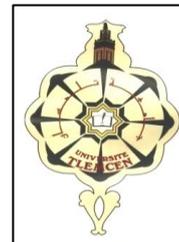




République Algérienne Démocratique et Populaire
Université de Tlemcen - Faculté des sciences de la nature et de la
des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie



Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et
à l'Environnement

N° d'ordre :

N° de série:

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en
Microbiologie Appliquée

Option : *Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement
Microbien*

Présentée par

M^{elle} : NAS Fatima

Thème

Étude de molécules antibiotiques biosynthétisées par
une bactérie extrêmophile B₁ isolée d'une sebkha d'EL
Goléa (Algérie).

Soutenue le : / /

Devant le jury :

Président	: M ^F Moussa-Boudjemaa B.	Professeur	Univ. Tlemcen
Rapporteur	: M ^{me} Khelil N.	Maitre de conférences. classe A	Univ. Tlemcen
Examineurs	: M ^F Bendahou M.	Maitre de conférences. classe A	Univ. Tlemcen
	: M ^F Drissi M.	Maitre de conférences. classe A	Univ. Tlemcen

Année universitaire 2012-2013

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire de **Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (L.A.M.A.A.B.E.)**. Université Abou Bakr Belkaid- Tlemcen.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à mon encadreur Madame **Khelil Nihel** née **Klouche** Maitre de conférence classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, mais surtout pour sa qualité humaine. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement Mr **Moussa Boudjemaa B.** Professeur à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen et directeur du laboratoire **L.A.M.A.A.B.E.** C'est un grand honneur pour moi de vous avoir comme président du jury. Votre sens du devoir, votre sérieux, et votre compétence m'ont énormément marquée.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Mr **Bendahou M.** Maitre de conférences classe A. à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen et à Mr **Drissi M.** Maitre de conférences classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté d'être membre de ce jury et d'examiner ce modeste travail. Je recevrai vos critiques avec la plus grande attention afin de profiter de votre expertise.

Un merci tout particulier à Mr **Moussaoui A.**, Mr **Abdelouahid D. E.**, Mme **Boucherit Z.** Mme **Hassaine H.** Mme **Malek F.** et Mme **Bendimered N.** pour leurs précieux conseils, leur soutien, leur gentillesse, et les moments agréables ainsi que l'enthousiasme qu'ils ont manifesté au cours de leur enseignement de notre promotion au cours de l'année théorique 2010-2011.

Je souhaite également remercier chaleureusement **Pr. Kara B.** (laboratoire du Catalyse et Synthèse en Chimie Organique - Tlemcen) pour son aide précieuse.

Je n'oublie pas l'accueil chaleureux de **Dr. Baghdad C.** au sein du laboratoire (Produits Naturels - Tlemcen) afin de réaliser l'étude chromatographique, merci pour votre esprit généreux et votre patience.

Je tiens à exprimer également ma plus profonde gratitude à **Dr Jean Luc Cayol** (Laboratoire IRD – Marseille - France) pour sa collaboration par la réalisation de l'étude phylogénétique de notre souche.

J'adresse également un immense merci à tous les membres des équipes « Sécurité microbienne des aliments », « Substances naturelles antimicrobiennes », « Hygiène hospitalière » et « Extrêmophiles » du laboratoire **L.A.M.A.A.B.E.** pour leur aide et leur soutien considérable ainsi que pour leur bonne humeur.

Un tel travail ne peut être réalisé sans le soutien de tous les jours par des gens qui ne comprennent pas nécessairement ce que tu fais, mais qui sont là lorsque tu en as besoin. Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

DEDICACES

A l'aide du tout puissant '**Allah**', le Clément, le Miséricordieux, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

A ceux que personne ne peut compenser les sacrifices pour mon éducation et mon bien être, ceux qui m'ont accordée leur soutien, amour et bénédiction dans les instants les plus difficiles de mon existence, **mes parents**, qui me sont les plus chers au monde. Qu'Allah me les garde. Vos prières et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Je voudrais à travers ce modeste travail, vous rendre un hommage mérité et vous dire combien je suis fière de l'éducation que vous m'avez donnée. Puisse le Tout Puissant nous accorder de vous avoir encore longtemps auprès de nous pour que vous puissiez bénéficier de l'ombre de l'arbre que vous avez si jalousement protégé et entretenu.

A **Mohammed**, en témoignage de tout mon respect et amour. J'ai toujours trouvé auprès de toi la compréhension et le soutien. Quoique je dise, les mots ne seront jamais à la portée de ce que je ressens. Que dieu te protège.

A tous mes frères et à toutes mes belles sœurs, en particulier « **la Tounssia** », qui ont cru en moi, qui m'ont encouragé et m'ont donnée la force d'aller jusqu'au bout. Qu'Allah les protège.

A la jumelle de mon âme, ma sœur **Noria** et son mari ainsi leurs petites filles **Fatima Zohra** et **Yamna**, que Dieu les protège et les prête la bonne santé et une longue vie.

A ma sœur **Asma** et mon petit frère **Yasser** mon chéri que j'adore plus fort que moi-même, que Dieu les protège.

A toutes mes chères nièces et mes neveux en témoignage de mon amour et ma profonde admiration.

A tous mes collègues au laboratoire (L.A.M.A.A.B.E.) **Nadia, Dounia, Khadija, Nassima, Samia, Fatima, Chafika, Karima, Amira, Amina, Sara, Ibrahim, Omar, Touhami, Fethi, Amine** et **Monaim**, en témoignage de tout mon respect. Continuons dans la voie de la consolidation de nos liens de fraternité et d'amitié, gardons toujours l'esprit d'équipe.

En témoignage de tout mon amour, je dédie ce travail à toutes mes copines **Nora, Latéfa, Iman, Chérifa, Leila, Samira, Fatima Zohra, Nadia, Soumia, Assia, et Samira Mebkhouti**, qui m'ont toujours encouragé, poussé et motivé dans mes études.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

Table de matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique

1. Les microorganismes extrêmophiles 5

1. 1. Les microorganismes halotolérants et halophiles 6

1. 2. Les microorganismes extrêmophiles et la température 8

1. 3. Microorganismes alcalophiles et acidophiles 9

1. 3. 1. Microorganismes acidophiles 9

1. 3. 2. Microorganismes alcalophiles 10

1. 4. Microorganismes piézophiles (barophiles) 11

2. Les microorganismes poly extrêmophiles 13

3. Écosystèmes salins et hypersalins 13

3. 1. Les sols salés..... 14

3. 1. Les eaux salées..... 15

3. 1. 1. Environnements thalassohalins 15

3. 1. 2. Environnements athalassohalins 16

4. Les groupes phylogénétiques des halophiles et des halotolérants..... 17

5. Adaptation de microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité	20
5. 1. L'adaptation par accumulation de KCl	20
5. 2. L'adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs	21
6. Diversité métabolique de microorganismes halophiles et halotolérants.....	22
7. Biotechnologie des microorganismes halophiles et halotolérants.....	24
8. Le genre <i>Bacillus</i>	28
8. 1. Taxonomie du genre <i>Bacillus</i>	28
8. 2. Caractéristiques bactériologiques du genre <i>Bacillus</i>	30
8. 3. Écologie du genre <i>Bacillus</i>	30
8. 4. Potentiels biotechnologiques de bactéries appartenant au genre <i>Bacillus</i>	31
9. Méthodes de screening des métabolites secondaires	33
9. 1. Screening primaire	34
9. 2. Screening secondaire	34
9. 3. Caractérisation des composés bioactifs	36

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique	37
1. 1. Origine et conservation de la souche	37
1. 2. Description du site d'étude	37
1. 3. Revivification de la souche	39
1. 4. Vérification de la pureté de la souche	39
2. Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832.....	40
2. 1. Caractères phénotypiques	40
2. 1. 1. Caractères microscopiques.....	40
2. 1. 2. Caractères macroscopiques (culturaux)	40

2. 1. 3. Caractères physiologiques.....	40
2. 1. 3. 1. Croissance à différentes températures.....	41
2. 1. 3. 2. Croissance à différents pH.....	41
2. 1. 3. 3. Tolérance à la salinité.....	41
2. 1. 4. Caractères biochimiques.....	41
2. 1. 4. 1. Le système api 20 ^E	41
2. 1. 4. 2. La recherche de la catalase.....	42
2. 1. 4. 3. La recherche de l'oxydase.....	42
2. 1. 4. 4. La recherche de la Nitrate réductase.....	42
2. 1. 4. 5. La recherche de l'ADNase.....	43
2. 1. 4. 6. Hydrolyse de l'amidon.....	43
2. 1. 4. 7. La recherche de la Lécithinase.....	43
2. 1. 4. 8. La dégradation de la caséine.....	43
2. 1. 4. 9. La dégradation de l'esculine.....	44
2. 1. 4. 10. L'hydrolyse du tween 80.....	44
2. 1. 4. 11. Mannitol mobilité.....	44
2. 1. 4. 12. Le type respiratoire.....	44
2. 1. 5. Étude du profil de résistance de la ML9832 aux antibiotiques.....	44
2. 2. Caractères génotypiques.....	46
2. 2. 1. Étude phylogénique de la souche.....	46
2. 2. 1. 1. Extraction et purification de l'ADN génomique.....	46
2. 2. 1. 2. Réaction de polymérisation en chaine (PCR) et purification du fragment amplifié.....	46

2. 2. 1. 3. Séquençage et analyse	47
3. Pré-caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832	48
3. 1. Germes test de référence utilisés	48
3. 2. Recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires sur milieu solide (technique des cylindres d'agar)	49
3. 3. Recherche de l'activité antimicrobienne du surnageant	49
3. 4. Choix du meilleur milieu pour la production des activités antimicrobiennes	50
3. 5. L'effet du temps d'incubation sur la production des activités antimicrobiennes ..	50
3. 6. L'extraction des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832.....	50
3. 6. 1. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la souche ML9832 cultivée en milieu solide	51
3. 6. 2. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la souche ML9832 cultivée en milieu liquide	52
3. 6. 2. 1. Test de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique	52
3. 6. 2. 2. Test de l'activité antifongique de l'extrait chloroformique	52
3. 7. Séparation des activités antimicrobiennes	53
3. 7. 1. Chromatographie sur couche mince	53
3. 7. 2. Les systèmes éluants utilisés	54
3. 7. 3. La révélation chimique	54
3. 8. Étude spectrale des activités antimicrobiennes par l'Infra-rouge	55

Résultats et Discussion

1. Caractérisation phénotypique et géotypique de la souche ML9832.....	57
1. 1. Résultats	57
1. 1. 1. Caractérisation phénotypique	57
1. 1. 1. 1. Caractérisation microscopique	57
1. 1. 1. 2. Caractérisation macroscopique	59
1. 1. 1. 3. Caractéristiques physiologiques	60
1. 1. 1. 4. Caractéristiques biochimiques.....	63
1. 1. 1. 5. Étude de l'antibiorésistance de la souche ML9832	68
1. 1. 2. Caractérisation géotypique	70
1. 2. Discussion	71
2. Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832.....	80
2. 1. Résultats.....	80
2. 1. 1. Résultats de la recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires sur milieu solide par la technique des cylindres d'agar et l'effet du temps d'incubation	80
2. 1. 2. Résultats de la recherche de l'activité antimicrobienne du surnageant.....	84
2. 1. 3. Résultats du choix du meilleur milieu pour la production des activités antimicrobiennes par la souche ML9832	85
2. 1. 4. Résultats de l'extraction des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832.....	86
2. 1. 4. 1. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la souche ML9832 cultivée en milieu solide.....	86
2. 1. 4. 2. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la souche ML9832 cultivée en milieu liquide	91
2. 1. 5. Résultats de la séparation des activités antimicrobiennes par CCM	95

2. 1. 6. Résultats de l'étude spectrale par Infra-Rouge (IR) des activités antimicrobiennes de la souche ML9832	98
2. 2. Discussion.....	100
3. Discussion générale	108
Conclusion générale.....	113
Références bibliographiques	116
Annexe.....	138

ملخص

تتواجد الكائنات المجهرية في الطبيعة بصفة لا تعد ، حيث يمكنها تحدي قوانين البيولوجيا و النمو في البيئات القاسية. تدعى هذه الكائنات بـ " الكائنات غير العادية " أو " Les extrémophiles ". تعتبر الكائنات المقاومة و المحبة للملوحة من بين هذه الكائنات الاستثنائية حيث أن مقاومتها للملوحة تمنحها خصائص مذهلة في ميدان التكنولوجيا الحيوية.

يهدف دراسة النشاط المضاد للميكروبات لعزلة مقاومة للملوحة ذات الرمز ML9832 معزولة في نسبة ملحوة تقدر بـ 25 % من كلوريد الصوديوم (و/ح) من بيئة شديدة الملوحة " سبخة El Goléa " المتواجدة بالصحراء الجزائرية ، تم تصنيفها وتمييز نشاطها المضاد للميكروبات بصفة أولية .
الدراسة التصنيفية للعزلة تمت بدراسة خصائصها الظاهرية والجينية. العزلة تظهر على شكل عصيات ايجابية الجرام ، هوائية ، قادرة على تشكيل أبواغ شبه طرفية .

البحث عن أنشطة إمهاة إنزيمية خارج خلوية و دراسة مدى تحملها لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم [0، 2، 5، 7.5، 10، 15، 17.5، 20، 25، 30 % (و/ح)] و لدرجات حرارة عالية و أخرى منخفضة [4، 15، 25، 30، 37، 45، 55 درجة]، كذلك دراسة قابليتها للنمو على أوساط ذات حموضة و أوساط قاعدية (2، 5، 7، 9، 11، 13) و كيفية تعاملها مع بعض المضادات الحيوية أظهرت أن هذه العزلة تفرز بعض الإنزيمات و أنها قادرة على النمو في وسط ملحي 0 – 25 % من كلوريد الصوديوم (حيث تبلغ أوجها عند 0 %)، و درجات حرارة ما بين 15° و 37° (حيث تبلغ أوجها عند 30°) ، و درجة حموضة pH ما بين 5 و 9 (حيث تبلغ أوجها عند pH = 7) . كما أوضحت هذه الدراسة قدرة هذه العزلة على مقاومة Céfotaxim و Fosfomycine. التحليل الفيلوجيني للعزلة أظهر بأنها تمثل عزلة جديدة في فصيلة الـ " Bacillales " بنسبة تشابه معادلة لـ 96 % . و تقترب من السلالتين *Bacillus pseudofirmus* و *Bacillus halodurans* بنسبتي تشابه 95 % و 93,3 % على الترتيب.

تمت دراسة نشاط العزلة ML9832 المضاد للميكروبات ضد بكتيريات ايجابية و سلبية الجرام، ضد بعض الطفيليات و خميرة. البحث الأولي عن النشاط المضاد للميكروبات تم بتقنية الانتشار داخل أوساط الزرع الصلبة : أسطوانات الأجار، حيث تبين بأن العزلة المدروسة قامت بتثبيط معظم الميكروبات المختبرة.

أثر وسط زرع هذه العزلة و مدة حضانتها على تركيب جزيئات ناشطة ضد الميكروبات أوضحت أن نشاطها المضاد يبلغ أوجه بعد 72 ساعة من الزرع على وسط Gélose nutritive.

عملية استخلاص المركبات المضادة للميكروبات بعدد من المذيبات العضوية مختلفة القطبية بعد اختبار نشاط كل المستخلصات ضد الميكروبات، أظهرت بان الكلورفورم هو الأفضل من اجل استخلاص المركبات المضادة للميكروبات المصنعة من طرف العزلة ML9832. كشفت التقنية الكروماتوغرافية المنجزة على طبقة رقيقة من gel de silice عن وجود نوعين من الجزيئات في مستخلص الكلورفورم : مركبات امينية و مركبات فينولية . أظهرت الدراسة الطيفية IR نتائج موافقة للدراسة الكروماتوغرافية.

الكلمات المفتاحية: عزلة جديدة، كائنات مجهرية غير عادية ، سبخة، مواد فعالة .

Résumé

Les microorganismes sont innombrables dans la nature, ils peuvent défier les lois de la biologie et prospérer dans des environnements extrêmes. Ils sont globalement qualifiés d'extrémophiles. Les halotolérants et halophiles font partie de ces êtres exceptionnels, leur résistance aux fortes salinités leur confère des caractéristiques étonnantes, ce qui révèle un véritable atout biotechnologique.

Une recherche ayant pour objectif, l'étude des activités antimicrobiennes d'une souche halotolérante ML9832 isolée à 25% de NaCl d'un environnement hypersalin algérien, lac d'El Goléa, est réalisée. Pour cela, une étude taxonomique de la souche ainsi qu'une pré-caractérisation de ses activités antimicrobiennes sont effectuées.

L'étude taxonomique a été accomplie par une identification phénotypique et génotypique. La souche ML9832 est un bâtonnet immobile à Gram positif, aéro-anaérobie facultatif capable de former des endospores sub-terminales. La recherche de certaines enzymes et l'analyse de sa tolérance à des concentrations de NaCl [0, 2, 5, 7.5, 10, 15, 17.5, 20, 25 et 30 % (p/v)], aux pH acides et alcalins [2, 5, 7, 9, 11, 13], et à des températures élevées et basses [4, 15, 25, 30, 37, 45, 55°C] ainsi que son profil de résistance à onze antibiotiques (RA, C, PT, CTX, CN, OX, AMC, FF, TOB, K, PNV) ont permis de mettre en évidence qu'elle possède la catalase, l'oxydase, l'amylase, la nitrate réductase, la lécithinase, la caseinase, la gélatinase, l'esculinase, et une lipase et qu'elle est capable de se développer à des concentrations salines allant de 0 à 25% de NaCl (p/v) avec un optimum à 0%, à des pH allant de 5 à 11 avec un optimum à 7, à des températures de 15°C à 37°C avec un optimum à 30°C et de résister vis-à-vis la Céfotaxime et la Fosfomycine. L'analyse phylogénétique de la souche ML9832 a révélé une similarité de 96% avec les espèces appartenant à l'ordre des *Bacillales* ; elle a permis de conclure que l'isolat constitue un nouveau taxon phylogénétiquement proche de l'espèce *Bacillus pseudofirmus* avec un pourcentage de similitude de 95% et de l'espèce *Bacillus halodurans* avec un pourcentage de similitude de 93,3%.

L'activité antimicrobienne de la souche a été mise en évidence contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, des champignons et une levure. Un screening primaire a été réalisé par la technique des cylindres d'agar. La souche ML9832 exerce un effet contre la plupart des germes test utilisés. L'étude de l'effet du milieu de culture et du temps d'incubation de la souche ML9832 sur la production de molécules antimicrobiennes a permis de déduire que la production est maximale après 72 heures de culture sur la gélose nutritive. L'extraction, par une batterie de solvants organiques de polarité différente, nous a permis de choisir le chloroforme comme meilleur solvant pour extraire les activités antimicrobiennes produites par la souche.

La technique chromatographique sur couche mince de gel de silice a révélé la présence de deux types de molécules : des amines et des phénols dans l'extrait chloroformique. Le spectre Infra-Rouge donne des pics caractéristiques correspondant aux mêmes groupements.

Mots clés : Nouveau taxon, Extrémophile, Sebkhia, molécules bioactives.

Abstract

Microorganisms are uncountable in nature; they can defy the law of biology and prosper in different extremes environments. They are globally qualified as extremophiles. Halophilic and halotolerant microorganisms are a member of those exceptional being. Their resistance in high salinity confers those surprising characteristics, what reveals a real biotechnological trump.

A research having for objective, study of antimicrobial activities of a halotolerant bacterial strain named ML9832 isolated at 25% of NaCl (w/v) from an Algerian hypersalin environment, El Golea Sabkha, was realized. For that purpose, a taxonomical study of the strain and a preliminary characterization of these antimicrobial activities were made.

Taxonomical study was accomplished by a phenotypic and genotypic identification. The strain ML9832 is an aero-anaerobic, no motile, Gram positive rod-shaped bacterium that produces sub terminal spores. The research of the hydrolytic activities, the Kinetics of growth at different saline concentrations [0, 2, 5, 7.5, 10, 15, 17.5, 20, 25 and 30% % NaCl (w/v)], at acidic and alkaline pH [2, 5, 7, 9, 11, 13], and at low and high temperatures [4, 15, 25, 30, 37, 45, 55°C] also his resistance to 11 antibiotics [RA, C, PT, CTX, CN, OX, AMC, FF, TOB, K, PNV] showed that the stain ML9832 possessed the catalase, oxidase, amylase, gelatinase, nitrate reductase, lécithinase, esculinase, caseinase and a lipase, it is able to grow at NaCl concentration range of 0 - 25 % with optimum at 0%, at pH range of 5 – 11 with optimum at pH=7 and at temperature range of 15 - 37°C with optimum at 30°C. Moreover, the strain was resistant to Cefotaxim and Fosfomycin.

Phylogenetic analysis allows us to conclude that the strain ML9832 constitute **new taxa** in the order of *Bacillales* with a similarity of 96%. It is phylogenetic ally neighboring to the *Bacillus pseudofirmus* with a similarity of **95%** and *Bacillus halodurans* with a similarity of **93,3%**.

The antimicrobial activity of the strain ML9832 was preliminarily screened by adopting agar plug method against Gram positive, Gram negative bacteria, fungi and yeast. The strain is active against a majority of microorganisms test.

Study of the effect of the medium of culture and the time of incubation on the antibacterial metabolites production showed that activity reach its maximal value in the 72 hours of culture in nutrient agar. Extraction with various organic solvents of varying polarity enabled us to choice the chloroform as the best solvent to extract the antimicrobial activities produced by the strain ML9832.

Thin layer chromatography on silica gel makes clear the presence of two types of molecules: amines and phenols in chloroformic extract. The Infra-Rouge spectra give a characteristic peaks corresponding to the same type of molecules.

Key words : New taxa, Extremophile, Sabkha ,Bioactives molecules.

Liste des Abréviations

µl	: microlitre
v/v	: volume/volume
UFC	: Unité formant colonie
ADNase	: Désoxyribonucléase
API 20^E	: Appareil et Procédés d'Identification 20 entérobactéries
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adénosine tri phosphate
BN	: Bouillon nutritive
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
cm	: centimètre
g/l	: gramme par litre
GN	: Gélose nutritive
h	: heure
HCl	: Chlorure d'hydrogène
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
IR	: Infra- Rouge
KCl	: Chlorure de potassium
KDa	: Kilo Dalton
Km	: Kilomètre
L	: Litre
M	: Concentration molaire
ml	: millilitre
mm/ an	: millimètre par an
MPa	: Méga pascal
nm	: nanomètre
p/v	: poids /volume
pH	: potentiel d'hydrogène
Rf	: Rapport frontale
t/min	: tours par minute

Liste des figures

Figure N° 1: Pseudo-sables très salés et sodiques de la lunette d'El Mabtuh (basse vallée de la Medjerda)	14
Figure N° 2 : Sols salés et sodiques des sebkhas en Tunisie	14
Figure N° 3 : Habitats thalassohalins	15
Figure N° 4 : Habitats athalassohalins	16
Figure N° 5 : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiaux	18
Figure N° 6 : Position phylogénétique des différentes espèces du genre <i>Bacillus</i> d'après l'analyse des séquences d'ARNr 16S (méthode de Neighbor-Joining)	29
Figure N° 7 : Screening primaire de l'activité antimicrobienne par la technique des stries transversales	34
Figure N° 8 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la technique des puits	35
Figure N° 9 : Observation microscopique de la souche ML9832, cultivée sur le milieu KN dépourvu de NaCl, après coloration par le bleu de méthylène (Observation par microscope optique G x100 à immersion)	57
Figure N° 10 : Examen microscopique, après coloration de Gram, de la souche ML9832 après 24 heures d'incubation sur le milieu KN dépourvu de NaCl à 30°C (Observation par microscope optique G x100 à immersion)	58
Figure N° 11 : Examen microscopique, après coloration de Gram, de la souche ML9832 après 72 heures d'incubation sur le milieu KN dépourvu de NaCl à 30°C (Observation par microscope optique G x100 à immersion)	58
Figure N° 12 : Culture de la souche ML9832 sur milieu de culture KN dépourvu de NaCl après 24 heures d'incubation à 30°C	59
Figure N° 13 : Culture de la souche ML9832 sur milieu KN additionné de 10% de NaCl après 6 jours d'incubation à 30°C	59

Figure N° 14 : Cinétique de la croissance de la souche ML9832 à différentes concentrations en NaCl.....	61
Figure N° 15 : Cinétique de la croissance de la souche ML9832 à différentes températures.	62
Figure N° 16 : Cinétique de la croissance de la souche ML9832 à différents pH.....	62
Figure N° 17 : Résultats des caractères biochimiques, de la souche ML9832, réalisés par le système Api 20 ^E après 24 heures d'incubation à 30°C.	64
Figure N° 18 : Résultats (A, B, et C) de la recherche des enzymes respiratoires de la souche ML9832.....	65
Figure N° 19 : Résultats de la recherche des activités hydrolytiques de la souche ML9832 après 24 heures d'incubation à 30°C.....	66
Figure N° 20 : Résultat de la mise en évidence du type respiratoire de la souche ML9832 sur la gélose VF après 24 heures d'incubation à 30°C.....	67
Figure N° 21 : Résultat de la culture de la souche ML9832 sur le milieu Mannitol-mobilité après 24heures d'incubation à 30°C.....	67
Figure N° 22 : Résultats de l'étude de l'antibiorésistance de la souche ML9832	69
Figure N° 23 : Arbre phylogénétique de la souche ML9832 construite d'après l'analyse des séquences de l'ARNr 16S montrant sa position au sein de l'ordre des <i>Bacillales</i>	70
Figure N° 24 : Test d'activité antimicrobienne de la souche ML9832, cultivée sur milieu KN gélosé exempt de NaCl, contre les bactéries à Gram positif par la technique des cylindres d'agar, ainsi que l'effet du temps d'incubation sur son activité.....	82
Figure N° 25: Test d'activité antimicrobienne de la souche ML9832, cultivée sur milieu KN gélosé exempt de NaCl, contre les bactéries à Gram négatif par la technique des cylindres d'agar, ainsi que l'effet du temps d'incubation sur son activité.....	83
Figure N° 26 : Test d'activité antifongique de la souche ML9832, cultivée sur milieu KN gélosé exempt de NaCl, par la technique des cylindres d'agar, ainsi que l'effet du temps d'incubation sur son activité contre <i>Candida albicans</i>	84
Figure N° 27 : Activité antibactérienne du surnageant et des extraits organiques extraits à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu solide contre les bactéries à Gram positif	89

Figure N° 28 : Activité antibactérienne du surnageant et des extrait organiques extraits à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu solide contre les bactéries à Gram négatif	90
Figure N° 29 : Activité antibactérienne de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide contre les bactéries à Gram positif	93
Figure N° 30 : Activité antibactérienne de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide contre les bactéries à Gram négatif	94
Figure N° 31 : Activité antifongique de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide contre <i>Candida albicans</i>	95
Figure N° 32 : Comportement de l'extrait chloroformique de la souche ML9832 sur couche mince de gel de silice après révélation chimique	97
Figure N° 33 : Spectre Infra-Rouge de l'extrait chloroformique de la souche ML9832.....	99

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Conditions extrêmes et microorganismes appropriés	12
Tableau N°2 : Exemples de concentrations salines maximales limitant certains processus microbiens	23
Tableau N°3 : Exemples d'extrêmeoenzymes produites par des microorganismes halophiles	27
Tableau N°4 : Caractères physico-chimiques du lac d'El Goléa et d'autres écosystèmes hypersalins et marins	38
Tableau N°5 : Les antibiotiques utilisés	45
Tableau N°6 : Germes test de référence utilisées	48
Tableau N°7 : Gamme de conditions physicochimiques permettant la croissance de la souche ML9832	61
Tableau N°8 : Résultats de différents tests biochimiques de la souche ML9832 ...	63
Tableau N°9 : Résultats de l'antibiogramme de la souche ML9832 comparés aux valeurs de référence données par Bauer et al. (1966)	68
Tableau N°10 : Récapitulation des différentes caractéristiques de la souche ML9832, de <i>Bacillus pseudofirmus</i> et de <i>Bacillus halodurans</i>	73
Tableau N°11 : Caractéristiques phénotypiques différentielles entre la souche ML9832 et d'autres espèces halotolérantes du genre <i>Bacillus</i>	78
Tableau N°10 : (suite) Caractéristiques phénotypiques différentielles entre la souche ML9832 et d'autres espèces halotolérantes du genre <i>Bacillus</i>	79
Tableau N°12 : Résultats du test de l'activité antimicrobienne de la souche ML9832 et l'effet de son temps d'incubation sur cette activité	81
Tableau N°13 : Résultats de l'effet du milieu d'incubation de la souche ML9832 sur son activité antimicrobienne	86
Tableau N°14 : Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues par les différents solvants à partir du milieu solide	88
Tableau N°15 : Résultats du test de l'activité antimicrobienne de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide (technique des disques en papier)	92
Tableau N°16 : Résultats du test de l'activité antifongique de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide (technique d'empoisonnement de la nourriture)	92

Tableau N°17 : Comportement de l'extrait chloroformique de la souche ML9832 sur couche mince de gel de silice, et les rapports frontaux calculés après révélation chimique. 96

Introduction générale

Introduction générale

Dans la nature, les microorganismes de par leur spécificité, leurs propriétés uniques et leur grande diversité métabolique sont innombrables et abondent différents types d'habitats. Cela inclut des habitats tels que le sol, l'eau, l'air. En effet, la stérilité au sein d'un échantillon environnemental est extrêmement rare.

Jusqu'au 20^{ème} siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement normal qui présente des conditions compatibles avec la vie de l'homme, puis, les chercheurs ont commencé à découvrir que certains environnements extrêmes tels que les régions volcaniques, les océans polaires, les lacs salés, les sources hydrothermales, la calotte glaciaire de l'Antarctique et les milieux alcalins ou acides qui s'avèrent trop rigoureux pour le développement d'une vie sont colonisés par certains microorganismes en dépassant toutes les limites physicochimiques de la vie. C'est le cas de **Thomas Brock** qui, dans les années 60, a trouvé une espèce thermophile importante dans l'avancement de la biologie moléculaire : *Thermus aquaticus*. Cette espèce a été découverte dans les sources thermales du Parc de Yellowstone aux États-Unis, c'est une source de la célèbre enzyme *Taq polymérase*, utilisée pour l'élongation des brins d'ADN à haute température au cours de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) [**Podar et Reysenbach, 2006**].

Ces Êtres exceptionnels qui défient les lois de la biologie et créent la vie là où l'homme n'osait l'imaginer, sont qualifiés d'**extrêmophiles** [**Echigo et al., 2005**] et ils ne sont pas seulement tolérants à ces conditions extrêmes, mais celles-ci sont requises pour leur croissance et développement [**Pikuta et Hoover, 2007**].

Il existe des extrêmophiles qui prospèrent dans des biotopes combinant plusieurs conditions extrêmes, ils sont baptisés « **poly extrêmophiles** ». Ce qualificatif englobe la résistance à des conditions physiques (par exemple la température, la pression, les radiations) et géochimiques (par exemple la dessiccation, la salinité, le pH) [**Mesbah et al., 2009**].

Selon les conditions extrêmes auxquels les microorganismes extrêmophiles sont confrontés, ils peuvent être thermophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles, piézophiles halophiles ou halotolérants... [Irwin et Baird, 2004].

Depuis la découverte des microorganismes extrêmophiles, les *Archaea* ont été les plus identifiées dans les environnements extrêmes, surtout associées à des sources thermales [Woese et al., 1978]. À ce moment, plusieurs chercheurs supposaient que celles-ci étaient d'ailleurs confinées à des écosystèmes hostiles. Les *Archaea* étaient même parfois considérées comme étant les seuls microorganismes pouvant survivre dans ce genre d'endroit. Cependant, de nombreuses études ont démontré qu'il existe, dans les autres domaines de la vie (*Bacteria* et *Eukarya*) des microorganismes qui sont également capables de survivre dans des environnements extrêmes [Weber et al., 2004]. De plus, d'autres études ont démontré que les *Archaea* sont probablement présentes dans tous les écosystèmes de notre planète tels les lacs [Auguet et Casamayor, 2008] et les rivières des régions tempérées [Abreu et al., 2001], les océans [Massana et al., 2000], le sol [Midgley et al., 2007] et même l'estomac des ruminants [Chaban et al., 2006].

L'existence de la vie dans les écosystèmes extrêmes a conduit à s'interroger sur les stratégies et les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques mis en jeu par ces microorganismes atypiques pour se maintenir dans de tels milieux, et la mise en évidence d'une extraordinaire biodiversité de ces formes de vie montre que l'inventaire de toutes les espèces vivantes sur terre n'est pas prêt à être fini.

Parallèlement, la découverte de la vie dans ces écosystèmes extrêmes a permis d'aborder la question de la vie extraterrestre [Seckbach et Chela-Flores, 2007]. Les exobiologistes (astrobiologistes) s'intéressent à ces habitats puisque ceux-ci sont, sans doute, analogues à ceux retrouvés sur la planète Mars ou sur certaines lunes de Jupiter ou de Saturne [Cavicchioli, 2002].

Les capacités étonnantes d'adaptation des microorganismes extrêmophiles aux stress physico-chimiques offrent des perspectives en termes d'applications biotechnologiques et

conduit également à s'interroger sur leur capacité de produire de nouvelles substances exceptionnelles [Irwin et Baird, 2004].

Les substances antimicrobiennes ont été l'une des innovations thérapeutiques de ce siècle et ont largement contribué à l'amélioration de l'espérance de vie en réduisant le taux de mortalité et de morbidité associées aux maladies infectieuses. Cependant leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des microorganismes à ces remarquables substances. En effet, une augmentation inquiétante de la multirésistance de germes pathogènes, une réémergence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées et l'apparition de nouveaux pathogènes ont été marqués. Ce scénario explique l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes pour combattre ces microorganismes pathogènes, ce qui a poussé et persuadé les investigateurs à étudier des molécules d'origine microbienne du fait que les microorganismes restent toujours la source dominante de substances antimicrobiennes nouvelles. Pour arriver à cette approche, le screening des microorganismes (bactéries et champignons) producteurs de composés inhibiteurs est le premier pas pour cette découverte [Imada et al., 2007], spécialement les microorganismes extrémophiles qui présentent un réservoir de molécules prodigieuses. Ils sont aussi la source d'extrêmoenzymes : enzymes fonctionnelles à des conditions extrêmes et qui peuvent être valorisables car elles présentent des applications lors des processus industriels comme la transformation de produits chimiques, alimentaires ou pharmaceutiques [Van Den Burg, 2003].

Parmi les microorganismes qui possèdent un potentiel biotechnologique important, les bactéries du genre *Bacillus* en sont un exemple prometteur. Cela est dû à leur taux de croissance et leurs sécrétions extracellulaires [Schallmey et al., 2004].

Les bactéries du genre *Bacillus* sont des bâtonnets à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatifs et capables de former des endospores. Elles produisent de nombreuses substances antimicrobiennes dont la grande partie est de nature peptidique et agissent contre les bactéries à Gram positif, comme exemples la bacitracine, la gramicidine, la tyrocidine, la subtiline et la bacilysine etc... Cependant la polymyxine, la colistine et la circuline possèdent

une activité contre les bactéries à Gram négatif et la bacillomycine, la mycobacilline, et la fungistatine agissent contre les champignons et les levures [Awais et al., 2007].

Le genre *Bacillus* possède aussi des capacités physiologiques extraordinaires qui lui permettent de survivre dans une large gamme d'habitats extrêmes. il peut être thermophile, psychrophile, acidophile, alcalophile, halotolérant ou halophile [Awais et al., 2007].

L'isolement des espèces du genre *Bacillus* actives à partir des écosystèmes extrêmes non ou peu exploités permet, éventuellement, la découverte de souches rares ou de nouvelles souches du point de vue taxonomique, pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité.

A ce titre et vu l'importance de ces microorganismes extrêmophiles sur le plan de la taxonomie et production d'activités antimicrobiennes, notre attention s'est portée sur l'étude de l'activité antimicrobienne d'une souche halotolérante et mésophile notée ML9832 isolée à 25% de NaCl à partir d'échantillon d'eau d'un lac salin " El Goléa " [Khelil Klouche, 1998], localisé au milieu du Sahara algérien et caractérisé par une salinité atteignant 30% (p/v) de NaCl au cours de la saison sèche [Hacène et al., 2004].

Pour atteindre l'objectif voulu, ce travail de mémoire vise à

- Identifier la souche ML9832 jusqu'au niveau espèce en étudiant ses caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques et moléculaires,
- Mettre en évidence l'activité antimicrobienne de la souche envers certains microorganismes cibles (bactéries et champignons.),
- Extraire ses activités antimicrobiennes par une batterie de solvants organiques à polarité différente et tester leur activité,
- Séparer ces activités antimicrobiennes par une chromatographie sur couche mince,
- Étudier ces activités antimicrobiennes par une spectrophotométrie à Infra-Rouge.

L'ensemble de ce travail a été réalisé sous la responsabilité du Dr. KHELIL N. chef d'équipe des « Extrêmophiles » du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (**L.A.M.A.A.B.E.**), Université Abou Bakr Belkaid- Tlemcen.

Synthèse bibliographique

1. Les microorganismes extrêmophiles

La croissance et la survie d'un microorganisme sont contrôlées par plusieurs facteurs physico-chimiques, biotiques et abiotiques. Cela signifie qu'un biotope, pour un microorganisme, est déterminé par une gamme pour chaque facteur permettant la croissance [Kristjansson et Hreggvidsson, 1995].

Pour définir un environnement extrême, il faut d'abord définir un environnement non extrême ou un environnement normal. Il n'existe pas une définition exacte ou stricte d'un environnement normal mais on peut supposer qu'il peut avoir comme facteurs une température comprise entre 4 à 40°C, un pH de 5 à 8,5 et une salinité entre celle des eaux douces et de l'eau de mer, donc un environnement extrême est caractérisé par des facteurs se situant en dehors de ces limites [Kristjansson et Hreggvidsson, 1995].

Le terme « extrêmophiles » a été inventé pour la première fois, en 1974, par MacELROY, dans un journal intitulé '*Some comments on the evolution of extremophiles*', il a été interprété par plusieurs façons pour enfin être associé aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement d'une vie [Irwin et Baird, 2004].

