

MAST-Bio-195/03

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM –



Faculté des Sciences

De la nature et de la vie, et science de la terre et de l'univers

Departement de Biologie

Partie expérimentale du mémoire

*De fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique
en biologie moléculaire et cellulaire.*

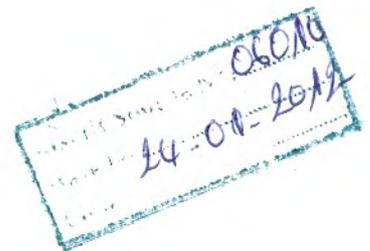
Option : Microbiologie.

Thème

***Contribution à l'étude du pouvoir antimicrobien d'une
souche bactérienne extrémophile (PK1) provenant d'une
sebkha algérienne.***

Présenté par :

M^{lle} Bahoussi Fayza.



Soutenu le 03-12 -2011 devant le jury composé de :

Président: M^r Bendahou M
Examinatrice : M^{me} Bendimerad N
Promotrice : M^{me} Khelil N



Maitre de conférence de classe « A »
Maitre assistante chargée de cours
Maitre de conférence de classe « A »

Année universitaire 2010/2011

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à M^{me} Khelil, Maître de conférence de classe A à la faculté de médecine à Tlemcen, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie appliquée à l'agro-alimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMMABE), nous remercions M^{elle} Nadia et Fatima qui nous ont beaucoup aidées .

J'exprime mes vifs remerciements à M^r BENDAHOUM Maître de conférences de classe A à la faculté des sciences Université de Tlemcen pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à M^{me} BENDIMRED N, maître assistante A au département de biologie d'avoir accepter de faire partie du jury.

J'exprime mes vifs remerciements à M^{me} BENSALAH F, maître assistante A au département de biologie qui nous a donné la collection des souches du laboratoire de produits naturels



Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout le long de mes études.

A :

Mes frère Mounir et Aymen et ma sœur Loubna

Mon poussin Abdallah

Mes tantes et mes oncles

Mes cousins et cousines.

Toute ma famille.

toutes mes amies Wassila, Hanane, Soumia, Asma.

Abréviations

T : température

Km : kilomètre

g : gramme

l : litre

BSR: Bactérie Sulfato-réductrices

SHT: Source hydrothermale terrestre

CH1: Souche hyper thermophile *Pyrococcus*..

% : Pourcentage

UV: Radiation Ultra violet

H₂O:L'eau

O₂ : Oxygène

CH₃ : Méthane

NH₃ :L'ammoniac

CH₄ : Méthane

HCN : Acide cyanogène

HC₅N : Le cyanoacéthylène

C₂H₂ :L'acétylène

R-OR : Liaisons éther

R-CO-OR : Liaison ester

μm : Micromètre

H₂O₂: eau oxygénée



ATP: Adenosine triphosphate

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ATB: Antibiotique

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique Chapitre I	
I. Les milieux extrêmes.....	3
I.1 Les conditions extrêmes.....	3
I.2. Les différents milieux extrêmes.....	3
I.2.1 Les eaux souterraines	4
I.2.2 Les sources thermales et hydrothermales.....	4
I.2.3 Les milieux hyper-salins.....	5
I.2.4 Les milieux pétrolier.....	6
II. Les microorganismes extrémophiles.....	8
II.1 Les différents extrémophiles.....	9
II.1.1 Les halophiles.....	9
II.1.1.1 Adaptation osmotique des microorganismes halophiles.....	10
II.1.2 Les psychrophiles.....	10
II.1.3 Les thermophiles.....	11
II.2 Les propriétés d'extrémophiles.....	12
II.3 Quelques microorganismes extrémophiles.....	12
II.3.1 Les Archéobactéries et leurs milieux extrêmes.....	13
II.3.2 Les caractéristiques des Archéobactéries.....	14
II.3.3 Les Bacillus.....	15

II.3.3.1. Nomenclature des rangs taxonomiques.....	16
1. Le domaine des eubactéries.....	16
2. Phylum des firmicutes.....	16
3. La classe des Bacillus.....	16
4. L'ordre des Bacillales.....	16
5. Le genre Bacillus.....	19
III. Intérêt biotechnologique des extremophiles.....	21
III.1 Intérêt biotechnologique des halophiles.....	21
III.2 Utilisation de cellules entières d'archeae en biotechnologie.....	22
III.3 Utilisation des Bacillus en biotechnologie.....	23
III.3.1 Les souches de LactoBacilles thermophiles utilisés dans l'industrie l'aitière.....	23
III.3.2 Production des bios insecticides par Bacillus thuringiensis.....	23
III.3.3 Production des bactériocines par les Bacillus.....	24
III.3.4 Production des antibiotiques ituriniques.....	24
III.3.5 Productions des protéases.....	25
III.3.6 Production des insecticides par des Bacillus.....	27

Synthèse bibliographique Chapitre II

I. Définition de sebkha.....	28
I.1 Situation géographiques.....	28
I.2 Cordonnées géographiques.....	28
I.3 Limites géographiques.....	28
I.4 Relief.....	29
I.5 Données climatiques.....	29
Température.....	30
Précipitations.....	30
Humidité relative de l'air Les vents.....	30
L'évaporation.....	31
Insolation.....	31
I.6 Les données hydrogéologiques.....	31
I.6.1. Le continental intercalaire ou nappe albienne.....	31
I.6.2. Nappe phréatique.....	31
I.7Les données édaphiques.....	32
I.7.1. Sol des régions sahariennes.....	32
I.7.2. Sol de la région d'El-Goléa.....	32

Méthodologie

I- Les caractéristiques de genre Bacillus.....	33
II- L'identification.....	33
III- La pré caractérisation du pouvoir antimicrobien.....	33

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Composition de l'ordre des Bacillales (Euzéby, 2002, Larpent 2000).....	18
Tableau n° 2: Taxons de la famille des Bacillaceae exclus du genre <i>Bacillus</i> (Larpent, 2000).....	19
Tableau n° 3 : Taxons de la famille des Bacillaceae appartenant au genre <i>Bacillus</i> (Larpent, 2000).....	20
Tableau n°4 : Quelques enzymes et antibiotiques synthétisés par <i>Bacillus</i> (LARPENT et <i>al.</i> 1997).....	26

Liste des figures

Figure n°1 :Fumeur riche en hyperthermophile <i>pyrococcus CIII</i> (Querellou, 2010).....	5
Figure n°2 : Mer morte, presque huit fois que les océans plus salée 275g/l de chlorure de sodiums http://fr.wikipedia.org	7
Figure3: <i>Thermotoga maritima</i> . (Olivier B.2009).....	8
Figure 4 : aspect microscopique du genre <i>Bacillus anthracis</i> (HanyW ,1975).....	16
Figure 5. Représentation schématique du domaine des eubactéries (d'après Larpent. 2000).....	18
Figure 6. Position géographique d'El-Goléa (Encarta 2004).....	29

Table des matières

Introduction.....1

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique.....3

2. Méthode de travail.....3

2.1 Revivification de la souche.....3

2.2 Purification.....4

2.3 Identification de la souche pk1 jusqu'au genre.....4

2.3.1 Caractères morphologiques.....4

2.3.2 Caractères culturaux.....7

2.3.3 Caractères biochimiques.....7

2.4. Activité antimicrobienne.....8

Résultats et discussions

3. Résultats.....12

3.1. Résultats d'identification.....12

3.2 Activité antimicrobienne.....13

4. Discussion.....16

Conclusion

Conclusion.....20

Références bibliographiques

Références bibliographiques.....22



Liste des tableaux

Tableau n°1 : Microorganismes-cible utilisés.....	10
Tableau n° 2 : Les caractères microscopiques culturaux et biochimiques de la pk1.....	12
Tableau n°3 : le diamètre des zones d'inhibition de la pk1.....	13

Liste des figures

Figure n°1 : Ensemencement de la souche pk1 sur milieu Mossel.....	4
Figure n°2 : La technique de la coloration de Gram (Gram et al. ,1889).....	6
Figure n°3: Test de la catalase.....	7
Figure n°4 : Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion par disques d'agar (Vardar-Unlu et al, 2003).....	9
Figure n° 5 : Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion par puits (Barefoot Klaenhammer .1983).....	11
Figure n°6 : Diamètre des zones d'inhibition de la méthode des disques.....	13
Figure n°7 : Diamètre des zones d'inhibition de la méthode des puits.....	14
Figure n°8 : Zones d'inhibition de la pk1 contre <i>E coli</i>	14
Figure n°9: Zones d'inhibition de la pk1 contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figure n°10: Zones d'inhibition de la pk1 contre <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figure n°11: Zones d'inhibition de la pk1 contre <i>Bacillus cereus</i>	15
Figure n°12: Zones d'inhibition de la pk1 contre <i>Enterococcus faecalis</i>	16

Introduction

Introduction

Les environnements considérés par l'homme comme extrêmes en termes de température, de pression, de pH et de salinité sont souvent colonisés par des micro-organismes, auxquels on a donné le nom d'extrémophiles. Ces derniers, bien adaptés à ces conditions physico-chimiques particulières, sont capables d'en retirer l'énergie nécessaire pour leur métabolisme et leur croissance.

Les organismes vivant en milieux extrêmes et en particulier les micro-organismes ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes.

Les organismes extrémophiles peuvent être répertoriés selon leurs paramètres de croissance :

- les espèces psychrophiles résistent au froid et se développent à des températures voisines de 0 °C (calotte glaciaire de l'Antarctique par exemple).

- les espèces thermophiles vivent dans des conditions de température proches du point d'ébullition de l'eau (de 80 à 105 °C) au niveau des geysers ou des sites hydrothermaux des profondeurs océaniques.

- Les espèces barophiles sont capables de supporter des pressions allant jusqu'à 100 mégapascals ;

- les espèces acidophiles et les alcalophiles résistent à des milieux où le pH est extrême, atteignant respectivement 0 et 11 (près de certains volcans et des lacs africains).

- les espèces halophiles peuplent les mers salées et les marais salants où la concentration saline est proche de la saturation (de 20 à 35 p. 100).

- les espèces anoxygènes : respiration en absence de l'oxygène ou bien l'accepteur final d'électron est une substance autre d'oxygène.

Introduction

L'étude des extrémophiles a pour objectif de comprendre les mécanismes adaptatifs mis en œuvre mais également d'exploiter les propriétés des biomolécules, notamment les enzymes potentiellement utilisables en ingénierie de l'ADN.

L'intérêt grandissant porté aux extrémophiles et aux applications biotechnologiques qu'ils recèlent tient beaucoup au fait qu'il s'agit d'une nouvelle frontière à explorer. En outre, les extrémophiles nous amènent à réviser les connaissances de base en biologie. Leurs constituants biologiques possèdent des propriétés directement intéressantes pour des applications industrielles existantes dont ils peuvent optimiser les procédés. Ils ouvrent aussi des perspectives de mise en œuvre de procédés biologiques nouveaux là où les méthodes de chimie seules peinent à satisfaire les exigences environnementales et à assurer la rentabilité des procédés.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier le pouvoir antibactérien et antifongique de la souche (pk1) isolée et conservée à -80°C puis à 4°C par Dr Khelil au cours de ses travaux de magistère à partir de la sebkha d'EL Golea de la région de Ghardaïa, connue par sa salinité élevée. (Khelil Klouche, 1998).

La partie expérimentale de notre travail consiste :

- dans un premier temps à identifier jusqu'au genre la souche pk1 (présumée selon Dr khelil un Bacillus).
- Dans un deuxième temps étudier son pouvoir antibiotique en somme une précaractérisation de l'activité antibiotique de cette souche.

Nous rappelons que ce travail rentre directement dans l'axe de recherches du laboratoire Lammabe (laboratoire de microbiologie appliquée à l'agro-alimentaire au biomédical et à l'environnement) et en particulier dans celui de l'équipe des extrémophiles dirigée par Dr Khelil N.

I. Les milieux extrêmes

Un milieu est dit extrême lorsque ses conditions de vie normales sont mortelles pour la plus part des autres organismes : température proche ou supérieure à 100°C (hyper thermophile) ou inférieure à 0°C (psychrophile), pression exceptionnelles (grands fonds marins), milieux très chargés en sel (halophile), milieux très acides ou hyper alcalins, milieux radioactifs ou anoxique (sans oxygène) ou non éclairé. (Sylvain, 2009)

I.1 Les conditions extrêmes :

- ❖ Température élevée: 121°C, Strain 121 (*Fumeurs du Pacifique*)
- ❖ Des basses températures: -15°C, *Cryptoendoliths* (Antarctique)
- ❖ Les radiations : 5 MRad, (*Deinococcus radiodurans*)
- ❖ Gravité : 1 millions de g, *Escherichia coli* (dans une centrifugeuse)
- ❖ La profondeur : 3.2 Km sous la terre, 12 Km sous la mer. *Bacillus Infernus*
- ❖ Milieux Acide : pH 0 (la plupart des organismes vivent dans un milieu 100000× moins acide), *Thiobacillus*.
- ❖ Milieu Basique : pH 12.8 (la plupart des organismes vivent dans un milieu 1000× moins basique)
- ❖ Espace : 6 ans de survie dans le vide pour *Bacillus subtilis* retrouvé sur un satellite de la NASA.
- ❖ Forte Pression : 1200× la pression atmosphérique ou 12 Km d'eau.
- ❖ Forte Salinité : 300g/L en mer Morte, *Haloarcula*. (Sylvain, 2009)

I 2. Les différents milieux extrêmes

I.2.1 Les eaux souterraines

On a vu dans une section précédente qu'une partie des eaux de précipitation ruissellent à la surface des continents pour former les cours d'eau, alors qu'une autre partie s'infiltré dans le sol pour donner ce qu'on appelle les eaux souterraines.

