéiques extracellulaires obtenus ont manifesté Une activité cellulolytique remarqué. Et une activité protéolytique prononcée dans les extraits intracellulaires.
- Lors de notre étude sur l'activité enzymatique, nous avons observé une absence d'activité amylolytique et pectinolytique dans tous les extraits testés.



**Figure 21** : Résultats de l'activité protéolytique dans les extraits intracellulaires

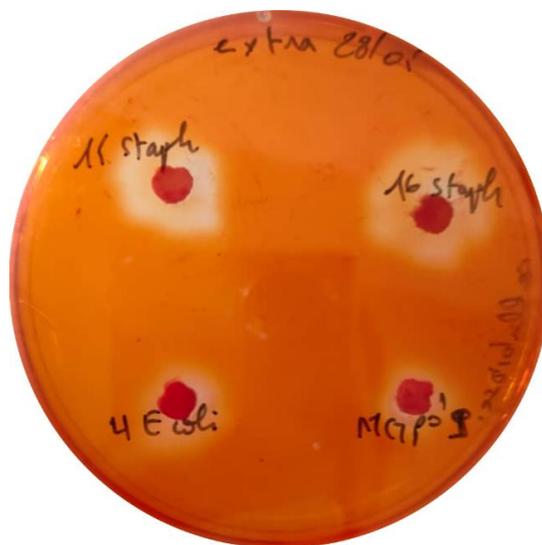


Figure 22 : Résultats de l'activité cellulolytique dans les extraits extracellulaires

**Résultats des activités enzymatiques dans les extraits extracellulaires et intracellulaires**

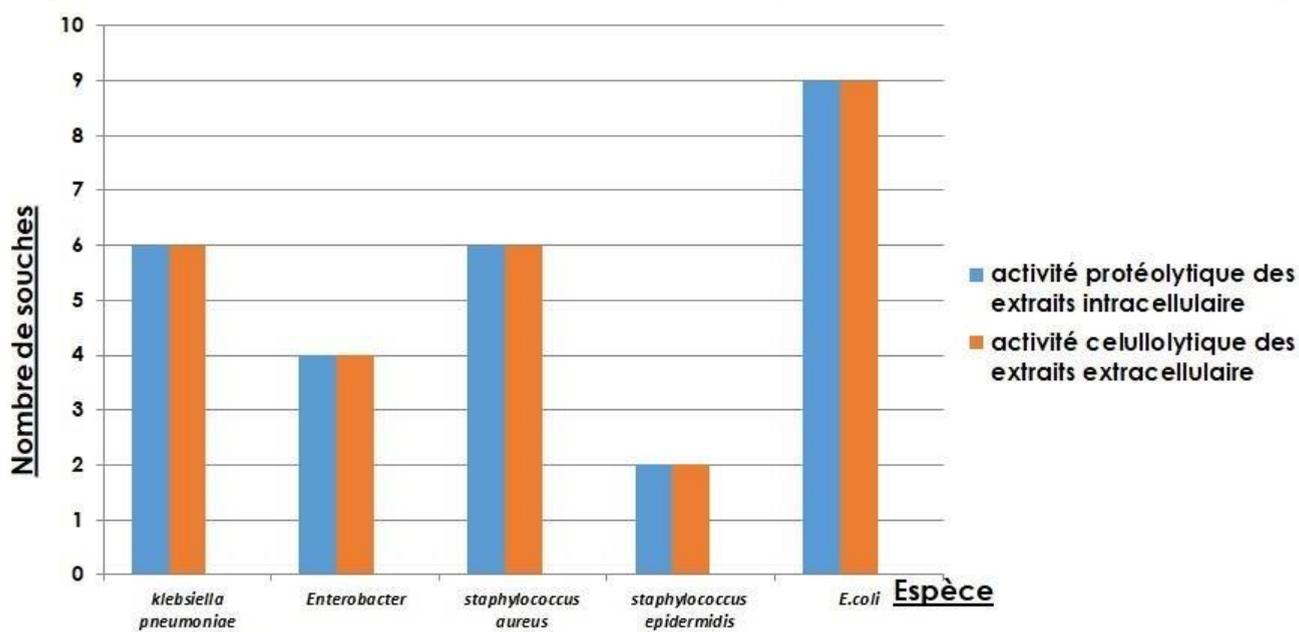


Figure 23 : Histogramme comparative des profils enzymatiques dans les extraits intracellulaires et extracellulaires.

**4-Résultats de l'activité antibactérienne :**

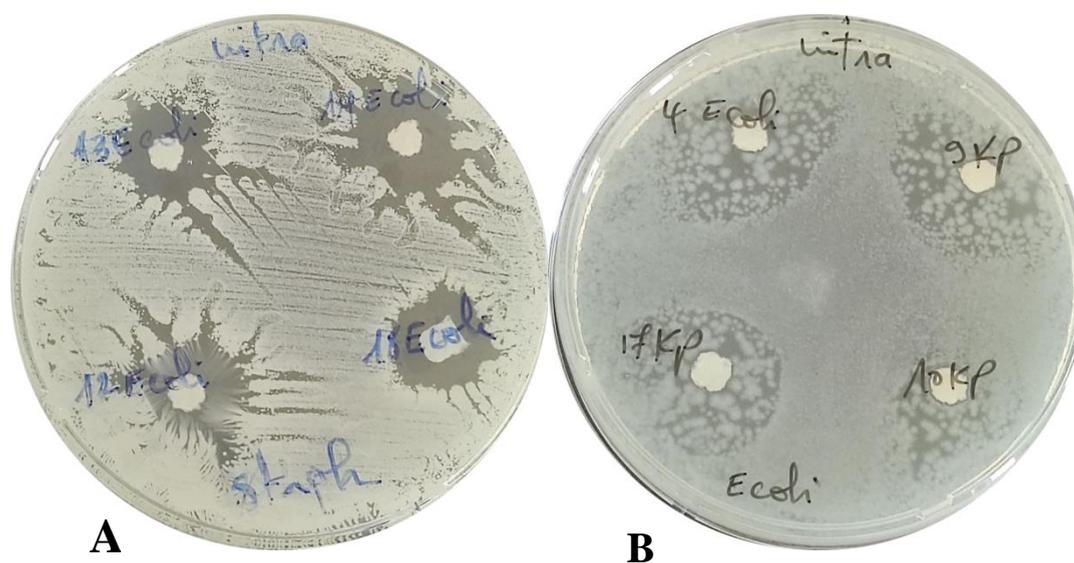
Lors de cette étude, nous avons testé l'action des différents extraits (extracellulaires et intracellulaires) extrait à partir des souches bactériennes isolées de graines de deux plantes *Morenga oleifera* et *Pinus halepensis* vis-à-vis de deux souches bactériennes pathogènes l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par (Moreira et al., 2005) Ils ont classé selon le diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne dans le tableau X comme suit :