La notion d'extrémophilie est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules se développent et fonctionnent de manière optimale dans ces conditions [Alber et al., 2001].

Les microorganismes extrêmophiles peuvent être répertoriés en plusieurs groupes, selon leurs paramètres de croissance et les conditions dans lesquelles ils existent (hautes et basses températures, valeurs extrêmes de pH, hautes concentrations de sel, hautes pressions et radiations).

1. 1. Les microorganismes halotolérants et halophiles

Les microorganismes vivants dans les environnements salins ou hypersalins, tels que le grand lac salé de l'Ouest américain et la Mer Morte, sont divisés en :

- ✓ Ceux qui sont capables de se développer sans sel tout en tolérant des concentrations élevées en sel, ce sont les microorganismes halotolérants [Echigo et al., 2005] par exemple l'espèce *Halobacillus salinus* qui a été isolée à partir d'un lac salé en Corée, cette espèce se développe sans sel et dans des milieux contenant plus de 23% de NaCl [Yoon et al., 2003].
- ✓ Ceux qui ne se développent qu'en présence de sel, ce sont les microorganismes halophiles [Tiquia et al., 2007].

Les microorganismes nécessitant moins de 2% (p/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles [Ollivier et al., 1994].

La propriété des microorganismes halotolérants à s'adapter rapidement aux changements des concentrations externes de sel, les rend meilleurs candidats pour la bio-prospection que leurs homologues halophiles qui dépendent strictement de la présence de sel [Shivanand et Jayaraman, 2009].

Dans le groupe de microorganismes halotolérants, il existe plusieurs catégories [Tiquia et al., 2007]

- Les microorganismes légèrement halotolérants qui tolèrent des concentrations de NaCl de 6 à 8% (p/v).
- Les halotolérants modérés qui tolèrent des concentrations de NaCl jusqu'à 18 à 20% (p/v).
- Les halotolérants extrêmes qui tolèrent toutes concentrations de NaCl varient de 0% jusqu'à le point de saturation.

Concernant les halophiles, nombreuses définitions ont été données par différents auteurs, en fonction de leur nécessité en sel (NaCl) pour une croissance optimale.

Parmi ces définitions, celles qui identifient que les microorganismes qui se développent à des concentrations de 2 - 5% de NaCl (0.2 - 0.85M), sont légèrement halophiles, et ceux qui se développent à 5 - 20% de NaCl (0.85- 3.4M), sont des halophiles modérés, comme exemple l'espèce *Bacillus persepolensis* [Amoozegar et al., 2009], alors que, les halophiles qui se développent à des concentrations de 20 - 30% de NaCl (3.4 – 5.1M) sont des halophiles extrêmes [Ollivier et al., 1994].

D'autres définitions admettent que :

- Les microorganismes halophiles modérés sont ceux qui se développent d'une manière optimale à des concentrations de 3 - 15% de NaCl (0.5 - 2.5M) [Echigo, et al., 2007], comme exemples d'espèces halophiles modérées appartenant au genre *Bacillus* : *Bacillus aurantiacus* [Borsodi et al., 2008], *Bacillus chagannorensis* [Carrasco et al., 2007], *Bacillus coahuilensis* [Cerritos et al., 2008], *Bacillus isabeliae* [Albuquerque et al., 2008], *Bacillus oshimensis* [Yumoto et al., 2005], *Bacillus polygona* [Aino et al., 2008], *Bacillus qingdaonensis* [Wang et al., 2007], *Bacillus taeanaensis* [Lim et al., 2006a] et *Bacillus salarii* [Lim et al., 2006b].
- Les microorganismes halophiles extrêmes requièrent des concentrations élevées en NaCl, avec un optimum de croissance entre 15 et 30 % (2.5 - 5.2 M) [Echigo et al., 2005]. Comme exemple l'espèce *Bacillus haloalkaliphilus* qui a été isolée à partir du lac Gabara en Égypte, elle se développe à des concentrations supérieures à 4M de NaCl avec un optimum de croissance à 3M [Weisser et Trüper, 1985].

L'équipe de Bowers (2009) accorde l'halophilie extrême aux microorganismes qui se développent à des concentrations en NaCl supérieures ou égales à 10% l'équivalent de 1.7 M.

Il est difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence et la nature de nutriments disponibles aussi la présence des autres sels modifient considérablement la réponse des microorganismes au NaCl [Kushner, 1993 ; Ventosa et al., 1998]. Comme exemple, pour l'espèce *Halomonas halophila*, la concentration saline optimale est de 5 % (p/v) à 22°C alors qu'elle est de 7.5 % (p/v) lorsque la température varie de 32 à 42°C [Quesada et al., 1987].

1. 2. Les microorganismes extrêmophiles et la température

Certains extrêmophiles existent dans des écosystèmes où la température atteint des valeurs maximales tels que les fumeurs noirs et les sources hydrothermales [Irwin et Baird, 2004], ou des valeurs minimales comme les mers froides polaires, les glaciers alpins et les sédiments océaniques [Cavicchioli et al., 2002].

Ces extrêmophiles sont classés en :

- Thermophiles : qui se développent d'une manière optimale aux alentours de 60°C [Nakagawa et al., 2004].

- Hyperthermophiles : sont des thermophiles extrêmes qui présentent des optimums de croissance à des températures comprises entre 80 et 110°C [Madigan et Martino, 2006]. Les hyperthermophiles les plus extrêmes sont des *Archaea*, ils appartiennent aux genres des *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* et *Methanopyrus* [Stetter, 1996], comme exemple, l'*Archaea Pyrococcus abyssi* ou « la boule de feu des abysses » qui a été collectée au niveau d'une cheminée de source hydrothermale à 2000 m de profondeur, au Nord du bassin Fidjien, dans l'Océan Pacifique, son optimum de croissance est à 96°C [Erauso et al., 1993]. Pour les bactéries, *Thermotoga maritima* et *Aquifex pyrophilus* croissent à des températures de 90°C et 95°C respectivement [Niehaus et al., 1999].

Les microorganismes hyperthermophiles peuvent être des anaérobies, des aérobies chimiolitho-autotrophes ou hétérotrophes, les derniers sont capables d'utiliser des polymères comme l'amidon, l'hémicellulose, les protéines, et les peptides [Niehaus et al., 1999].

- Psychrophiles : se développent de façon optimale à des températures inférieures ou égales à 15 °C avec un maximum de croissance à 20°C, et sont incapables de croître au-dessus de 20 °C [Irwin et Baird, 2004]. Les habitats des microorganismes psychrophiles comprennent les régions polaires où la lumière disparaît tout près de trois mois par année, où les ressources nutritives ne sont présentes qu'en faible quantité et où la température descend parfois à des niveaux incroyablement bas, et les eaux glacières [Vincent et al., 2004] qui ne sont pas seulement caractérisées par des basses températures, mais aussi par une pression élevée [Cavicchioli et al., 2002].

Comme exemples de microorganismes psychrophiles, les genres *Psychrobacter sp.*, *Arthrobacter sp.* et certaines espèces des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Methanogenium*, *Micrococcus*, *Sphingomonas*, *Hyphomonas*, *Polaribacter*, *Psychroserpens*, *Polaromonas* et *Vibrio* [Satyanarayana et al., 2005].

La majorité des microorganismes psychrophiles sont des bactéries et des archées, mais des études récentes ont mis en évidence un nouveau groupe de champignons psychrophiles vivant en absence d'oxygène sous des champs de neige alpins [Chaturvedi et al., 2010].

- Psychrotrophes : sont capables de se développer à des températures inférieures ou égales à 15°C, mais, leur croissance optimale est atteinte à des températures égales ou supérieures à 18°C [Irwin et Baird, 2004].

1. 3. Microorganismes alcalophiles et acidophiles

Les microorganismes, qui ne tolèrent pas seulement des pH extrêmes, mais exigent ces conditions pour avoir un métabolisme actif sont qualifiés acidophiles et alcalophiles.

1. 3. 1. Microorganismes acidophiles

Les microorganismes acidophiles se développent de façon optimale à un pH égal à 2 [Morozkina et al., 2010], ils colonisent des environnements acides alors que les acidotolérants peuvent être isolés à partir des environnements à pH neutre [Horikoshi, 1999].

Les acidophiles existent dans les trois domaines de la vie [Baker-Austin et Dopson, 2007], certains acidophiles possèdent des mécanismes qui leurs permettent de faire ressortir les protons intracellulaires pour garder le pH de leur cytoplasme proche de la neutralité donc leur protéines intracellulaires ne nécessitent pas de développer des mécanismes pour le maintien de leur stabilité alors que d'autres acidophiles, tel que *Acetobacter aceti*, ont un cytoplasme acide et possèdent des mécanismes qui expulsent les protéines intracellulaires à l'extérieur pour atteindre leur stabilité [Menzel et Gottschalk, 1985].

1. 3. 2. Microorganismes alcalophiles

Les microorganismes alcalophiles sont ceux qui se développent à des valeurs de pH égales ou supérieures à 9 avec un optimum entre 10 et 12, tout en montrant une croissance très faible près de la neutralité. Ces microorganismes ne se trouvent pas seulement dans des habitats à pH neutre ou alcalin, mais ils peuvent exister aussi dans des habitats acides [Horikoshi, 1999].

Les microorganismes alcalophiles peuvent exister également dans des habitats qui combinent plusieurs facteurs physicochimiques, dont on peut trouver des thermo-alcalophiles qui se développent de manière optimale à pH alcalins et à des températures supérieures à 50°C, comme il peut exister des halo-alcalophiles qui nécessitent des concentrations salines élevées et des pH alcalins [Sarethy et al., 2011].

Généralement, la réponse des microorganismes, en particulier les alcalotolérants, à des pH alcalins nécessite la présence intracellulaire des ions de sodium pour la régulation et le métabolisme [Lewinson et al., 2004].

Les lacs de soude, comme exemple le Lake Magadi au Kenya, représentent les milieux alcalins et salins les plus stables et productifs, avec des valeurs de pH généralement supérieures à 10 et atteignant parfois 12 [Jones et al., 1998]. Ils sont caractérisés par une grande quantité de carbonate de sodium (Na_2CO_3) formé par concentration des évaporites [Grant et Tindall, 1980]. Les microorganismes présents dans ces milieux salins et alcalins jouent un rôle important dans la reminéralisation de la matière organique au sein de l'écosystème. Ils sont les principaux contributeurs à la transformation du carbone organique, du soufre, des composés azotés et les métaux, ils ont aussi un rôle important dans les réseaux trophiques et les cycles des éléments nutritifs [Sarethy et al., 2011].

Les produits de microorganismes alcalophiles, en particulier les enzymes, ont un potentiel industriel très important, essentiellement dans l'industrie alimentaire, l'industrie des détergents, du papier et des tissus [Sarethy et al., 2011].

Les protéases alcalines constituent un groupe très important parmi les enzymes des microorganismes alcalophiles [Rao et al., 1998]. Horikoshi est le premier qui a documenté

que le genre *Bacillus sp.* (la souche 221) est capable de sécréter des protéases alcalines [Horikoshi, 1971], ensuite, plusieurs d'autres protéases alcalines isolées à partir des autres espèces du genre *Bacillus* ont été étudiées, caractérisées et commercialisées [Schallmey et al., 2004], elles ont une grande importance grâce à leur stabilité à différentes conditions environnementales [Kazan et al., 2005].

En plus des enzymes, les microorganismes alcalophiles produisent d'autres substances ayant un potentiel biotechnologique tels que les composés antimicrobiens et les caroténoïdes [Sarethy et al., 2011].

1. 4. Microorganismes piézophiles (barophiles)

Zobell et Morita (1957) ont été parmi les premiers à tenter d'isoler les microorganismes adaptés à croître sous des pressions élevées, et ils les ont appelé des barophiles.

Les premières bactéries barophiles ont été isolées en 1979, elles sont définies comme celles ayant une croissance optimale à des pressions supérieures à 40 MPa (mégapascal), alors que les bactéries barotolérantes présentent une croissance optimale à une pression inférieure à 40 MPa et poussent bien à la pression atmosphérique [Yayanos et al., 1979].

Le terme piézophile (en Grec piezo = pression et philo = aimer) a été introduit officiellement en 1995 pour décrire les microorganismes barophiles en comparaison avec d'autres termes similaires utilisés pour décrire l'effet de la pression dans d'autres domaines tel que la piézoélectrique [Yayanos, 1995].

Ils existent des piézophiles qui supportent des pressions allant jusqu'à 130 MPa, de tels microorganismes sont trouvés dans les grands fonds marins à des profondeurs de 10 500 m sous l'océan [Irwin et Baird, 2004]. Parmi les genres représentants des piézophiles, il y en a *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella*, *Methanococcus*, *Pyrococcus* et *Thermus* [Abe et Horikoshi, 2001].

D'autres microorganismes se développent aussi dans d'autres environnements extrêmes comme les solfatares (milieux riches en soufre), les couches pétrolifères, les aires de décomposition organique où on rencontrent les méthanogènes, etc. [Dudeja et al., 2010]. Il y a aussi des microorganismes extrêmophiles capables de vivre à la présence de fortes

concentrations d'ions métalliques (métallophiles), à des niveaux élevés de rayonnement (radiophiles), ou en absence d'oxygène (anaérobies strictes) [De Champdoré et al., 2006].

Le **tableau N° 1** récapitule les différents groupes de microorganismes extrêmophiles et les paramètres environnementaux correspondants.

Tableau N° 1 : Conditions extrêmes et microorganismes appropriés.

Paramètres environnementaux et types de microorganismes	Description des microorganismes	Références
La salinité		
✓ Halotolérants	Croissance sans sel avec tolérance à des concentrations élevées	[Echigo et al., 2005]
Légèrement halotolérants	• Tolérance de 6 à 8% (p/v) de NaCl.	[Echigo et al., 2005]
Halotolérants modérés	• Tolérance de 18 à 20% (p/v).	[Echigo et al., 2005]
Halotolérants extrêmes	• Tolérance de 0% jusqu'à saturation.	[Echigo et al., 2005]
✓ Halophiles	Nécessitent le sel pour la croissance	[Tiquia et al., 2007]
Légèrement halophiles	• 2 - 5% NaCl (0.2 - 0.85M),	[Ollivier et al., 1994]
Halophiles modérés	• 5 - 20% NaCl (0.85- 3.4M), • 3 - 15% NaCl (0.5 - 2.5M)	[Ollivier et al., 1994] [Echigo et al., 2007]
Halophiles extrêmes	• 20 - 30% NaCl (3.4 – 5.1M) • 15 et 30 % (2.5 - 5.1 M) • ≥ 10% (1.7 M).	[Ollivier et al., 1994] [Echigo et al., 2005] [Bowers et al., 2009]
✓ Les non halophiles	Nécessitent moins de 2% de NaCl (p/v)	[Ollivier et al., 1994]
La température		
Thermophiles	• Optimum aux alentours de 60°C	[Nakagawa et al., 2004].
Hyperthermophiles	• Optimum entre 80 et 110°C	[Madigan et Martino, 2006]
Psychrophiles	• Optimum ≤ 15°C et un max à 20°C , pas de croissance ≥ 20° C	[Irwin et Baird, 2004]
Psychrotrophes	• Croissance à ≤ 15°C optimum à ≥ 18°C	[Irwin et Baird, 2004]
Le pH		
Les acidophiles	• Optimum à pH égale 2	[Morozkina et al., 2010]
Les alcalophiles	• Croissance à pH 9 , avec un optimum entre 10 et 12	[Horikoshi, 1999]
La pression		
Piérophiles	• Supportent des pressions ≥ 40 MPa	[Yayanos, 1995]

2. Les microorganismes poly extrêmophiles

Certains microorganismes abritent des écosystèmes qui combinent plusieurs conditions extrêmes, ces microorganismes sont appelés poly extrêmophiles, telle que l'espèce archéenne *Sulfolobus acidocaldarius* qui se développe à 80°C et à un pH égal à 3 [Satyanarayana et al., 2005].

Les communautés microbiennes des mers glacières de l'arctique et l'antarctique sont exposées à différentes concentrations de sel plus élevées que celles des eaux de mer, ces microorganismes sont des halo-psychrophiles [Vincent et al., 2004].

Bacillus infernus "le bacille de l'enfer", a été isolé à partir des profondeurs d'environ 2700 m en dessous de la surface de la terre, ce microorganisme extrêmophile est baptisé thermophile (60 ° C), halotolérant (concentrations de sel 0,6 M) et légèrement alcalophiles (pH 7,8) [Boone et al., 1995].

Un autre exemple de bactéries poly extrêmophiles est l'espèce *Natranaerobius thermophilus* qui est une bactérie halophile alcalo-thermophile, elle a été isolée à partir d'un sédiment d'un lac alcalin et hypersalin de Wadi An Natrun en Egypt. Le *N. thermophilus* se développe à une température entre 35°C et 56°C avec un optimum à 53°C. La gamme de pH^{55°C} permettant la croissance de cette espèce est entre 8.3 et 10.6 avec un optimum à pH^{55°C} égal à 9.5. Un pH^{55°C} égal ou inférieur à 8.2 et égal ou supérieur à 10.8 ne permet du tout la croissance de cette espèce. A l'optimum de la température et du pH le *N. thermophilus* se développe à une série de concentration saline comprise entre 3.1- 4.9 M avec un optimum entre 3.3 et 3.9 M [Mesbah et al., 2007].

3. Ecosystèmes salins et hypersalins

Deux types d'environnements peuvent avoir le sel comme facteurs agissant sur les populations microbiennes ; le sol et l'eau. L'équilibre de sel dans ces environnements est affecté par la pénurie de la pluie et la forte évaporation en particulier dans les régions semi-arides et arides [Hachicha, 2007].

3. 1. Les sols salés

Les sols sont considérés comme salins lorsqu'ils contiennent un excès en sels solubles, dans la plupart comprenant les chlorures, les sulfates et les bicarbonates de sodium, de calcium et de magnésium , leur salinité est supérieure à 0,2% (p/v) [Ghassemi *et al.*, 1995].



Figure N° 1 : Pseudo-sables très salés et sodiques de la lunette d'El Mabtough (basse vallée de la Medjerda) [Hachicha, 2007].



Figure N° 2 : Sols salés et sodiques des sebkhas en Tunisie [Hachicha, 2007].

3. 1. Les eaux salées

Les eaux sont considérées comme salées lorsque leur concentration en sels solubles dépasse 0,3% (p/v) et hypersalées lorsqu'elles présentent des concentrations salines supérieures à celle de l'eau de mer 3,3% (p/v) [Edgerton et Brimblecome, 1981].

Selon leur origine, ces environnements sont classés en :

3. 1. 1. Environnements thalassohalins

Ils sont issus de l'évaporation de l'eau de mer, leur composition en sel est similaire à celle de l'eau de mer. Le sodium et le chlore sont les ions les plus dominants, le pH est proche de la neutralité ou une légère alcaliphilie. Au cours de l'évaporation, il se produit des changements dans la composition ionique dus à la précipitation du gypse ($\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) et d'autres minéraux quand leur solubilité est dépassée [Oren, 2002].

Des exemples d'environnements analogues sont représentés par les marais salants de Costa Blanca en Espagne et à San Francisco aux USA, Les lacs hypersalés de l'antarctique, la sebkha Gavish près de la mer rouge, etc... [Falb et al., 2005].

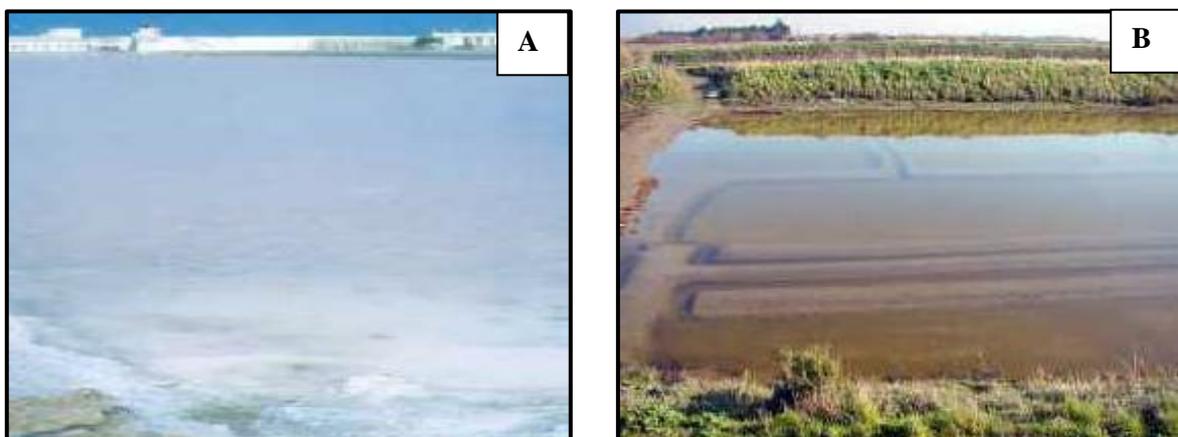


Figure N° 3 : Habitats thalassohalins : **A.** Marais salant à Formentera en Espagne [Gerday et Glansdorff, 2007], **B.** Marais salants de l'île de Ré en France [Poitevin et al., 2004].

3. 1. 2. Environnements athalassohalins

L'évaporation complète de l'eau de mer est à l'origine de la formation de dépôts de sels constituant à travers le temps des évaporites qui sont présents sur tous les continents et considérés comme des environnements fossiles hypersalés. Leur dissolution, par l'eau, crée des milieux athalassohalins [Rodriguez-Valera, 1993] dont la composition ionique est différente à celle de l'eau de mer, ils sont riches en microorganismes. De tels environnements sont représentés par la Mer morte où la valeur de pH est autour de 6 et la concentration des cations divalents ($1,9\text{M Mg}^{2+}$ et $0,4\text{M Ca}^{2+}$) dépasse la concentration des cations monovalents ($1,6\text{M Na}^+$ et $0,14\text{M K}^+$) [Oren, 2002], Wadi An Naturn en Egypt [Mesbah et al., 2007], le grand lac salé Utah aux USA, le lac rose salé au Sénégal [Falb et al., 2005] et le lac d'el Goléa au milieu du Sahara algérien [Hacène et al., 2004].



Figure N° 4 : Habitats athalassohalins. **A :** le Grand Lac Salé Utah (USA) ; **B :** le Lac Rose Salé (Sénégal) [Falb et al., 2005] ; **C :** Le lac d'el Goléa (wilaya de Ghardaïa - Algérie) [Google earth] ; **D :** la mer morte [Sapin, 2009].

4. Les groupes phylogénétiques des halophiles et des halotolérants

Le monde microbien est extrêmement vaste et plusieurs taxonomistes ont tenté de le classer selon divers critères. Au début des années 70, Woese et ses collaborateurs ont proposé un nouveau système de classification en divisant les organismes vivants en trois domaines : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* [Woese et al., 1990]. Plusieurs caractéristiques ont permis de faire cette distinction chez les organismes vivants. Entre autres, les Eucaryotes (*Eucarya*) possèdent un noyau bien défini qui contient leur matériel génétique. Ce n'est pas le cas des Procaryotes (*Archaea* et *Bacteria*) qui possèdent généralement un matériel génétique regroupé dans une région de la cellule sans membrane délimitant clairement l'ADN du cytoplasme. Les archaebactéries (*Archaea*) et les eubactéries (*Bacteria*) sont de tailles et de formes comparables ; c'est ce qui a compliqué leur distinction dans le passé.

Les *Archaea* peuvent se distinguer des deux autres domaines par de nombreux caractères, notamment par la structure et la chimie de la membrane cellulaire. Les lipides membranaires des *Archaea* sont particuliers et consistent en des éthers de glycérol et d'isoprénoïdes. La paroi constituée de peptidoglycane chez les bactéries est absente chez les *Archaea*. A la place de la paroi, on peut trouver une couche régulière, constituée de sous-unités protéiques, appelée couche de surface. Le chromosome circulaire est de type bactérien, mais il comporte des gènes mosaïques similaires à ceux des eucaryotes. De plus, le chromosome est associé à des protéines homologues aux histones eucaryotes. Les ARN polymérase ADN-dépendantes des *Archaea*, copiant l'ADN pour donner l'ARN messager, sont plus complexes que celles des bactéries, et similaires à celles des eucaryotes. Les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN sont également plus proches de celles des eucaryotes que de celles des bactéries [Kelman, 2000].

Il a toujours été considéré que les environnements hypersalins comme les autres environnements extrêmes sont uniquement hébergés par des microorganismes spécifiques appartenant aux haloarchaea. Mais les méthodes moléculaires ont permis de mettre en évidence une présence bactérienne autre qu'archéenne [Benlloch et al., 2002].

Les microorganismes halophiles et halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique (**Figure N° 5**), on les trouve dans les trois domaines de vie *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* [**Oren, 2010**].

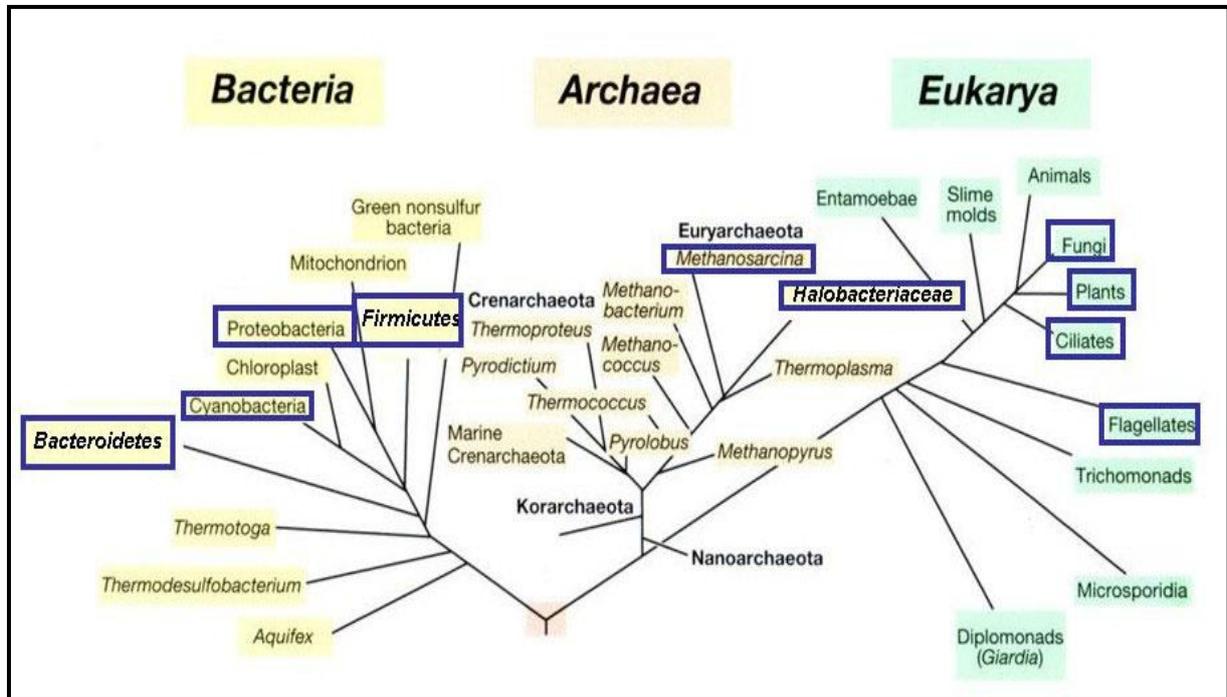


Figure N° 5 : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halophiles et halotolérants sont encadrés en bleu [**Oren, 2008**].

Les *Archaea* halophiles sont classées dans l'ordre des *Halobacteriales*, famille des *Halobacteriaceae* qui contiennent des aérobies extrêmement halophiles nécessitant des concentrations salines élevées avec un optimum entre 10-30 % (p/v) [**Minegishi et al., 2008**].

Le phylum *Euryarchaeota* comprend les halophiles par excellence [**Oren, 2006**], *Halobacterium* nécessite plus de 100 à 150 g/l de sel pour sa croissance et la stabilité de sa structure [**Oren, 2008**]. Ces microorganismes sont trouvés dans la mer morte, les lacs alcalins hypersalés comme le lac Magadi au Kenya [**Oren, 2002**]. La coloration rouge des lacs est due à un pigment de type C-50 caroténoïde (α -bacterioruberine) localisé dans la membrane cellulaire de certains membres de la famille des *Halobacteriaceae* [**Oren, 1994**], parallèlement, dans le groupe de méthanogènes du phylum *Euryarchaeota*, classe

Methanothermea, ordre *Methanosarcinales*, on rencontre des halophiles ou des halotolérants extrêmes (genre *Methanohalophilus* et *Methanohalobium*) [Oren, 2008].

Le royaume de *Bacteria* regroupe la plus grande diversité de microorganismes halophiles et halotolérants dont la plus part de ces microorganismes sont des modérés plutôt qu'extrêmes [Oren, 2002], ils sont répandus et présents dans un grand nombre de groupes phylogénétiques, ils appartiennent au phylum *Spirochaetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, et *Bacteroïdes*. Dans le groupe des *Firmicutes*, les halophiles existent dans les branches des aérobies (*Bacillus*) et des anaérobies [Oren, 2008] comme exemple *Geosporobacter subterraneus* [Klouche et al., 2007]. Les bactéries les plus isolées sont les bactéries fermentatives strictes appartenant à la famille des *Halobacteroidaceae* et *Haloanaerobiaceae* [Rainey et al., 1995], des bactéries sulfato-réductrices représentées par des halophiles modérées appartenant aux genres : *Desulfovibrio* [Krekeler et al., 1997] comme exemple *Desulfocurvus vexinensis* [Klouche et al., 2009], *Desulfobacter* [Brandt et Ingvorsen, 1997], *Desulfotomaculum* [Tardy-Jacquenod et al., 1998], et *Desufohalobium retbanse* [Ollivier et al., 1994]. Ces bactéries vivent dans les sédiments noirs, les sols hypersalés ainsi que dans les eaux salées souterraines. Aussi des bactéries hétérotrophes aérobies de la famille des *Halomonadaceae* sont isolées à partir des lacs neutrophiles et sodés [Ventosa et al., 1998]. Des bactéries photosynthétiques halophiles (cyanobactéries et bactéries phototrophes anaérobies) ont été aussi isolées de la surface des sédiments de milieux hypersalés où elles forment des tapis microbiens [DasSarma, 2001]. Les bactéries phototrophes anaérobies forment une couche pourpre au-dessous de celle des cyanobactéries [Sørensen et al., 2004]. Des isolats de bactéries pourpres appartenant aux genres *Halorhodospira*, *Roseospira*, *Halochromatium* et *Thiohalocapsa* ont été également isolés à partir des environnements salés [Imhoff et al., 1998]. Des espèces alcalophiles de *Halorhodospira* et une espèce d'actinomycète halophile extrême (*Actinopolyspora halophila*) ont été isolées de nombreux lacs en Afrique central et en Egypte [Johnson et al., 1986].

Au sein du domaine des *Eucarya*, les halophiles sont plus rares. Le principal microorganisme eucaryote halophile est l'algue verte *Dunaliella* qui est aussi le principal producteur primaire dans la mer morte et d'autre lacs hypersalins. Cette algue comprend plusieurs espèces, certaines entre elles produisent le β -carotène dont ses propriétés sont

exploitées en biotechnologie. L'algue *Dunaliella* est un halotolerant plutôt qu'un halophile, plusieurs espèces peuvent se développer à toutes concentrations de NaCl relativement les faibles concentrations (1M). Parmi les macro-organismes, on peut citer le crustacé *Artemia* qui joue des rôles importants dans des milieux hypersalins [Oren, 2002].

Il existe aussi des représentants halophiles des champignons qui nécessitent des concentrations très élevées de sels et proches de la saturation, exemple, le champignon *Trimmatostroma salinum* [Zalar et al., 1999] et la levure *Hortaea werneckii* [Gunde-Cimerman et al., 2000].

5. Adaptation de microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité

Les microorganismes vivant en milieux salins et hypersalins rencontrent différentes difficultés qui sont la déshydratation, le stress osmotique et la faible activité d'eau, pour cela ils ont développé plusieurs stratégies adaptatives. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale.

De ce fait, pour être capable de vivre à hautes concentrations de sels et puisque toutes les membranes biologiques sont perméables à l'eau, les microorganismes halophiles et halotolérants doivent maintenir leur cytoplasme en iso-osmose avec le milieu extérieur. Pour atteindre cet équilibre osmotique deux stratégies existent, elles sont basées sur le principe de créer une haute pression osmotique dans le cytoplasme tout en gardant une faible concentration en ion sodium (Na^+) [Oren, 2002], en l'expulsant grâce à un antiport Na^+/H^+ localisé au niveau de la membrane cytoplasmique [Oren, 2001].

5. 1. L'adaptation par accumulation de KCl

Cette stratégie est basée sur l'accumulation du KCl, Les ions K^+ sont les ions les plus accumulés par les *Archaea* extrêmement halophiles, le taux des ions de potassium intracellulaire chez ces microorganismes est cinq fois plus important que le taux des ions de sodium, la caractéristique qui leur permet de maintenir leur équilibre osmotique dans l'environnement où ils existent [Perez-Fillol et Rodriguez-Valera, 1986].

Les ions K^+ entrent passivement via un système uniport sous l'impulsion du potentiel de membrane, une partie de sodium cellulaire est remplacée par le potassium. L'afflux des cations doit être compensé par un nombre équivalent d'anions Cl^- , ces derniers vont pénétrer grâce à une pompe

Na^+/Cl^- , ce mécanisme est largement adopté chez les *Archaea* halophiles ce qu'il les a distingué des bactéries, mais certaines bactéries halophiles, comme les *Salinibacter*, utilisent la même stratégie [Zafrilla et al., 2010].

L'adaptation à la salinité par accumulation de KCl nécessite l'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire, car l'accumulation dans le cytoplasme de fortes quantités de sels principalement le KCl, soumis ces microorganismes à un nouveau stress cellulaire, cependant ces microorganismes ne semblent pas connaître ce stress, leurs protéines ne sont pas seulement fonctionnelles et stables à de telles salinités mais elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1M [Madern et al., 2000].

5. 2. L'adaptation par productions et accumulation d'osmoprotecteurs

Cette stratégie est basée sur l'exclusion du sodium et l'accumulation ou la production de composés organiques de faible poids moléculaire solubles dans l'eau 'solutés compatibles' pour éviter la perte d'eau [Galinski, 1993]. Ce mécanisme est largement utilisé dans les trois domaines de vie *Archaea*, *Eucarya* et *Bacteria*. Il existe une large variété de solutés compatibles, comme exemples la glycine bêtaïne, l'éctoïne et d'autres dérivés d'acides aminés, des polyalcools et des sucres [Galinski, 1995], qui peuvent être synthétisés par les microorganismes ou importés de l'environnement externe, par des systèmes de transport sans qu'ils interfèrent avec leurs métabolismes [Brown, 1976]. Les osmoprotecteurs les plus utilisés dans le domaine de *Bacteria* sont l'éctoïne et la glycine bêtaïne. L'éctoïne est synthétisée par une grande variété de microorganismes halophiles et halotolérants comme les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les *Archaea* méthanogènes tandis que la glycine bêtaïne est synthétisée exclusivement par des procaryotes photosynthétiques et accumulée à partir du milieu par des bactéries hétérotrophes [Oren, 2008].

Les microorganismes halophiles ou halotolérants utilisant le mécanisme de la production ou accumulation de solutés compatibles sont plus flexibles pour l'adaptation à la pression osmotique que les microorganismes utilisant le mécanisme de l'accumulation de KCl [Kunte et al., 2002]. Également, l'adaptation à la salinité par l'accumulation de solutés organiques nécessite moins d'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire que la stratégie de l'accumulation des ions potassium, cependant la production des solutés est énergétiquement coûteuse [Oren, 2002].

6. Diversité métabolique de microorganismes halophiles et halotolérants

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent dans une cellule. C'est un ensemble de processus de dégradation (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme) ; Tous les organismes cellulaires possèdent un métabolisme particulier. Les cellules utilisent les nutriments de leur environnement et les transforment pour générer l'énergie dont elles ont besoin pour croître et pour se reproduire. Elles conservent une part de l'énergie présente dans ces substances sous une forme assimilable et les éléments nécessaires à la synthèse de macromolécules puis elles éliminent les déchets.

Dans la nature, la diversité métabolique des microorganismes halophiles et halotolérants est très importante [Oren, 2008]. Parmi ces microorganismes, on trouve une variété d'*Archaea* hétérotrophes et méthanogènes comme exemples tous les membres de la famille *Halobacteriaceae* sont des chimio-hétérotrophes et la grande majorité sont des aérobies. Les bactéries halophiles et halotolérantes ont des propriétés physiologiques variées dont il existe des bactéries photosynthétiques lithotrophes et hétérotrophes. Les eucaryotes sont généralement photosynthétiques et hétérotrophes [Jiang et al., 2006].

La plupart des processus microbiens qui se produisent à des concentrations salines faibles peut être réalisée à des concentrations élevées. Cependant, certains processus qui ont été rencontrés à des environnements peu salins ne sont pas encore aperçus à des concentrations salines élevées ; de tels processus : la nitrification, la formation du méthane à partir du CO₂ et H₂ et à partir de l'acétate. Cela montre qu'il existe une concentration saline maximale qui limite chaque métabolisme (Tableau N°2) [Oren, 2002].

Tableau N° 2 : Exemples de concentrations salines maximales limitant certains processus microbiens [Oren, 2002].

Processus métaboliques	Microorganismes halotolérants représentatifs	Concentration de NaCl maximale limitant le processus % (p/v)
Photosynthèse oxygénique	<i>Dunaliella salina</i>	saturation
Photosynthèse anoxygénique	<i>Halorhodospira halophila</i>	saturation
Respiration aérobie	<i>Halobacterium salinarum</i>	saturation
Dénitrification	<i>Haloarcula marismortui</i>	25 - 30 %
Formation du méthane à partir du CO ₂ et H ₂	<i>Methanocalculus halotolerans</i>	12 %
Formation du méthane à partir de l'acétate	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	06 %
Formation de l'acétate à partir du CO ₂ et H ₂	<i>Acetohalobium arabaticum</i>	25 %
Oxydation aérobie du méthane	<i>Methylobacter modestohalophilus</i>	09 %

Les valeurs des concentrations salines, mentionnées dans le **tableau N° 2**, limitant les différents processus physiologiques n'excluent pas qu'on puisse découvrir de nouveaux microorganismes pouvant aller au-delà de ces limites, donc les processus métaboliques de ces microorganismes méritent une examination approfondie [Oren, 2002].

