République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Yahia Fares - MEDEA
FACULTE DES SCIENCES

Filière : **Science Biologique**
Spécialité : ***Microbiologie Appliquée***

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Thème

Optimisation des paramètres de croissance et évaluation des activités enzymatique, antimicrobienne et l'aptitude de formation de Biofilm des bactéries thermophiles isolées à partir de trois sources hydrothermales en Algérie.

Présenté par

M^{elle} HAMIDA Amel **M^{elle} KOURDALI Nawel** **M^{elle} TOUGA Asmaa**

Soutenue publiquement le 23/06/2022 devant le jury composé de :

Mme. **BOUMEDIEN F.**	MCB	Univ-MEDEA	Président
Mme. **ZERGOUG A.**	MCB	Univ-MEDEA	Examinatrice
M^{elle}. **HOCEINI A.**	MCB	Univ-MEDEA	Promotrice

Année universitaire :**2021/2022**

Remerciements

En premier lieu et avant tout, nous remercions notre Grand Dieu le plus puissant qui nous a éclairés notre chemin et nous a guidés pour réaliser ce modeste travail.

Tout d'abord, nous tenons à remercier Melle ***HOCEINI Amina*** *pour nous avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance en nous et sa gentillesse.*

Nous profitons de l'occasion de la présentation de ce travail pour exprimer nos vifs remerciements à notre enseignante ***BOUMEDIEN FARIDA****, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

Nos remercîments à notre enseignante ***ZERGOUG Amina*** *d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Notre profonde gratitude va également à Mr ***HENTABLI Mohamed*** *superviser de laboratoire chez groupe SAIDAL Médéa qui nous aide énormément, merci pour votre présence et patience, votre disponibilité permanente, et votre aide précieuse dans la réalisation d'une partie importante de ce mémoire*

Un merci tout particulier à Mr ***BAKIRTERKI Othmane,*** *Mr* ***LAIDI Maamer,*** *Mme* ***HFAIRI Saida*** *et à tous les enseignants 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 vifs remerciements à toute l'équipe de laboratoire de la faculté, Et bien sûr à tous les étudiants de la promotion Master 2 Microbiologie Appliquée 2021/2022.

Dédicace

Avant tout nous remercions ***ALLAH****, le tout puissant qui nous a donné, la patience et la santé durant toutes les années de nos études et surtout en accomplissant ce modeste travaille.*

Je dédie ce modeste travail :

A l'étoiles de ma vie, au symbole du sacrifice et du donnant, à la poitrine chaude et au cœur tendre, à celle qui ne m'oublie pas dans la prière jour et nuit à celle que je ne trouve pas de mots pour exprimer sa valeur ***« Ma chère mère »*** *que dieu prolonge sa vie et écrive sa santé et son bien-être tout au long de sa vie.*

A La bougie qui a brulé pour éclairer le chemin de ma vie ***« Mon cher père »*** *comme je suis heureux de te voir, et tu es fier de moi et heureux de ma réussite que dieu vous bénisse et vous donne longue vie.*

A ***ma grand-mère*** *et* ***mon grand-père*** *que dieu vous protège*

À la mémoire de ***ma grand-mère*** *et* ***mon grand-père****. – رحمهم الله –*

Au meilleur oncle du monde ***« Ahmed »****, tu es la source de tendresse et mon soutien tout au long de mon parcours universitaire, que dieu te protège où que tu ailles.*

A mes chère frères ***Mohamed*** *et* ***Abd el hak*** *et ma petit sœur* ***Meriem el batoul.***

A*mes très chères tantes et leur enfant.*

A ma seconde moitié ***Noudjoud,*** *et ma cousine* ***Amina, khaoula, Lina.***

A ma ***tante*** *et son* ***mari*** *merci pour tout.*

A tous mes cousins et cousines.

Ames très chère trinômes ***Nawal*** *et* ***Amel,*** *Merci pour vos efforts mes belles.*

A mes amis ***Lina*** *et* ***Yousra*** *que dieu vous bénisse dans votre vie.*

A tous ceux qui ont eu un impact sur ma vie, et à tous ceux que mon cœur a aimés et qui ont été oubliés par ma plume.

ASMAA…

Dédicace

A tous qui compte beaucoup pour moi

A ma chère maman, *mon ange, merci de m'avoir fait comprendre que le véritable amour est ce qui se donne, sans rien attendre en retour.*

A mon héros, mon père, *ce lui qui me laissera jamais seul, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

A ma sœur IKRAM et mes frères RAFIK et RAOUF, *que dieu vous protège pour moi.*

A toute la famille, exceptionnellement ma cousine NAZIHA, *ma meilleur amie, c'est un vrai bonheur de t'avoir dans ma vie.*

A mes chers trinômes, AMEL et ASMAA, *je vous souhaite une vie plain de succès et du bonheur et a tous mes collègues de la promotion 2022 Microbiologie appliquée.*

Nawel …

Dédicace

De tout mon cœur Je dédie ce modeste travail
A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le Courage
A celle qui a consacré sa vie à me rendre heureuse
A celle qui attend chaleureusement ce jour : ***la lumière de ma vie ma chère Mère.***