Tableau X : Diamètres des zones d'inhibitions.

| Souche                     | Diamètre          |
|----------------------------|-------------------|
| Non sensible               | Inferieur 8 mm    |
| Sensible (+)               | Entre 9 et 14 mm  |
| Très sensible (+ +)        | Entre 15 et 19 mm |
| Extrêmement sensible (+++) | Supérieur à 20 mm |

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés dans différents extraits extracellulaire et intracellulaire vis-à-vis *staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* des souches bactériennes isolées à partir de deux plantes étudiées sont été mesurées.

Les résultats obtenus sont présents respectivement dans la figure 24.



**Figure 24 :** Résultats obtenus de l'activité antibactérienne vis-à-vis *Staphylococcus aureus* (A) et *Escherichia coli* (B).

Les valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents extraits extracellulaires et intracellulaires vis-à-vis aux différentes souches bactériennes testées sont représentés dans le tableau XI.

**Tableau XI** : Diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents extraits extracellulaire et intracellulaire vis-à-vis aux différentes souches bactériennes testées.

| Souches                                  |                           | D (mm)                |               |
|--|---------------------------|-----------------------|---------------|
|  |                           | <i>Staphylococcus</i> | <i>E coli</i> |
| <b>Extrait<br/>Intra-<br/>cellulaire</b> | <i>04 E coli</i>          | 11                    | 27            |
|  | <i>09 KP</i>              | 15                    | 30            |
|  | <i>10 KP</i>              | 11                    | 12            |
|  | <i>MGPD 08</i>            | 14                    | 22            |
|  | <i>MGPD 10</i>            | 11                    | 15            |
|  | <i>15 Staphylococcus</i>  | 17                    | 20            |
|  | <i>16 Staphylococcus</i>  | 12                    | 10            |
|  | <i>01 KP</i>              | 17                    | 0             |
|  | <i>06 KP</i>              | 16                    | 0             |
|  | <i>07 E coli</i>          | 14                    | 20            |
|  | <i>03 KP</i>              | 13                    | 0             |
|  | <i>13 E coli</i>          | 16                    | 08            |
|  | <i>14 E coli</i>          | 17                    | 09            |
|  | <i>12 E coli</i>          | 15                    | 18            |
|  | <i>18 E coli</i>          | 16                    | 15            |
|  | <i>GP 13 Enterobacter</i> | 09                    | 0             |
|  | <i>GP 15 Enterobacter</i> | 08                    | 15            |
|  | <i>17 KP</i>              | 0                     | 25            |
|  | <i>06 Enterobacter</i>    | 0                     | 23            |
| <b>Extrait<br/>extra-<br/>cellulaire</b> | <i>12 E coli</i>          | 0                     | 09            |
|  | <i>2 E coli</i>           | 0                     | 10            |
|  | <i>MGPD 09</i>            | 12                    | 20            |
|  | <i>17 E coli</i>          | 09                    | 0             |
|  | <i>15 GP</i>              | 11                    | 0             |

# *Discussion*

L'étude des souches bactériennes isolées des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis* révèle un potentiel fascinant en ce qui concerne leurs protéines intracellulaires et extracellulaires,

Cette étude revêt une importance considérable car elle vise à combler une lacune de connaissances concernant la caractérisation biochimiques de la microflore des graines de *Moringa oleifera* et de *pinus halepensis*. Spécialement axée sur les activités enzymatiques et également l'intérêt de l'activité antibactérienne des extraits protéiques intracellulaires et extracellulaires contre des souches bactériennes pathogènes. Les résultats obtenus fourniront une meilleure compréhension sur la microflore de graines de ces deux plantes, contribuant ainsi à l'avancement de notre compréhension dans cet axe de recherche.

La supériorité des protéines intracellulaires tirées de souches bactériennes, comparativement aux extraits protéiques extracellulaires, tient à divers facteurs clés qui soulignent l'importance fondamentale de ces biomolécules à l'intérieur de la cellule (**Imran, 2016**).

À l'intérieur des cellules bactériennes, les protéines jouent un rôle essentiel dans presque toutes les fonctions vitales, de la réplication de l'ADN à la catalyse des réactions métaboliques

De ce fait, la concentration et la diversité des protéines intracellulaires surpassent largement celles des protéines extracellulaires. Les protéines extracellulaires, bien qu'importantes pour la communication intercellulaire et l'interaction avec l'environnement, représentent seulement une petite fraction des protéomes bactériens (**karpinski, 2013**)

Cela est dû au fait que la production et la sécrétion de protéines extracellulaires nécessitent une dépense énergétique considérable et sont souvent régulées de manière strict, ne survenant qu'en réponse à des stimuli spécifiques. Par conséquent, quand on analyse la richesse et la complexité des activités biologiques à travers le prisme des protéines, les extraits intracellulaires offrent une fenêtre beaucoup plus large sur les mécanismes internes et les capacités des souches bactériennes. Cela fait des protéines intracellulaires des cibles d'étude privilégiées pour comprendre en profondeur le fonctionnement bactérien conformément aux constatations de (**Trishin, 2004**).

Notre étude révèle que 70% des extraits extracellulaires étudiés ont manifesté une activité positive pour la cellulase. Ces résultats s'alignent sur des recherches précédentes, comme celles menées par **(Lokapirnasari, 2015)** ainsi **(Barbosa et al., 2020)** ayant révélé une activité cellulolytique dans les fractions protéiques extracellulaire de *Enterobacter ;Klebsiella pneumoniae*, et celles de *staphylococcus* **(Thomas et al., 2021)** concernant l'extrait protéique extracellulaire obtenu par *Escherichia coli*, À l'inverse de ce qui a été publié dans d'autres études, notamment celle de **(Gao et al., 2015)**, qui suggéraient l'absence de cette activité chez l'extrait protéique extracellulaire excrété à partir de *Escherichia coli* en raison du manque d'un gène encodeur de l'enzyme, notre recherche suggère autrement.

