REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHARCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DE SCIENCE

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Science de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquées

Par :

Lahfaier Meriem

Belkacemi Houda

Thème :

Evaluation de l'activité antimicrobienne, l'aptitude de formation de biofilm et la production des biosurfactants par des bactéries thermophiles isolées à partir de trois sources hydrothermales en Algérie.

Soutenue publiquement le : 26/06/2024., Devant le jury composé de :

Mm Zergoug Amina	**MCA**	U. Médéa	Présidente
Mm Hamza Imen	**MCB**	U. Médéa	Examinatrice
Mm Hoceini Amina	**MCA**	U. Médéa	Encadreur

Années universitaire 2023/2024

Remerciements

Tout au long de ce cycle universitaire après de gros efforts et de persévérance de la part de tous ceux qui nous ont accompagné, aidé, encouragé et encadré, nous tenons à exprimer notre profonde gratitudes et remerciements à :

En premier lieu et avant tout, notre Grand Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté pour réaliser ce travail

Tout d'abord nous tenons particulièrement à adresser nos remerciements à Melle **HOCEINI Amina** notre promotrice, pour avoir dirigé ce travail et accepter de nous encadrer, conseiller et de nous orienter dans cette démarche scientifique.

Nous remercions également **Mm Zergoug Amina** d'avoir Accepté la présidence du jury de notre travail, c'est également un grand honneur pour nous d'être jugé par vous.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers **Mm Hamza Imen** d'avoir accepté d'examiner notre mémoire. Nous aimerions exprimer notre gratitude et nos remerciements à tous les membres de jury.

Un merci tout particulier à tous les membres de l'administration et les Enseignantes de département de science de la nature et de la vie qui ont participé le long de ces 5 années à notre formation et pour leurs très grands dévouements.

Nos remerciements vont aussi à tous les membres de l'équipe de laboratoire de la faculté de Science Biologique, Et bien sûr à tous les étudiants de la promotion Master 2 Microbiologie Appliquée 2023/2024.

Dédicace

Je voudrais dédier cet humble travail à mes premiers professeurs dans la vie, mes très chers parents ***«*** *l'étoile* ***de ma vie : Ma chère mère »*** *et* ***« Mon cher père »*** *qui m'ont toujours soutenu, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction. Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

A toute ma petite famille, à mes grands-mères que dieu vous protège.

A mes chers frères ***: « Mouhamed et Bilel »*** *et leur femme* ***pour*** *leur soutient et leur amour continu et pour avoir accompli tout ce que j'ai demandé.*

A ma petite sœur ***« Zineb »***

Au meilleur oncle ***« Hamid »*** *et à la meilleure tante pour leurs encouragements et leurs prières pour moi que dieu vos protège où que tu ailles.*

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien de mes amis que je remercie :

*Tous mes cousins exceptionnellement mon cousin « **Abdel Kader** » qui m'a aidé et*

Guidé tout au long de ce travail.

Mes chères tantes » ***« Sihem et Souad »****, mes meilleurs amis, mes confidents*

« ***Riheb, Khawla Inaam et Amani »*** *merci d'être là.*

Un grand salut particulier à mon très cher binôme de mon travail et ma vie ***« Houda »,*** *ma copine, une sœur a moi, qui je porte avec elle les bons souvenirs, merci pour ta*

Patience et vos efforts ma belle.

Et sans oublier mes collègues universitaires ***« Wassila, Fatiha, Djihad et Hadjer »*** *qui je*

Passe avec elles les bonnes et les mauvais moments.

A tous ceux qui ont eu un impact sur ma vie, et ont été oubliés par ma plume.



Meriem…

Dédicace

Avant tout, je remercie ***Allah*** *le Tout-Puissant qui m'a accordé la santé, la patience et la persévérance pour arriver ici après avoir versé des larmes, fourni un grand effort et passé de longues nuits. Louange à Toi, Seigneur.*

Je dédie ce travail à tous ceux qui ont semé en moi une graine d'espoir et qui m'ont soutenu ne serait-ce qu'avec un mot.

À mon héros, celui qui a travaillé pendant 17 ans pour me voir ici aujourd'hui, à celui qui m'a forgé ma personnalité, ***Mon Père****, le meilleur père du monde, je suis fier de toi.*

À la prunelle de mes yeux et la lumière de ma vie, celle qui ne m'oublie pas dans ses prières jour et nuit, celle qui m'a porté dans la douleur, celle qui a consacré sa vie pour moi, ***Ma chère Mère*** *adorée. Que Dieu vous accorde longue vie à tous les deux.*

À mon soutien et ma moitié, mes frères et sœurs : ***Hadjer, Marwa, Mouhamed et Sameh.***

À mes beaux-frères chers ***: Farouk*** *et* ***Kheir Eddine****, qui m'ont aidé à écrire mon mémoire, merci.*

À l'amour de mon cœur, mon neveu : ***Abdelbari Adam****.*

À mon cher ami qui m'a soutenu.

À ma chère amie, ma jumelle et ma sœur, ma belle qui a travaillé dur avec moi, celle qui a été là dans mes moments les plus difficiles, celle qui a partagé ce travail avec moi : ***Meriem.***

À mes amies et sœurs de vie ***: Khawla****,* ***Sihem****,* ***Souad****,* ***Inaam*** *et* ***Riheb****.*

À ceux avec qui j'ai partagé les bancs de l'école : ***Fatiha****,* ***Wassila****,* ***Hadjer****,* ***Djihed*** *et* ***Sihem****.*

À mes cousines adorées : ***Khadija****,* ***Amina****,* ***Zineb****,* ***Sarah****,* ***Selma*** *et d'autres, chacune par son nom.*

À ***mes grands-parents****, que Dieu leur accorde longue vie et bonne santé.*

À ***mes grands-parents****, que Dieu les ait en Sa miséricorde.*

À tous ceux qui m'ont soutenu et aidé ne serait-ce qu'avec un mot et que mon stylo a oublié, je dis merci, mille mercis à Dieu qui m'a donné la réussite et à vous tous qui avez été la meilleure compagnie, les meilleurs frères et les meilleures personnes…



Houda…

ملخص

اكتشاف الكائنات الحية الدقيقة في البيئات القاسية و ع تعمقنا للظروف المالئمة للحياة. تعتبر البكتيريا المحبة للحرارة، التي تزدهر في درجات حرارة عالية، ذات أهمية خاصة في مجال التكنولوجيا الحيوية نظ ًرا لقدراتها الفريدة. ركزت هذه الدراسة على ثالثين بكتيريا محبة للحرارة تم عزلها في عام 2021 من ثالثة مواقع جيولوجية حرارية)حمام الصالحين في منطقة المدية، حمام كسانة في منطقة البويرة، وحمام رغاية في منطقة عين الدفلى(. هدف هذا البحث هو تحديد وتوصيف العزالت البكتيرية المحبة للحرارة الواعدة من خالل تقييم نشاطها المضاد للميكروبات، وقدرتها على تكوين الألغشية الحيوية، وقدرتها على إنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي.

في البداية، سمحت لنا التوصيفات المظهرية للعزالت، استنادًا إلى خصائصها المايكروسكوبية والمجهرية، بتحديد السالالت موجبة الجرام وسالبة الجرام. بعد ذلك، قمنا بتقييم النشاط المضاد للميكروبات للسالالت المدروسة ضد السالالت المرضية المرجعية، مثل بكتيريا *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium* والفطريات *Candida albicans*، *Aspergillus brasiliensis*. تم مالحظة التأثير المضاد للميكروبات مع معظم السالالت ضد *Escherichia coli*، وضد *Pseudomonas aeruginosa*. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للفطريات، أظهرت سالالة نقطة اشتا ضد *Aspergillus brasiliensis*.

عالوة على ذلك، تم تحليل قدرة السالالت المحبة للحرارة على تكوين الألغشية الحيوية باستخدام طريقتين)كمية ونوعية(. وأظهرت النتائج أن 66% من السالالت لديها القدرة على إنتاج المخاط. وأخيرا ً، قمنا بفحص قدرة البكتيريا المحبة للحرارة على إنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي ووجدنا أن السالالت التي أظهرت نشاطا مضادا للميكروبات هي التي تنتجها.

بعد دراسة هذه الأنشطة الثالثة، استنتجنا أن: كلما كان النشاط المضاد للميكروبات أكثر أهمية، كانت إنتاجية المواد الخافضة للتوتر السطحي أكثر فعالية وكانت إنتاجية الألغشية الحيوية أكثر، وبالتالي تكون المقاومة للمضادات الحيوية مرتفعة.

الكلمات المفتاحية:

الكائنات المحبة للحرارة، نشاط مضاد للميكروبات، أغشية حيوية، المواد الخافضة للتوتر السطحي، النشاط الحيوي، تقنيات حيوية.

Abstract

The discovery of microorganisms in extreme environments has expanded our understanding of the conditions suitable for life. Thermophiles, bacteria that thrive at high temperatures, are of particular interest to biotechnology because of their unique capabilities. This study focused on 30 thermophilic bacteria isolated in the year 2021 from three geothermal sites (Hammam Elsalhin in the MEDEA region, Hammam K'sana in the BOUIRA region, and Hammam Righa in the AIN DEFLA region). To evaluate their antimicrobial activity, their ability to form biofilms, and their production of biosurfactants. Firstly, the phenotypic characterization of the isolated strains, based on their macroscopic and microscopic properties, allowed us to identify Gram positive and Gram-negative strains. Then, we evaluated the antimicrobial activity of the strains studied against reference pathogenic strains, such as the bacteria *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis and the fungi Candida albicans, Aspergillus brasiliensis*. The antimicrobial effect was observed in most strains against *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*. Regarding antifungal activity, only one strain showed activity against *Aspergillus brasiliensis*.

Additionally, the ability of thermophilic strains to form biofilms was analyzed using quantitative and qualitative methods. The results showed that 66% of the strains are capable of producing slime. Finally, we examined the ability of thermophilic bacteria to produce biosurfactants and observed that strains with an antimicrobial effect produce them.

After studying these three activities we concluded that: the greater the antimicrobial activity, the more efficient the production of biosurfactants and the stronger the production of biofilm, therefore the stronger the resistance to antibiotics.

Keywords: Thermophiles, antimicrobial activity, biofilm, biosurfactants, bioactive, biotechnology

Résumé

La découverte de microorganismes dans des environnements extrêmes a élargi notre compréhension des conditions propices à la vie. Les thermophiles, des bactéries qui prospèrent à des températures élevées, présentent un intérêt particulier pour la biotechnologie en raison de leurs capacités uniques. Cette étude s'est concentrée sur 30 bactéries thermophiles isolées l'année 2021 à partir de trois sites géothermaux (Hammam Elsalhin dans la région de MEDEA, Hammam K'sana dans la région de BOUIRA, et Hammam Righa dans la région de AIN DEFLA). Pour évaluer leur activité antimicrobienne, leur capacité à former des biofilms, et leur production de biosurfactants. Dans un premier temps, la caractérisation phénotypique des souches isolées, basée sur leurs propriétés macroscopiques et microscopiques, nous a permis d'identifier les souches Gram positives et Gram négatives. Ensuite, nous avons évalué l'activité antimicrobienne des souches étudiées contre des souches pathogènes de référence, telles que les bactéries *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis et les champignons Candida albicans, Aspergillus brasiliensis*. L'effet antimicrobien a été observé chez la plupart des souches contre *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.* En ce qui concerne l'activité antifongique, une seule souche a montré une activité contre *Aspergillus brasiliensis*.

De plus, la capacité des souches thermophiles à former des biofilms a été analysée à l'aide de méthodes quantitatives et qualitatives. Les résultats ont montré que 66% des souches sont capables de produire du slime. Enfin, nous avons examiné la capacité des bactéries thermophiles à produire des biosurfactants et avons observé que les souches ayant un effet antimicrobien en produisent.

Après avoir étudié ces trois activités nous avons conclu que : plus l'activité antimicrobienne est importante plus la production des biosurfactants est efficace et plus la production de biofilm est forte, donc la résistance aux antibiotique forte.

Les mots clés : Thermophiles, activité antimicrobienne, biofilm, biosurfactants, bioactif, biotechnologie.

TABLE

DES

MATIERES

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction Générale 01

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 01 : Les sources thermales et les thermophiles

I.1.1 Introduction 03

I.1.2 Le Mode des extrémophiles 03

I. 1.3 Les microorganismes thermophiles 05

I. 1.4 Les sources thermales de l'Algérie 06

I. 1.4.1. Les stations thermales médicalisées 06

I. 1.5 La niche écologique des thermophiles : 07

I. 1.5.1. Les biotopes naturels 07

I. 1.5.1.1. Biotopes terrestres 07

I. 1.5.1.2. Biotopes marins 07

I. 1.5.2. Les Biotopes artificiels 07

I. 1.6. Adaptations moléculaires à la thermophile 08

I. 1.6.1. Thermostabilité des acides nucléiques (ADN, ARN) 08

I. 1.6.1.1. L'ADN gyrase inversée 08

I. 1.6.1.2. Protéines analogues aux histones des eucaryotes 08

I. 1.6.1.3. Accumulation d'une grande quantité d'osmolytes 08

I. 1.6.1.4. Teneur en Guanine + Cytosine 09

I. 1.6.2. Thermostabilité des protéines 09

I. 1.6.2.1. La présence de centres hydrophobe 09

I. 1.6.2.2 La présence de nombreuses interactions ioniques 09

I. 1.6.2.3. La présence des protéines chaperonne du choc thermique 09

I. 1.6.3. Thermostabilité des lipides membranaires 09

I. 1.7 Les avantages des thermophiles 09

Partie02 : Activité antimicrobienne et Biofilm

I.2.1 Agent antimicrobien 11

I. 2.1.1Mécanismes d'action 11
I. 2.1.2 L'activité antimicrobienne des thermophiles 12
I. 2.2 Biofilms bactériens 13
I. 2.2.1 Définition 13
I. 2.2.2 Composition du biofilm 13
I. 2.2.3 Formation du biofilm bactérien 13
I. 2.2.3.1 Attachement réversible des bactéries 14
I. 2.2.3.2 Adhésion irréversible 14
I. 2.2.3.3 Formation des microcolonies et production d'EPS 14
I. 2.2.3.4 Maturation du biofilm 15
I. 2.2.3.5 Détachement et dispersion du biofilm 15
L. 2.2.4 La formation de biofilm par les bactéries thermophiles 16
I. 2.2.5 L'intérêt de formation de biofilm 17

Partie 03 : Les biosurfactants

I.3.1Définition 18
I. 3.2Composition et structure chimique 18
I. 3.3 Classification des biosurfactants 18
I. 3.4 Microorganismes producteurs de biosurfactants 19
I. 3.5 Applications de biosurfactants 20
I. 3.6 Propriétés physicochimique des biosurfactants 21
I. 3.6.1 Abaissement de la tension superficielle 21
I. 3.3.6.2. Abaissement de la tension interfaciale 21
I. 3.6.3. Concentration Micellaire Critique (CMC) 21
I. 3.6.4. Solubilisation 22
I. 3.7 Avantages des biosurfactants 23
I. 3.8 Inconvénients des biosurfactants 24
I. 3.9 Les biosurfactants des bactéries thermophiles 24

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériels 25
.
II.1.1 Verrerie 25

II.1.2 Appareillage : 25

II.1.3 Milieux culture 25

II.1.4 Autres produits consommables 25

II.1.5 Autres matériel 25

II.2 Méthode 25

II.2.1 Période et lieu d'étude 25

II.2.2 Objectifs d'étude 26

II.2.3 revivification et identification des souches 26

II.2.3.1 Enrichissement et ensemencement 26

II.2.4 Identification phénotypique des souches 26

II.2.5 Recherche des activités antimicrobiennes sur milieu solide (technique des cylindres d'agar 28

II.2.6 La recherche de la capacité de formation de Biofilm 28

II.2.6.1 La méthode du Rouge Congo 28

II.2.6.2 Méthode de microplaques de titration à 96 puits 29

II.2.7 La production des biosurfactants 30

II.2.7.1 Sélection des souches productrices de biosurfactant 30

II.2.7.2 Préparation de préculture 30

.