A celui qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions
A celui qui a rêvé de voir cette journée : ***mon cher père.***

A mon partenaire de vie, mon bras droit qui est toujours à côté de moi, qui m'a partagé les bons et les mauvais moments et m'a motivé à poursuivre mes études mon mari ***Amine.***

A ma ***grande mère*** *la source de gentillesse, que Dieu te donne santé et longue vie.*
A ma sœur ***Amira,*** *mes frères* ***Abde elnour*** *et* ***Karim*** *que dieu vous garde pour moi*
A mes oncles spésialement ***Abde elkader, Ahmed*** *et* ***Said*** *et toute la famille qui m'ont beaucoup soutenu moralement.*

A mes trinôme ***Nawel*** *et* ***Asmaa*** *Merci pour leur soutien moral, leur patience et leur compréhension tout au long de ce travail.*

*De ce côté de la terre, merci infiniment à mes amies****Marwa, Khadidja, halla, Khaoula*** *et* ***Fouzia*** *pour leur appui constant, leur amitié et leur amour. Parce que finalement, le contenu de ce travail est un reflet de l'amour …*

Amel…

ملخص

فيدراسة معمقة حول بكتيريا محبة للحرارة تم عزلها العام الماضي من مواقع مائية (حمام الصالحين بمنطقة المدية، حمام كسانا بمنطقة البويرة، وحمام ريغا بمنطقة عين الدفلى)، تتضمن الدراسة تحسين معايير النمو، والبحث عن النشاط الانزيمي، وكذلك مضادات الميكروبات، والقدرة على تكوين البيوفيلم.

أولا، تعريف السلالات المعزولة بناء على خصائصها العينية والمجهرية والكيميائية الحيوية، مكن نا من دراسة سلالات تنتمي الى*Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus*و*Lysinibacillus*.

تقييم النشاط الانزيمي للسلالات المدروسة مكن من ايجاد سلالات تحتوي على انزيم الاميلاز، انزيم السليلاز، انزيم البكتيناز، انزيم الكازييناز، انزيم الاستيراز T20وT80 وانزيم الليسيثين، وقمنا ايضا بتقييم النشاط المضاد للميكروبات للسلالات المدروسة ضد تسع سلالات من البكتيريا والفطريات المسببة للامراض معيارية منها *Staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Aspergillus brasiliensis*، تم ايجاد هذا النشاط عند بعض السلالات المحبة للحرارة تجريبيا.

قمنا ايضا بدراسة قدرة هذه السلالات على تكوين البيوفيلم من خلال طريقتين (الكمية والنوعية)، النتائج المتحصل عليها اشارة الى قدرة السلالات على انتاجSLIME.

قمنا بتحسين معايير النمو للسلالات، وهذه الدراسة سمحت باستنتاج ان درجة حرارة °C60 وتركيز NaCl 0.2% ودرجة الحموضة بين 5.5 و 7.1 هي القيم الاحسن للنمو، هذه النتائج تم الحصول عليها عن طريق مخطط التجارب.

اخيرا، تمت نمذجة النتائج التجريبية عن طريق تحليل احصائي من اجل الحصول على نموذج رياضي يلخص كل نتائج هذا العمل.

الكلمات المفتاحية: المحبة للحرارة ، تحسين ،النشاط الانزيمي ،النشاط المضاد للميكروبات، بيوفيلم ، مخطط التجارب، النمذجة.

Abstract:

An in-depth study of thermophilic bacteria isolated last year at three geothermal sites (Hammam Elsalhin in the MEDEA region, Hammam K'sana in the BOUIRA region and Hammam Righa in the AIN DEFLA region), this study includes optimization of growth parameters, evaluation of enzymatic and antimicrobial activity and the ability to form biofilm. First, the phenotypic characterization of the isolated strains based on their macroscopic, microscopic and biochemical properties allowed us to study strains belonging to the genera Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus, and Lysinibacillus. The evaluation of the enzymatic activity of the strains studied made it possible to find strains amylase positive, cellulase positive, pectinase positive, Caseinase positive, esterase (T20) positive, esterase (T80) positive and lecithins positive strains. In addition, the antimicrobial activity of the strains studied was evaluated against nine standardized pathogenic test strains. The presence of this effect was detected in certain strains experimentally against Staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, staphylococcus epidermidis, Aspergillus brasiliensis. Thus, we analyzed the biofilm formation ability of thermophilic strains via two methods (quantitative and qualitative), the result obtained to show the ability of the strains to produce slime. As a result, the growth characters of the strains were not optimized and this study led to the conclusion that the temperature 60°C, the concentration of NaCl (0.2%) and the pH between 5.5 and 7.1 are the optimal values for the growth of the strains studied. These results are obtained using a plan of experiments. Finally, the modeling of the experimental data was carried out by statistical analysis in order to have a mathematical model summarizing all our results along this work.

Keywords: thermophiles, optimization, enzymatic activity, antimicrobial activity, biofilm, plan of experiments, modelling.