Nous observons en effet une activité cellulolytique pour les extraits intracellulaires et extracellulaires de *E. coli*. Cette disparité pourrait être attribuable à notre utilisation de la cellobiose comme substrat, qui est structurellement plus simple que le carboxyméthylcellulose (CMC). Cela suggère que notre préparation protéique d'*E. coli* a pu métaboliser la cellobiose, ce qui a engendré un test positif.

L'utilisation des cellulases microbiennes présente d'importants bénéfices écologiques en termes de renouvelabilité, de biocompatibilité et de biodégradabilité. Elle représente donc une alternative prometteuse pour réduire l'empreinte carbone associée à une large gamme de produits et processus au sein de différentes industries **(Imran, 2016)**. .

Notre analyse a confirmé que les extraits protéiques intracellulaires, sont positifs pour la présence de protéases. Cela inclut notamment les extraits intracellulaires dérivés d'*E. coli*, ce qui est cohérent avec les découvertes antérieures de **(Gottesman, 1996 )** ainsi **(Chung ,1993)**, qui ont mis en lumière la présence d'enzymes protéolytiques intracellulaire. Ces enzymes pourraient appartenir aux catégories de sérine protéases et métalloprotéases.

Par ailleurs, les extraits intracellulaires dérivés de souches d'*Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae* et le genre *Staphylococcus* ont montré une activité protéolytique significative, s'accordant ainsi avec d'autres données rapportées dans les études scientifiques de **(Trishin ,2004)** ainsi **(Rao,1998)**.

Il est bien établi dans la littérature scientifique que les protéases microbiennes sont largement employées dans plusieurs industries, comme celles du textile, des détergents, de la transformation du cuir, de la fabrication des aliments pour animaux, du traitement des déchets. Cependant, la découverte et l'exploitation de souches microbiennes productrices de protéases ont permis d'extraire ces enzymes directement des microorganismes, réduisant ainsi de manière considérable les coûts de production. Cette évolution ouvre de nouvelles voies pour l'utilisation des protéases dans divers secteurs, offrant une alternative plus économique et durable pour faire face à la demande en hausse d'enzymes protéolytiques. En somme, l'exploitation des protéases microbiennes offre un fort potentiel pour répondre efficacement à des besoins industriels, tout en apportant des bénéfices économiques et en favorisant une approche respectueuse de l'environnement. **(Razzaq , 2019).**

Les résultats présentés par Rosaria Ciriminna et ses collègues pourraient justifier l'absence de l'activité pectinolytique observée dans les extraits provenant des souches qui semblent appartenir aux genres *Staphylococcus* et *Enterobacter* ; de *klebsiella pneumoniae* lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux contenant de la pectine. Il semble que ces extraits puissent être vulnérables aux effets bactéricides de la pectine, ce qui aurait pu inhiber leur activité enzymatique sur ce milieu particulier.

Concernant *Escherichia coli*, le manque d'activité pectinolytique est probablement dû à une absence de gènes responsables de la production de ces enzymes, conformément aux constatations de **(Zink et al. , 1985).**

Dans le cadre de notre étude récente sur la présence d'activités amylolytique et au sein d'extraits protéiques extracellulaires et intracellulaires. Malgré la mise en œuvre de méthodologies rigoureuses et le contrôle méticuleux des conditions expérimentales, nos résultats ont indiqué une absence d'activité amylolytique dans les extraits testés. Cette observation suggère plusieurs perspectives intéressantes pour une enquête future. Elle pourrait refléter des variations intrinsèques dans l'expression génique des souches bactériennes sous des conditions de culture déterminées, Pareillement, l'influence de facteurs environnementaux sur l'activité et la stabilité enzymatique pourrait représenter une avenue de recherche significative. Ces résultats, bien qu'inattendus, contribuent de manière précieuse à notre compréhension de la complexité des systèmes biologiques et soulignent l'importance d'une exploration approfondie des conditions expérimentales et des mécanismes moléculaires sous-jacents.

Nos travaux récents sur l'activité antibactérienne des extraits protéiques intracellulaires issus de différentes souches bactériennes isolées à partir des graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis* ont fourni des résultats tout à fait prometteurs, mettant en lumière potentiel de ces extraits comme agents antibactériens efficaces contre les souches pathogènes courantes, telles qu'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. L'ensemble des extraits testés ont montré une activité antibactérienne positive, ce qui témoigne de la présence de molécules bioactives antibactériennes riches et diversifiées au sein de ces extraits.

Plus spécifiquement, les extraits issus de quatre souches distinctes de *Staphylococcus* (identifiées comme MGPLD08, MGPLD10, 15 et 20) ont révélé une activité antibactérienne positive avec des zones d'inhibition de diamètres modérés allant de 11mm à 17mm contre *Staphylococcus aureus*, et de 15mm à 22mm contre *Escherichia coli*. Il est à noter que la souche 13 s'est détachée par son activité spécifique contre *S. aureus*, produisant une zone d'inhibition plus modeste de 9mm, tandis qu'une activité modérée a été observée contre *E. coli* pour les extraits issus des souches (17, 6 et 15) avec des zones d'inhibition respectives de (25mm, 22mm et 15mm).

Ces données s'avèrent en accord avec les résultats publiés par (Aftab , 2021), confirmant l'efficacité des extraits protéiques intracellulaires en tant qu'agents antibactériens naturels. En outre, une activité antibactérienne remarquable a été observée dans les extraits protéiques intracellulaires obtenus à partir d'*Escherichia coli*, présentant des zones d'inhibition d'une ampleur modérée contre différentes cibles, ainsi que pour les extraits issus de souches de *Klebsiella*, démontrant une propulsion notable contre *S. aureus* et *E. coli*.

La présence marquée de bactériocines dans ces extraits pourrait expliquer leur robuste d'activité antibactérienne, suggérant un mécanisme d'action où ces extraits antimicrobiens jouent un rôle crucial dans l'inhibition des pathogènes cibles. Ce constat renforce non seulement l'importance des extraits protéiques intracellulaires en tant que réservoirs de composés antibactériens potentiels, mais ouvre également la voie à de futures recherches visant à exploiter ces composés dans le développement de nouvelles stratégies antibactériennes, en adéquation avec les découvertes de. Ces résultats contribuent de manière significative à l'avancement de nos connaissances sur l'usage potentiel des bactériocines en tant qu'alternatives naturelles aux antibiotiques traditionnels, présentant un intérêt particulier pour le combat contre la résistance aux antibiotiques (karpinski, 2013).