Les eaux souterraines constituent une provision d'eau potable inestimable pour l'humanité. Dans plusieurs pays, c'est pratiquement la seule source d'approvisionnement. Au Québec, nous sommes habitués à compter sur les eaux de ruissellement (lacs, rivières, fleuve) pour

notre approvisionnement en eau potable, mais de plus en plus, individus et municipalités se tournent vers cette richesse que constituent les nappes phréatiques. Celles-ci contiennent un volume énorme d'eau exploitable. En milieu urbain ou industriel, les nappes phréatiques peuvent devenir rapidement fragiles à la surexploitation ou à la contamination. Géologues et ingénieurs géologues commencent à peine à faire l'inventaire de cette ressource et à développer des outils pour une protection et une exploitation rationnelles.

Contrairement à la croyance souvent répandue que ces eaux sont stockées dans des sortes de rivières ou de grands lacs souterrains, les eaux souterraines sont contenues dans les pores des sédiments ou des roches. Un exemple type des eaux souterraines est celui des aquifères profonds.

Un aquifère est une formation souterraine de roche perméable ou de matériau meuble qui produit des quantités utiles d'eau lorsqu'elles sont captées par un puits.

Récemment deux nouvelles souches ont été découvertes par Dr Khelil et son équipe *Desulfocurvus vexinensis* isolé, à partir d'un puits qui a recueilli l'eau d'un aquifère salin profond utilisés pour le stockage souterrain de gaz naturel à une profondeur de 830 m dans le bassin de Paris, France (klouche et al., 2009)

1.2.2 Les sources thermales et hydrothermales

Les dorsales océaniques, lieu d'écartement des plaques et de formation de la croûte océanique, sont le siège d'une intense activité tectonique, volcanique et hydrothermale. Dans ces zones, l'eau de mer s'infiltre dans les fractures du plancher océanique et se réchauffe rapidement en approchant des chambres magmatiques. L'eau de mer ainsi chauffée, réagit fortement avec les roches traversées et se charge de minéraux variés. Plus chaude, donc plus légère, elle remonte et jaillit sur le fond à des températures pouvant atteindre plus de 400°C. Le mélange de ce fluide chaud et réduit avec l'eau de mer froide et oxygénée se traduit par des précipitations minérales qui forment des cheminées hydrothermales autour desquelles vit une faune luxuriante.

Les recherches seront centrées sur la microbiologie et l'écologie microbienne des environnements extrêmes. Les principaux biotopes explorés seront les sources hydrothermales

terrestres et marines. La recherche a démontré la présence des BSR (des bactéries sulfato-réductrices) dans des sources hydrothermales terrestres (SHT) colombiennes présentant des conditions physico-chimiques diverses en terme de température, pH et salinité et aussi la présence des *Desulfovibrio hydrothermalis* (bactérie d'origine abyssale) (Moura et al. 2006). Figure 1.



Figure 1 : Fumeur riche en hyperthermophile *Pyrococcus CH1* (Querellou, 2010)

1.2.3 Les milieux hyper-salins

Comment ces milieux peuvent-ils être considérés d'environnements extrêmes ?

Un environnement est considéré comme extrême quand la diversité est faible et que certains groupes taxonomiques sont absents. Ainsi, l'eau de mer n'est pas un environnement extrême, mais à partir d'une certaine salinité obtenue par concentration, les bactéries marines ne peuvent plus se développer et le milieu, sélectif pour les bactéries halophiles devient un environnement extrême.

Les environnements extrêmes ainsi formés constituent des sites pour l'évolution à long terme car ils permettent le développement de mécanismes complexes d'adaptation et de ce fait l'émergence d'organismes obligatoirement dépendants de ces milieux. Les milieux hyper-salins ont été formés depuis une longue période de l'histoire de la Terre.

Les bactéries halophiles se rencontrent dans deux domaines du monde vivant : Bacteria et Archaea. Dans le premier, on trouve surtout des bactéries halophiles faibles (marines) ou modérées et quelques halophiles extrêmes, limitées à quelques espèces de bactéries fermentaires strictes et photosynthétiques pourpres. Les bactéries halophiles extrêmes se

trouvent surtout dans le domaine Archaea ou elles représentent un groupe phylogénétique particulier au sein des Euryarchaeota. De nombreuses bactéries halophiles modérées ont été isolées de différents environnements hyper-salins. Des études de taxonomie ont montré qu'elles appartiennent à divers groupes bactériens communément rencontrés dans les environnements non salés. Parmi les bactéries hétérotrophes aérobies, les genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* et *Planococcus* sont les plus fréquemment identifiés. Mais, en plus, de nombreux isolats ne peuvent pas être caractérisés par rapport à des groupes existants, que ce soit par des études de physiologie ou de phylogénie. Ils devraient représenter des espèces ou des genres nouveaux qui seront vraisemblablement décrits prochainement. Ceci nous montre que les bactéries hétérotrophes aérobies halophiles modérées constituent un groupe très hétérogène d'un point de vue taxonomique. Les études phylogénétiques entreprises devraient permettre un réarrangement des groupes taxonomiques et ainsi mieux définir la position de ces bactéries qui est encore mal connue.

Ces études ont été mieux développées pour les bactéries anaérobies halophiles modérées. Ces dernières ont été en général isolées de milieux anoxiques hyper-salins comme les sédiments des marais salants ou des lacs salés, les sols hyper-salins ou les eaux salées souterraines.

Parmi ces bactéries, les plus isolées et étudiées sont les bactéries fermentaires strictes. Plusieurs d'entre-elles se trouvent dans des genres déjà décrits comme le genre *Clostridium*, qui comprend surtout des bactéries non halophiles. Ces dernières années, huit nouveaux genres ont été décrits et deux nouvelles familles (*Halobacteroidaceae* et *Haloanaerobiaceae*) ont été proposées. Une étude phylogénétique récente a montré qu'il s'agit de deux groupes phylogénétiques cohérents comprenant les genres suivants : *Haloicola*, *Haloanaerobium*, *Halobacteroides*, *Halocella*, *Halothermothrix*, *Sporohalobacter*, *Haloanaerobacter*, *Acetohalobium*. Ces bactéries vivent dans les milieux hyper-salins en fermentant principalement des sucres, mais certaines espèces sont capables d'utiliser des acides aminés ou leurs dérivés comme la glycine-bétaine.

D'autres bactéries anaérobies ont été isolées de milieux hyper-salins. Il s'agit des bactéries sulfato-réductrices (BSR) ; ce sont des halophiles modérées appartenant à quatre genres : *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* et *Desulfohalobium*. Ces bactéries vivent dans les sédiments et les sols hyper-salins ainsi que les eaux salées souterraines en utilisant des composés organiques simples issus du métabolisme des bactéries fermentaires et du

sulfate comme donneur d'électrons ; ce dernier est réduit en sulfure qui s'accumule dans le milieu anoxique. (Johanna ,2010).



Figure 4 : Mer morte, presque huit fois que les océans plus salée
275g/l de chlorure de sodiums <http://fr.wikipedia.org>

I.2.4 Les milieux pétroliers

Le pétrole se présente le plus souvent surmonté d'une couche d'hydrocarbures gazeux et se situe généralement au-dessus d'une couche d'eau salée : dans la partie huileuse du réservoir 80% du volume poreux est occupés par une eau de salinité variable ce qui constitue le milieu de croissance des micro-organismes.

Les découvertes faites dans l'UMR 180 en 2002-2003 dans le cadre de la microbiologie des environnements pétroliers confirment la présence de nouvelles populations de bactéries nitrato-réductrices dans les puits pétroliers qui pourraient intervenir au même titre que les bactéries sulfato-réductrices dans les processus de bio corrosion. La mise en évidence de bactéries capables d'utiliser le nitrate comme accepteur final d'électrons est donc significative d'un point de vue scientifique. et les puits pétrolier contiens aussi des *Archeoglobus Fulgidus* c'est un microorganisme hyper thermophile (75°-80°C) du domaine des *Archaea*. et *Thermotoga Maritima* représente une des branches les plus basses de l'arbre phylogénétique dans le domaine des Bacteria, présentent de grandes potentialités pour la synthèse d'hydrogène à partir de la matière organique qu'il sera utile de valoriser à court terme dans le cadre de la production "d'énergie propre. (Ollivier .2009).

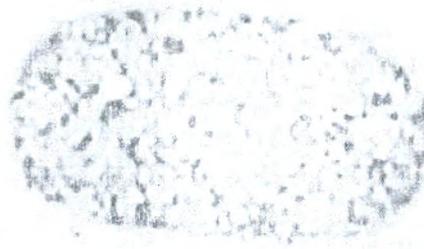


Figure3: *Thermotoga maritima*. (Ollivier .2009).

II. Les microorganismes extrêmophiles

Un extrémophile est un organisme vivant dans un milieu extrême. Qu'entend-on par milieu extrême ? A cette question simple, les réponses ont varié selon les époques. Il s'est agi tout d'abord de milieux hostiles à l'homme et où toute vie humaine paraissait impossible. Cette conception anthropocentrée a laissé place à une approche basée sur l'observation des formes de vie macroscopique. Puis, l'inventaire des formes de vie au cours de la seconde moitié du XX^e siècle a permis la découverte de micro-organismes vivant dans des milieux de plus en plus improbables et auparavant considérés comme stériles : Sources thermales, hydrothermales, lacs acides, alcalins, hyper-salés, sédiments marins profonds, réservoirs pétroliers, glaciers, etc. Ces découvertes ont progressivement reculé les limites physiques et chimiques connues de la vie sur terre. A l'heure actuelle, certaines limites ne sont toujours pas déterminées et les recherches se poursuivent afin de définir les limites de la biosphère. C'est le cas notamment pour les micro-organismes des sédiments profonds du plancher océanique (biosphère de subsurface) et pour les limites de la vie sous pression. Ces découvertes ont aussi conduit à réviser les hypothèses de vie sur d'autres planètes (exobiologie). (Johanna. 2010).

Les organismes vivant en milieux extrêmes et en particulier les micro-organismes ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans les conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. (Johanna. 2010)

II.1 Les différents extrêmophiles

II.1.1 Les halophiles :

Un **organisme halophile** (du grec *atos*, sel et *philein*, aimer) est un organisme qui s'accommode ou a besoin de fortes concentrations en sel dans son milieu pour vivre. Les organismes halophiles sont des extrémophiles appartenant aux domaines des Archaea ou des Bactéries.

Il existe différentes catégories de microorganismes halotolérants :

Les microorganismes **non-tolérants** sont ceux qui tolèrent seulement une faible concentration de NaCl (environ 1% poids/volume) : Les microorganismes **halotolérants faibles**, tolèrent jusqu'à 6-8%, les microorganismes **halotolérants modérés** tolèrent jusqu'à 18-20% et les microorganismes **halotolérants extrêmes** qui tolèrent des concentrations de sel qui varient de **zéro jusqu'à saturation** (*Tiquia, 2006*).

Toute fois, les microorganismes halophiles peuvent être regroupés de manière conventionnelle sur la base qu'ils exigent la présence du NaCl dans leur milieu pour leur croissance. Dans les écosystèmes marins, les microorganismes **faiblement halophile** peuvent croître à une concentration de 2-3% de NaCl les **halophiles modérés** croissent dans un intervalle plus large et élevé (5-20% poids/volume). Les **halophiles extrêmes**, y compris les *halobacteria* et les *halococci*, sont capable de croître sur milieux saturé de NaCl et incapable de croître sur une concentration de NaCl inférieure à 12% (*Yoshida, 1991*).

II.1.1.1 Adaptation osmotique des microorganismes halophiles

Il existe une diversité considérable dans les mécanismes utilisés par les microorganismes halophiles et halotolérants pour résister à la pression osmotique exercée par la très haute salinité de leur milieu. Puisque toutes les membranes biologiques sont perméable à l'eau, tous les microorganismes doivent maintenir leur cytoplasme au moins, en iso-osmose avec leur environnement. Dans tous les cas, les ions Na^+ sont exclus du cytoplasme autant que possible.

Il est à noter que tous les microorganismes halophiles contiennent des mécanismes de transport puissants, basés généralement sur les « antiporteur Na^+/H^+ » pour expulser les ions Na^+ du milieu intracellulaire.

Deux principales stratégies sont utilisées par différents groupes de microorganismes. Elles sont basées sur le principe de créer une haute pression osmotique dans le cytoplasme, tout en gardant une faible concentration en Na^+ (*Oren, 2002*).

La première stratégie est celle basée sur l'accumulation des ions K^+ et Cl^- pour maintenir l'équilibre de la balance osmotique. Ce mécanisme est utilisé par un nombre limité d'halophile.

Une deuxième stratégie basée sur une expulsion intensive des sels du cytoplasme et une accumulation de solutés organique afin de fournir et de soutenir la balance osmotique. Cette stratégie est largement utilisé dans le domaine *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*. Le soluté le plus utilisée dans le domaine Bacteria l'écotoïne (synthétisé par une large variété de microorganismes) et à un moindre degré la glycine betaine (synthétique, mais accumulés par beaucoup de bactéries hétérotrophes à partir du milieu). (AlZarba.,2002).