II.2.7.3 Préparation de culture 30

II.2.7.4 Extraction de biosurfactant 31

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Caractérisation phénotypique des souches isolées des trois sites 32

III.1.1 Observation macroscopique 32

III.1.2 Observation microscopique 34

III.2 L'activité antimicrobienne 36

III.3 L'aptitude de formation de biofilm 40

III.3.1 Technique Rouge Congo 40

III.3.2 Technique de microplaque de titration..... 42

III.4. Production des biosurfactants..... 45

III.4.1. L'effet de l'indice d'émulsification 46

III.4.2. L'effet de test de déplacement de l'huile :
.....47

III.4.3 L'extraction des biosurfactant 49

Conclusion 50

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ABREVIATIONS

Liste des figures

Figure I1.1 : Exemples des sources thermales en Algérie…….. **6**

Figure I.2.1 : les Etapes de la formation et de la dispersion d'un Biofilm bactérien …. **16**

Figure I.3.1 : Structures tensioactives générales ……..... **18**

Figure I.3.2 : Illustration des domaines dans lesquels il y a formation de micelles (concentration micellaire critique CMC) …… **22**

Figure I.3.3 : Représentation graphique des différentes propriétés fonctionnelles des biosurfactants / bioémulsifiants …… **23**

Figure III.1 : L'aspect macroscopique des souches ……..... **33**

Figure III.2 : Coloration de gram des souches thermophiles sous microscope optique au grossissement X100, X40 ……..... **35**

FigureIII.3 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (Bactérie et champignon) …….... **37**

Figure III.4 : La production de slime chez les souches ……. **40**

Figure III.5 : Les cultures bactériennes avant at après l'agitation 48h ……. **45**

Figure III. 6 : Le résultats de test d'émulsification …… **46**

Figure III.7 : Présentation du pourcentage de l'indice d'émulsion chez les différentes souches sélectionnées productrices de biosurfactants …….. **46**

Figure III.8 : Le résultats de test de déplacement après 30s …… **47**

Figure III.9 : Le résultats de l'extraction ……. **49**

Liste des tableaux

Tableau I.1.1 : Principaux types d'extrémophiles et extrémotolérants ……..... **4**

Tableau I.3.1 : Différents domaines d'applications de biosurfactants ……. **20**

Tableau III .1 : Caractères culturaux des souches cultivées …… **34**

Tableau III.2 : Résultats de coloration de gram …….. **35**

Tableau III.3 : l'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon) ……. **38**

Tableau III.4 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA ……... **41**

Tableau III.5 : Résultats de la technique de microplaque de titration ……. **43**

Tableau III.6 : Les mesures de diamètre de la zone claire après 30s et 24h …… **48**

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN : Acide Ribonucléique.

B.N : Bouillon Nutritif

°C : Degré Celsius.

CLSI: Clinical and laboratory standards institute

CMC : Concentration Micellaire Critique

D.O : Densité Optique

DDP : Diamètre de Déplacement de pétrole

E24 : Activité Émulsifiante

H : Heur.

LB : Luria Bertan

MM : Milieu Minimum

Min : Minimale

Max : Maximale

MH : Muller Hinton

NaCl : Chlorure de sodium.

Na2CO: Carbonate de sodium

PBS: phosphate-buffered saline

PH : potentiel d'hydrogène.

RCA : Rouge Congo Agar.

T : Température.

TTM: Thermus thermophilus medium.

TS: Tension de Surface

UFC: Ultimate Fighting Championship

V/V: Volume / volume

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Puisqu'ils peuvent se propager dans des conditions où d'autres organismes ne peuvent pas se développer ou se développer un peu, les microorganismes vivant dans des environnements extrêmes ont toujours été considérés comme un sujet de recherche populaire par les scientifiques. En particulier, la tolérance des composants cellulaires de ces microorganismes aux hautes températures a entraîné l'utilisation extensive des bactéries thermophiles dans différents types d'applications biotechnologiques (Adiguzel et *al*., 2011)

Les sources thermales ont été identifiées comme des habitats naturels favorables à l'établissement des bactéries thermophiles qui sont des microbes habitent principalement dans les sources chaudes, vivent et survivent à des températures élevées, elles ont été moins explorées en raison de difficultés d'isolement et de maintien en culture pure.(Panda et *al*., 2013). . L'Algérie renferme de multiples sources d'eaux chaudes naturelles, généralement situées dans les zones montagneuses ou à proximité des zones volcaniques tel que (Hammam Elsalhin dans la région de MEDEA, Hammam K'sana dans la région de BOUIRA, et Hammam Righa dans la région de AIN DEFLA).

Ces bactéries représentent une source précieuse de composés bioactifs aux multiples bénéfices pour la vie humaine notamment en tant qu'agents antimicrobiens. Cette recherche vise à identifier et caractériser des isolats bactériens thermophiles prometteurs en analysant leurs composés bioactifs et leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens, afin de répondre aux défis posés par l'évolution continue de la résistance aux antibiotiques. (Octarya et *al*., 2022). Les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens.(Tremblay et *al*., 2014)

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains microorganismes. Ils possèdent de nombreuses propriétés telles que la haute biodégradabilité, la non-toxicité, et une meilleure fonctionnalité dans des conditions extrêmes (pH acides, salinités et températures élevées, etc.)(Makkar et *al*., 2011).Ils peuvent être produits sur des substrats renouvelables (Dzięgielewska , 2013),ce qui permet leur utilisation dans différents domaines d'application tels que l'environnement, l'industrie pétrolière et l'agronomie (Sachdev et Cameotra, 2013).

Les objectifs de ce travail peuvent être résumés dans les points suivants :

- Enrichissement et identification phénotypique des souches thermophiles.

- Evaluation de l'activité antimicrobienne et l'aptitude de formation de biofilm.
- Etudier la production et la caractérisation d'un biosurfactant.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 01

LES SOURCES THERMALES ET THERMOPHILES

I.1.1. Introduction

La survie et la croissance des microorganismes vivants dépendent de multiples facteurs physicochimiques présents dans leur environnement. Chaque organisme est défini et caractérisé par des paramètres spécifiques qui sont essentiels à son développement.(Bouamoucha et Boufersada , 2008)

I.1.2. Les extrêmophiles

En 1974, Mac Elory a introduit le terme "extrêmophiles" dans un article intitulé « Somecomments on the evolution of extremophiles », il a été interprété de plusieurs façons pour enfin être associé aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement d'une vie (Irwin et Baird, 2004).

L'extrémophiles désigne la capacité de certains microorganismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques qui sont généralement défavorables pour la plupart des autres organismes vivants. Contrairement à la simple résistance aux conditions extrêmes, le concept d'extrêmophilie suggère que l'ensemble de la machinerie cellulaire est adapté à ces conditions et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans cet environnement hostile.

On classe les organismes extrémophiles selon le paramètre physico-chimique auquel ils sont adaptés dans une valeur extrême. Par exemple, pour la température, on a des organismes hyperthermophiles, thermophiles et psychrophiles. Pour le pH, on a des organismes qui vivent à pH bas (basophiles), ou élevé (acidophiles).(Detay et Thomas, 2018)

Tableau I.1.1 : Principaux types d'extrémophiles et extrémotolérants:(Detay et Thomas, 2018)

TYPE	Caractéristiques - Organismes vivant dans des environnements
Thermophile	Chauds avec des optimums de croissance proche de 60 °C (sources chaudes).
Hyperthermophile	Très chauds avec des optimums de croissance proche de 90 °C à 115 °C. Ils peuvent se diviser dans un milieu d'eau portée à ébullition quand la pression n'est pas trop forte, (sources chaudes, geysers, solfatares, fumeurs...).
Acidophile	Acides avec un pH optimum de croissance proche de 3 (lacs de cratère, sources chaudes, solfatares, Dallol, mines et couches de sulfures...).
Alcalophile	Basiques avec un pH optimum de croissance proche de 9 et plus (lacs natrons, lacs riches en Na2CO, Dallol, sources chaudes alcalines ...).
Halophile	Très salés, forte concentration en NaCl (lacs du rift Est-africain, salar d'Uyuni en Bolivie, Marais salants, sources sortant de couches d'évaporites, mines de sel, diapirs de sels...).
Psychrophile	Froids (abysses, calottes polaires, glaciers, inlandsis, neige, montagne, permafrost, et, de façon tout à fait artificielle, dans l'espace où ils peuvent résister au vide et aux radiations, mais pas s'y développer).
Piezophile	Soumis à des pressions élevées (fonds océaniques profonds jusqu'à − 11000 m : fosse des Mariannes), sous-sol profond...

I.1.3. Les microorganismes thermophiles

Effectivement, les microorganismes thermophiles sont des organismes qui prospèrent dans des environnements à température élevée. La définition proposée par Thomas Brock est largement acceptée dans le domaine de la microbiologie. Selon cette définition, un thermophile est un organisme dont la température optimale de croissance se situe au-delà de 60°C. Cette température optimale peut varier selon les espèces spécifiques de microorganismes thermophiles, mais elle est généralement significativement plus élevée que celle des organismes non thermophiles. Les microorganismes thermophiles sont souvent trouvés dans des environnements géothermiques tels que les sources chaudes, les fumeurs noirs sous-marins, et les sols riches en matière organique en décomposition où la température peut atteindre des niveaux élevés.(Alain et *al*., 2012)

La définition plus large des organismes thermophiles proposée par Karl Stetter est en effet intéressante car elle englobe un spectre plus large de températures. Elle permet également de subdiviser les thermophiles en différentes catégories en fonction de leurs températures optimales de croissance, ce qui offre une vue plus nuancée de leur diversité. Voici un résumé des catégories proposées par Stetter :

1. **Thermophiles modérée :** Leurs conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C. Ils sont adaptés à des températures élevées mais pas aussi extrêmes que les thermophiles extrêmes et les hyperthermophiles.

2. **Thermophiles extrêmes :** Leur température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C. Ils peuvent prospérer dans des environnements extrêmement chauds mais ne sont pas aussi extrêmes que les hyperthermophiles.

3. **Hyperthermophiles :** Leur température optimale de croissance est supérieure à 80°C. Ces organismes sont adaptés à des températures très élevées et peuvent survivre dans des conditions extrêmement chaudes.

4. **Hyperthermophiles extrêmes :** Leur température optimale de croissance est supérieure à 105°C. Ils sont parmi les plus extrêmes des organismes thermophiles et peuvent prospérer dans des environnements extrêmement chauds, tels que les sources hydrothermales sous-marines.

La plupart des thermophiles appartiennent aux domaines procaryotes, notamment les Bactéries et les Archaea, mais quelques eucaryotes thermophiles ont également été décrits. Chez les eucaryotes, les températures maximales de croissance sont généralement moins

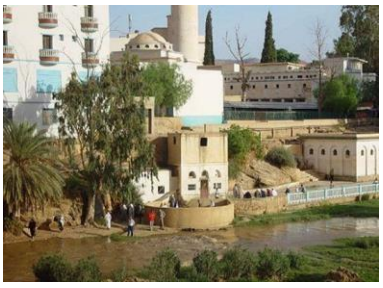
élevées que chez les procaryotes. Les hyperthermophiles affiliés aux archées sont particulièrement bien étudiés pour leur capacité à survivre dans des environnements extrêmement chauds et sont souvent trouvés dans des habitats géothermiques. Cette classification nous aide à mieux comprendre la diversité et la résilience des organismes vivant dans des environnements thermiques extrêmes.(Alain et *al*., 2012)

I.1.4. Les sources thermales de l'Algérie

Il existe sur le territoire algérien plus de 200 sources thermales d'après les études réalisées à ce sujet, ce nombre croit régulièrement quand on se déplace vers l'Est. Les températures mesurées à l'émergence varient de 19°C à Ben Haroune à 98 °C à Hammam Meskoutine. La minéralisation des eaux est déterminée surtout par la nature chimique et minéralogique des sédiments qu'elles traversent. Les sources thermales les plus minéralisées sont en relation directe avec les sédiments gypso-salins du Trias si répandu en Algérie, ce cas est rencontré à titre d'exemple à Hammam Melouane 29.42 gr/l, Hammam El Biban 15gr/l, Hammam Salhine 9 gr/l. Cette concentration élevée en minéraux peut conférer aux eaux thermales des propriétés curatives et thérapeutiques particulières, qui sont souvent recherchées pour leurs bienfaits pour la santé et le bien-être.(Ouali et *al*., 1974)

I.1.4.1. Les stations thermales médicalisées

Parmi les nombreuses stations thermales qui existent en Algérie, huit seulement sont médicalisées, il s'agit des stations thermales : Hammam Bouhanifia (Mascara), Hammam Bouhadjar (Ain Temouchent), Hammam Boughrara (Tlemcen), Hammam Rabbi (Saida), Hammam Righa (AinDefla), Hammam Guergour (Setif), Hammam Salhine (Biskra), Hammam Meskoutine (Guelma). Ces stations thermales sont gérées par la Société Algérienne de Thermalisme et sont conventionnées avec les différentes caisses de sécurité sociale (CNAS, Casnos, caisse militaire)(Ouali et *al*., 1974)


Hammam Salhin **Hammam Bouhnafia** **Hamma Boughrara**

Figure I.1.1 : Exemples des sources thermales en Algérie(Ouali et *al*., 1974)

I.1.5. La niche écologique des thermophiles

I.1.5.1. Les biotopes naturels

Les micro-organismes thermophiles sont présents dans de nombreux environnements géothermiques naturels à travers la planète, souvent liés à des régions de l'activité tectonique. Ces écosystèmes peuvent avoir une source :

I.1.5.1.1. Biotopes terrestres

Effectivement, vous avez bien résumé la situation. Dans les habitats géothermiques comme les sources chaudes en Islande, aux Açores, ou dans le Parc national de Yellowstone, la nature de l'eau est fortement influencée par les roches traversées, qui sont souvent associées à une activité volcanique. La température de l'eau in situ varie en fonction de la profondeur d'origine et peut atteindre des températures inférieures à 100°C. De plus, les conditions de pH peuvent être acides ou basiques à la surface de la terre, créant ainsi un environnement varié et extrême. Ces conditions extrêmes favorisent la croissance et la diversité des micro-organismes thermophiles, qui sont adaptés à ces environnements inhabituels. (Gregoire, 2009)

I.1.5.1.2. Biotopes marins

L'eau de mer s'infiltre dans les fissures et se chauffe au contact de la roche basaltique, du manteau ou d'autres roches ultramafiques en fusion, atteignant parfois des températures extrêmement élevées, jusqu'à 400°C. Ensuite, à travers d'autres fissures, elle remonte vers la surface. Ce fluide hydrothermal est abondant en composés réduits comme le sulfure d'hydrogène (H2S), le méthane (CH4), et l'ammonium (NH4+), ainsi qu'en éléments métaboliques tels que le manganèse (Mn^{2+}), le fer (Fe^{2+}), le lithium (Li^{+}), le cadmium (Cd^{2+}), le cuivre (Cu^{2+}), et le zinc (Zn^{2+}). Lorsque ce fluide se mêle à l'eau de mer froide (à 2°C), cela entraîne la précipitation de divers sulfures métalliques et de sulfate de calcium anhydre, donnant naissance aux "fumeurs" et "diffuseurs" qui forment graduellement les cheminées hydrothermales. C'est dans cette zone de mélange turbulente, entre le fluide hydrothermal surchauffé et toxique et l'eau de mer froide et oxygénée, que la vie hydrothermale prospère (Minic et *al*, 2006).

I.1.5.2. Les Biotopes artificiels

Les thermophiles peuvent également se trouver dans des environnements thermiques artificiels, comme les circuits de chauffage, les réservoirs d'eau chaude, les installations nucléaires, les usines géothermiques, les puits de pétrole et les forages, ainsi que dans les composts et les bioréacteurs. (Gomri, 2012).

I.1.6. Adaptations moléculaires thermophile

Parmi les caractéristiques des thermophiles, la capacité de vivre à des températures supérieures à celles tolérées par les autres organismes vivants(Bertrand et *al*., 2011) . Pour se développer dans de telles conditions, les thermophiles ont subi de nombreuses adaptations, ce qui a permis le maintien de leur intégrité ainsi que leurs fonctions(Niehaus et *al*., 1999) . De ce fait, leurs macromolécules (ADN, protéines et lipides) possèdent des propriétés particulières (Bertrand et *al*., 2011)

I.1.6.1. Thermostabilité des acides nucléiques (ADN, ARN)

Une des premières interrogations concerne la stabilité du matériel génétique. Bien que la composition des acides nucléiques des microorganismes thermophiles soit similaire à celle des mésophiles, il est observé que, à des températures élevées, l'ARN se dégrade et l'ADN subit une dénaturation in vitro (la séparation des deux brins de la double hélice), puis une dégradation.(Quérellou et Guézennec, 2010);Différents mécanismes favorisant la stabilité et la réparation des acides nucléiques chez les thermophiles ont été découverts .(Bertrand et *al*., 2011)

I.1.6.1.1. L'ADN gyrase inversée

Cette enzyme induit des super-enroulements positifs au niveau de l'ADN et recouvre une protéine manteau à l'emplacement des dommages, réduisant ainsi le taux de rupture de la double hélice et garantissant une meilleure stabilité face à la température.

I.1.6.1.2. Protéines analogues aux histones des eucaryotes

Ces protéines se lient à l'ADN et contribuent à sa compaction, assurant ainsi sa stabilité.

I.1.6.1.3. Accumulation d'une grande quantité d'osmolytes

La présence de solutés compatibles, tels que de fortes concentrations intracellulaires en 2,3-diphosphoglycérate de potassium cyclique chez Methanopyrus sp., protège l'ADN contre des

lésions chimiques telles que les dépurinations, ce qui contribue à stabiliser l'ADN en augmentant sa température de fusion.(Charlier et Droogmans, 2005)

I.1.6.1.4. Teneur en Guanine + Cytosine (G+C)

Une augmentation de la proportion de (G+C) dans les ARN de transfert et les ARN ribosomiques pourrait favoriser la stabilité de leurs conformations dans des environnements extrêmes.(Charlier et Droogmans, 2005)

I.1.6.2. Thermostabilité des protéines

Les protéines des thermophiles possèdent des caractéristiques particulières qui expliquent leur thermostabilité. Bertrand et ses collaborateurs ont identifié :

I.1.6.2.1. La présence de centres hydrophobes

Ces derniers réduisent la tendance des protéines à se déplier. En effet, des études ont montré que c'est le repliement des protéines qui contribue principalement à leur résistance à la chaleur.