Les résultats obtenus de notre étude mettent en évidence l'efficacité notable des extraits intracellulaires issus de souches de graines de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis* dans le domaine des antibiotiques. Cette efficacité démontre le potentiel important de ces extraits comme nouvelle source d'agents antimicrobiens. Par contrast, l'absence d'activité constatée dans les extraits extracellulaires suggère spécificité et sélectivité des composés actifs intracellulaires. Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement d'antibiotiques novateurs, capables de lutter contre les souches bactériennes résistantes. L'isolation et la caractérisation des molécules actives au sein des extraits intracellulaires pourraient révéler de nouvelles voies thérapeutiques, enrichissant ainsi notre arsenal contre les infections bactériennes. Ces résultats soulignent l'importance de poursuivre les études sur les composés intracellulaires de *Moringa oleifera* et de *Pinus halepensis*, explorant leur potentiel en tant qu'agents antibactériens naturels et innovants.

*Conclusion*

Les résultats obtenus à travers cette étude illustrent clairement le potentiel considérable des extraits protéiques intracellulaires, issus de diverses souches bactériennes, comme enzyme ainsi que agents antibactériens efficaces. Les tests menés ont démontré une capacité marquée de ces extraits à inhiber la croissance de pathogènes largement connus et cliniquement significatifs comme *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Cette efficacité manifeste contre ces souches pathogènes souligne l'abondance et la diversité des molécules bioactives antibactériennes contenues dans les extraits étudiés. La présence notable de bactériocines, en particulier, explique la robustesse de l'activité antibactérienne observée, indiquant ces extraits comme des acteurs clés dans la lutte contre les agents pathogènes ciblés.

La concordance de nos résultats avec ceux rapportés dans des travaux antérieurs renforce non seulement leur validité mais aussi l'importance de poursuivre les recherches dans cette direction. La capacité singulière de certaines souches à produire des extraits avec des activités spécifiques contre des bactéries pathogènes précises ainsi que d'intérêt biotechnologique ouvre des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies antibactériennes ciblées et personnalisées.

Ces découvertes contribuent de manière significative à l'avancée des connaissances dans le domaine des antibiotiques et industrielle offrent des voies nouvelles pour le développement de traitements alternatifs. Elles mettent en lumière la nécessité d'exploiter et d'approfondir notre compréhension des composés naturels dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques, une préoccupation de santé publique de plus en plus pressante.

L'exploration des extraits protéiques intracellulaires et de leur mécanisme d'action représente donc une avenue prometteuse et essentielle dans la recherche d'alternatives viables aux traitements antibiotiques traditionnels, soulignant l'importance de poursuivre et d'élargir ces investigations pour la mise au point de nouvelles solutions antibactériennes.

# *Références bibliographiques*

## A

- AFTAB UDDIN, M., AKTER, S., FERDOUS, M., HAIDAR, B., AMIN, A., SHOFIUL ISLAM MOLLA, A.H.M, . & ISLAM, MR .(2021).** Une souche endophyte végétale *Staphylococcus hominis* MBL\_AB63 produit un nouveau lantibiotique, l'homicorcine et une variante de position un. *Scientific Reports* , 11 (1), 11211 .
- AGROCONSULT.(2016).**Analyse des Potentialités de l'Exploitation du Moringa en Haïti, ministère de l'agriculture, des ressources naturelles et du développement rural (marndr).p211.
- ANWAR, F.,BHANGER ,M.(2003).** Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions ofPakistan. *J. Agric. Food Chem*, 51: 6558–6563.
- ANNE-SOPHIE MASSON. (2022).** Le microbiote des plantes, de son rôle dans la survie végétale à son ingénierie pour une agriculture durable.
- ASSAM, H., AYADI, A., & BAGHDAD, M. A. (2023).** Etude de biofilm positif et des propriétés adhésives d'une bactérie lactique d'intérêt (Doctoral dissertation, Université Ibn Khaldoun).
- ATAKPAMA, W., GOUSSIVI E.K., KANDA, M., DOURMA, M., NARE, M., BATAWILA, K.,AKPAGANA, K.(2014).** *Moringa oleifera* lamarck (moringaceae) une ressource phylogénétique à usage multiple, in revue CAMES science de la vie, de la terre etagronomie,2: p6-14.

## B

- BARNABE-HEIDER, F., & MILLER, F.(2003).** Les neurotrophines produites de manière endogène régulent la survie et la différenciation des progéniteurs corticaux via des voies de signalisation distinctes. *Journal of Neuroscience* , 23 (12), 5149-5160.
- BARBOSA , K.L.,RODRIGUES,DO., DOS SANTOS, M.,SALGUEIRO ,S., MACHADO, GOLDBERG,A.,JUNIOR, A.,VIEIRA ,D., RENATA, M., GARCIA A., JOSE ,ME.R.(2020).** Bacterial cellulase from the intestinal tract of the sugarcane borer , *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 161, p. 441-448, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.042.
- BEKHECHI ,C., ATTIK-BEKKARA ,F., ABDELOUHIB ,D,. (2008).** Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'origanum glandulosum d'Algérie. *Phytotherapie* 6: 153-9.

- BERNARD, P.(2013)**. Le pin d'Alep en France. Edition Quae,11-23.
- BENKHEDDA,F.,MOHAMED, NH, BENZIADA, R., BENLAHBIB, FZ,& BENLAHBIB, M. (2022)**. Evolution de la place des plantes et des éléments aquatiques dans la ville saharienne,pp. 119-134.
- BOULLARD, B. (2001)**. Plantes médicinales du monde Croyances et réalités. Ed. Stem,638p.
- BOUAZZA, F. (2013)**. Intérêt de la mycorhization contrôlée du Chêne vert (*Quercus ilex* L.) et du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Miller) par deux espèces de Terfez, en conditions gnotoxéniques et axéniques. Université d'Oran Es-Senia Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biotechnologie. 99 pages.
- BRADFORD ,M.(1976)**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254 .
- BRAGGER, J.,DANIEL ,R., COOLBEAR ,T., MORGAN, H.(1989)**.Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* ,31: 556–561.
- BRAVO, L.(2000)**.Polyphenols : Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. reviews.* 56, 11, 317-333.
- BROIN, M. (2005)**. Composition nutritionnelles des feuilles de *Moringa oleifera*.