II.1.2 Les psychrophiles

Des scientifiques britanniques et américains ont découvert des bactéries capables de vivre à des températures inférieures à zéro degré, chose qui semblait impossible il y a peu.

Ils connaissaient déjà des bactéries dont le métabolisme se remet en marche même après plusieurs dizaines de milliers d'années de congélation mais il était admis que les conditions de froid extrême ne pouvaient permettre à des bactéries de se multiplier.

Ce type d'activité avait été détecté il y a peu sur l'île Alexander en Antarctique. Les chercheurs ont mis le doigt sur un nouvel habitat de ces étonnants microorganismes. C'est sur les îles désolées du Grand Nord canadien Cornwallis et Devon où aucune végétation ne pousse, qu'ils ont été découverts à l'intérieur même de la roche ! "*Nous ne nous attendions pas à trouver ce type de colonisation dans les régions polaires où la plupart des roches sont opaques à la lumière du soleil*", explique Charles Cocknell du Service géologique britannique. Si l'on ajoute à ce tableau, déjà peu propice à la vie, le fort bombardement de rayons ultraviolets, dû à la minceur de la couche d'ozone sous ces latitudes, on comprend la surprise des scientifiques.

La découverte de ces bactéries repousse encore les limites que l'on avait établies au développement de la vie. Il faut dire que depuis la découverte en 1977 de communautés microbiennes sur les parois des fumeurs des fonds marins, les microorganismes n'ont de cesse de nous surprendre en battant des records d'adaptabilité. Ces bactéries qui vivent dans des milieux autrefois considérés comme impropres à la vie sont dites extrémophiles. Outre la catégorie des psychrophiles, résistantes aux basses températures, on distingue les bactéries

thermophiles (adaptées aux fortes températures), les acidophiles (adaptées aux milieux très acides), les alcalophiles (adaptées aux milieux très basiques), les halophiles (adaptées aux fortes salinités), les barophiles (adaptées aux hautes pressions). D'autres encore présentent une forte résistance aux radiations (UV, radioactivité...).

Ces bactéries sont des trésors d'informations qui permettent aux scientifiques de nombreuses avancées aussi bien théoriques que pratiques. Certains microorganismes ou certaines enzymes qu'ils produisent peuvent remplacer des produits chimiques dans des procédés industriels tel que, par exemple, le blanchiment du papier, et ainsi réduire la production de déchets polluants. D'autres peuvent être utilisés comme nettoyeurs de sites grâce à leurs métabolismes transformant des produits toxiques en composés non nocifs (*FDLS .2004*).

II.1.3 Les thermophiles

Les thermophiles, sont un type d'organismes extrémophiles se développant dans les sources comme chaudes le Grand Prismatic Spring, au Parc national de Yellowstone

Des organismes extrémophiles peuvent par exemple être isolés de sources chaudes sulfureuses, de cheminées hydrothermales sous-marines, de sédiments, dans les glaces de l'Antarctique ou de l'Arctique, dans des eaux saturées en sel (lac ou Mer Morte), dans des gisements pétroliers...

Quelques êtres vivants, appelés polyextrémophiles, cumulent même plusieurs de ces résistances (exemple de ou de *Sulfolobus Acidocaldarius*).

Parfaitement adaptés à ces conditions très spéciales, les extrémophiles sont rares dans les conditions plus ordinaires. En effet, même lorsqu'ils sont capables de supporter ces conditions (car dans bien des cas leur métabolisme spécial nécessite les conditions extrêmes), ils supportent mal la concurrence d'organismes banals. Il arrive que l'on distingue extrémophilie et extrémotolérance, selon que l'organisme a besoin des conditions exceptionnelles, ou bien qu'il les supporte mais qu'on le trouve dans des conditions plus ordinaires. (*Perry et al. 2004*)

Il faut bien distinguer le cas des extrémophiles-vrais (qui vivent normalement ou exclusivement en conditions extrêmes), des cas relativement banals d'organismes capables de provisoirement prendre une **forme résistante** aux conditions défavorables (en suspendant leurs fonctions vitales, en se protégeant par la formation d'un kyste ou d'une spore). Certaines

bactéries comme *Deinococcus Radiodurans* sont capables de s'autoréparer en conditions extrêmes, mais ne les exigent pas pour vivre. (Perry et al. 2004)

II.2 Les propriétés d'extrémophiles

Le concept d'extrémophilie, à la différence de celui de résistance aux conditions extrêmes, implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adapté aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions. Pour autant chaque constituant cellulaire ne fonctionne pas nécessairement à l'optimum dans les conditions du milieu extérieur. Les cellules sont capables de contrôler jusqu'à un certain point les conditions intracellulaires pour certains paramètres. Comme l'osmolarité. De ce fait le pH intracellulaire de souches alcalophiles sera inférieur à celui du milieu extérieur et inversement pour les espèces acidophiles. En revanche, pour certains paramètres, comme la température, la pression, les conditions du milieu extérieur s'imposent aux cellules dans leur globalité, membrane, milieu intérieur et totalité des constituants cellulaires devront être non seulement stables dans ces conditions, mais surtout fonctionnelles. La stabilité de chacune des biomolécules prise isolément et testée dans les conditions du milieu extérieur n'est toute fois pas toujours requise, du fait que le milieu intérieur peut bénéficier de l'effet de certains solutés organiques. (Scriban, 1993)

II.3 Quelques microorganismes extrémophiles

II.3.1 Les Archéobactéries et leurs milieux extrêmes

Il existe sur Terre des micro-organismes qui sont capables de vivre dans des conditions extrêmes. Conditions que nous pensions pourtant incompatibles avec toute forme de vie possible, et pourtant elles y vivent et s'adaptent à merveille. Actuellement ils existent plus de 250 espèces d'archéobactéries, et l'éventaire est loin d'être terminé !

Les premiers micro-organismes extrêmes furent découverts dans les geysers d'eau chaude et sulfureuse du parc national de Yellowstone par le microbiologiste Thomas Brock en 1964-1965. Ces micro-organismes se développent à des températures comprises entre 50°C et 90°C. Ces sources chaudes se forment à proximité de volcans en activité à la suite d'infiltration d'eau de ruissellement dans les fissures et crevasses de la roche. Des archéobactéries ont été également retrouvées au cœur du continent Antarctique, enfouies sous plus de quatre kilomètres de glace. Ces conditions de froid extrême, rappellent un peu celles

qui existe près de la surface de la planète Mars ou encore d'Europe, l'un des nombreux satellites de Jupiter. Il y a aussi les oasis situées dans les profondeurs abyssales des océans et qui a été découverte en 1977 par une équipe de géologue Américain, abord du sous-marin Alvin à plus de 2500 mètres de profondeurs, sur la crête de la dorsale des Galápagos dans le pacifique. Sous des pressions colossales de plus de 200 bars (200 fois la pression atmosphérique qui est de 1 kg/cm²) des archéobactéries vives et se développent à des températures extrêmes de près de 120°C. Ces archéobactéries se développent au contact des fumeroles Noirs des sources chaudes hydrothermales au jet d'eau minéralisé et acide de plus de 350°C. En Afrique du Sud, on a retrouvé dans les plus profondes mines aurifères, des archéobactéries lithotrophes «mangeur de pierre» se développent dans une atmosphère composée de méthane (CH₃) et d'hydrogène. Le fer, le manganèse et le soufre leurs servent de repas. D'autre Archéobactérie ont été retrouvées dans des milieux très salée, comme la mer morte ou encore dans des milieux très acides. D'autres sont capables de résister au vide de l'espace et même de survivre à travers les circuits de refroidissement très radio actif de nos central ésonucléaires.(Harley,2007)

La découverte de ces archéobactéries «extrémophiles» au cours des années 1970 par Carl Woese (professeur à l'Université de l'Illinois à Urbana, Etats-Unis d'Amérique), effectuée à partir de ses recherches sur la phylogénie de l'ARN-ribosomiale 16S, a constitué une véritable révolution. Leur existence laisserait penser que la vie peut se développer dès qu'elle le peut à travers de multiples environnements extrêmes et très différents les uns des autres. Les probabilités de retrouver des milieux propices aux développements et à l'évolution de différentes formes de vie, est donc devenu de plus en plus grande et de plus en plus varié. La vie peut donc évoluer dans des milieux extrêmes et même et pourquoi pas, sur d'autre planète que la notre, que ce soit des planètes extrasolaires ou encore de la planète comme Mars, où de satellite naturel comme Europa, Ganymède pour Jupiter, et Encelade et Titan pour Saturne. L'archéobactérie ancestrale était de toute vraisemblance de type hyper thermophile, vivant près des différentes sources chaudes hydrothermales et des fumeurs noirs, soit dans les profondeurs Abyssales ou situées plus près de la surface de la planète. Les archéobactéries semblent être l'intermédiaires entre LUCA, qui représente l'ancêtre de toute les cellules vivantes sur terre, avec les autre type cellulaire procaryotique (bactérie) ou eucaryotique (cellule animal et végétal). Tout ce que ça prend, c'est de bonne condition environnementale qui favorise la synthèse et l'évolution des toutes première molécules pré organiques

(l'ammoniac NH_3 , le méthane CH_4 , l'eau H_2O , l'acide cyanogène HCN , le cyanoacétylène HC_5N , l'acétylène C_2H_2 , la formaldéhyde CH_2O et etc....) (*Harley.2007*)

II.3.2 Les caractéristiques des Archéobactéries

Les archéobactéries sont des procaryotes et présentent certaines caractéristiques bien différentes des bactéries (Eubactéries), ce qui les rapproche un peu des cellules eucaryotes animal et végétal. Bon nombre des archéobactéries vivent dans des milieux extrêmes. Les bactéries les plus extrémophiles, comme les halophiles, les hyper-thermophiles, les psychrophiles (résistante aux froids extrêmes) et les hyper-acidophiles, sont toutes des représentantes des archéobactéries, mais les archéobactérie ne sont pas toutes des extrémophiles. Les archéobactéries se développent de préférence dans des niches écologiques extrêmes, où les conditions de vie sont très difficiles ou impossibles pour la plupart des autres organismes vivants.

Les lipides membranaires des archéobactéries, sont sous formes de longues chaînes d'alcool isopréniques attachées au glycérol par des liaisons éther (R-O-R). Alors que les autres organismes fabriquent des lipides membranaires en assemblant deux chaînes d'acides gras avec une molécule de glycérol, effectué à partir d'une liaison ester (R-CO-OR). L'ARN-polymérase des archéobactéries est inhabituelle, beaucoup plus complexe que les ARN-polymérase des bactéries, et plus proches de celles des eucaryotes (*Wolfram Zillig. 2007*). Elles possèdent un chromosome circulaire de type bactérien, mais comportant des gènes en mosaïque (introns) similaires à ceux des eucaryotes. Elles font preuve d'une grande diversité de modes de reproduction, soit par fission binaire, bourgeonnement ou par fragmentation. (*Harley.2007*)

II.3.3 Les Bacillus

Le terme **Bacillus** désigne un genre de bactérie qui comprend différents bacilles aérobies à Gram positif.

Pour les spécialistes en bactériologie, Bacillus appartient à la famille des Bacillacées (Bacillaceae), à l'ordre des Bacillales (Bacillales), à la classe des Bacilles (Bacilli), au phylum des Firmicutes (Firmicutes).

Les bactéries qui appartiennent aux gens *Bacillus* possèdent la capacité de produire, synthétiser des spores c'est-à-dire des éléments ayant la forme d'une petite sphère dont la paroi est épaisse. Ces éléments vont leur permettre de résister à des conditions particulièrement difficiles telles qu'une température très élevée ou une déshydratation (absence d'eau).

Bacillus est aérobie ou aéro-anaérobie facultatif.

Bacillus Anthracis, est la seule espèce de Bacille pathogène (entraînant des maladies) pour l'animal et très rarement chez l'homme. Cela survient après une contamination accidentelle ou une contamination dans le cadre d'une guerre bactériologique. Elle est responsable de la maladie du charbon. (*Hany., 1975*)

Les autres espèces de *Bacillus* sont habituellement saprophytes c'est-à-dire qu'elles sont présentes dans l'organisme sans entraîner de pathologie (maladie). Néanmoins ces Bacilles sont susceptibles d'entraîner l'apparition de maladies chez les sujets affaiblis comme par exemple les individus présentant des problèmes de dépression immunitaire (baisse de défense naturelle de l'organisme) ou encore les malades admis en réanimation. (*Hany .1975*)

Certains *Bacillus* sont utilisés pour la fabrication des antibiotiques (*Bacillus subtilis*).

- *Bacillus Anthracis* (maladie du charbon) *Bacillus Licheniformis*.
- *Bacillus Megaterium* particulièrement fréquent dans la terre.
- *Bacillus Cereus* dont certaines souches entraîne l'apparition de pathologie.

Bacillus Mesentericus.

- *Bacillus Subtilis* présent dans le sol.
- *Bacillus Thuringiensis* nuisible en agriculture mais pouvant être utilisé pour les combattre.