I.1.6.2.2. La présence de nombreuses interactions ioniques à la surface des protéines

Celles-ci contribuent au maintien des protéines entre elles.

I.1.6.2.3. La présence des protéines chaperonne du choc thermique

Elles interviennent dans le repliement des protéines partiellement dénaturées.

I.1.6.3. Thermostabilité des lipides membranaires

Les lipides membranaires des microorganismes thermophiles se présentent sous forme de tétra éthers de tétra éthers, qui démontrent une résistance naturelle aux températures élevées(Bertrand et *al*., 2011) .Leur principale stratégie d'adaptation implique l'augmentation de la longueur des chaînes acyles, ainsi que l'élévation du degré de saturation en acides gras, la ramification et la cyclisation.(Charlier et Droogmans, 2005). En outre, afin de contrer les effets néfastes des températures élevées sur la perméabilité cellulaire, certains organismes thermophiles ont recours à des systèmes antiports proton-sodium non stœchiométriques pour établir un second gradient de sodium, indépendant de la température du milieu.(Albers et *al*., 2001)

I.1.7. Les avantages des thermophiles

En outre, afin de contrer les effets néfastes des températures élevées sur la perméabilité cellulaire, certains organismes thermophiles ont recours à des systèmes antiports proton-sodium non stœchiométriques pour établir un second gradient de sodium, indépendant de la température du milieu.(Postec, 2005)

L'emploi des thermophiles en biotechnologie comporte divers avantages :

- Les risques de contamination par les mésophiles sont réduits lors de cultures continues à des températures dépassant les 60°C:(Vieille et Zeikus, 2001)
- La diminution de la viscosité de certains milieux de culture entraîne une augmentation de la diffusion des molécules, accélérant ainsi les réactions enzymatiques et favorisant le déplacement de l'équilibre.(Abdel-Fattah, 2002)
- Les mycètes thermophiles présentent des caractéristiques souhaitables telles que leur isolement et leur culture aisés, leur capacité à s'adapter à divers habitats, la réduction des risques de contamination, des besoins nutritionnels simples, une croissance rapide et la formation uniforme de leur mycélium. Ces facteurs favorables permettent leur utilisation à grande échelle.(Maheshwari et *al.*, 2000)

PARTIE 02

ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET BIOFILM

I. 2.1 .Agent antimicrobien

Les termes « antimicrobiens » ou « agents antimicrobiens » font simplement référence à tous les types de médicaments naturels et/ou synthétiques susceptibles de diminuer la multiplication de microorganismes ou de les détruire sans endommager les tissus de l'organisme. Les moyens de lutte sont variés. L'utilisation de tel ou tel moyen dépend des microorganismes visés, de son environnement et de l'intensité de l'action souhaitée. Parmi eux, on retrouve notamment les agents physiques comme : la température, les radiations, la filtration et la centrifugation, et aussi les agents chimiques comme : les antibiotiques, les antiseptiques et les sulfamides. Les agents antimicrobiens sont couramment utilisés pour le traitement et la prévention des maladies chez l'humain et les animaux ainsi que dans l'industrie agricole pour stimuler la croissance. Lorsque des microorganismes sont mis au contact d'une substance toxique, leur destruction n'est ni instantanée, ni totale. A mesure que l'agent antimicrobien agit, son efficacité diminue jusqu'à devenir nulle et cela avant que tous les microorganismes aient été tués. Ce sont d'ailleurs les survivants qui pourront développer les mécanismes de résistance.(Derfalou, 2020)

Le premier agent antimicrobien au monde était le Salvarsan, un remède contre la syphilis qui a été synthétisé par Ehrlich en 1910. En 1953 les sulfamides ont été développés par Domagk et d'autre chercheurs, ces médicaments étaient des composés synthétiques et avaient des limites en termes de sécurité et d'efficacité. En 1928, Fleming découvre la pénicilline, il a été constaté que la croissance de staphylococcus aureus était inhibée dans une zone entourant une moisissure bleue contaminée (un champignon du genre Penicillium) dans des boites de culture, conduisant à la découverte qu'un microorganisme produirait des substances pouvant inhiber la croissance d'autres microorganismes(López-Velandia et *al*., 2018)

I. 2.1.1. Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des produits antimicrobiens autres que les antibiotiques restent encore généralement peu et mal connus. Les agents chimiques antimicrobiens se classent en deux catégories selon leur effet. Le premier est létal, c'est à dire qu'il entraîne la mort de l'individu. On le nomme par le suffixe –CIDE : virucide, bactéricide, fongicide, insecticide. Le second correspond à une inhibition de croissance en présence du produit actif. On le nomme avec le suffixe –STATIQUE : bactériostatique, fongistatique.

Parmi les produits BIOCIDES, on distingue les composés chimiquement très réactifs qui se caractérisent par une action brutale, rapide et temporaire et souvent non spécifique. Exemples : les oxydants et l'eau oxygénée, les halogénés (chlore et iode) et l'oxyde d'éthylène, les acides et les bases fortes, les aldéhydes et les phénols. ii) les composés chimiquement stables à actions plus spécifiques comme les ammoniums quaternaires, les dérivés phénoliques autres que le phénol, la chlorohexidine parmi d'autres.

Les inhibiteurs de croissance avec un effet BIOSTATIQUE comprennent essentiellement les métaux (mercuriels et dérivés du cuivre, du zinc, de l'argent...) et les colorants.

Selon leur nature et la concentration utilisée, les antiseptiques et désinfectants ont une ou plusieurs cibles. Dans la majeure partie des cas, l'accès à la cible nécessite le franchissement de la paroi cellulaire qui est un obstacle à la fois chimique et physique.

M.R.J. Salton en 1968 a décrit cinq étapes dans l'action des agents antimicrobiens :

1. Adsorption sur la cellule suivie de la pénétration dans la paroi.

2. Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique conduisant à sa désorganisation.

3. Echappement des composants de faible poids moléculaire du cytoplasme.

4. Dégradation des protéines et des acides nucléiques.

5. Lyse de la paroi causée par les enzymes autolytiques.(Nosocomiales, 2000)

I.2.1.2. L'activité antimicrobienne des thermophiles

L'activité antimicrobienne des thermophiles est un sujet fascinant et pertinent dans le domaine de la microbiologie et de la biotechnologie. Les thermophiles sont des micro-organismes qui prospèrent à des températures élevées, souvent comprises entre 45°C et 80°C, voire plus. Leur activité antimicrobienne peut être attribuée à plusieurs facteurs clés :

Production de métabolites secondaires, Protéines antimicrobiennes, Compétition pour les ressources, Génétique et mécanismes de résistance.

Exemples concrets d'antimicrobiens produits par les thermophiles :

Thermocidines : Un type de peptide antimicrobien produit par certaines espèces thermophiles.

Bactériocines : Protéines produites par des bactéries thermophiles qui peuvent tuer ou inhiber la croissance d'autres bactéries.

Antibiotiques naturels : Certains thermophiles peuvent produire des antibiotiques uniques qui ne sont pas trouvés chez les mésophiles.(Allouche et *al*., 2010)

I.2 .2. Biofilms bactériens

I.2.2.1. Définition

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attaches à une surface et enrobes d'une matrice polymérique.

Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique, qu'a une surface abiotique. Ainsi, le biofilm est défini comme étant une association de micro-organismes, dans laquelle les cellules se collent l'une à l'autre sur une surface recouvrée par une matrice de substances extracellulaires polymériques produites par les bactéries elles-mêmes.(Jamal et *al*., 2018)

I.2.2.2 Composition du biofilm

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm, incluant des protéines, des enzymes, des polysaccharides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des lipides, des glycolipides et des cations(Flemming et Wingender, 2010). En plus de ces composants, l'eau est le composant majeur, avec plus de 97%, responsable du flux des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm(Sutherland, 2001)La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance(Tremblay et *al*., 2014b).

I.2.2.3 Formation du biofilm bactérien

La formation du biofilm est un processus hautement complexe, dans lequel les cellules microbiennes passent de la forme planctonique à la forme sessile**.** Il été supposé que la formation du biofilm est dépendante de l'expression de certains gènes spécifiques contrôlant leur formation(Okada et *al*., 2005). Le processus de formation de biofilm s'effectue en une

série d'étapes conduisant l'adaptation à une multitude de conditions nutritionnelles et environnementales(Hentzer et *al*., 2005)

I.2.2.3.1 Attachement réversible des bactéries

Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'associer à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : sédimentation) ou alors de transport en faisant notamment intervenir des structures particulières de la surface de la bactérie. (Goetz et *al*.,2016).

Il s'en suivra une adhésion réversible correspondant à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface déclenchée, lorsque les microorganismes arrivent sur le support à une certaine distance, et faisant intervenir des forces non covalentes ou des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques (Goetz et *al.*,2016).

I.2.2.3.2. Adhésion irréversible

Dans un deuxième temps, grâce à la sécrétion d'exo polymères par les bactéries qui leur permettant de renforcer leur fixation au support, l'adhésion devient irréversible (Branger, 2007). Dans ce cas, interviennent des interactions fortes et de courte distance qui apparaissent lorsque la distance devient inférieure à 3 nm, et comprennent les interactions hydrophobes, acides base de Lewis, la formation de dipôle, les liaisons covalentes et les interactions d'hydrogène (Malek et *al*., 2013).

I.2.2.3.3. Formation des microcolonies et production d'EPS

Durant cette étape, lorsque les bactéries sont irréversiblement attachées à la surface sera définitif, elles vont s'agréger entre elles et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et l'environnement liquide. Ce ci mène à la formation des microcolonies qui s'élargissent et s'unissent pour former une couche cellulaire couvrant la surface (Goetz et *al*., 2016). Il y aura alors une phase durant laquelle la densité bactérienne atteint un certain seuil, qui permettra au quorum sensing de participer à la maturation du biofilm(Otto, 2013). Une fois l'intensité de ses signaux abouti un niveau précise, les mécanismes génétiques contrôlant la production d'EPS sont activés (Costerton et *al*., 1999)Ces EPS jouent un rôle immense dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures, qu'elles soient mécaniques, physiques, chimiques ou cellulaires ainsi que dans l'ancrage de cellules à la surface (Mogha et *al*., 2014)

I.2.2.3.4. Maturation du biofilm

Par la suite la croissance exponentielle de biofilm se traduisant par une augmentation favorable de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel (Costerton et *al*., 1995). Le biofilm mature se caractérise par la formation des canaux aqueux, qui vont entrainer la séparation des microorganismes d'une part, et permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties enfuies du biofilm d'autre part, ainsi que l'évacuation des déchets .Le biofilm se développe, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, en présence des conditions optimales (Filloux et Vallet, 2003).

I.2.2.3.5 Détachement et dispersion du biofilm

Une fois la taille maximale du biofilm atteinte, les bactéries jointes afin de survivre et coloniser de nouveaux créneaux doivent pouvoir se détacher et se disperser du biofilm(Mogha et *al*., 2014). Le détachement de cellules de surface peut être régulé par le quorum sensing, et qu'a également ceci aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm (Tremblay et *al*., 2014)Principalement, les cellules filles sont détachées en premier du biofilm, suite à divers facteurs tels que : perturbation mécanique (ex : forces de cisaillement), les dynamiques des fluides, une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (ex : DNase) (Goetz et *al*., 2016). Le détachement de biofilm a été divisé en trois processus : érosion, abrasion et sloughing :

1. L'érosion : est le résultat des forces de cisaillement en milieu liquide.
2. L'abrasion (la collision de particules) : Se réfère au détachement continu de cellules simples ou bien des petits groupes cellulaires et affecte la surface totale du biofilm.
3. Sloughing : Correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm, affectant non seulement le biofilm entier mais aussi la surface de biofilm (Mogha et *al*., 2014)

La figure ci-dessous montre les différentes étapes de formation de biofilm.

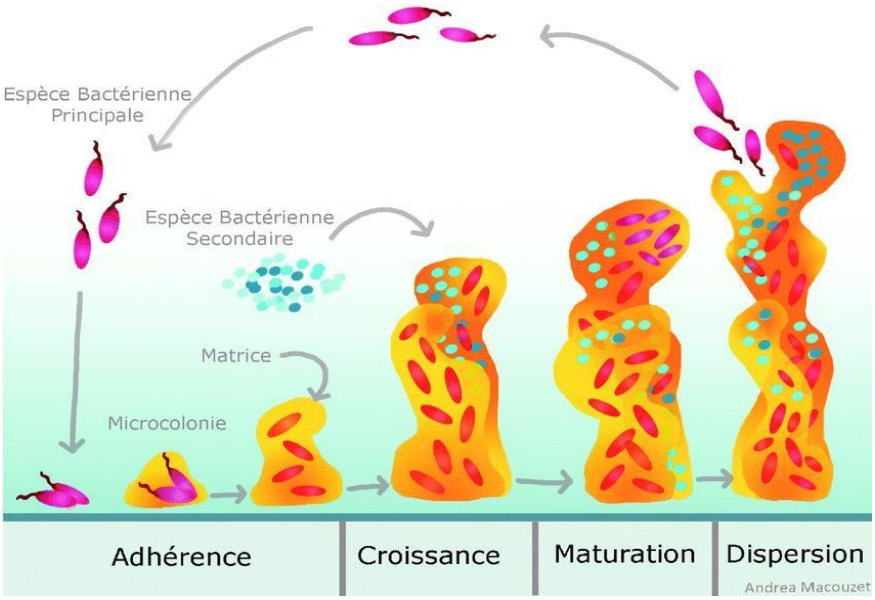


Figure I.2.1 : les Etapes de la formation et de la dispersion d'un Biofilm bactérie (Tremblay et *al*., 2014)

I.2.2.4 La formation de biofilm par les bactéries thermophiles

La croissance extensive des biofilms dans les chaines de fabrication peut se produire lorsque la surface de l'équipement est mal nettoyée, humide, en mauvaise état d'entretien (oxydée, rouillée, rayée, entaillée) , cycles de production sont trop longs et utilisation des ingrédients ou des sous-produits contaminés par les thermophiles.(Rayane, s.d.)

Les biofilms des bacilles thermophiles sont désignés comme des biofilms de process. Ces biofilms particuliers sont généralement dominés par une seule espèce en raison des pressions sélectives de l'environnement , les pressions de sélection dans une usine de fabrication des produits laitiers peuvent inclure la chaleur, la composition du produit, le pH et l'activité de l'eau (Flint et *al*., 1997). Les Biofilms des bacilles thermophiles sur l'acier inoxydable sont formées d'une monocouche et par conséquent ne font pas la maturation. Ce phénomène est susceptible de se produire dans des zones d'une usine de fabrication de produits laitiers qui sont régulièrement nettoyés et où il existe des taux de cisaillement élevés et qui sont des zones mortes, comme la surface des échangeurs de chaleur à plat. Cependant, dans d'autres sites des usines de fabrication laitière, où le flux est incompatible, comme au-dessous des plaques de distribution d'évaporateurs, les conditions peuvent permettre à la formation des structure multicouches pour former des cellules bactériennes ou elles peuvent être emprisonnées dans les encrassements du lait.

La formation de biofilm des bacilles thermophiles se produit dans les sections des usines de fabrication de produits laitiers où les températures élevées atteignent 40-65°C. De nombreuses stratégies ont été testées pour éliminer, prévenir et ou retarder la formation de biofilms des bacilles thermophiles dans la fabrication de produits laitiers, mais avec succès limités. Cela est dû à la structure et la composition des biofilms de bacilles thermophiles qui ne sont pas bien connues dans les environnements en général et plus spécifiquement dans la transformation du lait.(Rayane, s.d.)

