REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT SNV

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

En Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présentée par :

Ould-Maamer Kaouther, **Bettahar** Amina & **Benaissa** Khadidja

Thème

Criblage de l'activité enzymatique des souches de *Bacillus* sp. isolées de l'environnement.

Evalué par le jury composé de :

Promotrice :	**DJENANE Zahia**	**MCB**	**Université de Médéa**
Co-promotrice:	**EL-AICHAR Fairouz**	**Doctorante**	**USTHB**
Examinateur 1 :	**Bouhrama Amina**	**MAA**	**Université de Médéa**
Examinateur 2 :	**NATECHE Farida**	**Professeur**	**USTHB**

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

On remercie en premier lieu Dieu tout puissant de nous avoir accordé la puissance et la volonté pour achever ce travail.

On tient à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui nous ont aidées lors de la rédaction de ce mémoire.

On voudrait dans un premier temps remercier ***Pr HANANE DJENANE*** *pour son encadrement efficace et rigoureux en tant que promotrice de thèse et nous la remercions très chaleureusement pour son aide, sa disponibilité, pour avoir été un guide précieux et pour ses judicieux conseils.*

On adresse nos sincères remerciements à ***Melle EL AICHAR Fairouz*** *, Co-promotrice pour son aide précieuse et son dévouement durant la période de travail pratique.*

On adresse toute notre reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté d'examiner notre travail : Mme ***Bouhrama Amina et Pr. Nateche Farida***

On remercie également les Ingénieurs du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de vie. Université Yahia Farés Médéa pour leurs soutiens, et leur précieuse collaboration.

Merci à tous ceux et celle qui nous ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de notre mémoire

On ne pourrait pas terminer ces remercîments sans une énorme pensée pour nos parents, pour leur soutien constant et leurs encouragements. (Merci de nous supporter).

MERCI



Dédicace

KHADIDJA

*A l'aide d'**ALLAH** tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, afin de pouvoir*

***A l'âme de mon cher père. Mr. Abderrahmen** Tu resteras toujours mon idole dans la vie*

A ma très Chère Mère: M^me^ Hafida

Je te remercie pour toutes les nuits dans lesquelles tu restais réveillée pour prendre Soin de moi et mes enfants. Merci pour ton sourire qui est la lanterne qui éclaire mon chemin, pour tous les moments de bonheur que tu m'apporte quelque soit le terme et quelque soit l'expression, rien ne pourra exprimer mon amour telle que mon cœur le ressent, que dieu te protégé.

A mon cœur**. Mon cher mari **Mr. Hichem karaguendez

A mes petits princes** ; mes enfants **Aymen** et **Rayen

.

***A ma sœur**. Chérie. **M^elle^ Amel,** la source de ma motivation.*

***A mes frères .Mr. Sidali** et **Mr.Mohamed** pour leur soutient et de toujours croire en moi.*

A ma grande famille. A tous mes amis de près ou de loin.** Et surtout à ma cherie **M^elle^ Imen

Dédicace

Kaouther

En signe de respect et de reconnaissance je suis aujourd'hui la pour dédier ce modeste travail à toute ma famille à qui je présente une grande gratitude et énorme et sincères sentiments qui ont poussés mon travail milles pats en avant.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargner aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère ***Nabiha***

A l'homme, mon précieux offre de dieu, qui doit ma vie ma réussite et tout mon respect : mon chèr père ***Benaissa.***

Sans oublier mes deux braves frères et sœur ***Basset*** *et* ***Soumia.***

A tous mes amies qui m'ont toujours encouragé, que dieu puisse garder notre amitié.

J'adresse mes sincères remerciements à notre promotrice ***Melle DJENANE Zahia*** *pour son suivi et ses précieux conseils.*

Dédicace

Amina

« La science est le plus beau trésor de l'humanité ».

Je dédie ce travail à……

A ma très chère mère, merci d'être une super-femme, super-maman, merci d'être mon refuge et mon remède.

A mon cher père, tes prières m'ont donné la force et la patience pour continuer

A mon très cher mari, je n'oublierai jamais ta présence et ton soutien, sans ton aide mon travail n'aurait jamais vu la lumière

A mes princesses Khadidja et Meriem

A toute ma famille et ma belle-famille, mes sœurs Souad,Widad et Fatima , mes belles sœurs surtout Fatiha et Amina ,ma belle-mère mon beau père mes frères et mes beaux-frères et toutes les personnes qui m'ont aidé ou encouragé à continuer .

A mes binômes, kawter et khadidja,

A Dr Djenane, Dr EL AICHAR merci d'avoir suivi notre travail malgré les conditions défavorables.

Résumé :

L'objectif de ce travail est de mettre en exergue les potentialités de quelques souches du genre *Bacillus* isolée de l'environnement à synthétiser des enzymes actives sous différentes conditions physicochimiques de pH, température et salinité. Ces métabolites naturels constituent une source prometteuse trouvant son application dans les différents domaines de la biotechnologie. En effet, une enzyme préservant sa stabilité/fonctionnalité dans des conditions extrêmes serait un excellent, candidat pour un éventuel exploit dans le domaine industriel.

L'évaluation de la croissance et des propriétés fonctionnelles des différentes enzymes (Amylase, caséinase, lécithinase, lipase et lipoprotéinase) a été investiguées dans une gamme de conditions physicochimiques de pH (5, 7 et 9), [NaCl] (5%, 10% et 15%) et de température (30, 40 et 60)°C ce qui a permis de sélectionner les souches H5 et H10 comme candidats présentant un large éventail d'activités enzymatiques (amylase, caséinase et lécithinase). Une très faible activité lipoprotéase a été observée chez la souche H5. La souche R11 n'a synthétisé aucune des enzymes étudiées

L'amylase de la souche H5 était meilleure en terme de taux de production (diamètre en mm) et étant stable dans toute la gamme de température, pH et salinité analysée. A l'opposé, la caséinase et la lécithinase de la souche H10 était plus importante et plus stable dans les conditions physicochimiques à l'exception du milieu à 10% et 15% de NaCl et de la température 60°C pour la lécithinase. En l'occurrence, on peut retenir la souche H5 comme candidat pour la synthèse de l'amylase et la souche H10 pour la synthèse de la caséinase et la lécithinase. Des recherches ultérieures consistant à tester la stabilité des enzymes purifiées dans des conditions physicochimiques extrêmes avant de passer à une éventuelle application biotechnologique.

Mots clés : *Bacillus* sp., enzymes extracellulaires, biotechnologie industrielle, conditions physicochimiques.

Abstract :

The objective of this work is to highlight the potentialities of some strains of the Bacillus genera isolated from the environment to synthesize active enzymes under different physicochemical conditions of pH, temperature and salinity. These natural metabolites constitute a promising source finding its application in the various fields of biotechnology. Indeed, an enzyme preserving its stability / functionality under extreme conditions would be an excellent candidate for a possible exploit in the industrial field.

The evaluation of the growth and the functional properties of the different enzymes (Amylase, caseinase, lecithinase, lipase and lipoproteinase) was investigated in a range of physicochemical conditions of pH (5, 7 and 9), NaCl] (5%, 10 % and 15%) and temperature (30, 40 and 60) ° C made it possible to select strains H5 and H10 as candidates exhibiting a wide range of enzymatic activity (amylase, caseinase and lecithinase). A very weak lipoprotease activity was observed in the H5 strain. Strain R11 did not synthesize any of the enzymes studied

The amylase of the H5 strain was better in terms of production rate (diameter in mm) and being stable over the entire range of temperature, pH and salinity analyzed. In contrast, the caseinase and lecithinase of the H10 strain was greater and more stable under the physicochemical conditions with the exception of the medium at 10% and 15% NaCl and the temperature 60 ° C for the lecithinase. In this case, the H5 strain can be retained as a candidate for the synthesis of amylase and the H10 strain for the synthesis of caseinase and lecithinase. Further research consisting of testing the stability of purified enzymes under extreme physicochemical conditions before moving on to possible biotechnological application.

Keywords: *Bacillus* sp., extracellular enzymes, industrial biotechnology, physicochemical conditions.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على إمكانات بعض سلالات أجناس *Bacillus* المعزولة من البيئة تخليق إنزيمات نشطة تحت ظروف فيزيائية و كيميائية مختلفة من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والملوحة .تشكل هذه المستقلبات الطبيعية مصدرًا واعدًا يمكن تطبيقه في مختلف مجالات التكنولوجيا الحيوية .في الواقع ، سيكون الإنزيم الذي يحافظ على استقراره / وظيفته في ظل الظروف القاسية مرشحًا ممتازًا لاستغلال محتمل في المجال الصناعي.

تم فحص تقييم النمو والخصائص الوظيفية للأنزيمات المختلفة (Amylase, caséinase, lécithinase, lipoprotéase, lipase) في مجموعة من الظروف الفيزيائية والكيميائية للأس الهيدروجيني (5 ، 7 و 9) ، [كلوريد الصوديوم] (5٪ ، 10 ٪ و 15٪) ودرجة الحرارة (30 و 40 و 60) درجة مئوية جعلت من الممكن اختيار سلالات H5 و H10 كمرشحين يظهرون مجموعة واسعة من النشاط الأنزيمي (Amylase, caséinase, lécithinase) .لوحظ نشاط ضعيف جدًا في البروتين الدهني في سلالة H5 و لم تصنع السلالة R11 أيًا من الإنزيمات المدروسة.

كان انزيم Amylase لسلالة H5 أفضل من حيث معدل الإنتاج (القطر بالملم) وكان مستقرًا على المدى الكامل لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة والملوحة التي تم تحليلها .في المقابل ، كان انزيم caséinase, lécithinase لسلالة H10 أكبر وأكثر ثباتًا في ظل الظروف الفيزيائية الكيميائية باستثناء الوسط عند 10٪ و 15٪ كلوريد الصوديوم ودرجة الحرارة 60 درجة مئوية لانزيم lécithinase في هذه الحالة ، يمكن الاحتفاظ بسلالة H5 كمرشح لتخليق Amylase وسلالة H10 لتخليق caséinase و lécithinase ،المزيد من البحوث حول اختبار ثبات الإنزيمات المنقاة في ظل ظروف فيزيائية و كيميائية قاسية ذلك قبل الانتقال إلى التطبيق الحتمل في مجال التكنولوجيا الحيوية .

- **الكلمات المفتاحية**,: *Bacillus* sp. *Cereus* , الإنزيمات خارج الخلية ، التكنولوجيا الحيوية الصناعية ، الظروف الفيزيائية والكيميائية

Liste des abréviations

- : Négatif.

% p/v : pourcentage poids-volume.

% v/v : pourcentage volume –volume.

% : pourcentage.

+ **:** Positif.

°**C :** dégrée Celsius

g/l : Gramme par litre

BN : Bouillon nutritif

h : heurs

ml : millilitre

NaCl : Chlorure de sodium

TSA : Trypticasesoy agar

pH : Potentiel d'Hydrogène

Tween : polysorbate

ssp: Sous-espèce

av. J.-C : avant jésus christ.

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ADNr : ARN ribosomique

ARNr 16S : Acide RiboNucléique ribosomale 16S.

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

MLST : MultiLocus Sequence Typing

WGS : Whole Genome Sequencing

SNP : Single-Nucleotide Polymorphism

ATCC : American Type Culture Collection

CytK : Cytotoxine K

Cry: Crystal protein

Cyt: Cytolitic toxin

NRPS : Non-ribosomal peptide synthetases

NK : natural killer

Min : minute

Nhe : Non-Hemolytic Enterotoxin

Hbl : Hémolysine BL

ClyA : Cytolisine A

Liste des figures

Figure 1 : les différents groupes de *Bacillus* en fonction de morphologie de la spore et du sporange

Figure 2 : schéma de la culture sporulée de la souche de *Bacillus thuringiensis* avec le corp d'inclusion parasporal (X100)

Figure 3 : Colonies rhizoides de *Bacillus mycoides* sur milieu "TYA" (Tryptone Yeast Agar)

Figure 4 : méthode d'ensemencement en quadrant

Figure 5 : Croissance bactérienne sur différentes conditions physicochimiques

Figure 6 : Résultats de test de l'amylase sur différentes conditions physicochimiques.

Figure 7 : Résultats de la lécithinase sur différentes conditions physicochimiques

Figure 8 : Résultats de la lipase

Figure 9 : Résultats de la lipoprotéase

Liste des tableaux

Tableau I : Classification morphologique du genre *Bacillus*

Tableau II : les sept groupes phylogenetiques de *B.cereus*

Tableau III : toxines Cry et l'insecte cible

Tableau IV : Résultats de la croissance bactérienne en différentes températures.

Tableau V : Résultats de la croissance bactérienne en, différent pH.

Tableau VI : Différentes catégories des bactéries halotolérantes**.**

Tableau VII : Résultats de la croissance bactérienne en différent taux de salinité

Tableau VIII : Résultats de l'activité enzymatique « type amylase » des trois souches étudiées dans différentes conditions physicochimiques

Tableau IX : Résultats de l'activité enzymatique « type caséinase » des trois souches étudiées dans différentes conditions physicochimiques.

Tableau X : Résultats de l'activité enzymatique « type lécithinase »des trois souches étudiées dans différentes conditions physicochimiques.

Tableau XI: Résultats de l'activité enzymatique « type lipase »des trois souches étudiées dans différentes conditions physicochimiques

Tableau XII: Récapitulatif des résultats de l'influence de la température, le pH et la salinité sur la croissance et l'activité enzymatique de la souche R11

Tableau XIII : Récapitulatif des résultats de l'influence de la température, le pH et la salinité sur la croissance et de l'activité enzymatique de la souche H5.

Tableau XIV: Récapitulatif des résultats de l'influence de la température, le pH et la salinité sur la croissance et l'activité enzymatique de la souche H10.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS
LISRE DES TABLEAUX
LISTE DES FIGURES
Résumé

INTRODUCTION

Partie I : Recherche bibliographiques
1. Généralité sur le genre *Bacillus*…… 1
2. Classification ……... 2
2.1. Classification selon le Bergey…….. 2
2.1. classification sérotypique…….. 2
2.1.2. Selon ARN 16S…….. 2
2. 1.3. Selon la morphologie/position de la spore…… 3
3. Généralités sur le groupe *Bacillus cereus* ……... 4
4. L'évolution de la classification de group *Bacillus cereus*…… **6**
4.1. Séquençage partiel du gène panC…….. **7**
4.2. Le typage moléculaire M13-PCR dérivé de la RAPD…….. **7**
4.3. PFGE……. **8**
4.4. MLST…… 8
4.5. MALDI-TOF…… 8
5. Les biomolécules synthétisés par les souches de groupe *B.Cereus*…… 10
5.1. La toxine émétique…… 11
5.2. Les entérotoxines……... 11
5.3. Les phospholipases …… 11
5.4. Les hémolysines…… 12
5.5. δ-endotoxines……..... 12
5.6. Bêta-exotoxine …… 12
5.7. Les protéines Vips (VegetativeInsecticidalProteins)…… 13
5.8. Les parasporines…… 13
5.9. Les exoenzymes…… 13
5.10. Les bacteriocines …… 14
5.11. Les antibiotiques et les antifongiques……. 14

6. Quelques applications biotechnologiques des biomolécules synthétisées naturellement par *Bacillus spp*…… 15
6.1. Domaine industriel…….. 15
6.1.1L'industrie des détergents……..... 15
6.2. Industrie agroalimentaire…….. 15
6.3. L'industrie de transformation de l'amidon…… 16
6.4. Tanneries et Textile……... 16
6.5. Industrie du papier …… 16
6.6. Domaine pharmaceutique et médical…… 16
6.7. Lutte biologique…… 16
7. Quelques effets indésirables des métabolites bactériens…….. 17
7.1. Maladies dues aux toxines synthétisées par quelques souches du groupe B. cereus…… 17
7.2. Altérations des aliments……...…....…..... 18
Partie II : Matériels et méthodes
I. Matériel…… 18
1. Matériel biologique……. 18
1.1. Les souches microbiennes cibles ……... 18
1.2. Les souches microbiennes utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne..... 18
2. Matériel non biologique……... 18
2.1. Appareillage …….. 18
2.2. Les milieux de culture, les solutions et les réactifs……... 18
II. Méthodes…… 19
1. Mise en culture des souches bactériennes …… 19
1.1. Préparation de la suspension microbienne (l'inoculum), Repiquage et Conservation des souches …….. 19
1.1.1. Revivification des souches……. 19
1.1.2. Repiquage et conservation……... 20
2. La caractérisation des souches bactériennes ……..... 21
2.1. Aspect des colonies……... 21
2.2. Aspect des cellules……. 21
2.2.1. Observation à l'état frais…… 21
2.2.2. Observation à l'état fixé/Coloration de Gram…… 21
2.3. Les caractères physicochimiques……... 22
2.3.1. La température …… 22
2.3.2. La salinité ……... 22
2.3.3. Le pH…….. 22

3. Le criblage d l'activité enzymatique ……... 22
3.1. L'amylase ……. 23
3.2. La caséinase ……... 23
3.3. La lécithines, la lipoprotéinase et la lipase…… 23
3.4. La lipase/Hydrolyse du Tween 80……. 24

Partie III : Résultat et discutions

1. Observation macroscopique……. 27
2. Observation de la croissance bactérienne à différents paramètre physicochimique……... 27
2.1. La température…… 27
2.2. Le pH…… 28
2.3. La salinité……... 28
3. Criblage de l'activité enzymatique……... 29
3.1. L'amylase……... 30
3.2. La caséinase (protease)…….. 31
3.3. La lécithines, lipoprotease, lipase……... 32

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

INTRODUCTION

Les technologies modernes sont axées vers des considérations de plus en plus écologiques et environnementales, les diverses industries ne cessent pas de s'adapter en ce sens. Ainsi, le remplacement des produits chimiques par une alternative biologique, biodégradable rend l'impact sur l'environnement et la santé public moins néfaste. Cet axe de recherche permet aussi de contribuer à économiser l'énergie par l'utilisation des ressources biologiques renouvelables et durable, ceci est valable pour tous les secteurs d'applications (l'alimentation humaine et animale, les détergents, l'environnement, les cosmétiques, l'industrie pharmaceutique…etc.).

Plusieurs propriétés physiologiques font des espèces du genre *Bacillus* un organisme prometteur : sécrétion d'enzymes lytiques **(Agbaje et *al.,* 2016),** biosynthèse d'antibiotique (**Patrick Fickers *et al.,* 2009)**, de vitamines**,** des lipopolysaccharides et des glycoprotéines (**Makkar RS *et al.,* 2011**),des toxines entomopathogènes **(Margalith et *al*., 2000).** Ainsi plusieurs de ces molécules sont impliquées dans divers secteurs économiques au niveau mondial tel que l'industrie pharmaceutique, agro-alimentaire, biopesticides, textiles…etc.

Dans le domaine industriel, un intérêt particulier est porté sur les enzymes préservant leurs stabilité/fonctionnalités dans des conditions physicochimiques extrêmes, et ce en relation avec les conditions utilisées dans les différentes productions industrielles. En effet, plus de deux tiers d'enzymes produites industriellement par des bactéries impliquent les *Bacillus* **(Devine, 1995).** Les bactéries du genre *Bacillus* produisent les enzymes comme les protéases intra et extracellulaires, qui sont l'une des classes d'enzymes les plus intensivement étudiées et largement appliquées dans les processus industriels **(Gupta et *al*., 2002)** En outre, la production d'enzymes à des niveaux satisfaisants pour l'industrie pourrait mener à une révolution complète des méthodes industrielles. Ceci prend en considération la détermination des conditions de la croissance des bactéries, de l'activité optimales des enzymes, leur stabilité dans les conditions physicochimiques extrêmes et le développement d'une nouvelle méthode de production plus efficace, non néfaste et moins couteuses. L'enjeu est de pouvoir remplacer les anciennes méthodes chimiques par des technologies biologiques respectueuses à l'environnement et à la santé public. Dans ce contexte, notre travail vise à cribler quelques enzymes extracellulaires de trois souches bactériennes appartenant au genre Bacillus, et ce en suivant le plan suivant :

- Recherche bibliographique
- Test de la croissance bactérienne dans différents paramètres physicochimiques
- Criblage de l'activité enzymatique dans les conditions standards (pH7, 30°C et 5% de NaCl)
- Test de l'activité enzymatique dans des conditions extrêmes de pH (5 et9), température (40°C et 60°C) et salinité (10% et 15%).