## C

- CHAHRAZED, B., HOCINE BOUCHRA, K. M., & DHIKRA, M. (2022)**.Revue De Littérature Sur Les Mécanismes De La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques.
- CHEIKH ,R .,HENTANI, B., BESBES ,S., BLECKER ,C., DEROANNE, C., ATTIA,H. (2006)**. Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill) seeds cultivated in Tunisia. *Food Sciences and Technology International.* 12, pp.49.
- CHOLE,.,KIM,E.(2015)**.Anti-oxidation, physicochemical, and sensory characteristics of sulgidduck fortified with water extracts from *Moringa oleifera* leaf *Korean journal of food and cookery science*, 31(3):p335-343.
- CHUNG,C.H.(1993)**. Proteases in *Escherichia coli* , *Science*, vol. 262, no5132, p. 372-374, doi: 10.1126/science.8211156.
- CHUKWUEBUKA, E. (2015)**.*Moringa oleifera* “The Mother’s Best Friend”. *International Journal of Nutrition and Food Sciences.* 4(6) : p624-630.

## D

**-DAHAM, S., TABANA, Y., IQBAL, M., AHAMED, M., EZZAT, M., MAJID, A., MAJID, A. (2015).** Les propriétés anticancéreuses, antioxydantes et antimicrobiennes du sesquiterpène  $\beta$ - caryophyllène de l'huile essentielle d'*Aquilaria crassna*. *Molecules* , 20 (7), 11808-11829.

**-DEVOS, P., GARRITY ,G. M., JONES, D.,ET AL.(2009).** The Firmicute. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer,63–67.

**-DELPHA, I. (2011).***Le Moringa (moringa oleifera lam.): utilisation actuelles et intérêt pharmacologique* (Doctoral dissertation).

**-DELGADO-BAQUERIZO, M., OLIVERIO, A. M., BREWER, T. E., BENAVENT-GONZALEZ, A., ELDRIDGE, D. J., BARDGETT, R. D., MAESTRE, F. T., SINGH, B. K., & FIERER, N. (2018).** A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359(6373).

## F

**-FALOWO, A., MUKUMBO, F., IDAMOKORO , E., LORENZO, J., AFOLAYAN, A., MUCHENJE, V. (2018).** Multi- functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. *Food Research International*, 106: 317–334.

**-FEKIH, N., ALLALI, H., MERGHACHE, S., CHAÏB, F., MERGHACHE, D., EL AMINE, M., DJABOU, N., MUSELLI, A., TABTI, B., COSTA, J. (2014).** Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4, 97–103.

**-FOIDL, N., MAKKAR, H.P.S. BECKER, K. (2001).** Potentiel de *Moringa oleifera* en agriculture et dans L'industrie. Potentiel de développement des produits du *Moringa*. Dar esSalaam. Tanzanie. 29 Octobre - 2 novembre 2001.

**-FOTELLI, M.N., KORAKAKI, E., PAPARRIZOS, S.A., RADOGLU, K., AWADA, T., MATZARAKIS, A. (2019).** Environmental Controls on the Seasonal Variation in Gas Exchange and Water Balance in a Near-Coastal Mediterranean *Pinus halepensis* Forest. *Forests* 10, 313.

## G

-GAO,D., LUAN, L., WANG, Q. LIANG, Q.(2015).Construction of cellulose-utilizing Escherichia coli based on a secretable cellulase , Microb. Cell Factories, vol. 14, no1, p.159, 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0349-7.

- GAGNON, W. (2023). Les enzymes beta-glucuronidases: une nouvelle cible pour le traitement des maladies cholestatiques auto-immunes.

- GEISEN, S., LARA, E., MITCHELL, E. A. D., VÖLCKER, E., & KRASHEVSKA, V. (2020). Soil protist life matters ! Soil Organisms, 92(3). <https://doi.org/10.25674/so92iss3pp189>.

-GORDON ,R., HAYNESW, C., PANG ,C.H.N.(1973). The Genus Bacillus.Washington.

-GOTTESMAN,,S.(1996).PROTEASES AND THEIR TARGETS IN ESCHERICHIA COLI,Annu. Rev. Genet., vol. 30, no1, p. 465-506, 1996, doi:10.1146/annurev.genet.30.1.465.

-GRANNER ,D.K., MURRAY R.K., RODWELL V.W.(2008). Biochimie de HARPER. 3édition. De Boeck. Bruxelles., pp. 49-51, 483.

-GUPTA, R., BEG,Q.K., LORENZ, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and Industrial Applications. Appl. Microbiol. Biotechnol, 59, 15–32.

## H

-HADJ-ALI, N.E., RYM, A. , BASMA, G.F., ALYA, S.K., SAFIA, K., MONCEF, N. (2007).

Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serineprotease from a newly isolated Bacillus licheniformis NH1. Enzym. Microb. Technol, 40, 515–523.

-HAMMICHE, V. (2015). Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle Phytothérapie. 13, pp. 358 – 372.

-HAZIM, A. H, HUSSEIN, A.( 2021). Extraction and Purification of Extracellular L-Glutamate Oxidase from Streptomyces.

-HEDJI, C. C., KPOGUE GANGBAZO, D.N.S, HOUINATO M.R ., FIOGBE, E.

(2014).Valorisation de Azolla spp, Moringa oleifera, son de riz et de coproduits de volaille et de poisson en alimentation animale, Journal of Applied Biosciences 81:p7277 – 7289,p7277- 7289.

## I

-IMRAN M, ANWAR, Z., IRSHAD, M., ASAD ,M.,ASHFAQ,H.(2016). Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review.Advances in Enzyme Research, 04: 44–55.

## J

**-JOHNVESLY, B., NAIK, G.K.(2001).** Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemical defined medium. *Process Biochem*, 37, 139–144.

## K

**-KADRI, N., KHETTAL, B., YAHIAOUI, Z.R, BARRAGAN, M.V, MONTEROA, J. I. (2013).** Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill; seeds from North Algeria. *Industrial Corps and Products*. V(51), pp.116-122.

**-KADRI, N., KHETTAL, B., ADJEBLI A., CRESTEIL T., BARRAGAN, M.V, MONTERO J.L. (2015).** Anticancer properties of polar lipid, fraction of *Pinus halepensis* Mill. Seeds, *Colloque International sur la valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales de la Méditerranée (CIPAMM)*, Blida. pp11-12.