I.2.2.5 L'intérêt de formation de biofilm

Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. La présence de biofilms lors d'infections demande donc de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement. De même, la présence de biofilms sur des surfaces retrouvées à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation affectera l'efficacité du protocole de désinfection.(Tremblay et *al.*, 2014)

PARTIE 03

LES BIOSURFACTANTS

I.3.1. Définition

Les biosurfactants, également connus sous le nom de surfactants biologiques, sont synthétisés par une grande variété de microorganismes, y compris les champignons, les levures et surtout les bactéries. Leur composition est influencée par le type de microorganisme, le substrat utilisé et les conditions de production. En général, leur partie hydrophile (qui se mélange à l'eau) est constituée de divers groupes fonctionnels tels que des acides aminés, des protéines, des peptides cycliques, des acides carboxyliques, des polysaccharides, des alcools gras (mono ou di), tandis que leur partie hydrophobe non polaire (qui se mélange à l'huile) est composée d'une chaîne hydrocarbonée aliphatique saturée ou insaturée (allant de C8 à C22, linéaire ou ramifiée), d'acides gras à longue chaîne, d'hydroxy-acides gras ou d'α-alkyl-β-hydroxy-acides gras(Pacwa-Płociniczak et *al.*, 2011)

I.3.2 .Composition et structure chimique

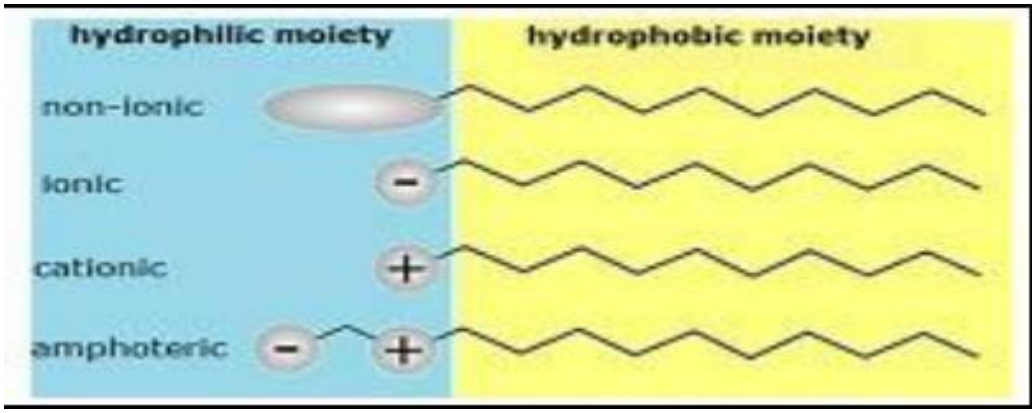


Figure I.3.1 : Structures tensioactives générales(Campos et *al.*, 2013)

I.3.3. Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et l'origine microbienne.

a. Selon le poids moléculaire (Rosenberg et Ron, 1999)

-Les biosurfactants à faible poids moléculaire, tels que les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides, sont efficaces pour réduire la tension interfaciale et la surface

-Les biosurfactants à poids moléculaire élevé ou les polymères, connus sous le nom de bioémulsifiants, sont plus efficaces pour stabiliser les émulsions huile-eau sans réduire considérablement la tension de surface. Parmi eux, on trouve les polysaccharides, les lipopolysaccharides et les lipoprotéines.

b. Selon la nature biochimique

Il existe cinq principales catégories de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres(Healy et al., 1996)

- **Les glycolipides :** sont constitués de sucres liés à une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Parmi les glycolipides les plus étudiés, on trouve les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.
- **Les lipopeptides :** sont des composés où un lipide est attaché à une chaîne polypeptidique.
- **Les phospholipides :**se composent de groupes alcool, phosphate et d'une chaîne lipidique
- **Les lipopolysaccharides :** ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ce sont les biosurfactants possédant la masse molaire la plus élevée.
- **Lipides neutres :** sont d'origine végétale, animale ou microbienne.

En raison de leur abondante production et de leurs remarquables propriétés tensioactives, les biotensioactifs les plus répandus et les mieux étudiés sont les glycolipides et les phospholipide des(Desai et Banat, 1997).

I.3.4. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement synthétisés par des microorganismes qui se développent dans des conditions aérobies. Ces microorganismes incluent généralement des levures, des champignons ou des bactéries. Par ailleurs, les plantes, les animaux et même les êtres humains peuvent également produire des biosurfactants(Mulligan et *al*., 2001).

Les bactéries utilisées dans la production de biosurfactants sont généralement prélevées dans des sols contaminés par des molécules hydrophobes telles que les hydrocarbures. Elles sont ensuite isolées de leur environnement naturel afin d'être cultivées en laboratoire. Cette approche permet de mener des tests pour déterminer la source de carbone optimale et d'ajuster les milieux de culture afin d'atteindre un rendement de production maximal. Dans tous les cas, le biosurfactant produit est un mélange complexe de différentes molécules. Par exemple, lorsqu'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2 est utilisée, le biosurfactant obtenu est un mélange de quatre rhamnolipides (Van Dyke et *al*., 1991). (Abalos et *al*., 2001) indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

I.3.5. Applications de biosurfactants

Les biosurfactants sont réputés pour leur non-toxicité, leur biodégradabilité et leur capacité à être utilisés dans des environnements extrêmes(Banat et *al*., 2000). C'est pourquoi ils sont utilisés dans de nombreux domaines.

Tableau I.3.1 : Différents domaines d'applications de biosurfactants(Banat et *al*., 2000)

Fonction	**Champ d'application**
Emulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peintures, produit alimentaire.
Solubilisant et micro-émulsions	Pharmaceutique, articles de toilette.
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textile, peinture.
Détergent	Nettoyants ménagers, produits de l' agriculture.
Agent moussant.	Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais
Agent épaississant	Peintures.
Agent séquestrant des métaux aide à la croissance bactérienne	Minerais, traitement d'huiles usagées pour boues de métaux aide
Dé-émulsifiant	Traitement de déchets.
Agent réducteur de viscosité	Transport par pipeline
Dispersant	Séparation des mélanges goudron /pétrole ou goudron/eau.
Récupération de ressources	Récupération assistée de pétrole.

Pourtant, bien que les coûts de production restent élevés, ce qui limite leur utilisation, les substrats utilisés pour la croissance des microorganismes producteurs de biosurfactants sont

peu coûteux. Cependant, en raison des faibles rendements de production et des processus de purification, il arrive parfois que leurs coûts dépassent ceux des tensioactifs chimiques

I.3.6 Propriétés physicochimique des biosurfactants

Les propriétés distinctives des biosurfactants sont directement liées à leur composition chimique.

I.3.6.1. Abaissement de la tension superficielle

La tension superficielle représente la force résultant de l'attraction entre les molécules à la surface d'un liquide, s'opposant ainsi à la rupture de cette surface(Saxena et Mandal, 2022)

I.3.6.2. Abaissement de la tension interfaciale

La tension interfaciale correspond à la force requise pour briser la surface entre deux liquides non miscibles(Saxena et Mandal, 2022)

I.3.6.3. Concentration Micellaire Critique (CMC)

Les molécules de biosurfactant s'alignent verticalement à l'interface air/eau dans un milieu aqueux, avec leur partie hydrophile orientée vers l'eau. Cela a pour effet de diminuer la tension superficielle et de former une émulsion. La concentration au-dessus de laquelle les surfactants commencent à former des micelles dans un milieu aqueux est connue sous le nom de concentration micellaire critique (CMC). Les micelles des molécules de biosurfactant contiennent un centre lipophile, c'est pourquoi les biosurfactants peuvent facilement dissoudre les huiles. Le point correspondant à la CMC est indiqué par la valeur la plus basse de la tension superficielle d'un réactif tensioactif.(Samanta, 2021)

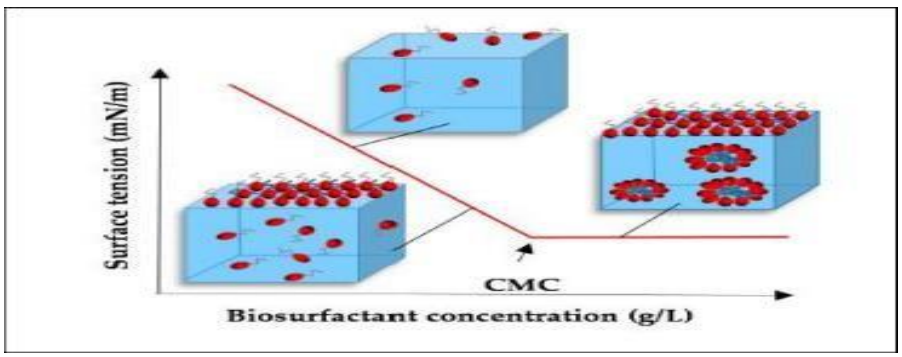


Figure I.3.2 : Illustration des domaines dans lesquels il y a formation de micelles (concentration micellaire critique CMC)(Samanta, 2021 b)

micelles (concentration micellaire critique CMC)a tension superficielle représente la force résultant de l'attraction entre les molécules à la surface d'un liquide, s'opposant ainsi à la rupture de cette surface.a tension superficielle représente la force résultant de l'attraction entre les molécules à la surface d'un liquide, s'opposant ainsi à la rupture de cette surface.a tension superficielle représente la force résultant de l'attraction entre les molécules à la surface d'un liquide, s'opposant ainsi à la rupture de cette surface.a tension superficielle représente la force résultant de l'attraction entre les molécules à la surface d'un liquide, s'opposant ainsi à la rupture de cette surface.a tension superficielle représente la force résultant de l'attraction entre les molécules à la surface d'un liquide, s'opposant ainsi à la rupture de cette surface.a tension superficielle représente la force résultant de l'attraction entre les molécules à la surface d'un liquide, s'opposant ainsi à la rupture de cette surface.Haut du formulaire

I.3.6.4. Solubilisation

Selon (Margaritis et *al*., 1979) la solubilité d'un agent tensioactif dans l'eau varie en fonction du nombre de liaisons C-C présentes dans la partie hydrophobe de la molécule de tensioactif

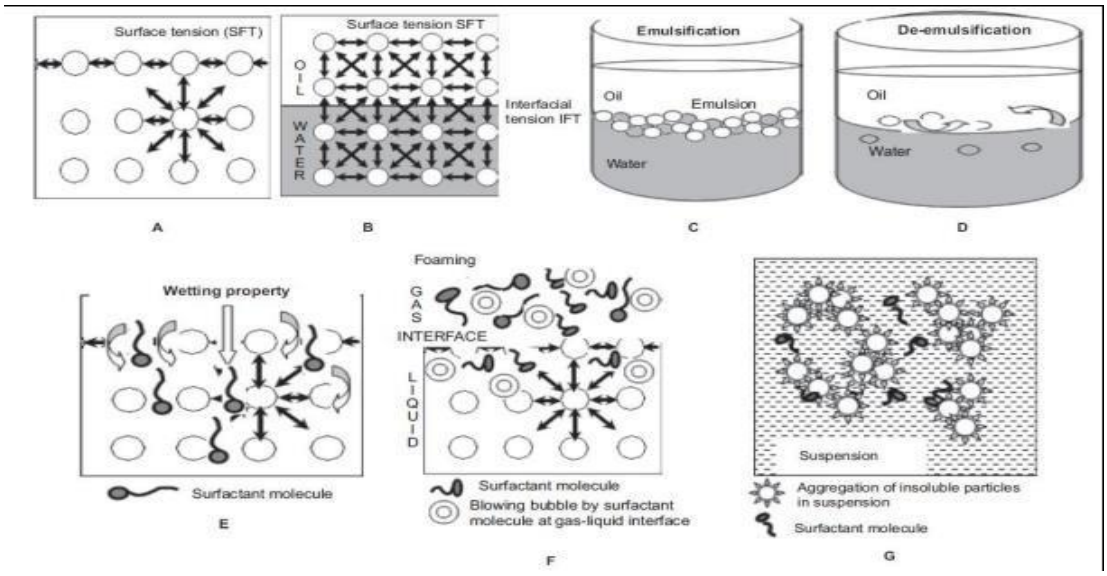


Figure I.3.3 : Représentation graphique des différentes propriétés fonctionnelles des biosurfactants / bioémulsifiants : (A) Tension superficielle ; (B) tension superficielle et interfaciale ; (C) émulsification ; (D) désémulsification ; (E) mouillage ; (F) moussant ; et (G)l'adsorption.(Satpute et *al*., 2010)

I.3.7 Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants présentent des propriétés tensioactives similaires à celles de leurs équivalents chimiques, mais ils offrent plusieurs avantages :

- Stabilité thermique et chimique élevée : ils restent stables dans une gamme étendue de conditions, notamment pH (de 2 à 10), salinité (jusqu'à 20 %) et température (allant jusqu'à 100 °C).
- Biocompatibilité et biodégradabilité : ils peuvent être utilisés en toute sécurité dans des applications telles que les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels.
- Caractère écologique : ils se dégradent facilement dans l'environnement et ne présentent pas de toxicité.
- Longue durée de stockage.
- Production à partir de déchets industriels : ils peuvent être produits à partir de divers sous-produits industriels tels que les effluents d'huileries, les graisses animales, le lactosérum et les déchets riches en amidon, ce qui permet de réduire leur impact environnemental et de diminuer les coûts de production.

I.3.8. Inconvénients des biosurfactants

Le principal facteur limitant l'usage des biosurfactants demeure l'aspect économique d'une production à grande échelle, dont les principaux obstacles sont :

- Faibles rendements de production par rapport au substrat(s)
- Importants investissements de capitaux
- Faibles rendements volumiques
- Problèmes de contrôle de procédé comme la formation de mousse
- Problèmes de récupération et de purification de produit
- Problèmes de caractérisation des produits finis en raison de leur complexité chimique.(Healy et *al.*, 1996)

I.3.9. Les biosurfactants des bactéries thermophiles

Les bactéries thermophiles ont été les plus largement distribuées dans les réservoirs pétroliers et aussi les plus étudiées par rapport aux microorganismes mésophiles, ceci est respectivement, le reflet de la température élevée qui caractérise la plupart des écosystèmes pétroliers, et grâce à leurs intérêts industriels accrus en raison de leurs enzymes thermostables. Par conséquent, plusieurs bactéries thermophiles ont été fréquemment isolées des champs pétroliers(Magot et *al*.2000) et parmi les produits qui sont avérés potentiellement utiles pour une meilleure récupération de pétrole les biosurfactants qui sont des agents tensioactifs produits par plusieurs microorganismes, majoritairement des aérobies mais quelques cas de production dans des conditions anaérobies ont été rapportés (Brown et *al*., 1986).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et Méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Verreries

Erlenmeyer, Bécher, Flacons en verre, Tubes à essai, Pipette pasteur, pipette graduer, Lame/ Lamelle.

II.1.2 Appareillage

Agitateur, Vortex, Balance, Densitomètre, PH-mètre, Bec bunsen, Autoclaves, Etuve, Distillateur, Bain marie, Incubateur, L'hôte microbiologique, Réfrigérateur, Microscope optique, Agitateur-incubateur .

II.1.3 Milieux de culture

TTM, bouillon nutritif, Mueller Hinton, gélose a la base de rouge Congo, Agno3.

II.1.4 Autres produits consommables

Lugol, Fushine, Violet de gentiane, Alcool, rouge Congo, L'huile de paraffine, L'eau distillé, PBS, Ethanol.

II.1.5 Autres matériel

Entonnoir, Eprouvette graduée, pro-pipette, Spatule, Barreau et tige magnétique, Pince, anse à platine, Eppendorf, embout, Pissette, Micropipette, Boites de pétri, papier filtre, les écouvillons.

II.2 Méthode

II.2.1 Période et lieu d'étude

Toute la partie expérimentale réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de la Faculté des sciences à l'université de Dr Yahia Fares Médéa pendant la période allant de Mars à mai 2024.

II.2.2 Objectifs d'étude

- Enrichir et identifier phénotypiquement les souches thermophiles.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne des souches thermophiles vis-à-vis cinq souches bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Bacillus sibtilus* et *Pseudomonas aeruginos*), et deux champignons (*Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans)* selon la technique des cylindres d'agar.

- Evaluation l'aptitude de formation de biofilm.
- Étudier la production et la caractérisation d'un biosurfactant issu d'une souche thermophile.

II.2.3 revivification et identification des souches

Les souches ont été extraites en 2021 de trois sources hydrothermales situées en Algérie : Hammam Salhine à Médéa, Hammam K'sana à Bouira et Hammam Righa à Ain Defla.

II.2.3.1 Enrichissement et ensemencement

À partir des souches bactériennes conservées depuis l'année (2021), une quantité a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et placée dans des tubes Eppendorf contenant 500 µL de BN **(annex 1)**, puis incubée dans une étuve à 60°C pendant 24h.Après 24h, 100 µL des suspensions ont été ensemencées dans des boîtes de pétrie contenant le milieu TTM (**annex 1),** puis incubées dans une étuve à 60°C pendant 24h.

II.2.4 Identification phénotypique des souches

Une série d'études macroscopique, microscopique et biochimique a été réalisée pour l'ensemble des souches enrichies en aérobiose.

A. Examen macroscopique

Afin d'identifier une souche microbienne, la première étape du diagnostic microbien et du biotypage d'une souche est la description macroscopique des colonies bien isolées ; parfois cette seule étude permet de connaître le germe qu'on a en présence car les colonies sont typiques. Les principaux caractères à étudier sont : La forme des colonies (rondes, irrégulières, etc.), La taille des colonies par la mesure du diamètre, la couleur de la colonie,

L'élévation (convexe, concave, plate), L'opacité (opaque, translucide ou transparente), La surface (lisse, rugueuse, sèche, dentelée, etc.)

B. Examen microscopique après coloration de Gram : (annex 2)

Toutes les bactéries possèdent une paroi composée de muréine, un peptidoglycane. Chez les bactéries Gram-, cette paroi est enveloppée par une membrane externe, tandis que les bactéries Gram+ en sont dépourvues. Cette différence dans leur structure permet de les classifier en tant que Gram+ ou Gram-.