Chapitre I :

Recherche bibliographique

1. Généralité sur le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* regroupe des espèces bactériennes particulièrement hétérogènes. Elles sont Gram positif ou variable, les cellules végétatives sont des bacilles droits ou incurvés à extrémités rondes ou carrées, de taille variable allant de 0,5-1.2 µm jusqu'à 2,5-10 µm **(Drobniewski,1993).** Elles sont généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, chimio-organotrophes, prototrophes ou auxotrophes, selon les espèces, pour de nombreux facteurs de croissance, aérobies ou aéroanaérobies, le plus souvent catalase positive et oxydase variable. Les espèces du genre *Bacillus* sont également caractérisées par un contenu en (G+C) % faible et très diversifié allant de 35% (espèces du groupe *Bacillus cereus*) à 69% (**Alcaraz*et al.* 2010). (larpent, 2000).**

Les espèces qui constituent ce genre sont ubiquiste, retrouvées dans différentes niches écologiques : l'air, le sol, les environnements alcalins ou salins **(DasSarma, 2001 ; Kushner ,1978)** les passages hydrothermaux, l'eau de mer et les cadavres d'insectes **(Ettoumi et *al*., 2009 ; Yazdani et *al*., 2009 ; Aizawa et *al*., 2010 ; Alcaraz et *al*., 2010 et Fan et *al*., 2011).** En l'occurrence, ces espèces s'adaptent à différentes conditions physicochimiques même ceux qualifiées d'extrêmes. En effet, l'adaptation à de telles conditions reflète une large capacité métabolique. Les biomolécules ainsi synthétisées fait de ce groupe un outil de choix dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, environnementale et en agriculture **(Schallmey et *al*., 2004; Chen et *al*., 2007 ; Vary et *al*., 2007 ; Coutte et *al*., 2010 ; Eppinger et *al*., 2011 ; Huang et *al*., 2011 ; Pérez-García et *al*., 2011 ; Sheremet et *al*., 2011 ; Yamashiro et *al*., 2011 ; Zhang et *al*., 2011)**.

Le genre *Bacillus* a été créé en 1872 par Ferdinand Cohn qui décrit *B. subtilis* comme espèce type. Quinze années plus tard (1887), Frankland isolent une nouvelle espèce, *B. cereus* à partir de l'air d'une étable au Royaume-Uni **(Frankland et Frankland, 1887).** La bactérie isolée est la souche type de *B. cereus* : ATCC 14579. En 1955, **Steinar Hauge** est le premier à prouver l'implication de *B. cereus* dans des toxi-infections alimentaires **(Hauge, 1955)**. C'est en 1975 que la souche diarrhéique F4430/73 de *B. cereus* a été isolée à partir d'une soupe de pois **(Spira et Geopfert, 1975).**

2. Classification

La classification des *Bacillus* fait apparaitre des groupes taxonomiques importants, mais certaines études viennent parfois contredire ces distinctions. En tout état de cause, il n'est pas possible de faire apparaitre pour *Bacillus* une véritable classification dichotomique. Toutefois, certains groupes se dégagent sur les plans phénotypique et génétique.

2.1. Classification selon le Bergey

2.1.1. Classification sérotypique

La classification sérotypique est faite selon la réaction antigéne-anticorps, grâce à trois types d'antigènes :

- Antigènes O : **(kramer et Gilbert, 1989).**
- Antigénes H.
- Antigénes des spores : **(kim et Geopfert ,1972).**

2.1.2. Selon ARN 16S

La sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) est essentiellement utilisée en raison de sa structure, très conservée dans toutes les bactéries. Le gène de l'ARNr 16S est le marqueur génétique le plus connu, utilisé pour identifier et classer les bactéries. Il est d'ailleurs couramment employé comme gène cible dans la PCR conventionnelle afin de détecter les espèces bactériennes.

Grace à la comparaison des séquences nucléotidiques obtenues de différentes bactéries deux bactéries appartiennent à des espèces différentes si leurs ARN 16S partagent moins de 97 % de similitude **(Stackebrandt et *al*., 1994).** Cependant, il semble raisonnable d'apprécier cette « limite » au cas par cas, car le taux de mutations observé dépend non seulement du temps écoulé entre les épisodes de spéciation, mais aussi de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN propres à chaque espèce.

D'après Bergey's Manual of SystematicBacteriology (3rd ed. 2010), la classification du genre *Bacillus* est la suivante :

Phylum : *Firmicutes*

Classe : *Bcilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Bacillaceae*

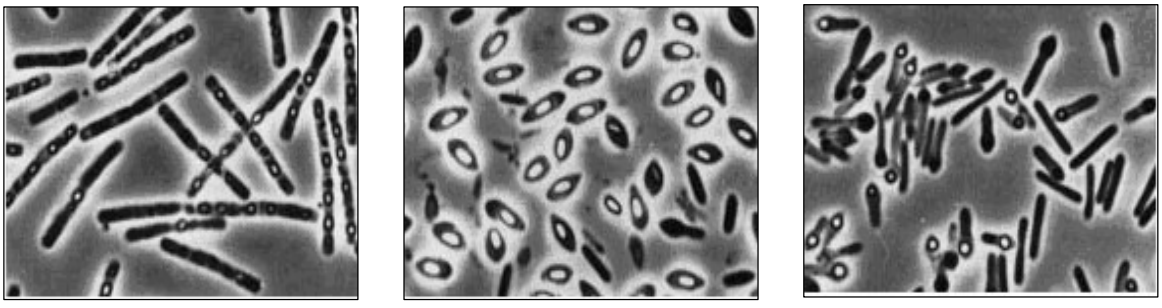
Genre : *Bacillus*

2. 1.3. Selon la morphologie/position de la spore : **(Drobniewski, 1993).**

Selon **(Gordon et *al*., 1973)**. Les espèces du genre *Bacillus* sont classées, selon la morphologie de la spore et du sporange, en trois groupes (Tableau N°I et Figure N°1).

Tableau I : Classification morphologique du genre Bacillus selon (Gordon et *al*.,1973).

Groupes	Caractères	Espèces
I	Bacilles à Gram positif, à spore centrale ou terminal, sphérique ou ovoïde non déformante subdivisé en :	
	-Sous-groupe IA : Bacilles d'un diamètre supérieur à 1 µm et contenant de l'inclusion poly-béta-hydroxybutyrate.	*B. anthracis , B. cereus, B. megaterium, B. mycoïdes, B. pseudomycoïdes, B. thuringiensis, B. weihenstephanensis.*
	-Sous-groupe IIA : Bacilles d'un diamètre inférieure à 1 µm et dépourvus d'inclusion de poly-béta-hydroxybutyrate	*B. coagulans, B. firmus, B. subtilis, B. licheniformis, B. pumilus.*
II	Bacilles à Gram variable avec une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante.	*B. circulans et B. stearothermophilus.*
III	Bacilles à gram variable avec spore sphérique, terminal ou sub-terminal déformante	*B. fusiformis, B. globisporus, B. insolitus, B. spharicus.*



Groupe I **Groupe II** **Groupe III**

Figure 1: Les différents groupes de *Bacillus* en fonction de morphologie de la spore et du sporange. (Gordon et *al*., 1973).

3. Généralités sur le groupe *Bacillus cereus*

Bacillus cereus sensu lato (*B.cereuss.l.*), aussi couramment appelé le groupe *B.cereus* est composé de 9 espèces étroitement liées de point de vue génomique *:B. cereus sensu stricto (ou B. cereuss.s.), B. anthracis, B. thuringiensis, B. weihenstephanensis, B. mycoides, B. pseudomycoides, B. cytotoxicus, B. toyonensis et l'espèce Bacillus wiedmanni*décrite récemment ***(*Miller et *al*., 2016)**. D'autres espèces ont également été décrites, mais pas (encore) validées (notamment *Bacillus gaemokensis****(*Jung et *al*., 2010),** *Bacillus manliponensis***(Jung et *al*., 2011),** *Bacillus bingmayongensis* ***(*Liu et *al*., 2014).**

Les espèces constituant ce groupe sont Gram-positive, formant des bâtonnets, aérobies ou anaérobies facultatives. Elles présentent un génome avec un faible pourcentage en bases GC (environ35%). Elles produisent des endospores et peuvent être mobiles grâce à une ciliature péritriche.

Les *B. anthracis* et quelques *B. mycoïdes* sont non-mobiles **(Stenfors and Granum, 2001),** Leur structure est constituée d'une membrane interne et d'un peptidoglycane épais qui a la fonction de maintenir la forme de la cellule.

En dehors du sol qui est leur réservoir primaire, elles peuvent coloniser des insectes et des mammifères **(Ceuppens et *al*., 2013 ; Jensen et *al*., 2003; Stenfors Arnesen et *al*., 2008)**. L'hôte est contaminé par des spores ou des cellules végétatives, présentes dans les aliments ingérés, l'air inhalé, ou pénétrant dans l'organisme par une plaie. Après germination, les bactéries se multiplient à l'intérieur de l'hôte en le dégradant (provoquant ou non sa mort). Elles sont ensuite disséminées dans l'environnement (par l'intermédiaire de l'hémolymphe, du sang, ou des selles de l'hôte), où elles sporulent **(Jensen et *al*., 2003; Vilas-Bôas et *al*., 2007).** Parallèlement à ce cycle de vie pathogène, **Jensen et al**, suggèrent l'existence d'un cycle endosymbiotique dans l'intestin d'invertébrés **(Jensen et *al*., 2003)**.

Les bactéries du *groupe B.cereus* présentent les caractéristiques biochimiques suivantes:

- Résistance à la polymyxine.
- Incapacité à métaboliser le mannitol.
- Synthèse d'une lécithinase (phospholipase C) par la plupart des souches.
- Morphologie caractéristique des colonies en « tâchede bougie », très semblable à celle d'une goutte de cire, ou sont rhizoïdes pour *B.mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes*. Les colonies Rhizoïdes ont un aspect ressemblant à de longs cheveux ou à des racines qui peuvent se Prolonger de plusieurs centimètres à partir du site d'inoculation.

- La plupart des souches du groupe *B. cereus* sont hémolytiques et environ 50% peuvent hydrolyser l'amidon **(Cadel Six et *al*., 2012**).
- Les souches de *B. anthracis* sont généralement non-hémolytiques.

B. cereus, B. thuringiensis et B. anthracis revêtent un intérêt particulier sur le plan industriel et d'un point de vue de santé publique, certaines souches ayant été même caractérisées sur la station spatiale internationale ISS **(Venkateswaran et *al*., 2017**), et sont par conséquent les 3 espèces étudiées en profondeur.

- *B. cereus* : est un pathogène opportuniste, responsable de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques **(« Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2016. » 2016)**, et d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques par le biais de son entérotoxine (**Kolsto et *al*., 2009).**
- *B. thuringiensis* : Est un entomopathogène bien connu. Il produit lors de la sporulation, d'un cristal parasporal qui fait de lui un important agent dans le contrôle biologique **(Ishiwata et *al*., 1901 ; Soberon et *al*., 2007).**
- *B. anthracis* : Ce pathogène est une zoonose responsable de l'anthrax par action de sa toxine et sa capsule codée par le plasmide pXO1 et pXO2 respectivement (**Read et *al*., 2003 ; Kolsto et *al*., 2009)**.
- *Bacillus weihenstephanensis :* Bactérie psychro-tolérante qui se développe à une température inférieure à 7°C. Capable de produire la toxine émétique **(StenforsArnesen et *al*., 2011 ; Guérin et *al*., 2017).**
- *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides* sont deux espèces non pathogènes communément associées aux système racinaire des plantes **(Bargabus et *al*., 2002; Yi et *al*., 2018).** Elles ne se distinguent que par leur composition en acides gras **(Oliwa-Stasiak, et *al*., 2011)** .
- *Bacillus cytotoxicus* : possède un gène cytK-1 codant pour une entérotoxine propre à cette espèce pouvant entraîner des toxi-infection alimentaires collectives **(Guinebertière et *al*., 2013; Lapiduset *al* .,2008,Lopezet *al*.,2015).**
- *Bacillus toyonensis :* Espèce non pathogène, utilisé comme probiotique pour certains animaux **(Jiménez *et al.*, 2013).**
- *Bacillus wiedmannii :* Cette espèce présente les caractéristiques de ne pas fermenter le saccharose et de ne pas cataboliser l'arginine, ce qui la différencie des autres membres du groupe *B. cereus* **(Miller et *al*., 2016).**

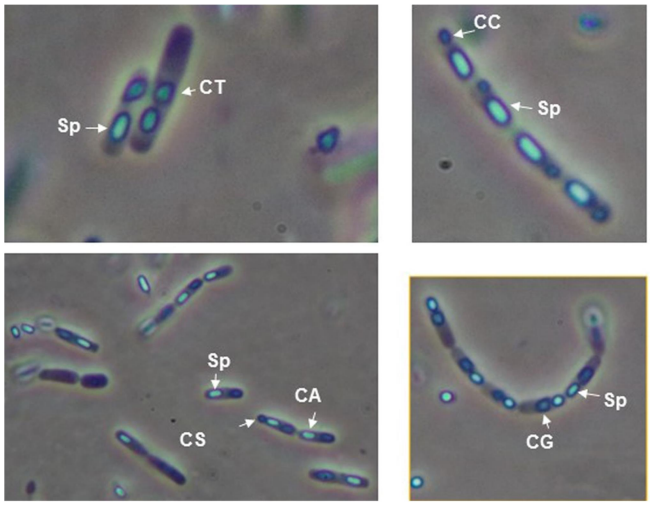


Figure 2: Image représentant l'aspect de quelques souches de *B. thuringiensis* sous microscope photonique à contraste de phase (Nikon Eclipse E400) au grossissement Gx100 à l'état frais, sans coloration. Sp : spore, CT : cristal triangulaire, CC : Cristal carré, CG : Cristal géométrique, CS : cristal sphérique, CA : cristal de forme allongée **(Djenane *et al.*, 2017)**

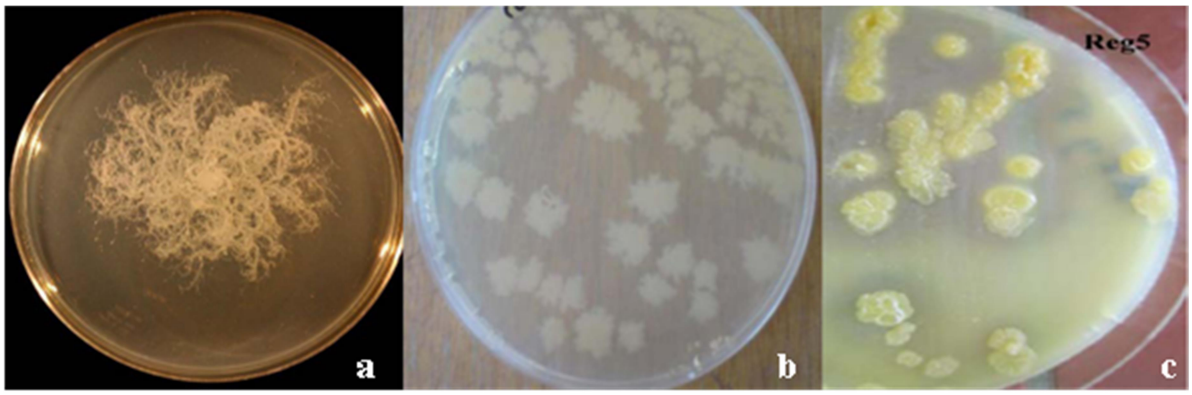


Figure 3: Aspect marcoscopique (colonies) de quelques souche de *Bacillus* sp. : (a) : rhizoides de *Bacillus mycoides* sur milieu "TYA" (Tryptone Yeast Agar), (b) : colonies rondes opaques crèmes de *Bacillus thuringiensis*, (c) : colonies sèches, rugueuses irrégulières. **(Djenane et al., 2017)**

4. L'évolution de la classification de groupe *Bacillus cereus*

La taxonomie du groupe *B.cereus* est complexe et controversée car les caractéristiques phénotypiques discriminantes entre les différentes espèces ne sont pas stables et leurs déterminants génétiques peuvent être échangés, y compris au sein de matrices alimentaires **(Van der Auwera et *al*., 2007).**

Dans un premier temps, les espèces ont été classifiés en utilisant des approches phénétiques telles que les caractères morphologiques (forme, position de la spore, forme de la colonie), physiologiques (composition des cellules), biochimiques (test API) et nutritionnels

(Berkeley et *al*., 1984 ; Gordon et *al*., 1973 ; Logan et Berkeley 1984; Smith et *al*., 1952; Stackebrandt et *al*., 1987). Puis Avec l'essor de la biologie moléculaire, l'approche phénotypique de la classification des microorganismes a laissé place à une classification génotypique fondée sur l'analyse des gènes. Actuellement, la plupart des stratégies utilisées pour établir une classification phylogénétique des souches repose sur des analyses moléculaires basées sur des hybridations ADN-ADN **(Wang et *al*., 2007)** et sur la comparaison des séquences d'ARN ribosomiques (ARN16S) **(Ash et *al*., 1991; Awad et *al*., 2007)**. En effet, le gène de l'ARNr16S est fortement conservé au sein de la famille des Bacillaceae **(Gürtler et Stanisich, 1996, Kolbert et Persing, 1999)**. De plus, plusieurs études ont mis évidence l'hétérogénéité des allèles, ce qui rend l'utilisation d'une seule copie du gène ARNr16S discutable. Actuellement, il est admis que deux souches appartiennent à la même espèce si elles présentent 97% d'identité de séquences d'ARN ribosomaux 16S et 23S et plus de 70% de réassociation lors d'une hybridation ADN/ADN **(Vandamme et *al*., 1996; Stackebrandt&Goebel 1994).**

Plusieurs études basées sur différents types d'analyses tels que le séquençage du gène panC, le typage moléculaire M13-PCR dérivé de la RAPD, l'électrophorèse en champ pulsée, le typage génomique multilocus, le séquençage de génome complet, la spectrométrie de masse MALDI-TO Font montré que ces espèces se répartissent en sept groupes phylogénétiques, **(Guinebretiere, et *al*., 2008, Tourasse, et *al*., 2011).**

4.1. Séquençage partiel du gène panC :(Guinebertière et *al*., 2008)

La classification moléculaire la plus répandue du groupe *B. cereus* se base sur le séquençage du gène de ménage panC qui code la pantoate-bêta-alanine ligase C **(Guinebertière et al.,2008)**. Les séquences consensus ont été comparées en utilisant le programme d'alignement multiple CLUSTAL 1.8. Un arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode « Neighbour-Joining » (NJ), et à l'aide du logiciel « NJplo ».