Résumé :

Une étude approfondie sur des bactéries thermophiles isolées l'année passée au niveau 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), elle comprendre une optimisation des paramètres de croissance, une évaluation de l'activité enzymatique, antimicrobienne et la capacité de formation de biofilm. D'abord, La caractérisation phénotypiques des souches isolées à base de leurs propriétés macroscopiques, microscopiques et biochimiques nous a permis d'étudier des souches appartenant aux genres Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus, et Lysinibacillus .L'évaluation de l'activité enzymatique des souches étudiées a permis de trouver des souche amylase positif, cellulase positif, pectinase positif, Caseinase positif, estérase (T20) positif, estérase (T80) positif et des souches lécithines positives. De plus on a évalué l'activité antimicrobienne des souches étudiés contre neuf souches testes pathogènes standardisées, La présence de cet effet a été détecté chez certaines souches expérimentalement contre Staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, staphylococcus epidermidis, Aspergillus brasiliensis . Ainsi, on a analysé l'aptitude de formation de biofilm des souches thermophiles via deux méthodes (quantitative et qualitative), le résultat obtenu à montrer la capacité des souches à produire de slime. En suites, On na optimiser les caractères de croissance des souches et cette étude a permis de conclure que la température 60°C, la concentration de NaCl (0.2%) et le pH entre 5.5 et 7.1 sont les valeurs optimales de croissance des souches étudiées. Ces résultats sont obtenus à l'aide de plan d'expériences Enfin, La modélisation des données expérimentales a été réalisées par l'analyse statistique afin d'avoir un modèle mathématique résume toute nos résultats le long de ce travail.

Mots clés : Thermophiles,Optimisation, activité enzymatique, activité antimicrobienne, biofilm, plan d'expériences,modélisation.

Table de Matière

Table des matières

Liste des : Figures, Tableaux, Abréviations
Introduction Générale
Chapitre I : Revue bibliographique 2
Partie 1 : Les sources thermales et les thermophiles 3
I.1 Introduction 2
I.2 La Microbiologie des eaux thermale : 3
I.3 Le Mode Des Extrémophiles : 4
I.4 Les thermophiles : 4
I.5 La niche écologique des thermophiles : 5
I.5.1 Le biotope naturel : 5
I.5.1.1 Biotopes marins : 5
I.5.1.2 Biotopes terrestres : 5
I.5.2 Biotopes artificiels : 6
I.6 Adaptations moléculaires à la thermophilie : 6
I.6.1 Les protéines : 6
I.6.2 Les membranes cytoplasmiques : 7
I.6.3 ADN gyrase reverse : 7
I.7 Les avantages des thermophiles : 7
Partie 2 : Les thermoenzymes 2
II.1 Les enzymes : 8
II.1.1 Classification 8
II.2 Les thermo enzymes : 9
II.2.1 Définition : 9
II.2.1.1 Les Protéases : 9
II.2.1.2 Les Cellulases : 10
II.2.1.3 Les xylanases : 10
II.2.1.4 Enzymes utilisées en biologie moléculaire : 11
II.2.1.5 Les lipases : 12
II.2.1.6 Les Amylases : 12
II.2.1.7 Les pectinases : 13
II.2.1.8 Les chitinases : 13
II.2.2 Avantages des thermoenzymes : 13
Partie 3 : Activité antimicrobienne et Biofilm 2
III.1 Agent antimicrobien : 15
III.2 Biofilms bactériens : 15
III.2.1 Définition : 15

III.2.2 Les étapes de formation de biofilm : 16
Partie 4 : Optimisation et Modélisation 18
IV.I Plan d'expérience : 17
IV.I.1 Introduction : 17
IV.I.2 Généralité sur le plan d'expérience : 17
IV.I.2.1 Définition : 17
IV.I.2.2 Objectif de plan d'expérience : 17
IV.I.3 Espace expérimental : 18
IV.I.4 Domaine d'un facteur : 18
IV.I.5 Domaine d'étude : 19
IV.I.5.1 Méthodologie des plans sans contraintes : 20
IV.I.5.2 Surfaces de réponse : 21
IV.I.6 Les méthodes des plans d'expériences : 21
IV.I.7 Les types de plans d'expériences : 22
IV.I.7.1 Plans factoriels complets : 22
IV.I.7.2 Notion de modélisation mathématique : 22
IV.I.7.3 Le modèle de l'expérimentateur : 23
IV.I.7.4 Analyse statistique : 23
IV.I.8 Statistiques sommaires dans (Logiciel MODDE) : 24
IV.II Machines à vecteur support : 25
IV.II.1 Introduction : 25
IV.II.2 SVM pour la régression : 26
IV.II.3 Utilisation des noyaux : 27
IV.II.4. Les noyaux : 28
IV.II.5 Évaluation du modèle : 29
IV.II.6 Réglage du *C* "chemin de régularisation" : 29
Chapitre II : Matériels et Méthodes 30
II. Matériels et Méthodes : 31
II.1 Matériels : 31
II.1.1 Verrerie : 31
II.1.2 Appareillage : 31
II.1.3 Milieux culture : 31
II.1.4 Autres produits consommables : 31
II.1.5 Autres matériel : 31
II.2 Méthode : 31
II.2.1 revivification et identification des souches : 31
II.2.1.1 Enrichissement et ensemencement : 32