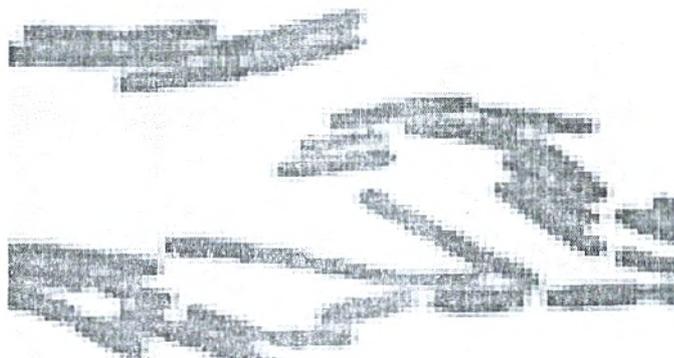


Figure 4 : aspect microscopique du genre *Bacillus Anthracis*(*Hany.1975*)

II.3.3.1. Nomenclature des rangs taxonomiques

1. Le domaine des eubactéries

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du domaine (ou empire) des bactéries ou eubactéries (ou Eubacteria) et du phylum (ou division) des Firmicutes (Euzéby, 2002) aussi dénommées bactéries à bas G+C% et à coloration de Gram positive (Larpen, 2000), ce qui correspond à une branche des eubactéries (voir figure 5).

2. Phylum des Firmicutes

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du phylum des Firmicutes.

La nomenclature phylogénique de certaines des bactéries à bas G+C% et à coloration de Gram positive.

3. La classe des Bacillus

Les Firmicutes comprennent cinq classes : les *Bacilli*, les *Clostridia*, les *Clostridia* non classées, la classe des *Mollicutes* et la classe des *Thermolithobacteria* (Euzéby, 2002).

Les Bacilli comprennent deux ordres, l'ordre des Bacillales et l'ordre des Lactobacillales.

4. L'ordre des Bacillales

L'ordre des Bacillales comprend une dizaine de familles, comme on peut le lire dans le tableau 1.

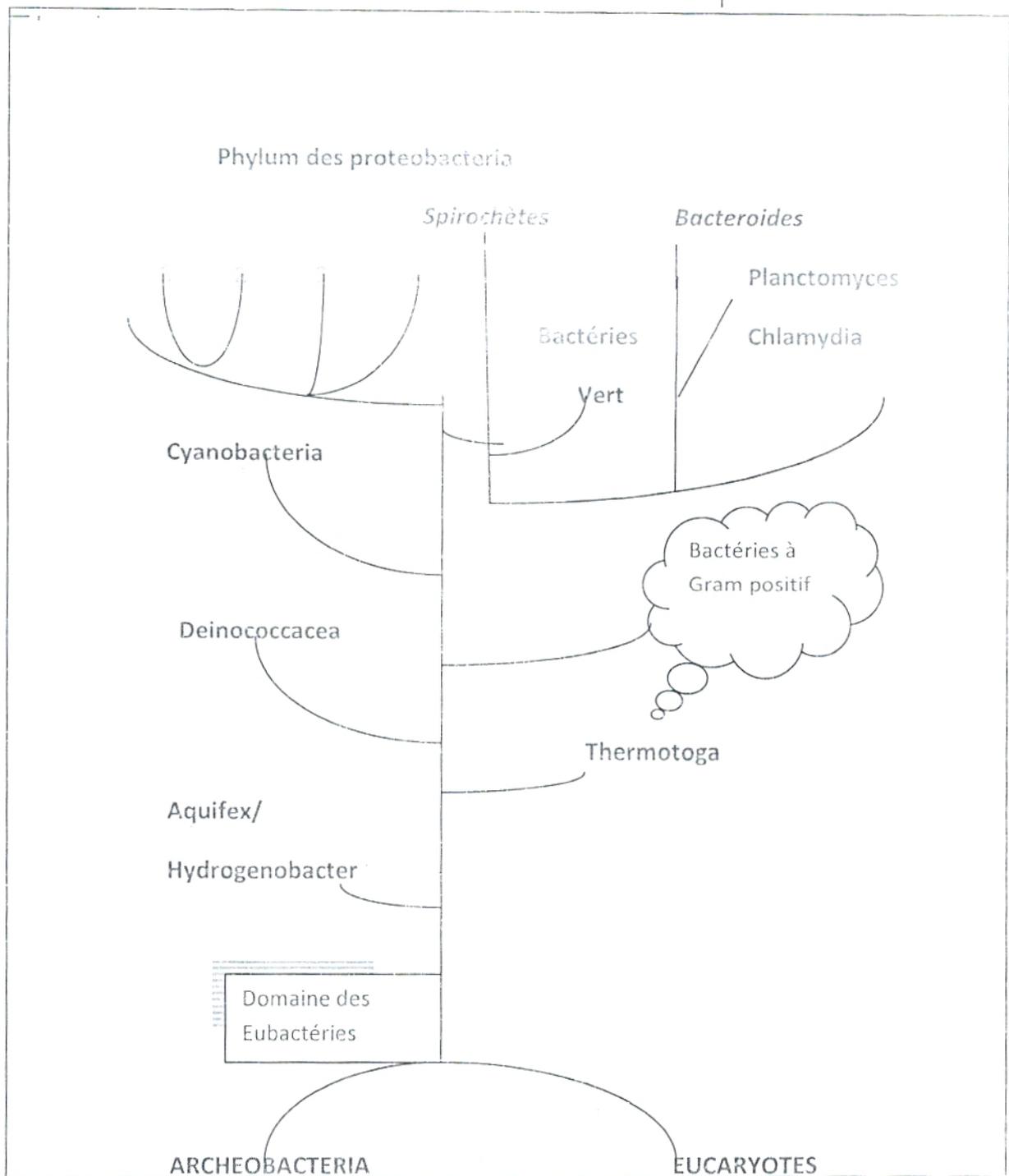


FIGURE 1. Représentation schématique du domaine des eubactéries d'après (Larpent. 2000)

Tableau n°1. Composition de l'ordre des Bacillales d'après (Euzeby, 2002 ; Larpent, 2000).

<p>Famille des bacillaceae</p> <p>Alkalibacillus Oceanobacillus Amphibacillus Ornithinibacillus Anoxybacillus Paraliobacillus Bacillus Paucisalibacillus Caldalkalibacillus Pelagibacillus Cerasibacillus Piscibacillus Filobacillus Saccharococcus Geobacillus Salibacillus Gracilibacillus Salinibacillus Halalkalibacillus Slirhabdus Halobacillus Tenuibacillus Halolactibacillus Terribacillus Jeotgalibacillus Thalassobacillus Lentibacillus Ureibacillus Lysinibacillus Virgibacillus Marinibacillus Vulcanibacillus</p>		<p>Famille des Planococcaceae</p> <p>Filibacter Kurthia Planococcus Planomicrobium Sporosarcina Famille des « Staphylococcaceae » Gemella Jeotgalicoccus Macrooccus Salinicoccus Staphylococcus</p>	<p>Famille des Thermoactinomycetaceae</p> <p>Laceyella Mechercharimyces Planifilum Seinonella Thermoactinomyces Thermoflavimicrobium</p>
<p>Famille des Caryophanaceae</p> <p>Caryophanon</p>	<p>Famille des Alicyclobacillaceae</p> <p>Alicyclobacillus Pasteuria Sulfobacillus</p>	<p>Famille des « Paenibacillaceae »</p> <p>Ammoniphilus Aneurinibacillus Brevibacillus Cohnella Oxalophagus Paenibacillus Thermicanus Thermobacillus</p>	<p>Famille des Thermoactinomycetaceae</p> <p>Lceyella Mechercharimyces Planifulum Seinonella Thermoactinomyces</p>
<p>Famille des « Listeriaceae »</p> <p>Brochothrix Listeria</p>	<p>Non classées *</p> <p>Pullulanibacillus</p>	<p>Famille des « Turicibacteraceae »</p> <p>Turicibacter</p>	<p>Famille des « Sporolactobacillaceae »</p> <p>Marinococcus Sinococcus Sporolactobacillus Tuberibacillus.</p>

Tableau n° 2 : Taxons de la famille des Bacillaceae exclus du genre *Bacillus* (L'arpent, 2000).

Ancienne dénomination	Nouvelle dénomination
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
<i>Bacillus acidoterrestris</i>	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
<i>Bacillus agri</i>	<i>Brevibacillus agri</i>
<i>Bacillus alginolyticus</i>	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>
<i>Bacillus aneurinolyticus</i>	<i>Aneurinibacillus aneurinolyticus</i>
<i>Bacillus azotofixans</i>	<i>Paenibacillus azotoans</i>
<i>Bacillus bortelensis</i>	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>
<i>Bacillus centrosporus</i>	<i>Brevibacillus centrosporus</i>
<i>Bacillus chondroitinus</i>	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>
<i>Bacillus choshinensis</i>	<i>Brevibacillus choshinensis</i>
<i>Bacillus cycloheptanicus</i>	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>

5. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène.

L'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par la grande variété des places écologiques que les nombreuses espèces occupent, et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques.

Ce sont des Bacilles à coloration de Gram positive, ou à coloration de Gram variable.

Les dimensions des cellules végétatives vont de 0.5 µm par 1.2 µm à 2.5 µm par 10 µm de diamètre.

Ce sont des bactéries sporulées (*Drobniewski, 1993*).

La teneur en G+C de l'ADN des espèces peut varier de 32 à 69 %, ce qui est beaucoup plus large que ce que l'on considère comme raisonnable pour la définition d'un genre (TSCA, 1997). Beaucoup d'espèces peuvent en fait être classées dans différents groupes taxonomiques

(*Drobniewski, 1993*) Les taxons du genre *Bacillus* sont présentés dans le tableau 3 (*L'arpent, 2000*).

Tableau n°3. Taxons de la famille des Bacillaceae appartenant au genre *Bacillus* (Larpent, 2000)

<i>Bacillus agaradhaerens</i>	<i>Bacillus lentus</i>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus marinus</i> (ex- <i>Bacillus globisporus</i> subsp. <i>Marinus</i>)
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus marismorttii</i>
<i>Bacillus atropheus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus azotoformans</i>	<i>Bacillus methanolicus</i>
<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus moiavensis</i>
<i>Bacillus benzoovorans</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>Bacillus carboniphilus</i>	<i>Bacillus naganoensis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus niacini</i>
<i>Bacillus chinensis</i>	<i>Bacillus oleronius</i>
<i>Bacillus chitinolyticus</i>	<i>Bacillus pallidus</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus pasteurii</i>
<i>Bacillus clarkii</i>	<i>Bacillus popilliae</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus pseudocaliphilus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus pseudofirmus</i>
<i>Bacillus cohnii</i>	<i>Bacillus pseudomycoides</i>
<i>Bacillus curdlanolyticus</i>	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>
<i>Bacillus dipsosauri</i>	<i>Bacillus pulvifaciens</i>
<i>Bacillus ehimensis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus fastidiosus</i>	<i>Bacillus schlegelii</i>
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Bacillus silvestris</i>
<i>Bacillus flexus</i>	<i>Bacillus simplex</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus smithii</i>
<i>Bacillus galactophilus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
<i>Bacillus gibsonii</i>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus glucanolyticus</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>
<i>Bacillus halmapatius</i>	<i>Bacillus thermocatentilatus</i>
<i>Bacillus haloalkaliphilus</i>	<i>Bacillus thermocloacae</i>
<i>Bacillus halodenitrificans</i>	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Bacillus thermoleovorans</i>
<i>Bacillus horikoshii</i>	<i>Bacillus thermosphaericus</i>
<i>Bacillus infernus</i>	<i>Bacillus thermoruber</i>
<i>Bacillus insolitus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bacillus kaustophilus</i>	<i>Bacillus tusciae</i>

III. Intérêt biotechnologique des extrémophiles

Les extrémophiles représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie. Les travaux de recherche sur les extrémophiles sont pour une grande part motivés par les applications biotechnologiques déjà acquises et par cellules susceptibles de reposer sur des biomolécules aux propriétés nouvelles pouvant déboucher sur le développement de nouveaux produits. En raison des pratiques en vigueur dans les laboratoires de recherche et dans l'industrie, il est souvent difficile de documenter les chemins ayant conduit de la source (extrémophile) à un possible d'aborder ce chapitre sous plusieurs angles :

- ✓ Par groupe d'extrémophiles
- ✓ Par type d'application industrielle
- ✓ Par grandes familles d'enzymes et de produits. (*Theilleux et al. 1993*)

III.1 Intérêt biotechnologique des halophiles

Les microorganismes halophiles avaient trouvé plusieurs applications en biotechnologie. Certaines de ces applications existent depuis des siècles, avant même la compréhension des processus microbiens.

Dans les années récentes, le nombre des microorganismes halophiles utilisés en biotechnologie avait augmenté et des applications nouvelles sont en voie de développement.

L'utilisation des halophiles en biotechnologie peut être divisé en trois catégories (*Oren, 2002*) :

Première catégorie : l'halo-tolérance de plusieurs enzymes, extraites de microorganismes halophiles, peut être exploitée chaque fois que les transformations enzymatiques requièrent une faible activité d'eau : c'est le cas d'un milieu à concentration élevée en sel.

Deuxième catégorie : Certains stabilisateurs osmotiques organiques présentent des applications intéressantes (éctoïne et hydroxéclorine).

Troisième catégorie : Certains microorganismes halophiles peuvent produire des composés de valeur, le plus souvent sans aucune connexion directe avec leur propriétés halophiles. Mais les halophiles peuvent présenter des avantages distinctifs pour le développement de processus biotechnologiques de production.