4.2. Le typage moléculaire M13-PCR dérivé de la RAPD : (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003)

Les méthodes de typage moléculaire rapide utilisant la PCR telle que la RAPD (RandomAmplifiedPolymorphic DNA) sont utilisées pour le typage de souches du *groupe B. cereus*. Ces méthodes sont reconnues pour être de bons outils pour distinguer les souches entre elles et tracer des contaminations à *B. cereus.* La méthode de typage M13-PCR, dérivée

de la RAPD, se base sur la PCR du coliphage M13 18 afin d'obtenir des profils moléculaires permettant d'étudier la diversité génétique des souches

Dans le cas d'études intra-laboratoire, la méthode M13-PCR est appropriée car elle permet une caractérisation rapide, facile, discriminante et peu chère d'un grand nombre de souches (**Guinebretiere and Nguyen-The, 2003)**

4.3. PFGE (Otlewska et *al*., 2013).

La PFGE pour « Pulsed Field Gel Electrophoresis » est une technique de typage moléculaire très discriminante. Cette méthode permet de séparer les grands fragments d'ADN (>15kb) obtenus après une restriction enzymatique et présente l'avantage d'analyser la totalité du génome. **(Merzougui et *al*., 2013) (Zhong et *al*., 2007) (Otlewska et *al*., 2013).**

4.4. MLST (Cardazzo et *al*., 2008; Didelot et *al*., 2009; Helgason et *al*., 2004; Hoffmaster et *al*., 2008; Priest et *al*., 2004).

La méthode « multilocussequencetyping » (MLST) est une méthode de typage moléculaire des souches bactériennes se basant sur le séquençage de plusieurs gènes **(Maiden et *al*., 1998).** En fonction de la séquence de chaque gène et des variations nucléotidiques, les souches se voient attribuer un profil allélique ou « séquence type » (ST). Ce ST permet de différencier les souches entre elles et de faire des études phylogénétiques.

4.5. MALDI-TOF (Böhm, 2012; Fiedoruk et *al.* ,2016; Lasch et *al*., 2009).

Les méthodes décrites précédemment sont efficaces et utilisées pour caractériser les souches du groupe *B. cereus*, mais leur mise en œuvre prend beaucoup de temps et nécessite des cultures bactériennes et des isolements sur milieu sélectif, la méthode basée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'identification bactérienne en milieu clinique **(Singhal et *al*., 2015).** La technique est basée sur la caractérisation des signaux de masse spectrale de protéines très abondantes possédant des fonctions de ménage.

D'une façon générale, toutes ces techniques suggèrent que les différentes souches du groupe *B. cereus* présentent un haut niveau de similarité génétique, ce qui ne permet pas de distinguer les espèces entre elles et conduit parfois à une identification erronée.

Tableau II : les sept groupes phylogenetiques de B.cereus (Guinbretiére et *al*.,2008).

Groupes Espèces	Espèces	Association à des toxi-infections alimentaires	Températures (°C) de croissance	Résistance des spores*	Observations “
I	*B.pseudomycoides*	Non	10-40	Nd	Mésophiles;colonierhizoïdes sur agar
II	*B.cereusII, B.thuringiensis II*	Oui	7-40	++	La plupart des souches sont psychrotolérantes. Le variant psychrotolérant du gène cspA est absent
III	Souches émétiques *B.cereusIII, B.thuringiensisIII B.anthracis*	Oui	15-45	+++	Mésophile
IV	*B.cereusIV, B.thuringiensis IV*	Oui	10-45	++	Mésophile
V	*B.cereusV, B.thuringiensis V*	Oui	8-4	++	Mésophile
VI	*B.weihenstephanensis B.mycoides B.thuringiensis VI*	Non	5-37	+	Toutes les souches sont psychrotolérantes. Le variant psychrotolérant du gène cspA est présent
VII	*B. cytotoxicus*	Oui	20-50	+++	Thermotolérant, très peu de souches de ce groupe ont été trouvées, mais très souvent associées à des toxi-infections alimentaires

nd : non determiné

*: Classement établit par **(Afchain et *al*., 2008); (Carlin et *al*., 2006).**

“: CspA : Major Cold Shock Protein A

5. Les biomolécules synthétisés par les souches du groupe *B.Cereus*

Plusieurs toxines, enzymes et métabolites sont synthétisés par les différentes souches de groupe *Bacillus* sensu lato, qui ont des plusieurs application choix dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, environnementale et en agriculture **(Pérez García, Romero and deVicente2011),** comme probiotiques pour les animaux et les humains **(Lodemann et *al*.,2008),** et ils constituent une source d'antibactérien et composés antifongiques **(Gebhardt et *al*.,2002).** De plus, ils sont même évalués comme agent de lutte biologique pour réduire les infections liées à la santé **(Vandini et *al*., 2014)** ou même les ravageurs des plantes **(Lambert and Peferoen ,1992).**

Aussi certaines molécules sont utilisées comme anticellulaires (lutter contre le cancer) tel que les parasporines.

5.1. La toxine émétique

Le céreulide est la toxine responsable du syndrome émétique lors de son ingestion dans l'aliment, c'est un peptide toxique, très stable à la chaleur et au pH extrêmes n'est détruite ni par la cuisson, ni par les enzymes digestives. il est produit pendant la phase stationnaire de croissance **(Thorsen et *al*., 2009).**

Le céréulide induit l'apoptose de plusieurs types cellulaires **(Jääskeläinen et *al*., 2003; Virtanen et *al*.,2008)**, en particulier les cellules hépatiques **(Yokoyama et *al*., 1999)** et les cellules NK de la réponse immunitaire **(Paananen et *al*., 2002),** puis il se lie aux récepteurs de la sérotonine dans l'estomac et dans l'intestin grêle et stimule le nerf vague, qui contrôle les mouvements musculaires dans l'intestin qui cause le vomissement spécifiques **(Agata et *al*., 1995).**

5.2. Les entérotoxines

➢L'hémolysine BL (Hbl) : est constituée de trois sous-unités distinctes nommées L1, L2 et B, requises pour permettre son activité maximale **(Douglas J Beecher, Schoeni, et Wong, 1995).**La toxine Hbl possède également une activité hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et augmente la perméabilité vasculaire, et peut être la cause de sévères endophtalmies**(D. J. Beecher et *al*., 2000 ; Callegan et *al*., 2003).**

➢L'entérotoxine non-hémolytique Nhe: elle estconstituée de trois sous-unités: NheA, NheB et NheC. **(Lindback, 2004).**Cette toxine capable de crée des poreset ainsi de perturber l'intégrité de la membrane plasmique des cellules épithéliales.

➢La cytotoxine K (CytK) : est présente sous deux formes distinctes CytK-1 et CytK-2. Diffèrent par leur activité biologique. CytK-1 est plus toxique que CytK-2 pour les cellules Véro et pour les cellules CaCo2. Cette toxine représente de ce fait un risque plus important pour l'homme **(Guinebretiere et *al*., 2013 ; Ceuppens et *al*., 2013).**

5.3. Les phospholipases

Induisent une lyse cellulaire par l'intermédiaire d'une activité enzymatique et elles peuvent être associées à la dégradation des tissus **(Drobniewski, 1993).** *B. cereus* produit trois phospholipases C : la phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC), la phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC) et la sphingomyélinase (SM-PLC).c'est deux dernieres peuvent également s'associer, donnant naissance à la céréolysine AB, **(Gilmore et *al*., 1989).**

5.4. Les hémolysines

Outre Hbl, CytK et la céréolysine AB mentionnées précédemment, d'autres hémolysines spécifiques sont produites au sein du groupe *Bacillus cereus*.

➢ **L'hémolysine I**: appelée aussi céréolysine O fait partie de la famille des hémolysines à thiolscausant ainsi la formation de larges pores transmembranaires **(Brillard&Lereclus, 2007).**

➢ **L'hémolysine II** : forme des pores transmembranaires de petite taille capable de perturber la perméabilité membranaire des cellules, conduisant à la libération du contenu et à une apoptose de la cellule**(Andreeva et *al*., 2007 ;Tran, Guillemet, et *al*., 2011 ; Tran, Puhar, et *al*., 2011).**

5.5.δ-endotoxines

Lors de la sporulation, *B. thuringiensis* synthétise des inclusions de cristaux essentiellement composés d'une ou plusieurs protéines cristalines (toxine Cry) et cytolytiques (toxine Cyt) (**Girard et *al* ., 2008).** Les génes codant pour les toxines Cry et Cyt sont localisé sur des plasmides conjugatifs et sont generalement flanqués d'élément transposable (**Bravo et *al*.,2007).**

➢ **Les protéines Cry**

Ce sont synthétisées sous forme de protoxines Au cours de la sporulation par la plupart des souches de *B. thuringiensis.* La pathogénèse commence par l'ingestion du cristal de *B. thuringiensis* par des larves phytophages, qui est solubilisée par le Ph alcalin de l'intestin des

insectes. Les toxines Cry vont alors former des pores transmembranaires ou des canaux ioniques sur les cellules épithéliales de l'intestin et conduire à une lyse cellulaire osmotique.

Höfte et Whiteley (1989) proposèrent une nomenclature des gènes *cry* établie en fonction du degré de similitude des séquences en acides aminés et du spectre d'action des protéines correspondantes. Quatre classes de protéines Cry furent définies :

- Classe I : Spécifique des Lépidoptères.
- Classe II : Spécifique des Lépidoptères et des Diptères
- Classe III : Spécifique des Coléoptères
- Classe IV : Spécifique des Diptères.

Une nouvelle classification fondée sur la similitude des séquences en acides aminés des protéines composant le cristal sans tenir compte du spectre d'action s'est installée **(Crickmore*et al.,* 1998).**

Tableau III:toxines Cry et l'insecte cible (Baute, T.,2004).

Toxines cry	**Insectes ciblés**
Cry1Ab,Cry1Ac, cry9C	Pyrale du maïs
Cry1Aa,	Fausse-teigne des crucifères, Fausse arpenteuse du chou, Légionnaire d'automne
Cry3A,cry3C	Doryphore de la pomme de terre
Cry3Bb1	Chrysomèles des racines du maïs
Cry4	Moustiques et mouches noires

- **Les protéines Cyt**

A la différence de proteines Cry, les proteines Cyt ne nécessitent pas des récepteurs membranaires spécifiques. L'activité toxique implique les mêmes étapes que les toxines Cry : solubilisation, activation protéolytique et insertion dans la membrane **(Sayyed et *al.,* 2004).**

5.6. Bêta-exotoxine

La β-exotoxine ou thuringiensine est un composé de nature non protéique, extracellulaire, thermostable et non spécifique. Elle est un analogue de l'adénine qui inhibe l'activité de l'ARN polymérase en se substituant à l'ATP, provoquant l'inhibition de la

synthèse de l'ARN (**campel et *al.* ,1987).** La β-exotoxine est toxique pour de nombreuses espèces d'insectes, .En raison de sa toxicité pour les vertébrés, la plupart des préparations commerciales de *B.thuringiensis* sont préparés à partir d'isolats qui ne produisent pas de β-exotoxine **(Espinasse et *al*., 2003).**

5.7. Les protéines Vips (Vegetative Insecticidal Proteins)

Les toxines Vip sont synthétisées durant la phase végétative de certains souche de *B.thuringiensis*, sont des protéines insecticides qui peuvent être utilisés séparément comme biopesticides **(Estruch et *al*.,1996)**. Il existe actuellement 4 familles de gènes *vip*, communément nommés *vip1*, *vip2*, *vip3* et *vip4* (**Crickmore et *al*., 2014*)*** les proteines Vip1 et Vip2 ont une activité contre les coléoptères,par contre la protéine de type Vip3 montre une toxicité élevée contre les lépidoptères **(Estruch et *al*., 1996**; **Sellami et *al*., 2013**). Les données relatives à la protéine Vip4 demeurent encore inconnues.

5.8. Les parasporines

Mise en évidence pour la première fois par **Mizuki et *al*., en 2000.** C'est un ensemble des protéines Cry synthétisées par certaines souches de *Bacillus thuringiensis* non hemolitique Elles sont caracterisées par leur forte activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses humaines de diverses origines **(Ohba et *al*., 2009).** Uniquement lorsqu'elles sont dégradé par des protéases, les parasporines exercent leur activités cytotoxique **(Chan KK et *al*. 2012; Nagamatsu et *al*., 2010).**

5.9. Les exoenzymes

Les exoenzymes de *B. thuringiensis* ont un rôle à jouer pour la pathogénicité chez l'insecte et non sur les vertébrés contrairement aux entérotoxines et aux hémolysines, Les exoenzymes les plus importantes restent les chitinases et les protéases.

- **La chitinase** : est une enzyme qui dégrade la chitine qui est une composante de l'exosquelette des insectes ainsi qu'une composante des champignons. Il a été suggéré que la chitinase accroîtrait la toxicité de Bt par perforation de la membrane péritrophique de l'intestin moyen des larves et l'augmentation de l'accessibilité des δ endotoxines aux récepteurs des cellules **épithéliales (Regev et *al*., 1996 ; Huber, Cabib et *al*., 1991; Sampson and Gooday, 1998 ;de la Vega, Barboza-Corona et *al*., 2006).**

- **La protéase :** L'activité des protéases est augmentée durant la phase post-exponentielle, **(Andrews, Bibilos et *al*., 1985).** Les protéases de *B. thuringiensis* ont un rôle à jouer autant dans la croissance et la sporulation que dans la toxicité de la bactérie chez l'insecte (**Brar, Verma et *al*., 2007).**).. Les protéases intracellulaires influencent la toxicité de *B. thuringiensis* en activant les protoxines, mais aussi en affectant le système de défense de l'insecte **(Brar, Verma et *al*., 2007)**. Quant à elles, les protéases extracellulaires de *B. thuringiensis* n'ont pas d'action sur la toxicité de celle-ci, mais plutôt sur la concentration des protéines cristallines.

5.10. Les bacteriocines

Les bactériocines sont des protéines ou des complexes de protéines Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique **(Taale, 2016).** Le mode d'action des bactériocines sur une bactérie cible se fait par adsorption sur la surface cellulaire suivie d'un effet létal bactériostatique ; un effet bactéricide au cours duquel les bactéries meurent tout en gardant leur intégrité physique car il n'y a pas eu de lyse cellulaire et un effet bactériolytique conduisant à une dissolution de la cellule bactérienne.

Parmi les bacteriocine produit par *B.thuringiensis* on trouve : la thuricine,latochicine,Bacthuricine F4,Morricine269.

5.11. Les antibiotiques et les antifongiques

- **Zwittermicine A :** c'est un antibiotique de type polyol linéaire de 396Da produit par nombreuses espèces de Bacillus lors de la sporulation .Il exerce diverses activités biologiques **(silo suh et *al*., 1998).** Soit un bon suppresseurs des maladies phytopathogénes causés par les protistes, les champignons ou même les insectes ravageurs **(handelsman et *al*., 1990).** ont démontré son rôle dans l'atténuation des maladies de luzerne causée par certains protozoaires. En effet, **Kevany et al. (2008)** ont confirmé l'effet antibiotique de la zwittermicine sur les bactéries Gram + et Gram- ainssi que les champignons. **(silosuh et *al*.,1998 ; Rrogers et *al* .,2008** ; **Broderick et *al*.,2003).**
- **Les fongycines :** Les fongycines sont des lipopeptides cyclique composés d'un décapeptide. Les fongycines ont une activité antifongique contre les champignons filamenteux et agissent dans des activités de lutte contre les phytopathogenes**(Chtioui, 2011 ;Yu Li et *al*.,2012 ;Pathak et *al*.,2012 ; Ait Kaki, 2014).**

6. Quelques applications biotechnologiques des biomolécules synthétisées naturellement par *Bacillus spp*

Plusieurs propriétés physiologiques du genre *Bacillus* en font un organisme prometteur : sécrétion d'enzymes lytiques, biosynthèse d'antibiotiques, de vitamines, d'acides aminés et d'autres agents pathogènes ou toxines d'insectes. Ainsi, certaines de ces molécules impliquent divers secteurs économiques à l'échelle mondiale, tels que : les secteurs de l'industrie, de l'agroalimentaire, de l'environnement et de la pharmacie.

6.1. Domaine industriel

Les espèces de *Bacillus* sont considérées comme une source d'enzymes industrielles. La découverte de nouvelles enzymes fonctionnant dans diverses conditions physiquo-chimiques offre une variété d'options pour les applications biotechnologiques**.**

6.1.1. L'industrie des détergents

Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle) et les produits de nettoyage pour usage industriel.

Les lipases synthétisées par *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus coagulans* **(Alkan*et al.,* 2007)** ou des protéases synthétisées par *Bacillus stearothermophilus, Bacillus aquimaris* **(Shivanand*et al.,* 2009).** ont trouvé une large application dans l'industrie des détergents ainsi une « alkaline-serine protéase », est le plus important détergent dans le marché, elle est synthétisée par *B. Clausii*, *B. amyloliquefaciens* et *B. halodurans* **(Shallmey*et al.,* 2004 ; Saeki*et al.,* 2007).**

Des amylases α produit par l'espèce *Bacillus Aspergillus* et *Bacillus licheniformis* et des cellulase produit par *Bacillus.sp*

6.2. Industrie agroalimentaire

- L'α-amylase et β-glucanasecriblée à partir de *B.amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, **(Schallney et *al*., 2004 ; Gangadharan et *al*., 2009 ; Chi et *al*., 2010).** Est utilisé surtout dans la glucoserie .
- protease dans la Clarification de la bière et dans la fabrication de fromage par l'espèce de *B.subtilis* **(Rao et *al*., 1998).**
- La xylynase produit par *B.subtilis* est t utilisé dans la clarification des jus **(Avcioglu et *al*., 2005 ; Sapre et *al*., 2005 ; Nagar et *al*., 2011).**

6.3. L'industrie de transformation de l'amidon

L'hydrolyse de l'amidon est surtout réalisée au niveau industriel par l'utilisation des amylases de *B. amyloliquefasciens et B. licheniformis.*

6.4. Tanneries et Textile

- L'amylase et la protéase de *Bacillus subtilis* ou de *Bacillus licheniformis* sont utilisées régulièrement dans l'industrie des textiles pour leurs diverses proprieté.
- protéases produites par *B. licheniformis*, *B. amyloliquefasciens* est utilisé dans le domaine de tannerie **(Laxman et *al*., 2005).**

6.5. Industrie du papier

- La α-amylase dans l'industrie du papier *Bacillus sp. Geobacillus* **(Fogarty et *al,* 1999).**
- La xylanases produit par *Bacillus sp* **(Tolan, 1996).**

6.6. Domaine pharmaceutique et médical

Devant la recrudescence des maladies bactériennes avec un profil de résistance, l'industrie pharmaceutique s'est tournée vers la recherche de molécules innovantes.

Outre, dans le monde, certaines anthracyclines, angucyclines et dithiolopyrrolones sont connues pour leur activité anticancéreuse.

Les souches de *Bacillus* montrent un pouvoir inhibiteur sur les mycètes pathogènes et/ou phytopathogènes (*Sclerotiniasclerotiorum, Monilisp, Penicillium sp, Aspergillus flavus et Aspergilusniger)*. Cette action est due principalement à la synthèse de la bacillomycine D,iturine A, la surfactine, la mycosubtiline, la fengycine **(Athukorala et *al*., 2009).** Ou même de certains enzymes (Chitinase et Acyle-homoserinelactonase) ou antibiotique (Zwittermycine**). (Dong et *al*., 2002 ; Kevany et *al*., 2008 et Han et *al*., 2010).**

Certains antibiotiques rares sont produits par des souches du genre *Bacillus* : la gramicidine S Enfin, la synthèse de molécules anti-tumorales a été démontrée chez certaines souches de *B.thuringiensis*. (**Mizuki et *al*., 2000 ; Ohba et *al*., 2009 ; Okumura et *al*., 2010)** et certaines espèces marines de *Bacillus sp* **(Lim et et *al*., 2010).** (*Bacillus brevis*), la bacitracine (*Bacillus subtilis*), la polymyxine B (*Bacillus polymyxa*).