II.2.1.2 Identification phénotypique des souches : 32
II.2.1.3 Mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires : 34
II.2.2 L'optimisation des paramètres de croissance : 35
II.2.2.1 Application de la méthode de plan d'expérience : 35
II.2.2.2 Définition des objectifs et des réponses : 36
II.2.2.3 Définition du domaine expérimental : 37
II.2.2.4 Construction du plan d'expériences : 37
II.2.3 Recherche des activités antimicrobiennes sur milieu solide (technique des cylindres d'agar) : 37
II.2.4 La recherche de la capacité de formation de biofilm : 38
II.2.4.1 La méthode du Rouge Congo : 38
II.2.4.2 Méthode de microplaques de titration à 96 puits : 38
Chapitre III : Résultats et discussion 18
III.1 Caractérisation phénotypique des souches isolées des trois sites : 40
III.1.1 Observation macroscopique : 40
III.1.2 Observation microscopique : 41
III.1.3 Identification biochimiques des isolats : 43
III.2 L'activité enzymatique : 49
III.3 L'activité antimicrobienne : 51
III.4 L'aptitude de formation de biofilm : 54
III.4.1 Technique Rouge Congo : 54
III.4.2 Technique de microplaque de titration : 55
III.5 Optimisation des paramètres de croissance : 57
III.5.1 Analyse globale des résultats d'essais : 57
III.5.2 Analyse mathématique des résultats d'essais 57
III.5.3 Analyse statistique globale des modèles 57
III.5.4 Courbe de criblage : 57
III.5.5 Courbes iso-réponse : 57
III.5.6 Représentation graphique de l'effet des facteurs : 58
III.6 Modélisation des résultats obtenus le long de ce travail par support vector machine (SVM) : 88
III.6.1 Analyse statistique des données : 89
III.6.2 Modèle DA-SVMr. 89
Conclusion 93

Liste des : Figures, Tableaux, Abréviations

Liste des figures

Figure1 : Exemple de sources thermales : A. Hammam D'bagh de Guelma (Algérie), B.Hammam korbous (Tunisie) 02

Figure2 : Exemples de biotopes naturels chauds. A**.** Octopus Spring, parc national de Yellowstone, B. Volcan de Dallol (Ethiopie) 06

Figure3 :Étape de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien 16

Figure4 : L'espaceexpérimental de l'étude de deux facteurs pour un plan à deux dimensions

…… 18

Figure5 : Le domaine de variation des facteurs 19

Figure6 : Le domaine d'étude est défini par la réunion des domaines des différents facteurs sans contraintes 19

Figure7 : Le domaine d'étude sous contraintes est représenté par la partie grisée 20

Figure8 : Exemple de disposition des points expérimentaux dans un domaine sans contraintes 20

Figure9 : L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse 21

Figure10 : Hyper-tube modélisant la fonction de régression 26

Figure11 : Utilisation des noyaux pour la résolution de la régression non linéaire 27

Figure 12 : Aspect macroscopique des souches 40

Figure13 :coloration de gram des souches thermophiles sous microscope optique au grossissement X100, X40 42

Figures 14 : Les résultats de catalase des souches 43

Figure 15 : Les résultats d'oxydase des souches 44

Figure 16 : Le test nitrate réductase des souches 44

Figure 17 : Test de mannitol mobilité des souches 45

Figure 18 : les galeries API 20E après incubation 46

Figure 19 : Les résultats des tests enzymatiques 49

Figure20 :L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon) 51

Figure 21 : La production de slime chez les souches (H8, W9, C, W5, H, A5, B, W13, I5, H3, W7, W15, M, W12, 11 et W8) 54

Figure 22 : Préparation de microplaque de titration. 55

Figure 23 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S1. 58
Figure 24 : Courbe isoréponse 4D de la souche S1. 59
Figure 25 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S1 59
Figure 26 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S2 60
Figure 27 : Courbe isoréponse 4D de la souche S2 60
Figure 28 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S2 60
Figure 29 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S3 61
Figure 30 : Courbe isoréponse 4D de la souche S3 61
Figure 31 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S3 62
Figure 32 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S4 62
Figure 33 : Courbe isoréponse 4D de la souche S4 63
Figure 34 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S4 63
Figure 35 :Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S5 64
Figure 36 : Courbe isoréponse 4D de la souche S5 64
Figure 37 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S5 64
Figure 38 :Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S6 65
Figure 39 : Courbe isoréponse 4D de la souche S6 65
Figure 40 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S6 66
Figure 41 :Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S7 66
Figure 42 : Courbe isoréponse 4D de la souche S7 67
Figure 43: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S7 67
Figure 44 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S8 68
Figure 45 : Courbe isoréponse 4D de la souche S8 68
Figure 46 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S8 68
Figure 47 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S9 69