De nombreux genres, notamment *Bacillus*, produisent d'importants antibiotiques commercialisés et une collection d'autres métabolites secondaires. Ces derniers incluent les alcools aliphatique, les lactones, les sulphides biogéniques, les cétones, les esters, les thioesters, les furanes, isoprénoides. Leurs applications ont été rapidement reconnues à cause de leur utilisation dans le domaine de recherche en tant qu'antibiotique, enzymes, inhibiteurs d'enzymes et autre composés utilisés dans le domaine pharmaceutique (Zaitlin et al. 2006)

III.2 Utilisation de cellules entières d'archeae en biotechnologie

L'une des premières applications possibles est la biolixiviation, utilisée essentiellement pour concentrer les métaux (cuivre, or et uranium) lorsque les concentrations initiales de minerai sont faibles et les procédés chimiques conventionnels non rentables. Cette approche, développée en Afrique du Sud, au Brésil et en Australie, fait en général appel à des cultures de bactéries mésophiles des genres *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus* et *Leptospirillum*. Toutefois, différents travaux ont mis en évidence l'intérêt des archées *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Sulfolobus* et *Metallosphaera*. Bien qu'inadaptées à des traitements en milieu ouvert, ces espèces hyper-thermophiles et thermoacidophiles satisfont aux exigences de fonctionnement à haute température en réacteurs contrôlés pour le traitement de certains minerais comme la chalcopyrite ou la pyrite.

Un second type d'application est directement lié aux caractéristiques de certaines archées halophiles extrêmes. Seules espèces vivantes capables de se développer dans des saumures proches de la saturation, elles sont aussi les seules aptes à être utilisées en bioremédiation en cas de contamination par divers produits chimiques, métaux lourds, radionucléides ou composés halogénés. Ainsi, *Haloferax Mediterranei* est capable d'utiliser le pétrole brut, *Halobacterium* Sp (Querellou. 2010)

III.3 Utilisation des *Bacillus* en biotechnologie

Certaines bactéries sont capables d'orienter leur développement non pas vers une division cellulaire mais vers une différenciation cellulaire. Cette différenciation se déclenche très souvent en fin de croissance exponentielle et au début de la phase stationnaire. Les bactéries susceptibles de produire des endospores sont *Bacillus*.

Le passage de la forme végétative à la spore se traduit physiologiquement par l'excrétion d'antibiotique, d'exoprotéases et par « turn-over » protéique et ribonucléique important. Au

stade 2 apparaît l'alanine déshydrogénase. Le stade 3 se caractérise par la synthèse d'enzymes résistantes à la chaleur.

Les différentes étapes de la sporulation sont données en heures.

Le stade 0 correspond à la fin de la phase logarithmique de croissance. Le stade 1 se caractérise par un remaniement de l'ADN (filament central). Cette période se caractérise par l'excrétion chez certains *Bacillus* d'antibiotiques, de sérine-protéases et par une charge énergétique cellulaire importante avec augmentation des enzymes impliqués dans la production d'énergie et la synthèse ATP (Leveau *et al.* 1993).

III.3.1 Les souches de *Lactobacilles thermophiles* utilisés dans l'industrie Plaitière

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H_2O_2) et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices. De nombreuses possibilités d'utilisation ont été envisagées, pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique et de la médecine. Ces nouvelles substances naturelles produites par des souches bactériennes universellement reconnues d'usage alimentaire dirigées contre des germes pathogènes pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours du processus de fabrication, permettant ainsi de diminuer le nombre d'intoxications alimentaires et d'augmenter la durée de conservation et de commercialisation. Par exemple, la nisine produite par la souche *Lactococcus Lactis*, est autorisée et utilisée à cet effet dans certains aliments. (JACK.1995).

III.3.2 Production des bios insecticides par *Bacillus thuringiensis*

Bacillus Thuringiensis est une bactérie entomopathogène de grand intérêt, capable de produire une panoplie de protéines ayant des propriétés bio insecticides dont les protéines Cry et les protéines VIP (Végétative Insecticidal Proteins) de types 1, 2 et 3. Les gènes *vip1* et *vip2*

codent deux protéines binaires actives sur les coléoptères, alors que *vip3* code une protéine active sur les lépidoptères. (Dabbeche, 2009)

III.3.3 Production des bactériocines par les *Bacillus*

La production de substances bactériocines ou bactériocines-like est aussi décrite pour *Bacillus Cereus*, *Bacillus Thuringiensis*, *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Stearothermophilus*, *Bacillus Megaterium* et autres espèces de *Bacillus* (Tagg et al. 1976).

Malgré l'importance que joue le genre *Bacillus* dans de nombreux domaines tels que la biotechnologie et l'agriculture, la recherche de métabolites antibactériens où bactériocines reste limitée pour ce genre. Les bactériocines les mieux étudiées sont la subtiline produite par *Bacillus Subtilis* ATCC 6633 (Klein et al. 1993) et la coaguline secrétée par *Bacillus coagulans* I (Hyronimus et al. 1998). D'autres espèces bactériocinogéniques sont décrites pour ce genre dont on peut citer *Bacillus Licheniformis* qui produit la bacillocine 490 (Martirani et al. 2002), *Bacillus Polyfermenticus* produisant la polyfermenticine SCD (Lee et al. 2001) et *Bacillus Sp.* qui secrète la mersacidine (Brötz et al. 1998). Concernant *Bacillus Thuringiensis* et *Bacillus Cereus*, neuf bactériocines sont actuellement caractérisées. Cependant, ces bactériocines ne sont pas totalement caractérisées

III.3.4 Production des antibiotique ituriniques

Les antibiotiques ituriniques sont des lipopeptides cycliques produits par *Bacillus Subtilis*. Ils sont constitués de 7 acides aminés et d'un acide gras bêta-aminé. Ils sont synthétisés en même temps qu'un autre peptidolipide cyclique: la surfactine. Bien que les antibiotiques ituriniques soient des composés faiblement immunogènes, des anticorps anti-antibiotique ont pu être obtenus. Leur spécificité a été étudiés ; ils reconnaissent de la même façon tous les antibiotiques ituriniques mais ne reconnaissent pas la surfactine. Deux mutants ne produisant plus d'iturine ont été isolés après traitement UV. L'un est certainement muté au niveau de la régulation de la biosynthèse, l'autre est muté au niveau de la biosynthèse de la partie peptidique de l'antibiotique. Les deux mutations n'affectent ni la sporulation des bacilles, ni la synthèse de surfactine. Les antibiotiques ont une voie de biosynthèse originale. Il s'agit d'un processus non-ribosomique faisant intervenir un complexe multienzymatique. L'étude de la biosynthèse de l'iturine a permis d'isoler et de caractériser une des sous-unités du complexe qui active spécifiquement la L-sérine, acide aminé constitutif de l'iturine. L'étude génétique de la biosynthèse a été entreprise. Une sonde dégénérée a été obtenue à partir d'homologie de

séquences des gènes de biosynthèse d'autres antibiotiques peptidiques. L'hybridation de cette sonde sur des digestions du DNA génomique de *Bacillus Subtilis* a mis en évidence plusieurs fragments intéressants. (Larpen *et al.* 1997).

III.3.5 Productions des protéases

Parmi les protéases produites par *Bacillus*, ce sont les protéases alcalines qui sont le plus utilisées en industrie (Fogarty *et al.* 1974).

Ces protéases à sérines sont actives et dotées d'une grande stabilité au pH alcalin. Les protéases neutres ou métallo protéases sont par contre de stabilité très précaire et nécessitent des ions calcium (MALEK, 1995).

Cependant, c'est à cette catégorie d'enzymes qu'appartiennent les thermo lysines : enzyme hautement résistantes à l'inactivation thermique et produites par les *Bacillus Thermopyles* : *Bacillus Thermoproteolyticus* et *Bacillus Sterothermophilus* (MALEK, 1995).

L'application industrielle des protéases de *Bacillus* couvre les secteurs industriels les plus divers. Elles sont appréciées aussi bien par l'industrie fine (pharmaceutique) que les industries plus grossières (tannage de cuir).

En plus de la production de protéases et d'une large variété d'autres enzymes extracellulaires. Les *Bacillus* produisent des antibiotiques et de protéines comme le montre le tableau n° 4.

Tableau n°4 : Quelques enzymes et antibiotiques synthétisés par Bacillus (LARPENT et al1997)

Les espèces de Bacillus	Antibiotiques	Les espèces de bacillus	Enzymes
B. subtilis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Subtilisine ➤ Surfactine ➤ Bacillomycine F 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ B.licheniformis ➤ B.amyloliquefancien ➤ B.treorothermophilus ➤ B.coagulans 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Amylase ➤ Amylase produisant maltose isomerase
B.brevis	Gromidine Thyroidine	<ul style="list-style-type: none"> ➤ B.Amylologiquefanciens ➤ B.circulans ➤ B.subtilis 	B GLUCONASE
B.Lichiniformis	Bacitracine proticine	<ul style="list-style-type: none"> ➤ B.lichiniformis ➤ B.alcalophile 	Protéase alcaline
B.polymixa	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Polymyscine ➤ Colistine 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ B.amylologiquefanciens ➤ B.thermoproteoliticus 	Protéases neutres
B.thiominolyticus	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Octophytine ➤ Baciphelacine 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ B.Acidopulluliticus ➤ B.Megaterium 	Pullunase Pénicilline amidase
B.cereus	Biocérine céresune	<ul style="list-style-type: none"> ➤ B.Alcalophilus 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cellulase ➤ Lipase ➤ Serine protéase

III.3.6 Production des insecticides par des *Bacillus*

Bacillus Thuringiensis est le principal insecticide biologique commercialisé à grande échelle. Cette bactérie au moment de la sporulation produit une protéine, codée par un plasmide, soluble dans la cavité digestive des insectes dont le pH est alcalin. Des protéases transforment cette protoxine en petites molécules toxiques actives. Le sérotype *Israelensis* est toxique pour les moustiques (par ordre décroissant d'efficacité *Aedes*, *Culex* et *Anopheles*). Dans l'avenir, d'autres espèces pourront être utilisées, telles que *B.Sphaericus* (Sérotype H5a et H5b), H6 et H2- sont actifs contre les moustiques et par ordre décroissant d'activité sur *Culex*, *Anophèles* mais pas sur *Aedes*. *B.popilliae* est actif contre le hanneton. La toxine de *B.Thuringiensis* est composée de quatre protéines de 135, 128,72 et 28 kDa. *Bacillus Sphaericus* produit 4 protéines toxiques de 125, 110,63 et 43 kDa.

Pour la fabrication d'insecticides, c'est la souche *Kurstaki* qui est principalement utilisée (HD-et HD12) ainsi que *Aizawai*, *Israelensis*, *worrisoni*, *Tenebreonis* et *Sandiego*.

Un des gènes responsable de la synthèse de la toxine a été transféré dans la plante de tabac, puis dans la tomate, la pomme de terre, et le maïs rendant ces plantes résistantes aux insectes.

Les gènes codant la toxine de *Bacillus Thuringiensis* sérotype *Israelensis* ont été clonés et exprimés dans les cyanobactéries servant d'aliments pour les larves de moustiques (*Leveau et al.1993*).

I. Définition de sebkha

Géographie lac temporaire qui se couvre d'efflorescences salines après évaporation et qui occupe une dépression dans une région désertique des sebkhas en bordure de désert. (*Dictionnaire Encarta 2009*)

I.1 Situation géographiques

El-Goléa dite actuellement El-Menia, s'étend sur une superficie de 49 000Km². C'est une oasis rattachée à la wilaya de Ghardaïa, se trouvant à mi - chemin sur l'axe routier "Alger - Tamanrasset". Elle est composée de deux communes El-Menia et Hassi Gara. Elle occupe un couloir entre la falaise (Battent) et les dunes de l'erg occidental, couloir qui correspondrait au prolongement de l'oued - Segueur provenant de l'Atlas saharien.

L'oasis est établie sur une mince couche alluviale repassant sur les terrains du crétacé inférieur et dispose des ressources hydriques relativement importantes (BELERAGUEB1996)

I.2 Cordonnées géographiques

Il se trouve dans une altitude de 397 m avec une longitude de 2°87" Est et une latitude de 30°57" Nord

I.3 Limites géographiques

El-Goléa se trouve presque dans le centre d'Algérie, au Nord sebkha de m'Zab, au sud plateau de Tademaït, à l'Est Hamada de Ouargla et à l'Ouest l'erg-occidental.

Numerisée par: elgolea.dzblog.com

Figure 6 : Position géographique d'El-Goléa (Encarta 2004)

I.4 Relief

L'allure générale des terrains est caractérisée par une faible pente du Nord (amont) vers le Sud (aval) (BELERAGUEB, 1996).

I.5 Données climatiques

La région saharienne se caractérise par un climat de type aride avec de fortes amplitudes entre le jour et la nuit et entre l'été et l'hiver. L'oasis d'El-Goléa est définie comme zone

désertique où l'évaporation potentielle excède toujours la précipitation ; elle est caractérisée par son "hiver" rigoureux et froid et son "été" sec et chaud (BELERAGUEB, 1996).

Température.

Les températures sont très élevées pouvant dépasser les 40°C. L'aridité est accentuée par des vents de sable parfois violents.

L'analyse des données pris à la station météo d'El-Menia montrent que le mois le plus froid est décembre avec une température moyenne de l'ordre de 11.25°C, et le mois le plus chaud est juillet avec 62.25°C.

La présence des gelées peut être observée, parfois, en décembre et janvier.

Précipitations.

Les précipitations sont rares et irrégulières. La moyenne annuelle sur 10 ans (1996- 2006) est de 62.77 mm.

Les vents.

Il est à noter que dans nos régions sahariennes, les vents sont inévitables, le vent Nord- Est le plus dominant, il intervient habituellement au mois de février et se poursuit jusqu'à la fin Avril. Ainsi le sirocco provoqué par le vent Sud-est survient en été et ces vents Nord- Est et Sud - Ouest posent particulièrement des problèmes.