7. Biotechnologie des microorganismes halophiles et halotolérants

Les organismes vivant en milieux extrêmes, en particulier les microorganismes, présentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes.

Les propriétés singulières de certains de ces microorganismes ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies : chercheurs, ingénieurs et entreprises pour exploiter ce nouveau gisement de ressources naturelles en biomolécules, notamment les enzymes, les biopolymères et les métabolites secondaires.

En comparaison avec les autres groupes d'extrémophiles, spécialement les procaryotes thermophiles et alcalophiles qui sont extensivement utilisés pour la production des extrêmoenzymes, les microorganismes halophiles et halotolérants sont un groupe un peu négligé en application biotechnologique [Oren, 2010].

Les deux processus biotechnologiques largement réussis et qui impliquent des microorganismes halophiles sont : La production du β -carotène par l'algue verte *Dunaliella* et les solutés compatibles (bétaine, éctoïne ...) par des bactéries et des *Archaea* halophiles. Le β -carotène est utilisé dans l'industrie alimentaire comme colorant ou en cosmétique comme précurseur de la vitamine A, ainsi ses activités antioxydantes le rend populaire pour l'usage en aliments sanitaires [Ye et al., 2008], et les solutés organiques ou osmoprotecteurs permettent de protéger les constituants cellulaires et la stabilisation des enzymes, de l'ADN et des membranes [Oren, 2010].

Un des solutés compatibles les plus communs dans le domaine des bactéries est l'éctoïne (1, 4, 5, 6, tetrahydro-2- methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid), elle a été découverte pour la première fois chez une bactérie photosynthétique et halo-alcalophile '*Ectothiorhodospira halochloris* [Oren, 2010], elle protège la peau des altérations causées par les rayonnements ultra-violetts d'où son incorporation dans les préparations de certaines crèmes à vocation hydratante [Van den Burg, 2003]. Elle est reconnue pour augmenter les défenses immunitaires des cellules de Langerhans [Buenger et Driller, 2004]. L'éctoïne empêche également l'agrégation et la neurotoxicité du β -amyloïde d'Alzheimer [Kanapathipillai et al., 2005].

Les halophiles présentent, également, une source importante de composés bioactifs [Ventosa et al., 1998]. Des substances anti tumorales et antimicrobiennes ont été isolées à partir des bactéries légèrement et extrêmement halophiles. Les Halocines, substances antimicrobiennes de nature protéique, sont isolées à partir des archaea halophiles extrêmes, elles ont été décrites pour la première fois par **Rodriguez-valera et al. (1982)** ; ces molécules détruisent les membranes cellulaires microbiennes ou inhibent la transcription, la traduction et l'activité nucléique [Price et Shand, 2000].

Une caractéristique physiologique intéressante des halophiles et halotolérants est la présence, chez certaines espèces, d'un photopigment membranaire (la bactériorubérine) qui permet la production d'ATP, quand la teneur en oxygène dans le milieu extérieur est trop faible. Ce composé, formé d'une protéine de 25-kDa (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde, est responsable de la couleur rouge des saumures [Oren, 2002], la bactériorhodopsine est utile dans la fabrication de biopuces pour les ordinateurs. La membrane artificielle capable de convertir la lumière du soleil en électricité peut également être une possibilité technologique [Bullock, 2000].

Certaines bactéries halophiles et halotolérantes, comme exemple *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, ont la capacité de dégrader des composés aromatiques comme le phénol et les hydrocarbures aromatiques polycycliques [Tiquia et al., 2007]. Également, *Halomonas halodurans* est capable de dégrader le phénol et de cliver d'autres composés complexes tels que le benzoate [Margesin et Schinner, 2001]. Des espèces archéennes appartenant aux genres *Halobacterium*, *Haloarcula* et *Haloferax* sont capables de dégrader des n-alcanes et des insecticides. Ces capacités les rendent aptes à jouer un rôle dans la décontamination des environnements salins contaminés par les hydrocarbures.

La plupart des processus industriels s'effectuent sous des conditions physico-chimiques spécifiques qui ne peuvent pas être définitivement ajustées aux points optimaux nécessaires à l'activité des enzymes disponibles; alors, il serait d'une grande importance d'avoir des enzymes qui présentent des activités optimales à différentes gammes de concentration en sel, de pH et de températures dénaturantes pour les autres protéines.

De telles enzymes (protéases, lipases, amylases, β galactosidases...) sont produites par plusieurs microorganismes halophiles et halotolérants [Gomez et Steiner, 2004] comme exemple le *Bacillus pseudofirmus* qui est une bactérie halo-alcalophile isolée à partir d'un sol salé en Inde [Gupta et al., 2005]. Ces enzymes ont une gamme étendue d'applications dans beaucoup de champs ; dont, les amylases, enzymes responsables de la dégradation de l'amidon, sont utilisées dans l'industrie de la saccharification d'amidon, de textile, des aliments, de boulangerie et de brassage [Gupta et al., 2003] ; les protéases, responsables de l'hydrolyse des protéines en libérant des peptides plus petits, sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, pharmaceutiques et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets [Amoozegar et al., 2007; Karbalaie-Heidari et al., 2009].

Des archées halophiles extrêmes productrices de protéases comme *Halogeometricum borinquense* [Vidyasagar et al., 2006] et *Natrialba magadii* [D'Alessandro et al., 2006] ont été isolées. De telles enzymes ont été également isolées et caractérisées à partir de plusieurs espèces bactériennes comprenant comme exemples les espèces du genre *Bacillus* [Shivanand et Jayaraman, 2009] et *Halobacillus* [Karbalaie-Heidari et al., 2009].

Tableau N° 3 : Exemples d'extrêmoenzymes produites par des microorganismes halophiles [Gomes et Steiner, 2004].

Microorganismes halophiles	Enzymes	Caractéristiques de l'enzyme	Références
<i>Halothermothrix orenii</i>	α - Amylase	<ul style="list-style-type: none"> • T°C optimale est de 65°C • pH optimal est de 7.5 • Tolère plus de 25 % de NaCl 	[Mijts et Patel, 2002]
<i>Bacillus dipsosauri</i>	α - Amylase	<ul style="list-style-type: none"> • T°C optimale est de 60, • tolère des T°C > 60 • pH optimal est de 6.5 	[Deutch, 2002]
<i>Halobacillus sp. strain MA-2</i>	Amylase	<ul style="list-style-type: none"> • T°C optimale 50 • pH optimal est de 7.5 à 8.5 • stable 5 % NaCl 	[Amoozegar et al., 2003]
<i>Haloferax mediterranei</i>	α - Amylase	<ul style="list-style-type: none"> • T°C optimale 50-60 • pH optimal est de 7 à 8 • Stable à 2 - 4 M NaCl (Optimum à 3 M NaCl) 	[Perez - Pomares et al., 2003]
<i>Halorhabdus utahensis</i>	β - Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> • T°C optimale 55 à 70 • Optimum d'activité à 5-15 % NaCl 	[Waino et Ingvorsen, 2003]
<i>Halorhabdus utahensis</i>	β -Xylosidase	<ul style="list-style-type: none"> • T°C optimale 65 • Optimum d'activité à 5 % NaCl 	[Waino et Ingvorsen, 2003]
<i>Pseudoalteromonas sp. strain CP76</i>	Protéase	<ul style="list-style-type: none"> • T°C optimale 55 • pH optimal est de 8.5 • Tolère 0 à 4 M NaCl • Optimum d'activité à 7.5 % NaCl 	[Sanchez - Porro et al., 2003b]

Les estérases et les lipases ont aussi trouvé de multiples applications dans les industries médicales et agroalimentaires, dans la production de détergents, dans la synthèse d'arômes. Plusieurs études ont permis de révéler la production des enzymes lipolytiques en présence de fortes concentrations salines par plusieurs microorganismes halophiles et halotolérants comme exemples *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Gracilibacillus*, *Salinicoccus*, *Piscibacillus* [Rohban et al., 2009] et *Salinivibrio* sp. [Amoozegar et al., 2008].

Les liposomes obtenus des microorganismes halophiles sont également utilisés en médecine et en cosmétique en tant qu'agents de diagnostic, comme des véhicules porteurs de vaccin, de médicaments, pour porter les composés jusqu'aux leurs sites spécifiques [Margesin et Schinner, 2001].

8. Le genre *Bacillus*

8.1. Taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est ubiquiste dans la nature, il appartient à la famille des *Bacillaceae*, Ordre des *Bacillales*, Classe des *Bacilli*, Phylum des *Firmicutes*. Depuis qu'il a été établi par Cohn en 1872, le nombre d'espèces n'a pas cessé de fluctuer. La première étude taxonomique complète sur le genre *Bacillus* a été publiée par Smith et al. (1952), elle est basée sur une comparaison entre 1134 isolats représentant plus de 150 espèces. A partir de cette étude, plusieurs d'autres études taxonomiques ont mis en évidence d'autres espèces [Claus et Fritze, 1989 ; Priest, 1993].

De nombreuses espèces initialement décrites comme *Bacillus* ont été transférées à des genres apparentés. Néanmoins, le genre *Bacillus* est toujours considéré comme l'un des plus grands genres et comprend plus de 200 espèces [Zhang et al., 2009].

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été basée auparavant sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler [Bron et al., 1999] alors qu'aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARNr 16S [Maughan et Van der Auwera, 2011].

Les études utilisant l'analyse des séquences du gène l'ARNr 16S ont montré un niveau élevé d'hétérogénéité phylogénétique dans le genre *Bacillus* [Garveba et al., 2003] dont la teneur en guanine et en cytosine (G+ C%) de ces espèces connues est comprise entre 32 et 69 moles pour cent [Vargas et al., 2005].

L'arbre phylogénétique, basé sur les séquences d'ARNr 16S, des espèces du genre *Bacillus* est représenté sur la Figure N° 6 [De Vos et al., 2009].

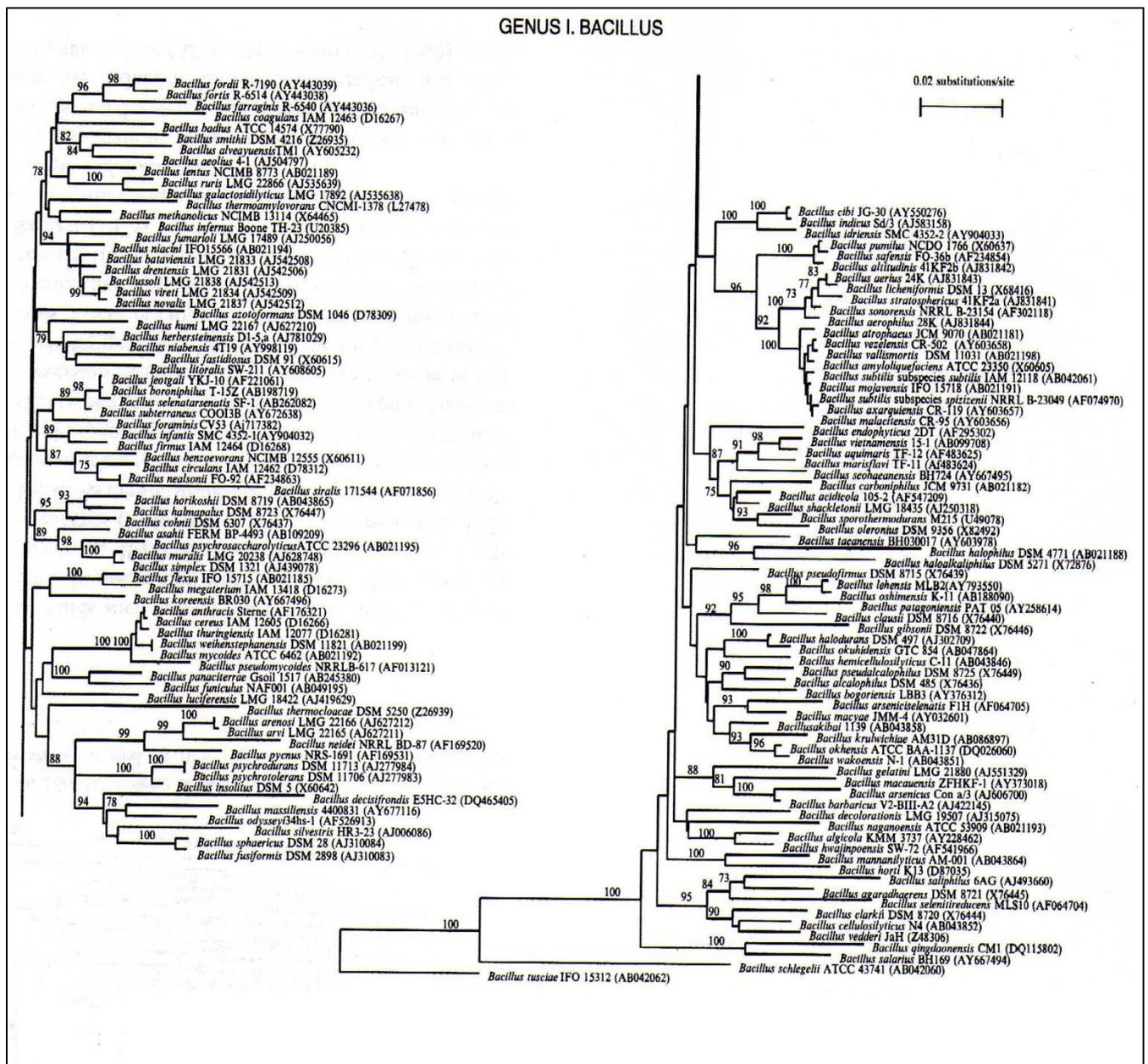


Figure N° 6 : Position phylogénétique des différentes espèces du genre *Bacillus* d'après l'analyse des séquences d'ARNr 16S (méthode Neighbor-Joining) [De Vos et al., 2009].

8. 2. Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés, à Gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possèdent des extrémités carrées, d'une longueur de 0.9 à 10.0 µm. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfectants et la dessiccation... [De Vos et al., 2009].

Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chaînettes. Elles sont catalase positive, capables de croître sur des milieux ordinaires comme exemple la gélose nutritive. La morphologie de leurs colonies est très variables entre et au sein des espèces. La composition du milieu de culture et les conditions d'incubation influent sur cette morphologie. Mais, malgré cette diversité, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficiles à identifier [De Vos et al., 2009].

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérantes ou halophiles [Awais et al., 2007]. Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes, certaines espèces sont prototrophes et d'autres auxotrophes exigeant des facteurs de croissance [De Vos et al., 2009].

8. 3. Ecologie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondants et omniprésents dans la nature [Bron et al., 1999], son principale habitat est le sol surtout pour les espèces saprophytes où elles jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote, le matériel végétal et les exsudats racinaires représentent des sources importantes de nutriments organiques. Cependant ce genre peut être également isolé à partir des aliments, de l'eau, des organismes eucaryotiques [Dahl, 1999] et même à partir des environnements extrêmes comme les déserts, l'Antarctique et les habitats hypersalins, dont la caractéristique la plus importante de ce genre et qui lui permet d'héberger plusieurs niches écologique est la capacité de former des endospores [Priest, 1993].

8. 4. Potentiels biotechnologiques de bactéries appartenant au genre *Bacillus*

Grâce à son omniprésence dans la nature ainsi que sa diversité métabolique et génétique, en tête, la production de différentes enzymes, substances antimicrobiennes et des insecticides [Bron et al., 1999], le genre *Bacillus* est devenu très exploité dans plusieurs applications biotechnologiques [Priest, 1993], dont certaines de leurs substances ont une valeur dans le secteur pharmaceutique et d'autres sont testées in vitro pour contrôler les populations microbiennes des aliments [Stein, 2005].

Les espèces du genre *Bacillus* sont reconnues par leurs bagage enzymatique important, elles sont à l'origine d'un grand nombre d'enzymes industrielles, comme exemple, l'industrie de blanchisserie consomme des cellulases et des amylases produites par *Bacillus subtilis* [Jarnagin et Ferrari, 1992]. D'autres utilisations des enzymes isolées à partir de *B. subtilis* y compris la modification des protéines du lait dans les produits laitiers par des protéases, de l'amidon et la production de sirop de maltose par des amylases et des pullulanases [Zukowski, 1992].

Ces bactéries antagonistes produisent également un grand nombre de composants bioactifs contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus [Syed et al., 2009], elles sont aussi parmi les agents les plus utilisés pour lutter biologiquement contre de nombreux agents pathogènes des plantes [El-hamshary et Khattab, 2008].

De nombreuses études ont montré que certaines souches du genre *Bacillus* isolées à partir des sols salins inhibent certains champignons phytopathogènes [Sadfi-Zouaoui et al., 2008], d'autres montrent que certaines souches de *Bacillus* modérément halophiles prélevées à partir d'un marais salant à Weihai (Chine) présentent des activités contre les champignons et les bactéries à Gram positif plus que les bactéries à Gram négatifs [Chen et al., 2010]. Aussi l'étude de Kamat et al. (2011) qui s'intéresse à la recherche de l'activité antimicrobienne d'une souche identifiée comme *Bacillus marismortui* prélevée à partir d'un lac salé en Inde montre qu'elle exerce une activité contre *Staphylococcus citreus*. En outre, des insecticides sont aussi produits par diverses espèces de *B. subtilis* [Awais et al., 2010], de plus cette espèce est capable de produire également des sédirohores [Tabbene et al., 2010].

Le nombre de substances antimicrobiennes produites par le genre *Bacillus* est proche de 167, dont 66 sont isolées de *B. subtilis*, 23 à partir de *B. brevis* et le reste à partir des autres espèces. Les principaux antibiotiques produits par des espèces de ce genre sont : la polymyxine, la difficidine, la subtiline, la mycobacilline, la bacitracine par *B. subtilis* ; la gramicidine et la tyrothricine par *B. brevis* ; la cerexine et la zwittermicine par *B. cereus* ; la circuline par *B. circulans* ; la laterosporine par *B. laterosporus* ; la bacitracine par *B. licheniformis* ; la polymyxine et la colistine par *B. polymyxa* ; et la pumuline par *B. pumilus* [Awais et al., 2010].

La grande partie de substances antimicrobiennes produites par le genre *Bacillus* est de nature peptidique tels que la bacitracine, la gramicidine, la tyrocidine, la subtiline, la bacilysine etc... [Fariha et al., 2009]. La majorité de ces substances agissent sur les bactéries à Gram positif, cependant la polymyxine, la colistine et la circuline possèdent une activité contre les bactéries à Gram négatif et la bacillomycine, la mycobacilline, et la fungistatine agissent sur les champignons et les levures [Syed et al., 2009].

Selon la voie de synthèse, les substances bioactives produites par le genre *Bacillus* sont soit des peptides ribosomiaux produits durant la phase active de la croissance ou non ribosomiaux produits après la cessation de la croissance bactérienne [Tamehiro et al., 2002].

Les substances bioactives produites par voie ribosomique comprennent, comme exemples, le Tas A [Stover et Driks, 1999], la subtilosine [Babasaki et al., 1985] et la sublancine [Paik et al., 1998] alors que celles produites par voie non ribosomique contiennent, comme exemples, la surfactine, et la fengycine [Peypoux et al., 1999].

9. Méthodes de screening des métabolites secondaires

Plusieurs méthodes ont été développées pour le screening de métabolites secondaires essentiellement les substances antimicrobiennes [Cannell, 1998]. La préparation des échantillons biologiques nécessite l'optimisation des conditions de croissance, les procédures d'extraction et les protocoles de la purification [Higgs et al., 2001].

L'efficacité d'un programme de criblage dépendra de plusieurs critères : le microorganisme producteur, le germe cible et la méthode analytique utilisée.

9.1. Screening primaire

Le screening primaire permet de détecter *in vitro* et sur milieu gélosé l'effet inhibiteur des microorganismes sélectionnés vis-à-vis des germes cibles, il est rapide, sensible, et raisonnable. Il peut être réalisé par plusieurs techniques

- **Technique des cylindres d'agar (plug agar)** : Elle consiste à prélever des cylindres d'agar à partir de la culture du microorganisme d'intérêt et les mettre sur milieu gélosé préalablement ensemencé par le microorganisme test. Les substances diffusent sur la gélose et l'observation d'une zone d'inhibition autour des cylindres après incubation indique la présence de l'effet inhibiteur [Eccleston et al., 2008].
- **Technique des stries transversales (Cross streak)** : Elle consiste à ensemencer le germe sélectionné en strie au centre d'un milieu de culture gélosé, et après incubation (3 à 7 jours) à une température appropriée, le milieu est ensemencé par les germes test en stries de manière à former un angle de 90° avec le germe d'intérêt. Après ré-incubation, l'interaction microbienne est analysée par la mesure de la zone d'inhibition [Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008].

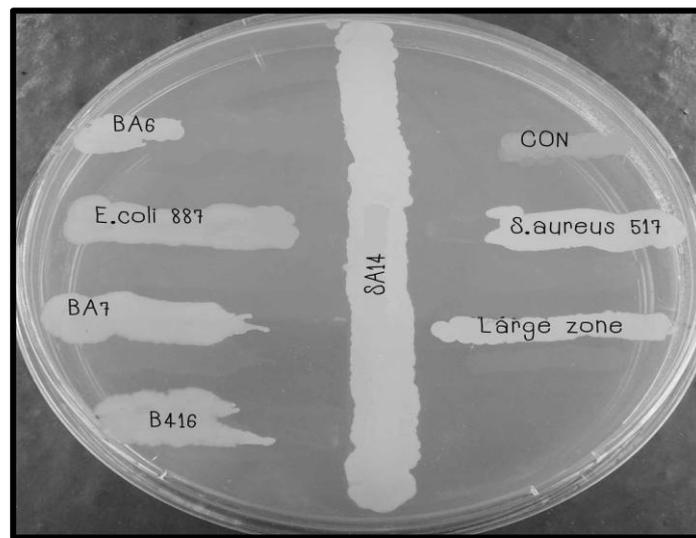


Figure N° 7: Screening primaire de l'activité antimicrobienne par la technique des stries transversales [Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008].

9. 2. Screening secondaire

Un screening secondaire suit habituellement le screening primaire, et seulement les microorganismes présentant une activité inhibitrice sont retenus. Il a comme objectif de récupérer les substances bioactives à partir d'une culture liquide (filtrat ou surnageant) des germes sélectionnés. Le filtrat ou le surnageant peuvent être analysés directement ou après extraction, par des solvants organiques, par plusieurs techniques [Khanna et al., 2011].

- **Technique des disques en papier (filter paper discs) :** Elle consiste à déposer des disques stériles en papier filtre, imbibés par un volume défini du filtrat, du surnageant ou de l'extrait organique du germe sélectionné, sur un milieu gélosé préalablementensemencé par le germe test, après incubation, les zones d'inhibition sont mesurées autour des disques [Lancini et Parenti, 1982].
- **Technique des puits :** Elle consiste à former des puits sur un milieu gélosé préalablementensemencé par le germe test et les remplir par un volume précis du filtrat, du surnageant ou de l'extrait organique du germe sélectionné [Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008].

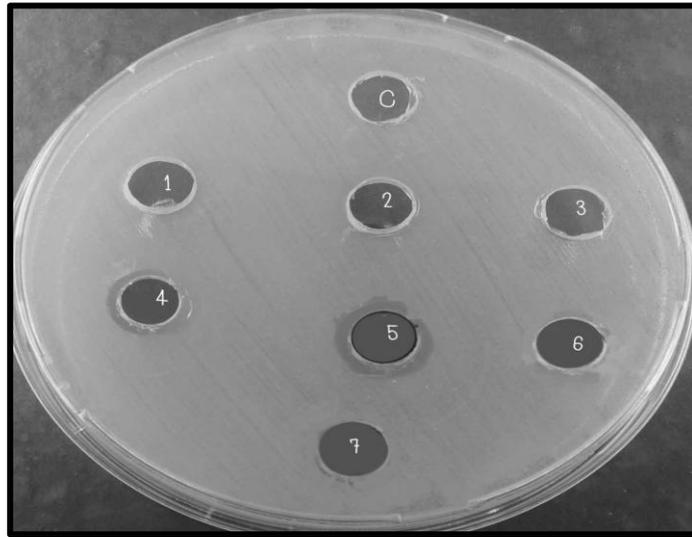


Figure N° 8: Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la technique des puits
[Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008].

- **La concentration minimale inhibitrice (CMI) :** La CMI (ou MIC) est définie comme la plus petite concentration d'un composé antimicrobien qui inhibe la croissance d'une souche après une période d'incubation appropriée. Elle est déterminée in vitro, par des dilutions en gélose ou en bouillon. Les germes cibles sont testés pour leur capacité à montrer une croissance visible sur une série de boîtes pétries contenant milieu gélosé (dilution en gélose) ou sur des microplaques (micro-dilution en bouillon) contenant des dilutions appropriées de l'agent antimicrobien. L'observation est réalisée après une nuit d'incubation, la plus faible concentration dans laquelle il n'y a pas de croissance visible du germe cible correspond à la CMI [Khanna et al., 2011].

9. 3. Caractérisation des composés bioactifs

Afin de caractériser et de définir une biomolécule, elle doit être isolée et purifiée en utilisant une gamme de techniques différentes qui comprennent la centrifugation, la filtration, l'extraction par des solvants, la chromatographie sur couche mince (CCM), l'électrophorèse et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [Gibbons et Gray, 1998].

La centrifugation des cultures liquides à haute vitesse permet d'éliminer les cellules bactériennes, le surnageant issu est traité par un solvant approprié permettant d'extraire la fraction active [Munimbazi et Bullerman, 1998]. Alternativement, les substances antimicrobiennes peuvent être adsorbées sur la résine échangeuse de cations [Pinchuk et al., 2001].

Les techniques de séparation dépendent de la forme, la taille et la densité des molécules à purifier. Les biomolécules peuvent être également séparées et purifiées par des techniques chromatographiques. La chromatographie sur couche mince (CCM) est largement utilisée pour purifier et vérifier la pureté des produits en raison de sa simplicité et sa rapidité [Gibbons et Gray, 1998].

L'électrophorèse, transport des particules chargées par un champ électrique à travers un gel solvant, est également une méthode importante utilisée pour purifier les biomolécules [Dunbar, 1987]. L'effet de tamisage de gel réticulé influe le mouvement des biomolécules et conduit à la séparation en raison de leur taille et de leur forme [Wood, 1981].

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

Notre travail porte sur la caractérisation phénotypique et génotypique d'une souche bactérienne halotolérante et mésophile notée ML9832 ainsi que la pré-caractérisation de ses activités antimicrobiennes.

1. 1. Origine et conservation de la souche

La souche ML9832 a été isolée par Dr. Khelil Klouche, lors de ses travaux de magister, à partir du lac salé d'El Goléa dont l'objectif fût la recherche de souches particulières apparentées halophiles en vue d'exploitation taxonomique et biotechnologique [**Khelil Klouche, 1998**].

L'isolement a été effectué sur milieu Pringsheim à 25% de NaCl (voir annexe). La purification de la souche a été réalisée sur milieu **KN** (voir annexe). La souche pure a été repiquée sur le milieu KN liquide à 15 % (v/v) de glycérol puis conservée à – 80°C (Laboratoire IRD-Marseille) [**Khelil Klouche, 1998**].

1. 2. Description du site d'étude

Le lac d'el Goléa est localisé au milieu du Sahara algérien, au sud de la ville d'el Goléa, s'étendant sur une longueur de 7 à 8 km. Il est alimenté par les eaux domestiques, les eaux de drainage de la palmeraie et les eaux de pluie, son degré élevé de la pollution et sa forte salinité (atteignant les 30 % au cours de la saison sèche) [**Hacène et al., 2004**] exercent une forte pression de sélection sur la microflore, permettant une sélection naturelle de souches particulières [**Khelil Klouche, 1998**].

Ce lac est divisé en quatre sites dont la souche ML9832 est issue du site N°1 qui se caractérise par [**Khelil Klouche, 1998**] :

- ✓ Début du lac proche de la ville;
- ✓ égouts, riche en matière organique ;
- ✓ arbustes, plantes, animaux ;
- ✓ mare stagnante, vase noirâtre ;
- ✓ profondeur 10 à 50 cm ;
- ✓ couleur : trouble avec des suspensions verdâtres.

Tableau N° 4 : Caractères physico-chimiques du lac d'El Goléa et d'autres écosystèmes hypersalins et marins [Boutaiba *et al.* , 2011].

Ecosystèmes	Caractères physico-chimiques (g/l)								
	pH	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃	Salinité
Lac d' El Goléa	9.0	107	/	0.3	0.4	198	/	/	296
Grand lac salé -USA	7.7	105	6.7	11.1	0.3	181	27	0.72	333
Mer morte	7.8	40.1	7.6	44.0	78.2	225	0.44	0.26	340
Wadi Natrun -Egypte	11	142	2.3	/	/	155	22.6	67	394
Lac Sidi Ameer (Eau) - Algérie	7.4	67.1	0.17	3.0	0.51	111	2.1	0.19	200
Sidi Ameer (Sédiment) - Algérie	7.15	94.5	0.23	2.9	1.7	170	1.1	/	/
Lac Himalatt (Eau) - Algérie	7.2	24.5	0.12	1.6	0.22	63.8	3.1	/	117
Océan Atlantique	8.5	10.6	0.38	1.29	0.42	19.2	2.68	0.14	34.85

1. 3. Revivification de la souche

A partir de la suspension bactérienne conservée à – 80°C, nous avons effectué des inoculations. 9 ml du milieu de culture liquide KN à 10% de NaCl (p/v) est inoculé par 1ml de la suspension conservée, ensuite la culture est incubée à 30 °C sous agitation pendant 5 à 6 jours (jusqu'à l'apparition d'un trouble).

1. 4. Vérification de la pureté de la souche

A partir de la culture liquide préparée précédemment, des passages successifs sont effectués sur milieu KN, solide et liquide, à 10% (p/v) de NaCl afin de vérifier et d'assurer la pureté de la souche ML9832.

La souche pure a été conservée à nouveau sur gélose nutritive inclinée à 4°C pour une durée de trois mois. Pour la conserver plus longtemps, la souche ML9832 est cultivée 24 heures en milieu KN liquide exempt de NaCl, ensuite la culture est additionnée de glycérol stérile à une concentration de 15% (v/v) et est immédiatement congelée à 0°C (au niveau de LAMAABE-Tlemcen- Algérie).

2. Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

La souche pure est soumise à une étude de ses différents caractères selon le protocole proposé par **Logan et al. (2009)** pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales*.

2. 1. Caractères phénotypiques

2. 1. 1. Caractères microscopiques

La souche ML9832 a étéensemencée sur le milieu de culture gélosé KN à 10% de NaCl (p/v) et incubée à 30°C, après l'apparition des colonies (6 jours d'incubation), la souche est repiquée sur le même milieu exempt de NaCl. Ensuite, des examens microscopiques ont été réalisés après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 30°C par :

- Un état frais : Observation de cellules vivantes afin de vérifier la mobilité, la présence de spores et la forme de la souche.
- Une coloration simple, après fixation, par application du bleu de méthylène pendant cinq minutes [**Harley et Prescott, 2002**].
- Une coloration de Gram : Observation d'un frottis fixé pour déterminer la forme, la présence de spores, le mode de regroupement et le plus important le type de paroi.

2. 1. 2. Caractères macroscopiques (cultureux)

Les caractères cultureux de la souche ML9832 (taille, forme et couleur de colonies) sont déterminés sur le milieu de culture gélosé KN après 24 heures d'incubation à 30°C et sur le même milieu additionné de 10% de NaCl (p/v) après 6 jours d'incubation à 30°C.

2. 1. 3. Caractères physiologiques

La physiologie de la souche a été étudiée par l'estimation de la cinétique de sa croissance, sur milieu liquide, à différentes conditions physico-chimiques de température, de pH et de salinité en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de **580 nm**, chaque **six heures pendant 72 heures** [**Kamat et al., 2011**].

La recherche de l'optimum de ces paramètres pour la croissance de la souche a été réalisée en variant l'un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants.

2. 1. 3. 1. Croissance à différentes températures

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance de la ML9832 a été effectuée par incubation à différentes températures (**4, 15, 25, 30, 37, 45 et 55°C**) de la souche ML9832 ensemencée sur le milieu de culture KN liquide à **pH 7** et **exempt** de NaCl.

2. 1. 3. 2. Croissance à différents pH

L'évolution de la croissance de la ML9832 en fonction de pH a été déterminée par la culture de la souche sur le milieu KN liquide **sans** NaCl ajusté à des pH de **2, 5, 7, 9, 11 et 13**. L'incubation a été effectuée à **30°C**.

2. 1. 3. 3. Tolérance à la salinité

Cette étude a été réalisée selon le protocole de **Joshi et al. (2008)**. La souche a été ensemencée sur le milieu KN liquide, avec **pH** égal à **7**, contenant des concentrations en NaCl de **0, 2, 5, 7.5, 10, 15, 17.5, 20, 25 et 30 %** (p/v). Après incubation sous agitation à **30°C**, la densité optique de la culture a été mesurée selon les conditions citées précédemment. La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la dernière concentration permettant encore une croissance.

2. 1. 4. Caractères biochimiques

Sur le plan biochimique, la caractérisation de la ML9832 a été réalisée par l'utilisation du système api 20^E [**Logan et Berkeley, 1984**], et d'autres techniques de la microbiologie classique pour la recherche de la catalase, l'oxydase, la Nitrate réductase, l'ADNase, l'Amylase, la Lécithinase, la dégradation de la caséine, la dégradation de l'esculine, l'hydrolyse du tween 80, le Mannitol mobilité et le type respiratoire,

2. 1. 4. 1. Le système api 20^E

La galerie api 20^E est un système simplifié et standardisé, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 20 tests biochimiques (voir annexe).

Dans les microtubes, une suspension bactérienne de la ML9832 effectuée en API medium à partir d'une culture de 18 heures sur milieu KN liquide à 10% de NaCl (p/v) (équivalent à 0,5 McFarland) estensemencée. Après incubation 24 heures à 30°C, les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'interprétation des résultats se réfère au catalogue joint avec la plaque (voir annexe).

2. 1. 4. 2. La recherche de la catalase

Il s'agit de la recherche de l'enzyme responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène ; la catalase. Le principe consiste à mettre en contact une colonie de la souche avec une goutte d'eau oxygénée H₂O₂. La présence de l'enzyme se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses [Health Protection Agency, 2011a].

2. 1. 4. 3. La recherche de l'oxydase

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Le principe consiste à déposer une colonie de la souche sur un disque imprégné du réactif oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine de couleur rose. La présence de l'enzyme se traduit par un virage de la couleur rose vers un violet noirâtre [Health Protection Agency, 2011b].

2. 1. 4. 4. La recherche de la Nitrate réductase

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme nitrate réductase. Il a été réalisé selon le protocole mentionné dans le *Bergey's Manuel of Systematics* [De Vos et al., 2009]. La souche ML9832 est cultivée sur bouillon nitraté, après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures, trois gouttes de chacun de réactif NIT I (acide parasulfanilique 0,8 g en 5 N acide acétique) et NIT II (diméthyl- α -naphthylamine 0.6 ml; acide acétique 100 ml), appelés aussi réactifs de GRIESS, sont ajoutées à la culture. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge.

En absence de cette coloration, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés s'il y a

- Apparition de la coloration rouge : les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la Nitrate réductase.

- Absence de coloration rouge : les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la Nitrate réductase.

L'apparition de gaz dans la cloche de Durham indique la réduction des nitrates en azote gazeux.

2. 1. 4. 5. La recherche de l'ADNase

L'hydrolyse de l'ADN est étudiée sur la gélose à ADN. Trois boîtes pétries coulées par la gélose à ADN sont ensemencées en une seule strie par la souche, puis incubées à 30°C. Chaque 24 heures, la lecture d'une boîte s'effectue en versant une solution d'HCl 1M sur la gélose. L'apparition d'une zone claire autour de la culture correspond à la dégradation de l'ADN, alors que l'opacification indique que l'ADN n'est pas dégradé et que la souche ne possède pas cette enzyme [Sánchez-Porro et al., 2003a].

2. 1. 4. 6. Hydrolyse de l'amidon

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est réalisée par l'ensemencement de la souche en une seule strie sur gélose à amidon. Après incubation à 30°C des observations régulières sont effectuées chaque 24 heures pendant 72 heures, en recouvrant la gélose par une solution de lugol. L'absence de la coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun [De Vos et al., 2009].

2. 1. 4. 7. La recherche de la Lécithinase

Ce test est réalisé par ensemencement de la souche en une seule strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf). L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, témoigne que la souche possède la lécithinase [De Vos et al., 2009].

2. 1. 4. 8. La dégradation de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur gélose au lait. La souche est ensemencée en une seule strie puis incubée à 30°C. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant 72 heures. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine [De Vos et al., 2009].

2. 1. 4. 9. La dégradation de l'esculine

La mise en évidence de la dégradation de l'esculine est réalisée sur la gélose à esculine par ensemencement de la souche par épaissements. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, la dégradation de l'esculine se manifeste par l'apparition d'un pigment brun à noir autour de la culture [Smibert et Krieg, 1994].

2. 1. 4. 10. L'hydrolyse du tween 80

La dégradation du tween 80 par la souche est réalisée sur un milieu approprié (dont la composition est donnée en Annexe), elle se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour de la culture après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures [Sierra, 1957].

2. 1. 4. 11. Mannitol mobilité

La mobilité de la souche est déterminée sur le milieu semi solide de mannitol-mobilité [Guiraud, 1998]. La souche est ensemencée par piqûre centrale. Après incubation pendant 72 heures à 30°C, la mobilité se traduit par l'envahissement du milieu à partir de la piqûre d'inoculation.

2. 1. 4. 12. Le type respiratoire

La mise en évidence du type respiratoire de la souche est réalisée selon le protocole de Guiraud (1998), sur une gélose profonde viande foie (VF) coulés dans des tubes. Au moment de l'emploi, la gélose est régénérée par chauffage au bain marie bouillant pendant 30 minutes, puis maintenue en surfusion à 45°C. L'ensemencement de la souche est effectué à l'aide d'une pipette pasteur qui est plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemer uniformément le milieu. Après refroidissement et solidification du milieu, les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures.