Figure 48 : Courbe isoréponse 4D de la souche S9 69
Figure 49: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S9 70
Figure 50 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S10 70
Figure 51 : Courbe isoréponse 4D de la souche S10 71
Figure52: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S10 71
Figure 53 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S11 72
Figure 54 : Courbe isoréponse 4D de la souche S11 72
Figure55 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S11 72
Figure 56 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche12 73
Figure 57 : Courbe isoréponse 4D de la souche S12 73
Figure 58 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S12 73
Figure59 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S13 74
Figure 60 : Courbe isoréponse 4D de la souche S 13 75
Figure 61: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S13 75
Figure 62 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S14 76
Figure 63 : Courbe isoréponse 4D de la souche S14 76
Figure 64 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S14 76
Figure 65 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S15 77
Figure 66 : Courbe isoréponse 4D de la souche S15 77
Figure 67 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S15 78
Figure 68 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S16 78
Figure 69 : Courbe isoréponse 4D de la souche S16 79
Figure 70 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S16 79
Figure 71 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S17 80
Figure 72 : Courbe isoréponse 4D de la souche S17 80

Figure 73 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S17.....80
Figure 74 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S18.....81
Figure 75 : Courbe isoréponse 4D de la souche S18.....81
Figure 76 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S18.....82
Figure 77 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S19.....82
Figure 78 : Courbe isoréponse 4D de la souche S19.....83
Figure 79 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S20.....83
Figure 80 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S20.....84
Figure 81 : Courbe isoréponse 4D de la souche S20.....84
Figure 82 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S20.....84
Figure 83 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S21.....85
Figure 84 : Courbe isoréponse 4D de la souche S21.....85
Figure 85 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S21.....86
Figure 86 : Organigramme du processus d'optimisation par DA-SVM 89
Figure 87 : Corrélation léniaire entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales 90
Figure 88 : Interface graphique 91

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristique de quelques sources thermales du nord de l'Algérie.....03
Tableau 2 :les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés 04
Tableau 3 : Les principales classes d'enzymes dans le système EC.....08
Tableau 4 : Exemples de noyaux.....28
Tableau 5 : La nature des différents facteurs. 37
Tableau 6 : Le domaine des facteurs étudiés.....37
Tableau 7 : Caractères culturaux des souches cultivées.....41
Tableau 8 : Caractérisations microscopique des isolats. 42
Tableau 9 : Résultats d'oxydase et catalase. 44
Tableau 10 : Les résultats de test nitrate réductase et mannitol mobilité.....46
Tableau 11 : Les résultats des souches de la galerie API 20E. 47
Tableau 12 : Identification des souches 48
Tableau 13 : Activité enzymatique des souches.....50
Tableau 14 : l'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon) 52
Tableau 15 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.....55
Tableau 16 : Résultats de la technique de microplaque de titration.....56
Tableau 17 : Analyse d'ANOVA de la souche S1 58
Tableau 18 : Analyse d'ANOVA de la souche S2 59
Tableau 19 : Analyse d'ANOVA de la souche S3 61
Tableau 20 : Analyse d'ANOVA de la souche S4 62
Tableau 21 : Analyse d'ANOVA de la souche S5 63
Tableau 22 : Analyse d'ANOVA de la souche S6 65
Tableau 23 : Analyse d'ANOVA de la souche S7. 66
Tableau 24 : Analyse d'ANOVA de la souche S8 67
Tableau 25 : Analyse d'ANOVA de la souche S9 69
Tableau 26 : Analyse d'ANOVA de la souche S10 70
Tableau 27 : Analyse d'ANOVA de la souche S11 71
Tableau 28 : Analyse d'ANOVA de la souche S12 73
Tableau 29 : Analyse d'ANOVA de la souche S13 74
Tableau 30 : Analyse d'ANOVA de la souche S14 75

Tableau 31 : Analyse d'ANOVA de la souche S15 77
Tableau 32 : Analyse d'ANOVA de la souche S16 78
Tableau 33 : Analyse d'ANOVA de la souche S17 79
Tableau 34 : Analyse d'ANOVA de la souche S18 81
Tableau 35 : Analyse d'ANOVA de la souche S19 82
Tableau 36 : Analyse d'ANOVA de la souche S20 83
Tableau 37 : Analyse d'ANOVA de la souche S21 85
Tableau 38 : Paramètres optimaux de croissance des souches 86
Tableau 39 : Informations les plus importantes sur les données ajustées dans ce travail 88
Tableau 40:hyper-paramètres de modèle SVM 91

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ANOVA : Aalysis Of Variance/ Analyse de la variance.

ANRH : Agence Nationale des Ressources Hydrauliques.

API 20E : Analytical Profile Index 20E (E : Entérobactéries).

B.N : Bouillon Nutritif.

°C : Degré Celsius.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

DA : Dragonfly Algorithm.

D.O : Densité Optique.

DOE : Design of experiment/ Plans d'expériences.

E.C. : Commission des enzymes.

H : Heur.

Km : Kilomètre.

MAE : Erreur Absolue Moyenne.

MAPE : Erreur de Pourcentage Absolu Moyen.

MLR : Régression linéaire multiple.

MPa : Mégapascal.

MSR : Méthodologie des surfaces de réponses.