6.7. Lutte biologique

Bacillus thuringiensis (Bt) produit une protéine toxique sélective (δ-endotoxine), regroupe les protéines Cry et les protéines Cyt *B.thuringiensis* est le bio-insecticide le plus

utilisé à travers le monde puisqu'il représente un moyen efficace et écologique pour contrer les insectes nuisibles.

Il existe aussi d'autres protéines insecticides qui ont une activité contre les coléoptères.

On retient trois applications majeures concernant cette bactérie. D'abord, la bactérie sert à contrôler les insectes défoliants en foresterie. Elle est également utilisée pour le contrôle des insectes vecteurs de maladies microbiennes (lépidoptères, des diptères et descoléopteres).

Finalement, on s'en sert pour fabriquer certaines plantes transgéniques résistantes à plusieurs espèces d'insectes **(Roh et *al*., 2007).**

En plus de synthétiser bon nombre de protéines insecticides, *B.thuringiensis* produit aussi d'autres métabolites tels des antibiotiques et antifongiques. Ces métabolites peuvent notamment servir aux plantes pour les aider à lutter contre certains champignons ou bactéries néfaste telle que : la zwittennicine A, les thuricines, la tochicine**, (Silo-Suh, Lethbridge et *al*., 1994).**

7. Quelques effets indésirables des métabolites bactériens

7.1. Maladies dues aux toxines synthétisées par quelques souches du groupe *B. cereus*

- **Infections gastro-intestinales**

B. cereus, *B. cytotoxicus* et *B. thuringiensis* peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) chez l'Homme en provoquant des infections gastro-intestinales. Les infections gastro-intestinales sont de deux types différents au niveau des symptômes et de leur origine.

Le syndrome diarrhéique : est causé par une intoxication résultant de la synthèse de toxines par la forme végétatives des bactéries dans l'intestin. Les bactéries sous forme de spores ou de cellules végétatives peuvent être présentes dans des produits laitiers, des purées de légumes, des crudités, ou des plats à base de viande. Elles sont le plus souvent ingérées sous forme de cellules végétatives mais aussi sous la forme de spores **(Clavel *et al.,* 2004)** qui, une fois dans l'intestin, germent, se multiplient, et produisent des entérotoxines.

Les symptômes apparaissent plusieurs heures après ingestion (5 h à 24 h), et se manifestent par des douleurs abdominales et une diarrhée profuse **(Stenfors Arnesen *et al.,* 2008**), et il est généralement bénignes avec une rémission spontanée dans les 24 h, sans traitement.

Le syndrome émétique : Résulte d'une intoxination, elle est provoquée par le céréulide, une toxine synthétisée par *B. cereus* et préformée dans les aliments. Cette toxine cause des nausées et des vomissements survenant rapidement (entre 30 minutes et 6 h après ingestion) et a déjà provoqué des décès, notamment à la suite d'insuffisances hépatiques **(Dierick *et al.,* 2005 ; Mahler *et al.,* 1997)**. Les plats pouvant contenir le céréulide sont généralement à base d'aliments amylacés comme le riz et les pâtes, préparés à l'avance, conservés à température ambiante ou mal réfrigérés, et rapidement réchauffés avant consommation. Les spores de *B. cereus*, toujours présentes dans l'aliment après sa préparation initiale, germent pendant son stockage et produisent la toxine émétique **(Ehling-Schulz *et al.,* 2004)**. Cette toxine est très résistante à la chaleur et n'est pas détruite lors du réchauffage de l'aliment. Elle n'est pas non plus dégradée par le pH acide de l'estomac ni par les enzymes digestives (Alonzo et al., 2015). Il n'a pas été montré que *B. cytotoxicus* et *B. thuringiensis* aient la capacité de synthétiser le céréulide **(Hoton et *al*., 2009 ; Thorsen *et al.,* 2009).**

- **Maladie du charbon (anthrax)**

Le charbon (anthrax) est dû à *Bacillus anthracis*, qui est un microorganisme anaérobie facultatif encapsulé producteur de toxines. Le charbon (anthrax), une maladie souvent mortelle chez les animaux, est transmis à l'homme par contact avec des animaux infectés ou leurs produits. Chez l'homme, l'infection est habituellement contractée via la peau. Les infections pulmonaires sont moins fréquentes; les infections méningées et gastro-intestinales sont rares. Dans les infections par inhalation et les infections gastro-intestinales, des symptômes locaux non spécifiques sont habituellement suivis en quelques jours d'atteintes

généralisées sévères, d'un état de choc et souvent de la mort. Le traitement empirique repose sur la ciprofloxacine ou la doxycycline. Un vaccin est disponible.

7.2. Altérations des aliments

Les altérations d'aliments causées par *Bacillus* sont principalement des défauts organoleptiques telles que des flaveurs désagréables : notes rances, fruitées, levurées, amères **(Meer *et al.,* 1991).**

Ces altérations sont dues à la production d'acides, d'enzymes (telles que des lipases et protéases) et d'autres composés indésirables **(Burgess *et al.,* 2010)**.Il a été démontré que des enzymes extracellulaires de *Bacillus cereus* peuvent avoir des activités d'altération des

aliments. Parmi ces dernières il existe des protéases, et des lipases comme les lecithinases. Par définition, ces enzymes vont respectivement hydrolyser soit des protéines soit des lipides Les aliments les plus décrits pouvant être altérés sont les œufs et le lait pasteurisé.

Dans le lait

Les spores de *B. cereus* sont capables de résister à de fortes températures et donc aux principales méthodes de stérilisation de l'industrie agroalimentaire. Il a été montré que dans le lait UHT (ultra haute température), les spores présentes sont alors activées par ce choc thermique. Les bactéries, qui ont ainsi germé, peuvent alors produire des enzymes extracellulaires. Ces enzymes sont produites lors de la fin de la croissance exponentielle ainsi que pendant le début de la phase stationnaire **(Chen *et al.,* 2003)**. Ainsi, il a été montré que la production de ces enzymes extracellulaires est associée à la sporulation **(Chen *et al.,* 2004)**. Ces dernières donnent au lait une flaveur anormale et des défauts de structure **(De Jonghe *et al.,* 2010)**. Les mécanismes altérant les propriétés physiques (microstructure, viscosité) et la flaveur du lait sont complexes. Ils résultent d'une combinaison de réactions physiques, chimiques et biochimiques **(Chen *et al.,* 2003)**.

L'activité protéinase : Dans le lait, les protéinases vont provoquer un clivage des caséines provoquant une désorganisation des micelles de caséine. Ceci entrainant une coagulation du lait **(Chen *et al.,* 2003).** L'activité protéolytique provoque alors un défaut dans le caillage, le «sweet curdling» (**De Jonghe *et al.,* 2010).** L'activité des protéinases est maximale lorsque le pH est alcalin **(Chen *et al.,* 2004**)

L'activité lipolytique : Les enzymes lipolytiques, les lipases, produites par *B. cereus* agissent sur les lipides, notamment les acides gras du lait. Leur action d'hydrolyse est plus efficace sur des acides gras à courte chaîne **(Chen *et al.,* 2004)**. Cette mise en évidence est d'autant plus importante que ce sont ces mêmes acides gras à courtes chaînes qui contribuent le plus à la flaveur du lait **(Al-Shabibi *et al.,* 1964).** Ainsi, cette dégradation donne une flaveur rance et fruitée au lait, tout comme les lecithinases peuvent donner au lait un aspect de crème caillée en raison de l'agrégation des globules gras **(De Jonghe *et al.,* 2010)**

Il a été montré que l'activité des lipases est maximale lorsque le pH est de 7-9. Les lipases produites par une souche de *B. cereus* sont plus stables que les protéases produites par cette même souche **(Chen *et al.,* 2004)**. Les aliments fabriqués à partir de lait sont potentiellement

altérables par *B. cereus*. Parmi ceux-ci se trouvent les crèmes glacées, les fromages et les yaourts. Dans la littérature, **(Chen *et al.*, 2003)** ont montré que même si les bactéries qui

Contaminent le lait ne survivent pas à sa transformation, les enzymes, elles, sont encore plus

Résistantes à la température et peuvent être retrouvées dans du lait déshydraté. Ainsi, nul doute que *B. cereus* apparait comme un véritable danger en industrie agroalimentaire aussi bien d'un point de vue sanitaire qu'économique.

Dans les œufs

La première altération d'aliment a été mise en évidence sur l'oeuf. En effet, il a été montré que lorsque des œufs sont contaminés par des *B. cereus*, le jaune devient alors comparable à « une balle de ping pong » de couleur crème. De plus, l'albumine devient alors marron avec une odeur aigre caractéristique qui peut être associée à celle du fromage **(Colmer, 1948).** Dans les ovo-produits, les bactéries du groupe *B. cereus* sont également responsables d'altération. Les bactéries produisent des lipases et des protéases qui vont être responsables d'une coagulation et d'une décoloration de ces derniers **(Baron *et al.*, 2007)**.

Chapitre II :

Matériel Et Méthodes

II. Matériel et méthodes

Le travail présenté a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département des Sciences de la Nature et de la Vie**,** Université Yahia Farès de Médéa, en collaboration avec le Laboratoire de microbiologie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Les souches microbiennes cibles

Trois souches (R11, H5 et H10) du genre *Bacillus* ont été utilisées pour étudier l'activité enzymatique. Ces dernières ont été isolées préalablement de Sebkha et font partie de la collection de **Ameziane et *al.,* 2014,** équipe de Microbiologie, laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, faculté des Sciences biologiques, Université des Sciences et de la Technologie houari Boumedienne (USTHB).

2. Matériel non biologique

2.1. Appareillage

L'appareillage utilisé est celui retrouvé habituellement dans un laboratoire de microbiologie : verreries, balance électronique, bain marrie, pipettes Pasteur, boites de Pétri, étuve, barreau magnétique, autoclave, agitateur, pH-mètre, réfrigérateur, incubateur, stérilisateur, Spatule, anse de platine, Plaque chauffante et agitateur magnétique (TRADE RAYPA), Appareil photo.

2.2. Les milieux de culture, les solutions et les réactifs

La composition des milieux de culture utilisés pour le criblage de l'activité enzymatique est donnée en (annexe 1). Les milieux utilisés sont :

- ✓ Gélose à l'amidon à 1% : Criblage de l'amylase.
- ✓ Gélose au lait : Criblage de la caséinase (protéase)
- ✓ Gélose au jaune d'œuf : Criblage de la lécithinase, lipase et la lipoprotéase

Remarque :

Ce travail consistait, en plus de criblage des enzymes cités ci-dessus, en un screening de la gélatinase et les hydrolases de tween 80 ainsi que l'identification de pouvoir antibactérien des trois souches vis-à-vis des bactéries et champignons pathogènes et/ou phytopathogènes. Par ailleurs, l'urgence sanitaire du Covid19 ne nous a pas permis de finir le travail, en l'occurrence ce dernier sera envisagé ultérieurement.

2. Méthodes

2.1. Mise en culture des souches bactériennes

2.1.1. Ré-identification des souches bactériennes

2.1.1.1. Revivification

On a ensemencé 5ml de bouillon nutritif à partir des souches bactériennes conservées. Ces derniers sont incubés à une température de 37°C pendant 24h. Cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches.

2.1.1.2 Repiquage et conservation

Les différentes souches bactériennes R11, H10, H05. Ont été repiquées par la méthode d'ensemencement en quadrant ou épuisement de manière à obtenir des colonies isolées, puis incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Cette étape permet la purification des souches bactériennes et l'obtention de culture jeune.

Une colonie bien isolée est ensuite transplanter une colonie bien isolée dans un tube contenant 5ml de gélose nutritive. Les tubes sont incubés à 30°C sous agitation jusqu'à plus de 90% de sporulation (48 à 72 heures). La sporulation est vérifiée au moyen d'un microscope photonique.

La conservation consiste à mettre la culture sporulée dans des cryotubes à glycérol à raison de 15% ou à 50% (conservation à court ou à long terme respectivement). Et les tubes sont stockés jusqu'à éventuelle utilisation.

2.2. Caractérisation macroscopique et microscopique des cultures bactériennes

2.2.1. Mise en culture

Elle se fait à partir d'une culture jeune sur des boites de Pétri coulées au préalable avec une gélose nutritive (GN) comme a été décrit ci-dessus.

2.2.2. Etude macroscopique

Elle consiste à une observation directe à l'œil nu de l'aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose nutritive après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C. Les critères pris en considération sont : la taille, la forme, l'élévation de la colonie, l'aspect en surface, l'opacité, la consistance et la couleur ou pigmentation.

En effet, les souches de *Bacillus* sp. développent des colonies crèmes- blanchâtre non réfringente à surface rugueuse et un contour régulier ou dentelé. Les souches ainsi purifiées, sont repiquées sur deux tubes gélosés dont l'un est conservé à 4°C alors que le second sera utilisé pour les études ultérieures.

2.2.3. Etude microscopique

Elle permet de décrire la taille, la forme, le mode d'arrangement des cellules, l'affinité pour différents colorants (le Gram), la mobilité ainsi que certains éléments importants comme la présence de la spore et des inclusions cellulaires. En effet, elle est d'un apport important pour la classification car la présence et la position de la spore permet de sélectionner les souches de *Bacillus* sp.

2.2.3.1. Observation à l'état frais

Elle consiste à préparer un étalement en déposant sur une lame propre dégraissée, une goutte d'une suspension réalisée dans de l'eau distillée à partir de colonies de 24h de 48h et de 72h de souches de *Bacillus* sp. ainsi isolées et ayant été repiquées sur une gélose nutritive. La préparation est alors recouverte d'une lame couvre-objet. L'observation est réalisée à Gx40 et à Gx100.

La surveillance des cultures à différents temps permet de caractériser les cellules à l'état végétatif (phase exponentielle) ainsi qu'à l'état sporulé. L'observation à l'état frais permet, à la différence de l'état fixée, la détermination de la mobilité.

2.2.3.2. Observation à l'état fixé (Coloration de Gram)

Elle consiste à préparer un frottis mince fixé à la chaleur sur une lame propre et dégraissée. La coloration de Gram est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool, donc sur leur capacité à retenir dans leur cytoplasme, un colorant primaire (violet de Gentiane). Cette différence de perméabilité permet de classer les bactéries en deux grands groupes, Gram négatif ou Gram positif à qui appartiennent, généralement, les souches du genre *Bacillus.*

La coloration se fait en 4 temps :

- La coloration avec le violet de Gentiane pendant 1 minute,
- Le mordançage par un ou deux bains de lugol pendant 45 secondes
- La décoloration avec l'alcool à 96% pendant 30 secondes, suivi d'un rinçage à l'eau courante douce
- La contre coloration avec la fushine pendant 1 minute et rinçage.

Le frottis coloré est séché et observé au microscope photonique à Gx10, Gx40 et Gx100. Les bacilles Gram positifs sont colorés en violet.

2.3. Caractères physicochimiques de la croissance bactérienne et l'activité enzymatique

2.3.1. Influence de la température

L'évaluation de l'effet de la température sur l'activité enzymatique et/ou la croissance des souches bactériennes tests a été effectuée par incubation sur différent milieux de cultures à des températures variées (40°C, 50°C et 60°C).

2.3.2. Influence de la salinité

Dans le but de déterminer la tolérance des bactéries au NaCl ainsi que la stabilité/fonctionnalité des enzymes criblées, les milieux de cultures (gélose nutritive, gélose au lait, gélose à 1% d''amidon et gélose au jaune d'œuf) ont été additionnés de 5% ,10% ,15% de NaCl.

2.3.3. Influence de pH

Pour ce paramètre, les milieux de culture (gélose nutritive, gélose au lait, gélose à 1% d''amidon et gélose au jaune d'œuf) ont été ajustés à différents pH, (5 ,7 et 9), et incubés, après ensemencement, à 30° C, pendant 24h ,48h, 72h.

Remarque

- Une croissance positive se traduit par l'apparition de colonies/culture bactérienne après incubation. Si après une semaine d'incubation à 30°C aucune colonie n'a été observée, la croissance est considérée négative.
- Pour l'activité enzymatique, l'apparition d'un halo autour de la colonie (indiquant la dégradation de substrat de l'enzyme) reflète la synthèse de l'enzyme en question.
- Pour étudier l'influence des différentes conditions physicochimiques sur la croissance et l'activité enzymatique, un seul paramètre est varié, les autres sont maintenu stables.
- Il est à noter que dans notre travail, la stabilité/fonctionnalité des enzymes étudiés en fonction des paramètres physicochimiques dépend de la croissance bactérienne, il s'agit d'une étude qualitative. Dans des étapes ultérieurement, il serait important d'étudier la stabilité des enzymes dans des conditions extrêmes après leur purification.

3. Criblage d l'activité enzymatique

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions métaboliques chez les microorganismes. Cette caractéristique importante pourrait être exploitée dans le domaine industriel d'où l'objectif de notre travail.

Les bactéries du genre *Bacillus* constituent la source majeure d'enzymes hydrolytiques utilisées surtout dans le domaine alimentaire et celui des détergents. Plus des deux tiers des

enzymes produites industriellement par des bactéries, le sont par des espèces du genre *Bacillus* **(Devine, 1995).**

La recherche sur les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles a été abordée par **Nordberg et Hofsten** en **1969.** Ces propriétés ont fait des enzymes halophiles d'excellents Candidats pour différentes applications biotechnologiques dans de nombreux processus Industriels **(Setati, 2010).**

Toutes les enzymes étudiées ont été recherchées sur des milieux de cultures préparés et/ou soumis à différentes conditions physicochimiques de pH, de température et de salinité comme a été expliqué précédemment. Le détail de la préparation des milieux de culture est illustré en (Annexe 1).

3.1. Recherche de l'amylase

Les amylases sont parmi les enzymes hydrauliques (hydrolyser l'amidon), ayant des propriétés fonctionnelles, sont appliquées dans tous processus industriels tel que les aliments, les détergents, et les textiles. Ce test est effectué sur des boites de Pétri contenant une gélose nutritive à 1% d'amidon.

Technique : La gélose à 1% d'amidon est ensemencée par spot, l'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture : Elle nécessite l'ajout du lugol-iodé, ce dernier réagit avec l'amidon du milieu donnant lieu à une coloration bleue-violacée. Les souches produisant une amylase dégradent l'amidon autour du spot ensemencé révélant ainsi un halo clair après ajout du lugol.

3.2. Recherche de la caséinase

Certaines bactéries peuvent hydrolyser la caséine (protéine du lait) grâce à une caséinase : En raison de leur importance commerciale : l'action de conservation due à l'acidification et/ou à l'amélioration de la saveur, la texture. Ce test est réalisé sur un milieu gélosé additionné de lait stérile.

Technique : Des boites de Pétri contenant une gélose au lait (Agar doublement concentré plus 50% de lait stérile) sont ensemencées par spot, l'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture : L'hydrolyse de la caséine se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie résultant de la dégradation de la caséine.