2. 1. 5. Étude du profil de résistance de la ML9832 aux antibiotiques

Le profil de résistance de la souche ML9832 est déterminé, en utilisant la technique de diffusion des disques sur la gélose Mueller-Hinton, vis-à-vis onze antibiotiques de différentes classes (Tableau N° 5). La souche est cultivée sur bouillon nutritif pendant 24 heures à 30°C. La culture est utilisée pour préparer une suspension dont la turbidité est équivalente à 0,5

McFarland (ajuster la turbidité de la culture en bouillon en pleine croissance avec du bouillon nutritif pour obtenir la turbidité voulue) [Akel et al., 2008].

Après immersion d'un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ajustée à 0,5 McFarland (équivalent de 1 à 2 x 10⁸ UFC/ml), il est essoré en le tournant sur la paroi interne du tube. Ensuite, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface de la gélose Mueller-Hinton, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. En fin l'écouvillon est passé sur la périphérie de la gélose. Après l'ensemencement de la souche, les disques d'antibiotiques sont appliqués et pressés sur la gélose à l'aide d'une pince stérile [CLSI, 2010].

Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 heures d'incubation à 30°C et la classification de la souche ML9832 comme intermédiaire, résistante ou sensible aux antibiotiques a été effectuée en accord avec les interprétations données par Bauer et al. (1966).

Tableau N° 5: Les antibiotiques utilisés

Antibiotiques	Classes	Sigle	Charge de disque (µg)
Rifampicine	Rifamycines	RA	30
Chloramphénicol	Phénicoles	C	30
Pristinamycine	macrolides	PT	15
Céfotaxime	Bêta-lactamines (C3G)	CTX	30
Gentamycine	Aminosides	CN	10
Oxacilline	Bêta-lactamines	OX	5
Pénicilline-Novobiocine	Bêta-lactamines	PNV	10-30
Amoxicilline-ac.clavulanique	Bêta-lactamines	AMC	20-10
Fosfomycine	Fosfomycine	FF	10
Tobramycine	Aminosides	TOB	10
Kanamycine	Aminosides	K	30

2. 2. Caractères génotypiques

L'étude génotypique de la souche ML9832 a été réalisée au niveau du laboratoire IRD de Marseille (France) avec la collaboration de Mr. Jean Luc CAYOL.

2. 2. 1. Étude phylogénique de la souche

L'analyse phylogénétique est réalisée par une comparaison des séquences d'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal selon la méthode suivante

2. 2. 1. 1. Extraction et purification de l'ADN génomique

Cette étape est réalisée pendant la phase exponentielle de la croissance avec un kit de purification d'ADN génomique Wizard (Promega), à partir de 5 ml de culture d'après le protocole fourni avec le kit.

2. 2. 1. 2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et purification du fragment amplifié

Le principe de cette technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant en grand nombre de fois grâce à une polymérase. L'amplification est réalisée par cycle comprenant les étapes suivantes :

- ✓ Dissociation de l'ADN double brin par élévation de la température du milieu réactionnel à 95°C pendant 7 minutes,
- ✓ Hybridation des amorces spécifiques des bornes du fragment d'ADN génomique à amplifier (ADN_r-16S) par abaissement de la température à 55°C pendant deux minute,
- ✓ Elongation des amorces par la *Taq* polymérase, après élévation de la température à 72°C pendant 20 minutes.

La purification de l'ADN_r-16S amplifié est réalisée après électrophorèse, par découpage du gel d'agarose. Après élimination de l'agarose, le fragment d'ADN est directement séquencé.

2. 2. 1. 3. Séquençage et analyse

Les séquences obtenues sont alignées à l'aide d'éditeur de séquence, avec celles des bactéries phylogénétiquement proches dont la séquence est déposée dans GenBank ou à l'EMBL. Après suppression des nucléotides et des alignements incertains, la matrice des similitudes est construite en utilisant les paramètres de corrélation d'**Olsen (1988)** selon la méthode de **Jukes et Cantor (1969)**.

A partir de cette matrice, l'algorithme de **De Soete (1983)** et une analyse transversale avec le programme DMAPARS du logiciel PHILIPS de **Felsenstein (1993)**, permettent de construire le dendrogramme.

Enfin la topologie de l'arbre phylogénétique est affinée à l'aide des programmes SEE QBOOT, FITCH et COMSEMBE du logiciel TREECON.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832
3. Pré-caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832
3.1. Germes test de référence utilisés

La mise en évidence du pouvoir antimicrobien de la souche ML9832 a été effectuée vis-à-vis 11 germes de référence (**Tableau N° 6**). L'ensemble de ces souches de références est fourni par les équipes « Sécurité microbienne des aliments », « Substances naturelles antimicrobiennes » et « Hygiène hospitalière » et « Les extrêmophiles » du laboratoire **L.A.M.A.A.B.E. - Tlemcen**.

A partir des cultures de 18 à 24 heures de microorganismes test sur leurs milieux appropriés, des suspensions en eau physiologique stérile sont préparées. La densité optique de chaque suspension est ajustée entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde $\lambda = 620$ nm pour les bactéries et entre 0,12 et 0,15 à une longueur d'onde $\lambda = 530$ nm pour la levure *Candida albicans* (turbidité équivalente à 0,5 McFarland).

Tableau N° 6 : Germes test de référence utilisées

Germes tests	Références
Gram positif	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
Gram négatifs	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 2453
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
Levure	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832**3. 2. Recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires sur milieu solide (technique des cylindres d'agar)**

Les activités antimicrobiennes extracellulaires de la souche ML9832 ont été recherchées par la technique des cylindres d'agar [Eccleston *et al.*, 2008 ; Radhika *et al.*, 2011], elle consiste à ensemencer la souche ML9832 en stries serrées sur la gélose KN sans NaCl de façon à obtenir un tapis. Après 72 heures d'incubation à 30°C, des cylindres d'agar d'environ de 6 mm de diamètre sont prélevés et déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés (Muller-Hinton et Sabouraud) préalablement ensemencés par un écouvillon stérile, selon la technique recommandée par la **CLSI (2010)**, par les suspensions des microorganismes test, ensuite, les boîtes de pétri sont laissées pendant deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour la levure (ces températures d'incubation des germes test sont respectées tout au long du notre travail).

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 24 à 48 heures d'incubation. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif [Kitouni, 2007].

3. 3. Recherche de l'activité antimicrobienne du surnageant

Après ensemencement de la souche ML9832 sur le milieu KN liquide exempt de NaCl, et incubation sous agitation pendant 72 h à 30°C, le milieu est centrifugé à 10000 t/min pendant 20 minutes [Chen *et al.*, 2010], ensuite, le surnageant est récupéré et testé pour son pouvoir antimicrobien par la technique des disques en papier [Khanna *et al.*, 2011], contre les mêmes germes cibles utilisés précédemment.

Des disques stériles en papier Wattman N° 3 de 6 mm de diamètre reçoivent un volume de 100 µl de surnageant, ensuite, ils sont déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés (Muller-Hinton et Sabouraud) préalablement ensemencés par les microorganismes test selon la technique recommandée par la **CLSI (2010)**. Après incubation dans les mêmes conditions décrites précédemment, les zones d'inhibition sont mesurées.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

3. 4. Choix du meilleur milieu pour la production des activités antimicrobiennes

Trois milieux de culture gélosés ont été utilisés pour étudier l'effet de la composition du milieu de culture de la souche ML9832 sur ses activités antimicrobiennes ainsi que pour chercher le bon milieu pour la production de ces activités antimicrobiennes [Moshafi et al., 2011] ; les milieux utilisés pour la culture de la souche ML9832 sont, la gélose KN dépourvu de NaCl, le milieu Mossel et la gélose nutritive. Le test des activités antimicrobiennes est réalisé par la méthode des cylindres d'agar.

Des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été prélevés après 72 heures d'incubation à partir des trois milieux utilisés, ensuite leurs activités sont testées contre les mêmes germes cibles utilisés précédemment et les zones d'inhibition sont mesurées après 24 à 48 heures d'incubation.

3. 5. L'effet du temps d'incubation sur la production des activités antimicrobiennes

Afin d'étudier l'effet du temps d'incubation de la ML9832 sur son pouvoir antimicrobien, la souche a été cultivée sur la gélose nutritive et incubée à 30°C pendant 72 heures. Des prélèvements de cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été effectués après 24, 48, et 72 heures d'incubation, pour tester leurs activités antimicrobiennes contre les mêmes onze germes utilisés précédemment [Awais et al., 2007]. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 24 à 48 heures d'incubation et comparés.

3. 6. L'extraction des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832

Afin d'extraire les activités antimicrobiennes de la souche ML9832, quatre solvants de polarité différente ont été testés : l'éther éthylique, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

L'extraction a été effectuée à partir de la culture de la souche ML9832 cultivée sur milieu solide (gélose nutritive) selon la technique de **Ayari et al. (2012)** en testant les quatre solvants, et à partir de la culture de la souche ML9832 en milieu liquide (bouillon nutritif) selon la méthode de **Chen et al. (2010)**, avec quelques modifications (concernant le volume de solvant ajouté) en testant seulement le chloroforme.

3. 6. 1. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la ML9832 cultivée en milieu solide

La souche ML9832 est ensemencée en stries serrées sur gélose nutritive, et incubée à 30°C pendant 72 heures ; des cubes d'agar de 10 mm² sont découpés et mis dans les différents solvants en raison de 40 cubes par 40 ml de chaque solvant. L'extraction a été réalisée sous agitation pendant deux heures à une température ambiante. L'extrait organique a subi une filtration par papier wattman N° 3 stérile, et ensuite une évaporation au rotavapeur rotatif à 45°C ; le résidu sec de l'évaporation est récupéré dans 5 ml du même solvant de l'extraction [**Ayari et al., 2012**].

Par la suite, l'activité antimicrobienne de chaque extrait (extrait étherique, chloroformique, d'acétate d'éthyle et méthanolique) a été évaluée par la technique des disques en papier [**Khanna et al., 2011**], contre *Bacillus cereus* ATCC **11778**, *Enterococcus faecalis* ATCC **29212**, *Staphylococcus aureus* ATCC **25923**, *E. coli* ATCC **25922**, *Salmonella enteritidis* ATCC **2453**, *Klebsiella pneumoniae* ATCC **70603**, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC **27853**.

Des disques stériles de papier Wattman N° 3 (6 mm de diamètre) reçoivent 100 µl de chaque extrait et des disques témoins reçoivent 100 µl des différents solvants purs (par des dépôts successifs de 10 µl tout en évitant les débordements). Après leur séchage, les disques en papier sont déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés, Muller-Hinton et Sabouraud, préalablement ensemencés par écouvillonnage, selon la technique **CLSI (2010)**, avec les suspensions des micro-organismes test.

Les boîtes de pétri sont laissées pendant 2 heures à 4°C, puis incubées pendant 24 à 48 heures à 37°C pour les bactéries et 25° pour *Candida albicans*, les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif [**Kitouni, 2007**].

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832**3. 6. 2. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la ML9832 cultivée en milieu liquide**

A partir des cultures de la ML9832 conservée sur gélose inclinée, 20 ml de bouillon nutritif sont inoculés, ensuite, le bouillon inoculé est incubé à 30°C, dans un bain marie thermostaté à agitation (180 t/min). Après 24 heures d'incubation, cette **préculture** est introduite stérilement dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 180 ml de bouillon nutritif, puis ré-incubée à 30°C sous agitation (180 t/min) pendant 72 heures. Le surnageant de la culture est collecté par une centrifugation à 10 000 tours pendant 20 minutes, ensuite, il est introduit dans un volume équivalent de chloroforme. Après une décantation pendant deux heures, la phase organique est récupérée pour ensuite subir une évaporation au rotavapeur rotatif à 45°C ; le résidu sec de l'évaporation est récupéré dans 5 ml de chloroforme.

3. 6. 2. 1. Test de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique

L'activité antibactérienne de cet extrait est évaluée par la technique des disques en papier décrite précédemment contre les mêmes bactéries cibles utilisées pour l'extraction de l'activité à partir de la culture de la souche ML9832 en milieu solide. La lecture des résultats est réalisée dans les mêmes conditions décrites ci-dessus.

3. 6. 2. 2. Test de l'activité antifongique de l'extrait chloroformique

L'extrait chloroformique de la souche ML9832 a été testé également pour son activité antifongique contre la levure de référence *Candida albicans* **ATCC 10231** par la technique des disques en papier [Khanna et al., 2011]. La préparation de la suspension est déjà décrite ci-dessus (3. 1.)

L'activité antifongique de l'extrait chloroformique a été évaluée parallèlement contre deux champignons (sauvages) *Cladosporium sp.* et *Aspergillus sp.* par la technique d'empoisonnement du milieu de culture [Soliman et Badeaa, 2002 ; Sharma et Parihar, 2010]. 20 ml du milieu Sabouraud, additionnés de 100 µl d'extrait chloroformique, sont coulées sur une boîte pétrie ; la boîte est ensuite inoculée au centre par un disque d'agar provenant d'une culture pure de 5 à 7 jours de la moisissure et puis incubée à 25°C ± 2 pendant 5 à 7 jours.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Une autre boîte contenant 20 ml de Sabouraud non additionné de l'extrait chloroformique est inoculée par un cylindre d'agar de la même culture de moisissure de 5 à 7 jours d'incubation, elle est utilisée comme boîte témoin.

La mesure des diamètres des zones de croissance mycélienne par rapport au contrôle se traduit par l'application de la formule suivante [Soliman et Badeaa, 2002] :

$$T = \frac{Db - Da}{Db} \times 100 \quad ; \text{ dont}$$

T : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

Da : Le diamètre (en mm) de la zone de la croissance mycélienne du disque d'agar de la culture pure de 5 à 7 jours inoculé sur milieu Sabouraud **additionné** d'extrait chloroformique (L'expérience).

Db : Le diamètre (en mm) de la zone de la croissance mycélienne du disque d'agar de la culture pure de 5 à 7 jours inoculé sur milieu Sabouraud **non additionné** d'extrait chloroformique (témoin).

3. 7. Séparation des activités antimicrobiennes

3. 7. 1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle de solvant. Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est relativement facile sur la plaque. Dans le cas contraire, nous devons rendre les taches visibles par révélation par UV ou par des révélateurs chimiques [Hainque et al., 2008].

Des bandelettes des plaques CCM en aluminium (20 x 2 cm) préalablement étalées par une couche mince de gel de Silice, ont été utilisées pour la réalisation de la chromatographie. **20 µl** de l'extrait chloroformique de la souche ML9832 sont déposés progressivement sous forme de spots, à l'aide d'une micropipette et sont séchés sous courant d'air chaud entre

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

chaque application. Les dépôts ont été réalisés à **1,5 cm** du bord inférieur de la bandelette et à partir de **1cm** des bords latéraux.

Les bandelettes sont ensuite introduites verticalement dans une cuve de CCM contenant **100 ml** de système éluant dont l'atmosphère de la cuve est saturée pendant deux heures, avant l'introduction des bandelettes, avec la vapeur du système éluant. La migration est arrêtée lorsque le front du système éluant a atteint **1cm** du bord supérieur de la plaque.

La constante de migration caractéristique de chaque espèce chimique dans un système de phase stationnaire / phase mobile donnée est appelée le rapport frontal, il est égal au rapport entre la distance parcourue par la tâche et la distance parcourue par le front de l'éluant depuis la ligne de dépôt [Tabbene et al., 2009].

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration entre depot et tâches}}{\text{Distance de migration entre depot et front de l'éluant}}$$

3. 7. 2. Les systèmes éluants utilisés

Trois systèmes de solvants ont été utilisés pour l'analyse chromatographique de l'extrait chloroformiques de la souche ML9832

- **C - M** : Chloroforme - Méthanol (60 : 40 v /v).
- **A - M** : Acétate d'éthyle - Méthanol (100 : 15 v /v).
- **C - M - A** : Chloroforme - Méthanol - Ammoniaque (8 : 1 : 1 v /v).

3. 7. 3. La révélation chimique

Après migration, la plaque est retirée de la cuve, puis le solvant est éliminé par une simple évaporation sous courant d'air chaud. On procède ensuite à la révélation en utilisant un réactif convenable qui fait apparaître les substances recherchées sous forme de taches colorées (spots).

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Trois révélateurs chimiques ont été utilisés dans notre travail

- Révélateur de sucres : réactif de Molisch
- Révélateur des amines : La ninhydrine.
- Révélateur de phénols : Fe Cl₃

La composition et le mode d'utilisation sont donnés en Annexe.

3. 8. Etude spectrale des activités antimicrobiennes par l'Infra-rouge.

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire « Catalyse et Synthèse en Chimie Organique – Tlemcen » avec l'aide précieuse du **Pr. Kara B.**

L'examen spectrophotométrique est réalisé à une absorption entre 700 à 4000 cm⁻¹ à l'aide d'un spectrophotomètre de type Agilent Technologies Cary 600FTIR Spectrometer.

Notre échantillon se présentait sous forme de poudre, il a été étalé à l'aide d'une spatule sur la surface centrale du diamant. Les mesures ont été réalisées automatiquement chaque deux minutes.

Résultats et Discussion

Le lac d'el Goléa d'où notre souche a été isolée, est localisé au milieu du Sahara algérien à 1000 km au sud de la côte d'Alger, il est caractérisé par une salinité atteignant 30% au cours de la saison sèche dont le taux d'évaporation atteint 2121 mm/an. Ce lac est considéré comme un environnement athalassohalin puisque sa salinité est dérivée de la dissolution des dépôts de sels d'origine continentale, il est aussi un écosystème hypersalin très particulier vue sa combinaison entre la salinité, la pollution et la situation géographique (climat aride) [Hacène et al., 2004].

La flore procaryote de ce lac est très diversifiée, Il héberge des microorganismes halotolérants et halophiles modérés regroupant des bactéries appartenant aux genres *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Streptococcus* et certains membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Salmonella*, *Shigella* et *Escherichia*). D'autres genres sont identifiés tels que *Bacillus*, *Proteus*, *Sporolactobacillus*, *Paracoccus*, *Gemella*, *Spirulina*, quatre genres de l'ordre *Actinomycetales* (*Streptomyces*, *Acinoplanes*, *Actinopolyspora* et *Spirillospora*), et le genre *Filobacillus*. Les halophiles extrêmes de ce lac sont représentés par des bactéries du genre *Halobacillus* et des archaea aérobies de la famille des *Halobacteriaceae* [Hacène et al., 2004].

Cette flore peut représenter un répertoire de biomolécules originales d'un potentiel biotechnologique très important, mais malheureusement les études existant sur ce lac restent encore timides malgré celle effectuée par Hacène et al. (2004) sur la diversité microbienne de ce lac. Ce lac a fait aussi l'objet d'une thèse de Magister dans laquelle l'auteur a isolé des espèces halophiles dotées d'activités antimicrobiennes [Khelil Klouche, 1998].

La souche ML9832, l'objet de ce travail, et qui fait partie de la collection isolée par Dr Khelil Klouche, a été soumise à une étude de ses différents caractères phénotypiques et génotypiques selon la base des tests proposés par Logan et al. (2009) pour la description de nouveaux taxons des bactéries aérobies sporulantes appartenant à l'ordre des *Bacillales*. Son profil de résistance aux antibiotiques a été aussi étudié vis-à-vis onze antibiotiques (RA, OX, PT, CTX, C, CN, TOB, PNV, AMC, FF.) ainsi que la recherche de ses activités antimicrobiennes vis-à-vis certains germes de référence et d'autres sauvages.

1. Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

1. 1. Résultats

1. 1. 1. Caractérisation phénotypique

1. 1. 1. 1. Caractérisation microscopique

L'observation au microscope optique (grossissement X 100 à immersion) de l'état frais, après 24 heures d'incubation à 30°C sur le milieu KN exempt de NaCl, montre que les cellules sont des bâtonnets immobiles à extrémités arrondies ; l'observation des cellules fixées, après coloration par le bleu de méthylène, montre également la forme bâtonnet des cellules (**Figure N° 9**).



Figure N° 9 : Observation microscopique de la souche ML9832, cultivée sur le milieu KN dépourvu de NaCl, après coloration par le bleu de méthylène (Observation par microscope optique G x100 à immersion).

L'observation du frottis fixé, après coloration de Gram, de la souche ML9832 cultivée pendant 24 heures sur le milieu KN dépourvu de NaCl à 30°C, révèle que les cellules sont des bâtonnets à Gram positif aux extrémités arrondies (**Figure N° 10**).



Figure N° 10 : Examen microscopique, après coloration de Gram, de la souche ML9832 après 24 heures d'incubation sur le milieu KN dépourvu de NaCl à 30°C (Observation par microscope optique G x100 à immersion).

L'examen microscopique, après coloration de Gram, de la souche ML9832 révèle également que les cellules sont capables de former des endospores sub-terminales non déformantes après 72 heures d'incubation sur le même milieu à 30°C (**Figure N° 11**).



Figure N° 11 : Examen microscopique, après coloration de Gram, de la souche ML9832 après 72 heures d'incubation sur le milieu KN dépourvu de NaCl à 30°C (Observation par microscope optique G x100 à immersion).

1. 1. 1. 2. Caractérisation macroscopique

Après ensemencement de la souche sur le milieu de culture KN dépourvu de NaCl, les colonies apparaissent après 24 heures d'incubation à 30°C en envahissant tout le milieu (**Figure N° 12**), tandis que sur milieu KN additionné de 10% de NaCl, les colonies apparaissent au bout de 6 jours d'incubation à 30°C (**Figure N° 13**), elles sont circulaires et convexes à contour régulier, de surface lisse et gluante et de couleur beige claire, leur diamètre est environ de 2 à 3 mm.



Figure N° 12 : Culture de la souche ML9832 sur milieu de culture KN dépourvu de NaCl après 24 heures d'incubation à 30°C.



Figure N° 13 : Culture de la souche ML9832 sur milieu KN additionné de 10% de NaCl après 6 jours d'incubation à 30°C.

1. 1. 1. 3. Caractéristiques physiologiques

L'évaluation de l'effet de la température, le pH et la concentration de NaCl sur la croissance de la souche ML9832 a été effectuée par l'estimation de la cinétique de sa croissance à ces différentes conditions en mesurant sa densité optique, à une longueur d'onde $\lambda=580$ nm, les densités optiques des inocula de départ sont tous standardisées entre 0,08 et 0,1.

Le **tableau N° 7** résume les gammes de toutes les conditions physicochimiques permettant la croissance de la souche ML9832 avec les valeurs optimales ; les résultats de la cinétique de croissance sont représentés parallèlement dans les figures **14**, **15**, et **16** ; d'où il ressort que la souche ML9832 est capable de croître à des concentrations de NaCl allant de **0** à **25%** (p/v) avec un optimum à **0 %**, à des températures comprises entre **15** et **37°C** avec un optimum à **30°C**, et à un pH situant entre **5** et **11** avec un optimum de croissance à pH égal à **7**.

Tableau N° 7 : Gamme de conditions physicochimiques permettant la croissance de la souche ML9832

Concentration de NaCl (%)	
Gamme	0 – 25 %
Optimum	0 %
Température de croissance (°C)	
Gamme	15 – 37°C
Optimum	30°C
pH de croissance	
Gamme	5 - 11
Optimum	7

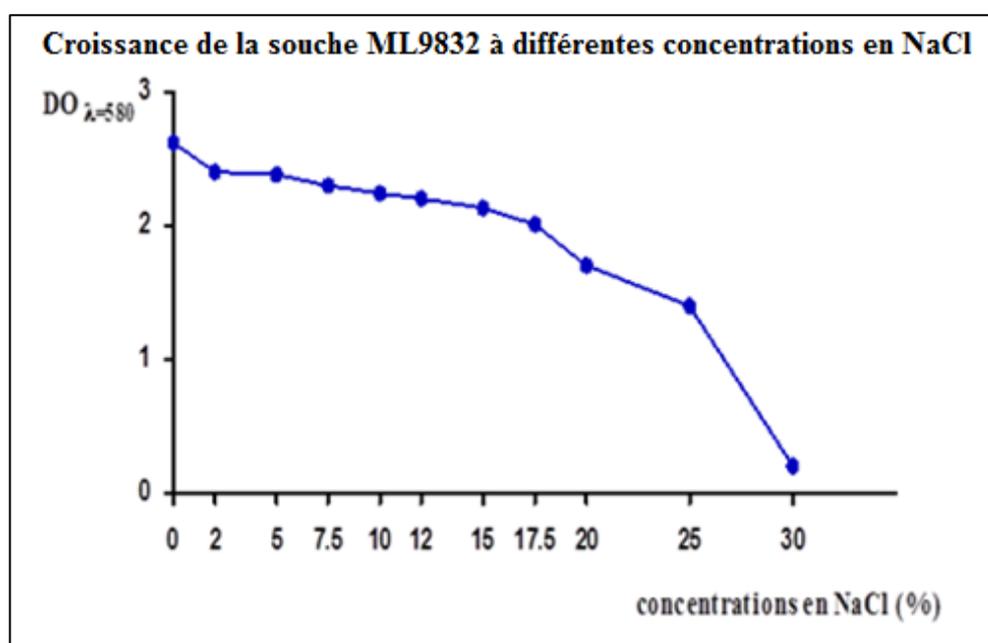


Figure N° 14 : Cinétique de la croissance de la souche ML9832 à différentes concentrations en NaCl.

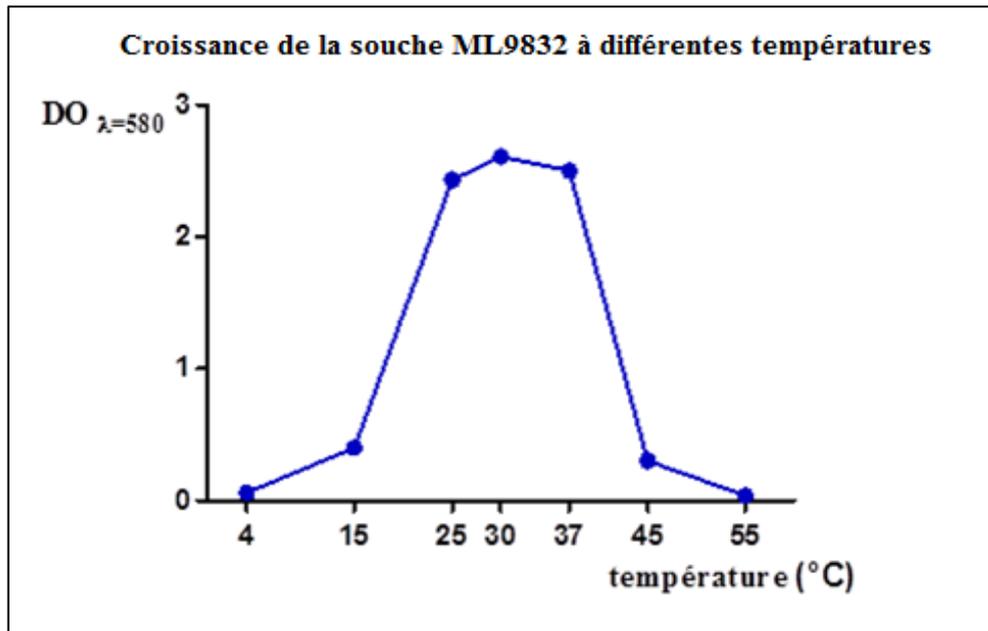


Figure N° 15 : Cinétique de la croissance de la souche ML9832 à différentes températures.

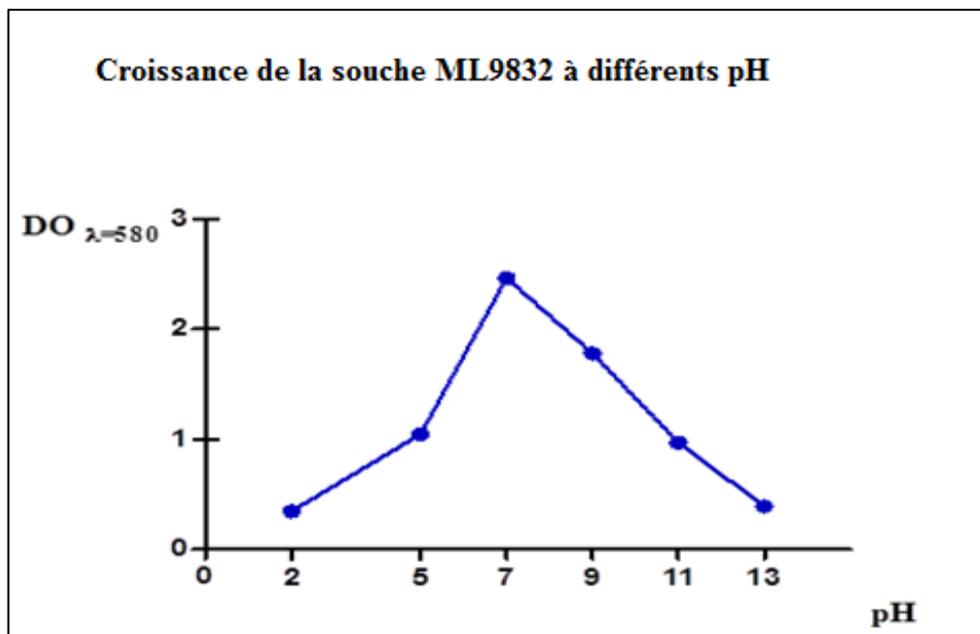


Figure N° 16 : Cinétique de la croissance de la souche ML9832 à différents pH.

1. 1. 1. 4. Caractéristiques biochimiques

Les résultats des différents caractères biochimiques de la souche ML9832 mis en évidence par la galerie Api 20^E et la galerie classique sont réunis dans le **tableau N° 8**, elles nous fournissent des éléments essentiels pour la classification de notre souche.

Tableau N° 8 : Résultats de différents tests biochimiques de la souche ML9832

Tests du système Api 20 ^E				Autres tests	
ONPG	+	GEL	+	Catalase	+
ADH	+	GLU	-	Oxydase	+
LDC	-	MAN	+	Nitrate réductase	+
ODC	-	INO	-	ADNase	-
CIT	-	SOR	-	Dégradation de l'amidon	+
H ₂ S	-	RHA	-	Lécithinase	+
URE	-	SAC	+	Dégradation de la caséine	+
TDA	-	MEL	-	Dégradation de l'esculine	+
Indole	-	AMY	+	Dégradation de tween 80	+
VP	+	ARA	+	Le type respiratoire	AF*

*AF : aéro-anaérobie facultatif.

Il est à noter que toutes les analyses effectuées et présentées dans le **tableau N° 8** ont été réalisées trois fois et les résultats sont reproductibles.

Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

D'après les données ainsi obtenues par le système api 20^E, nous pouvons déduire les caractéristiques suivantes (**Figure N° 17**) pour la souche ML9832 :

- ✓ La souche détient la β -galactosidase, l'Arginine dihydrolase, la Gélatinase, mais pas la Lysine décarboxylase, l'Ornithine décarboxylase, l'Uréease et la Tryptophane désaminase.
- ✓ Elle est capable de produire l'acétoïne mais pas l'indole et l'H₂S.
- ✓ Elle peut se développer sur le mannitol, le saccharose, l'amygdaline et l'arabinose comme seule source de carbone tandis qu'elle ne fermente pas le glucose, l'inositol, le sorbitol, le rhamnose et le mélibiose. Le citrate Simmons n'est pas utilisé.



a. Plaque Api 20^Eensemencée par la souche ML9832 (avant incubation)



b. Plaque Api 20^Eensemencée par la souche ML9832 (après 24 heures d'incubation à 30°C)

Figure N° 17: Résultats des caractères biochimiques, de la souche ML9832, réalisés par le système Api 20^E après 24 heures d'incubation à 30°C.

Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

Un screening des enzymes respiratoires et des activités hydrolytiques de la souche ML9832 a été également effectué ; les résultats sont réunis dans le **tableau N° 8** (mentionné précédemment) où il nous apparait que

- La souche possède la catalase, la cytochrome oxydase, la nitrate réductase (**Figure N° 18**).



A. Résultat du test de la catalase



B. Résultat du test de l'oxydase



C. Résultat du test de la recherche de la Nitrate réductase sur bouillon nitraté après 24 heures d'incubation à 30°C (avant **(a)** et après **(b)** l'ajout de réactifs NIT I et NIT II)

Figure N° 18: Résultats (A, B, et C) de la recherche des enzymes respiratoires de la souche ML9832.

Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

- La souche possède également la lécithinase et l'esculinase, mais pas l'ADNase, et est capable d'hydrolyser l'amidon, la caséine et le tween 80 (**Figure N° 19**).

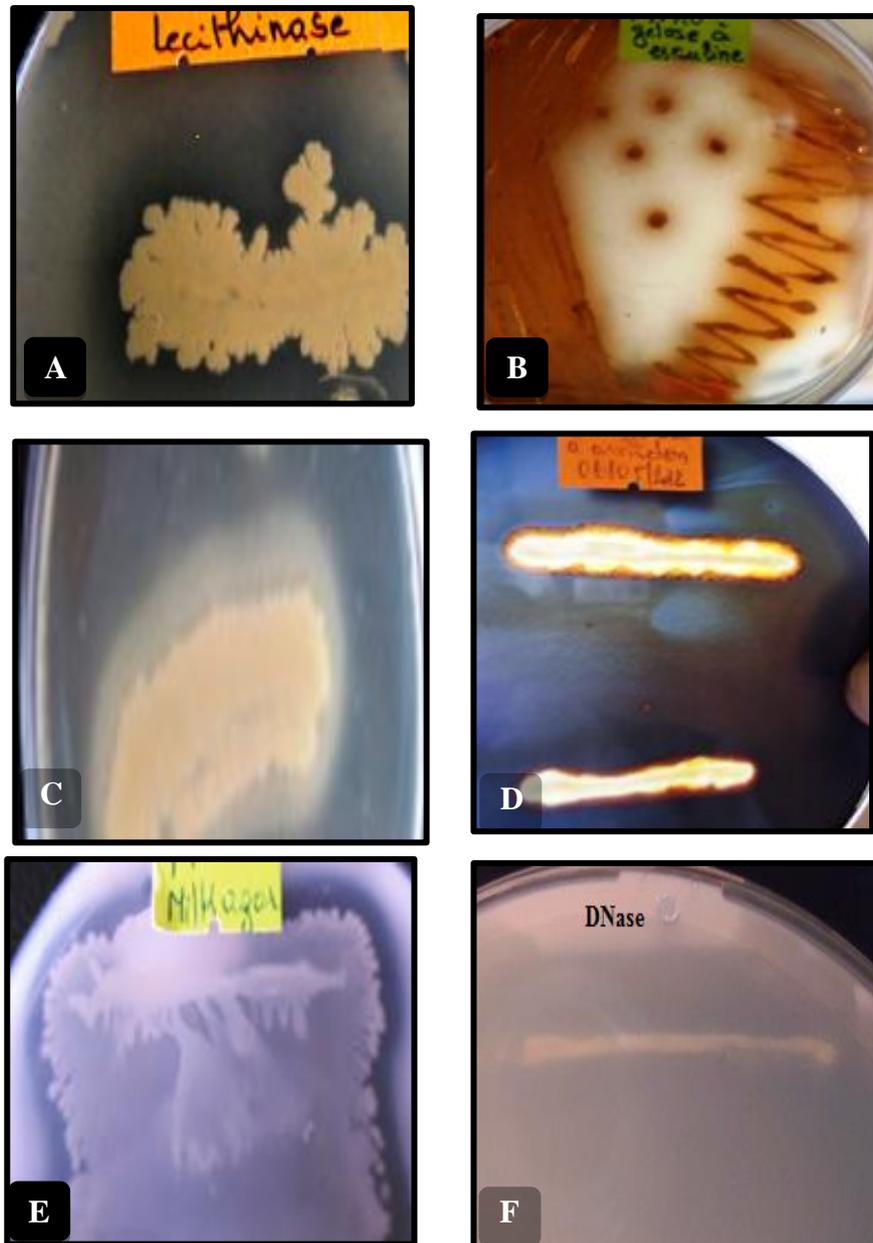


Figure N° 19 : Résultats de la recherche des activités hydrolytiques de la souche ML9832 après 24 heures d'incubation à 30°C. **A**. Hydrolyse de la lécithine sur gélose à l'œuf, **B**. Hydrolyse de l'esculine sur gélose à esculine, **C**. Hydrolyse du Tween 80 sur milieu contenant le Tween 80, **D**. Hydrolyse de l'amidon sur gélose à amidon, **E**. Hydrolyse de la caséine sur gélose au lait, **F**. Résultat négatif de la recherche de l'ADNase sur gélose à ADN.

- La culture de la souche sur le milieu VF montre qu'elle est aéro-anaérobie facultative (**Figure N° 20**).



Figure N° 20 : Résultat de la mise en évidence du type respiratoire de la souche ML9832 sur la gélose VF après 24 heures d'incubation à 30°C.

- Sa culture sur le milieu mannitol-mobilité provoque un virage de l'indicateur coloré sans avoir envahi tout le milieu, cela indique que la ML9832 fermente le mannitol et confirme qu'elle est immobile (**Figure N° 21**).



Figure N° 21 : Résultat de la culture de la souche ML9832 sur le milieu Mannitol-mobilité après 24 heures d'incubation à 30°C.

1. 1. 1. 5. Étude de l'antibiorésistance de la souche ML9832

Ce test est réalisé pour étudier le profil de la résistance de la souche ML9832 vis-à-vis de onze antibiotiques. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus et les valeurs de référence sont représentés dans le **tableau N° 9**.

Cette étude révèle que la souche ML9832 est sensible à la plus part des antibiotiques testés (Rifampicine, Gentamycine, Oxacilline, Pénicilline-Novobiocine, Tobramycine, et Kanamycine). Pour le Chloramphénicol, la Pristinamycine et l'Amoxicilline-ac.clavulanique la souche est intermédiaire, elle peut aller vers la résistance. La résistance de la ML9832 a été observée vis-à-vis la Céfotaxime et la Fosfomycine (**Figure N° 22**).