NaCl : Chlorure de sodium.

N.R : Nitrate Réductase.

p/v : poids par volume.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PH : potentiel d'hydrogène.

PLS : Partial least squares.

R : Coefficient de Corrélation.

$\mathbf{R^2}$: Coefficient de Détermination.

RCA : Rouge Congo Agar.

RMSE : Erreur Quadratique Moyenne.

SVM : Support Vector Machine/ Machine à vecteurs de support.

T : Température.

T20 : Tween 20.

T80 : Tween 80.

TM : Température de demi-dénaturation.

TTM : Thermus thermuphilus medium.

Introduction Générale

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 **(ADIGÜZEL et *al*., 2011).** Les bactéries thermophiles sont des microbes qui habitent principalement 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).** Les enzymes thermostables produites par ces microorganismes sont très importantes pour les applications industrielles en raison de leurs résistances dans différentes conditions de fonctionnements, ces enzymes se sont avérées plus stables contre de nombreux solvants, détergents, pH acides et alcalin et températures élevées. En raison de ces propriétés, l'isolement et l'identification des bactéries thermophiles, ainsi que la détermination et la caractérisation de leurs enzymes sont très essentielles **(Baltaci et al, 2017).** Autres sources de composés bioactifs des bactéries thermophiles qui présentent de nombreux avantages pour la vie humaine, est la source d'antimicrobiens **(Octarya et al., 2022**). Comme les agents pathogènes microbiens évoluent continuellement et développent une résistance aux antibiotiques, il y a eu une demande accrue pour la découverte et le développement de nouveaux composés antimicrobiens efficaces **(Alrumman et al., 2018).** L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sols désertiques et surtout les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutique. Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment qu'on s'est intéressé aux microorganismes habitants ces environnements **(Bouanane-Darenfed et al., 2011).**

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

- Enrichissement et identification phénotypique des souches thermophiles.
- Evaluation de l'activité enzymatique des souches préalablement isolées sur les milieux (gélose à l'amidon, gélose CMC, gélose à la pectine, gélose tween 20, gélose tween 80, gélose à la base de lait écrémé, gélose au jaune d'œuf).
- Optimisation des paramètres de croissance (PH, T°, NaCl).
- Evaluation de l'activité antimicrobienne et l'aptitude de formation de biofilm.
- Modélisation mathématique des données expérimentales.

Chapitre I : Revue bibliographique

Partie 1 : Les sources thermales et les thermophiles

I.1Introduction

Selon **Gilbert**, on dit des sources naturelles que ce sont des sources chaudes : si la température de son eau est supérieure à la température moyenne au nulle de 15°**C (**Gilbert**,1875**).



Figure.1 Exemple de sources thermales : A. Hammam D'bagh de Guelma (Algérie), **B.** Hammam korbous (Tunisie)**(Bouacem, 2016).**

En Algérie, nombreux sources thermales réparties sur la presque totalité du Nord Algérien. **(Fekraoui et *al*, 1999),** Plus de 282 sources thermales ont été inventoriées par l'Agence Nationale des Ressources Hydrauliques (ANRH), Elles sont réparties sur 24 wilayas avec une plus forte concentration au Nord – Est du pays, Ces sources thermales sont principalement exploitées en balnéothérapies.**(Ouali et *al*,2018).**

Les températures des eaux chaudes Algériennes varient de 22 à 98,8°C, les plus élevées enregistrées sont : 68,8°C pour la zone Ouest (Hammam Bouhnifia), 80,8°C pour la zone centrale (Hammam el Biban) et 98,8°C pour la zone Est (Hammam Meskhoutine) au nord de l'Algérie.**(Saibi, 2009).**

En plus des nombreuses sources thermales dans le nord du pays, il existe dans le sud algérien et plus exactement dans le Sahara septentrionale, une importante réserve en eau thermale qui est la nappe du continental intercalaire.**(Ouali et *al*, 2006).**

Tableau 1 : Caractéristique de quelques sources thermales du nord de l'Algérie **(Ouali et *al*,2006).**

Sources Thermales	Région	Faciès chimique	Résidus secs (mg/l)	Température (°C)	Débit (litre/second)
H. Chellala	Guelma	Sulfaté magnésium	1600	98	100
H. Bou hadjar	Ain T'émouchent	Chloruré sodique	3210	66,5	-
H. Bouhanifia	Mascara	Bicarbonaté sodique	1400	66	-
H. Bou Taleb	Sétif	Chlorure sodique	3416	52	-
H. Essalihin	Khenchela	Chlorure sodique	2082	70	-
H.Salhine	Skikda	Sulfaté magnésium	2046	55	-
H. Sidi Bou Abdellah	Gelizan	Chlorure sodique	1194	51	-
H. Delaa	M'sila	Sulfaté sodique	1980	42	-
H. Rabi	Saida	Chlorure sodique	1524	47	-
H.Sillal	Bejaia	Chlorure sodique	2221	46	-
H. Ben Haroun	Constantine	Chloruré sodique	3762	42	10

I.2 La Microbiologie des eaux thermale :

Les eaux minérales et thermales ne sont pas stériles, mais contiennent une flore microbienne indigène liée aux caractéristiques physiques et chimiques de ces biotopes.