3.3. Recherche de La lécithines, la lipoprotéinase et la lipase

Elles sont appliquées dans des processus industriels comme les additifs détergents, le traitement des rejets industriels, la transformation des produits alimentaire et le processus pharmaceutique, aussi dans la production des produits cosmétiques. (**Schmidt, B. M.,et *al* 2004).**

Le milieu à base de jaune d'œuf est un milieu complexe qui contient des phospholipides, plus particulièrement la phosphatidyle-coline (ou lécithine), des triglycérides et des lipoprotéines. Bien qu'il soit expressément pour la mise en évidence de la lécithinase, il permet aussi une appréciation de la lipase et la lipoprotéinase **(Marchal et al 1982).**

Technique : Le milieu gélosé Trypticase-Soja- Agar (TSA), est additionné d'une émulsion de jaune d'œuf à 10% (v/v avec eau physiologique stérile). Les boites sont ensemencées par spot et incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture

- **La lipoprotéinase :** Elle dégrade les protéines du complexe lipoprotéique ce qui augmente la solubilité des lécéthines et des lipides contenus dans ce complexe. Cette action se traduit par un halo d'éclaircissement autour du spot ensemencé. La recherche de cette enzyme exige une lecture précoce.
- **La lécithinase :** Son action sur la lécithine libère la choline soluble et un triglycéride peu soluble qui précipite dans le milieu créant une zone opaque crème-jaunâtre à bord net autour de la colonie.
- **La lipase :** La dégradation des triglycérides conduit à la précipitation des acides gras donnant lieu à une opacité floue autour de la colonie

Remarque : La lipase conduit à la précipitation d'acides gras donnant lieu à un liseré blanc opaque, pouvant être confondu avec la lécithine (la zone opaque est ici, moins importante que celle de la lécithinase).

Chapitre III :

Résultats

Et

Discussion

III. Résultats et discussion

1. Observation macroscopique

Apres culture sur gélose nutritive à 30°C, on a observé des colonies rondes à bord régulier à irrégulier de couleur beige-blanchâtre, avec un aspect opaque, légèrement bombées, et un diamètre variable (entre 1 à 5mm).

NB : La croissance sur gélose nutritive à 30°C des souches H5, H10 a été observée après 48h alors que la croissance de la souche R11 a été observée après72h.

Ceci indique que le temps de génération de la souche R11 est plus long. Ce paramètre est toujours pris en considération lors de l'exploration des souches en production industrielle car il reflète la vitesse de synthèse des métabolites d'intérêt

2. observation microscopique

- ✓ **Etat frais**

  L'observation des différents frottis a révélé des cellules de forme bacillaire, isolées ou regroupées en chainette, mobiles, et la présence des spores non déformantes.

- ✓ **Etat fixé**

La coloration de Gram a montré que les trois souches étudiées sont des Gram positif.

*l'observation de la forme bacillaire, et la présence des spores, avec la coloration de Gram orientent vers l'affiliation au genre ***Bacillus*** .Une identification biochimique et moléculaire seront envisagées pour une identification plus précise des souches présentant un intérêt biotechnologique.

3. Etude de la croissance bactérienne à différents paramètres physico-chimiques

La croissance bactérienne a été contrôlée chaque 24h pendant une semaine. Ainsi, on considère que la croissance est positive lorsque la taille des colonies à la surface de la gélose est supérieure à 1 mm. Contrairement à une croissance négative qui ne présente aucun développement au bout d'une semaine.

Dans la nature, les paramètres physicochimiques diffèrent selon la niche écologique, les conditions climatiques et géographiques. Au laboratoire, bien que les conditions nutriments et d'incubation utilisées sont toujours proches à celles du milieu où les souches ont été isolées. En revanche, il reste important de tester la croissance des microorganismes dans une large gamme de paramètres physicochimiques.

Sachant que la croissance bactérienne et l'activité de l'enzyme sont deux facteurs différents, dans une étape ultérieure, il serait intéressant de tester la la stabilité des enzymes criblées, après leur purification, dans différents paramètres physicochimiques.

3.1. Influence de la température sur la croissance bactérienne

La température est une variable importante de chaque écosystème. Elle peut avoir effet sur la stabilité des métabolites. Ces derniers, lorsqu'ils sont utilisés dans des procédés industriels doivent maintenir leur fonctionnalité à des températures variables voire extrêmes. En effet, la classification des microorganismes en fonction de leur température optimale de croissance est considérée comme un aspect fondamental de la taxonomie microbiologique **(Wiegel et Canganella, 2001).** Ils sont classés en cinq groupes :

- Les psychrophiles (-5 à 20°C).
- Les mésophiles : (à 45°C) température optimum .entre 30 à 37°C
- Les thermophiles :(45 à 80°C)
- Les hyperthermophiles : (≥ 80 °C)
- Les psychrotrophes : température optimale de croissance < 15°C (**Vieille et Zeikus, 2001**).

Les résultats de la croissance des trois souches à 30°C, 40°C et 60°C sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau VI : Résultats de la croissance bactérienne à différentes températures :

Souches / Température	R11		H5		H10	
	24H	48H/72H	24H	48H	24H	48H
30°C	-	-/+	-	+	-	+
40°C	-	+	+	+	+	+
60°C	-	+	+	+	+	+

Après une période d'incubation de 24h ,48h et72h. On observe que :

- la souche R11 présente une croissance positive après 48h à 40°C et 60°C.
- Les souches H5 et H10 présentent une croissance positive à 30°C après 48h alors qu'à 40°C et 60°C la croissance a été observée plus rapidement, après seulement 24 heures d'incubation.
- On remarque que la souche R11 présente une croissance plus lente.
- On peut dire que les trois souches R11, H5 et H10 sont des bactéries mésophiles à thermophile. Un test de la croissance optimale sur milieu liquide doit être envisagé.

3.2. Influence du pH sur la croissance bactérienne

Selon le pH permettant un développement des bactéries, on observe trois catégories :

- ✓ Les bactéries neutrophiles qui se développent pour des pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7,
- ✓ Les bactéries basophiles se développent dans un pH voisin de 9
- ✓ Les bactéries acidophiles se développent dans un pH allant de 3 à 6.

Les résultats de la croissance des souches R11, H5 et H10 sur GN à différents pH, et incubation à 30°C sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau V: **Résultats de la croissance bactérienne à différent pH.**

Souches / Ph	R11		H5		H10	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
5	+	+	+	+	+	+
7	-	-/+	-	+	-	+
9	-	-	+	+	+	+

On observe que :

- La souche R11 tolère le pH acide en présentant une croissance après 24h sur gélose nutritive à pH5. Aucune croissance n'a été observée sur gélose à pH7 et une faible croissance après 48h d'incubation sur gélose nutritive à pH7.
- On observe que la croissance des souches H5 et H10 dans la gamme de pH étudiée est semblable. Elles se développent après 24h sur gélose nutritive à pH 5 et à pH9 alors que sur la gélose nutritive à pH7, la croissance a été observée après 48h.

On conclue que la souche R11 présente un caractère acidophile alors que les souches H5 et H10 présentent un caractère acidophile et basophile, en même temps.

Il serait important de pousser les pH, selon la tolérance des souches, et de déterminer celui permettant une croissance optimale.

3.3. Influence de la salinité sur la croissance bactérienne

La Salinité est un autre paramètre important influençant la croissance des microorganismes.la concentration en sel ou en sucre présente un effet sur l'activité de l'eau (Aw) et est inversement proportionnelle à la pression osmotique du milieu. En fonction de la concentration du milieu en NaCl, les bactéries sont classées en :

- **Halophiles** : nécessitent du sel (NaCl) pour leurs croissance, 1-6% pour les faiblement halophile et 15-30% pour les halophiles extrêmes)
- **Halotolérantes :** tolèrent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (**Yoon et *al* ., 2003**).

Le tableau suivant représente les résultats de la croissance des souches R11, H5 et H10 sur gélose nutritive présentant différentes concentrations en NaCl (5%, 10% et 15%).

Tableau VI : Résultats de la croissance bactérienne sous différents taux de salinité.

Souches / NaCl	R11		H5		H10	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
5%	-	-	+	+	+	+
10%	-	-	-	-	-	-
15%	-	-	-	-	-	-

On observe que :

- Aucune des trois souches n'a présenté une croissance dans la gélose nutritive à 10% et 15% de NaCl.
- Dans la gélose nutritive contenant 5% de NaCl, Les souches H5 et H10 ont montré une croissance après 24h d'incubation alors qu'aucun développement n'a été observé pour la souche R11.

En prenant en considération la concentration initiale en NaCl de la poudre de GN, on peut déduire que la souche R11 présente un caractère halotolérant alors que les souches H5 et H10 présentent un caractère faiblement halophile.

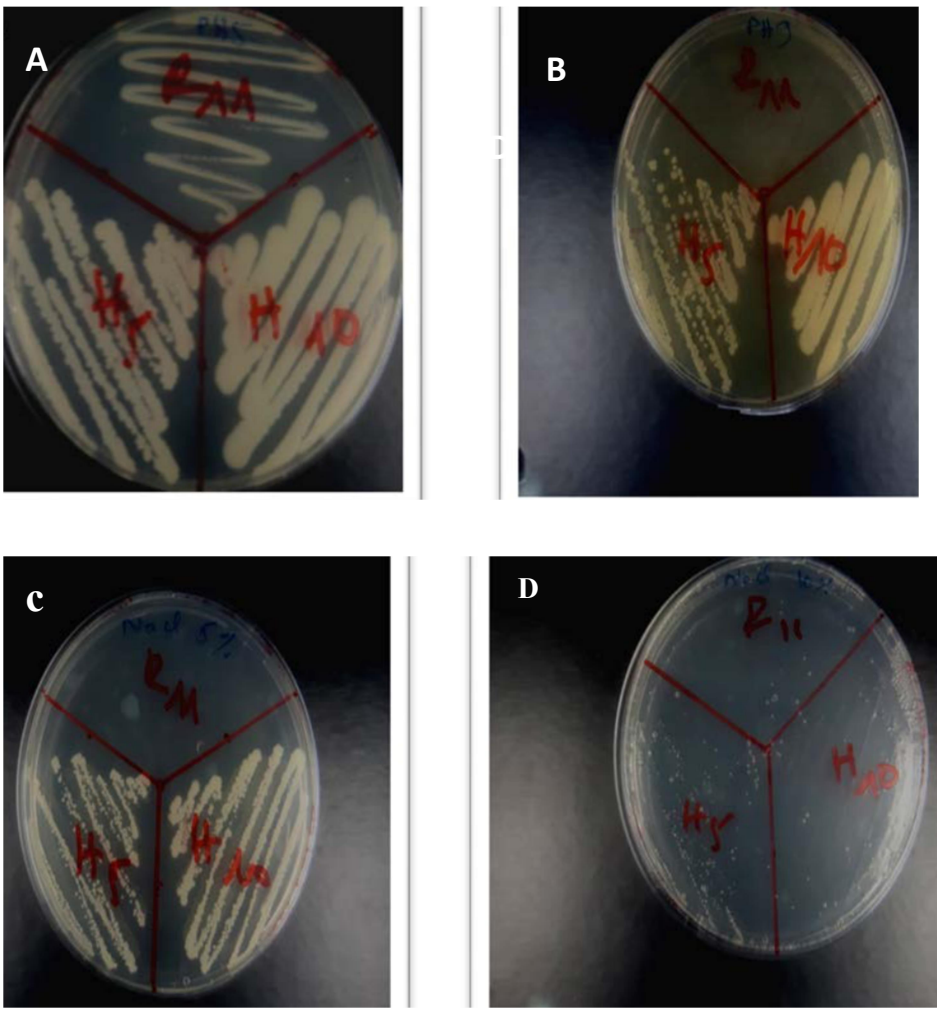


Figure 5: Images représentant l'aspect de la croissance des souches R11, H5 et H10 dans quelques conditions physicochimiques. A : pH5, B : pH9, C : 5% NaCl, D :10% NaCl .

4. Criblage de l'activité enzymatique

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 106 fois, par rapport à la réaction en leur absence **(Granner, 2008).** Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où et jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires **(Bergmeyer et *al.*, 1979 *;* Amaud *et al.*, 1993 *;* Pelmont, 1995 *;* Drouin, 2005**). En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées **(Patel et *al., 2005)***, la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola et *al.*, 2001**).

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale **(Barnabé et *al., 2003*)**.

Les rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de production (**Amaud et *al.*, 1993 *;* Scriban, 1993**). En biotechnologie, on s'intéresse aux enzymes préservant leur stabilité dans différents paramètres physicochimiques et ce en réponse aux procédés industriels qui utilisent, parfois, des conditions extrêmes.

Nous avons évalué la capacité des trois souches du genre *Bacillus* à synthétiser des enzymes extracellulaires, dans différentes conditions physicochimiques de pH (5, 7 et 9), température (30°C, 40°C et 60°C) et de salinité (5%, 10% et 15% de NaCl). L'objectif est d'estimer l'impact du changement des conditions physicochimiques sur la production d'enzyme par les souches testées. Cette dernière consiste en un criblage phénotypique de l'activité enzymatique en question, en utilisant des milieux de cultures spécifiques. Les enzymes que nous avons criblés dans le présent travail sont : l'amylase, la lipoprotéinase, la lécithinase, la lipase et la caséinase (protéase).

4.1. Criblage de l'amylase

Cette enzyme est criblée sur un milieu à base de 1% d'amidon. La synthèse de l'amylase **se** traduit par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie bactérienne, après ajout de lugol iodé. Les résultats sont pris en mesurant le diamètre du halo.

Les résultats sont représentés dans le Tableau VII et la Figure 6

Tableau VII : Résultats de l'activité enzymatique « type amylase »des trois souches étudiées dans différentes conditions physicochimiques.

Souches / **Conditions physicochimique**		**R11(mm)**	**H5(mm)**	**H10(mm)**
Température	**30°C**	**-**	3	*3*
	40°C	**-**	*8*	*4*
	60°C	**-**	*4*	-
Ph	**5**	**-**	*10*	*8*
	7	**-**	*3*	*3*
	9	**-**	*8*	*5*
Salinité	**5%**	**-**	5	6
	10%	**-**	3	2
	15%	**-**	?	?

L'analyse de la synthèse/stabilité de l'amylase en fonction des conditions physicochimique pourrait être résumée comme suit :

- **En fonction de la température**

- La souche R11 était incapable de synthétiser l'amylase.
- A 30°C et 40°C, les deux souches H5 et H10 ont montré une activité amylolytique avec une activité légèrement meilleure pour la souche H5 à 40°C. il peut donc s'agir d'une enzyme à préférence thermophile.
- A 60°C, l'amylase était absente chez la souche H10

- **En fonction du pH**

- La synthèse de l'amylase était négative chez la souche R11 à pH5, 7 et 9.
- Les souches H5 et H10 ont montré une amylase positive dans les trois pH. Une activité plus élevée a été observée à pH5 pour la souche H5 et H10 (10mm et 8 mm respectivement) et à pH9 pour la souche H5 (8mm).
- On peut déduire que l'amylase des souches H5 et H10 peut présenter un caractère à la fois acidophile et basophile.
- On remarque que ce résultat va dans le même sens avec la croissance de ces souches à différents pH.

- **En fonction de la salinité**

- Comme pour la température et le pH, la souche R11 n'a pas présenté une amylase positive dans les différentes concentrations de salinité.
- On observe que les souches H5 et H10 ont présenté une amylase positive dans les milieux contenant 5% et 10% de NaCl. Cette activité était légèrement plus élevée à 5% avec des diamètres de 5mm et 6mm pour les souches H5 et H10 respectivement.

Pour la salinité 15% on n'avait pas la chance de lancer les tests vus les évènements arrivés.

** Les résultats de criblage de l'amylase ont montré que la souche R11 était incapable de synthétiser l'enzyme sous les différentes conditions physicochimiques, quant à l'amylase des souches H5 et H10 a présenté un caractère thermotolérant (40°C), à la fois acidophile et basophile (Ph5 et PH9) et faiblement halophile (5% de NaCl).

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie **(Gupta et *al.,* 2003**). Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes (***Saxena* et *al.,* 2007**). En effet, les amylases possèdent une gamme étendue d'applications tels que les industries de la saccharification d'amidon, le textile, les aliments, la boulangerie, le brassage et la distillation **(Gupta et *al., 2003).*** En raison de l'importance industrielle de cette enzyme,

un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées à de nouvelle applications industrielles **(Burhan et *al*., 2003**).

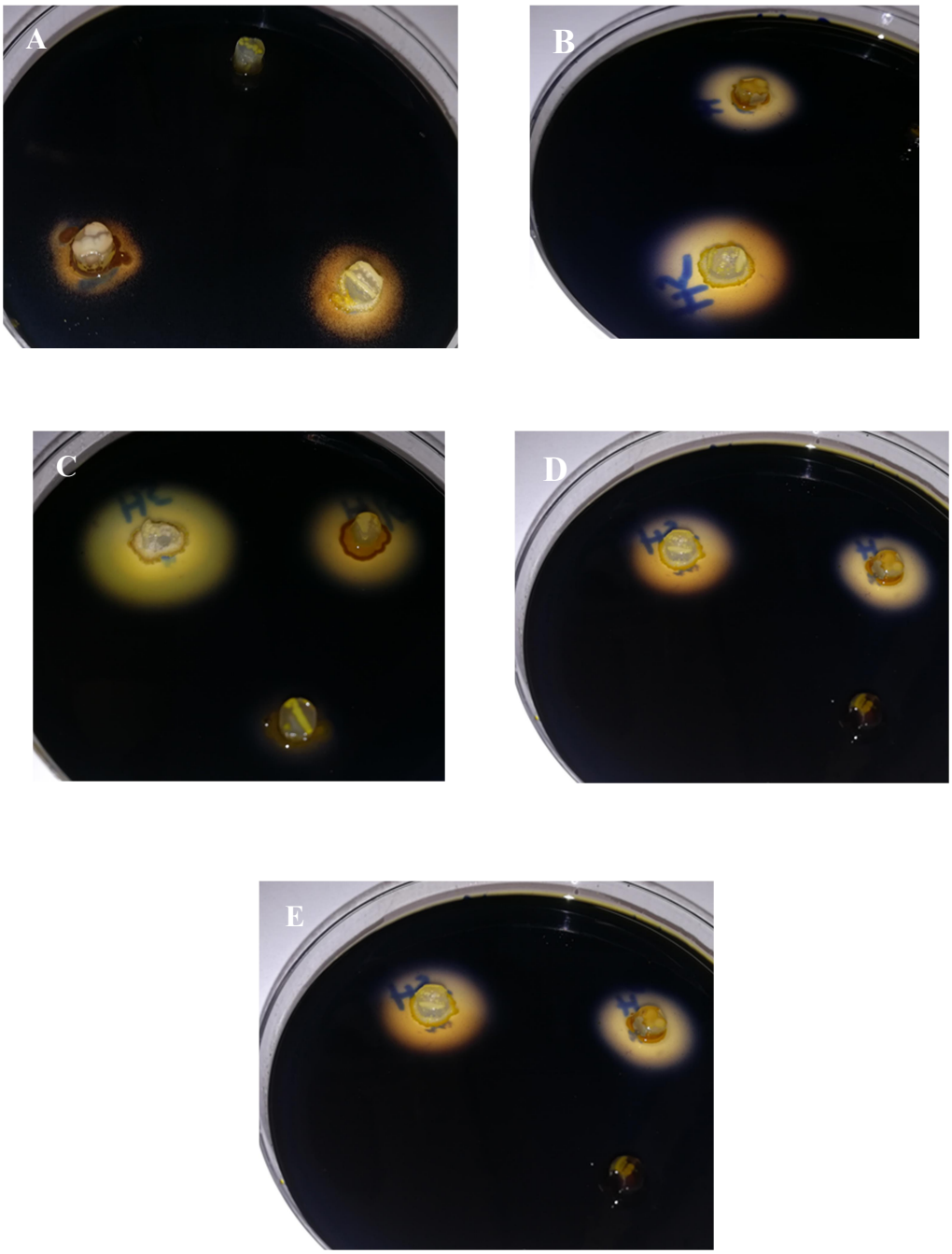


Figure 6 Résultats du test de l'amylase sous différentes conditions physicochimiques. A amylase à (pH7, 30°C) ; B : amylase à pH9, 30°C) ; C : amylase à (pH5, 30°C) ; D : amylaseà NaCl 5% ; E : amylase à 40°C.