Tableau N° 9 : Résultats de l'antibiogramme de la souche ML9832 comparés aux valeurs de référence données par **Bauer et al. (1966)**.

Antibiotiques	Sigle	Charge de disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Diamètre lu (mm)
			S ≥	I	R ≤	
Céfotaxime	CTX	30	21	16-20	15	09 (Résistante)
Fosfomycine	FF	50	20	15-19	14	06 (Résistante)
Chloramphénicol	C	30	18	13-17	12	16 (Intermédiaire)
Pristinamycine	PT	15	19	15- 18	14	18 (Intermédiaire)
Oxacilline	OX	05	14	10-13	09	13 (Intermédiaire)
Amoxicilline-ac.clavulanique	AMC	20-10	18	14-17	13	17 (Intermédiaire)
Pénicilline-Novobiocine	PNV	10-30	25	19-24	18	28 (Sensible)
Rifampicine	RA	30	18	14-17	13	22 (Sensible)
Gentamycine	CN	10	15	13-17	12	24 (Sensible)
Tobramycine	TOB	10	15	13-17	12	27 (Sensible)
Kanamycine	K	30	18	14-17	13	30 (Sensible)

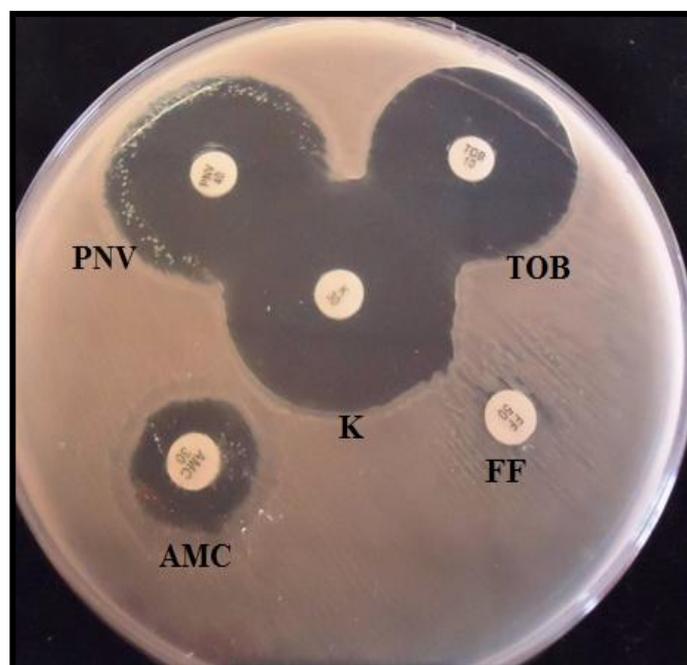
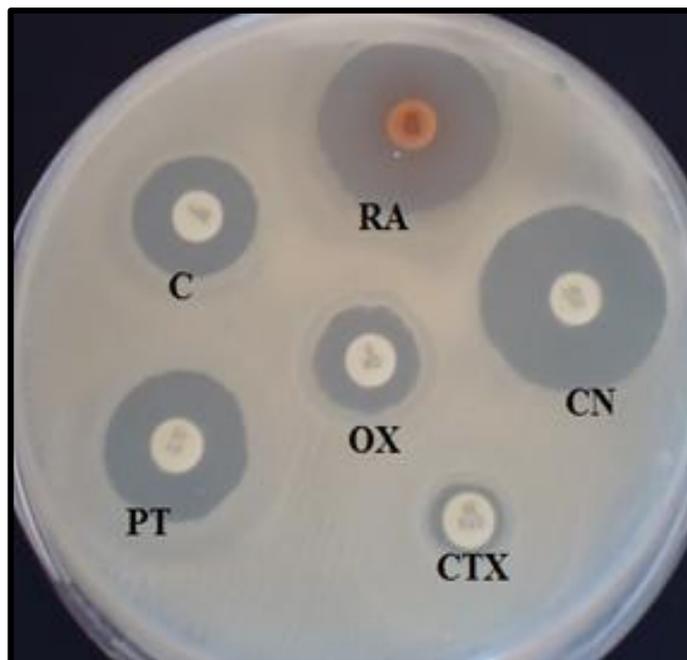


Figure N° 22 : Résultats de l'étude de l'antibiorésistance de la souche ML9832

1. 1. 2. Caractérisation génotypique

L'analyse phylogénétique a révélé que cette souche appartient au domaine de Bacteria, le groupe phylogénétique le plus proche avec 96 % de similitude est l'ordre des *Bacillales*.

Au seuil de cet ordre, la souche ML9832 est proche de *Bacillus pseudofirmus* [Nielson et al., 1995] par un pourcentage de similitude de 95% et de *Bacillus halodurans* [Nielson et al., 1995] par un pourcentage de similitude de 93,3%.

Par le biais de programmes spéciaux, l'arbre phylogénétique de la souche ML9832 illustré dans la **figure N° 23**, a été élaboré avec l'aide précieuse de Dr. Jean Luc CAYOL (laboratoire IRD - Marseille).

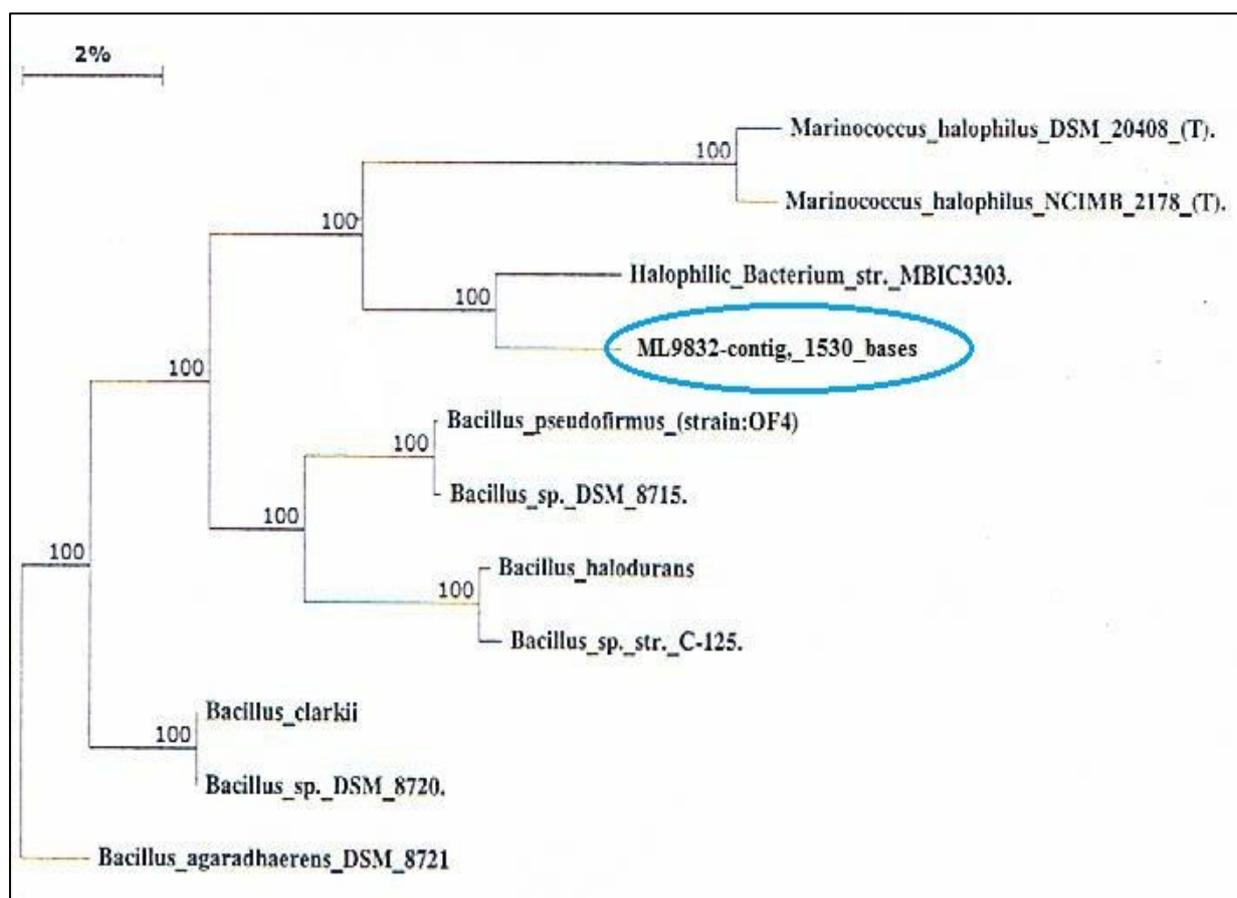


Figure N° 23: Arbre phylogénétique de la souche ML9832 construit d'après l'analyse des séquences de l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML9832 au sein de l'ordre des *Bacillales*.

1. 2. Discussion

L'identification phénotypique de la souche ML9832 a révélé qu'il s'agit d'un bâtonnet aéro-anaérobie facultatif et immobile, à Gram positif, capable de former des endospores sub-terminales non déformantes. C'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobie ou aéro-anaérobies facultatifs et halotolérants isolés à partir de différents habitats salins tels que les lacs salés, les aliments salés et les estuaires d'eau [Ventosa et al., 1989 ; Arahall et al., 1999 ; Yoon et al., 2004] et qui ont été affiliés au genre *Bacillus*, comme exemples l'espèce *Bacillus bagoriensis* isolée à partir d'un lac de soude au Kenya [Vargas et al., 2005], l'espèce *Bacillus okhensis* isolée à partir d'un lac salé en Inde [Nowlan et al., 2006] et l'espèce *Bacillus solisalis* isolée à partir d'un sol salé autour du lac salé de Yuncheng en Chine [Liu et al., 2009].

En se basant sur ces études et selon ce qui a été mentionné dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Volume 3. *The Firmicute*) [De Vos et al., 2009] ainsi que nos résultats, il apparaît que notre souche appartient au genre *Bacillus* ou du moins présente toutes les caractéristiques le concernant.

Son étude phylogénétique confirme également l'appartenance de notre souche à l'ordre des *Bacillales*. En effet, l'alignement de ses séquences nucléotidiques avec les banques de données a révélé une similarité de **96%** avec les séquences nucléotidiques de référence obtenues à partir du GenBank et l'EMBL des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches bactériennes appartenant à l'ordre des *Bacillales*.

Dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed. Volume 3. *The Firmicute*) [De Vos et al., 2009], l'ordre des *Bacillales* est classé au domaine de Bacteria, il est composé de 12 familles et 54 genres.

De plus, l'arbre phylogénétique réalisé montre la **nouveauté du taxon ML9832**. Elle est proche de l'espèce *Bacillus pseudofirmus* avec un pourcentage de similitude de **95%** et de l'espèce *Bacillus halodurans* avec un pourcentage de similitude de **93,3%**. Ces deux espèces ont été isolées à partir du sol [Nielsen et al., 1995], elles présentent les caractéristiques suivantes :

- Le *Bacillus pseudofirmus* (DSM 8715) présente des caractéristiques similaires à celles de *Bacillus firmus*. Elle forme des colonies crème, circulaires avec des bords irréguliers. les cellules sont des bâtonnets d'une longueur de 3,0 à 6,0 µm et une largeur de 0,6 à 0,8 µm, elle forme des spores centrales à sub-terminales non déformantes ; cette souche est capable d'hydrolyser le Tween 40 et 60, la gélatine, la caséine et l'amidon, mais pas le Tween 20 et pullulane. Elle possède la phénylalanine désaminase mais pas la nitrate réductase. Elle est strictement alcalophile, avec un optimum de croissance à pH égal à 9, et incapable de croître à pH égal à 7. La gamme de la température permettant sa croissance est comprise entre 10 et 45°C, sa croissance est marquée à une concentration de NaCl égale à 16%, certaines espèces tolèrent jusqu'à 17%. Elle est capable d'utiliser le ribose et le D-xylose comme seule source de carbone, mais pas le L-arabinose, galactose, rhamnose, sorbitol, lactose, mélibiose, D-raffinose, D- tagatose. Son pourcentage de G+C est compris entre 39,0 et 40,8 mole% [Nielsen et al., 1995].

- Le *Bacillus halodurans* a été également isolé à partir du sol, Elle forme des colonies blanches, circulaires avec des bords légèrement filamenteuses. Les cellules sont des bâtonnets d'une longueur de 3,0 à 4,0 µm et une largeur de 0,5 à 0,6 µm, elle forme des spores sub-terminales légèrement déformantes ; elle est capable d'hydrolyser le Tween 40 et 60, la gélatine, la caséine, l'amidon et le pullulane, mais pas le Tween 20 et l'hippurate. Elle ne possède pas la phénylalanine désaminase et la nitrate réductase. Elle pousse à un pH égal 7 avec un optimum de croissance à pH compris entre 9 et 10, La gamme de la température permettant sa croissance est comprise entre 15 et 55°C, sa croissance en présence de NaCl peut être observée jusqu'à une concentration de 12%. Elle est capable d'utiliser L-arabinose, galactose, xylitol, inositol, mannose, N-acetylglucosamine mais pas sur dulcitol, sorbitol, methyl α-D-mannoside ou D- tagatose, Son pourcentage de G+C est compris entre 42,1 et 43,9 mole% [Nielsen et al., 1995].

La souche ML9832 présente des caractéristiques similaires et autres différentes de celles de *Bacillus pseudofirmus* et *Bacillus halodurans* (**Tableau N° 10**), elle diffère en termes d'utilisation des sources de carbone, les pH, les températures et les concentrations salines de croissance ainsi que la possession de certaines enzymes. D'autre part, elle présente des

Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

caractères en commun tels que la possession de la caseinase, l'amylase et la gélatinase et aussi l'incapacité à utiliser le sorbitol.

Tableau N° 10 : Récapitulation des différentes caractéristiques de la souche ML9832, de *Bacillus pseudofirmus* et de *Bacillus halodurans*.

Caractéristiques	ML9832	<i>B. pseudofirmus</i>	<i>B. halodurans</i>
Formation de spore	+	+	+
Position de spore	ST	C / ST	ST
Gélatinase	+	+	+
GLU	-	+	+
INO	-	+	+
SOR	-	-	-
RHA	-	-	+
MEL	-	-	+
AMY	+	+	/
ARA	+	-	/
Nitrate réductase	+	-	-
Hydrolyse d' Amidon	+	+	+
Hydrolyse de la Caséine	+	+	+
Hydrolyse de Tween 80	+	-	-
Gamme de concentration de NaCl de croissance (%)	0-25	0-17	0-12
Gamme de température de croissance (°C)	15-37	10-45	15-55
Optimum de pH de croissance	7	9	9-10
G+C%	/*	39,0 et 40,8 mole%	42,1 et 43,9 mole%

* en cours de réalisation.

Sur la base de l'étude biochimique ainsi que l'arbre phylogénétique qui a montré une similitude de la souche ML9832 aux deux espèces du genre *Bacillus* (*Bacillus pseudofirmus* et *Bacillus halodurans*), nous pouvons conclure que notre souche est un nouveau taxon au sein de l'ordre *Bacillales*. Nous pouvons d'oser et déjà affirmer qu'il s'agit d'un nouveau genre nouvelle espèce sous réserve de complément de certaines données : l'analyse de la teneur en guanine et en cytosine (G+C%)

L'étude physiologique de la ML9832 montre que cette souche pousse à des concentrations salines allant de 0 jusqu'au 25% (p/v) avec un optimum de croissance à 0 % de NaCl, à 30 % de NaCl la souche n'a montré aucune croissance.

À la lumière de ces résultats et selon **Echigo et al. (2005)**, on peut conclure que la souche ML9832 est halotolérante, elle ne nécessite pas le NaCl pour sa croissance mais elle est capable de pousser en sa présence. Ainsi, sa tolérance à des concentrations supérieures à **20%** la fusionne dans le groupe des halotolérants extrêmes selon la définition de **Tiquia et al. (2007)**, ce qui n'est pas le cas pour la plupart des bactéries halotolérantes et halophiles isolées appartenant au genre *Bacillus* et qui sont généralement des modérées comme exemple *Bacillus okhensis* qui tolère des concentrations de NaCl de 0 à 10% [**Nowlan et al., 2006**], *Bacillus solisalsi* qui tolère des concentrations de NaCl allant jusqu'à 15% [**Liu et al., 2009**] et *Bacillus persepolensis* qui requière des concentrations allant de 5 à 20% [**Amoozegar et al., 2009**].

Notre résultat concernant l'halotolérance est également contredit avec ce qui a été indiqué pour les bactéries halotolérantes et halophiles qui sont généralement des modérées plutôt qu'extrêmes alors que l'halotolérance extrême est accordée aux archées [**Oren, 2002**].

L'intervalle de température toléré par la souche ML9832 se situe entre 15°C à 37 °C avec un optimum de croissance à 30°C, ce qui correspondait à la température initiale de l'isolement de la souche. Ces résultats nous permettent de la considérer comme une souche mésophile.

La gamme de pH permettant la croissance de la souche ML9832 se situe entre 5 et 11 avec un optimum de croissance à pH égal 7 cela indique que la souche ne tolère pas une forte acidité. La tolérance à l'alcalinité est plus ou moins importante, donc la souche ML9832 peut être considérée comme alcalitolérante selon la définition de **Nielsen et al. (1995)**.

En effet, la majorité des espèces du genre *Bacillus* capables de se développer à des concentrations salines allant jusqu'au 20% ou plus sont capables de pousser à des pH alcalins [Fritze, 1996] tels que *Bacillus halophilus* qui tolère des concentrations salines supérieures à 30% et pousse à des pH de 6 à 8 avec un optimum à pH égal à 7 [Ventosa et al., 1990]; *Bacillus pantothenicus* qui se croit à un pH de 9,7 à une concentration saline comprise entre 10% et 20% [Fritze, 1996] et *Bacillus bogorensis* qui tolère des concentrations salines supérieures à 10 % et exige des pH de 8 à 11 avec optimum à pH égal à 10 [Vargas et al., 2005].

La concentration en NaCl du milieu a une influence sur la réponse des souches du genre *Bacillus* au pH [Krulwich et al., 2001]. du fait que l'halotolérance et l'alcalitolerance voire même l'alcaliphilie sont souvent conjuguées, ce qui signifie que l'adaptation de ces microorganismes à des valeurs de pH élevées exigeait la présence intracellulaire d'ion de sodium pour le métabolisme et la régulation [Lewinson et al., 2004]. Cependant notre souche ML9832 a toléré un pH égal à 11 sans qu'elle ait exigé la présence de NaCl dans le milieu dont le milieu utilisé pour la recherche de l'optimum de pH de croissance a été exempt de NaCl.

La tolérance des microorganismes halophiles ou halotolérants au pH peut s'étendre sur de larges intervalles de pH, ce qui signifie qu'ils peuvent se développer également à des pH acides grâce à d'autres mécanismes d'acidotolérance comme exemple l'accumulation de solutés compatibles et de protons H⁺ [Lewinson et al., 2004]. Ce qui peut expliquer probablement la tolérance de la souche à un pH acide égal à 5.

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique de la souche ML9832 est très important, elle est capable d'hydrolyser la caséine, l'amidon, l'esculine, la lécithine et le tween 80, elle possède aussi la catalase et l'oxydase.

Dans le même contexte, plusieurs études consacrées au screening des enzymes extracellulaires par des bactéries halophiles et halotolérantes ont montré que ces microorganismes possèdent un pouvoir enzymatique important [Sanchez-Porro et al., 2003a].

Auparavant, il a été également signalé que les espèces du genre *Bacillus* soient connues par leur importante production de plusieurs types d'enzymes, et plusieurs processus industriels utilisent ces espèces pour la production d'enzymes commerciales [McConnell *et al.*, 1986].

L'identification biochimique par la galerie API 20^E a montré que la souche ML9832 possède également la Gélatinase, la Nitrate réductase, la β -galactosidase et l'Arginine dihydrolase. Parallèlement, ce système a révélé aussi que la souche ML9832 produit l'acétoïne et possède le pouvoir de métaboliser le mannitol, le saccharose, l'amygdaline et l'arabinose et non le glucose, le sorbitol, l'inositol, le rhamnose et le mélibiose.

L'étude du profil de la résistance de la souche ML9832 aux antibiotiques révèle une sensibilité à la Rifampicine, la Gentamycine et la Kanamycine, ces résultats sont similaires à ceux retrouvés par l'équipe de Liu en 2009, où ils ont montré que l'espèce *Bacillus solisalsi* est sensible à ces mêmes trois antibiotiques, et à ceux de Zhang *et al.* (2009) où il a été retrouvé que l'espèce modérément halotolérante *Bacillus korensis* isolée à partir d'un sol sableux est sensible à la Gentamycine et la Kanamycine.

D'autres études taxonomiques qui ont étudié le profil de résistance des bactéries halotolérantes du genre *Bacillus* ont montré une sensibilité de l'espèce *Bacillus sp. KYJ 963* isolée à partir d'un sol salé en Corée vis-à-vis la Rifampicine et le Kanamycine [Ha *et al.*, 2002] et de l'espèce *Bacillus persepolensis* vis-à-vis la rifampicine [Amoozegar *et al.*, 2009], Cette dernière étude montre, en parallèle, des résultats contradictoires avec celles de notre étude en ce qui concerne la résistance aux Gentamycine, Tobramycine et la Kanamycine dont l'espèce *Bacillus persepolensis* est résistante à ces antibiotiques alors que la souche ML9832 est sensible. Une autre étude montre également que la souche *Bacillus okhensis* est résistante à la gentamicine [Nowlan *et al.*, 2006].

Notre étude révèle aussi une sensibilité de la souche ML983 vis-à-vis l'Oxacilline et la Pénicilline-Novobiocine.

Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

La souche ML9832 montre parallèlement une résistance vis-à-vis la Céfotaxime et la Fosfomycine. Pour le Chloramphénicol, la Pristinamycine et l'Amoxicilline-ac. clavulanique, la souche est intermédiaire, elle peut tendre vers la résistance. Ce qui n'est pas le cas pour *Bacillus solisalsi* et *Bacillus korlensis* qui présentent tous les deux une sensibilité vis-à-vis le Chloramphénicol.

Une récapitulation de toutes les propriétés phénotypiques de la souche ML9832 mises en évidence dans la première partie de notre travail, en comparaison avec celles de l'espèce *Bacillus pseudofirmus* et l'espèce *Bacillus halodurans* ainsi que les propriétés de certaines autres espèces halotolérantes du genre *Bacillus* possédant de nombreuses caractéristiques différentes et d'autres analogues à celles de notre souche, est représentée dans le **tableau N° 11**.

Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

Tableau N° 11 : Caractéristiques phénotypiques différentielles entre la souche ML9832, l'espèce *Bacillus pseudofirmus*, l'espèce *Bacillus halodurans* et d'autres espèces halotolérantes du genre *Bacillus*.

1, La souche **ML9832**; **2**, *Bacillus pseudofirmus* [Nielsen et al., 1995]; **3**, *Bacillus halodurans* [Nielsen et al., 1995]; **4**, *Bacillus clarkii* [Nielsen et al., 1995]; **5**, *Bacillus agaradhaerense* [Nielsen et al., 1995]; **6**, *Bacillus bogoriensis* [Vargas et al., 2005]; **7**, *Bacillus okhensis* [Nowlan et al., 2006]; **8**, *B. solisalis* [Liu et al., 2009].

	1	2	3	4	5	6	7	8
Mobilité	-	/	/	/	/	-	+	+
Formation de spore	+	+	+	+	+	+	/	+
Position de spore	ST	C / ST	ST	ST	ST	/	/	ST
Tests du système Api 20^E								
ONPG	+	/	/	/	/	/	/	+
ADH	+	/	/	/	/	/	/	-
LDC	-	/	/	/	/	/		+
ODC	-	/	/	/	/	/	/	-
Citrate Simmons	-	/	/	/	/	/	/	-
H ₂ S	-	/	/	/	/	/	/	-
Uréase	-	/	/	/	/	-	/	-
TDA	-	/	/	/	/	/	/	/
Indole	-	/	/	/	/	/	/	-
VP	+	/	/	ng	ng	/	/	+
Gélatinase	+	+	+	+	+	-	+	-
GLU	-	+	+	-	+	-	/	-
MAN	+	/	/	ng	ng	-	-	+
INO	-	+*	+	-	-	-	/	-
SOR	-	-	-	-	+	-	/	-
RHA	-	-	+	-	+	+	+	-
SAC	+	/	/	/	/	/	/	/
MEL	-	-	+	-	+	-	/	-
AMY	+	+	/	-	+	-	/	-
ARA	+	-	/	+	+	+	/	+

Caractérisation phénotypique et génotypique de la souche ML9832

Tableau N° 10 (suite) : Caractéristiques phénotypiques différentielles entre la souche ML9832 et d'autres espèces halotolérantes du genre *Bacillus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Autres tests								
Catalase	+	/	/	/	/	+	/	+
Oxydase	+	/	/	/	/	/	/	+
Nitrate réductase	+	-	-	+	+	-	-	-
ADNase	-	/	/	/	/	/	/	+
Dégradation de								
Amidon	+	+	+	-	+	+	/	+
Caséine	+	+	+	+	+	/	+	+
Esculine	+	/	/	/	/	+	/	+
Tween 80	+	-	-	-	-	/	-	-
Lécithine	+	/	/	/	/	/	/	/
Concentration de								
NaCl (%)								
Gamme	0-25	0-17	0-12	5-16	2-16	0-2M	0-10	0-15
Optimum	0	/	/	/	/	/	5	/
Température de								
croissance (°C)								
Gamme	15-37	10-45	15-55	15-45	10-45	10-40	/	15-53
Optimum	30	/	/	/	/	37	/	35-42
pH de croissance								
Gamme	5-11	/	/	/	/	8-11	7-10	5-13
Optimum	7	9	9-10	10	10	10	/	7-10

C : centrale ; **ST** : sub-terminale ; / : non déterminé ; * : faiblement positif ; **ng** : pas de croissance

2. Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

2. 1. Résultats

2. 1. 1. Résultats de la recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires sur milieu solide par la technique des cylindres d'agar et l'effet du temps d'incubation

Cette étude est menée dans le but de tester le potentiel antimicrobien de la souche ML9832. Le screening primaire de l'activité antimicrobienne est réalisé par la technique des cylindres d'agar qui nous a permis de détecter l'effet inhibiteur de la souche ML9832 envers certains germes test utilisés ainsi que l'effet du temps d'incubation de la souche sur son activité antimicrobienne.

La souche a été cultivée sur le milieu KN gélosé dépourvu de NaCl et incubée à 30°C pendant 72 heures. Des prélèvements de cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été effectués après 24h, 48h, et 72h d'incubation pour tester l'activité antimicrobienne.

Les différents résultats obtenus à partir de cette étude sont illustrées dans les **Figures N° 24, 25 et 26**, et résumés dans le **tableau N° 12**, d'où il en ressort que la souche **ML9832** exerce un pouvoir inhibiteur contre toutes les bactéries à Gram positif testées à l'exception d'*Enterococcus faecalis*. Notre souche exerce également une activité contre certaines bactéries à Gram Négatif : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* à l'exception de *Salmonella enteritidis* et *Acinetobacter baumannii*. Aucun effet inhibiteur à l'égard de la levure *Candida albicans* n'a été détecté.

Le **tableau N° 12** révèle aussi que les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues avec les cylindres d'agar prélevés après **72** heures d'incubation envers tous les microorganismes inhibés par la souche ML9832.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Les zones d'inhibition les plus importantes ont été obtenues contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (13 mm) suivis par *E. coli*, *Bacillus cereus* (12mm).

Tableau N° 12 : Résultats du test de l'activité antimicrobienne de la souche ML9832 et l'effet de son temps d'incubation sur cette activité.

Germes tests	Diamètres obtenus à partir des cylindres de 24 heures (mm)	Diamètres obtenus à partir des cylindres de 48 heures (mm)	Diamètres obtenus à partir des cylindres de 72 heures (mm)
Bactéries à Gram positif			
<i>Bacillus cereus</i>	9	10	12
<i>Bacillus subtilis</i>	/	7	9
<i>Listeria monocytogenes</i>	9	9	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10	13
Bactéries à Gram négatif			
<i>E. coli</i>	11	11	12
<i>Salmonella enteritidis</i>	/	/	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>	/	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	11	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	10	13
Levure			
<i>Candida albicans</i>	/	/	/

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

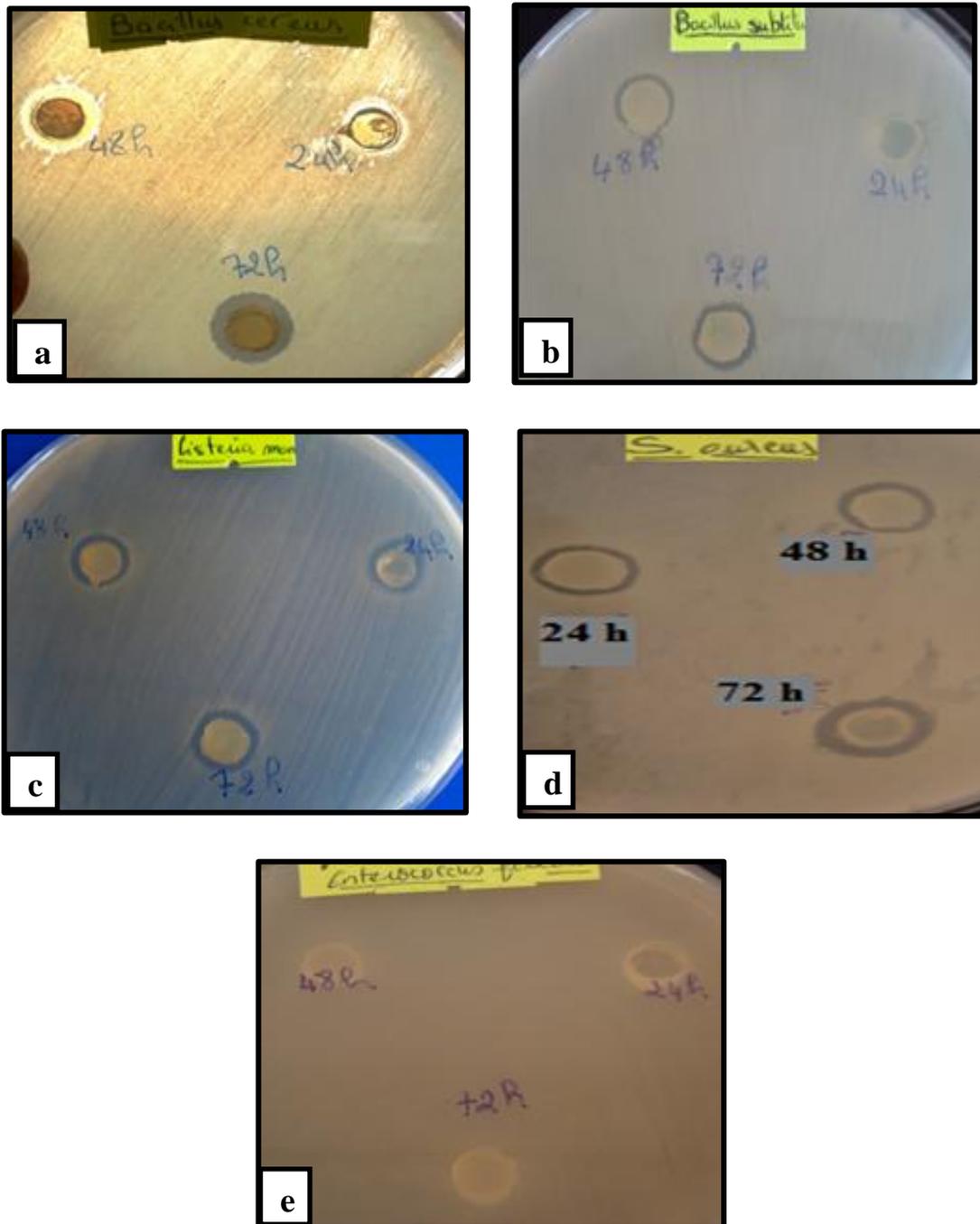


Figure N° 24 : Test d'activité antibactérienne de la souche ML9832, cultivée sur milieu KN exempt de NaCl, sur les bactéries à Gram positif par la technique des cylindres d'agar, ainsi que l'effet de temps d'incubation sur son activité [contre : (a) *Bacillus cereus*, (b) *Bacillus subtilis*, (c) *Listeria monocytogenes*, (d) *Staphylococcus aureus*, (e) *Enterococcus faecalis*].

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

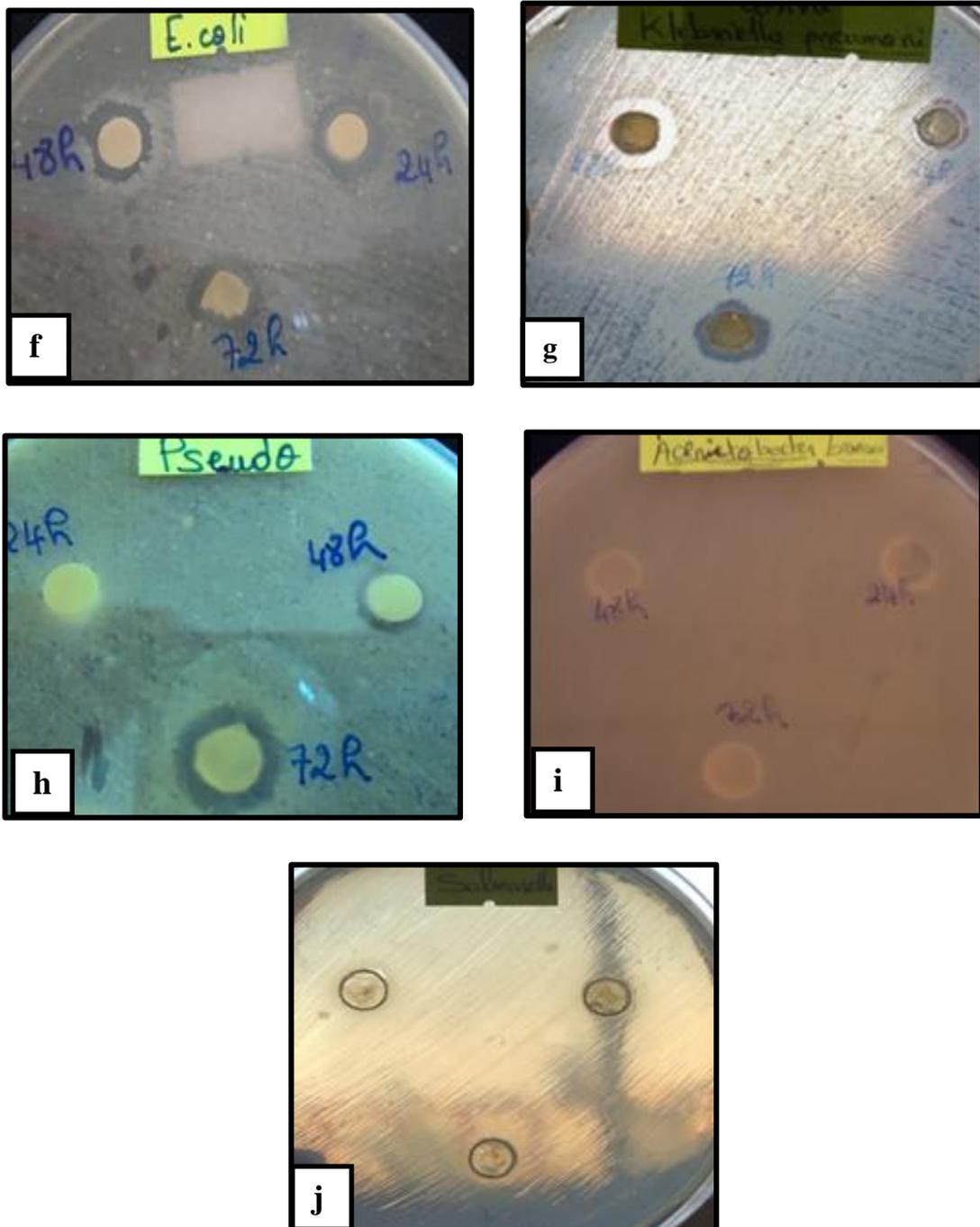


Figure N° 25 : Test d'activité antibactérienne de la souche ML9832, cultivée sur milieu KN exempt de NaCl, sur les bactéries à Gram négatif par la technique des cylindres d'agar, ainsi que l'effet de temps d'incubation sur son activité [contre : (f) *E. coli*, (g) *Klebsiella pneumoniae*, (h) *Pseudomonas aeruginosa*, (i) *Acinetobacter baumannii*, (j) *Salmonella enteritidis*].

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832



Figure N° 26 : Test d'activité antifongique de la souche ML9832, cultivée sur milieu KN exempt de NaCl, par la technique des cylindres d'agar, ainsi que l'effet de temps d'incubation sur son activité contre *Candida albicans*.

2. 1. 2. Résultats de la recherche de l'activité antimicrobienne du surnageant

Le surnageant de la culture de la souche ML9832 récupéré par centrifugation à 10000 t/min pendant 20 minutes a été testé pour son pouvoir antimicrobien par la technique des disques en papier contre *Bacillus cereus* ATCC11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 25212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Le surnageant de la souche ML9832 n'a montré aucun effet inhibiteur contre tous les germes testés, les résultats sont illustrés par les **figures** N° 27 et N° 28 avec les résultats des activités des extraits organiques.

2. 1. 3. Résultats du choix du meilleur milieu pour la production des activités antimicrobiennes par la souche ML9832

Beaucoup de travaux ont montré que la nature et la composition des milieux de culture ont un effet remarquable sur la capacité des microorganismes de produire des métabolites secondaires essentiellement les substances antimicrobiennes. Pour cette raison, nous avons testé l'activité antimicrobienne de la souche ML9832 sur trois milieux afin de choisir le meilleur milieu qui permet une production importante de substances antimicrobiennes.

Le **tableau N° 13** illustre les différents résultats des diamètres des zones d'inhibition obtenues par les cylindres d'agar prélevés à partir des différents milieux utilisés. La plus grande moyenne des diamètres des zones d'inhibition est obtenue avec les cylindres d'agar prélevés à partir de la gélose nutritive (**12 mm**) suivie par celle du milieu de culture de la souche ML9832 (**11,28 mm**), alors que la plus faible moyenne des diamètres des zones d'inhibition est obtenue avec les cylindres d'agar prélevés à partir du milieu Mossel (**8,42 mm**).