Cette microflore peut être divisée en deux groupes sur une base métabolique :

Le premier groupe : les bactéries lithotrophes qui puisent leur énergie dans les substances inorganiques et jouent un rôle important dans le cycle des éléments comme le soufre et le fer.

Le deuxième groupe : les bactéries organotrophes essentiellement composées de bacilles Gram négatif. Ils n'ont pas d'importance sanitaire mais toute augmentation brutale de leur nombre peut indiquer une contamination de la ressource (**Capdepuy et Canellas,1995).**

I.3 Le Mode Des Extrémophiles :

Les Microorganismes nécessitant des environnements extrêmes pour leurs croissances sont appelés Extrémophiles, ce terme a été utilisé pour la premier fois par **Mac Elory** en 1974 **(Comes et steiner, 2004)**.

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et /ou une diminution de la biodiversité existante : PH inférieure à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPA, température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels supérieures à 3-4 en Nacl jusqu'à saturation (35% en Nacl) **(Gregorie et*al*, 2009)**.

Tableau 2: les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés **(Kristjansson et hreggevidsson, 1995)**.

Habitat	**Température (C°)**	**PH**	**Salinité (% W/V)**
Eau douce alcaline de sources chaudes.	> 60	>7	< 6
Champsacides solfatares.	> 60	< 3	< 6
Les boues anaérobies et le solgéothermiques.	> 60	5 à 7	< 6
Zones acides riches en soufre et pyrite.	< 50	< 3	< 6
Milieux alcalines carbonates.	< 50	> 8	< 6
Les lacs de soudes.	< 50	> 9	> 6
Les lacs hyper salins.	< 50	5 à 8	> 6

I.4 Les thermophiles :

Selon leur nom les thermophiles « therme : chaleur, philein : aimer » ce sont des micro-organismes qui aiment la chaleur.

Ils font partie des Extrémophiles ces derniers sont capable de se développer à des températures relativement élevées entre 45°C et 122°C (**Kambourova et *al*, 2012).**

Thomas D. Brock « Le Microbiologiste à l'origine de la découverte des micro-organisme thermophiles **»** à définit les thermophiles comme des êtres vivants dont la température optimale de croissance se situe au-dessus de 60°C.

Selon **Karlstetter** les organismes thermophiles tous les êtres vivants qui se développant à des températures supérieures à 45°C, cette dernière définition permettre de définit trois sous catégories au sein des thermophiles :

- Les thermophiles modérés avec une température optimale de croissance entre 55°C et 65°C.

- Les thermophiles extrêmes avec une température optimale de croissance entre 65°C et 80°C.
- Les hypers thermophiles avec une température optimale de croissance supérieur à 80°C.

Les thermophiles sont dans leur immense majorité aux deux domaines de procaryote : que sont les Bactéria et les Archaea, mais quelques eucaryotes thermophiles ont également été décrits

- Chez les eucaryotes, les températures maximales de croissance recensées à ce jour se situent aux alentours de 50°C chez les plantes et les animaux, de 60°C chez les champignons microscopiques et de 70°C chez les protozoaires.
- Chez les procaryotes, l'on compte un grand nombre d'hyper thermophiles dont beaucoup sont affiliés aux archées.

Le micro-organisme le plus hyper thermophile connu à ce jour est l'archer *pyrolobusfumarii* capable de se diviser à la température maximale de 113°C et incapable de se développer en dessous de 90°C. **(Alain et *al*,2010).**

I.5 La niche écologique des thermophiles :

I.5.1 Le biotope naturel :

Les environnements naturellement chauffés sont variés entre les sources hydrothermales terrestres, les sites volcaniques terrestres, les systèmes hydro thermiques sous-marins, les sites souterrains, tels que les réserves de pétrole **(Oshima et Moriya 2008).**

I.5.1.1 Biotopes marins :

L'eau de mer s'infiltre dans les fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique (ou roches profondes du manteau ou ultramaphiques) en fusion, pouvant atteindre des températures très élevées (jusqu' à 400°C) puis, par d'autres fissures, remonte en surface. Ce fluide hydrothermal est riche en composés réduits tels que H2S, CH4, NH4+ ainsi qu'en éléments métaboliques tels que Mn^{2+}, Fe^{2+}, Li^{+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}. Le mélange de ce fluide avec l'eau de mer froide (2°C) provoque la précipitation d divers sulfures métalliques et de sulfate de calcium anhydre, origine des « fumeur » et « diffuseurs », qui constituent progressivement les cheminées hydrothermales. C'est dans cette zone de mélange turbulent, entre le fluide hydrothermal toxique surchauffé et l'eau de mer oxygénée et froide, que se développe la vie hydrothermale **(Minic et *al*, 2006)**.

I.5.1.2 Biotopes terrestres :

Les zones géothermiques terrestres peuvent généralement être divisée en deux classer en fonction de la source de chaleur :

Le premier type est le champ à haute température situé dans les zones volcaniques actives et possèdent une chambre magmatique à une profondeur de 205 Km comme source de chaleur.