**-KARPINSKI, T. M., SZKARADKIEWICZ, A. K. (2013).** Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish Journal of Microbiology* 62(3), 223–235.

**-KARIMI, B., TERRAT, S., DEQUIEDT, S., SABY, N. P. A., HORRIGUE, W., LELIEVRE, M., NOWAK, V., JOLIVET, C., ARROUAYS, D., WINCKER, P., CRUAUD, C., BISPO, A., MARON, P. A., PREVOST-BOURE, N. C., & RANJARD, L. (2018).** Biogeography of soil bacteria and archaea across France. *Science Advances*, 4(7). [https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAT1808/SUPPL\\_FILE/AAT1808\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAT1808/SUPPL_FILE/AAT1808_SM.PDF).

**-KIZILARSLAN, C., SEVGI, E. (2013).** Ethnobotanical uses of genus *Pinus* L. (Pinaceae) in Turkey. *Indian J Tradit Knowle*. 12, pp.209-220.

**-KONG, H., SONG, G.C., RYU, C.M. (2019).** Inheritance of seed and rhizosphere microbial communities through plant–soil feedback and soil memory. *Environmental Microbiology*, 11 479–486.

## L

**-LADJAL, S. (2012).** Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la région de M'sila, Université Ferhat Abbas-Sétif. 76pages.

**-LIANG, L., WANG, C., LI, S., CHU, X., SUN, K. (2019).** Nutritional compositions of Indian *Moringa oleifera* seed and antioxidant activity of its polypeptides. *Food Science & Nutrition*; 7: 1754– 1760.

**-LOKAPIRNASARI ,W.(2015).** Nazar DS, Nurhajati T, Supranianondo K, Yulianto AB. Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Surabaya abattoir, Indonesia. *Vet World*; 8: 367–71.

## M

**-MAHMOOD,K., MUGAL,T., HAQ, I. (2010).** *Moringa oleifera*: a natural gift-A review. *J. Pharm. Sci. & Res*, 2(11):775-781.

**-MEUNIER, N.E.(2000).** Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. M.Sc Thesis, INRSETE, Univ. Quebec. Canada. pp. 1-168.

**-MISHRA, G., SINGH, P., VERMA, R., KUMAR, S., SRIVASTAV, S., JHA, KK, & KHOSA, R.(2011).** Utilisations traditionnelles, phytochimie et propriétés pharmacologiques de la plante *Moringa oleifera* : un aperçu. *Der Pharmacia Lettre* , 3 (2), 141-164.

**-MOHAMMED,S.I.,ADITYA,A.,PONNAMBALAM,R.,SELVAGANAPATHY,A.(2017).** Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods.

**-MUTAR,Y., AL-RAWI, S., K. F., & MOHAMMED, M. T. (2021).** *Moringa oleifera*: Nutritive importance and its medicinal application, as a Review. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(11), 6827-6834.

## N

**-NELSON,E., SIMONEAU, P., BARRET, M., MITTER, B.(2018).** Compant S. Editorial special issue: the soil, the seed, the microbes and the plant. *Plant and Soil* 422 .

**-NIGAMEN, B., KUETE,V., SIMO , I. (2009).** Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *S Afr J Bot* 75(2): 256– 61.

**-NIGAM, P. ET SINGH, D. (1995).** Procédés de production fermentaire du xylitol, un substitut du sucre. *Process Biochemistry* , 30 (2), 117-124 .

## O

**-OLSON,M.E.CARLQUIST, S.(2001).** Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematics in *Moringa* (Moringaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 135 (4) p315-348

**-OLAGBEMIDE , P., ALIKWE ,P.C.N.(2014).** Proximate Analysis and Chemical Composition of Raw and Defatted *Moringa oleifera* Kernel. *Advances in Life Science and Technology*, 24: 92-99.

## P

- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P.(2000)**. Biotechnological potential of agro-industrial residues, II-Cassava Bagasse. *Bioresour. Technol*, 74, 81–87.
- POLIZELI, M., RIZZATTI, A., MONTI, R., TERENCEI, HF, JORGE, JA, & AMORIM, D. (2005)**. Xylanases issues de champignons : propriétés et applications industrielles. *Microbiologie appliquée et biotechnologie* , 67 , 577-591 .
- POOLE, A.J., CHURCH, J.S., HUSON,M.G.(2009)**. Environmentally sustainable fibers from regenerated protein, *Biomacromolecules*,. 10 : 1-8.
- POONAM,S.N.(2013)**.Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications, 3, 597-611; doi:10.3390/biom3030597.
- PRICE, M. L. (2007)**. "Le Moringa." Note technique-ECHO (revue en 2000, en 2002 et en 2007.

## Q

- QUEZEL,P.(2000)**. Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinus halepensis* and *Pinus brutia*). In:Ecology, Biogeography and Management of *Pinus halepensis* and *P. Brutia* ForestEcosystems in the Mediterranean Basin.Eds.,Néeman G., Trabauds L.,Backhuys Publishers, Leiden,pp. 1-12.

## R

- RAO, M.B., TANKSALE , A.M., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V. (1998)**. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 : 597-635.
- RAZZAQ , A,CHAMSI , S.,ALI , Q.,SAJJAD ,MY., MALIK , A.,ACHRAF ,M.(2019)**.Microbial Proteases Applications », *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 110, 2019, doi:10.3389/fbioe.2019.00110.
- ROLOFF, A .H, WEISGERBER, U.,STIMM, B. (2009)**. *Moringa oleifera* Weinheim, 978–3.
- ROMAN-REYNA, V., PINILI, D., BORJA, F., QUIBOD, L., GROEN , C., NICKOLAI, A., RAMIL, M., RICARDO ,O.(2020)**. Characterization of the Leaf Microbiome from Whole-Genome Sequencing Data of the 3000 Rice Genomes Project. *Rice*; 13: 72.

## S

-**SAUMYA BHADURI, PAUL, H., DEMCHICK.(1983)**. Simple and Rapid Method for Disruption of Bacteria for Protein Studies, p. 941-943.

-**SHUYING, ZHENG. (2009)**. Rôle de l'interaction entre les revues et Internet dans la couverture des catastrophes liées aux tremblements de terre. Revue chinoise des périodiques scientifiques et techniques , 20 (2), 322 .

-**SIVARAMAKRISHNAN,S.,GANGADHARAN, D., NAMPOOTHIRI, K.M., SOCCOL, C.R., PANDEY, A.(2006)**.  $\alpha$ - amylases from microbial sources An overview on recent developments. Food Technol. Biotechnol,44, 173–184.