Cela nous permet de dire que les trois milieux utilisés favorisent la production de substances antimicrobiennes par l'isolat ML9832 mais avec un rendement différent donc la gélose nutritive constitue le meilleur milieu pour la production de ces substances tandis que le milieu Mossel constitue le milieu le moins favorable pour cette production. Ces résultats nous ont incité à sélectionner la gélose nutritive pour la suite de notre travail.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Tableau N° 13 : Résultats de l'effet de milieu d'incubation de la souche ML9832 sur son activité antimicrobienne.

Germes test	Diamètres max des zones d'inhibition obtenues avec les cylindres d'agar prélevées à partir de la gélose nutritive (mm)	Diamètres des zones d'inhibition obtenues avec les cylindres d'agar prélevées à partir du milieu KN exempt de NaCl (mm)	Diamètres des zones d'inhibition obtenues avec les cylindres d'agar prélevées à partir du milieu Mossel (mm)
Bactéries à Gram positif			
<i>Bacillus cereus</i>	13	12	8
<i>Bacillus subtilis</i>	11	9	7
<i>Listeria monocytogenes</i>	11	10	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	12	8
Bactéries à Gram négatif			
<i>E. coli</i>	12	12	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	11	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	13	9
Moyenne	12	11,28	8,42

2. 1. 4. Résultats de l'extraction des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832

2. 1. 4. 1. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la souche ML9832 cultivée en milieu solide

Quatre solvants de polarité différente (l'éther éthylique, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol) ont été utilisés pour extraire les molécules antimicrobiennes de la souche ML9832 à partir du milieu de culture solide (la gélose nutritive).

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Le test de l'activité a été réalisé par la technique des disques en papier de 6 mm de diamètre contre *Bacillus cereus* ATCC11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 25212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau N° 14, l'activité antibactérienne mise en évidence est illustrée par les figures N° 27 et N° 28.

A partir des résultats obtenus, il se révèle que :

✓ L'extrait chloroformique a inhibé tous les germes tests utilisés dont les grands diamètres des zones d'inhibition ont été obtenus contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (23 mm) et suivie par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922 (15 mm).

✓ L'extrait d'acétate d'éthyle exerce une activité, moins importante que celle de l'extrait chloroformique, contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Salmonella enteritidis*, l'activité contre *Enterococcus faecalis* ATCC 25212 est très faible alors qu'aucune activité n'a été détectée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

✓ L'extrait méthanolique n'a inhibé aucune bactérie à Gram positif, pour les bactéries à Gram négatif, une très faible activité a été détecté seulement contre *Salmonella enteritidis* ATCC 2453,

✓ L'extrait d'éther éthylique a donné une très faible activité contre *Bacillus cereus* ATCC11778, *E. coli* ATCC 25922. *Salmonella enteritidis* ATCC 2453, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, alors qu'aucune activité n'a été détectée contre *Enterococcus faecalis* ATCC 25212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ces résultats font ressortir le chloroforme comme le meilleur solvant pour l'extraction des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

La supériorité des diamètres des zones d'inhibition produites par l'extrait chloroformique par rapport à ceux des autres extraits, nous incite à choisir le chloroforme pour l'exploiter dans la suite du travail.

Tableau N° 14 : Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues par les différents solvants à partir du milieu solide.

Germes tests	diamètres obtenus par ECh (mm)	diamètres obtenus par EAc (mm)	diamètres obtenus par EE (mm)	diamètres obtenus par EM (mm)
Bactéries à Gram positif				
<i>Bacillus cereus</i>	12	10	7	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	7	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	/	/	/
Bactéries à Gram négatif				
<i>E. coli</i>	15	11	7	/
<i>Salmonella enteritidis</i>	12	10	7	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	/	7	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	11	/	/

ECh : Extrait Chloroformique.

EAc : Extrait d'Acétate d'éthyle.

EE : Extrait d'Ether éthylique.

EM : Extrait Méthanolique.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

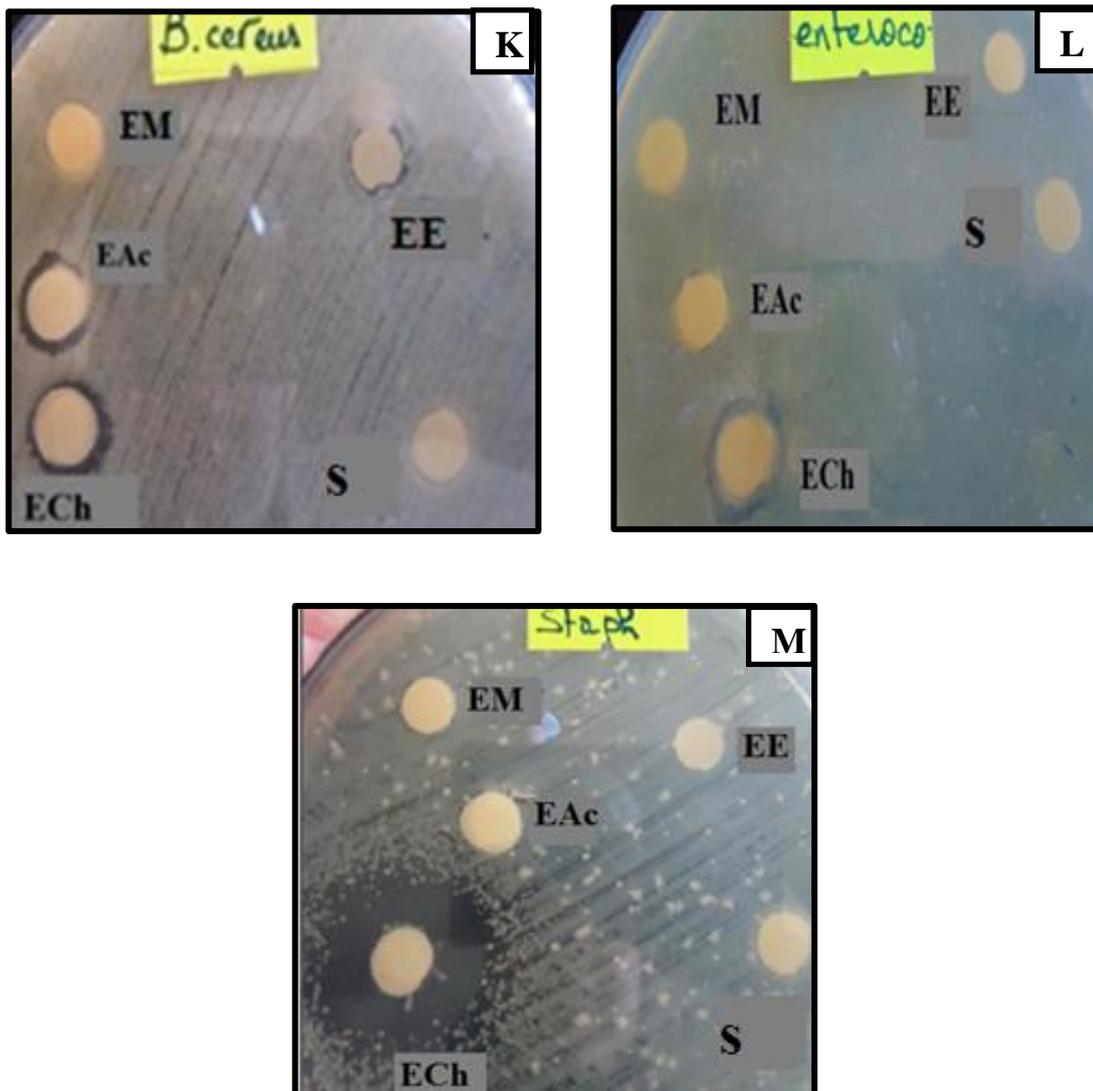


Figure N° 27 : Activité antibactérienne du surnageant et des extraits organiques extraits à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu solide contre les bactéries à Gram positif [(**K**) *Bacillus cereus*, (**L**) *Enterococcus faecalis*, (**M**) *Staphylococcus aureus*].

EM : Extrait Méthanolique, **EAc :** Extrait d'Acétate d'éthyle,

ECh : Extrait Chloroformique, **EE :** Extrait d'Ether éthylique,

S : Surnageant

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

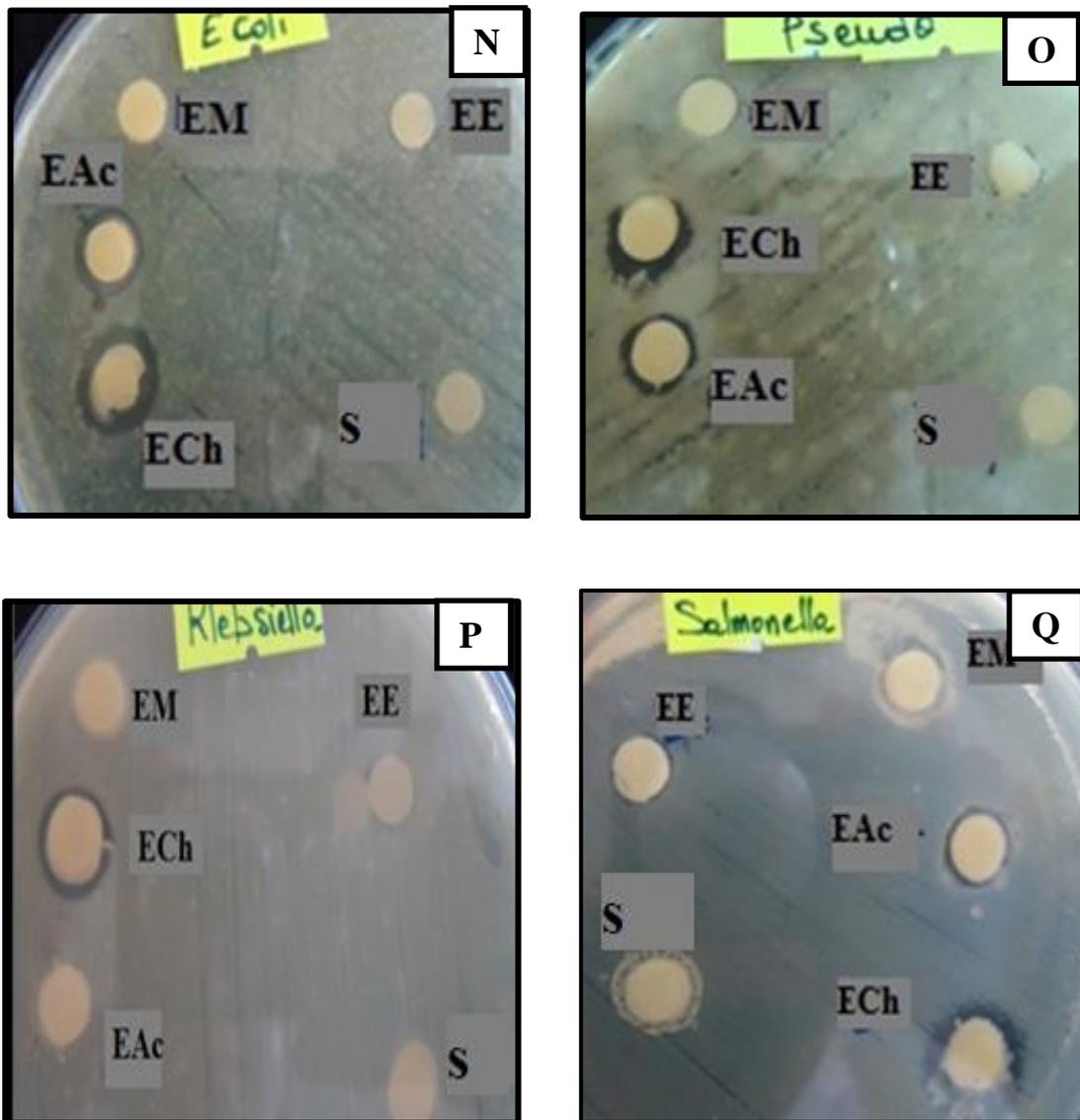


Figure N° 28 : Activité antibactérienne du surnageant et des extraits organiques extraits à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu solide contre les bactéries à Gram négatif [(N) *E. coli*, (O) *Pseudomonas aeruginosa*, (P) *Klebsiella pneumoniae*, (Q) *Salmonella enteritidis*].

EM : Extrait Méthanolique, **EAc :** Extrait d'Acétate d'éthyle,

ECh : Extrait Chloroformique, **EE :** Extrait d'Ether éthylique,

S : Surnageant.

2. 1. 4. 2. L'extraction des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la ML9832 cultivée en milieu liquide

Pour ce test, un seul solvant a été utilisé, le chloroforme, pour l'extraction des activités antimicrobiennes à partir du milieu liquide (Bouillon Nutritif) en se basant sur les résultats de l'extraction à partir du milieu solide qui révèlent que l'extrait chloroformique est le meilleur solvant d'extraction des molécules antimicrobiennes produites par l'isolat ML9832.

Pour ce faire, une culture de la souche ML9832 effectuée sur bouillon nutritif pendant 72 heures à 30°C a subi une centrifugation de 10 000 tours pendant 20 minutes. Le surnageant est ensuite collecté et introduit dans un volume équivalent du chloroforme. Après décantation, la phase organique est récupérée, puis évaporée au rotavapeur à 40°C. le résidu sec est récupéré dans 5 ml de chloroforme.

L'extrait récupéré a été testé pour son activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* ATCC11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 25212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 par la technique des disques en papier.

Son activité antifongique a été également réalisée, en parallèle avec l'activité antibactérienne, contre *Candida albicans* ATCC 10231 par la technique des disques en papier, et contre *Cladosporium sp.* et *Aspergillus sp.* par la technique d'empoisonnement de la nourriture.

Les résultats sont représentés dans les tableaux N° 15 et N° 16, les figures 29 et 30 confirment ces résultats d'où il apparaît que l'extrait chloroformique est actif contre toutes les bactéries test utilisées, résultat identique à celui de l'extraction des activités antimicrobiennes à partir du milieu solide.

Le chloroforme permet aussi l'extraction des activités antifongiques actives contre *Candida albicans* et *Aspergillus sp.*

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Tableau N° 15 : Résultats du test de l'activité antimicrobienne de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide (technique des disques en papier)

Germes tests	diamètres obtenus par ECh (mm)
Bactéries à Gram positif	
<i>Bacillus cereus</i>	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	25
Bactéries à Gram négatif	
<i>E. coli</i>	15
<i>Salmonella enteritidis</i>	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Levure	
<i>Candida albicans</i>	10

Tableau N° 16 : Résultats du test de l'activité antifongique de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide (technique d'empoisonnement de la nourriture)

Germes	Pourcentages de zones d'inhibition
<i>Aspergillus sp.</i>	23,33%
<i>Cladosporium sp.</i>	/

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

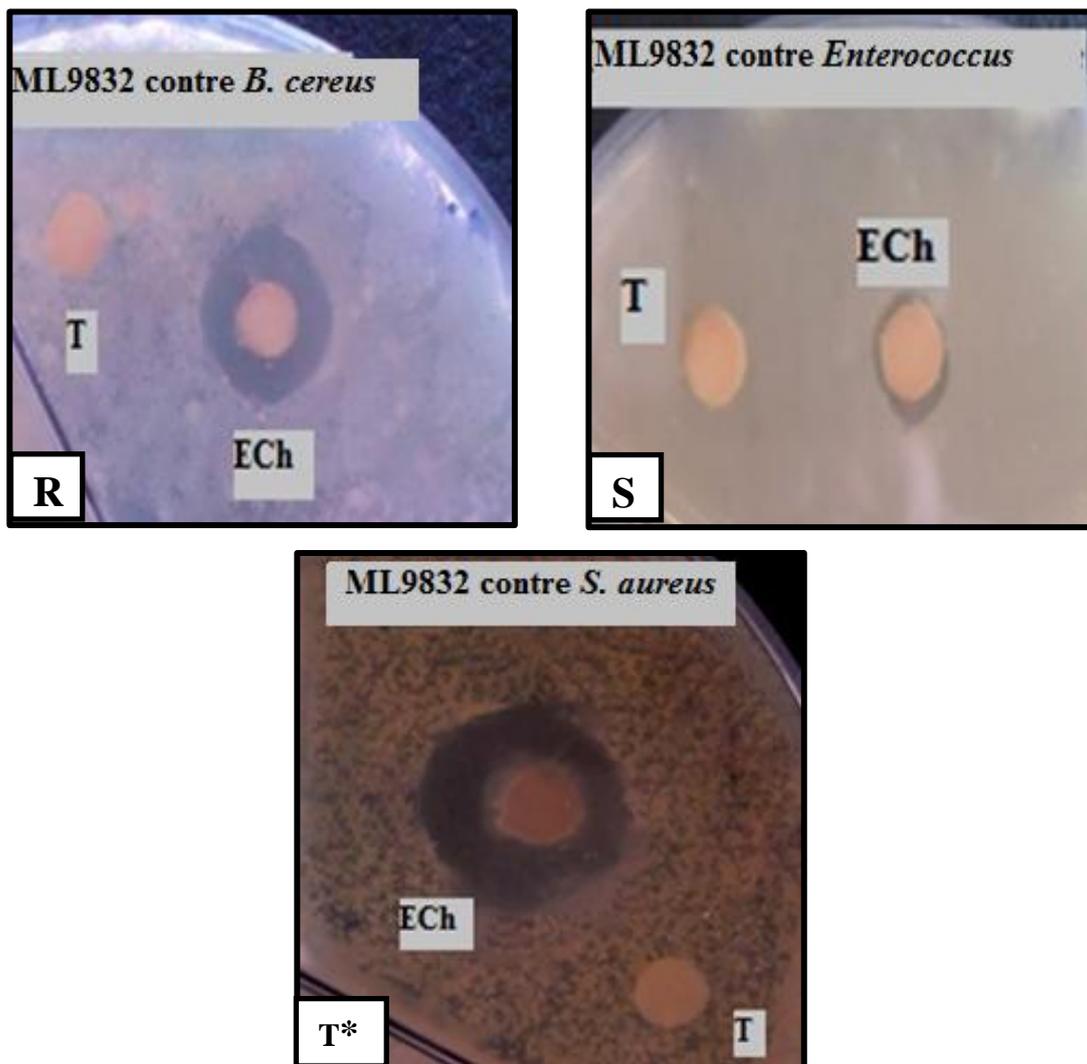


Figure N° 29 : Activité antibactérienne de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide contre les bactéries à Gram positif [(R) *Bacillus cereus*, (S) *Enterococcus faecalis*, (T*) *Staphylococcus aureus*].

ECh : Extrait Chloroformique, T : Témoin.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

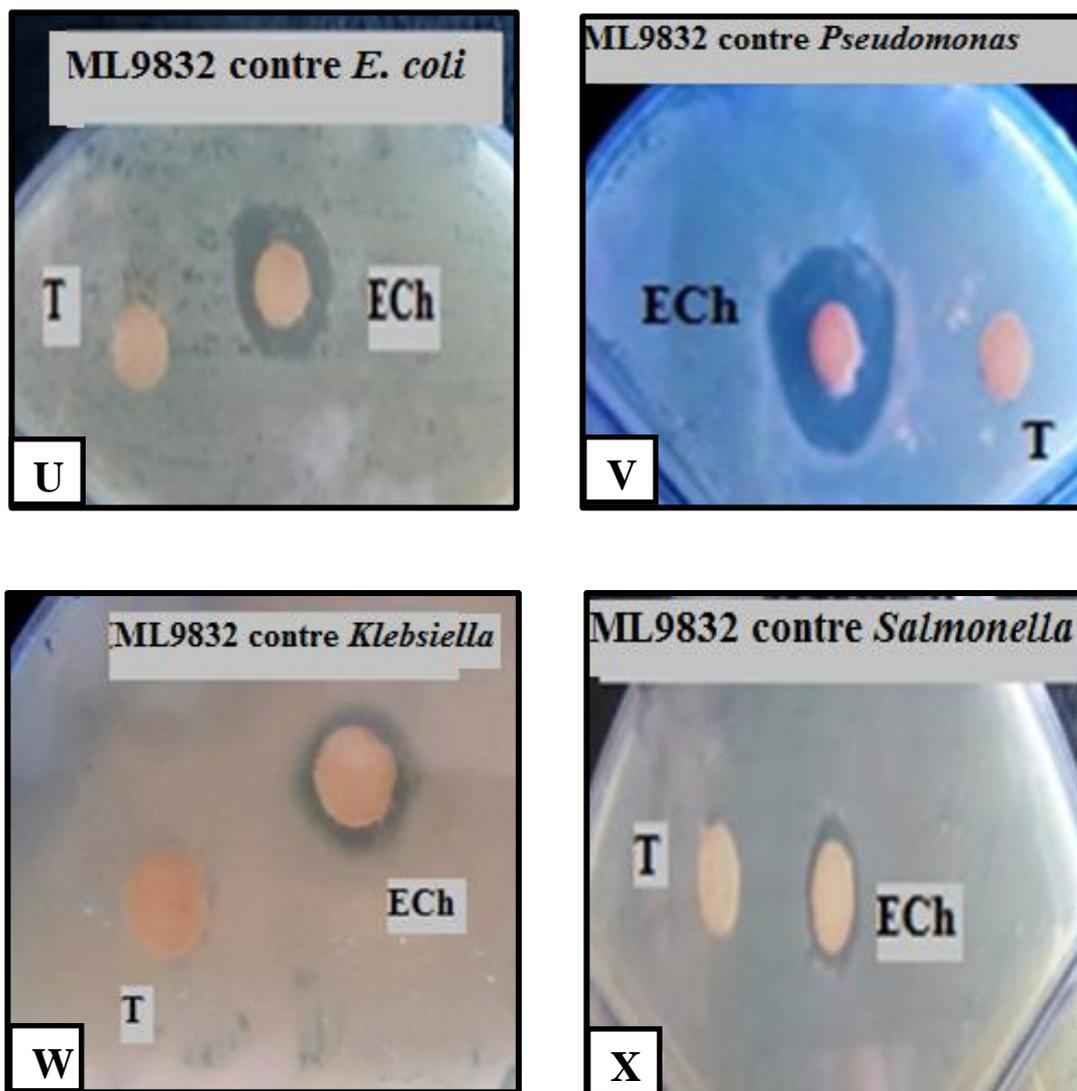


Figure N° 30 : Activité antibactérienne de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide contre les bactéries à Gram négatif [(U) *E. coli*, (V) *Pseudomonas aeruginosa*, (W) *Klebsiella pneumoniae* (X) *Salmonella enteritidis*.].

ECh : Extrait Chloroformique, T : Témoin.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

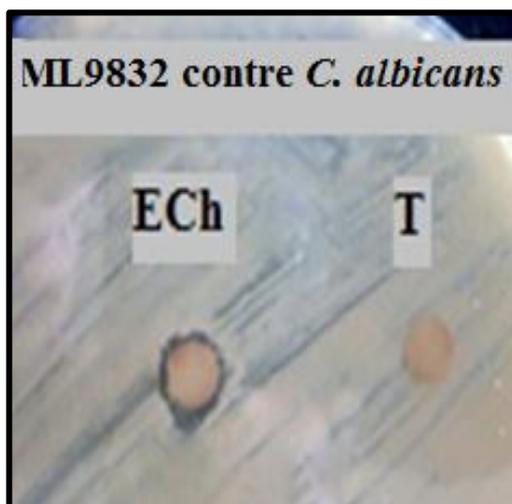


Figure N° 31 : Activité antifongique de l'extrait chloroformique extrait à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide contre *Candida albicans*.

ECh : Extrait Chloroformique, **T :** Témoin.

2. 1. 5. Résultats de la séparation des activités antimicrobiennes par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Une analyse qualitative de l'extrait chloroformique de la souche ML9832 a été réalisée par une chromatographie sur couche mince.

Après développement de la chromatographie dans les différents systèmes des solvants utilisés, les rapports frontaux sont calculés après révélation chimique. Les résultats sont réunis dans le tableau N° 17.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Tableau N° 17 : Comportement de l'extrait chloroformique de la souche ML9832 sur couche mince de gel de silice, et les rapports frontaux calculés après révélation chimique.

Les révélateurs chimiques	Les systèmes de solvants		
	Chloroforme – Méthanol (60 - 40)	Chloroforme-Méthanol – Ammoniaque (2 – 1 -1)	Acétate d'éthyle – Méthanol (100-15)
La ninhydrine	Rf = 0,93	Rf = 0,55	Rf = 0,45
Aspect de tâches	spots pourpres	spots pourpres	spots pourpres
Fe cl₃	Rf = 0,97	Rf = 0,63	/
Aspect de tâches	Spots marronnâtes	Spots marronnâtes	/
Réactif de Molish	/	/	/

Les tests des réactions chromogéniques effectués sur les systèmes solvants Chloroforme - Méthanol (60 - 40) et Chloroforme-Méthanol-Ammoniaque (2-1-1) sont positifs pour les révélateurs chimiques des amines (ninhydrine) et des phénols (Fe cl₃). Alors que le test effectué sur le système Acétate d'éthyle – Méthanol (100-15) est positif seulement pour la ninhydrine.

Ces résultats ont permis de déduire la présence des groupements amines (N-terminales) libres et phénols par contre les résidus osidiques sont absents

D'après les rapports frontaux pour chaque tache révélée, le système Chloroforme – Méthanol (60 – 40 (v/v)) est le bon système solvant permettant une migration rapide des molécules bioactives et une bonne séparation.

Une tache révélée peut être constituée soit d'un seul type de molécule ou bien d'un ensemble de molécules ayant le même poids moléculaire et donc la même vitesse de migration.

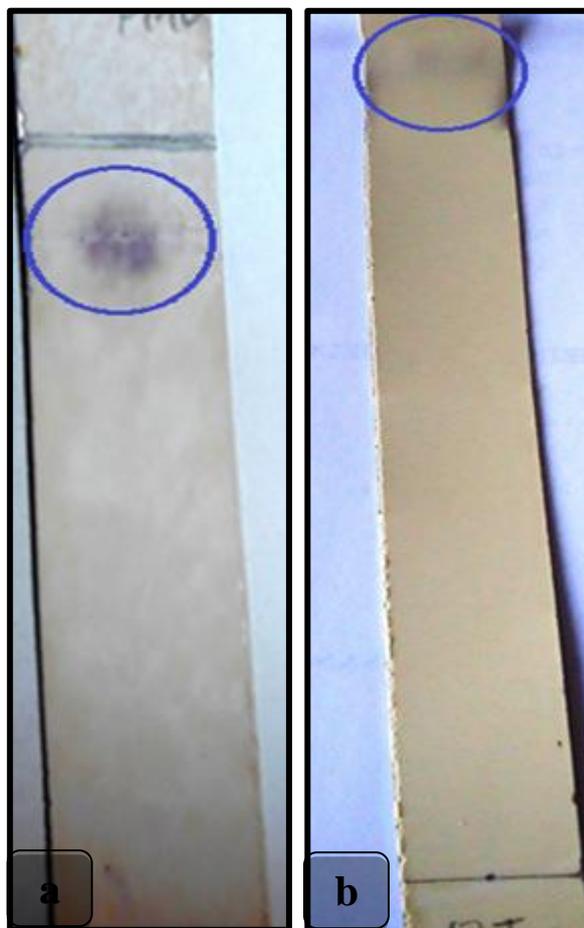


Figure N° 32 : Comportement de l'extrait chloroformique de la souche ML9832 sur la couche mince de gel de silice après révélation par : **a**, la Ninhydrine et **b**, le $FeCl_3$

2. 1. 6. Résultats de l'étude spectrale par Infra-Rouge (IR) des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

L'étude spectrophotométrique des activités antimicrobiennes de la souche ML9832 par l'IR a permis de mettre en évidence l'existence des pics caractéristiques correspondant à des bandes d'absorption de $1275,616\text{ cm}^{-1}$, soit amine, et un autre pic apparaissant à $1653,826\text{ cm}^{-1}$, soit phénol. D'autres pics ont été détectés correspondant à des bandes d'absorption de $1123,296\text{ cm}^{-1}$ (des éthers et des esters), $1728,341\text{ cm}^{-1}$ (des cétones), $1653,826\text{ cm}^{-1}$ (des alcènes) et $1453,349\text{ cm}^{-1}$ (des dérivés nitrés).

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

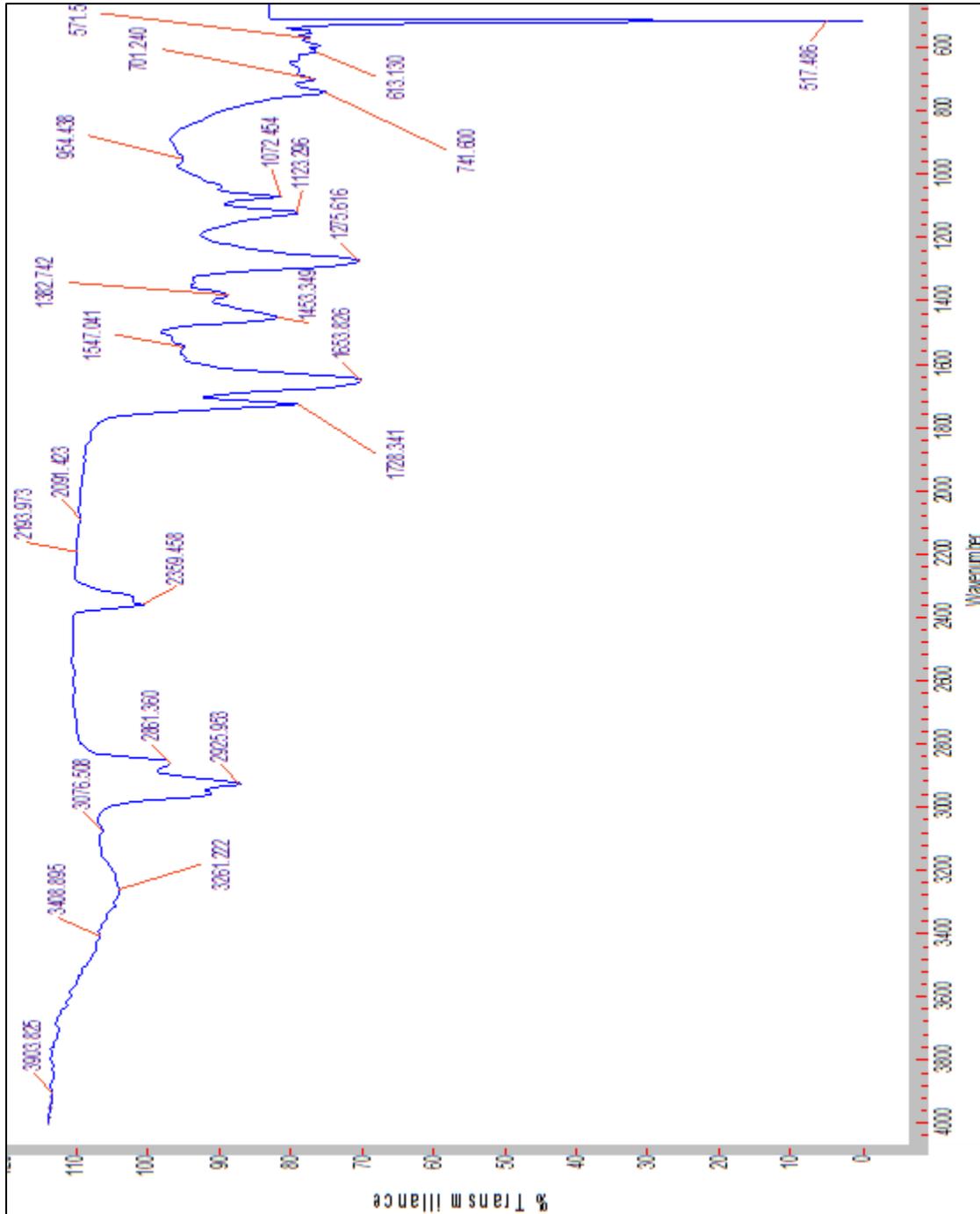


Figure 33 : Spectre Infra-Rouge de l'extrait chloroformique de la souche ML9832

2. 2. Discussion

La mise en évidence des activités antimicrobiennes de la souche ML9832 est réalisée par la technique des cylindres d'agar en raison de sa simplicité.

Cette technique est largement utilisée pour réaliser un screening primaire des effets inhibiteurs de plusieurs germes [Tabbene et al., 2010 ; Khanna et al., 2011], elle nous a permis de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur de la souche ML9832 envers certains germes test utilisés.

Ces mêmes germes cibles sont couramment sélectionnés et utilisés, pour la mise en évidence des pouvoirs inhibiteurs de microorganismes producteurs de substances bioactives, vu que l'utilisation abusive des antibiotiques a conduit à l'augmentation de la résistance de ces germes pathogènes surtout en milieu hospitalier dont plusieurs études ont signalé l'émergence de cette résistance vis-à-vis certains antibiotiques incluant les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération [Katsumi et al., 2005 ; Sekhsokh et al., 2008]. L'étude de l'émergence de bactéries multi-résistantes responsables d'infections nosocomiales a été également proclamée en Algérie [Touati et al., 2006 ; Aggoune-Khinache et al., 2008 ; Messai et al., 2008]. Récemment, un gène nommé New Delhi metallo-bêta-lactamase (NDM-1) a été décelé chez certaines entérobactéries ; ces dernières sont capables de synthétiser un enzyme qui inactive la plupart des antibiotiques de la famille des bêta- lactames [Kumarasamy et al., 2010]. Il a été aussi signalé que l'usage intensif de la ciprofloxacine a conduit à la diminution de la sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* [Véron, 1990].

Cette situation alarmante a obligé les chercheurs scientifiques à intensifier les recherches pour la découverte de nouvelles molécules bioactives, à savoir des antibiotiques, des antifongiques et des bactériocines, à partir d'une source naturelle notamment les microorganismes vue la complexité de la structure chimique des antibiotiques.

Parmi les travaux de recherches qui sont orientés vers le criblage de nouvelles molécules bioactives à partir de microorganismes, particulièrement les bactéries du genre *Bacillus* qui sont parmi les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs, celle de **Kamat et al. (2011)** qui ont prouvé le pouvoir inhibiteur de l'espèce *Bacillus marismortui*, isolée à partir d'un lac salé en Goa en Inde, contre le

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Staphylococcus citreus ; celle de **Tabbene et al. (2010)** qui s'intéresse à la purification d'un composé antimicrobien S07-2, produit par l'espèce *Bacillus subtilis* B38 isolée à partir du sol, active contre des agents pathogènes d'origine alimentaire « *Listeria monocytogenes* » et « *Enterococcus faecalis* » et également contre *Salmonella enteritidis* et celle de l'équipe de **Fariha et al. (2009)** qui a mis en évidence l'activité d'une souche de *Bacillus pumilus* SAF1 contre *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) , ainsi que celle de **Bottone et Peluso (2003)** qui cherchent l'activité antifongique de *Bacillus pumilus* (MSH) dont ils ont montré qu'il est actif contre *Aspergillus* et les *Mucoraceae*.

Dans le même contexte, plusieurs d'autres études se sont intéressées à la recherche des molécules antimicrobiennes à partir des actinomycètes, telle que l'étude de **Aouiche et al. (2011)** où ils ont montré un effet inhibiteur très important d'un actinomycète désigné PAL54 appartenant au genre *Saccharotrix*, isolé à partir d'un sol saharien en Ghardaïa (Algérie), contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif par la production d'un composé antimicrobien de la famille des Chloramphénicoles. Ainsi que l'étude de **Sibanda et son équipe (2010)** où ils ont réalisé un screening des activités antibactériennes de trois actinomycètes appartenant aux genres de *Saccharopolyspora* (TR046 et TR039) et *Actinosynnema* (TR024) dont les trois souches exercent des effets inhibiteurs contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Le screening primaire de l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar a révélé que la souche ML9832 a pu inhiber sept bactéries sur dix bactéries cibles utilisées dont quatre sont à Gram positif (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, et *Staphylococcus aureus*) et trois sont à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, et *Klebsiella pneumoniae*) dont *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* représentent les espèces les plus sensibles tandis que l'espèce la moins sensible est *Bacillus subtilis*. Ce pouvoir inhibiteur de la souche ML9832 constitue un potentiel biotechnologique important et indique que ces activités inhibent à la fois les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ce qui est en corrélation avec la plupart des études consacrées à la mise en évidence des activités antibactériennes des espèces extrémophiles particulièrement halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus* [**Gebhardt et al., 2002 ; Ben Maachia et al., 20011 ; Kamat et al., 2011**].

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

Des études antérieures ont également indiqué que les activités antimicrobiennes produites par les espèces du genre *Bacillus* sont plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif et les champignons [Morikawa et al., 1992; Eltem et Ucar 1998].

Inversement à ce qui a été mentionné précédemment, la souche ML9832 n'a pas pu inhiber *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Acinetobacter baumannii* et la levure *Candida albicans*. Ce résultat négatif peut être probablement dû à la résistance de ces dernières aux substances produites par la souche ML9832, ou bien à l'absence de récepteurs spécifiques aux substances bioactives produites par cette souche. Une autre hypothèse possible, est que la quantité de ces substances synthétisées par notre isolat n'est pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, à savoir la concentration minimale inhibitrice de chaque microorganisme test utilisé.

D'un autre point de vue, les microorganismes test, peuvent produire des substances inhibitrices de l'action des molécules antimicrobiennes de notre souche même si ceux-ci sont produits en quantités suffisantes.

L'équipe de **Mendo** ont isolé en **2004** une souche *Bacillus licheniformis* 189 à partir d'une source chaude en Azores (Portugal) capable d'inhiber des bactéries à Gram positif. Ainsi que, d'autres espèces de *Bacillus* isolées à partir d'un lac salé [Eltem et Ucar, 1998] et à partir du sol [Aslim et al., 2002] ont montré une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* et *Candida albicans*.

Il est important de signaler qu'une production importante des composés antimicrobiens par certaines espèces microbiennes est associée à un rôle écologique en jouant une action défensive au sein d'une communauté microbienne établie [El-Banna, 2003].