II.2.5 Recherche des activités antimicrobiennes sur milieu solide (technique des cylindres d'agar)

Les propriétés antimicrobiennes des souches ont été évaluées à l'aide de la méthode des disques d'agar(Radhika et *al*., 2011). Cette méthode implique l'ensemencement des souches sur de la gélose TTM en stries serrées afin de former un tapis bactérien. Après une incubation de 24 heures à 60°C, des cylindres d'agar d'environ 6 mm de diamètre sont prélevés et placés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de Muller-Hinton **(annex3)** préalablement inoculé avec des souches témoins (100 ml de Muller-Hinton mélangé avec 20 ml de suspension). Cette procédure suit les recommandations du CLSI (2010) avec des modifications, et les boîtes sont incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les champignons (ces conditions d'incubation sont maintenues tout au long de l'étude). Les zones d'inhibition sont ensuite observées après 24 à 48 heures d'incubation. Toute zone d'arrêt de croissance autour des disques, même de petite taille, est considérée comme un résultat positif.(Kitouni, 2007)

II.2.6 La recherche de la capacité de formation de Biofilm

On a employé deux approches pour évaluer la capacité des souches à produire du biofilm.

II.2.6.1 La méthode du Rouge Congo

D'après(Freeman et *al*., 1989), la gélose Rouge Congo est particulièrement adaptée pour repérer les souches qui produisent du slime.

Sur ce substrat, les souches qui expriment le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) forment des colonies noires, tandis que les souches qui ne le produisent pas ont des colonies rouges. Les souches à phénotype variable se traduisent par des colonies avec un centre noir et une bordure rouge, ou un centre rouge et une bordure noire.(Mathur et *al*., 2006)

A. Technique

- Préparer la gélose Rouge Congo **(annex 4)** et inoculez une colonie en réalisant des stries à la surface d'une boîte de gélose Rouge Congo (RCA).
- Incuber les boites en 60°C pendant 48 heures

B. Lecture

Les souches qui produisent du biofilm se caractérisent par des colonies noires avec une surface rugueuse, tandis que les souches qui n'en produisent pas ont des colonies rouges avec une surface lisse.

II.2.6.2 Méthode de microplaques de titration à 96 puits

En réponse aux nombreuses recherches rapportant l'impact de la composition du milieu de culture sur la production de biofilm, nous avons jugé opportun d'étudier la formation de biofilm en utilisant la technique de microplaques de titration décrite précédemment, mais en utilisant le milieu Thermus thermophilus sans agar. Le cristal violet a été employé pour colorer le biofilm, et après séchage, le colorant a été solubilisé avec de l'alcool, conduisant ainsi à une turbidité homogène du colorant.(Stepanovic et *al*., 2000).

A. Technique

- A partir des colonies isolées, effectuer des cultures d'une nuit dans **B.N**(Thermus thermophilus sans agar) et incubées dans l'étuve à 60°C.
- Après 24 heures, ajuster le DO des suspensions bactériennes à 0.5 McFarlane (l'équivalent de 108 UFC/ml) à la longueur d'onde 600 nm.
- Inoculer chaque puits de la microplaque de titration (96 puits) avec 200µl de la suspension ajustée.
- Incuber les microplaques en aérobiose à 60°C pendant 24 heures.
- Laver les microplaques 3 fois par la solution PBS (phosphate-buffered saline pH=7) **(annex 4)** pour -éliminer les cellules bactériennes non adhérentes.
- Sécher les plaques à 60°C pendant 10 mn
- Remplir les puits par le Crystal violet à 0.1% pendant 10 mn (Al-Ahmad, 2012)
- Laver les microplaques 3 fois par l'eau distillée.
- Laisser les microplaques sécher à 60°C pendant 10min.
- Introduire dans chaque puit 200µl de l'éthanol et la laisser 15 mn.

B. Lecture

La lecture de densité optique se fait à l'aide d'un lecteur de microplaques (Safas monaco MP96) à 600 nm **(**Lecteur ELISA**)**

II.2.7 La production des biosurfactants

II.2.7.1 Sélection des souches productrices de biosurfactant

Dix souches bactériennes thermophiles (A, A5, W15, G, W9, W10, k, j, H et H2) ont été sélectionnées pour leur performance à produire de biosurfactants. Des repiquages successifs sur milieu solide ont effectués pour la purification des souches sou forme de colonies bien isolées.

II.2.7.2 Préparation de préculture

Une seule colonie a été mise dans un milieu liquide LB **(annex 5)**. Afin de préparer les précultures de24h à 55 °C afin de préparer les précultures de 24h à 45 °C qui seront employées pour inoculer les milieux à tester pour la production de biosurfactants.

II.2.7.3 Préparation de culture

Les expériences ont été réalisées dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu minimum (MM) **(annex 5)**, additionnée a 0.5 % de l'huile d'olive comme source unique de carbone ; ce milieu liquide est inoculé avec 5% de la préculture. L'incubation a été assurée pendant 48h, la température est fixée à 55 °C sous une agitation de 150 tr/min.

La production du biosurfactant a été suivie par la mesure de deux grandeurs :

❖ Indice d'émulsification (E24)

L'émulsification est évaluée principalement à l'aide de l'indice d'émulsification E24. Pour ce faire, on mélange des volumes égaux de surnageant (4 ml) et de solution hydrophobe (huile d'olive) dans un tube à essai. Ce mélange est vigoureusement agité au vortex pendant 2 minutes jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène, puis on le laisse reposer pendant 24 heures avant de procéder à la mesure.(Abouseoud et *al*., 2008)

L'indice d'émulsification est défini comme étant le rapport de la hauteur de la couche émulsionnée (He) sur la hauteur totale (Ht) et en multipliant par 100(Francy et *al*., 1991), selon la formule suivante :

E24 =(He/Ht) *100

Avec He : La longueur de la couche émulsionnée

H_T : La longueur totale du mélange

❖ Test de déplacement d'huile

Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression de surface du biosurfactant est capable de déplacer l'huile. La méthode décrite ci-dessous est basée sur celle déjà décrite par(Morikawa et *al*., 1993), avec quelques modifications. Un (01) ml d'huile brut est étalé sur toute la surface d'eau distillée (25 ml) remplissant une boîte de Pétri (90 mm de diamètre). Une fine couche d'huile se forme immédiatement. Par la suite, 200 µL de la solution de l'échantillon sont déposés doucement au centre de la couche d'huile, entraînant la formation d'un halo clair. Le diamètre du cercle ainsi formé est mesuré après 30s et 24h. Les étapes de réalisation de ces tests ont présenté dans la figure II.10.

II.2.7.4 Extraction de biosurfactant

La procédure de récupération se déroule de la manière suivante : le bouillon de culture est centrifugé à 7000 tr/min pendant 20min pour éliminer la biomasse. Le liquide en surface, qui correspond au biosurfactant brut, est récupéré. En réalité, la récupération du biosurfactant passe par plusieurs étapes :

- Le surnageant est acidifié par HCl (2N) à pH = 2 .
- Le liquide acidifié est conservé à 4°C pendant une nuit .
- le précipité est récupéré par centrifugation à 7000 g pendant 20 min à 4 °C .
- L'extraction a été effectuée deux fois (v : v) à l'aide d'acétate d'éthyle.
- Le solvant a été ensuite enlevé à l'aide d'un rotavapeur.

Chapitre III

RESULTATS

ET

DISCUSSION

III.1 Caractérisation phénotypique des souches isolées des trois sites

Trent souches d'aspects différents ont été isolées en (2021), à partir des trois sites hydrothermaux, ces souches ont subi une série de test macroscopique, microscopique. Les résultats de cette caractérisation sont présentés dans le tableau III .1.

III.1.1 Observation macroscopique

L'observation des caractères culturaux des colonies est le premier examen qui a été effectué après l'incubation des souches à 60°C sur gélose TTM.

La FigureIII.1 illustre l'aspect macroscopique de quelques souches bactériennes isolées de l'eau thermale. L'aspect des colonies bactériennes a été déterminé selon les critères de base décrits par(Prescott et *al*., 2003)

Habituellement, lorsqu'on examine des colonies bactériennes sur une gélose, on observe des aspects tels que la forme, la couleur, la taille, la texture, la brillance et les bords des colonies.

Les colonies acquises sont généralement rondes ou ovale, grande ou petite, lisses, bombé, jaune ou blanche. Cependant, il y avait peu de diversité dans leur aspect macroscopique. Les résultats obtenus sont illustrés dans le (Figure III.1 et Tableau III.1)

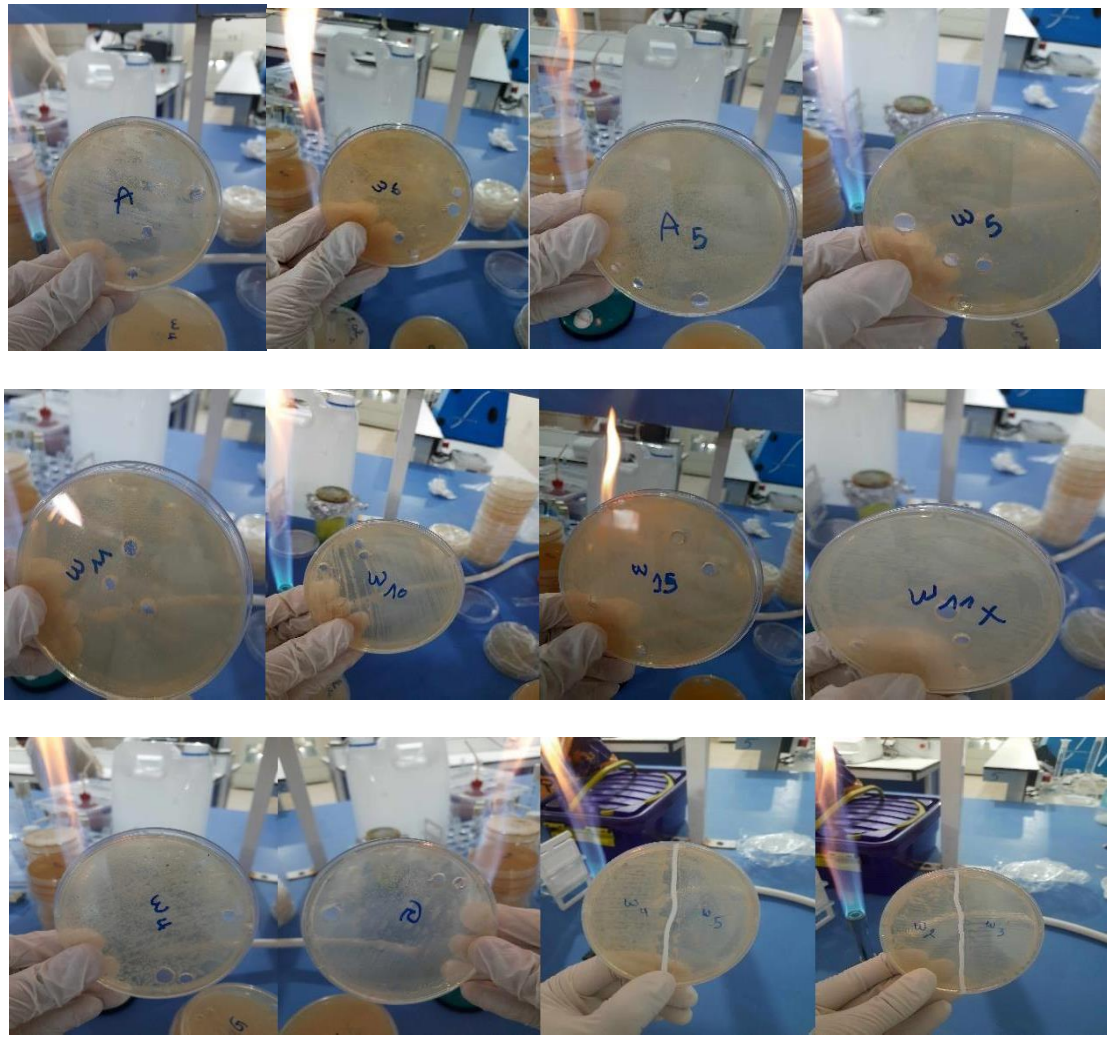


Figure III.1 : L'aspect macroscopique des souches

Tableau III .1 : Caractères culturaux des souches cultivées.

Souches	Forme	Taille	Couleur	Aspect
W2	Irrégulier	Grande	Jaune	Lisse
W3	Irrégulier	Grande	Jaune claire	Lisse
W4	Ronde régulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
W5	Ronde irrégulier	Moyenne	Blanchâtre flou centre	Rugueuse
W6	Ronde régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W7	Ronde	Moyenne	Jaune	Lisse
W9	Ronde bombée	Petite	Jaune	Lisse
W10	Irrégulier	Petite	Jaune claire	Rugueuse
W11	Irrégulier	Grande	Blanchâtre	Lisse plate
W11x	Irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse plate
W15	Ronde bordure régulier	Moyenne	Jaune Crémé	Rugueuse
G	Ronde bordure irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
A	Irrégulier	Grande	Jaune claire	Rugueuse
A5	Ronde régulier	Petite	Jaune Crémé	Rugueuse
H8	Ronde	Moyenne	Jaune	Lisse
H2	Ronde Régulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
I17	Ronde Régulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
B	Irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Rugueuse
C	Régulier	Petite	Transparente	Rugueuse

III.1.2 Observation microscopique

L'observation microscopique des souches isolées des sources hydrothermales a permis de déterminer quelques caractères morphologiques des cellules bactériennes après colorations différentielles de Gram

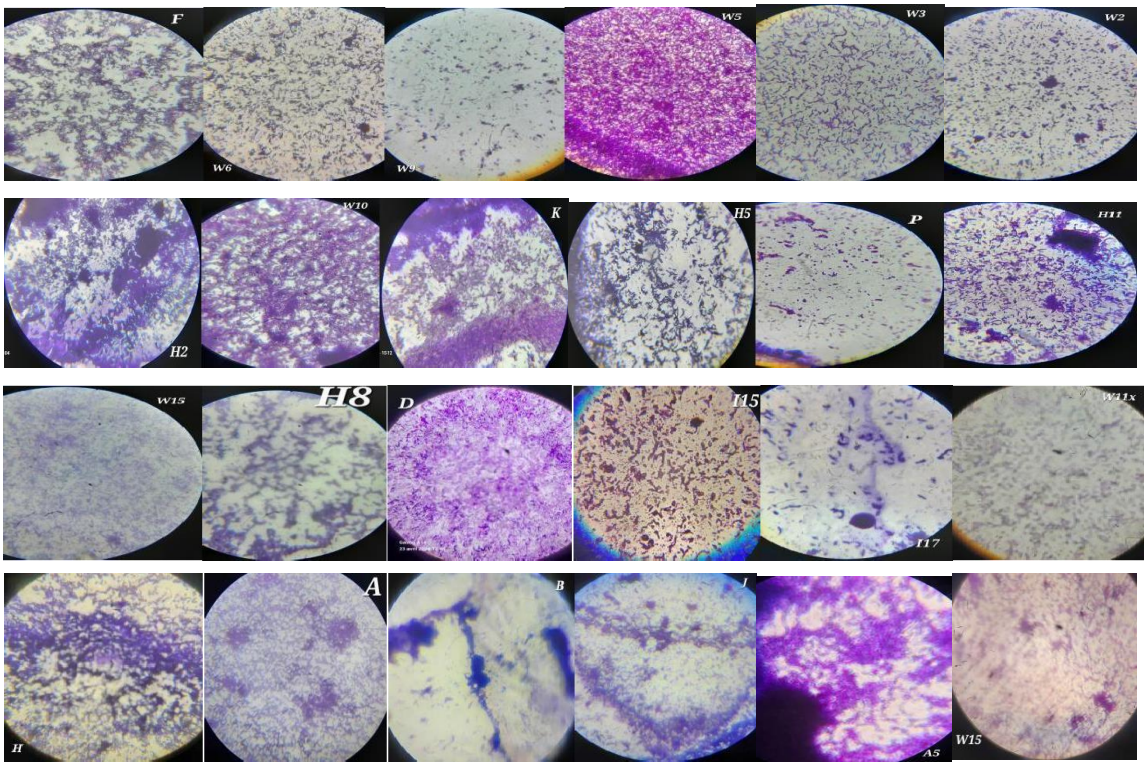


Figure III.2 : Coloration de gram des souches thermophiles sous microscope optique au grossissement X100, X40.

Tableau III.2 : Résultats de coloration de gram.

Souche	Gram
F	Positif+
W6 (*Paenibacillus panacisoli)*	Positif +
W9 (*Bacillus licheniformis)*	Positif +
W5 (*Bacillus circulans)*	Négatif -
W3 Bacille	Positif +
W2	Positif +
H2 Bacille	Positif +
W10	Positif +
H5 Bacille	Positif +
H11 Bacille	Positif +
H8 Bacille	Positif +
H Bacille	Positif +
P Bacille	Positif +
A Bacille	Positif +
W15 Bacille	Positif +
D	Positif +
G	Négatif -
E	Positif +
J	Positif +
C	Négatif -
I10	Positif +
W11x	Positif +
A5(*Paenibacillus residui)*	Positif +
W7 (*Bacillus niacini)*	Négatif -
I15 Bacille	Positif +
B Bacille	Positif +
W11 Bacille	Positif +
I17 Bacille	Positif +
K Bacille	Positif +

L'examen microscopique a révélé les résultats représentés dans le tableau (III.2). Parmi les 30 souches, 26 sont des bactéries à Gram positif et 4 à Gram négatif.