Humidité relative de l'air.

Dans le Sahara, la moyenne des humidités est rarement supérieure à 65% et peut descendre au dessous de 30%. Sur un intervalle de dix années, la moyenne des humidités la plus élevée est enregistrée au mois de janvier avec 49.6% et la plus faible au mois de août avec un taux de 2.3%.

L'évaporation.

L'évapotranspiration est en fonction d'autres éléments climatiques (T° , insolation, vitesse du vent) et compte tenu de la pluviométrie et l'humidité de l'air très basse.

L'évapotranspiration ne peut être que forte. Elle est de l'ordre 198 mm/an (BELERAGUEB, 1996).

Insolation.

Il ressort de ce tableau que la région d'El-Menia est caractérisée par une forte insolation,

le minimum est enregistré au mois de novembre avec 187 heures et le maximum au mois juin avec 277.5 heures.

1.6 Les données hydrogéologiques

Les caractéristiques du climat montrent que les précipitations sont très faibles pour provoquer l'écoulement ; l'oasis doit son eau des nappes souterraines à travers des puits et des forages (BELERAGUEB, 1996).

1.6.1. Le continental intercalaire ou nappe albiennne :

Elle est très importante et qualifiée de grand appareil hydraulique du Sahara (SAVORAIN, 1947).

Ascendant et jaillissant suivant les points d'eau de l'oasis, les eaux des forages correspondent à cette nappe profonde BAHMANI (1987).

1.6.2. Nappe phréatique

C'est une nappe superficielle, se trouvant dans les formations du quaternaire ; circule dans les sables et alluvions de (l'oued Seggeur) dans la vallée au sont implantées les palmeraies d'ElMenia. La nappe bénéficie surtout des infiltrations provenant de la nappe albiennne, soit des eaux de ruissellement (BELERAGUEB, 1996).

Selon BAHMANI (1987) la nappe est à 1,40 m de l'oasis, elle monte progressivement vers le sud à des profondeurs inférieures à 1 m.

I.7. Les données édaphiques :

I.7.1. Sol des régions sahariennes

Les sols peuvent être classés grossièrement en trois groupes :

Les sols désertiques (regs) : sols sablonneux et graveleux.

Les sols limono-argileux : terrasses des vallées

Les sols salés (halomorphe), sebkha,...

Généralement les sols sahariens ont une texture sablo limoneuse avec une faible teneur en phosphore, azote et oligo-éléments. Les sols sont aussi caractérisée par un pH élevé qui réduit la disponibilité des oligo-éléments et un taux de calcaire total élevé ayant un effet négatif sur l'assimilation du phosphore, potassium et l'azote par la plante au niveau du sol. On note aussi une faible teneur en matière organique d'où une faible capacité d'échange cationique (<5 méq/100g du sol) (BELERAGUEB, 1996).

I.7.2. Sol de la région d'El-Goléa

Selon BELERAGUEB (1996) ; En dehors de la palmeraie, sur les plateaux, l'érosion éolienne a découpé les éléments fins, ne laissant en surface que les éléments grossiers (reg). Au niveau de la plaine alluviale (palmeraie), les apports sont assez homogènes et caractérisés par une granulométrie assez grossière : sable fins, sable fins légèrement limoneux. En profond la variabilité est plus grande, on observe des niveaux granulo-caillouteux et des niveaux argileux.

1. Matériels biologiques

❖ Origine de la Souche

La souche utilisée est probablement un *Bacillus* nommée pk1, elle a été isolée par Dr Khelil à partir des eaux de sebkha d'El Goléa (W. Gardaya) du site I. Elle a été sélectionnée en raison de son pouvoir antimicrobien (Klouche, Khelil, 1998).

Le site I se caractérise par :

- Début du lac, proche de la ville (peu de sel)
- Égouts, riche en matière organique
- Arbuste, plantes, animaux
- Mare stagnante, vase noirâtre
- Ph=7
- Profondeur 10 à 50 cm
- Couleur : trouble avec des suspensions verdâtres

❖ Milieux de culture

Pour la revivification de la souche : **eau peptonée**

Pour la croissance de la souche d'intérêt : **Gélose nutritive**

Milieu de la sélection de la souche : **Milieu Mossel**

Pour tester le pouvoir antimicrobien : **Mueller Hinton, Bouillon nutritif.**

Pour les germes cibles : **Glose inclinée**

2. Méthode de travail

2.1 Revivification de la souche

La souche a été conservée à -80°C puis à 4°C

Dans 5 tubes à essai contenant 7 ml de l'eau peptonée, 1ml de la souche pk1 est additionnée au milieu à l'aide d'une micropipette. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 48h.

Matériels et méthodes

2.2 Purification

Afin d'obtenir une souche pure, les différents tubes d'eau peptonéeensemencés par la pk1 sont repiqués etensemencés par la méthode d'épuisement dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubés à 30C° Pendant 24h. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquages possibles, pour conserver la stabilité génétique de la souche. (Holt,1994)

Et pour s'assurer de la pureté de cette souche, elle estensemencée sur un milieu sélectif (le milieu Mossel). Voir figure 1

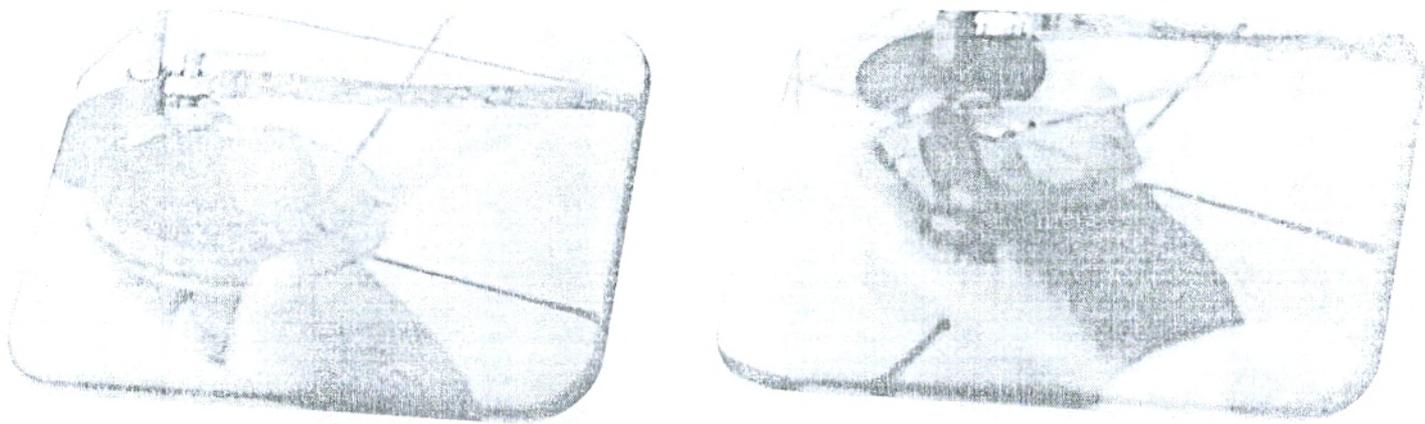


Figure 1: Ensemencement de la souche pk1 sur milieu Mossel

2.3 Identification de la souche pk1 jusqu'au genre

2.3.1Caractères morphologiques

L'étude des caractères morphologiques est réalisée par les examens microscopiques suivants :

- L'état frais
- La coloration de Gram



1. L'état frais

Ce test permet d'observer :

- La morphologie.
- La taille.
- Le mode de groupement des bactéries
- La mobilité
- Présence éventuelle de spore

➤ La technique

Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame.

Prélever une fraction de colonies sur gélose, de préférence a bords de celle-ci (ou prélever une petite goutte de bouillon). Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum

Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air.

2. La coloration de Gram :

La coloration de Gram permet de mettre en évidence la différence de structure pariétale entre deux grands groupes bactériens, bactérie Gram positif, bactérie Gram négatif.

La technique est représentée dans la figure2.

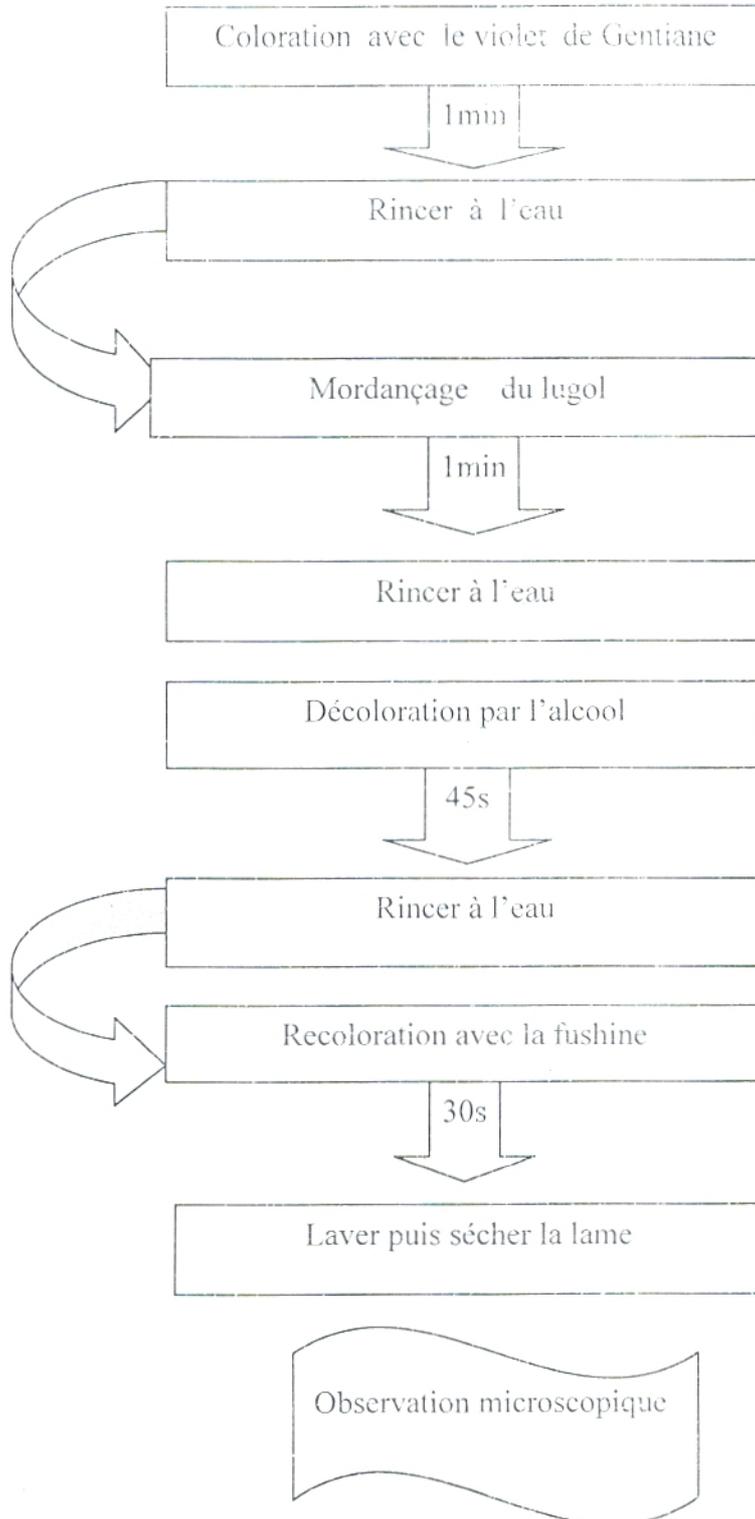


Figure 2 : la technique de la coloration de Gram (Gram et al.,1889).

Matériels et méthodes

. Test d'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.

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une colonie est déposée sur des disques imprégnés du réactif oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine de couleur rose. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive. (Joffin et Leyral., 2005)

. Test de mobilité

Ce test permet de déterminer si une bactérie est mobile ou non

- ✓ A l'aide d'une aiguille stérile, retirer une partie de colonie isolée suspecte provenant d'une culture de 24h.
- ✓ Inoculer le tube de mobilité en enfonçant soigneusement l'aiguille à une profondeur de 3 à 4 cm.
- ✓ Retirer l'aiguille tout droite, de façon à ne voir qu'une seule ligne d'inoculum
- ✓ Laisser incuber pendant 24h à 30C°.

Les organismes non mobiles, ne formeront qu'une seule ligne, par contre les organismes mobiles formeront une zone diffuse de croissance autour de la ligne d'inoculation. (Freney et al.,2007)

2.4. Activité antimicrobienne :

Afin de déterminer si la souche pk1 a un pouvoir antimicrobien contre des germes pathogènes cible nous avons réalisé deux techniques différentes :

1. méthode de diffusion par disques d'agar (Vardar-Unlu et al., 2003)

La méthode de diffusion sur gélose est utilisée pour le dépistage (screening) des activités antimicrobiennes de la souche étudiée. Les disques d'agar (5mm de diamètre) sont déposés dans des boîtes de Pétries contenant de la gélose Mueller Hinton déjà ensemencée. Après incubation à 30C° pendant 24h.

Les diamètres des zones d'inhibition (IZ) sont alors mesurés en millimètre (Mayachiew et al.,2008).