En ce qui concerne l'étude de l'activité inhibitrice du surnageant de la culture de la souche ML9832, aucune action inhibitrice n'a été observée contre les germes tests utilisés, cela peut être expliqué par l'existence dans le surnageant d'une faible quantité ou d'une concentration insuffisante des activités antimicrobiennes pour inhiber la croissance des germes test [Reghioua et al., 2008], de tels résultats ont été aperçus par [Hosny et al., 2011], qui ont

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

observé que l'espèce bactérienne qu'ils ont isolé à partir de la mer méditerranéenne et qui est désignée comme *Bacillus licheniformis* NRC-18 est capable de produire des substances antimicrobiennes sur le milieu solide alors que son filtrat n'a exprimé aucune activité ; ils ont expliqué ce résultat par le fait que les substances inhibitrices synthétisées par cette souche ne diffusent pas dans le milieu aqueux. Les mêmes résultats ont été anciennement obtenus par **Rosenfield et Zobell (1947)** et **Burkholder et al. (1966)** où ils ont approuvé que les substances antimicrobiennes persistent intimement sur la surface externe de la cellule et sont secrétées sur milieu solide.

L'absence de l'activité de surnageant de la souche ML9832 peut être expliquée également par le fait que le passage du milieu solide au milieu liquide influent sur la production des activités antimicrobiennes en milieu liquide. **Shomura et al. (1979)** expliquent cela par le fait que la répartition des nutriments dans les milieux liquides varie avec le temps de fermentation alors que leur distribution en milieu solide et autour des colonies ne varie pas ou très légèrement.

Le temps d'incubation de la souche a une influence plus ou moins importante sur la production des activités antimicrobiennes, dont les zones d'inhibition données par les cylindres d'agar prélevés après 72 heures d'incubation sont plus importantes que les zones d'inhibition obtenues par les cylindres d'agar prélevés après 24 heures et 48 heures. Ces résultats convergent parfaitement avec ceux exposés par **Awais et al. (2008)** et **Hasan et al. (2009)** qui indiquent que la production maximale de substances antimicrobiennes par l'espèce *Bacillus pumilus* et *Bacillus pumilus* SAF1, respectivement, a été obtenue après 72 heures d'incubation qui correspond à la phase de croissance rapide pour les *Bacillus spp.* [**Hasan et al., 2009**], ces mêmes résultats ont été rapportés auparavant [**Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008 ; Bhatta et Kapadnis, 2010**].

Des résultats similaires ont été également retrouvés par **Haavik (1975)** où il a rapporté que la production de la Bacitracine par *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580) n'a été observée que pendant la phase de croissance rapide. Cependant, **Egorov et al. (1986)** ont trouvé qu'un maximum d'efficacité de la synthèse de bacitracine par *Bacillus licheniformis* coïncide avec la fin de la phase exponentielle de la croissance et au début de la formation de spores.

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

La production microbienne de métabolites secondaires, particulièrement les composés antimicrobiens, est également influencée et associée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. En effet, la composition du milieu de culture influe les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires essentiellement les substances antimicrobiennes, ainsi que la quantité de ces substances **Sánchez et Demain (2002)**.

En fait, les travaux de **Gesheva** et son équipe **(2005)** ont montré que la nature des sources de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et des traces des éléments minéraux, affectent fortement la production des molécules bioactives par *Streptomyces hygroscopicus*. Les mêmes constatations ont été rapportées par **Awais et al. (2007)** concernant la production des activités antimicrobiennes par l'espèce *Bacillus subtilis*.

Donc, une optimisation des conditions de production de biomolécules par la souche est nécessaire pour une production importante et peut être réalisée à travers des analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de production. Cependant, cela ne veut pas dire que les conditions optimales pour la production des substances antimicrobiennes sont forcément identiques à celles permettant une bonne croissance.

Il a été rapporté par **Dumenil et Sanglier (1989)** que les conditions optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement différentes de celles de la croissance et sont en fonction de la souche en question.

Selon ces rapports et afin de sélectionner le bon milieu de culture pour la production des activités antimicrobiennes par la souche ML9832, trois milieux de culture ont été utilisés, les résultats nous ont permis de conclure que la gélose nutritive est le meilleur milieu pour la production des activités antimicrobiennes par la souche ML9832.

Ce milieu (gélose nutritive) a provoqué la sporulation de la souche après 48 heures d'incubation à 30°C ce qui n'est pas le cas pour le milieu Mossel et le milieu KN exempt de NaCl, Cette propriété peut être expliquée par le fait que le milieu de la gélose nutritive a permis une croissance abondante tant qu'il est milieu ordinaire ce qui a conduit à une forte densité

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

cellulaire et donc une carence nutritive incitant le phénomène de la sporulation [Auchtung et Grossman, 2008] qui est un processus très important pour les cellules végétatives face à la carence nutritive. Au début de la phase stationnaire de croissance, la population est dense et les sources nutritives se raréfient. A ce stade, les cellules doivent choisir entre le maintien de la croissance ou la formation d'une structure résistante, la spore, pour préserver leur matériel génétique, mais avant de déclencher ce processus, les cellules mettent en place des mécanismes de réponse alternatifs tels que la formation de flagelles, la sécrétion d'enzymes, ou encore la production de molécules antimicrobiennes et de toxines [Setlow et Johnson, 2007].

En plus de l'explication des résultats pour laquelle la gélose nutritive est choisie comme meilleur milieu pour la production des activités antimicrobiennes par notre souche du fait qu'elle provoque la sporulation de la souche après 48 heures d'incubations, les rapports d'Auchtung et Grossman (2008) et de Setlow et Johnson (2007) expliquent bien pourquoi la production des activités antimicrobiennes par la souche ML9832 est importante après 72 heures d'incubation.

Afin d'extraire et de concentrer les activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832 cultivée sur milieu solide (GN) et sur milieu liquide (BN), une batterie de solvants organiques de polarité différente a été utilisée. Après extraction, l'activité antimicrobienne de chaque extrait a été évaluée et les résultats ont fait ressortir le chloroforme comme le meilleur solvant pour l'extraction de ces activités antimicrobiennes.

L'activité antibactérienne de la souche ML9832 contre *Enterococcus faecalis* et *Salmonelle enteritidis* ainsi que l'activité antifongique contre *Candida albicans* n'ont pas été exprimées qu'après extraction par le chloroforme et concentration au rotavapeur cela confirme notre hypothèse qui suppose que la quantité de ces substances synthétisées par notre isolat dans le screening primaire n'est pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition. L'extrait chloroformique de la souche a pu également inhiber *Aspergillus sp.* par un pourcentage d'inhibition de 23,33%.

L'activité antifongique de plusieurs espèces du genre *Bacillus*, comme exemples *Bacillus cereus*, *B. lentimorbus* et *B. licheniformis* isolées de différents milieux hypersalins a été mise

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

en évidence contre des champignons pathogènes des plantes comme *Botrytis cinerea* et *Fusarium roseum* var. *sambucinum* in vitro et in vivo [Sadfi-Zouaoui et al., 2008].

Il est à noter que le chloroforme est de polarité intermédiaire, cela nous mène à déduire que les activités antimicrobiennes de notre souche peuvent être de polarité intermédiaire. Ce solvant a permis d'extraire des activités antimicrobiennes à propriétés antibactériennes et également des activités antimicrobiennes à propriétés antifongiques.

Ce même solvant (le chloroforme) a été le plus efficace pour l'extraction des activités antimicrobiennes à partir d'une souche de *Bacillus subtilis* MTCC-8114 [Kumar et al., 2009].

Une chromatographie sur couche mince a été appliquée afin de séparer et de purifier les activités antimicrobiennes de l'extrait chloroformique de la souche ML9832 dans trois différents systèmes de solvant. Le système Chloroforme-Méthanol est apparu comme le meilleur système de séparation en raison des Rf important qu'il ait donné.

Après révélation chimique des chromatogrammes, des spots mono-taches ont été obtenues, cela peut être expliqué par le fait que les spots sont purs ou bien ils contiennent des substances de même poids moléculaires. En effet, plusieurs travaux consultés ont mentionné que la chromatographie sur couche mince est appliquée dans la plupart des cas de purification de métabolites secondaires [Gibbons and Gray, 1998].

La révélation chimique, après développement des chromatogrammes, a donné une réaction positive avec la ninhydrine (Rf égal à 0,94) révélateur des fonctions amines. De tel résultat a été rapporté par l'étude [Kumar et al., 2009]. D'autre part, cette révélation a montré une réaction positive avec le chlorure de Fer (Rf égal à 0,97) révélateur de composés phénoliques.

L'étude spectrophotométrique par Infra – Rouge de l'extrait chloroformique, sous forme de poudre, de la souche ML9832, a permis la détection des pics caractéristiques correspondant à une bande d'absorption de 1275,616 cm^{-1} , soit amine, et un autre pic apparaissant à 1653,826 cm^{-1} , soit phénol. Ces résultats concordent parfaitement aux résultats obtenus par la chromatographie sur couche mince CCM après révélation chimique par la ninhydrine révélateur des amines et le FeCl_3 révélateur des composés phénoliques. Cette étude a permis

Pré-caractérisation et début de caractérisation des activités antimicrobiennes de la souche ML9832

également la détection de plusieurs autres composés incluant des esters, des éthers, des alcènes, des cétones et des dérivés nitrés.

En conclusion de cette partie, les activités antimicrobiennes de la souche ML9832 ont pu être révélées. En observant les activités antibactériennes et antifongiques, les résultats obtenus montrent le potentiel biotechnologique important de cette souche. Ces résultats prouvent également l'intérêt de poursuivre la caractérisation et la purification de ces activités par des techniques plus sensibles et plus fines.

3. Discussion générale

Cette étude a été menée dans le but d'étudier les activités antimicrobiennes de la souche ML9832 qui est une souche halotolérante isolée à 25% de NaCl à partir d'un lac salin algérien "El Goléa" ; cette souche fait partie de la collection isolée par Dr. Khelil Klouche en vue d'exploitation taxonomique et biotechnologique [**Khelil Klouche, 1998**].

Le lac d'el Goléa a été choisi pour ses caractéristiques physicochimiques extrêmes ainsi que sa nature particulière vue que sa combinaison entre la salinité, la pollution et la situation géographique (Sahara). Il est considéré comme un environnement hypersalin athalassohalin dont sa salinité atteint 30% au cours de la saison sèche [**Hacène et al., 2004**].

La première partie de notre travail a consisté à caractériser la souche ML9832, sur le plan phénotypique et génotypique.

L'étude des caractères phénotypiques a montré que la souche ML9832 est une bactérie aéro-anaérobie facultative en forme de bâtonnet à Gram positif capable de former des endospores sub-terminales non déformantes, ces caractéristiques particularisent la plupart des espèces halotolérantes isolées à partir des milieux marins et des milieux hypersalins affiliées au genre *Bacillus*. De ce fait, notre souche a été affiliée au genre *Bacillus*.

Malgré que les analyses phénotypiques soient importantes en taxonomie microbienne, et qu'elles soient généralement faciles à étudier et bien significatives vu que les critères phénotypiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables, il est difficile de déterminer l'identité de la souche ML9832 et de la rassembler dans le genre *Bacillus*, dont de nombreuses études ont suggéré que le genre *Bacillus* constitue un genre hétérogène, d'un point de vue phénotypique, que la plupart des autres genres bactériens [**Claus et Berkeley, 1986**] et que les espèces appartenant à ce genre sont en augmentation continue et sont difficiles à identifier par les méthodes traditionnelles fondées sur les caractéristiques phénotypiques [**Woese, 1987**] ce qui nous a incité à réaliser une étude phylogénétique.

L'analyse des séquences de gènes codant pour l'ARNr 16S est devenu un outil important pour l'identification bactérienne puisqu'elle fournit des informations sur l'emplacement

phylogénétique des espèces [Woose, 1987, Brenner et al., 2001]. Les séquences d'ADN des gènes ribosomiaux sont conservées mais ces gènes contiennent des régions variables qui peuvent être utile pour la discrimination entre les espèces [Rossello-Mora et Amman, 2001]

L'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S a confirmé en partie la classification phénotypique de la souche ML9832 dont cette étude a montré qu'elle appartient à l'ordre des *Bacillales*. L'alignement de ses séquences nucléotidiques avec les banques de données a révélé une similarité de **96%** avec les séquences nucléotidiques de référence obtenues à partir du GenBank et l'EMBL des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches bactériennes appartenant à l'ordre des *Bacillales*.

L'arbre phylogénétique de la souche ML9832 a été élaboré avec l'aide précieuse de Dr. Jean Luc CAYOL au laboratoire IRD à Marseille (France), il a été construit à l'aide des programmes du logiciel TREECON pour élucider l'emplacement phylogénétique de notre souche. Il en ressort que notre souche est proche de l'espèce *Bacillus pseudofirmus* (**95 %** de similitude) et de l'espèce *Bacillus halodurans* (**93,3%** de similitude) [Nielsen et al., 1995].

L'arbre en question, révèle également l'**originalité** de notre souche et les pourcentages de similitudes nous permettent d'affirmer qu'il s'agit d'un nouvel genre nouvelle espèce.

Il a été mis en évidence que les isolats dont les séquences ont un pourcentage de similitude inférieur à **97 %** n'appartiennent pas à la même espèce [Stackebrandt et Goebel, 1994] et s'il est compris entre **93** et **95 %**, les deux souches appartiennent à des genres différents [Devereux et al., 1990 ; Whitman et al., 2001]. Néanmoins, deux espèces peuvent avoir des séquences des ARNr 16S très proches et être différentes par hybridation ADN-ADN [Dijkshoorn et al., 2000].

La croissance de la souche ML9831 ne requière pas de NaCl, mais son halotolérance est variable et peut aller jusqu'à 25% (p/v) de NaCl, l'optimum est observé pour une concentration de 0 % (p/v). La souche peut tolérer des variations de température de 15 à 37°C et de pH de 5,0 à 11,0 mais l'optimum est à 30°C et à pH égal à 7,0. Cela nous a permis de conclure que la souche ML9832 est une espèce mésophile, halotolérante extrême et alcalitolérante.

Dans cette première partie, un screening de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été également effectué, cela a permis de mettre en évidence l'importance du potentiel enzymatique de la souche : elle possède en effet des amylases, des lipases et des protéases. Généralement les espèces du genre *Bacillus* que ce soit halophiles ou halotolérantes, alcalophiles ou acidophiles et thermophiles ou psychrophiles sont reconnues par leur production de différentes enzymes supportant des conditions extrêmes.

La deuxième partie de ce travail est menée dans le but de mettre en évidence le potentiel antimicrobien de la souche ML9832.

La mise en évidence de cette activité est réalisée en premier temps (screening primaire) par la technique des cylindres d'agar, qui est une méthode de diffusion en milieu gélosé. L'effet du temps d'incubation sur la production des activités antimicrobiennes a été testé, ainsi que l'effet du milieu de culture afin d'optimiser les conditions de la production de ces activités ;

Pour cela, la souche a été cultivée pendant 72 heures à 30°C, des prélèvements des cylindres d'agar ont été effectués périodiquement chaque 24 heures pour tester leur activité ; parallèlement trois milieux de culture sont utilisés (GN, KN, et Mossel). Les résultats de ces tests ont fait ressortir que la meilleure production est obtenue après 72 heures d'incubation sur le milieu gélose nutritive.

Pour la plupart des microorganismes producteurs des métabolites secondaires, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse de ceux-ci. Cet effet peut se situer au niveau du taux de croissance et d'une répression de la synthèse, dénommée répression catabolique glucidique ou effet du glucose. D'une manière générale la production des métabolites secondaires commence après que la source de carbone favorisant une croissance rapide, soit entièrement métabolisée et le taux de biosynthèse n'est pas lié à l'intensité de la croissance [Telma et al., 2003]. Dans le même contexte, l'étude d'Egorov et al. (1986) a prouvé que la production de bacitracine par l'espèce *Bacillus licheniformis* est maximale à la fin de la phase exponentielle qui correspond à un taux de croissance faible

Le surnageant de la souche ML9832 n'a donné aucune activité contre les germes testés, cela a été expliqué par le fait que la concentration des activités antimicrobiennes dans le surnageant est insuffisante pour inhiber ces germes cibles ou bien que la souche n'a pas pu

secréter ces activités dans le milieu liquide. Les résultats de l'extraction par le chloroforme des activités antimicrobiennes à partir de la culture de la souche ML9832 sur bouillon nutritif viennent confirmer notre première hypothèse car après additionnement du chloroforme au surnageant et concentration au rotavapeur de la phase organique récupérée, les activités antimicrobiennes ont été mise en évidence, cela veut dire que les activités antimicrobiennes étaient présentes dans le surnageant mais avec une concentration insuffisante.

La comparaison entre l'extraction à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu liquide et celle à partir de la culture de la souche ML9832 sur milieu solide a montré que la première est plus ou moins rentable que la deuxième. Cependant, il a été rapporté que la production des substances antimicrobiennes à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide et qu'il existe même des microorganismes producteurs des substances antimicrobiennes sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide [Shomura et al., 1979].

L'activité antimicrobienne de la souche ML9832 a été marquée contre la plupart des germes test utilisés, dont elle a pu inhiber des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que les champignons et levure. De telles propriétés ne sont pas nouvelles chez le genre *Bacillus*, car il est connu par la production d'activités antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti tumorales [Awais et al., 2010]

Une chromatographie sur couche mince a été appliquée pour séparer les activités antimicrobiennes de l'extrait chloroformique dans des systèmes de solvants différents. Les résultats obtenus montrent après révélation chimique que l'extrait contenait deux types de substances, la première substance avec un Rf égal à **0,94** contenant des groupements amines révélés par la ninhydrine et la deuxième substance avec un Rf égal à **0,97** contenant des groupements phénoliques révélés par le chlorure de fer.

L'étude spectrale des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832 par Infra-Rouge a confirmé les résultats de la révélation chimique après développement de CCM, dont elle a prouvé l'existence de groupement phénoliques et amines.

Les résultats de la CCM et IR constituent un excellent résultat puisque c'est l'objectif principal recherché ; mais il est dommage que l'HPLC et l'UV-Visible n'ont pas été réalisés pour cause de panne.

Enfin, notre étude nous a permis d'aborder plusieurs volets, les milieux extrêmes, le genre *Bacillus*, la caractérisation phénotypique et génotypique, et la mise en évidence ainsi que la pré-caractérisation des activités antimicrobiennes de notre souche qui possède un potentiel biotechnologique important et présente un réservoir prodigieux de biomolécules à savoir les enzymes et les activités antimicrobiennes.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif essentiel de ce travail était d'une part la caractérisation taxonomique d'une souche extrémophile ML9832 isolée à 25% de NaCl à partir d'échantillon d'eau du lac salé d'el Goléa situé au milieu du Sahara algérien et d'autre part l'étude de ses activités antimicrobiennes. Ainsi plusieurs points ont été abordés pour atteindre cet objectif.

Dans un premier temps, la souche a fait l'objet d'identification selon le protocole préconisé par **Logan et al. (2009)** pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales*. Cela a été effectué par une analyse phénotypique et génotypique.

L'observation au microscope optique a révélé que la ML9832 est un bâtonnet à Gram positif immobile capable de former des spores sub-terminales non déformantes.

L'étude physiologique de la souche nous a permis de conclure qu'il s'agit d'une souche halotolérante extrême et qui présente des optimum de croissance à une température de 30°C, à un pH de 7 et à une concentration saline de 0% de NaCl (p/v).

Sur le plan de la production des enzymes extracellulaires, cette souche possède un potentiel très important, elle produit des amylases, des lipases et des protéases.

L'étude phylogénétique de la souche ML9832 a révélé une similarité de **96%** avec les espèces appartenant à l'ordre des *Bacillales* ; elle nous a permis de clarifier sa position phylogénétique et de conclure qu'elle s'agit d'un **nouveau taxon** phylogénétiquement proche de l'espèce *Bacillus pseudofirmus* avec un pourcentage de similitude de **95%** et de l'espèce *Bacillus halodurans* avec un pourcentage de similitude de **93,3%**.

Une détermination du pourcentage guanine cytosine G+C% est nécessaire pour compléter notre étude qui fera l'objet d'une publication.

Le test de l'activité antimicrobienne a montré que la souche ML9832 exerce un effet inhibiteur contre la plus part des microorganismes test utilisés (bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et champignons) ; Cette production varie en fonction du temps d'incubation de la souche et le milieu de culture ainsi que le germe test utilisé. Ceci indique l'importance du choix du milieu de culture et du temps d'incubation pour une production maximale des activités antimicrobiennes.

L'extraction par une batterie de solvants organiques de polarité différente nous a permis d'une part de conclure que le chloroforme est le meilleur solvant d'extraction des activités antimicrobiennes produites par la souche ML9832, et d'autre part, d'identifier préliminairement la nature de ces activités en se basant sur les données chimiques de polarité des solvants organiques. L'analyse qualitative de ces activités par chromatographie sur couche mince de gel de silice a permis également de choisir le système éluant Chloroforme-Méthanol comme meilleur éluant permettant une migration rapide et une bonne séparation du fait qu'après révélation chimique, il a été révélé qu'il existe des groupements amines et des groupements phénols, l'étude spectrale par Infra-Rouge vient confirmer les résultats de la CCM dont elle a montré des pics caractéristiques correspondants aux mêmes groupements révélés par la CCM.

L'objectif de ce travail a été en grande partie atteint, malgré que certaines techniques prévues à effectuer (microscopie électronique, HPLC et UV-Visible) n'ont pas pu être réalisées en raison d'une panne ou de non disponibilité de matériels.

Comme perspectives de nos recherches futures, nous réaliserons la microscopie électronique à balayage afin d'avoir une idée précise sur la morphologie de notre souche ainsi que la position exacte des endospores.

Nous comptons aussi optimiser les paramètres de la culture de notre souche par un plan d'expérience afin d'améliorer sa production des activités antimicrobiennes tant qu'elle représente un répertoire de biomolécules à potentiel biotechnologique important.

Nous projetons de compléter l'identification de la structure chimique complète des molécules antimicrobiennes par le biais des techniques chromatographiques fines et spectrométriques très sensibles et reproductibles, tels que la chromatographie sur colonne, HPLC, la spectroscopie Ultra-Violet et la spectroscopie de masse...etc, dans l'espoir d'obtenir de nouvelles substances bioactives.

Aussi, vu l'importance des activités antimicrobiennes de la souche ML9832 contre des germes pathogènes tels que *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, une des perspectives les plus importantes est d'étudier la toxicité de ces molécules in vivo.

De plus, vu l'importance de la souche ML9832 sur le plan de la production d'enzymes extracellulaires qui ont également un potentiel biotechnologique important, la purification de ces enzymes constitue une autre excellente perspective de ce travail.

Enfin, les résultats de ce travail font son **originalité**. En effet, aucune publication parlant de l'isolement de bactéries appartenant à l'ordre des *Bacillales*, genre *Bacillus* productrices des activités antimicrobiennes à partir de ce lac n'est réalisée, tous les travaux réalisés jusqu'à ce jour, s'intéressent à l'étude de la biodiversité ou bien à l'activité des espèces d'actinomycètes.

En somme, c'est un travail important d'un point de vue fondamentale (taxonomie de la souche) et appliqué (potentiel de production des activités antimicrobiennes).

Références bibliographiques

A

1. **Abe F. and Horikoshi K. 2001.** The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in Biotechnology*, 19: 102-108.
2. **Abreu C., Jurgens G., De Marco P., Saano A., and Bordalo A. A. 2001.** *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* in temperate estuarine sediments. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 713-718.
3. **Aggoune-Khinache N., Bensersa D., Henniche F. Z., Daoudi M., Abdouni M. A., Chabani A., Tiouiti D. and Naim M. 2008.** Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med. Mal. Infect.*, 39 : 413-414.
4. **Aino K., Hirota K., Matsuno T., Morita N., Nodasaka Y., Fujiwara T., Matsuyama H., Yoshimune K. and Yumoto I. 2008.** *Bacillus polygoni* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 120–124.
5. **Akel H., AL-Quadani F., Atoum M. and Battikhi M. 2008.** Phenotypic and Genotypic Characterization of Three Novel Halophilic *Bacillus* Strains from Jordanian Hot Springs. *Jordan Journal of Biological Sciences*. Volume 1, Number 1.
6. **Alber S., Vossenberg J., Driessen A. and Konings W., 2001.** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions, *Extremophiles*, 5: 285-294.
7. **Albuquerque L., Tiago I., Taborda M., Nobre M. F., Verissimo A. and Da Costa M. 2008.** *Bacillus isabeliae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a sea salt evaporation pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 226–230.
8. **Amoozegar M. A., Fatemi Z. A., Karbalaie-Heidari H. R. and Razavi M. R. 2007.** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol Res.*, 162: 369-377.
9. **Amoozegar M. A., Malekzadeh F. and Khursheed A. M. 2003.** Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2, *J. Microbiol. Methods*, 52: 353-359.
10. **Amoozegar M. A., Sánchez-Porro C., Rohban R., Hajighasemi M. and Ventosa A. 2009.** *Bacillus persepolensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2352–2358.

11. **Amoozegar M. A., Schumann P., Hajighasemi M., Ashengroph M. and Razavi M. R. 2008.** *Salinicoccus iranensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58:178–183.
 12. **Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F. and Lebrihi A. 2011.** *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Springer.
 13. **Arahal D. R., Marquez M. C., Volcani B. E., Schleifer K. H. and Ventosa A. 1999.** *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49 : 521–530.
 14. **Aslim B., Saglam N. and Beyatli Y. 2002.** Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk. J. Biol.*, 26: 41-8.
 15. **Auchtung J. M., Grossman A. D. 2008.** Extracellular peptide signaling and quorum responses in development, self-recognition and horizontal transfer in *B. subtilis*. In *Chemical communication among bacteria*, pp. 13-30. Edited by Winans S. C. and Bassler B. L. Washington: ASM Press.
 16. **Auguet J. C. and Casamayor E. O. 2008.** A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environmental Microbiology* 10: 1080-1086.
 17. **Awais M., Arshid P., Sadia Q. and Saleem M. 2008.** Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by *Bacillus pumilus*. *African J. Microbiol. Res.*, 2: 114-119.
 18. **Awais M., Aamer A. S., Abdul H. and Fariha H. 2007.** Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *bacillus* sp. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312.
 19. **Awais M., Pervez A., Yaqub A. and Shah M. M. 2010.** Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel. *Pakistan J. Zool.*, vol. 42(3), 267-275.
 20. **Ayari A., Morakchi H. and Gacemi K. Dj. 2012.** Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African Journal of Biotechnology.*, Vol. 11(2), 305-311.
- B**
-
21. **Babasaki K., Takao T., Shimonishi Y. and Kurahashi K. 1985.** Subtilosin A. a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis and biogenesis. *Journal of Biochemistry.* 98 : 585 – 603.

22. **Baker-Austin C. and Dopson M. 2007.** Life in acid: pH homeostasis in acidophilic, *Trends in Microbiology*, 15: 165-171.
23. **Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. and Turck M. 1966.** Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Amr. J. Clin. Path.*, 45:493–496.
24. **Ben Maachia S., Errakhi R., Mathieu F., Chérif M. and Lebrihi A. 2011.** Identification and partial characterization of antifungal and antibacterial activities of two *Bacillus* sp. Strains isolated from salt soil in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5(13) : 1599-1608.
25. **Benlloch S., Lopez-Lopez A., Casamayor E. O., Øvreas L., Goddard V., Daas F. L., Smerdon G., Massana R., Joint I., Thingstad F., Pedro-Aliø C. and Rodriguez-Valera F. 2002.** Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.*, 4, 349-360.
26. **Bhatta D. R. and Kapadnis B. P. 2010.** Production optimization and characterization of bioactive compound against *salmonella* from *Bacillus subtilis* KBB isolated from Nepal. *scientific world*, vol. 8(8) : 19-29.
27. **Boone D. R., Liu Y. T., Zhao Z. J., Balkwill D. L., Drake G. R., Stevens T. O. and Aldrich H. C. 1995.** *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)-reducing and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 441 - 448.
28. **Borsodi A. K., Márialigeti K., Szabò G., Palatinszky M., Pollák B., Kéki Z., Kovács A. L., Schumann P. and Tòth E. M. 2008.** *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 845–851.
29. **Bottone E. J. and Peluso R. W. 2003.** Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 69–74.
30. **Boutaiba S., Hacene H., Bidle K. A. and Maupin-Furlow J. A. 2011.** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameer and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J. Arid. Environ.*, 75: 909-916.
31. **Bowers K. J., Mesbah N. M. and Wiegel J. 2009.** Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physicochemical boundary for life? *Saline Systems*, 5:9.

32. **Brandt K. K. and Ingvorsen K. 1997.** *Desulfobacter halotolerans* sp. nov., a halotolerant acetate-oxidizing sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of Great Salt Lake, Utah. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20, 366-373.
 33. **Brenner D. J., Staley J. T., and Krieg N. R. 2001.** Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Boone D. R., Castenholz R. W. (Eds), Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, Volume 1, 27-48.
 34. **Bron S., Meima R., Dijk J. M. V., Wipat A. and Harwood C. R. 1999.** Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd Edition*. Eds. Demain A. L. and Davies J. E., *ASM Press*. Washington, D.e. 392-416.
 35. **Brown A. 1976.** Microbial water stress, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 40: 803-846.
 36. **Buenger J. and Driller H. 2004.** Ectoin: an effective natural substance to prevent UV A-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 17: 232-237.
 37. **Bullock C. 2000.** The Archaea a biochemical perspective. *Biochem. Mol. Biol. Edu.*, 28: 186 -19.
 38. **Burkholder P. R., Pfister R. M. and Leitz F. H. 1966.** Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl. Microbiol.*, 14 (4) : 649-653.
- C
-
39. **Cannell R. J. P. 1998.** How to approach the isolation of natural products. In: *Natural Products Isolation*. Ed. Cannell R. J. P. *Human Press*. New Jersey. 1-51
 40. **Carrasco I. J., Márquez M. C., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D. and Ventosa A. 2007.** *Bacillus chagannorensis* sp. nov., a moderate halophile from a soda lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2084–2088.
 41. **Cavicchioli R. 2002.** Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, 2:281-292.
 42. **Cavicchioli R., Siddiqui K. S., Andrews D. and Sowers K. R. 2002.** Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 253–261.
 43. **Cerritos R., Vinuesa P., Eguiarte L. E., Herrera-Estrella L., Alcaraz-Peraza L. D., Arvizu-Gómez J. L., Olmedo G., Ramirez E., Siefert J. L. et Souza V. 2008.**

- Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 919–923.
44. **Chaban B., Ng S. Y. M., and Jarrell K. F. 2006.** Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 73-116.
 45. **Chaturvedi V., Springer D. J., Behr M. J., Ramani R., Li X., Peck M. K., Ren P., Bopp D. J., Wood B. and Samsonoff W. A. 2010.** Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with white nose syndrome (WNS), *PloS One*, 5: 10783-10791.
 46. **Chen L., Wang G., Bu T., Zhang Y., Wang Y., Liu M., Lin X. 2010.** Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26:879–888.
 47. **Claus D. and Berkeley C. W. 1986.** The Genus *Bacillus*. In: Sneath PHA ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore., 1105-1139.
 48. **Claus D. and Fritze D. 1989.** Taxonomy of *Bacillus*. In: Biotechnology Handbook, *Bacillus*. 1st Edition. Ed. Harwood, C.R Plenum Press. New York. Pp. 5-26.
 49. **CLSI, 2010.** Clinical and Laboratory Standards Institute-. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Eighth Edition. Pennsylvania, USA.
 50. **Cohn F. 1872.** Untersuchungen über Bakterien. *Bertr. Biol. Pflanz. 1 (Heft II)*, 127-224.
- D**
-
-
51. **D'Alessandro C. P., De Castro R. E., Giménez M. I. and Paggi R. A. 2006.** Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett Appl. Microbiol.*, 44 : 637–642.
 52. **Dahl M. K. 1999.** *Bacillus*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Eds. Robison E. K, Batt C. A. and Patel P. D. Volume 1. *Academic Press*. UK. 113-158.
 53. **DasSarma S. 2001.** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
 54. **De Champdoré M., Staiano M., Rossi M. and D'Auria S. 2006.** Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J. Royal Society. Interface* 4, 183-191.

55. **De Soete G. 1983.** A least square algorithm for fitting additive trees to proximaty data. *Psychometrika*, 48 : 612-626.
56. **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. 2009.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., The *Firmicute*. Springer. New York. Volume Three. 63-67.
57. **Deutch C. E. 2002.** Characterization of a salt-tolerant extracellular amylase from *Bacillus dipsosauri*, *Lett. Microbiol.*, 35: 78-84.
58. **Devereux R., He S. H., Doyle C. L., Orkland S., Stahl D. A., LeGall J. and Whitman W. B. 1990.** Diversity and origin of *Desuyovibrio* species : phylogenetic definition of a family. *J. Bacteriol.*,172, 3609-3619.
59. **Dijkshoorn L., Ursing B. M. and Ursing J. B. 2000.** Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J. Med. Microbiol.*, 49, 397-401.
60. **Dudeja S., Bhattacharjee A. B. and Chela-Flores J. 2010.** Microbial mats in Antarctica as models for the search of life on the Jovian moon Europa. In: J. Seckbach and A. Oren (eds.) Microbial Mats. In the book series of Cellular Origins, Life in Extreme Habitats and Astrobiology (COLE), *Springer*.
61. **Dumenil G. et Sanglier J. J. 1989.** Physiologie de la production des antibiotiques, *In: Larpent J. P. et Sanglier J. J. Biotechnologie des antibiotiques. Masson Edition Paris: 195- 217.*
62. **Dunbar B. S. 1987.** Basic theories and principles of electrophoresis. In: Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques. *Plenum Press*. New York, USA. 1-21.

E

63. **Eccleston G. P., Brooks P. R., Kurtboke D. I. 2008.** The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia, *Marine Drugs*, 6, 243-261.
64. **Echigo A., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M. and Usami R. 2007.** *Halalkalibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a non-saline soil sample in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1081–1085.
65. **Echigo A., Hino M., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M. and Usami R. 2005.** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline

- Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm) *Saline Systems*, 1:8.
66. **Edgerton M. E. and Brimblecome P. 1981.** Thermodynamics of halobacterial environments. *Can. J. Microbiol.*, 27, 899-909.
67. **Egorov N. S., Kozlova I. and Baranova I.P. 1986.** Nisin biosynthesis during the joint cultivation of *Streptococcus lactis* strain MGU and yeasts. *Antibiot. Med. Biotekhnol.*, 31: 828-830.
68. **El-Banna N. 2003.** Antimicrobial substances produced by air flora, *Arab. Gulf. J. Sci. Res.*, 21; 134-139.
69. **El-hamshary O. I. M. and Khattab A. A. 2008.** Evaluation of antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and their fusants against *Fusarium solani*. *Res. J. Cell. Mol. Biol.*, 2: 24-29.
70. **Eltem R. and Ucar F. 1998.** The determination of antimicrobial activity spectrum of 23 *Bacillus* strains isolated from Denizli-Acigol (Bitter Lake) which is soda lake (Na₂SO₄). *J. KUKEM.*, 21, 57-64.
71. **Erauso G., Reysenbach A. L., Godfroy A., Meunier J. R., Crump B., Partensky F., Baross J. A., Marteinson V., Barbier G., Pace N. R. and Prieur D. 1993.** *Pyrococcus abyssi* sp. nov. a new hyperthermophilic *archaeon* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.*, 160: 338-349.

F

72. **Falb M., Pfeiffer F., Palm P., Rodewald K., Hickmann V., Tittor J. and Oesterhelt D. 2005.** Living with two extremes: Conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Research.*, 15, 1336-1343.
73. **Fariha H., Samiullah K., Aamer A. S. and Abdul H. 2009.** Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1 *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1499-1510.
74. **Felsenstein J. 1993.** Phylogenetic inference package version 3. 5. 1. Department of Genetic, University of Washington, Seattle, USA.
75. **Fritze D. 1996.** *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov. *Internation Journal of Systematica Bacteriology*, 98 -101.

G

76. **Galinski E. A. 1993.** Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 49: 487- 496.
77. **Galinski E. A. 1995.** Osmoadaptation in Bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 37: 273-328.
78. **Garveba P. Van Veen J. A. and Van Elsas J. D. 2003.** Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, 45, 302- 316.
79. **Gebhardt K., Schimana J., Muller J., Fielder H. P., Kallenborn H. G., holzenkampfer M., Krastel P., Zeeck A., Vater J., Holtzel A., Schmid D. G., Rheinheimer J. and Dettner K. 2002.** Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic *bacilli* isolated from arthropods. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 217: 199–205.
80. **Gerday C. and Glansdorff N. 2007.** Physiology and biochemistry of extremophiles. *ASM press, Washington, DC.* P. 450.
81. **Gesheva V., Ivanova V., Gesheva R. 2005.** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.*, 160: 243-248.
82. **Ghassemi F., Jakeman A. J. and Nix H. A. 1995.** Salinisation of Land and Water Resources. (eds.). Wallingford Oxon : CAB International.
83. **Gibbons S. and Gray A. I. 1998 .** Isolation by planar chromatography. In Natural Products Isolation, ed. Cannell R. J. P. *Humana press*, Totowa, New Jersey. Pp. 209–245.
84. **Gomez J. and Steiner W. 2004.** The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.*, 2 : 223-235.
85. **Grant W. D. and Tindall B. J. 1980.** The isolation of alkalophilic bacteria, In: Gould GW, Corry ICL (Eds.) *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*, Academic Press, London, 27–36.
86. **Guiraud J. P. 1998.** Techniques d'analyses microbiologiques. *In: microbiologie alimentaire.* Dunod, paris. 168-333.
87. **Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. 2000.** Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, 32: 235-240.

88. Gupta A., Roy I., Patel R. K., Singh S. P., Khare S. K., Gupta M. N. 2005. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Journal of Chromatography*, 1075, 103 - 108.
89. Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. 2003. Microbial α -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 38: 1599-1616.