4 .2. Criblage de la caséinase (protéase).

Ce test permet la mise en évidence d'une protéinase catalysant l'hydrolyse de la caséine, protéine du lait, sur milieu gélosé additionné de lait stérile, la présence de l'enzyme se traduit par la présence d'une zone claire autour de la colonie résultant de la dégradation de la caséine. Le diamètre mesuré de cet halo reflète l'intensité de l'activité enzymatique.

Les résultats du criblage de la caséinase sous différentes conditions physicochimiques sont représentés dans le Tableau VIII et la Figure 7

Tableau VIII: Résultats de criblage de la caséinase des trois souches R11, H5 et H10 dans différentes conditions physicochimiques.

Souches / Conditions physicochimique		R11(mm-	H5(mm)	H10(mm)
Température	**30°C**	**-**	*10*	*16*
	40°C	**-**	*11*	*13*
	60°C	**-**	-	*7*
Ph	**5**	**-**	*9*	*15*
	7	**-**	*10*	*16*
	9	**-**	*8*	*14*
Salinité	**5%**	**-**	5	12
	10%	**-**	-	-
	15%	**-**	-	-

L'analyse de la synthèse/stabilité de la caséinase en fonction des conditions physicochimique pourrait être résumée comme suit :

- **En fonction de la température**

- La synthèse de la caséinase pour la souche R11 était négative dans les trois températures 30°C, 40°C et 60°C.
- La souches H5 a présenté une activité caséinase élevée (10mm) à 30°C et 40°C. à 60°C la caséinase était absente bien que cette souche a montré une croissance positive après 24h à 60°C. Ceci indique que cette enzyme ne préserve pas sa fonctionnalité et n'est donc pas thermostable.
- La synthèse de la caséinase chez la souche H10 était plus importante comparée à la souche H5 (16mm à 30°C et 13mm à 40°C). De plus, la caséinase de la souche H10 (contrairement à la souche H5) préserve sa fonctionnalité en montrant un diamètre de 7mm. Il peut donc s'agir d'une caséinase thermostable**.**

- **En fonction de pH**

- La souche R11 a présenté une caséinase négative à pH5, 7 et 9.
- Les souches H5 et H10 ont montré une caséinase positive dans les trois pH (5, 7 et 9). Selon les diamètres observés, l'activité de la caséinase de la souche H10 était meilleure que celle de la souche H5.

** un intérêt particulier car elle préserve sa fonctionnalité dans une large gamme de pH, ; c'est un critère très important lors de la sélection des enzymes pour une éventuelle application industrielle.

- **En fonction de la salinité**

- Comme pour la température et le pH, la caséinase n'a pas été synthétisée dans les trois concentrations de salinité étudiées.
- Les souches H5 et H10 ont montré une caséinase positive seulement à 5% de NaCl, avec une activité plus élevée pour la souche H10 (12mm vs 5mm).

Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différentiation (**Gupta et al., 2002 ; Sandhya et *al.,* 2005**).

Les protéases sont les plus employées par rapport aux autres enzymes utilisées en biotechnologie **(Antranikian, 2009*),*** elles sont très recherchées dans la bio-industrie et l'agro-alimentaire. Elles représentes environ 65% (50 et 60 milliards d'euros par an) des ventes d'enzymes industrielles dans le marché mondial **(Sahoo et *al.,* 2012**). Elles sont utilisées comme additives dans : les détergents de blanchisserie, la transformation des produits alimentaires, l'industrie pharmaceutique, la tannerie et la gestion des déchets **(Amoozegar et *al.,* 2007**).

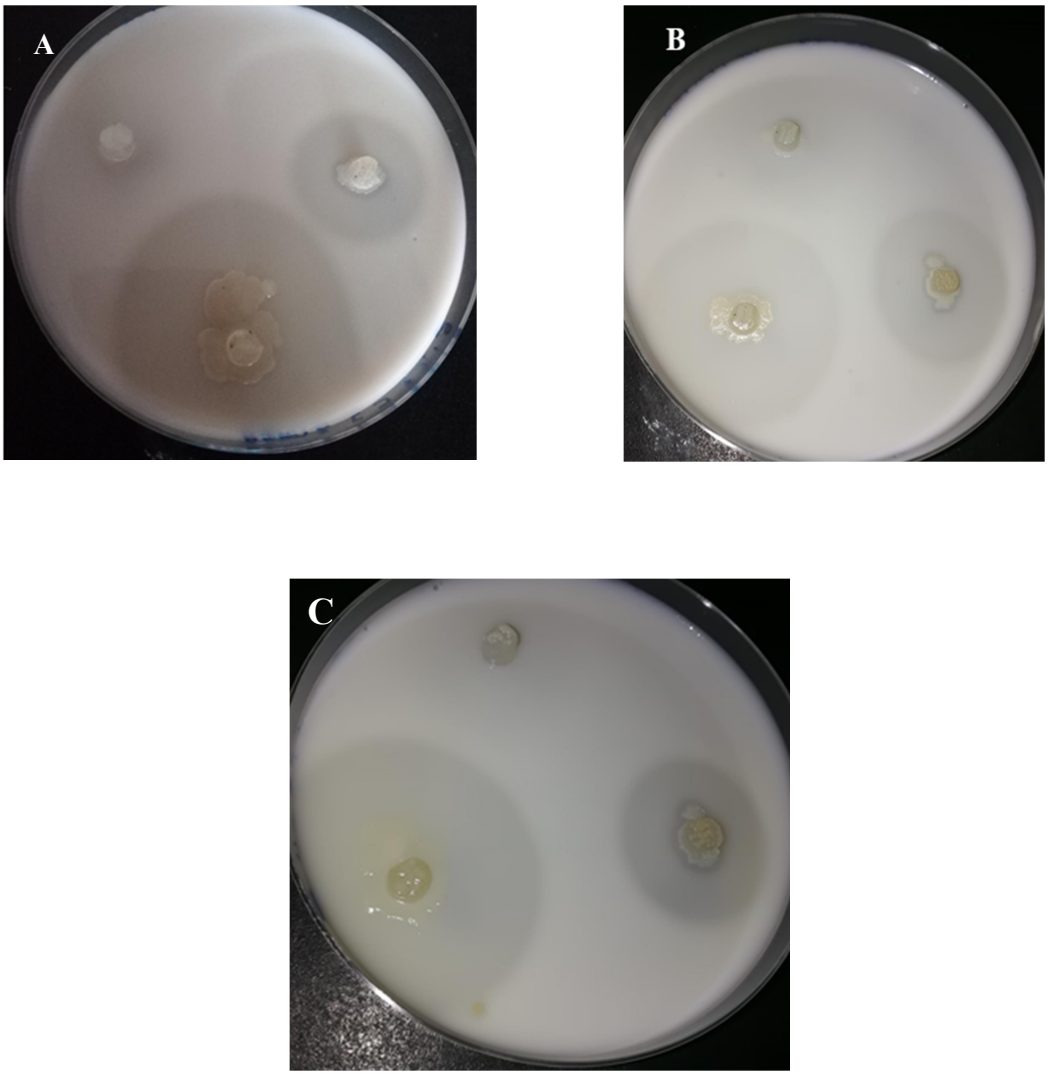


Figure 7: Résultats du test de la caséinase sous différentes conditions physico-chimiques : A :caséinase à (pH7,T30°C), B : caséinase: (pH9,T30°C), C :caséinase à (pH5,T30°C).

4.3. Criblage de la lécethinase, lipoprotease et lipase

Le jaune d'œuf, substrat complexe, est composé de lécithine, de triglycéride et d'une lipoprotéine. Il permet donc de rechercher 3 enzymes :la lécithinase, la lipase, et la lipoprotéinase respectivement . Les résultats de criblage de ces trois enzymes sous différentes conditions physicochimiques de température de pH et de salinité sont illustrés comme suit :

4.3.1. La lécithinase

Les lécithinases ou phospholipases sont des enzymes libérées par des bactéries qui ont la capacité de détruire les tissus animaux et jouent un rôle dans la pathogénicité. Elles

décomposent la lécithine en diglycérides insolubles résultant une zone blanche à crème jaunâtre opaque et diffuse, qui s'étend dans le milieu entourant le disque

Les résultats du criblage de la lécithinase sous différentes conditions physicochimiques sont représentés dans le Tableau IX et la Figure n°8

Tableau IX : Résultats de criblage de la lécithinase des trois souches R11, H5 et H10 dans différentes conditions physicochimiques

Souches / Conditions physicochimique		R11(mm)	H5(mm)	H10(mm)
Température	**30°C**	**-**	*3*	*12*
	40°C	**-**	-	*12*
	60°C	**-**	-	-
Ph	**5**	**-**	-	*13*
	7	**-**	*3*	*12*
	9	**-**	-	*10*
Salinité	**5%**	**-**	-	3
	10%	**-**	-	-
	15%	**-**	-	-

L'analyse de la synthèse/stabilité de la lécithinase en fonction des conditions physicochimique pourrait être résumée comme suit :

- **En fonction de la température :**

- La synthèse de la lécithinase pour la souche R11 était négative dans les trois températures 30°C, 40°C et 60°C.
- Les souches H5 a présenté une activité lécithinase à 30°C .à 40°Cet 60°C cette dernière était absente bien que cette souche a montré une croissance positive après 24h à40 et à 60°C. Ce qui indique que cette enzyme ne préserve pas sa fonctionnalité et n'est donc pas thermostable.
- La synthèse de lalécithinase chez la souche H10 était beaucoup plus importante comparée à la souche H5 (12mm à 30°C). De plus, lalécithinase de la souche H10 préserve la fonctionnalité à la T 40°c avec le même diamètre (12 mm) et redevient absente à 60°C ce qui donne un profil légèrement thermostable à la lécithinase chez H10

- **En fonction de pH :**

- La souche R11 a présenté une lécithinase négative à pH5, 7 et 9.
- Les souches H5 a montré une lécithinase positive dans le PH 7 et négatif dans le pH 5et pH9
- La souche H10a presenté une lécithinase dans les trois pH (5, 7,9).

- **En fonction de la salinité**

Chez H5 et R11 la lécithinase n'a pas été synthétisée dans les trois concentrations de salinité étudiées.

La souche H10 a montré une lécithinase positive seulement à 5% de NaCl, avec une activité faible (3mm) par rapport aux autres paramètres précédemment étudiés .

4.3.2. La lipoprotéase

Une lipoprotéase positive est révélée par un Halo d'éclaircissement autour du disque apparaissant en premier

Les résultats du criblage de la lipoprotéase sous différentes conditions physicochimiques sont représentés dans le Tableau X et la Figure 8

Tableau X: Résultats de criblage de la lipoprotéase des trois souches R11, H5 et H10 dans différentes conditions physicochimiques.

Souches / Conditions physicochimique		R11(mm)	H5(mm)	H10(mm)
Température	30°C	-	-	-
	40°C	-	*2*	-
	60°C	-	-	-
Ph	5	-	*3*	-
	7	-	-	-
	9	-	*1*	-
Salinité	5%	-	-	-
	10%	-	-	-
	15%	-	-	-

L'analyse de la synthèse/stabilité de la lipoprotéase en fonction des conditions physicochimique pourrait être résumée comme suit :

H5 est la seule souche qui présente une activité lipoprotéinase.

- **En fonction de la temperature**

A la température 40°C, H5 a présenté une faible activité enzymatique (3mm), et qui était absente à 30°C et T60°C.

- **En fonction de pH :**

A un pH 7 la souche H5 n'a pas présenté de lipoprotéase alors PH5 et PH9, une faible activité (3mm, 1mm respectivement) a été observée.

- **En fonction de la salinité :**

L'activité enzymatique était observée absente en présence de NaCl 5%,10% et à 15%.

4.3.3. La lipase

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides à longues chaînes d'acides gras en glycerol et en acides gras correspondant .la présence d'une activité lipase est révélé par un hallo d'opacité floue qui limite le disque.

Les résultats de criblage de la lipase sous différentes conditions physicochimiques sont représentés dans le Tableau XI et la Figure 8

Tableau XI: Résultats de criblage de la lipase des trois souches R11, H5 et H10 dans différentes conditions physicochimiques

Souches / Conditions physicochimique		R11(mm)	H5(mm)	H10(mm)
Température	30°C	-	-	-
	40°C	-	-	-
	60°C	-	-	-
Ph	5	-	-	-
	7	-	-	-
	9	-	-	-
Salinité	5%	-	2	-
	10%	-	-	-
	15%	-	-	-

L'analyse de la synthèse/stabilité de la lipoprotéase en fonction des conditions physicochimique pourrait être résumée comme suit :

La seule souche qui a montré une activité lipase de 2mm est H5 et c'était seulement sur GN avec 5%de NaCl.

-Les lipases microbiennes sont souvent perçues comme une des plus importantes et des plus intéressantes classes d'enzymes pour le monde industriel.

Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie, dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries (saucissons, salamis). Les lipases sont également utilisées dans l'interestérification d'huiles et de graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés de synthèse chimique conventionnels. Elles sont également couramment utilisées en tannerie. L'utilisation de lipases permet de diminuer la quantité de surfactant et de détergent à utiliser dans les bains

de lavage, ce qui contribue à l'obtention de peaux plus souples et plus élastiques **(Rhom, 1992)**, Dans l'industrie des cosmétiques et de la parfumerie, elles sont utilisées dans la synthèse d'arômes. Elles sont aussi largement mises en œuvre dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse de médicaments ou dans la préparation d'intermédiaire homochiral optiquement actif.

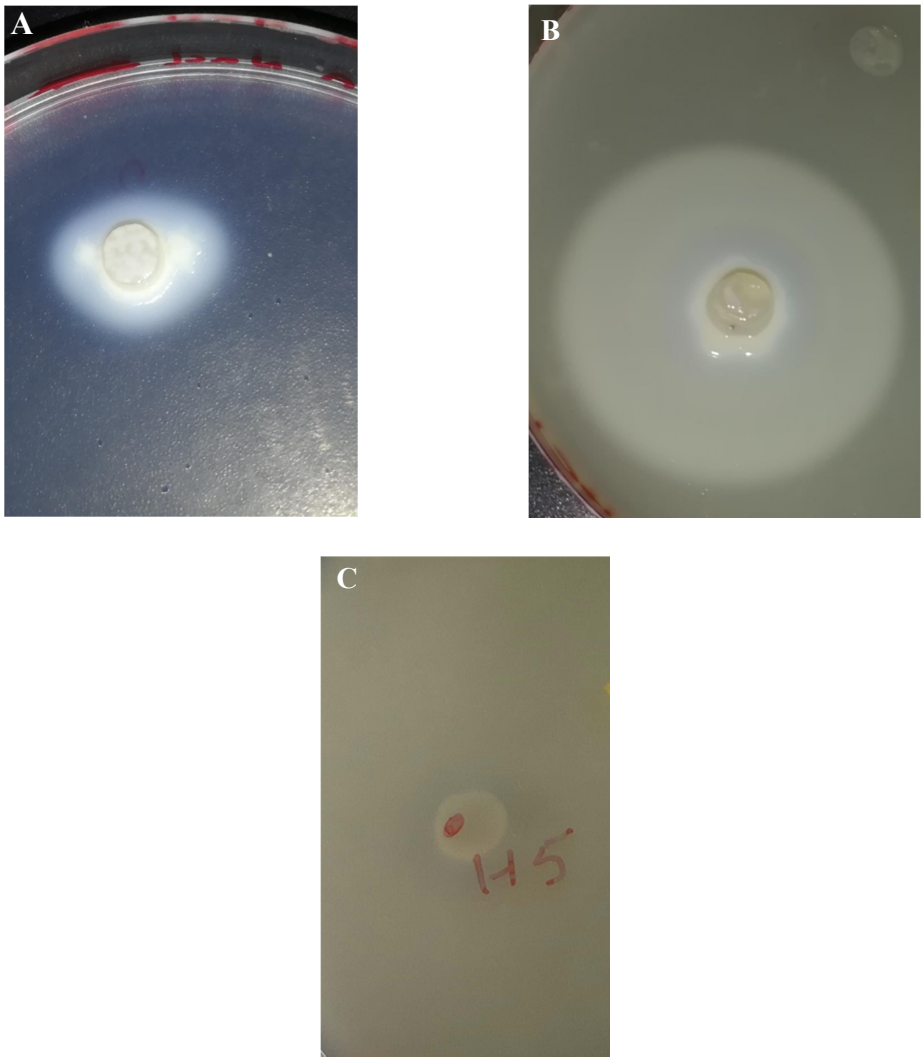


Figure 8: Résultats des tests enzymatiques sur la gélose au jaune d'œuf. A) : La lipase (halo flou), B) : La lécithinase (halo opaque), C) : La lipoprotéinase (halo transparent).

conclusion

Conclusion

Dans notre étude, nous avons mis en évidence la capacité de trois souches appartenant au genre *Bacillus* à synthétiser des enzymes extracellulaires de type amylase, caséinase, lécithinase, lipoprotéase et lipase. On a également essayé de tester l'influence des différents paramètres physicochimiques (température, pH et salinité) sur la croissance de ces souches et sur la stabilité/fonctionnalité des enzymes synthétisées et leur production optimale.

Il est à signaler qu'à cause de la pandémie du Covid19 qui a touché le monde, plusieurs parties n'ont pas été achevé, entre autres le criblage de la gélatinase, des hydrolases de tween 80 et le pouvoir antibactérien et antifongique vis-à-vis de quelques microorganismes pathogènes. Par ailleurs, les résultats obtenus concernant les enzymes analysés restent prometteuses.

Les trois souches R11, H5 et H10 sont à caractère thermophile se développement mieux à 40°C et 60°C avec croissance plus rapide pour les souches H5 et H10 (un critère à prendre en considération lors de la sélection des souches à usage industriel). De plus, la souche R11 est acidophile non halotolérante. Les souches H5 et H10 se développe dans une gamme de pH allant de 5 à 9 et sont halotolérante à 5% de NaCl.

Le criblage des enzymes extracellulaire a permis d'identifier une amylase, caséinase et lécithinase chez les souches H5 et H10 et une lipoprotéase seulement chez la souche H5. La souche R11 n'a synthétisé aucune des enzymes investigués.

Si l'on considère le taux de production de l'enzyme et sa stabilité dans les conditions physicochimiques extrêmes, on peut identifier :

- Une meilleure production de l'amylase chez la souche H5. Cette enzyme était stable dans toute la gamme de température (30, 40 et 50)°C, de pH (5, 7 et 9) et de salinité (5%, 10%) de NaCl.
- Le taux de synthèse de la caséinase et de la lécithinase était remarquablement plus élevé chez la souche H10. Ces deux enzymes ont préservé leur stabilité dans toute la gamme de pH (5, 7 et 9), de température (30, 40 et 60)°C (à l'exception de la lécithinase qui a perdu sa stabilité à 60°C) et à 5% de NaCl,
- Le taux de production très faible de la lipoprotéase et sa faible stabilité dans les différentes conditions physicochimiques ne permettent pas son exploitation en biotechnologie.

L'amylase de la souche H5, la caséinase et la lécithinase de la souche H10 constituent des enzymes candidates qui doivent faire l'objet d'une étude poussée (de taux de production en utilisant des milieux peu couteux et stabilité dans des paramètres physicochimiques extrême) afin qu'elles soient exploitées en Biotechnologie industrielle. L'utilisation de sources biologiques comme alternative aux composés chimique, tout en respectant le rapport qualité/coût constitue un défi dans le domaine industriel.