La méthode est représentée dans la figure 4

Matériels et méthodes

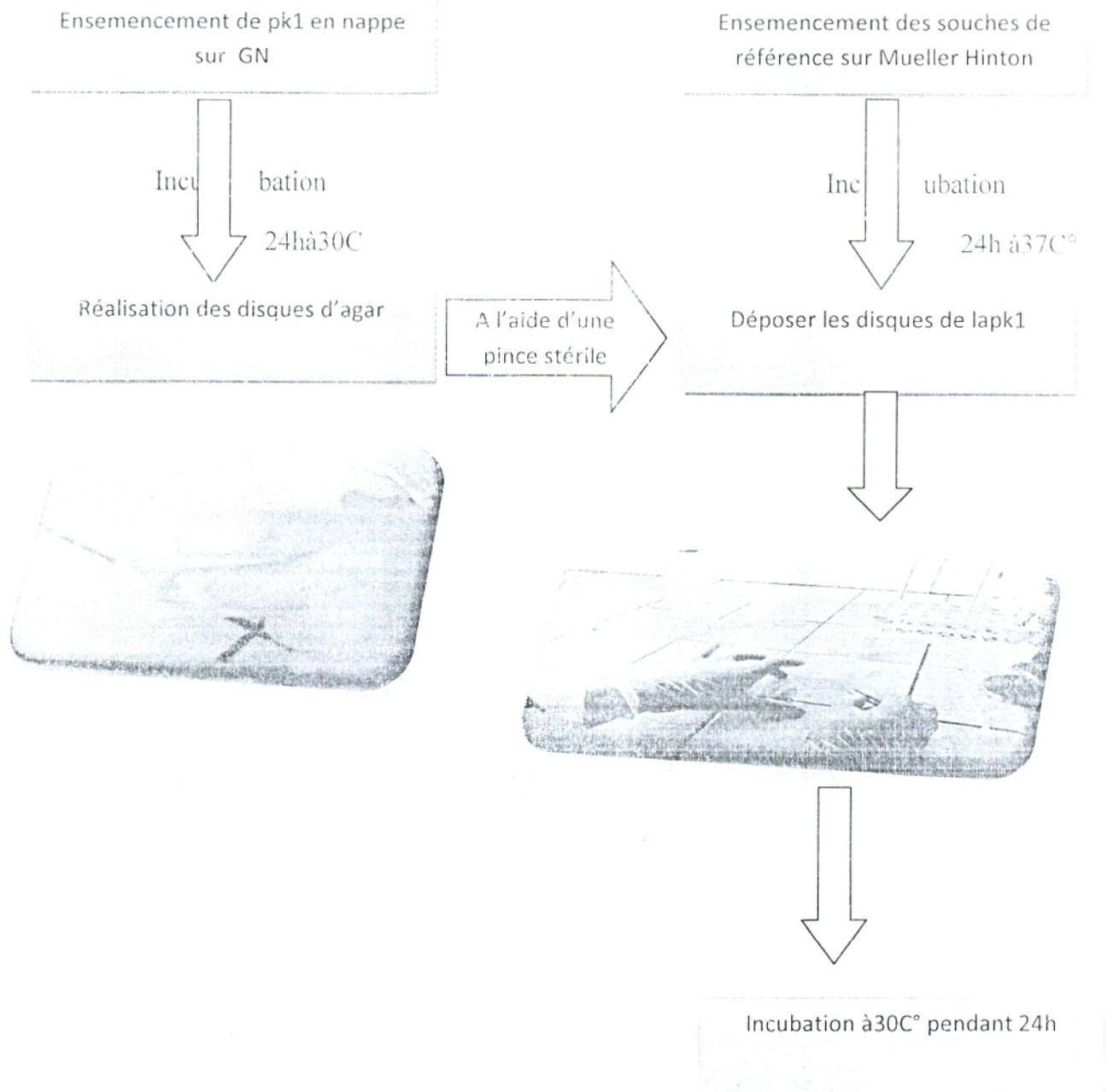


Figure n° 4 : Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion par disques d'agar (Vardar-Unlu et al., 2003).

2. Méthode de diffusion par puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)

Afin d'étudier l'effet inhibiteur de notre souche en milieu liquide, les boîtes de Pétri sont

Matériels et méthodes

Ensemencées avec les germes pathogènes (voir tableau n°1), des puits (diamètre de 5 mm) sont réalisées (5 à 6 puits / boîtes), et remplis par le filtrat d'une culture de 48h de la souche pk1.

La technique de diffusion des puits préconisée par (Barefoot et Klaenhammer.,1983) puis reprise et modifiée par plusieurs auteurs (Schillinger et Lucke, Ten brink et al.,Jin et al.,1989).

La lecture de l'activité antagoniste se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm (Pulzani et al.,1992).

Tableau n°1 : Microorganismes-cible utilisés

Microorganismes	Genre / espèce	Référence	La source
Bactéries	<i>Escherichia.colie</i>	ATCC 25922	Institut Pasteur
	<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	ATCC 27853	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	
	<i>Klebsiella pneumoneae</i>	ATCC 700603	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 1177	
Champignon	<i>Aspergillus flavus</i>		Laboratoire Produits naturels
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Laboratoire Produits naturels

La préparation de filtrat de la pk1 est la suivante :

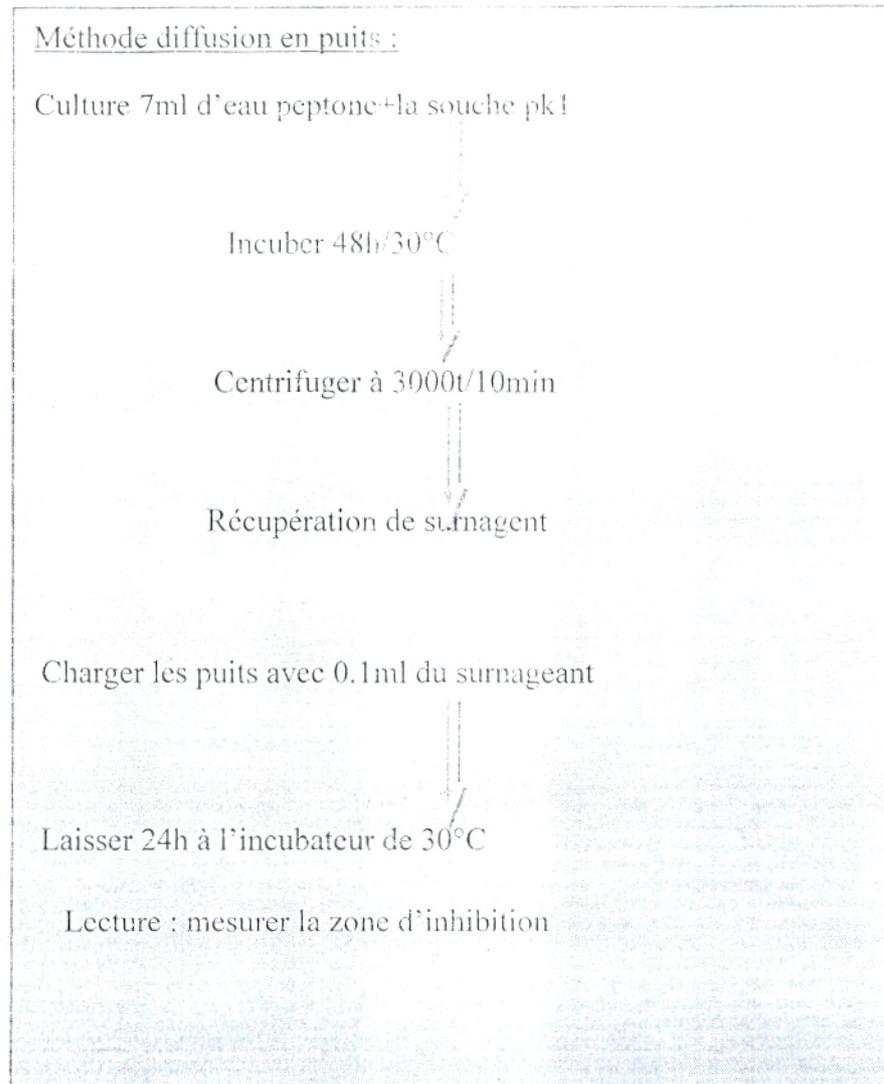


Figure n° 5 : Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion par puits (Barefoot et Klaenhammer.,1983)



Résultats et Discussions

3. Résultats

3.1. Résultats d'identification

L'examen microscopique (**état frais et coloration de Gram**) révéla des bacilles Gram+

La pk1 avait un aspect muqueux brillant de couleur crème opaque et des colonies volumineuses sur milieu mossel.

La souche pk1 est dotée d'une catalase positive, d'une cytochrome oxydase négative.

Tous ces résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Résultats et Discussions

3.2 Activité antimicrobienne

Les résultats sont montrés dans le tableau n°4 suivant :

Tableau n°3 : le diamètre des zones d'inhibition de la pk1(*Bacillus*)

Souches pathogènes	La boîte témoin (mm)	Zone d'inhibition sur milieu solide (mm)	Zone d'inhibition sur milieu liquide (mm)
<i>Escherichia coli</i>	05	07	06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		09	07
<i>Staphylococcus aureus</i>		08	07
<i>Bacillus cereus</i>		11	08
<i>Enterococcus faecalis</i>		10	07
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		05	05
<i>Aspergillus flavus</i>		05	05
<i>Candida albicans</i>		05	05

Ces résultats sont représentés dans les figures 6 et 7 :

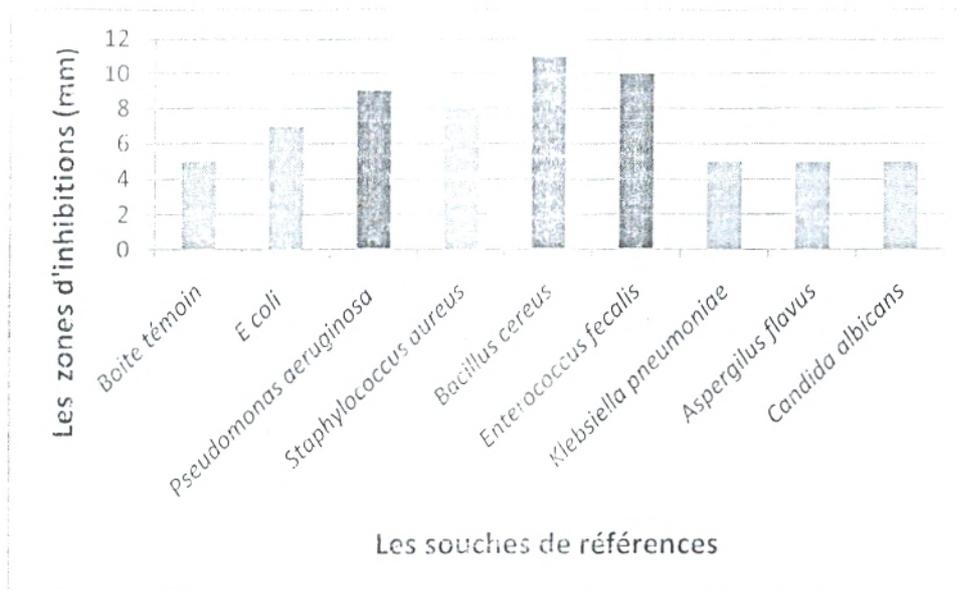


Figure n°6 : Diamètre des zones d'inhibition de la méthode des disques (Vardar-Unlu et al., 2003).

Résultats et Discussions

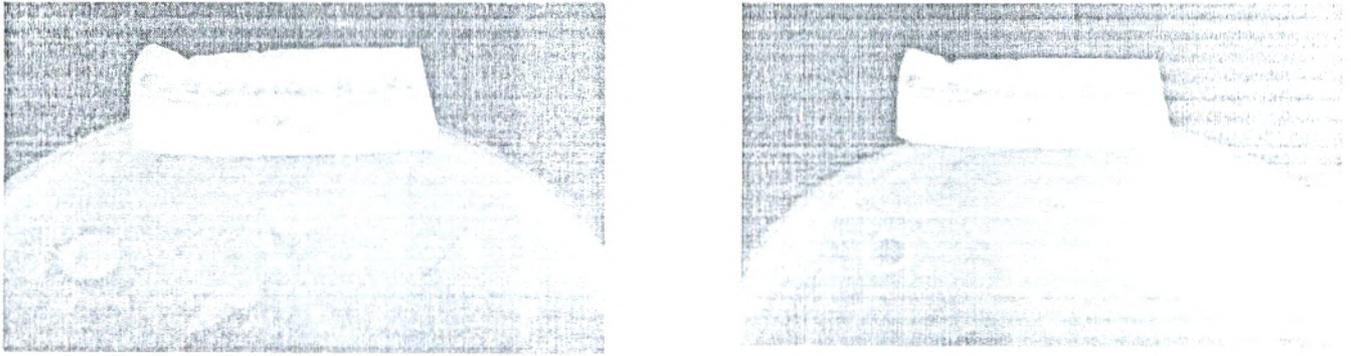


Figure n°12: Zones d'inhibition de la pk1 contre *Enterococcus faecalis*

4. Discussion

D'après la figure 6, nous remarquons que la souche pk1 exerce un effet antibiotique **modéré** sur la plus part des souches (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) à l'exception de *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*.

Le diamètre des zones d'inhibition relevées varie entre les deux méthodes :

-Pour la méthode des disques d'agar les diamètres intéressants sont :

{	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	→	09mm
	<i>Bacillus cereus</i>	→	11mm
	<i>Enterococcus faecalis</i>	→	10mm

La pk1 exerce un effet antibactérien négligeable vis à vis *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (7mm ,8mm).Le diamètre d'inhibition était proche a celui le diamètre de la boîte témoin.