-**SNAIKI, J ., NADIF, A ., OUHSSINE, M. (2006)**. Détection Biochimique D'Erwinia carotovora Subsp. Carotovora De Tubercules De Betterave Sucrière Atteints De Pourriture Molle. Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux; 145: 53–60.

-**SOLANKI, P., PUTATUNDA ,C ., KUMAR, A., BHATIA ,R., WALIA, A. (2021)**. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. 3 Biotech, 11.

-**SUBRAMANIYAN, S., PREMA, P. (2000)**. Studies on Production of Bacterial Xylanases.

-**SUNDARRAM,A., PANDURANGAPPA ,T., MURTHY, K.(2014)**.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. Journal of Applied & Environmental Microbiology; 2: 166–175.

## T

-**TAMHANE, K.,JADHAV,A.(2023)**.une courte revue sur le moringa oleifera-don naturel de la nature.

-**THOMAS,A., LAXMI,M., BENNY,A.(2021)**. Bioethanol Production of Cellulase Producing Bacteria from Soils of Agrowaste Field,Journal of Scientific Research, vol. 13, no. 2, pp. 643–655, doi: 10.3329/jsr.v13i2.50574.

-**TRISHIN , A.V.,ZHDANOVICH , M.,SAVVATEEVA,L., TOPTYGIN , A.,DONENKO ,M.(2004)**. Protease activity of Klebsiella pneumoniae of different virulence ,Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., no 4, p. 7-11.

-**TRSTENJAK, T., DUNIC, A.J., MLINARIC, S., BEGOVIC, L., ŠKORO, M., CESAR,V.,LEPEDUS, H.(2020)**. Anatomy chlorophyll content and photosynthetic performance in current year and previous-year Aleppo pine (Pinus halepensis Mill.) needles. Bot. Serbica 44, 61– 69.

**-TSAKNIS ,J.,LALAS,S.,GERGIS,V.,DOUROGLOU,V.,SPILOTIS ,V.(1999).**Characterization of Moringa oleifera variety Mbololo seed oil of Kenya. Journal of Agricultural and Food Chemistry.,47: 4495-4499.

**-TUKAN,S., AL-ISMAIL,K., AJO,R.Y.,AL-DABBAS, M.M.(2011).** Seeds and seed oil compositions of Aleppo Pine (Pinus halepensis Mill.) grown in Jordan.la rivista italiana delle sostanze grasse.90, 87–93.

## V

**-VETROVSKÝ, T., MORAIS, D., KOHOUT, P., LEPINAY, C., ALGORA, C., AWOKUNLE HOLLA, S., BAHNMANN, B. D., BILOHNEDA, K., BRABCOVA, V., D'ALO, F., HUMAN, Z. R., JOMURA, M., KOLARIK, M., KVASNICKOVA, J., LLADO, S., LOPEZ-MONDEJAR, R., MARTINOVIC, T., MASINOVA, T., MESZAROSOVA, L. (2020).** GlobalFungi: a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. Scientific Data, 7(1).

**-VIJAYALAKSHMI, S., VENKAT , K.S.,THANKAMANI, V.(2011).** Optimization and cultural characterization of Bacillus RV.B2.90 producing alkalophilic thermophilic protease. Res. J. Biotechnol, 6, 26–32.

## Y

**-YONGABI, K. A. (2012).** A sustainable Low-Cost phytodisinfectants and filter alternative for water Purification, thèse de doctorat en sciences, université d'Adelaide, Australie, p207.

**-YUSOFF, M. M. (2016).** Aqueous enzymatic extraction of Moringa oleifera oil with high pressure processing pre-treatment, these de doctorat en philosophie, department aliment et sciences Alimentaires, universite de Reading, angleterre, p214.

## Z

**-ZINK , R., CHATTERJEE, A.T.(1985).** Cloning and expression in Escherichia coli of pectinase genes of Erwinia carotovora subsp. carotovora, Appl. Environ. Microbiol., vol. 49, no3, p. 714-717.

## Annexes :

### Annexe 01 : les milieux utiliser pour la prurification

#### Gélose Eosine Methylene Blue (EMB)

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Peptone .....                         | 10g    |
| Lactose .....                         | 5g     |
| Saccharose .....                      | 5g     |
| Hydrogénophosphate de potassium ..... | 2g     |
| Eosinase y.....                       | 400mg  |
| Bleu de méthylène .....               | 65mg   |
| Agar .....                            | 13.5g  |
| Eau distillée .....                   | 1000ml |

pH= 7,2

#### Gélose Chapman

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Peptone .....            | 10g    |
| Extrait de bœuf .....    | 1g     |
| Chlorure de sodium ..... | 75g    |
| D-mannitol .....         | 10g    |
| Rouge de phénol .....    | 25mg   |
| Agar .....               | 15g    |
| Eau distillée .....      | 1000ml |

pH= 7,4

#### Bouillon nutritif

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Tryptone.....           | 10,0g   |
| Extrait de viande ..... | 5,0 g   |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 g   |
| Eau distillée .....     | 1000 ml |

pH 7,2 ± 0,2

### Annexe 02 : milieux utiliser pour l'extraction des enzymes

#### Cœur cerval a base de 1 % d'arginine

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Extrait cœur-cervelle .....           | 17,5 g  |
| Peptone pancréatique de gélatine..... | 10,0 g  |
| Chlorure de sodium.....               | 5,0 g   |
| Phosphate disodique .....             | 2,5 g   |
| Glucose.....                          | 2,0 g   |
| Arginine.....                         | 10g     |
| Eau distillée .....                   | 1000 ml |

**Bouillon nutritif**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Tryptone .....           | 100 g   |
| Extrait de viande.....   | 5,0 g   |
| Chlorure de sodium ..... | 5,0 g   |
| Eau distilles .....      | 1000 ml |

pH  $7,2 \pm 0,2$

**Tampn phosphate salin sans  $Mg^{2+}$  ni  $Ca^{2+}$** 

|  |        |
|--|--------|
| L'eau distillée .....                  | 1000ml |
| NaCl .....                             | 8 g    |
| KCl .....                              | 0,2 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1,44g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 0,24g  |

Ph= 7,4 .