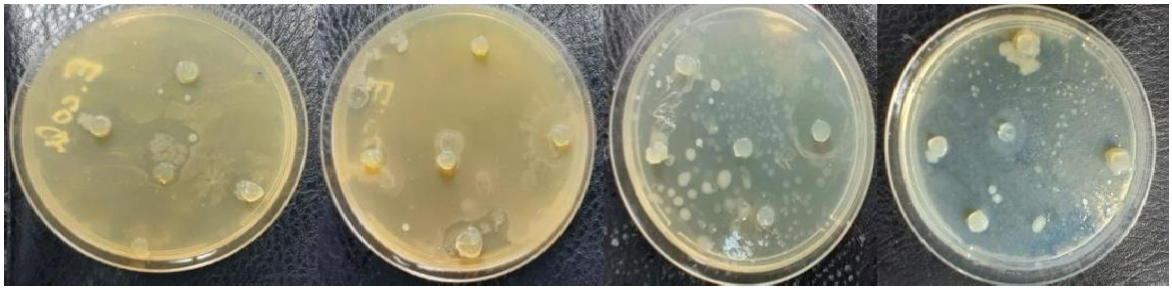
La plupart des bactéries isolées des sources thermales en Algérie surtout, étaient des bacilles Gram positif. Une étude similaire de 85 souches thermophile montre que 76 souches sont à Gram positif et les restes sont à Gram négatif. (Djebbar.2019)

Une autre étude a été réalisée par (Larbi Daouadji, 2015)qui a isolé 59 souches bactériennes de différentes sources thermales (Hammam Debagh à Galma, Hammam bouhnifia à Mascar, Hammam Bouhjar à Temouchent, Hammam Rabi à Saida), dont 44 isolats étaient des bacilles Gram positif.

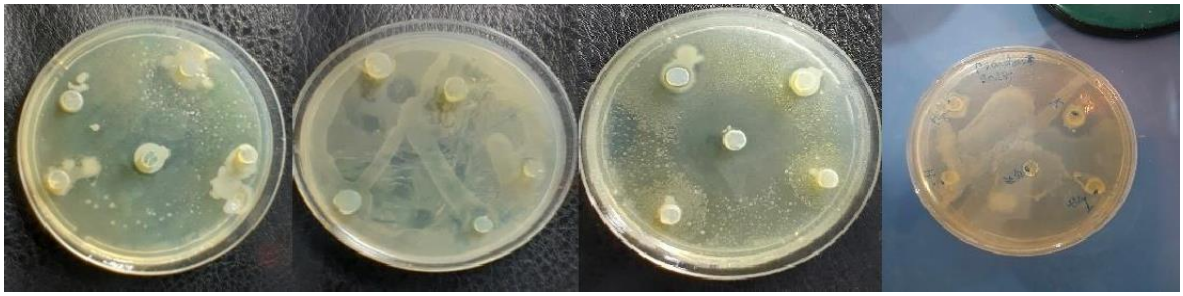
Nos résultats concordent aussi avec ceux trouvés par (Aissat et Mekki ,2019), qui ont pu isoler 10 souches bactériennes de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie) dont 9 isolats étaient de Gram positif, et un isolat de Gram négatif.

III.2 L'activité antimicrobienne

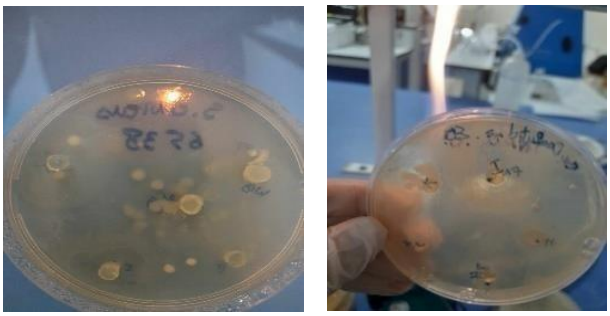
Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches étudiées contre des souches test standardisés : les bactéries : « *Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis, pseudomonas aeruginosa et staphylococcus epidermidis* », Les champignons :« *Candida albicans, Aspergillus brasiliensis* ».



E. coli *E. coli* *S. aureus* *S. typhimurium*



S. typhimurium *A. brasiliensis* *P. aeruginosa* *P. aeruginosa*



S. aureus *B. subtilis*

Figure III.3 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon)

Tableau III.3 : l'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon).

les souches tests	*S. aureus*	*S. typhimurium*	*E. coli*	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*	*A. brasiliensis*
A	-	-	+	-	-	-	-
A5	-	-	+	-	+	-	-
G	-	-	-	-	+	-	-
H	-	-	-	-	+	-	+
H2	-	+	+	-	+	-	-
H8	-	-	+	-	-	-	-
I10	-	-	+	-	-	-	-
I15	-	-	+	-	+	-	-
I17	-	-	-	+	-	-	-
W2	-	-	-	-	-	-	-
W3	-	+	-	-	-	-	-
W4	-	-	-	-	+	-	-
W5	-	-	-	-	-	-	-
W6	-	-	-	-	-	-	-
W7	-	-	-	-	+	-	-
W9	-	-	-	-	-	-	-
W10	+	-	+	-	-	-	-
W11	-	-	-	-	-	-	-
W15	+	-	+	-	-	-	-
K	-	-	-	-	+	-	-

Ce tableau met en évidence l'importance de tester plusieurs souches pour identifier celles qui ont une activité antibactérienne et antifongique efficace contre des micro-organismes spécifiques.

D'après nos résultats, la capacité à présenter une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* a été détectée chez les souches (A, A5, H2, H8, I10, I15, W10 et W15), et contre

Pseudomonas aeruginosa chez les souches (A5, G, H, H2, I15, W4, W6 et K,), ce qui suggère une meilleure efficacité globale contre ce micro-organisme.

La plupart des souches testées n'ont pas montré d'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* sauf les souches (W15 et W10) et aucun effet contre *Salmonella typhimurium* à l'exception des souches (H2 et W3), seules la souche (I17) montre une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*

Pour l'activité antifongique aucune souche à développer une activité contre *Candida albicans,* a l'exception de la souche (H) qui à présenter une activité contre *Aspergillus brasiliensis.*

Malgré des recherches approfondies sur les microorganismes vivant dans des environnements extrêmes, y compris les thermophiles, les informations disponibles sur leurs métabolites secondaires, en particulier concernant la production de protéines antimicrobiennes, sont très limitées.(Ojha et *al*., 2021)

Quatre souches bactériennes thermophiles présentant une activité antimicrobienne contre des agents pathogène testés ont été isolées de source chaude saoudienne. Le composé majeur, la tabtoxinine-bêta-lactame, est une toxine produite par certaines bactéries comme *Pseudomonas*. C'est un antibiotique bêta-lactame, qui représente une nouvelle stratégie thérapeutique antibiotique pour traiter les pathogènes gram-négatifs multi-résistants exprimant des niveaux élevés d'enzymes bêta-lactamase(Alrumman et *al*., 2019)

Une étude réalisée sur 30 isolats de Streptomyces, isolés et purifiés à partir des zones thermales du nord de la Jordanie, a révélé que 20% des isolats présentaient une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et 26% contre *Staphylococcus aureus*, tandis que 23% montraient une activité antifongique contre *Candida albicans*(Abouseoud et *al*., 2008)

III.3 L'aptitude de formation de Biofilm

Les souches isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former un Biofilm par deux techniques : méthode de Rouge Congo (RCA) et méthode des microplaques de titration.

III.3.1 Technique Rouge Congo

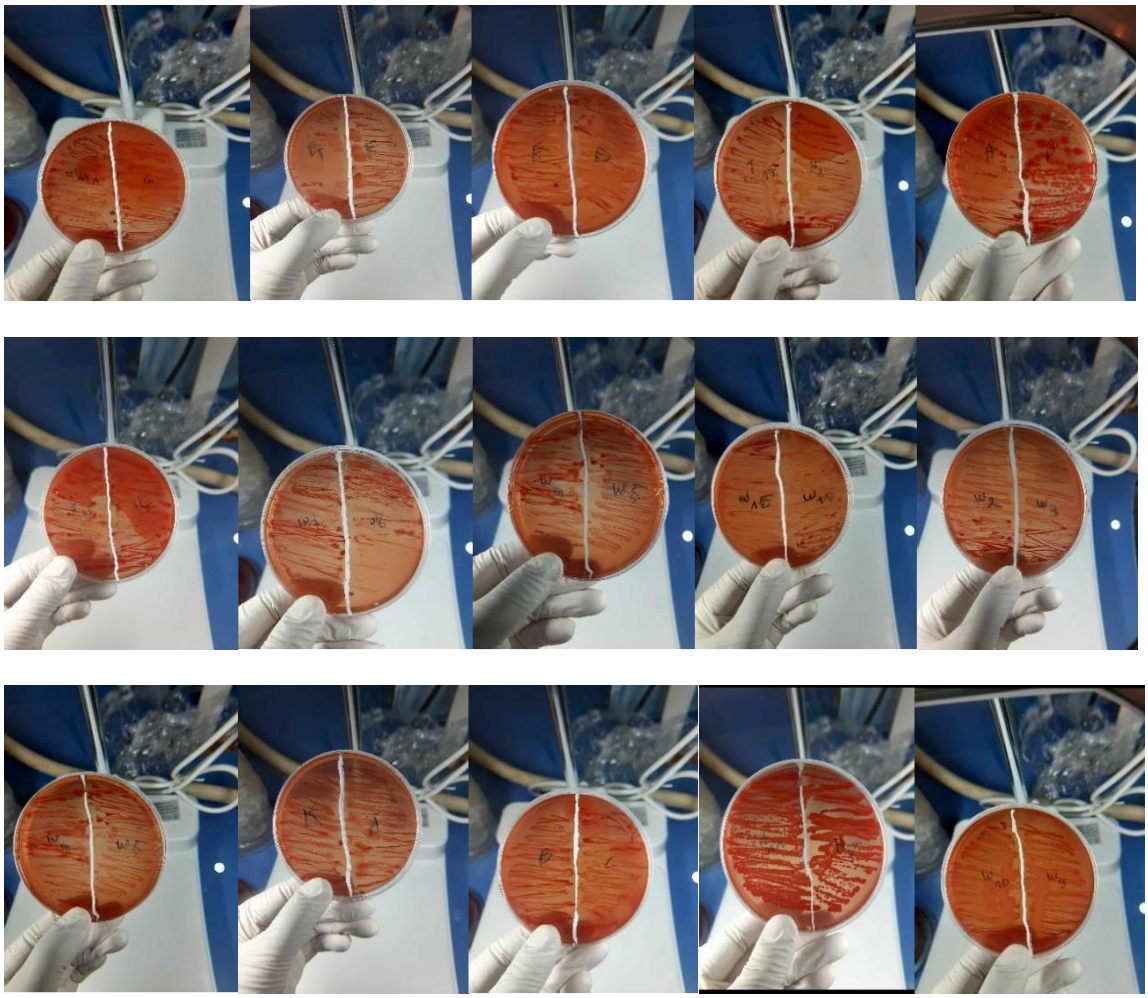


Figure III.4 La production de slime chez les souches (A, A5, P, H, H2, H5, H8, H11, W2, W3, W4, W5, W6, W7, W9, W10, W11, W15, I10, I15, I17F, B, C, E, D, K, J, G)

Tableau III.4 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souche	Phénotype (slime)
A	Formatrice
A5	Formatrice
P	Formatrice
H	Non formatrice
H2	Non formatrice
H5	Formatrice
H8	Non formatrice
H11	Formatrice
W2	Formatrice
W3	Formatrice
W4	Formatrice
W5	Formatrice
W6	Formatrice
W7	Formatrice
W9	Non formatrice
W10	Non formatrice
W11	Formatrice
W15	Formatrice
I10	Non formatrice
I15	Non formatrice
I17	Formatrice
F	Non formatrice
B	Formatrice
C	Formatrice
E	Formatrice
D	Non formatrice
K	Formatrice
G	Formatrice
J	Formatrice

La figure III.4 présente la répartition des résultats des aspects des colonies sur milieu Rouge Congo. Après 48 heures d'incubation, la production de slime est remarquée respectivement

chez les souches A5, M, C, I5, W5, W4, A7, B, W9, W7, W6, H13, H, W12, W15, H3 et H5 à l'opposé des autres souches exprimant un phénotype négatif.

Sur 30 souches thermophiles, le taux des souches formatrices de slime était de 66% soit un nombre de 19 souches ont données des colonies rouges avec contour noire.

Tandis que 11 souches non productrices des slime soit un taux de 34% ont données des colonies rouges avec un aspect lisse.

Selon (Chaieb et *al.*, 2005) le slime est définie comme la substance polymérique extracellulaire, également connu sous le nom d'exo-polysaccharides (EPS). Sur le milieu RCA, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif.

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires, contrairement aux colonies non productrices qui restent rouge (Kara Terki, 2014).

III.3.2 Technique de microplaque de titration

Les valeurs seuils pour l'essai de B.N(Bouillon nutritive)

D.O min=0.109

D.O max=0.327

D.O min= D.O témoin moyen + 3. Ecart type =0.78+(3*0.106)

D.O max= 3. D.O min=3*0.109

Tableau III.5 : Résultats de la technique de microplaque de titration

Souche	D.O moyenne	Formation de biofilm
W2	0.194	Moyennement
W4	0.186	Moyennement
W10	0.173	Moyennement
F	0.204	Moyennement
G	0.163	Moyennement
P	0.167	Moyennement
K	0.166	Moyennement
H	0.230	Moyennement
A	0.210	Moyennement
W15	0.200	Moyennement
D	0.242	Moyennement
W7	0.179	Moyennement
A5	0.238	Moyennement
W6	0.246	Moyennement
E	0.201	Moyennement
B	0.228	Moyennement
H5	0.197	Moyennement
H8	0.211	Moyennement
Ft	0.222	Moyennement
W5	0,0253	Faiblement
W3	0,2605	Moyennement
W9	0,226	Moyennement
W11	0,268	Moyennement
I17	0,216	Moyennement
I15	0,227	Moyennement
C	0,237	Moyennement
H11	0,272	Moyennement

Après une incubation de 24 heures à une température de 55 °C, la formation des biofilms a été évaluée en mesurant la densité optique (DO) à 600 nanomètres. Les résultats de l'analyse ont montré, en comparant les différentes valeurs de densité optique de chaque souche étudiée avec la densité optique du témoin négatif, que toutes les souches avaient une densité optique inférieure à celle du témoin. En comparant la densité optique obtenue avec les valeurs DOmin=0,109 et DOmax=0,327 pour chaque souche, il a été constaté que 29 souches avaient une densité optique comprise entre DOmin et DOmax et étaient considérées comme moyennement formatrices, tandis qu'une seule souche avait une densité optique inférieure à DOmin et était considérée comme faiblement formatrice.

Des études similaires sur les bacilles thermophiles :

Selon (Benyahia, 2015) à température 55 °C : 5 souches ont des DO inferieur 0,5 sont faiblement productrice de biofilm et 4 souches sont moyennement productrice de biofilm à cause de leurs DO qui est comprise entre 0,5 et 1,5.

Et d'après (Batahri, N. I. 2015) l'estimation quantitative du taux de formation des biofilms par les souches thermophiles à 4 températures (37°C ,47°C, 55°C, 65°C) sur le milieu BHIB est obtenue par la mesure de la DO à 630 nm au lecteur de microplaque, les souches qui ont été isolées à 55°C ou à 65°C sont faiblement productrices de biofilm à ces mêmes températures. Elles ont une DO inférieur à 0,5. Les résultats obtenus par (Burgess .2010) sont différents une formation importante de biofilm sont obtenus aux températures élevées. Cette différence peut être expliquée d'un part par la différence des souches, d'autre part la technique utilisée.

Cependant, d'autres auteurs suggèrent que cette méthode peut être moins précise pour déterminer la capacité des souches à sécréter le slime bactérien (de Castro Melo et *al*., 2013).Pour cette raison (Nasr *et al*., 2012) ont proposé la méthode de culture sur RCA comme une alternative à la méthode TCP pour le dépistage de la formation de biofilm par les Staphylocoques étant plutôt facile à réaliser, elle prend moins de temps et plus est sensible et spécifique.

Aussi plusieurs auteurs signalent que la méthode de rouge Congo agar semble être moins efficace pour détecter la formation de biofilm in vitro (Hassan et *al*., 2011) ; (Taj et *al*., 2012)

III.4 Production de biosurfactants par des souches bactériennes thermophiles

La production de biosurfactants par des microorganismes mésophiles a été largement étudies.

En revanche. Notre travail a été réalisés à des températures supérieures à 40°C. Ceci montre L'importance des souches thermophiles utilisées dans notre cas d'étude. Plusieurs études ont rapporté que les microorganismes utilisant les hydrocarbures sont capables de produire des biosurfactants. Donc la sécrétion du biosurfactant est un processus très important pour que les hydrocarbures soient assimilés par les bactéries.

La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance et de la source de carbone utilisée. Un substrat insoluble permet souvent d'obtenir un bon rendement.



Figure III.5 : Les cultures bactériennes avant at après l'agitation 48h

L'étude de la capacité productrice de biosurfactant par la souche bactérienne est basée sur :la mesure l'indice d émulsification et du diamètre de la surface halo claire (test de déplacement de l'huile de moteur).

L'huile d'olive (1%, v/v) a été utilisée comme substrat pour les souches (W10, W9, W15, A, A5, H, H2, G, J, P ; K).