Enfin, les échantillons algériens sur lesquels nous avons effectué notre étude, offrent un vaste champ d'investigation pour l'isolement de nouvelles molécules ayant une application en industrie

Refferences Bibliographique

A

Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of Bacillus cereus. *FEMS Microbiol. Lett, 129,* 17-19.

Agbaje, L., Sunday A. O., Suliat, O. M., 2016. Anticandida, anti-coagulant and thrombolytic activities of biosynthesized silver nanoparticles using cell-free extract of Bacillus safensis LAU 13.Process Biochemistry.

Ait Kaki, A. (2014). Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre Bacillus pour l'agriculture et l'agroalimentaire. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle en Biotechnologie . *Université Constantine ,1* , 18.

Aizawa, T., Urai, M., Iwabuchi, N., Nakajima, M., et Sunairi, M. (2010). "Bacillus trypoxylicola sp. nov. xylanase-producing alkaliphilic bacteria isolated from the guts of Japanese horned beetle larvae (Trypoxylus dichotomus septentrionalis)." Int J Syst Evol Microbiol 60: P61-66

Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of Bacillus through comparative genomics. *BMC genomics, 11, 332*.

Alkan, M., Demirbas, O., Dogan, M. (2007) Adsorption kinetics and thermodynamics of an anionic dye onto sepiolite. Microporous Mesoporous Mater 101:388–396

Amaud, A., Berset , C., Bocquet ,J., Bouix, M., Cerisie, Y., Cuvellier, E. G. F., De Nettancourt, D., Engasser, J.M., GaW P., Goursaud J., Cnrenini M., Guiraud J.P., Richard, H., Steenbrugge, H., Teoule, E., Thomas, D. et Vandecasteele, J.P. (1993). Biotechnologies. 4ièn'" ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation LavoisieE Paris, France, 904 p.

Amoozegar, M.A., Fatemi, Z.A., Karbalaei-Heidari, H.R. and Razavi, M.R. (2007). Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, Salinivibrio sp. strain AF-2004. Microbiology Research. 162: 369-377.

Andreeva, Z.I., Nesterenko, V.F., Fomkina, M.G., Ternovsky, V.I., Suzina, N.E., Bakulina, A.Y., Solonin, A.S., Sineva, E.V. (2007). The Properties of Bacillus cereus Hemolysin II Pores Depend on Environmental Conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes ,1768 (2)*, 253-63.

Andrews, R.E.Jr., Bibilos,M.M.,Bulla,L.A. (1985). Protease activation of the entomocidal protoxin of Bacil/us thuringiensis subsp. kurstaki. *Applied and environmental microbiology ,50(4)* , 737-742.

Antranikian, G. (2009). Extremophiles and Biotechnology in: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1-5 p.

Ash, c., Farrow, J. A. K., Oorsch, M., Stackebrandt, E. et Collins, M. O. (1991). comparative of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related species on the basis of reverse transcriptase. *Int. J. Syst. Bacteriol, 41*, 343-346.

Athukorala, Y., Ahn, G.N., Jee, T.H., Kim, G.Y., Kim, S.H., Ha. JH., Kang, J.S., Lee ,KW., Jeon, YJ. (2009) Antiproliferative activity of sulfated polysaccharide isolation from an enzymatic digest of Ecklonia cava on the U-937 cell line. J Appl Phycol 21:307–314

Avcioglu, B., Eyupoglu, B., & Bakir, U. (2005). Production and characterization of xylanases of a Bacillus strain isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(1), 65-68.

Awad, M.K., Saadaoui, I., Rouis, S., Tounsi, S., Jaoua, S. (2007). Differentiation between Bacillus thuringiensis strains by gyrB PCR-Sau3Al fingerprinting. *Mol. Biotechnol,35*, 171-177.

B

Baute, T. (2004). A grower's handbook; controlling corn insect pests with Bt corn technology.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck M., (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method.American Journal of Clinical Pathology; 45:493–496.

Bargabus,R.L., Zidack,N.K., Sherwood,J.E., Jacobsen,B.J. (2002). Characterisation of Systemic Resistance in Sugar Beet Elicited by a Non-Pathogenic, Phyllosphere-Colonizing Bacillus mycoides, Biological Control Agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 289-98.

Barnabé S., Sasseville J. L., Tyagi R. D. et Valéro J. R. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières ? VECTEUR environnement. 36 (2), 50-62 p.

Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al. (1979). Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. 17p

Berkeley, R. C. W., Logan, N. A., Shute, L. A., Capey, A. G. (1984). Identification of Bacillus species. *In. Met. Microbiol* , 291- 328.

Beecher, D. J., Olsen, T. W., Somers, E. B., & Wong, A. C. (2000). Evidence for Contribution of Tripartite Hemolysin BL, Phosphatidylcholine-Preferring Phospholipase C, and Collagenase to Virulence of Bacillus cereus Endophthalmitis . *Infection and Immunity ,68 (9)*, 5269-76

Böhm, D., Keller, K., Pieter, J., Boehm, N., Wolters, D., Siggelkow, W., Lebrecht, A., Schmidt, M., Kölbl, H., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2012). Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach. *Oncology reports*, *28*(2), 429–438.

Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Taibi, H., Djamel, T (2014). Valorisation de l'essence aromatique du Thym (Thymus vulgaris L.) en aromathérapie antiinfectieuse [Potential application of Thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil as

antibacterial drug in aromatherapy]. International Journal of Innovation and Applied Studies 8, 1418.

Burhan, A., Unaldi, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A., Gülnaz, O. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp.Isolate ANT-6. Process Biochem, 38: 1397-1403.

Brar,S.K.,Verma,M.,Tyagi,R.D.,Surampalli,R.Y.(2007).Antagonisticfungi,Trichoderma spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37(1), 1-20.

Bravo , A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of Baci/lus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 423-435.

Broderick N.A.,Goodman,R.M.,Handelsman,J and Raffa ,K.F (2003). Effect of host diet and insectsource on synergy of gypsy moth(Lepadoptera: Lymanotriidae) mortality to bacillus thuringiensis subsp kurstaki by zwittermicin A. *Environ.Entomol ,32*, 387-397.

C

Cadel six, S., De Buyser, M.L., Vignaud, M.L., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S. Hennekinne, J.-A., Pihier, N., Brisabois, A. (2012). Toxi-infections alimentaires collectives à Bacillus cereus : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bull Epidemiol Hebd*, 45–49.

Callegan, M. C., S. T. Kane, D. C. Cochran, M. S. Gilmore, M. Gominet, and D. Lereclus. (2003). Relationship of PlcR-Regulated Factors to Bacillus Endophthalmitis Virulence. *Infection and Immunity ,71 (6)*, 3116-24.

Chan, K.K., Wong,R.S.,Mohamed,S.M.,Ibrahim,T.A.,Abdullah,M and Nadarajah,V.D.J W. (2012). Bacillus thuringiensis parasporal proteins induce cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptotic cell death in Leukemic cells . *Environ.Pathol.Toxicol.oncol, (31)1*, 75-86.

Campel ,D.P., Dieball,D.E.,Brackett,J.M. (1987). Rpid HPLC Assay for the β exotoxin of Bacillus Thuringiensis . *J.Agric.Food.Chem, 35*, 156-158.

Cardazzo, B., Negrisolo, E., Carraro, L., Alberghini, L., Patarnello, T., Giaccone, V. (2008). Multiple Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in Bacillus cereus Food-Borne Isolates. *Appl. Environ. Microbiol, 74,*850-860.

Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salonen, M. S., Svensson, B., Nguyen-the, C., & Ehling-Schulz, M. (2006). Emetic toxin-producing strains of Bacillus cereus show distinct characteristics within the Bacillus cereus group. *Int. J. Food Microbiol,109,* 132–138.

Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G, et Borriss, R. (2007). "Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium Bacillus amyloliquefaciens FZB42." Nat Biotechnol25(9): P1007-1014.

Chi, M. C., Wu, T. J., Chuang, T. T., Chen, H. L., Lo, H. F, et Lin, L. L. (2010). "Biophysical Characterization of a Recombinant a-Amylase from Thermophilic Bacillus sp. strain TS-23." Protein J. 29(8): 572-582.

Chtioui, O. (2011). Production sélective de lipopeptides par Bacillus subtilis en bioréacteur à disques tournants. *Thèse pour l'obtention du titre de docteur.Université Lille, 1*, 196.

Coutte, F., Lecouturier, D., Yahia, S. A., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P, et Dhulster, P. (2010). "Production of surfactin and fengycin by Bacillus subtilis in a bubbleless membrane bioreactor." Appl Microbiol Biotechnol 87: P499-507.

Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, H. E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, et Dean, D. H. (1998). "Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins." Microbiol. Mol. Biol. Rev 62: P807-813.

Crickmore,N., Panneerselvam,S., Berry,C., Connor,T., Mishra,R.,and Bonning,B.C. (2014). Bacillus thuringiensis toxin nomenclature. *Available online:* http://www.btnomenclature.info/.

D

DasSarma. (2001). Halophiles. . *Encyclopedia of Life Sciences :* , P1-9.

Das, K., Tiwari, R., Shrivastava, D., 2010**.** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. Journal of medicinal plants research 4, 104-111.

de la Vega, L. M., Barboza-Corona, J. E., Aguilar-Uscanga, M. G., & Ramírez-Lepe, M. (2006). Purification and characterization of an exochitinase from Bacillus thuringiensis subsp. aizawai and its action againstphytopathogenic fung. *Canadian journal ofmicrobiology, 52(7)* , 651-657.

Delmotte, A. (1958). Lactivité lipolytique microbienne décelée par la méthode de SIERRAavec référence spéciale au M. pyogenes. 309-330.

Devine, K. M., (1995). The *Bacillus subtilis* genome project: aims and progress. *Tibtechnology;* 13:210-216.

De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H.and Whitman W. B., 2009. Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition., VolumeThree, The Firmicutes. Springer, New York, USA

Didelot, X., Urwin, R., Maiden, M., & Falush, D.(2009). Genealogical typing of Neisseria meningitidis. *Microbiology, 155*, 3176–3186.

Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., ... & Lennon, V. A. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine*, *8*(8), 793-800.

Douglas ,J Beecher., Schoeni., et Wong, J. A. (1995). Enterotoxic Activity of Hemolysin BL from Bacillus cereus . *INFECT. IMMUN, 63*, 6.

Drobniewski, F.A. (1993). Bacillus cereus and related species. *Clin. Microbiol. Rev*, 6(4), 324-338.

Drouin, M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par Bacillus licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître és sciences (M.Sc.). Canada

E

Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M. A., Edirisinghe, J. N., Kutumbaka, K. K., Koenig, S. S., Huot Creasy, H., Rosovitz, M. J., Riley, D. R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L. D., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J, et Vary, P. S. (2011). "Genome sequences of the biotechnologically important B. megaterium strains QM B1551 and DSM319." J Bacteriol 193: P4199-4213

Espinasse., S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D., & Sanchis,V. (2003). Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of Bacillus thuringiensis. *Current microbiology, 47(6)*, 501–507.

Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(11)*, 5389–5394.

Ettoumi, B., Raddadi, N., Borin, S., Daffonchio, D., Boudabous A., Cherif, A. (2009). "Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments." J Basic Microbiol 49: P13-23.

F

Fan, L., Bo, S., Chen, H., Ye, W., Kleinschmidt, K., Baumann, H. I., Imhoff, J. F., Kleine, M, et Cai, D. (2011). "Genome sequence of Bacillus subtilis subsp. spizizenii gtP20b, isolated from the Indian ocean." J Bacteriol 193: P1276-1277.

Fiedoruk, K., Daniluk, T., Fiodor, A., Drewicka, E., Buczynska, K., Leszczynska, K., Bideshi, D.K., Swiecicka, I. (2016). MALDI-TOF MS portrait of emetic and non-emetic Bacillus cereus group members. Electrophoresis. *Electrophoresis ,37*, 15-16.

Fogarty, L. A., Curbow, B. A., Wingard, J. R., McDonnell, K., & Somerfield, M. R. (1999). Can 40 seconds of compassion reduce patient anxiety?. *Journal of Clinical Oncology*, *17*(1), 371-371.

Frankland,G.C et Frankland,P.E. (1887). Studies on Some New Micro-Organisms Obtained. *Proceedings of the Royal Society of London*, 42,150-151.

Frazier, W.C. (1926**).** A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. J. Infect. Dis. 39:302-309.

G

Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Sivaramakrishnan, S., & Pandey, A. (2009). Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from Bacillus amyloliquefaciens. *Applied biochemistry and biotechnology*, *158*(3), 653–662.

Gilmore, M. S., Cruz-Rodz, A. L., Leimeister-Wächter, M., Kreft, J., & Goebel, W. (1989). A Bacillus cereus Cytolytic Determinant, Cereolysin AB, Which Comprises the Phospholipase C and Sphingomyelinase Genes: Nucleotide Sequence and Genetic Linkage. *Journal of Bacteriology ,171 (2),* 744-53.

Girard, F., Vachon, V., Préfontaine, G., Marceau, L., Su, Y., Larouche, G., Vincent, C., Schwartz, J. L., Masson, L., & Laprade, R. (2008). Cysteine scanning mutagenesis of α4, a putative pore-lining helix of the Bacillus thuringiensis insecticidal toxin Cry1Aa. *Appl. Environ. Microbiol, 74*, 2565-2572.

Gonzalez, C., Gutierrez, C., Ramirez, C. (1978). Halobacterium vallismortis sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. Can J Microbiol 24: 710-715

Gordon, R.E.,Haynes,W.C.,Pang,H.N. (1973). The genus Bacillus . *Agriculture Handbook No.427*.

Guérin, A., Rønning, H.T., Dargaignaratz, C., Clavel, T., Broussolle, V., Mahillon, J., Granum, P. E., & Nguyen-The, C. (2017). Cereulide Production by Bacillus weihenstephanensis Strains during Growth at Different PH Values and Temperatures, *Food Microbiology* , 130-35.

Guinebretiere , M. H., & Nguyen-The, C. (2003). Sources of Bacillus cereus contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbio. Ecol*, 207–215.

Guinebretiére, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., & De Vos, P. (2008). Diversification in the Bacillus Cereus Group. *Environmental Microbiology, 10 (4)*, 851-65.

Guinebretiere , M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M. L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., & Sorokin, A. (2013). Bacillus cytotoxicus Sp. Nov. Is a Novel Thermotolerant Species of the Bacillus cereus Group Occasionally Associated with Food poisining. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY ,63 (Pt 1)*, 31-40.

Gupta, R., Beg, Q. K. and Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 15-32

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatran, H., Goswami, K.V., Chauhan, B. (2003). Microbial α - amylase: a biotechnological perspective. Process Biochem 38: 1599-1616

Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology ,142*, 3-16.

Granner, D.K., Murray, R.K., Rodwell, V.W. (2008). Biochimie de HARPER. 3ème édition. De Boeck. Bruxelle., 47. pp. 49-51, 483.

H

Han, P., Niu, C. Y., Lei, C. L., Cui, J. J., & Desneux, N. (2010). Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee Apis mellifera L. *Ecotoxicology*, *19*(8), 1612-1619.

Handelsman,J.,Raffel ,Mester,E.H.,Wunderlich,L , and Grau,C.R . (1990). Biological control of damping-off alfalfa seedling with Bacillus cereus UW85. *Appl.Environ.Microbiol ,56*, 713-718.

Hauge, S. (1955). Food poisining caused by sporeforming bacilli. *J.Appl.Bacteriol*, 18,59-51.

Helgason , E., Tourasse, N. J., Meisal, R., Caugant, D. A., & Kolstø, A. B. (2004). . Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the Bacillus cereus Group. *Appl. Environ. Microbiol, 70*, 191-201.

Höfte, H., Whiteley, H.R.(1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev 53:242–255.

Hoffmaster , A. R., Novak, R. T., Marston, C. K., Gee, J. E., Helsel, L., Pruckler, J. M., & Wilkins, P. P. (2008). Genetic diversity of clinical isolates of Bacillus cereus using multilocus sequence typing. *B.M.C Microbiol, 8*, 191.

Huang, B., Qin, P., Xu, Z., Zhu, R, et Meng, Y. (2011). “Effects of CaCl2 on viscosity of culture broth, and on activities of enzymes around the 2-oxoglutarate branch, in Bacillus subtilis CGMCC 2108 producing poly-(γ-glutamic acid).” Bioresour Technol 102: P3595-3598

Huber, M., Cabib, E., & Miller, L. H. (1991). "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ,88(7)* , 2807-2810.

I

Ishiwata, S. (1901) On a kind of severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 114, 1–5.

J

Jääskeläinen , E. L., Teplova, V., Andersson, M. A., Andersson, L. C., Tammela, P., Andersson, M. C., Pirhonen, T. I., Saris, N. E., Vuorela, P., & Salkinoja-Salonen, M. S. (2003). In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning Bacillus cereus. *Toxicol. In Vitro ,17*, 737–744.

Janda, K. (2005). The lipolyticactivity of Thermomyces lanuginosus strains isolated from different natural sources. International Bio deterioration & Biodegradation. 55:149152.

Jensen ,G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., & Mahillon, J. (2003). The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives. *Environ. Microbiol,5*, 631-640.

Jiménez , G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A. B., Ramón, D., Martínez, J. F., Codoñer, F. M., & Rosselló-Móra, R.

(2013). Description of Bacillus toyonensis Sp. Nov., a Novel Species of the Bacillus cereus Group, and PairwiseGenome Comparisons of the Species of the Group by Means of ANI Calculations . *Systematic and Applied Microbiology, 36 (6)*, 383-91.

Jung,W.J.,Mabood,F.,Souleimanov,A,.Zhou,X,.Jaoua,S,.Kamoun,F.and Smith,D.L.(2008).Stability and antibacterial activity of bacteriocins produced by *Bcillus thuringiensis ssp.Kurstaki. J Microbiol biotechnol.,18:1836-1840.*

Jung, M. Y., Paek, W. K., Park, I. S., Han, J. R., Sin, Y., Paek, J., Rhee, M. S., Kim, H., Song, H. S., & Chang, Y. H. (2010). Bacillus gaemokensis sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *J. Microbiol*, 48,867-871.

jung , M. Y., Kim, J. S., Paek, W. K., Lim, J., Lee, H., Kim, P. I., Ma, J. Y., Kim, W., & Chang, Y. H. (2011). Bacillus manliponensis sp. nov., a new member of the Bacillus cereus group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J. Microbio*, 49,1027-1032.

K

Kevany , B. M., Rasko, D. A., & Thomas, M. G. (2008). Characterization ofthe complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster fromBacillus cereus. *Appl Environ Microbiol, 75*, 1144-1155.

Kevin, M., Devine. (1995): The Bacillus subtilis genome project: Aims and progress. Trends in Biotechnology 13(6):210-6 .

Kim, H. U., and J. M. Goepfert. 1972. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods: 24-hour presumptive test medium. Appl. Microbiol. **22**:581–587.

Kolbert, C. P., Persing, D. H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification ofbacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol, 2*, 299-305.

Kolsto, A. B., Tourasse, N. J, et Okstad, O. A. (2009). "What sets Bacillus anthracis apart from other Bacillus species?" Annu Rev Microbiol 63: P451-476

Kramer, J. M., & Gilbert, R. J. (1989). Bacillus cereus and other Bacillus. In Foodborne bacterial pathogens (pp. 21-70). Marcel Dekker New York.

Kushner. (1978). Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner D.J (ed) Microbial Life in Extreme Environments. *Academic Press London.* , P317-368.