H

90. Ha Y. M., Park Y. H. and Kim Y. J. 2002. A Taxonomic Study of *Bacillus* sp. Isolated from Korean Salt-Fermented Anchovy. *Molecular Biology Today*, 3(1): 25-29.
91. Haavik H. I. and Froyshov O. 1975. Function of peptide antibiotics in producer organisms. *Nature*, 254: 79-82.
92. Hacène H., Raza F., Chebhouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Baratti J. C. and Ollivier B. 2004. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt Lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 58, 273-284.
93. Hachicha M. 2007, Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. *Sécheresse* ; 18 (1) : 45-50.
94. Hainque B., Bandin B et Lefebvre P. 2008. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Chapitre 15: Chromatographie planaire. Flammarion.
95. Harley J. P. et Prescott L. M. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edn. 449 p.
96. Hasan F., Khan S., Shah A. A. and Hameed A. 2009. Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* saf1 *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1499-1510.
97. Health Protection Agency. 2011a, *Catalase* Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 8 Issue 2.2.
98. Health Protection Agency. 2011b, *Oxidase* Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.2.
99. Higgs R. E., Zahn J. A., Gygi J. D. and Hilton M. D. 2001. Rapid methods to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 371-376.
100. Horikoshi K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. *Agric. Biol. Chem.* 35:1407-1414.

101. **Horikoshi K. 1999.** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 735–750.
102. **Hosny A. M. S., Sheir D. H., and Eldewany A. I. 2011,** Production of Antimicrobial Agent from Marine Bacteria Isolated from Mediterranean. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5): 121-128.

I

103. **Imada C., Koseki N., Kamata M., Kobayashi T. and Hamada-Sato N. 2007.** Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica.*, 21: 27-31.
104. **Imhoff J., Suling J. and Petri R. 1998.** Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
105. **Irwin J. A., Baird A. W. 2004.** Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*. Volume 57 (6).

J

106. **Jarnagin A. S. and Ferrari E. 1992.** Extracellular enzymes, gene regulation and structure function relationship studies. In: *Biology of bacilli, applications to industry* (eds. R.E. Doi and M. McGloughlin), pp. 189-224. Butterworth-Hoffman Press, Boston, U.S.A.
107. **Jiang H., Dong H. Zhang G., Yu B., Chapman L. R. and Fields W. M. 2006.** Microbial diversity in water and sediment of lake chaka, an athallassohaline lake in Northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 3832–3845.
108. **Johnson K. G., Lanthier P. H. and Gochbauer M. B. 1986.** Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Arch. Microbiol.*, 143, 370-378.
109. **Jones B. E., Grant W. D., Duckworth A. W. and Owenson G. G. 1998.** Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles*. 2, 191–200.
110. **Joshi A. A., Kanekar P. P., kelkar A. S., Shouche Y. S., Vani A. A., Borgave S. B., and Sarnaik S. S. 2008.** Cultivable bacteria diversity of alkaline Lonar lake India. *Microb Ecol* 55:163–172.
111. **Jukes T. H. and Cantor C. R. 1969.** Evolution of protein molecules, p 2-132. In Munzo H. N. ed, Mammalian protein metabolism. *Academic Press*. New York.

K

112. **Kamat T. K., Kiran S. and Kerkar S. 2011.** Antimicrobial potential of *Bacillus marismortui*, a salt pan isolate of Cavellosim, Goa, India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, Vol. 2, Issue 3, 321-328.
113. **Kanapathipillai M., Lentzen G., Sierks M. and Park C. B. 2005.** Ectoïne and hydroxyectoïne inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Lett.*, 579: 4775–4780.
114. **Karbalaei-Heidari H. R., Amoozegar M. A., Ziaee A. A. 2009.** Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 21-27.
115. **Katsumi S., Kazshi T. and Hirochi O. 2005.** Pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility of urinary tract infection cases during a 20 year period (1983-2002) at a single institution in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58 : 303-308.
116. **Kazan D., Denizci A. A., Oner M. N. K. and Erarslan A. 2005.** Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 335-344.
117. **Kelman Z. 2000.** DNA replication in the third domain (of life). *Curr Protein Pept Sci* 1: 139-154.
118. **Khanna M., Solanki R. and Lal R. 2011.** Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. Vol. 2, Issue 3, 357-375.
119. **Khelil Klouche N. 1998.** Etude des antibiotiques biosynthétisés par des bactéries filamenteuses extrêmophiles, notamment *Metallogenium sp.* Thèse de Magister en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Aboubakr Belkaid- Tlemcen, Institut des sciences de la Nature. Algérie. 157p.
120. **Kitouni M. 2007.** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 170 p.
121. **Klouche N., Basso O., Lascourrèges J. F., Cayol J. L., Thomas P., Fauque G., Fardeau M. L. and Magot M. 2009.** *Desulfocurvus vexinensis* gen. nov., sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from a deep subsurface aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 3100–3104.

122. Klouche N., Fardeau M. L., Lascourrèges J. F., Cayol J. L., Hacène H., Thomas P. and Magot M. 2007. *Geosporobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., a spore-forming bacterium isolated from a deep subsurface aquifer. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1757–1761.
123. Krekeler D. P., Sigalevich P., Teske A., Cypionka H. and Chen Y. 1997. A sulfatereducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxycliniae* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 167, 369-375.
124. Kristjansson J. K. and Hreggvidsson G. O. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 17-25.
125. Krulwich T. A., Ito M. and Guffanti A. A. 2001. The Na⁺-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1505, 158–168.
126. Kumar A., Saini P. and Shivastava J. N. 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol 4: 57-62.
127. Kumarasamy K. K., Toleman M. A. and Walsh T. R. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism In India, Pakistan and the UK: a molecular, biological and epidemiological study. *The Lancet. Infect. Dis.*, 10 : 597-602.
128. Kunte H., Trüper H., and Stan-Lotter H. 2002. Halophilic Microorganisms in Astrobiology "*The Quest for the Conditions of Life*", Berlin, Springer.
129. Kushner D. J. 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The biology of halophilic bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. pp. 87-103. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- L**
-
130. Lancini G. and Parenti, F. 1982. The Antibiotics. In: *Antibiotics an integrated view*. Springer-Verlag. New York, USA. Inc. 1-241.
131. Lertcanawanichakul M. and Sawangnop S. 2008. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak. J. Sci. Tech.*, 5(2): 161-171.
132. Lewinson O., Padan E. and Bibi E. 2004. Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *P.N.A.S.*, 39: 14073 - 14078.
133. Lim J. M., Jeon C. O. and Kim C. J. 2006a. *Bacillus taeanensis* sp. nov., a halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2903–2908.

134. **Lim J. M., Jeon C. O., Lee S. M., Xu L. H., Jiang C. L. and Kim C. J. 2006b.** *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 373–377.
135. **Liu H., Zhou Y., Liu R., Zhang K. Y. and Lai R. 2009.** *Bacillus solisalsi* sp. nov., a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1460–1464.
136. **Logan N. A. and Berkeley R. C. W. 1984.** Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1871–1882.
137. **Logan N. A., berge O., Bishop A. H., Busse H. J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kämpfer P., Rabinovitch I., Salkinoja-Salonen M. S., Seldin I. and Ventosa A. 2009.** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 2114-2121.

M

138. **MacElroy R. D. 1974.** Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* 6:74-75.
139. **Madern D., Ebel C. and Zaccai G. 2000.** Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4, 91-98.
140. **Madigan M. T. and Martino J. M. 2006.** Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education: Upper Saddle River, N. J., USA.
141. **Margesin R. and Schinner F. 2001.** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 11.
142. **Massana R., DeLong E. F., and Pedros-Alio C. 2000.** A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1777-1787.
143. **Maughan H. and Van der Auwera G. 2011.** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11 ; 789–797.
144. **McConnell D. J., Cantwell B. A., Devine K. M., Forage A. J., Laoide B. M., O’Kane C., Ollington J. F. and Sharp P. M. 1986.** Genetic engineering of extracellular enzyme systems of *Bacilli*. *Annual New York Academy of Science*, 469, 1–17.

145. **Mendo S., Faustino N. A., Sarmiento A. C., Amado F. and Moir A. J. 2004.** Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. *Biotech. Lett.*, 26: 115.
146. **Menzel U. and Gottschalk G. 1985.** The internal pH of *Acetobacterium wieringae* and *Acetobacter aceti* during growth and production of acetic acid, *Archives of Microbiology*, 143: 47-51.
147. **Mesbah N. M., Cook G. M. and Wiegel J. 2009.** The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiple environmental extremes using a large repertoire of Na⁺(K⁺)/H⁺ antiporters. *Molecular Microbiology*, 74(2), 270-281.
148. **Mesbah N. M., Hedrick D. B., Peacock A. D., Rohde M. and Wiegel J. 2007,** *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2507-2512.
149. **Messai Y., Iabaden H., Benhassine T., Alouach S., Tazir M., Gautier V., Alert G. and Bakour R. 2008.** Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol.*, 56 : 319-325.
150. **Midgley D. J., Saleeba J. A., Stewart M. I. and McGee P. A. 2007.** Novel soillineages of Archaea are present in semi-arid soils of eastern Australia. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 129-138.
151. **Mijts B. N. and Patel B. K. 2002.** Cloning, sequencing and expression of an α -amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and bio- chemical characterization of the recombinant enzyme, *Microbiology*, 148; 2343-2349.
152. **Minegishi H., Mizuki T., Echigo A., Fukushima T., Kamekura M. and Usami R. 2008.** Acidophilic haloarchaeal strains are isolated from various solar salts. *Saline Systems*, 4:16.
153. **Morikawa M., Ito M., and Imanaka T. 1992.** Isolation of a new surfactin producer, *Bacillus pumilis* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-I*. *J. Ferment. Bioeng.*, 74 : 255–261.

154. Morozkina E. V., Slutskaya E. S., Fedorova T. V., Tugay T. I., Golubeva L. I. and Koroleva O. V. 2010. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 46: 1-14.
155. Moshafi M. H., Forootanfar H., Ameri A., Shakibaie M., Dehghan-Noudeh G. and Razavi M. 2011. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain fas1 isolated from soil. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol. 24, N° 3. 269-275
156. Munimbazi C. and Bullerman L. B. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 959 - 968.

N

157. Nakagawa T., Ishibashi J., Maruyama A., Yamanaka T., Morimoto Y., Kimura H., Urabe T. and Fukui M. 2004. Analysis of dissimilatory sulfite reductase and 16S rRNA gene fragments from deep-sea hydrothermal sites of the Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Western Pacific, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 393–403.
158. Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 711-729.
159. Nielsen P., Fritze D. and Priest F. G. 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141, 1745-1761.
160. Nowlan B., Dodia M. S., Singh S. P. and Patel B. K. C. 2006. *Bacillus okhensis* sp. nov., a halotolerant and alkalitolerant bacterium from an Indian saltpan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1073–1077.

O

161. Ollivier B., Caumette P., Garcia J. L. and Mah R. A. 1994. Anaerobic bacteria from hypersalin environments. *Microbiology Reviews* 58, (1), 27-38.
162. Oren A. 1994. The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol. Rev.*13: 415- 440.
163. Oren A. 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* 466, 61-72.
164. Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 56-63.

165. **Oren A. 2006.** The order *Halobacteriales*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 3*. 3rd edition. Edited by: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: *Springer*. 113-164.
166. **Oren A. 2008.** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:2.
167. **Oren A. 2010.** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31:8-9, 825-834.

P

168. **Paik S. H., Chakicherla A. and Hansen J. N. 1998.** Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produce by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 23134 - 23142.
169. **Pérez-Fillol M. and Rodriguez-Valera F. 1986.** Potassium ion accumulation in cells of different halobacteria, *PRONADISA: Reactivos de Calidad Internacional*, 2:73-80.
170. **Perez-Pomares F., Bautista V., Ferrer J., Pire C., Marhuenda- Egea F. C. and Bonete M. J. 2003.** Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, *Extremophiles*, 7: 299-306.
171. **Peypoux F., Bonmatin J. M. and Wallach J. 1999.** Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 553-563
172. **Pikuta E. V. and Hoover R. B. 2007.** Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, 33, 183-209.
173. **Pinchuk I. V., Bressollier P., Verneuil B., Fenet B., Sorokulova I. B., Graud F. and Urdaci M. C. 2001.** *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 45 : 3156–3161.
174. **Podar M. and Reysenbach A. L. 2006.** New opportunities revealed by biotechnological explorations of extrêmophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 250-255.
175. **Poitevin B., Anras L., Blachier P., Hussenot J., Lagardère J-P., Lapouyade P., Massé J. et Rigaud C. 2004.** Les marais salés atlantiques, mieux connaitre pour mieux gérer. *Cahier technique*: 1-76.
176. **Price L. B. and Shand R. F. 2000.** Halocin S8 a 36-amino-acid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8a. *J. Bacteriol.*, 182, 4951-4958.

177. **Priest F. G. 1993.** Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein A.L., Hoch J. A., Losick R. (Eds.), *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 3–16.

Q

178. **Quesada E., Bejar V., Valderrama M. J. and Ramos-Cormenzana A. 1987.** Growth characteristics and salt requirement of *Delaya halophila* in a defined medium. *Curr. Microbiol.*, 16, 21-25.

R

179. **Radhika S., Bharathi S., Radhakrishnan M. and Alagurunathan R. 2011.** Bioprospecting of Fresh Water *Actinobacteria*: Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. *Journal of Pharmacy Research.*, 4(8), 2584-2586.
180. **Rainey F., Zhilina T., Buligyna E., Stackebrandt E., Tourova T. and Zavarzin G., 1995.** The taxonomic statut of the fermentative halophilic anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 1,185-189.
181. **Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:597–635.
182. **Reghioua S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. et Boulahfrouf A. 2008.** Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycetes isolés de sol aride de la région de Biskra ; *Sciences et Technologie*, 28 : 59-64.
183. **Rodriguez-Valera F. 1993.** Introduction to Saline Environments. In : Vreeland R. H. and Hochstein L. I. (Eds), *The Biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press Inc, Boca Raton, Pp. 1 – 23.
184. **Rodriguez-Valera F., Juez G. and Kushner D. J. 1982.** Halocins: Salt-dependant bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.*, 28, 151-154.
185. **Rohban R., Amoozegar M. A. and Ventosa A. 2009.** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Ind Microbiol. Biotechnol.*, 36: 333-340.
186. **Rosenfeld W. D. and Zobell C. E. 1947.** Antibiotic production by marine microorganisms. *J. Bacteriol.*, 54: 393-398.

187. **Rossello Mora R. and Amann R. 2001.** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39-67.
- S**
-
188. **Sadfi-Zouaoui N., Essghaier B., Hajlaoui M. R., Fardeau M. L., Cayaol J. L., Ollivier B. and Boudabous A. 2008.** Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *J. Phytopathol.*, 156:42–52.
189. **Sánchez S. and Demain A. 2002.** Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzymes Microbiology Technology.* 31:895-906.
190. **Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E. and Ventosa A. 2003a.** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 295–300.
191. **Sánchez-Porro C., Mellado E., Bertoldo C., Antranikian G. and Ventosa A. 2003b.** Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76, *Extremophiles*, 7: 221-228.
192. **Sapin J. 2009.** L'archéologie de la mer Morte, géographie et climat de la mer Morte. *Revue d'archéologie et d'histoire:* 1-63.
193. **Sarethy I. P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S. K., Gupta V. and Gupta S. 2011.** Alkaliphilic bacteria : applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38:769–790.
194. **Satyanarayana T., Raghukumar C. and Shivaji S. 2005.** Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Curr. Sci.*, 89, 78-90.
195. **Schallmeyer M., Singh A. and Ward O. P. 2004.** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50: 1-17.
196. **Seckbach J. and Chela-Flores J. 2007.** Extremophiles and chemotrophs as contributors to astrobiological signatures on Europa: A review of biomarkers of sulfate-reducers and other microorganisms. In: R.B. Hoover, G.V. Levin, A.Y. Rozanov, and P.C.W. Davies (eds.), *Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology X*. Proc. SPIE 6694: 66940W.
197. **Sekhsoxh Y., Chadli M. et El Hamzaoui S. A. 2008.** Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Med. Mal. Infect.* 38 : 324-327 .

198. **Setlow P., Johnson E. A. 2007.** Spores and their significance. In *Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers*. 30-68. Edited by Doyle M. P., Beuchat L. R. and Montville T. J.. Washington D.C.: ASM Press.
199. **Sharma H. and Parihar L. 2010.** Antifungal activity of extracts obtained from Actinomycetes. *Journal of Yeast and Fungal Research*. Vol. 1(10), 197- 200.
200. **Shivanand P. and Jayaraman G. 2009.** Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*. 1088–1094.
201. **Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M. and Niida T. 1979.** Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only in agar culture. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, Strain SF-1993. *J. antibiot.*, 32 : 427-435.
202. **Sibanda T., Mabinya L. V., Mazomba N., Akinpelu D. A., Bernard K., Olaniran A. O. and Okoh A. I., 2010.** Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 2612-2623.
203. **Sierra G. 1957.** A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 23:15-22.
204. **Smibert R. M. and Krieg N. R. 1994.** Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt. Washington, DC: *American Society for Microbiology*.
205. **Smith N. R., Gordon R. E. and Clark F. E. 1952.** Aerobic spore-forming bacteria. *U.S. Dept. Agr. Monogr.* N°16. Washington, D.C. USA.
206. **Soliman K. M. and Badeaa R. I. 2002.** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic Fungi. *Elsevier Science Ltd-Foud and Chemical Toxicology*, 1669-1675.
207. **Sørensen K. B., Canfield D. E. and Oren A. 2004.** Salinity Responses of Benthic Microbial Communities in a Solar Saltern (Eilat, Israel). *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1608-1616.
208. **Stackebrandt E. and Goebel B. M. 1994.** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846-849.

209. Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845–857.
210. Stetter K. O. 1996. Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found. Symp.* 202: 1-18.
211. Stover A. G. and Driks A. 1999. Secretion, localization and antibacterial activity of Tas A, a *Bacillus subtilis* pore associated protein. *Journal of Bacteriology*, 181, 1664-1672.
212. Syed A. M., Safia A. and Abdul H. 2009. Antibiotic production by thermophilic *bacillus* specie SAT-4. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol. 22, No.3, pp. 339-345.
- T**
-
213. Tabbene O., Ben Slimene I., Bouabdallah F., Mangoni M. L., Urdaci M. C. and Limam F. 2009. Production of Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Activity from *Bacillus subtilis* sp. Strain B38 Newly Isolated from Soil . *Appl Biochem Biotechnol.*, 157: 407- 419.
214. Tabbene O., Karkouch I., Elkahoui S., Cosette P., Mangoni M. L., Jouenne T. and Limam F. 2010. A new antibacterial and antioxidant S07-2 compound produced by *Bacillus subtilis* B38; *FEMS Microbiol. Lett.*, 303 ; 176–182.
215. Tamehiro N., Okamoto-Hosoya Y., Okamoto S., Ubukata M., Hamada M., Naganawa H., Ochi K. 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 315-320.
216. Tardy-Jacquenod C., Magot M., Patel B., Matherson and Caumette P. 1998. *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophilic sulfate–reducing bacterium isolated from oil production facilities. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
217. Telma E. B., Willibaldo S., Alfredo E. M., Janice C. and Jorge A. V. C. 2003. Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. *Z. Naturforsch.* 58: 708–712.
218. Tiquia S. M., Davis D., Hadid H., Kasparian S., Ismail M., Sahly R., Shim J., Singh S. and Murray K. S. 2007. Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of southeastern Michigan. *Environmental Technology*, Vol. 28. 297-307.
219. Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L. et de Champs C. 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 27 : 397-402.

V

220. **Van den Burg B. 2003.** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opinion. Microbiol.*, 6: 213-218.
221. **Vargas V. A., Delgado O. D., Hatti-Kaul R. and Mattiasson B. 2005.** *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkaliphilic halotolerant bacterium isolated from a Kenyan soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 899–902.
222. **Ventosa A., Garcia M. T., Kamekura M., Onishi H. and Ruiz- Berraquero F. 1989.** *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Syst Appl Microbiol* 12: 162–165.
223. **Ventosa A., Garcia M. T., Kamekura M., Onishi H., and Ruiz-Berraquero F. 1990.** *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 401- 405.
224. **Ventosa A., Nieto J. J. and Oren A. 1998.** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(2): 504-544.
225. **Véron M. 1990.** *Pseudomonaceae*. In : Le Minor L. et Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences. Flammarion. France. Ch 22 : 555-587.
226. **Vidyasagar M., Prakash S., Litchfield C. and Sreeramulu K. 2006.** *Archaea* 2: 51–57.
227. **Vincent W. F., Mueller D. R. and Bonilla S. 2004.** Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology* **48**,103–112.

W

228. **Waino M. and Ingvorsen K. 2003.** Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*, *Extremophiles*, 7: 87-93.
229. **Wang Q. F., Li W., Liu Y. L., Cao H. H., Li Z. and Guo G. Q. 2007.** *Bacillus qingdaonensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1143–1147.
230. **Weber A. P. M., Oesterhelt C., Gross W., Brautigam A., Imboden L. A., Krassovskaya I. 2004.** EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. 55: 17-32.

231. Weisser J., and H. G. Trüper. 1985. Osmoregulation in a new haloalkaliphilic *Bacillus* from the Wadi Natrun (Egypt). *Syst. Appl. Microbiol.*, 6:7–11.
232. Whitman W. B., Boone D. R., Koga Y. and Keswani J. 2001. Taxonomy of methanogenic *archaea*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. Boone D. R., Castenholz R. W. and Garitty G. M. Volume 1. pp. 211-213. New York: Springer.
233. Woese C. R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221- 271.
234. Woese C. R., Kandler O. and Wheelis M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4576 - 4579.
235. Woese C. R., Magrum L. J. and Fox G. E. 1978. *Archaeobacteria*. *Journal of Molecular Evolution*, 11: 245-251.
236. Wood W. A. 1981. Physical methods. In: *Manual of Methods for General Bacteriology*. Eds. Gerhardt P., Murray R. G. E., Costilow R., Nester E. W., Wood W. A., Krieg N. R and Phillips G. B., *ASM Press*. Washington, D.e. USA. 286-327.

Y

237. Yayanos A. A. 1995. Microbiology to 10,500 m in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 777–805.
238. Yayanos A. A., Dietz A. S. and Van Boxtel R. 1979. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science*, 205:808-810.
239. Ye Z. W., Jiang J. G. and Wu G. H. 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progress and prospects. *Biotechnol. Adv.*, 26: 352–360.
240. Yoon J. H., Kang K. H. and Park Y. H. 2003. *Halobacillus salinus* sp. nov., isolated from a salt lake on the coast of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 687–693.
241. Yoon J. H., Kim I. G., Kang K. H., Oh T. K. and Park Y. H. 2004. *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus* genomospecies, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 803-808.
242. Yumoto I., Hirota K., Goto T., Nodasaka Y. and Nakajima K. 2005. *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 907–911.

Z

243. **Zafrilla B., Martinez-Espinosa R. M., Alonso M. A. and Bonete M. J. 2010.** Biodiversity of Archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopó Valley, Spain. *Saline Systems*. 6: 10.
244. **Zalar P., De Hoog S., Gunde-Cimerman N. 1999.** *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Stud. Mycol.*, 43:57-62.
245. **Zhang L., Wang Y., Dai J., Tang Y., Yang Q., Luo X. and Fang C. 2009.** *Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1787–1792
246. **ZoBell C. E. and Morita R. Y. 1957.** Barophilic bacteria in some deep-sea sediments. *J. Bacteriol.*, 73:563-568.
247. **Zukowski M. M. 1992.** Production of commercially valuable products. In: *Biology of Bacilli; application to industry* (eds. R. E. Doi and M. McGloughlin), pp. 311-371, Butterworth-Hoffman Press, Boston, U.S.A.

Annexe

➤ Milieux de culture liquides

Milieu de culture KN

Extrait de levure	02g
Peptone	02g
NaCl	02g
NH ₄ Cl	01g
KH ₂ PO ₄	03g
K ₂ HPO ₄	03g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.1g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0.5g
KCl	0.1g
Eau distillée	1000ml

pH =7

Bouillon nutritif

Peptone	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Eau distillée	1000ml

pH = 7,2

Bouillon Nitraté

Peptone	5 g
Extrait de bœuf	3 g
KNO ₃	1 g
Eau distillée	1000ml

pH =7

Milieu Pringsheim

Extrait de levure	0,5 g
MnSO ₄ , 4H ₂ O	0,2 g
Eau distillée	1000ml

pH =7,2

➤ Milieux de culture solides

Milieu de culture KN

Extrait de levure	02g
Peptone	02g
NaCl	02g
NH ₄ Cl	01g
KH ₂ PO ₄	03g
K ₂ HPO ₄	03g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.1g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0.5g
KCl	0.1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH =7

Gélose nutritive

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

pH =6,8-7,4

Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caseine	17.5g
Amidon	01.5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml

pH =7,4

Gélose Sabouraud

Glucose	40 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7	

Gélose à ADN

Tryptose	20g
Acide desoxyribonucleique	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH =7,3	

Gélose à Amidon

Gélose nutritive	100ml
Amidon	01g

Milieu pour la recherche de la lécithinase (*Egg-yolk agar*)

Gélose nutritive	90 ml
Emulsion de jaune d'œuf	10 ml

Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, récupérer le jaune d'œuf et additionner 4 fois le volume en eau distillée stérile, mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

N. B. Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter l'émulsion de jaune d'œuf, après séchage le milieu est ensemencé.

Gélose au lait**Préparation 1**

Lait écrémé poudre 05g

Eau distillée 50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

Préparation 2

Agar 01g

Eau distillée 50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

N. B. La stérilisation des deux préparations se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation les deux préparations sont mises en surfusion (45°C) et mélangées puis coulées sur boîte pétri. Après séchage, le milieu estensemencé.

Gélose à esculine

Extrait de viande 3,0 g

Peptone de viande 5,0 g

Esculine 1 g

Citrate de fer (III) 0,5 g

Agar-agar 14,5 g

pH = 7

Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80

Extrait de levure 5 g

NaNO₃ 1 g

Solution saline 50 ml

CaCl₂, 2H₂O 0,1 g

Tween 80 10 ml

agar 8 g

eau distillée..... 1000 ml
pH = 7,2

Milieu Mannitol-Mobilité

Peptone 20 g
Nitrate de potassium 1 g
Mannitol 2 g
Rouge de phénol 40 mg
Agar 4 g
Eau distillée 1000 ml
pH = 8,1

Gélose viande-foie

Extrait de viande 10 g
Peptone 20 g
Extrait de levure 10 g
Glucose 05 g
Agar 15 g
Eau distillée 1000 ml
pH = 7,6

Milieu Mossel

Extrait de viande 01g
Peptone 10g
D-Mannitol 10g
Chlorure de sodium 10g
Rouge phénol..... 0.025g
Agar 15g
Eau distillée 1000ml
pH = 7,2 ± 0.2

➤ **Solutions**

Eau physiologique

Eau distillée	1000ml
Chlorure de sodium (NaCl).....	9g

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase (Ortho Nitro Phényl- β D-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L -arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /rouge
LDC	L -lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
ODC	L-Ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
CIT	Trisodium citrate	Utilisation du Citrate	Vert pâle - jaune	Bleu-vert-bleu
H₂S	Sodium thiosulfate	Production d' H ₂ S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange /rouge
TDA	L-tryptophane	Tryptophane Désaminase	TDA immédiat	
			Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'Indole	JAMES immédiat	
			Incolore-vert pâle – jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	VP1+VP2/10min	
			Incolore – rose pâle	Rose - rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (Gélatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
GLU	D-glucose	Fermentation -oxydation (Glucose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation -oxydation (Mannitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
INO	Inositol	Fermentation -oxydation (Inositol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SOR	D-sorbitol	Fermentation -oxydation (Sorbitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
RHA	L-rhamnose	Fermentation -oxydation (Rhamnose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SAC	D-saccharose	Fermentation -oxydation (Saccharose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MEL	D-melibiose	Fermentation -oxydation (Melibiose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
AMY	Amygdaline	Fermentation -oxydation (Amygdaline)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
ARA	L-arabinose	Fermentation -oxydation (Arabinose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris

➤ **Tableau de lecture de la galerie Api 20^E**

➤ **Mode de préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince**

Révélateur chimique	Mode préparatoire	Molécules chimiques révélées	Conditions de révélation
Ninhydrine	- 0.2 % (p/v) Ninhydrine - Acétone	- Les amines, - Les acides aminés - Les osamines	Après chauffage à 110°C pendant 5 minutes, des taches violettes ou roses sont visibles
FeCl₃	- 1% (p/v) FeCl ₃ - méthanol/eau (50/50 ; v/v).	- Les phénols	Après chauffage à 105°C pendant 2 à 5 minutes, des taches grises noirâtres sont visibles
Molisch	- 0,25 % (p/v) d'α-naphtol - 50 ml ethanol -50 ml d'acide sulfurique à 20%	- Les sucres	Après chauffage à 105°C pendant 2 à 5 minutes, des taches violettes sont visibles

توجد الكائنات المجهرية في الطبيعة بصفة لا تعد ، حيث يمكنها تحدي قوانين البيولوجيا و النمو في البيئات القاسية. تدعى هذه الكائنات بـ " الكائنات غير العادية " أو " Les extrémophiles ". تعتبر الكائنات المقاومة و المحبة للملوحة من بين هذه الكائنات الاستثنائية حيث أن مقاومتها للملوحة تمنحها خصائص مذهلة في ميدان التكنولوجيا الحيوية. يهدف دراسة النشاط المضاد للميكروبات لعزلة مقاومة للملوحة ذات الرمز ML9832 معزولة في نسبة ملوحة تقدر بـ 25 % من كلوريد الصوديوم (و/ح) من بيئة شديدة الملوحة " سبخة El Golea " المتواجدة بالصحراء الجزائرية ، تم تصنيفها وتمييز نشاطها المضاد للميكروبات بصفة أولية. الدراسة التصنيفية للعزلة تمت بدراسة خصائصها الظاهرية والجينية. العزلة تظهر على شكل عصيات إيجابية الجرام ، هوائية ، قادرة على تشكيل أبواغ شبه طرفية. البحث عن أنشطة إمامة إنزيمية خارج خلوية و دراسة مدى تحملها لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0، 2، 5، 7.5، 10، 15، 17.5، 20، 25، 30 (و/ح) % و لدرجات حرارة عالية و أخرى منخفضة [4، 15، 25، 30، 37، 45، 55 درجة] ، كذلك دراسة قابليتها للنمو على أوساط ذات حموضة أو أوساط قاعدية (2، 5، 7، 9، 11، 13) و كيفية تعاملها مع بعض المضادات الحيوية أظهرت أن هذه العزلة تفرز بعض الإنزيمات و أنها قادرة على النمو في وسط ملحي 0 – 25 % من كلوريد الصوديوم (حيث تبلغ أوجها عند 0 %) ، و درجات حرارة ما بين 15° و 37° (حيث تبلغ أوجها عند 30°) ، و درجة حموضة pH ما بين 5 و 9 (حيث تبلغ أوجها عند pH = 7). كما أوضحت هذه الدراسة قدرة هذه العزلة على مقاومة Céfotaxim و Fosfomycine. التحليل الفيلوجيني للعزلة أظهر بأنها تمثل عزلة جديدة في فصيلة " Bacillales " بنسبة تشابه معادلة لـ 96 % . و تقرب من السلالتين *Bacillus pseudofirmus* و *Bacillus halodurans* بنسبتي تشابه 95% و 93,3% على الترتيب. تمت دراسة نشاط العزلة ML9832 المضاد للميكروبات ضد بكتيريات إيجابية و سلبية الجرام، ضد بعض الطفيليات و خميرة. البحث الأولي عن النشاط المضاد للميكروبات تم بتقنية الانتشار داخل أوساط الزرع الصلبة : أسطوانات الأجار، حيث تبين بأن العزلة المدروسة قامت ببتثبيط معظم الميكروبات المختبرة. أثر وسط زرع هذه العزلة و مدة حضانتها على تركيب جزئيات ناشطة ضد الميكروبات أوضحت أن نشاطها المضاد يبلغ أوجه بعد 72 ساعة من الزرع على وسط nutritive.

عملية استخلاص المركبات المضادة للميكروبات بعدد من المذيبات العضوية مختلفة القطبية بعد اختبار نشاط كل المستخلصات ضد الميكروبات، أظهرت بأن الكلورفورم هو الأفضل من أجل استخلاص المركبات المضادة للميكروبات المصنعة من طرف العزلة ML9832. كشفت التقنية الكروماتوغرافية المنجزة على طبقة رقيقة من gel de silice عن وجود نوعين من الجزئيات في مستخلص الكلورفورم : مركبات أمينية و مركبات فينولية . أظهرت الدراسة الطيفية IR نتائج موافقة للدراسة الكروماتوغرافية.

الكلمات المفتاحية: عزلة جديدة، كائنات مجهرية غير عادية ، سبخة، مواد فعالة .

Résumé

Les microorganismes sont innombrables dans la nature, ils peuvent défer les lois de la biologie et prospérer dans des environnements extrêmes. Ils sont globalement qualifiés d'extrémophiles. Les halotolérants et halophiles font partie de ces êtres exceptionnels, leur résistance aux fortes salinités leur confère des caractéristiques étonnantes, ce qui révèle un véritable atout biotechnologique.

Une recherche ayant pour objectif, l'étude des activités antimicrobiennes d'une souche halotolérante ML9832 isolée à 25% de NaCl d'un environnement hypersalin algérien, lac d'El Golea, est réalisée. Pour cela, une étude taxonomique de la souche ainsi qu'une pré-caractérisation de ses activités antimicrobiennes sont effectuées.

L'étude taxonomique a été accomplie par une identification phénotypique et génotypique. La souche ML9832 est un bâtonnet immobile à Gram positif, aéro-anaérobie facultatif capable de former des endospores sub-terminales. La recherche de certaines enzymes et l'analyse de sa tolérance à des concentrations de NaCl [0, 2, 5, 7.5, 10, 15, 17.5, 20, 25 et 30 % (p/v)], aux pH acides et alcalins [2, 5, 7, 9, 11, 13], et à des températures élevées et basses [4, 15, 25, 30, 37, 45, 55°C] ainsi que son profil de résistance à onze antibiotiques (RA, C, PT, CTX, CN, OX, AMC, FF, TOB, K, PNV) ont permis de mettre en évidence qu'elle possède la catalase, l'oxydase, l'amylase, la nitrate réductase, la lécithinase, la caseinase, la gélatinase, l'esculinase, et une lipase et qu'elle est capable de se développer à des concentrations salines allant de 0 à 25% de NaCl (p/v) avec un optimum à 0%, à des pH allant de 5 à 11 avec un optimum à 7, à des températures de 15°C à 37°C avec un optimum à 30°C et de résister vis-à-vis la Céfotaxime et la Fosfomycine. L'analyse phylogénétique de la souche ML9832 a révélé une similarité de 96% avec les espèces appartenant à l'ordre des *Bacillales* ; elle a permis de conclure que l'isolat constitue un nouveau taxon phylogénétiquement proche de l'espèce *Bacillus pseudofirmus* avec un pourcentage de similitude de 95% et de l'espèce *Bacillus halodurans* avec un pourcentage de similitude de 93,3%.

L'activité antimicrobienne de la souche a été mise en évidence contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, des champignons et une levure. Un screening primaire a été réalisé par la technique des cylindres d'agar. La souche ML9832 exerce un effet contre la plupart des germes test utilisés. L'étude de l'effet du milieu de culture et du temps d'incubation de la souche ML9832 sur la production de molécules antimicrobiennes a permis de déduire que la production est maximale après 72 heures de culture sur la gélose nutritive. L'extraction, par une batterie de solvants organiques de polarité différente, nous a permis de choisir le chloroforme comme meilleur solvant pour extraire les activités antimicrobiennes produites par la souche.

La technique chromatographique sur couche mince de gel de silice a révélé la présence de deux types de molécules : des amines et des phénols dans l'extrait chloroformique. Le spectre Infra-Rouge donne des pics caractéristiques correspondant aux mêmes groupements.

Mots clés : Nouveau taxon, Extrémophile, Sebkhha, molécules bioactives.

Abstract

Microorganisms are uncountable in nature; they can defy the law of biology and prosper in different extremes environments. They are globally qualified as extremophiles. Halophilic and halotolerant microorganisms are a member of those exceptional being. Their resistance in high salinity confers those surprising characteristics, what reveals a real biotechnological trump.

A research having for objective, study of antimicrobial activities of a halotolerant bacterial strain named ML9832 isolated at 25% of NaCl (w/v) from an Algerian hypersalin environment, El Golea Sabkha, was realized. For that purpose, a taxonomical study of the strain and a preliminary characterization of these antimicrobial activities were made.

Taxonomical study was accomplished by a phenotypic and genotypic identification. The strain ML9832 is an aero-anaerobic, no motile, Gram positive rod-shaped bacterium that produces sub terminal spores. The research of the hydrolytic activities, the Kinetics of growth at different saline concentrations [0, 2, 5, 7.5, 10, 15, 17.5, 20, 25 and 30% NaCl (w/v)], at acidic and alkaline pH [2, 5, 7, 9, 11, 13], and at low and high temperatures [4, 15, 25, 30, 37, 45, 55°C] also his resistance to 11 antibiotics [RA, C, PT, CTX, CN, OX, AMC, FF, TOB, K, PNV] showed that the strain ML9832 possessed the catalase, oxidase, amylase, gelatinase, nitrate reductase, lécithinase, esculinase and a lipase, and it is able to grow at NaCl concentration range of 0 - 25 % with optimum at 0%, at pH range of 5 – 11 with optimum at pH=7 and at temperature range of 15 - 37°C with optimum at 30°C. Moreover, the strain was resistant to Cefotaxim and Fosfomycin.

Phylogenetic analysis allows us to conclude that the strain ML9832 constitute **new taxa** in the order of *Bacillales* with a similarity of 96%. It is phylogenetic ally neighboring to the *Bacillus pseudofirmus* with a similarity of **95%** and *Bacillus halodurans* with a similarity of **93,3%**.

The antimicrobial activity of the strain ML9832 was preliminarily screened by adopting agar plug method against Gram positive, Gram negative bacteria, fungi and yeast. The strain is active against a majority of microorganisms test.

Study of the effect of the medium of culture and the time of incubation on the antibacterial metabolites production showed that activity reach its maximal value in the 72 hours of culture in nutrient agar. Extraction with various organic solvents of varying polarity enabled us to choice the chloroform as the best solvent to extract the antimicrobial activities produced by the strain ML9832.

Thin layer chromatography on silica gel makes clear the presence of two types of molecules: amines and phenols in chloroformic extract. The Infra-Rouge spectra give a characteristic peaks corresponding to the same type of molecules.

Key words : New taxa, Extremophile, Sabkha ,Bioactives molecules.