III.4.1. L'effet de l'indice d'émulsification

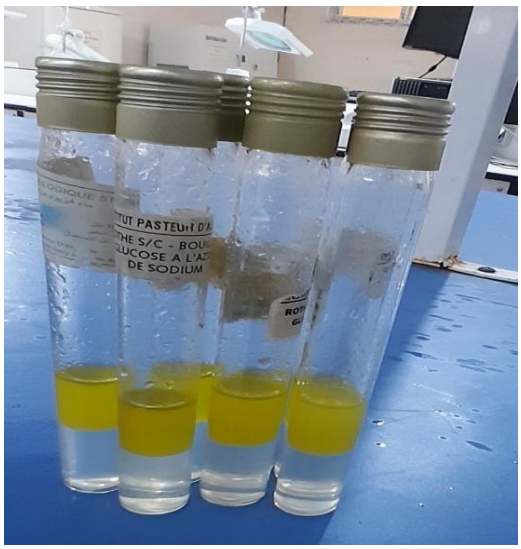


Figure III. 6 : Le résultats de test d'émulsification

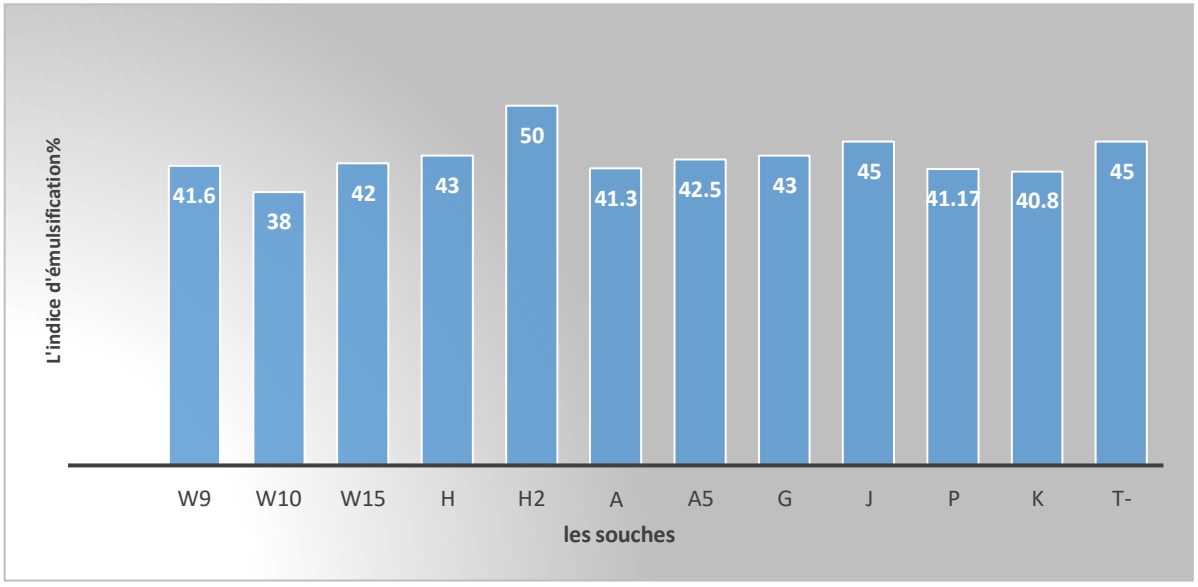


Figure III.7 : Présentation du pourcentage de l'indice d'émulsion chez les différentes souches sélectionnées productrices de biosurfactants

Ce graphique montre l'indice d'émulsification (en pourcentage) de différentes souches bactériennes.

La souche H2 montre le plus haut indice d'émulsification avec 50%, la souche W10 présente le plus bas indice d'émulsification avec 38% et les autres souches présentent des indices d'émulsification variant entre environ 40,8% et 45%.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par (Guergouri, 2017), qui montrent que le taux de biodégradation des hydrocarbures varie selon le groupe bactérien. Dans une autre étude réalisée par (Eddouaouda, 2012), la production de biosurfactants a été évaluée en se basant sur la capacité des souches à former une émulsion atteignant presque 50 %, et qui reste stable après 24h. En utilisant quatre substrats différents (pétrole, huile moteur, huile de friture et huile d'olive), il a été constaté que la production maximale était enregistrée en présence d'huile d'olive, se traduisant par une valeur minimale de la tension de surface (33 mN/m).

L'augmentation de l'index d'émulsion est proportionnelle à la concentration microbienne. Il atteint des valeurs de 52,68 % et 43,54 % pour deux souches .Des résultats similaires ont été trouvés chez *Pseudomonas aeruginosa* qui peut atteindre un index d'émulsion de 50%.(Benincasa et Accorsini, 2008)

III.4.2. L'effet de test de déplacement de l'huile de moteur

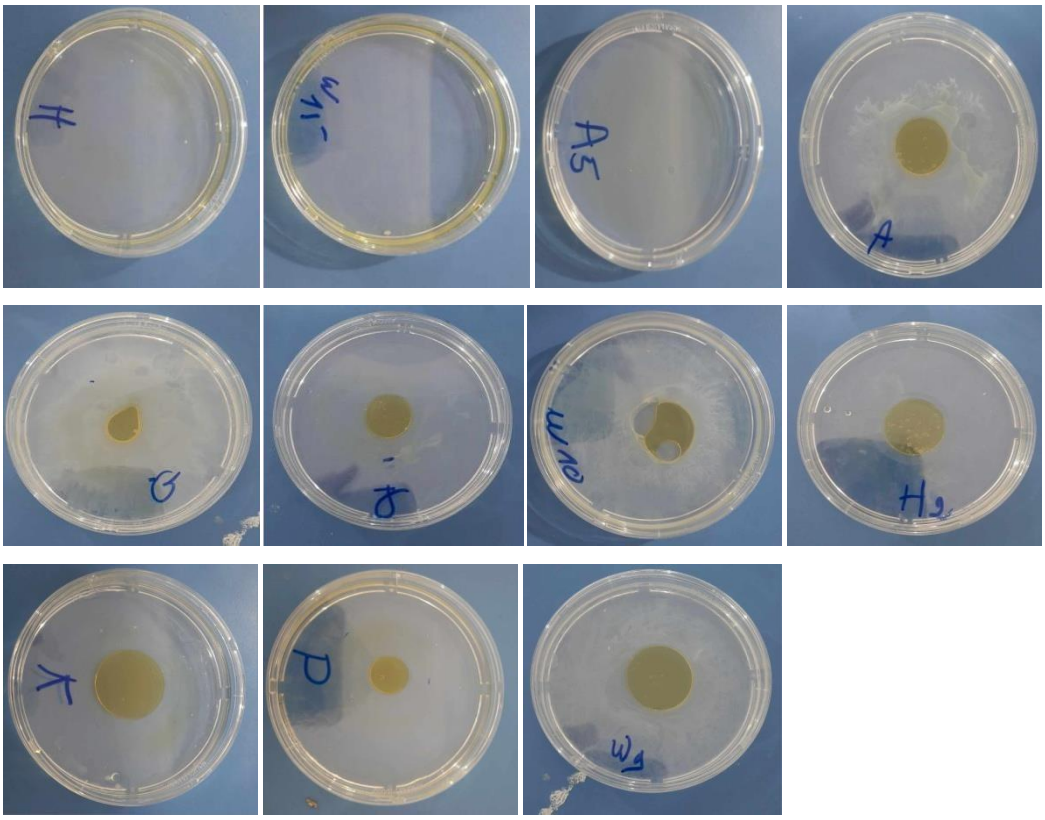


Figure III.8 : Le résultats de test de déplacement après 30s

Tableau III.6 : Les mesures de diamètre de la zone claire après 30s et 24h

Les souches	Diamètre de la zones claire (cm) après 30s	Diamètre de la zones claire (cm) après 24h
W9	3.5 cm	7.5 cm
W10	4.5 cm	7.5 cm
W15	7.5 cm	8 cm
A	2.7 cm	5.2 cm
A5	5 cm	8 cm
H	5 cm	8 cm
H2	4 cm	8 cm
G	3.5 cm	7.8 cm
J	4 cm	8 cm
P	3.5 cm	8 cm
K	4 cm	8 cm

D'après nos résultats, les diamètres de la zone claire après 30 secondes chez les souches (W10, A5, H, H2, J, K) montrent un déplacement initial plus grand par rapport aux souches (A, G, P, W9). La souche (W15) se distingue en révélant le déplacement le plus important avec 7,5 cm, ce qui suggère une activité de biosurfactant rapide et efficace.

Selon (Čipinytė et *al*., 2011) il a été observé que l'activité de déplacement de l'huile, mesurée par la surface de la zone claire sur la surface huile-eau, diminuait proportionnellement à la diminution de la concentration du biosurfactant. Ainsi, l'essai de dispersion d'huile s'est

révélé être le plus adapté pour la mesure quantitative de l'activité des biosurfactants. L'essai de dispersion d'huile a été utilisé pour détecter, quantifier et comparer les activités des biosurfactants. Pour évaluer l'augmentation de la zone claire dans le temps, notez qu'après 24 heures, certaines souches comme W15, H, et A5 ont atteint un diamètre de 8 cm, indiquant une production continue et soutenue de biosurfactants.

En comparant les diamètres après 30 secondes et 24 heures pour chaque souche, nous avons observé que la plupart des souches (W9, W10, A5, H, H2, J, G, P, K) présentaient une augmentation significative entre 4 cm et 4,5 cm. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par(Zenati, 2018.)qui a montré que la margine et l'huile de moteur usagée présentaient également une activité relativement élevée (DDP de 3,5 et 4 cm respectivement. Cela pourrait indiquer une activité de biosurfactant qui se développe avec le temps.

III.4.3 L'extraction de biosurfactant

Les biosurfactants obtenus sont des liquides visqueux d'une couleur marron-jaunâtre et une odeur caractéristique, (La figure III.6) montre l'aspect des produits bruts.

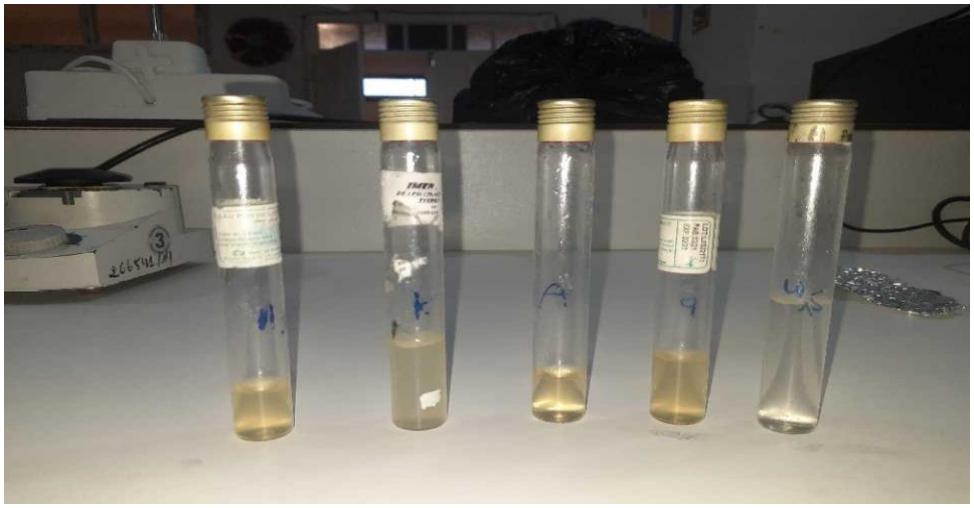


Figure III.9 : Le résultats de l'extraction

La présence de sédiments jaunâtres au fond des tubes pour les souches (K, P, A, A5, W15, W10, W9, H, G, J) indique probablement la précipitation des biosurfactants. Cependant, la souche H2 présente une couleur plus claire, suggérant que l'extrait n'est pas concentré.

La technique d'extraction par solvant organique après évaporation à l'aide d'un rotavapeur a donnée des extraits de couleur jaune à orange avec une texture liquide. Alors, La quantité

et la couleur de ces dépôts peuvent varier en fonction de la souche et des conditions de culture.(Oumer et *al*., 1996)

Lorsque des échantillons ont été obtenus à partir de zones contaminées par des hydrocarbures, 22 % des micro-organismes isolés ont montré une activité de surface. Ces résultats suggèrent une forte corrélation entre la dégradation des hydrocarbures et la production de biosurfactants par les micro-organismes.(Parra et *al*., 1989)

(Raza et *al*., 2007) qui ont utilisé l'huile d'olive comme seule source de carbone dans la production du biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa* qui a réduit la tension superficielle jusqu'à 29 mN/m. Après incubation de 5 jours, le biosurfactant a été extrait à partir du milieu de production par précipitation acide. La souche a pu produire 2,4g de biosurfactant par litre de milieu minérale M2 additionné de 4% d'huile de tournesol comme seule source de carbone.

Conclusion

Conclusion

Les microorganismes thermophiles autochtones des environnements chauds tels que les sources hydrothermales possèdent des capacités d'adaptation moléculaires intéressantes. Ils sont très recherchés par différentes industries à cause de leurs propriétés qui dépassent celles de leurs contreparties mésophiles.

Dans ce travail, un isolement des 30 souches thermophiles a été effectué partir de trois sources hydrothermales en Algérie, (Hammam Essalihine dans la région de wilaya de MEDEA, de Hammam K'sana dans la région de wilaya de BOUIRA et de Hammam Righa de wilaya de AIN DEFFLA), pour l'identification et l'évaluation de l'activité antimicrobienne, la capacité de formation de biofilm et la production des biosurfactants.

Trente souches ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique. Les résultats ont révélé que la majorité de ces souches sont de Gram positif.

Les bactéries thermophiles ont démontré une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli* chez les souches (A, A5, H2, H8, I10, I15, W10 et W15), et contre *Pseudomonas aeruginosa* chez les souches (A5, G, H, H2, I15, W4, W6 et K). En ce qui concerne l'activité antifongique, seule la souche (H) a montré une activité *contre Aspergillus brasiliensis*. Les méthodes quantitatives et qualitatives utilisées pour évaluer la capacité de formation de biofilm de ces bactéries ont également mesuré leur capacité à produire du slime. Les résultats de la méthode RCA ont démontré que les souches A5, M, C, I5, W5, W4, A7, B, W9, W7, W6, H13, H, W12, W15, H3 et H5 sont productrices de slime. Avec la méthode de microplaque de titration, 29 souches ont montré un potentiel de formation de biofilm modéré, tandis qu'une seule souche (W5) a présenté une faible capacité de formation.

La dernière partie de l'étude s'est focalisée sur la production et la caractérisation de biosurfactants en utilisant de l'huile d'olive. Les résultats obtenus ont montré que les biosurfactants produits par les souches (K, P, A, A5, W15, W10, W9, H, G, J) présentaient un indice d'émulsification (E24) avoisinant les 50 %, ainsi que des diamètres variés lors du test de déplacement d'huile de moteur.

Conclusion

A la fin, l'étude des bactéries thermophiles révèle un potentiel considérable pour des applications industrielles, médicales et environnementales. Une meilleure compréhension de leurs mécanismes biologiques et de leurs produits peut conduire à des innovations significatives dans divers secteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHAQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abalos, A., †, Pinazo, A., ‡, Infante, M. R., Casals, M., §, García, F., & and, ⦀. (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir*, *17*(5), 1367-1371.

Abdel-Fattah, Y. R. (2002). Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic Geobacillus sp. Using Box-Behnken experimental design. *Biotechnology Letters*, *24*(14), 1217-1222. https://doi.org/10.1023/A:1016167416712

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, s, & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens. *Desalination*, *223*, 143-151. https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.198

Alain, K., Geslin, C., Godfroy, A., & Prieur, D. (2012). *Les thermophiles*.

Albers, S. V., Van De Vossenberg, J. L. C. M., Driessen, A. J. M., & Konings, W. N. (2001). Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*, *5*(5), 285-294. https://doi.org/10.1007/s007920100214

Allouche, F. N., Hellal, A., & Laraba, A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*, *2*(2), 13-20.

Alrumman, S. A., Mostafa, Y. S., Al-Qahtani, S. T. S., Sahlabji, T., & Taha, T. H. (2019). Antimicrobial Activity and GC-MS Analysis of Bioactive Constituents of Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *44*(1), 75-85. https://doi.org/10.1007/s13369-018-3597-0

Aperçu général sur la microflore bactérienne des déserts chauds (étude de cas Algérie et Maroc).pdf. (S. d.). Consulté 3 juin 2024, à l'adresse https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mmf/2020/Aper%C3%A7u%20g%C3%A9n%C3%A9ral%20sur%20la%20microflore%20bact%C3%A9rienne%20des%20d%C3%A9serts%20chauds%20(%C3%A9tude%20de%20cas%20%20Alg%C3%A9rie%20et%20Maroc).pdf

Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *53*(5), 495-508. https://doi.org/10.1007/s002530051648

Benincasa, M., & Accorsini, F. R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresource Technology*, *99*(9), 3843-3849. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.048

Benyahia, N. I. (2015). *Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans les équipements laitiers* [Thesis]. http://dspace1.univ-tlemcen.dz//handle/112/7347

Bertrand, R., Lenoir, J., Piedallu, C., Dillon, G. R., De Ruffray, P., Vidal, C., Pierrat, J. C., & Gégout, J. C. (2011). Changes in plant community composition lag behind climate warming in lowland forests. *Nature*, *479*(7374), 517-520. https://doi.org/10.1038/nature10548

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Branger, A. (2007). *Micro biochimie et alimentation*. Educatrice Editions.

Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, *29*(5), 1097-1108. https://doi.org/10.1002/btpr.1796

Chaieb, K., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2005). Detection of icaA and icaD loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infection*, *61*(3), 225-230. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.05.014

Charlier, D., & Droogmans, L. (2005). Microbial Life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(24), 2974-2984. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5251-8

Čipinytė, V., Grigiškis, S., Šapokaitė, D., & Baškys, E. (2011). Production of Biosurfactants by Arthrobacter Sp. N3, a Hydrocarbon Degrading Bacterium. *ENVIRONMENT. TECHNOLOGIES. RESOURCES. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference*, *1*, 68-75. https://doi.org/10.17770/etr2011vol1.888

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). MICROBIAL BIOFILMS. *Annual Review of Microbiology*, *49*(1), 711-745. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, *284*(5418), 1318-1322. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318

De Castro Melo, P., Ferreira, L. M., Filho, A. N., Zafalon, L. F., Vicente, H. I. G., & de Souza, V. (2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *44*(1), 119-124. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000031

Derfalou, A. S. et A. (2020). *Mémoire de Master Mémoire de Master*. *2013*, 80.

Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *61*(1), 47-64. https://doi.org/10.1128/mmbr.61.1.47-64.1997

Detay, M., & Thomas, P. (2018). *Les extrémophiles dans leurs environnements géologiques—Un nouveau regard sur biodiversité et sur la vie terrestre et extraterrestre*. 1-28.

Dzięgielewska and Adamczak—2013—Evaluation of waste products in the synthesis of s.pdf. (s. d.). Consulté 2 juin 2024, à l'adresse https://maaz.ihmc.us/rid=1N1XZ6SLN-Z4TBTH-8BVG/Dzi%C4%99gielewska%20and%20Adamczak%20-%202013%20-%20Evaluation%20of%20waste%20products%20in%20the%20synthesis%20of%20s.pdf

Eddouaouda, K. (2012). *Etude du potentiel biodégradatif de souches isolées du sol de Hassi Messaoud contaminé par du pétrole* [Thesis, univ. Blida 1]. https://di.univ-blida.dz/jspui/handle/123456789/5160

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm : Mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine/sciences*, *19*(1), 77-83. https://doi.org/10.1051/medsci/200319177

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(9), 623-633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415

Flint, S. H., Bremer, P. J., & Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, *11*(1), 81-97. https://doi.org/10.1080/08927019709378321

Francy, D. S., Thomas, J. M., Raymond, R. L., & Ward, C. H. (1991). Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, *8*(4), 237-246. https://doi.org/10.1007/BF01576061

Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, *42*(8), 872-874.

Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F., Jacques, M.2016. Importance et Contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la Vache laitière : une revue bibliographique. PP: 215-229.

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *15*(4), 305-311.

Healy, M. G., Devine, C. M., & Murphy, R. (1996). Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, *18*(1-4), 41-57. https://doi.org/10.1016/S0921-3449(96)01167-6

Hentzer, M., Eberl, L., & Givskov, M. (2005). Transcriptome analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm development: Anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms*, *2*(1), 37-61. https://doi.org/10.1017/S1479050505001699

Ibtissem, G., & Yacine, B. (2017). *Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) productrices des biosurfactants*. http://depot.umc.edu.dz/handle/123456789/5113

Irwin, J. A., & Baird, A. W. (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*, *57*(6), 348. https://doi.org/10.1186/2046-0481-57-6-348

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, *81*(1), 7-11. https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012

Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycètes productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. *Université Mentouri-Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie (Alger*.

Larbi Daouadji, K. (2015). *Isolement et identification des souches productrices de lipase.* [PhD Thesis]. http://rdoc.univ-sba.dz/handle/123456789/930

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

López-Velandia, D. P., Torres-Caycedo, M. I., Castro-Gutiérrez, L. T., & Prada-Quiroga, C. F. (2018). Antibiotic resistance: Origins, evolution and healthcare-associated infections. *Salud Uninorte*, *34*(2), 494-505. https://doi.org/10.14482/sun.34.2.615.32

Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 461-488. https://doi.org/10.1128/mmbr.64.3.461-488.2000

Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, *1*(1), 5. https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5

Malek, F., Boudjemaa, B., Aquametric, A., & Kihal, M. (2013). Identification and genetic diversity of Bacillus cereus strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Science & Technology*, *93*(1), 73-82. https://doi.org/10.1007/s13594-012-0093-2

Margaritis, A., Zajic, J. E., & Gerson, D. F. (1979). Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, *21*(7), 1151-1162. https://doi.org/10.1002/bit.260210706

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indiana Journal of Médical Microbiology*, *24*(1), 25-29. https://doi.org/10.4103/0255-0857.19890

Microbiologie des réservoirs pétroliers | Antonien van Leeuwenhoek. (S. d.). Consulté 11 juin 2024, à l'adresse https://link.springer.com/article/10.1023/A:1002434330514

Mogha, K. V., Shah, N. P., S., J. B., & Chaudhari, A. R. (2014). Biofilm a threat to dairy industry. *Indian Journal of Dairy Science*, *67*(6), Article 6. https://epubs.icar.org.in/index.php/IJDS/article/view/39317

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., & Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by Arthrobacter sp. Strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, *175*(20), 6459-6466. https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6459-6466.1993

Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Engineering Geology*, *60*(1-4), 371-380. https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., & Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*(6), 711-729. https://doi.org/10.1007/s002530051456

Nosocomiales, I. (2000). *DESINFECTANTS*. 1-87.

Ojha, P., Kar, N. P., Nayak, S., Patra, A. K., & Sahoo, K. K. (2021). Isolation of a broad-spectrum antimicrobial producing thermophilic Bacillus and characterization of its antimicrobial protein. *Archives of Microbiology*, *203*(5), 2059-2073. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02162-w

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Okada, M., Sato, I., Cho, S. J., Iwata, H., Nishio, T., Dubnau, D., & Sakagami, Y. (2005). Structure of the Bacillus Subtilis Quorum-Sensing Peptide Pheromone Comx. *Nature Chemical Biology*, *1*(1), 23-24. https://doi.org/10.1038/nchembio709

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: Mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, *64*, 175-188. https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023

Ouali, S., Boughrara, H., & Bouhadjar, H. (1974). *Recherche et Développement Les sources Thermales en Algérie*. *June 2008*, 16-18.

Oumer, A., Leclercq-Perlat, M., Bergère, J., & Corrieu, G. (1996). Mise au point d'une méthode de mesure de la concentration totale en cellules de Brevibacterium linens à la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée. *Le Lait*, *76*(4), 389-404.

Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants : Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(1), 633-654. https://doi.org/10.3390/ijms12010633

Panda, M. K., Sahu, M. K., & Tayung, K. (2013). Isolation and characterization of a thermophilic Bacillus sp. With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian Journal of Microbiology*, *5*(2), 159-165.

Parra, J. L., Guinea, J., Manresa, M. A., Robert, M., Mercadé, M. E., Comelles, F., & Bosch, M. P. (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *66*(1), 141-145. https://doi.org/10.1007/BF02661805

Postec, A. (2005). *Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique : Cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles.* 292.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2003). *Microbiologie*. De Boeck.

Radhika, Selvaraj, B., Radhakrishnan, M., & Balagurunathan, R. (2011). Bioprospecting of fresh water actinobacteria: Isolation, characterization and antagonistic potential of selected actinobacteria. *Journal of Pharmacie Resarci*, *44*, 2584-2586.

Rayane, A. (s. d.). *A toute ma famille BOUSSEBOUA et ZOUAGHI Et à tous ceux qui me sont chers*.

Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *52*(2), 154-162. https://doi.org/10.1007/s002530051502

Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(3), 1005-1016. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8

Samanta, A. (2021a). *Biosurfactants and Its Application in Oil Recovery* (p. 181-205). https://doi.org/10.1007/978-3-030-70026-3_6

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Samanta, A. (2021b). *Biosurfactants and Its Application in Oil Recovery*. *June*, 181-205. https://doi.org/10.1007/978-3-030-70026-3_6

Samira, B., & Messaouda, B. (2008). *Mémoire Jrc*.

Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(2), 127-144. https://doi.org/10.3109/07388550903427280

Saxena, N., & Mandal, A. (2022). Natural Surfactants. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*, 19-24. https://doi.org/10.1007/978-3-030-78548-2_4

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *40*(2), 175-179. https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6

Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix—An immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, *9*(5), 222-227. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1

Taj, Y., Esa, F., Aziz, F., & Kazmi, S. U. (2012). Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Journal of Infection in Developing Countries*, *6*(5), 403-409. https://doi.org/10.3855/jidc.1743

Tensions superficielles et interfaciales. (S. d.). Techniques de l'Ingénieur. Consulté 19 avril 2024, à l'adresse https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/sciences-fondamentales-th8/constantes-mecaniques-et-viscosite-42339210/tensions-superficielles-et-interfaciales-k475/

Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014a). Les biofilms bactériens : Leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *78*(2), 110-116.

Van Dyke, M. I., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991). Applications of microbial surfactants. *Biotechnology Advances*, *9*(2), 241-252. https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90006-H

Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *65*(1), 1-43. https://doi.org/10.1128/mmbr.65.1.1-43.2001

Zenati, B. (s. d.). *Biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole*.

ANNEX

Annex

Annex 1 : préparation de milieux de culture

THERMUS THERMOPHILUS MEDUIM (TTM)

Extrait de levure 4g

Protéase peptone..... 8g

Na cl 2g

L'eau distillé 1000ml

Annex 2 : coloration de gram

Réactifs

Violet de gentiane

Violet de gentiane..... 1g

Alcool éthylique à 95% 10ml

Phénol..... 2g

Eau distillée..... 100ml

Lugol de Gram

Iodure de potassium.....1g

Iode..... 1g

Eau distillée..... 300ml

Fushine de Ziehl :

Fushine..... 1g

Alcool éthylique à 95.....10ml

Phénol ajouté à 100ml d'eau distillée.....5g

La technique Préparation du Frottis

- Sur une lame de microscope, déposer une goutte d'H2O.
- A l'aide d'une anse stérilisé (passant sous le bec benzène), toucher une colonie pour prélever des bactéries.

- Déposer ce prélèvement au milieu de lame, puis passer la lame dans la petite flamme du bec bunsen pour fixer à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de violer de gentiane (cristal violer) sur le frottis fixé. - Laisser agir 1 min, puis rincer à l'eau.
- Déposer quelques gouttes de Lugol (un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries) sur le frottis, Laisser agir 1 min et rincer brièvement à l'H2O.
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 s). Rincer avec l'eau. L'alcool pénètre dans la bactérie.
- La coloration au violet de Gentiane disparait. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram- si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 min. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 40x puis grossissement 100x avec une goutte d'huile à immersion)

Annex 3 : Milieux de l'activité antimicrobienne

MULLER HINTON (MH)

Muller Hinton..... 38g

Eau distillée..... 100ml

Annex 4 : Milieux de biofilm

ROUGE CONGO (RC)

Le bouillon cœur Cherval 37g/L

saccharoses..... 50g/L

Agar ..... 10 g/L

Rouge Congo ..... 0,8 g/L

PHOSPHATE BUFFERED SALINE(PBS)

NaCl..... 8g/L

Kcl 0.2g/L

Na2HPO4…..1.44g/L

KH2PO4…..0.24g/L

Annex 5 : Milieux de biosurfactant

LURIA BERTANI

Tryptone.....10g/L

Extrait de levure .....5 g/L

NaCl.....10g/L

Ajusté PH à 7.0±0.2

MILIEU MINIMUM

NH4Cl.....0.4g/L

K2HPO4…..0.3g/L

NaCl.....10g/L

MgCl2…..0.33g/L

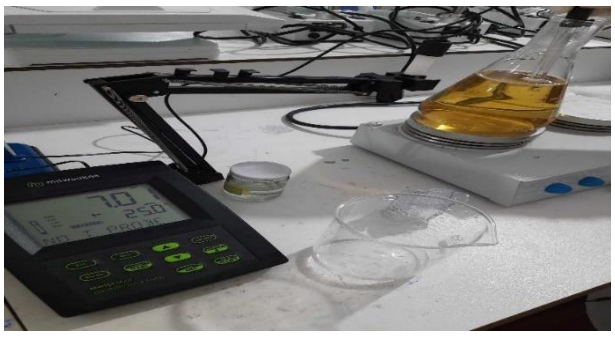
CaCl2…..0.05g/L

Extrait de levure 0.1g/L

Oligoéléments 1ml

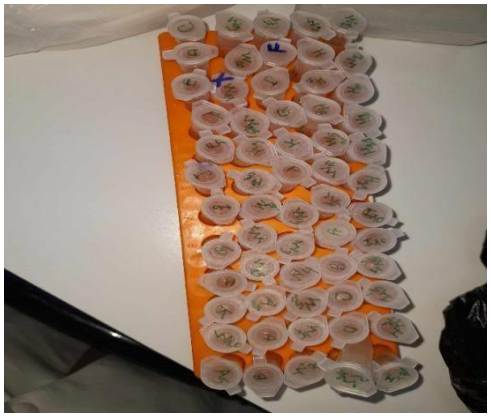
Ajusté PH à 7.0/7.5

Annex 6 :

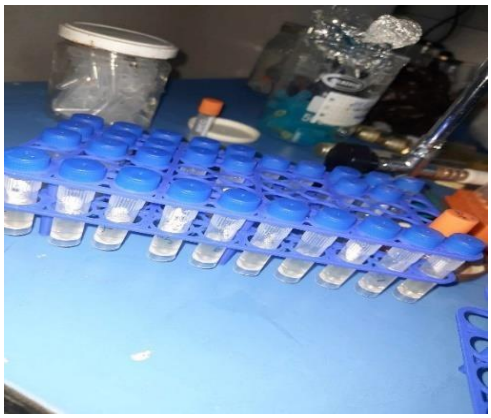


Préparation de milieu BN

Annex



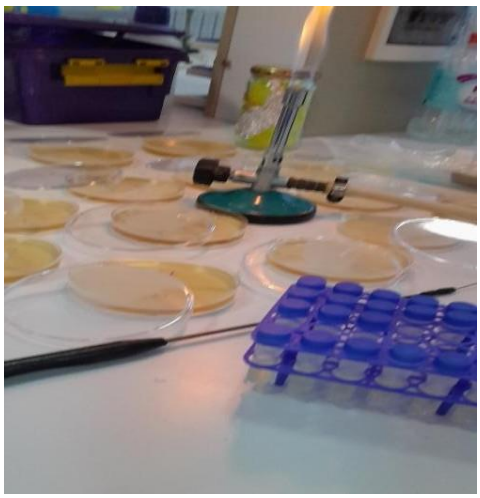
Souches bactériennes



Souches bactérienne + BN

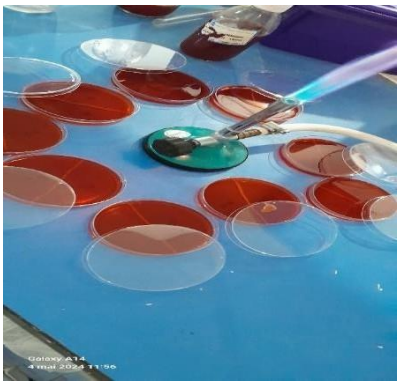


Préparation de milieu TTM



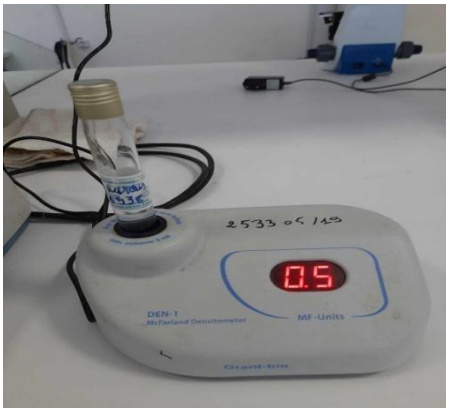
Ensemencement des Souches sur le milieu TTM





Préparation de milieu Rouge Congo et écoulement Sur les boites pétries

Annex



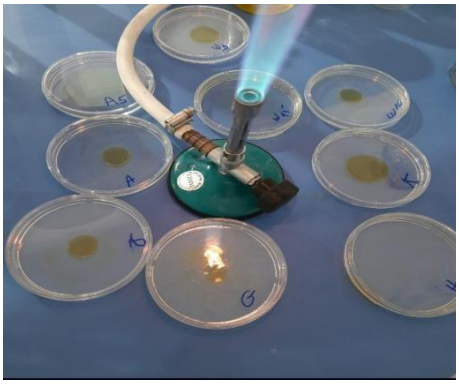
L’ajustement de la DO des suspensions bactériennes



La préparation des précultures des souches sur le milieu LB



La préparation des cultures + incubation



Le test de déplacement d’huile

Annex



Les étapes de d’extraction de quelques souches