L

Lambert, Bart., Marnix Peferoen. (1992). Insecticidal Promise of Bacillus thuringiensis. *BioScience*, 42 (2), 112-22.

Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M. L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebretiere, M. H., Sanchis, V., Nguen-The, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Sorokin, A. (2008). Extending the Bacillus cereus Group Genomics to Putative Food-Borne Pathogens of Different Toxicity. *Chemico-Biological Interactions, 171 (2)*, 236-49.

Larpent. (2000). *introduction a la nouvelle classification bacterienne-les principaux groupes bacteriens.* Paris: Edition Tec&Doc lavoisier.

Lasch , P., Beyer, W., Nattermann, H., Stämmler, M., Siegbrecht, E., Grunow, R., & Naumann, D. (2009). Identification of Bacillus anthracis by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. . *Appl. Environ. Microbiol, 75* , 7229–7242.

Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O. (2001). Industrial use of enzymes. Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

Laxman, S., Sastry, P. S., & Unnikrishnan, K. P. (2005). Discovering frequent episodes and learning hidden markov models: A formal connection. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering*, *17*(11), 1505-1517.

Lim, Y. C., Cho, K. W., Kwon, H. C., Kang, S. U., Pyun, J. H., Lee, M. H., Hwang, H. S., Kim, J. H., Lee,H. N., Choi, E. C, et Kim, C. H. (2010). "Growth Inhibition and Apoptosis with H31 Metabolites fromMarine Bacillus SW31 in Head and Neck Cancer Cells." ClinExpOtorhinolaryngol 3(4): P217-25.

Lindback,T., Fagerlund, A., Rodland, M.S & Granum PE. (2004). Characterization of the Bacillus cereus Nhe enterotoxin. *Microbiology ,150* , 3959-3967.

Liu , B., Liu, G. H., Hu, G. P., Sengonca, C., Lin, N. Q., Tang, J. Y., Tang, W. Q., & Lin, Y. Z. (2014). Bacillus bingmayongensis sp.nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105,501-510.

Lodemann , U., Lorenz, B. M., Weyrauch, K. D., & Martens, H. (2008). Effects of Bacillus cereus var. toyoi as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Archives of animal nutrition, 62(2),* 87-106.

Logan, N. A., & Berkeley, R. C. (1984). Identification of Bacillus strains using API system. *J.Gen. Microbiol*, 1871-1882.

López ,AC., A.M, Alippi., J, Minnaard., P. F, Pérez. (2015). A case of Intoxication Due to a Highly Cytotoxic Bacillus cereus Strain Isolated from Cooked Chicken. *Food Microbiology ,46 (avril)*, 195-99.

M

Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., ... & Feavers, I. M. (1998). . Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad.Sci, 95*, 3140–3145.

Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express, 1: 5.

Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C. (1982) Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries Doin, Paris.

Margalith, Y., & Ben-Dov, E. (2000). Biological control by Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Insect pest management: techniques for environmental protection, 243-301.

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

Merzougui, S. , Lkhider, M., Grosset, N. ,Gautier, M. , Cohen, N. (2013). Differentiation by Molecular Typing of Bacillus cereus Isolates from Food in Morocco: PFGE-Eric PCR. *Food Public Health ,3,* 223-227.

Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K, et Ohba, M. (2000). "Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of Bacillus thuringiensis." Clin Diagn Lab Immunol 7(4): P625-634.

Miller , R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., & Kovac, J. (2016). Bacillus wiedmannii sp. nov a psychrotolerant and cytotoxic Bacillus cereus group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 66, 4744–4753.

N

Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T., & Mizuki, E. (2010). three cry toxins in twho types from Bacillus thuringiensis strain MO19 preferencially kill human hepatocyte cancer . *Biosci.Biothecnol.Biochem,74(3)*, 1-5.

Nagar, A., Nandakumar, K., & Jain, A. K. (2011). Multibiometric cryptosystems based on feature-level fusion. *IEEE transactions on information forensics and security*, *7*(1), 255-268.

O

Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from Bacillus thuringiensis. . *Anticancer research, 29(1),* 427–433.

Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Inouye, K, et Mizuki, E. (2010). "Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from Bacillus thuringiensis." Biochim biophys acta

Oliwa-Stasiak ,K.,Kolaj-robin,O.,Adley,C.C. (2011). Development of Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Bacillus cereus Group Species: Differentiation of B. weihenstephanensis and Rhizoid B. pseudomycoides Isolates from Milk . *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (1), 80-88.

Otlewska, A., E, Oltuszak-Walczak., P,Walczak. (2013). Differentiation of strains from the Bacillus cereus group by RFLP-PFGE genomic fingerprinting. *Electrophoresis ,34*, 3023-3028.

P

Paananen, A ., R, Mikkola., T, Sareneva., S, Matikainen., M ,Hess., M ,Andersson., I ,Julkunen., M. S, Salkinoja-Salonen and T, Timonen. (2002). Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from Bacillus cereus. *Clin. Exp. Immunol,129,* 420-428.

Patel, R., Dodia, M., Singh, S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic Bacillus sp. : Production and optimization. Proc. Biochem., 40; 3569– 3575.

Fickers, P., Guez, J. S., Damblon, C., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., & Joris, B. (2009). High-level biosynthesis of the anteiso-C(17) isoform of the antibiotic mycosubtilin in Bacillus subtilis and characterization of its candidacidal activity. *Applied and environmental microbiology*, *75*(13), 4636–4640.

Pelmont, J. (1995). Enzymes : Catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. 7; 621. 652-654.

Pérez García, A., Romero, D., & de Vicente, A. R. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology ,22(2),* 187–193.

Plou, F. G., Ferrer, M., Nuero, O. M., Calvo, M. V., Alcalde, M., Reyes, F. & Ballesteros, A. (1998).Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. Biotechnology techniques.12: 183-186.

Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W., Holmes, E. C., & Maiden, M. C. (2004). Population Structure and Evolution of the Bacillus cereus Group. *J. Bacteriol .186*, 7959-7970.

R

Rao, A. V., Waseem, Z., & Agarwal, S. (1998). Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International*, *31*(10), 737-741.

Read,T.D., Myers,G.S., Brunham,R.C., Nelson,W.C., Paulsen,I.T., Heidelberg,J., Holtzapple,E., Khouri,H., Federova,N.B., Carty,H.A. et al. (2003) Genome sequence of Chlamydophila caviae (Chlamydia psittaci GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. Nucleic Acids Res., 31, 2134–2147.

Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Knocz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J., and Zilberstein, A. (1996) Synergistic activity of a Bacillus thuringiensis (δ-endotoxin) and a bacterial endochitinase against Spodoptera littoralis larva. Appl. Environ. Microbiol., 62, 3581-3586.

Roh, T. Y., Wei, G., Farrell, C. M., & Zhao, K. (2007). Genome-wide prediction of conserved and nonconserved enhancers by histone acetylation patterns. Genome research, 17(1), 74–81.

Rrogers,E.W.,Dalisay,D.S.,Molinski,T.F. (2008). Zwittermicin A:assignment of its complete configuration by total synthesis of the enantiomere and implication of d-serine in its biosynthesis . *Angrew.Chem.Int 47:*, 8086-8089.

S

S.Ceuppens S. Timmery J. Mahillon M. Uyttendaele N. Boon (2013). Small Bacillus cereus ATCC 14579 Subpopulations Are Responsible for Cytotoxin K Production. *Journal of Applied Microbiology 114 (3):* , 899-906.

Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., & Ito, S. (2007). Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. Journal of bioscience and bioengineering, 103(6), 501–508.

Sahoo, D.K., Das, A., Thatoi H., Mondal K.C., Mohapatra P.K. (2012). Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by anewly isolated bacterium under submerged fermentation, Appl. Biochem. Biotechnol., 167 : 1040-1051.

Sapre, M.P., Jha, H., Patil, M.B.(2005) Purification and characterization of a thermoalkalophilic xylanase from Bacillus sp. World J Microbiol Biotechnol 21:649–654

Sampson,M. N., & Gooday,G. W. (1998). Involvement of chitinases of Bacillus thuringiensis during pathogenesis in insects. *Microbiology ,144 (pt 8),* 2189-2194.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. and Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, 40: 2689-2694

Sayyed, A.H., Raymond, B., Ibiza-Palacios, M.S., Escrich, Band Wright, D.J. (2004). Genetic and biochemical charactrization of field evolved resistance to Bacillus thuringiensis toxin cry 1Ac in the diamondback moth,plutella xylostella. *Appl.Environ.Microbiol, (70), 12*, 7010-7017.

Sabaou, N.(1980). Antagonisme de deux Actinomycètes vis-à-vis du *Fusarium oxysporumf.sp albedinis* (Killian et Maire) Gordon et d'autre champignon. Thèse de Magistère, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie.

Schallmey, M., Singh, A, et Ward, O. P. (2004). "Developments in the use of Bacillus species for industrial production." Can J Microbiol 50: P1–17.

Schmidt , B. M., Baumann, M., Henke, E., Konarzycka-Bessler M. & Bornscheuer U. T. (2004).Directed evolution of Lipases and Esterases. Methods in enzymology. 388: 199-207.

Sellami ,S., Zghal ,T., Cherif, M., Zalila-Kolsi, I., Jaoua, S., Jamoussi, K. (2013). Screening and identification of a Bacillus thuringiensis strain S1/4 with large and efficient insecticidal activities. *J. Basic Microbiol, 52*, 1-10.

Setati ,(2010). Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. Afr J Biotechnol 9 (11): 1555-1560

Sheremet, A. S., Gronskiy, S. V., Akhmadyshin, R. A., Novikova, A. E., Livshits, V. A., Shakulov, R. S, et Zakataeva, N. P. (2011). "Enhancement of extracellular purine nucleoside accumulation by Bacillus strains through genetic modifications of genes involved in nucleoside export." J Ind Microbiol Biotechnol 38: P65-70.

Shivanand, P., & Jayaraman, G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, Bacillus aquimaris strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*, *44*(10), 1088-1094.

Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., & Handelsman, J. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by Bacillus cereus UW85. Applied and environmental microbiology, 60(6), 2023-2030.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Virdi, J. S. 2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. . *Front. Microbiol, 6*, 791.

Smith , N. R., Gordon, R. E., & Clark, F. E. (1952). Aerobic spore-forming bacteria, USDA Agriculture Monograph. *Government printing office*.

Spira ,W. M., and J. MGeopfert. (1975). Biological characteristics of an enterotoxin produced by Bacillus cereus. *Can.J.Microbiol*, 21(8),1236-1246.

Stackebrandt, E., W, Ludwig. M, Weizengger. S, Theodore.,J, McGill. G, FOX.,C, WOESE., SCHUBERTS, W and K.H, SCHLEIFER 1987). Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-fonning bacilli and non-spore forming relatives. *J. Gen. Mierobiol, 133* , 2523 - 2529.

Stackebrandt, E., & GOEBEL, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *44*(4), 846-849.

Soberon, M., Pardo-Lopez, L., Lopez, I., Gomez, I., Tabashnik, B. E, et Bravo, A. (2007). “Engineering modi-fied Bt toxins to counter insect resistance.” Science 318: P1640-1642 ,« Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2016. » 2016, 11.

Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology reviews*, *32*(4), 579-606.

Stenfors Arnesen,L.,Granum, P.E., Buisson ,C., Bohlin, J., Nielsen-LeRoux, C. (2011). Using an Insect Model to Assess Correlation between Temperature and Virulence in Bacillus weihenstephanensis and Bacillus cereusBacillus weihenstephanensis, Bacillus cereus and Virulence . *FEMS Microbiology Letters*, 317 (2), 196-202.

Stenfors, L.P., Granum, P.E. (2001). Psychrotolerant species from the Bacillus cereus group are not. *FEMS Microbiol. Lett*, 197, 223–228.

T

Taale, E. (2016). Recherche de molécules bioactives d’origine microbienne:caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. *Thèse Unique pour obtenir le grade de Docteur.Université Ouaga IPR Joseph Ki-Zerbo.*, P207.

Tourasse,N.J.,Helgason,E.,Klevan,A.,Sylvester,P.,Moya,M.,Haustant,M.,Aukstad,O.A.,Faout, a.,Mock,M.,Kolsto,A.B. (2011). Extended and global phylogenetic view of the Bacillus cereus group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology,28*, 236-244.

Thorsen, T., & Holt, T. (2009). The potential for power production from salinity gradients by pressure retarded osmosis. *Journal of Membrane Science*, *335*(1-2), 103-110.

Tran, S. L., Guillemet, E., Ngo-Camus, M., Clybouw, C., Puhar, A., Moris, A., Gohar, M., Lereclus, D., & Ramarao. (2011). Haemolysin II Is a Bacillus cereus Virulence Factor That

Induces Apoptosis of Macrophages: Bacillus cereus HlyII Is a Toxic Factor Inducing Apoptosis. *Cellular Microbiology ,13 (1)*, 92-108.

Tran, S. L., Puhar, A., Ngo-Camus, M., & Ramarao, N. (2011). Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of Bacillus. *PLoS ONE ,6 (9)* , e22876.

V

Van der Auwera,G.A.,Timmery,S.,Hoton,F.,Mahilone,J. (2007). Plasmid exchanges among members of the Bacillus cereus group in foodstuffs. *Int J Food Microbiol, 113(2)*, 164-72.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Mierobiol. Rev, 60*, 407-438.

Vandini, A., Temmerman, R., Frabetti, A., Caselli, E., Antonioli, P., Balboni, P. G., ... & Mazzacane, S.I (2014). Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS One, 9(9)*, e108598.

Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. D, et Jahn, D. (2007). "Bacillus megaterium from simple soil bacterium to industrial protein production host." Appl Microbiol Biotechnol 76: P957-967.

Vieille, C., Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65:1-43.

Venkateswaran , K., Singh, N. K., Checinska Sielaff, A., Pope, R. K., Bergman, N. H., van Tongeren, S. P., Patel, N. B., Lawson, P. A., Satomi, M., Williamson, C., Sahl, J. W., Keim, P., Pierson, D., & Perry, J. (2017). « NonToxin-Producing Bacillus cereus Strains Belonging to the B. anthracis Clade. *mSystems* , 2 (3), e00021-17.

Vilas-Boas, G. T., Peruca, A. P., & Arantes, O. M. (2007). Biology and taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis, and Bacillus thuringiensis. *Can J Microbiol*, 53, 673–687.

Virtanen, S. M., Roivainen, M., Andersson, M. A., Ylipaasto, P., Hoornstra, D., Mikkola, R., & Salkinoja-Salonen, M. (2008). In vitro toxicity of cereulide on porcine pancreatic Langerhans islets. . *Toxicon ,5,* 1029–1037.

W

Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kasai, H. (2007). Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA DNA hybridization IN THE Bacillus subtilis group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *57*(Pt 8), 1846–1850.

Wiegel, J., Canganella, F. (2001). Extreme Thermophiles in; Encyclopedia of life sciences.Wiley Ed. 12P.subtilis group. *Int. J. Syst. Evol.Microbiol,57*, 1846–1850.

Y

Yamashiro, D., Yoshioka, M, et Ashiuchi, M. (2011). “Bacillus subtilis pgsE (Formerly ywtC) stimulates poly-γ-glutamate production in the presence of zinc.” Biotechnol Bioeng 108: P226-230.

Yazdani, M., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Soudi, M. R., Asghari, S. M, et Sharifzadeh, M. (2009). “Isolation and characterization of a novel gamma-radiation-resistant bacterium from hot spring in Iran.” J Basic Microbiol 49: P119-127.

Yi, Y., Li, Z., Song, C., & Kuipers, O. P. (2018). Exploring Plant-Microbe Interactions of the Rhizobacteria Bacillus subtilis and Bacillus mycoides by Use of the CRISPR-Cas9 System: CRISPR-Cas9 for Rhizospheric Bacillus . *Environmental Microbiology*, 4245-4260.

Yokoyama , K., Ito M., Agata N., Isobe M., Shibayama K., Horii T. and Ohta M .(1999). Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of Bacillus cereus, is reversible in mice. . *FEMS Immunol. Med. Microbiol,24*, 115–120.

Z

Zhang, J., Zhou, J., Liu, J., Chen, K., Liu, L, et Chen, J. (2011)b. “Development of chemically defined media supporting high cell density growth of Ketogulonicigenium vulgare and Bacillus megaterium.” Bioresour Technol 102: P4807-4814

Zhong ,W., Y, Shou., T.M, Yoshida., B. L,Marrone .(2007). Differentiation of Bacillus anthracis, B. cereus, and B. thuringiensis by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol,73*, 3446–3449.

Annexe 01 : Composition des milieux de culture.

Pour chacun des milieux de culture, le pH est mesuré par un pH- mètre puis ajusté par l'ajoute soit de KOH ou de HCl.

-Gélose à amidon à 1% :

Gélose nutritive en surfusion…….180ml

Amidon à 10%.....20ml

L'amidon est additionné stérilement à une concentration finale de 1%.

-Gélose au lait :

Agar doublement concentré……..….100ml

Lait UHT écrémé……...100ml

Le lait UHT est additionné stérilement.

-Gélose au jaune d'œuf :

Gélose TSA en surfusion……...……180ml

Emulsion de jaune d'œuf (v/v)……....20ml

-Gélose au gélatine à 10% :

Gélatine 10g……..100ml

Gélose nutritive…….180ml

-Milieu Tween

Peptone…….....10g

Chlorure de sodium ……....5g

$CaCL_2$ 0.1g

Agar ……..25g

H_2O …….1000ml

Tween …….10ml

Annexe 2 : Les solutions et les réactifs

1-Agar doublement concentré :

Agar ……....3g

Eau distillée ……..100ml

2-Solution de l'amidon à 1% :

Amidon soluble ……..…10g

Eau distillée …….…….100ml

La solution est stérilisée au bain marie à 100° C pendant 30min.

3-**Autres :**

Lugol, eau distillée.

Annexe 3 : L'étude de la croissances et activité enzymatiques chez les souches H5, R11, H10 dans différents condition physico-chimiques

Tableau I : Récapitulatif des résultats de l'influence de la température, le pH et la salinité sur la croissance et l'activité enzymatique de la souche R11.

La souche R11	**T°C**			**pH**			**NaCl**		
	30	40	60	5	7	9	5%	10%	15%
Croissance	+/- 48h	+ 48h	+ 48h	+ 24h	+ 48h	+ 24h	-	-	-
Amylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caséinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipoprotease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : pas de production

Tableau II : Récapitulatif des résultats de l'influence de la température, le pH et la salinité sur la croissance et l'activité enzymatique de la souche H5.

La souche H5	**T°**			**pH**			**Nacl**		
	30	40	60	5	7	9	5	10	15
Croissance	+ 48h	+ 24h	+ 24h	+ 24h	+ 48h	+ 24h	+ 24h	-	-
Amylase	3	8	4	10	3	8	5	3	NF
Caséinase	10	11	-	9	10	8	5	-	-
Lecithenase	3	-	-	-	3	-	-	-	-
Lipoprotease	-	2	-	3	-	1	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NF : Non fait, - : pas de production,

Tableau III : Récapitulatif des résultats de l'influence de la température, le pH et la salinité sur la croissance et l'activité enzymatique de la souche H10.

La souche H10	**T°C**			**pH**			**NaCl**		
	30	40	60	5	7	9	5%	10%	15%
Croissance	+ 48h	+ 24h	+ 24h	+ 24h	+ 48h	+ 24h	+ 24h	-	-
Amylase	3	4	-	8	3	5	6	2	NF
Caséinase	16	13	7	15	16	14	12	-	-
Lecithenase	12	12	-	13	12	10	3	-	-
Lipoprotease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NF : Non fait, - : pas de production