-pour la méthode des puits la souche (pk1) présente un spectre d'activité très proche vis-à-vis des germes testés(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,

Résultats et Discussions

Bacillus cereus, *Enterococcus faecalis*) le diamètre des zones d'inhibition observé se situait entre 6 mm à 8mm.

L'activité antifongique testée sur nos germes cibles est nulle néanmoins nous ne pouvons conclure d'une manière formelle que cette souche ne produit pas d'antifongique du fait du nombre réduit des germes fongiques cibles utilisés(*Aspergillus flavus*, *Candida albicans*).

-la zone d'inhibition d'un bon agent antimicrobien diffère d'un auteur à un autre. d'après **Pereira., 2006**) la zone d'inhibition doit être égale ou supérieur a 10 mm, pour **(Vieira .,2001)** elle est de 13mm et selon **(Seokwon Kime .,2006)** elle est supérieur à 6mm : et d'après **Schillinger et Lucke.,(1989)** L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1 mm.

Nous remarquons que les zones d'inhibition obtenues sur milieu liquide sont inférieures à celle obtenues sur milieu solide.

Ce type de constatation a été fait par d'autre chercheurs **(Shomura et al., 1979; Iwai et Omura., 1982)**.

En fait, le passage des milieux solides aux milieux liquides pose quelquefois problème quant à l'efficacité de la production d'antibiotique en milieu liquide.

Shomura et al., (1979) and Nisbet .,(1982) expliquent cela par le fait que la répartition des nutriments dans les milieux liquides varie avec le temps alors que leur distribution en milieu solide et autour de colonies ne varie pas ou très légèrement.

-Les résultats que nous avons obtenus peuvent être expliqués par le fait que le filtrat n'est pas été concentré et, par conséquent, l'activité antibiotique est diluée et donc plus faible.

.Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec **(Allouche F, et al.,2010)**.qui ont travaillé sur des souches de lactobacille thermophiles produisant et excrétant dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* .

Résultats et Discussions

-D'après (Rengpipat et al., 2000, Helmstrom et al., 2002 ; Balcazar, Luna-Rojas.,2007Mahdhi et al., 2010). Beaucoup d'espèces appartenant au genre *Bacillus* ont un effet antimicrobien contre des micro-organismes, compris des bactéries pathogènes (parmi ces bactéries se trouve notre germe cible) pour les poissons, les mollusques et les crustacés ont la capacité de produire des exotoxines.

-En outre, des études précédentes ont indiqué que *Bacillus sp.* Produit des polypeptides et des antibiotiques, tels que la bacitracine, la polymyxine et la tyrotricidine, qui ont une activité contre une large gamme de bactéries à Gram positives et Gram négatives (Marques et al., 2006).

Les résultats obtenus dans notre étude sur la souche pk1 testées vis-à-vis des germes pathogènes se rapprochent de ceux cités dans le travail expérimental de (Tabak, S., et al., 2010). qui met en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique de la souche *Lactobacillus sakei* 2525. contre des germes pathogènes (*Streptomyces microflavus*, *Escherichia coli*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*).

-Ainsi, l'utilisation d'une souche de *Bacillus S11* dans une culture de crevette *Penaeus monodon* a amélioré le taux de survie, la croissance, la stimulation du système immunitaire et montre une activité antibactérienne vis à vis des pathogènes testés (Tai et al., 2004 ; Lagzouli et al., 2007).

-(Quintana-Castro et al., 2009; Pinzon-Martinez et al., 2010). Balcazar et Luna-Rojas.,(2007)et Deng-Yu et al., (2009) ont montré que l'administration de *Bacillus subtilis* à la culture de juvéniles de crevettes *Litopenaeus vannamei* a stimulé leur système immunitaire et a renforcé leur résistance aux maladies infectieuses contre des germes différents (notre germe testé).

-Notre étude, ainsi que d'autres (Gatesoupe, 1999 ; Zhou et al., 2009 ; Mahdhi et al., 2010). ont montré que Le genre *Bacillus* montre une activité antibactérienne en présence de pathogènes.

Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus par (Djabalah C., 2010). qui a travaillé sur l'activité antimicrobienne des actinomycètes halophiles et halotolérants vis-à-vis des germes pathogènes Gram positif et Gram négatif.

Résultats et Discussions

Nous concluons que la souche pk1 appartenant au genre *Bacillus* a un pouvoir antibactérien modéré .son pouvoir antifongique il s'est averé nul sur nos germes fongiques cible.

- Notre modeste étude expérimentale a permis de mettre en évidence une faible activité antibiotique de notre *Bacillus* mais fait ouvre plusieurs perspectives notamment une identification plus poussée jusqu'à l'espèce en utilisant des techniques moléculaires qui pourrait faire ressortir la nouveauté de cette souche (nouveau taxon) et ensuite une caractérisation proprement dite de l'activité antibiotique de cette souche.

Nous rappelons que cette étude expérimentale constitue uniquement un screening d'activité antibiotique.

.Conclusion

Avec la découverte des antibiotiques, l'humanité a disposé d'un moyen et d'un remède extrêmement efficaces contre le fléau des bactéries pathogènes qui l'accablaient depuis des millénaires. Depuis la découverte de la pénicilline, des milliers d'antibiotiques sont produits et différentes classes ont été décrites. L'utilisation des antibiotiques a représenté alors le plus grand succès thérapeutique et cette utilisation sauve annuellement des millions de vies.

Malheureusement, l'utilisation massive et répandue des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, a engendré un problème très épineux qui est la résistance des bactéries pathogènes aux traitements par les antibiotiques. Les scientifiques ont observé que les bactéries qui étaient auparavant sensibles pouvaient devenir résistantes, et plus on utilise d'antibiotiques, plus cette résistance s'accroît. On s'est rendu compte que le miracle « antibiotique » a ses limites.

Actuellement, il existe des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* qui résistent à tous les antibiotiques connus. La question est donc comment remédier à cette situation ?

Outre la recherche de nouvelles molécules antibiotiques, l'une des solutions pour surmonter le problème de la résistance des bactéries pathogènes aux biomolécules, pourrait être l'utilisation des antibiotiques produits par les microorganismes.

L'ensemble de ces considérations nous a conduit à élaborer un programme d'étude dont le but a été d'identifier une souche bactérienne extrémophile nommé pk1, puis testé son pouvoir antimicrobien.

Le lieu de notre isolat (le lac d'El-Goléa) a été choisi afin d'optimiser les chances de découverte de souches particulières et, pourquoi pas, de nouvelles biomolécules actives.

Avant d'entreprendre cette recherche, une étude bibliographique nous a fait prendre conscience de l'importance de nos investigations concernant les *Bacillus* aquatiques vivant dans des écosystèmes salés (milieu marin, lacustres salés) car peu de travaux sont reportés à ce sujet.

L'étude expérimentale ,divisée en deux parties ,a consisté d'abord à identifier jusqu'au genre la souche pk1 ,puis mettre en évidence son pouvoir antimicrobien par la technique de diffusion par disque d'agar et par puits vis-à-vis des *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* .

Les résultats obtenus montrent une activité antibactérien modéré contre les Gram positif .

Références bibliographiques

- Allouche F., Hellal A., Laraba A., (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Revu n°3 « *Nature et Technologie* ». n° 03/Juin 2010. Pages 13 à 20.
- Balcazar J.L and Luna-Rojas.,(2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) *Curr. Microbiol.*, 55 : 409- 412.
- Barefoot S.F and Klaenhammer T.R., (1983).Detection and activity of lactacin Ba bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* *Appl.Environ.Microbiol.*45(6).1808-1815.
- Deng-Yu T., Pei-Lin H., Sung-Yan C., Sheng-Chi S., Ya-Li C., Chiu-Shia, L., Chun-Hung., (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* by the probiotic, *Bacillus subtilis* E 20. *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 339-344.
- Djabalah C., (2010).contribution a l'étude des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Université Mentouré Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie Département de biochimie et microbiologie
- Gatesoupe F.J., (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180 : 147-165
- Harley M and Klein D., (2007). Prescott Microbiologie, Edition de Boeck.
- Holmström C., Egan A., Franks S., McCloy S., Kjelleberg., (2002). - Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 41 : 47-58.
- Holt J.,Krieg N.R.,Sneath P.,Staley J and Williams S.T.,(1994).Bergey's manual of determinative bacteriology.Williams and Wikins.
- Iwai Y and Omoura., (1982).Culture conditions for screening of new antibiotics- *J.Antibiot.*35, 123-141.
- Joffin J.N and Leyral G., (2005).Microbiologie Technique Tome 1 Dictionnaire des techniques Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine,171-189.

Références bibliographiques

- Khelil née Klouche N ., (1998).** Thèse de Magistère B.M.C etude des molécules biosynthétisées par des souches bactériennes filamenteuses extrêmophiles notamment *Metallogenium sp.*

- Leyral G and Vierling E.,(2007).**Microbiologie et toxicology des aliments :hygiene et sécurité alimentaires ;pp.26.Edition de Biosciences et techniques. Collection dirigée par Figarello J et Zonszain.

- **Lagzouli M., Mennane A., Aitounejjar S., Wafae M., Ouhssine M., Elyachoui E.H., Berny M., Jadal., (2007).** Optimization of growth and extracellular glucoamylase production by *Candida famata* isolate. *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 2590-2595

- **Mahdhi A., Harbi B., Ángeles M., Esteban K.,Chaieb,F., Kamoun, A. ,Bakhrouf., (2010) .**Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*. *Biocontrol Sci. Technol.*, 20: 983-996.

- **Marques A., Huynh Thanh W., Verstraete J., Dhont P. ,Sorgeloos P., Bossier., (2006).** Use of selected bacteria and yeast to protect *Artemia* against different pathogens. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, 334: 20-30.

- Mayachiew P and Devahastin S., (2008).**Antimicrobial and antioxydant activities of Indian gooseberry and galangal extracts.*LWT-Food Science and technologie*,**41** :1552-1558.

- Nisbet L.J.,(1982).** Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites-*J.Chel.Tech.Biotechnol.*32,251-270.

- Pereira S., (2006).**antimicrobial activity of *indigofera suffruticosa*.

- **Pinzón-Martínez D.L., Rodríguez-Gómez D., Miñana-Galbis, J.A.,Carrillo-Chávez G., Valerio- Alfaro R., Oliart-Ros., (2010).** Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environ. Technol.*, 31 : 957-966.

Références bibliographiques

- Pulzani R.S., Rao R.D., Sunki R.,(1992).Antimicrobial activity of lactic culture :partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus* .J.Food Science,44.575-578.
- Quintana-Castro R., Valerio-Alfaro,H.S., Garcia, R.,Oliart-Ros., (2009). Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase. Mol. Biotechnol., 42 : 75-83.
- Rengpipat S., Rukpratanporn R., Piyatiratitivorakul S., Menasaveta P., (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)by a probiont bacterium (*Bacillus*S11). Aquaculture, 191: 271-288.
- Schillinger U and Luke F., (1989).Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat .Appl.Environ.Microbiol,55.
- Seokwon Kime.,(2006) .antimicrobial and antifungal activity of sulfur :containing compounds from *petiveria alliaca* l.
- Shomura T.,Yoshida Y., Amano S. ,Kojima M., Inouye S., Niida T ., (1979).Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture.Screening,taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii* strain SE 1993-J.antibiotics,32,427-435.
- Tabak S and Bensoltane A., (2010). Laboratory of Food and Industrial Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Oran 31100.
- Tai S.K., Lin J., Kuo J.K., Liu., (2004). Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. Extremophiles, 8: 345-349.
- Viera ., (2001) . microbiocidol effect of medicinal plants extracts(*Psidium guajava* LINN ,and *Papaya* LINN)upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children.
- Vardar U G., Candan F., Daferera D.,Polissiou M., Kmen M.,(2003).Antimicrobial and antioxydant activity of the essential oil and méthanol extracts of *Tthymus pectinatus* Fisch.Et Mey.Var.*pectinatus*(Lamiaceae).journal of Agricultural AND Food Chemistry,46 :4869-4873.

Références bibliographiques

- Zhou X., Wang W., Li., (2009). Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penacus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287: 349-353.

Résumé

La recherche de nouvelles molécules antibiotiques continue de susciter un grand intérêt travers le monde. Ceci, en raison de la toxicité de certaines molécules ou des cas émergents de résistance microbienne. Parmi les microorganismes, les *Bacillus* constituent la principale source d'antibiotiques. Ils sont isolés de différents écosystèmes, mais notre isolat provient d'une sebkha saharienne. Les laboratoires dans le monde reçoivent des milliers d'échantillons de sol et examinent avec un intérêt particulier ceux provenant de milieux extrêmes.

La souche a été identifiée sur la base de critères phénotypiques. Le pouvoir antimicrobien est réalisé par deux méthodes utilisant l'une des disques d'agar et la seconde des puits (Barefoot).

The search for new antibiotic molecules continue to arouse a great interest through the world. This, because of the toxicity of certain molecules or the emerging cases of microbial resistance. Among the micro-organisms, *Bacillus* constitute the independent source of antibiotics. They are isolated from various ecosystems, but our isolate comes from a sebkha Saharan. The laboratories in the world receive thousands of samples of ground and examine with an private interest those coming from extreme mediums. The stock was identified on the basis of study phénotypique . chemical. The antimicrobial capacity is carried out by two method one of barefoot and the second of the agar discs.