**Deodycl sulfate de sodium**

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| L'eau distillée ..... | 1000 ml |
| SDS.....              | 10g     |

**Solution de Lyzosyme**

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Lysosyme .....               | 200 mg |
| Tampon phosphate salin ..... | 20 ml  |

**Annexe 03 : Milieux pour les tests enzymatiques****Agar à 5% de lait écrémé**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Lait écrémé.....    | 50ml   |
| Agar .....          | 10g    |
| Eau distillée ..... | 1000ml |

**Milieu gélose à 1 % amidon**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Gélose nutritive..... | 1000ml |
| Amidon.....           | 10g    |

**Milieu gélosé à 0,5% de cellobiose**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Gélose nutritive..... | 1000ml |
| Cellobiose.....       | 5g     |

### Milieu pectine-agar

Pectine ..... 5g  
Extrait de levure ..... 5g  
Agar ..... 20g  
Eau distillée ..... 1000ml

### Annexe 04 : Les indicateurs colorés

#### Rouge Congo à 0.1% :

Rouge Congo ..... 0.1g  
Eau distillée ..... 1000ml

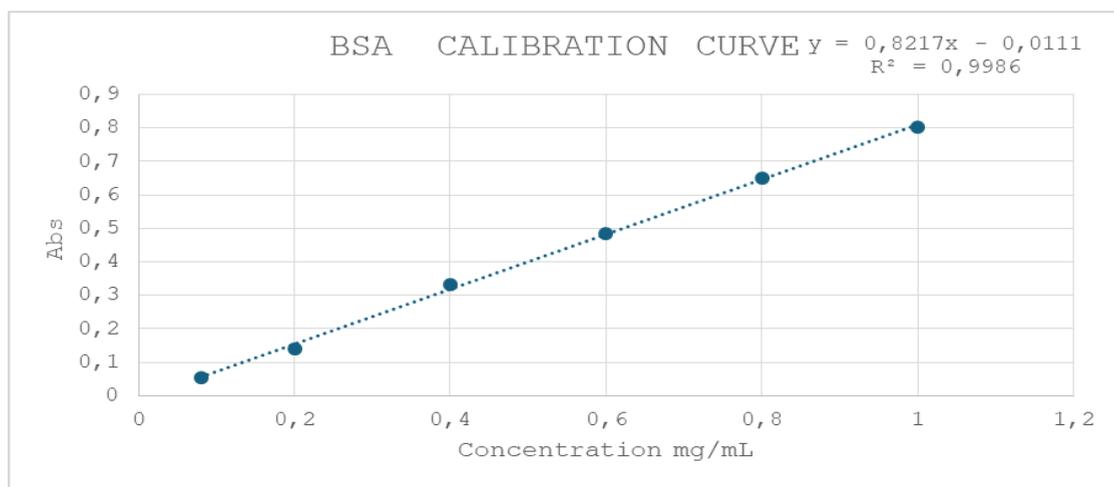
- Dissoudre 0.1g de Rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 1000ml.

#### Acétate de cuivre à 0,7%

Acétate de cuivre ..... 7,5g  
Eau distillée ..... 1000ml

- Dissoudre 7,5g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 1000ml.

### Annexe 05 : Courbe d'étalonnage BSA



### Annexe 06 : les souches de références

| Souche                       | Référence  |
|------------------------------|------------|
| <i>Escherichia coli</i>      | ATCC 25922 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538  |

## Résumé

Ce manuscrit décrit l'extraction des protéines à partir de bactéries déjà isolées de *Moringa oleifera* et *Pinus halepensis* en suivant des protocoles adaptés. Les extraits protéiques ainsi obtenus ont été testés pour leurs activités enzymatiques et leur capacité à inhiber la croissance des souches bactériennes pathogènes *E.coli* et *Staphylococcus aureus* en utilisant des méthodes standard de microbiologie.

Les résultats indiquent une diversité dans les profils enzymatiques des extraits obtenus à partir des bactéries isolées de *Moringa oleifera* et *Pinus halepensis*. L'évaluation de leur activité antibactérienne révèle des variations dans leur efficacité contre les souches testées, suggérant un potentiel dans le développement de nouvelles solutions antibactériennes. Cette étude met en lumière le rôle des protéines extraites de ces bactéries en tant qu'agents antibactériens prometteurs, ouvrant la voie à de futures recherches dans ce domaine.

**Mots clés :** *Moringa oleifera*, *Pinus halepensis*, activité antibactérienne, souches bactériennes.

## Abstract

This manuscript outlines the extraction of proteins from bacteria already isolated from *Moringa oleifera* and *Pinus halepensis* using tailored protocols . The protein extracts obtained were tested for their enzyme activity and their ability to inhibit the growth of pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* et *E.coli* using standard microbiological methods.

The results reveal a diversity in the protein profiles of the extracts derived from bacteria isolated from *Moringa oleifera* and *Pinus halepensis*. Assessment of their antibacterial activity shows variations in efficacy against the tested strains, indicating potential for the development of new antibacterial solutions. This study highlights the role of proteins extracted from these bacteria as promising antibacterial agents, paving the way for future research in this field.

**Keywords :** *Moringa oleifera*, *Pinus halepensis*, antibacterial activity, bacterial strains.

## المخلص

هذه المذكرة تصف عملية استخلاص البروتينات من البكتيريا التي تم عزلها من نباتات مورينجا أوليفيرا و صنوبر هالبينيس وفقاً لبروتوكولات مصممة خصيصاً. وقد تم فحص استخلاصات البروتين المستحصلة للتأكد من النشاط الانزيمي و قدرتها على تثبيط نمو سلالات بكتيرية ضارة و هي ايشيريشيا القولونية و المكورات العنقودية الذهبية ، باستخدام طرق ميكروبيولوجية قياسية

أظهرت النتائج تنوعاً في ملامح استخلاصات البروتينات المشتقة من البكتيريا المعزولة من نباتات مورينجا أوليفيرا و صنوبر هالبينيس. تقييم نشاطها المضاد للبكتيريا كشف عن تباين في فعاليتها ضد السلالات التي تم اختبارها، ما يشير إلى إمكانية تطوير حلول جديدة مضادة للبكتيريا. تُسلط هذه الدراسة الضوء على دور البروتينات المستحصلة من هذه البكتيريا كعوامل واعدة في مجال المضادات الحيوية، وتمهد الطريق للبحوث المستقبلية في هذا المجال.

كلمات مفتاحية: مورينجا أوليفيرا، صنوبر هالبينيس، النشاط المضاد للبكتيريا، سلالات البكتيريا.