Le deuxième type est le champ à basse température situé en dehors de la zone d'activité volcanique et chauffé par des coulées de lave profondes ou par du magma mort **(Canganella,2012**).

I.5.2 Biotopes artificiels :

Les thermophiles habitent également dans les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puit et forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs **(Ferrera et Reysenbach, 2007).**

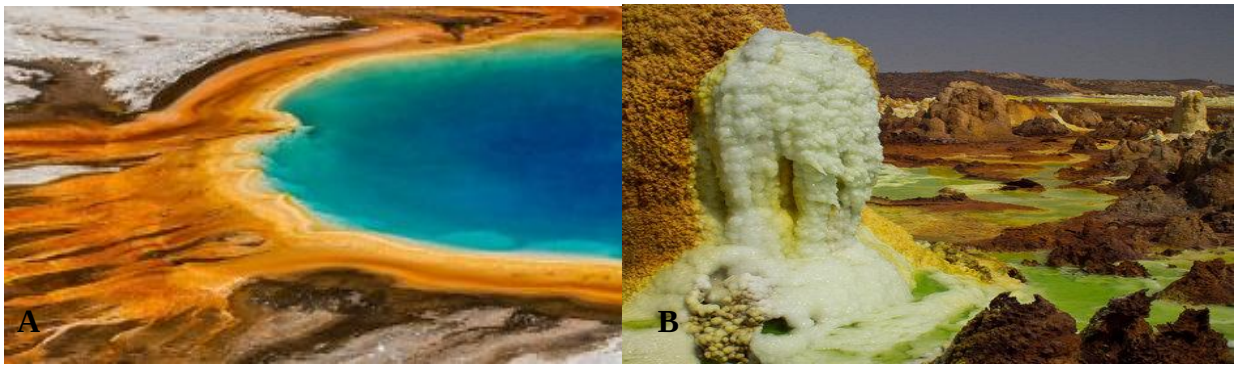


Figure. 2 Exemples de biotopes naturels chauds. A. Octopus Spring, parc national de Yellowstone, **B.** Volcan de Dallol (Ethiopie) **(Bouacem, 2016).**

I.6 Adaptations moléculaires à la thermophilie :

La vie à haute température est rendue possible par un certain nombre de mécanismes adaptatifs et /ou de molécules que l'on retrouve uniquement chez les (hyper)thermophiles.

I.6.1 Les protéines :

Les protéines des thermophiles et hyper thermophiles sont plus thermostables que celles de leurs homologues mésophiles et fonctionnent de manière optimale à haute température.

Néanmoins, il n'existe aucune règle générale permettant d'expliquer cette thermostablité intrinsèque des protéines en générales et des enzymes en particulier est le plus souvent due à des modifications mineures de la séquence en acides aminés favorisant le repliement de la protéine sous une forme compacte avec un nombre réduit de cavités

internes, un nombre élevé de ponts ioniques contribuant à maintenir l'ensemble et à résister à la dénaturation**. (Alain et *al,* 2010).**

I.6.2 Les membranes cytoplasmiques :

Les membranes cytoplasmiques des microorganismes thermophiles possèdent une structure particulière leur permettant de rester stables et fonctionnelles aux températures élevées. Celles les bactéries (hyper)thermophiles sont composées d'une bicouche lipidique formée d'acides gras liés à un glycérol par une liaison ester et sont exceptionnellement riches en acides gras saturés. Cette richesse en acide gras saturés permet d'augmenter la température de fusion de la membrane tout en maintenant une stabilité et une fluidité optimales dans des conditions de thermophilie **(Alaine et *al*,2010).**

Les membranes des archées (hyper)thermophiles sont, quant à elles composées d'une monocouche lipidique de longues chaines d'alcools isopréniques attachés au glycérol par des liaisons éther.

Cette structure en monocouche est incontestablement plus thermo stable que les structures en bicouche des bactéries **(Ferrera et Reysenbach,2007).**

I.6.3 ADN gyrase reverse :

Les thermophiles possèdent une enzyme appelée le gyrase inverse responsable de la stabilisation d'ADN et empêchent la dénaturation des doubles brins d'ADN aux température élevée **(Holden, 2009)**.

I.7 Les avantages des thermophiles :

Les microorganismes thermophiles ont suscité un grand intérêt dans le domaine de la biotechnologie, Parmi les avantages de l'utilisation des microorganismes thermophiles dans les applications biotechnologiques, on énumère certains come suite :

- Une activité métabolique élevée entraine une augmentation des taux de formation de produit.
- Inactivation ou élimination des microorganismes / pathogènes mésophiles.
- Production de macromolécules et métabolites thermostables.
- Les réactions métaboliques se produisent à la même température élevée que les substrats solubilisent.
- Aucune étape de refroidissement requise après les étapes de chauffage.
- Augmentation des taux de diffusion, ionisation et solubilité des produits chimiques.
- Une densité, une tension de surface et une viscosité plus faible des solutions améliorent les vitesses de réaction.

- Récupération directe des produits volatils.
- Une faible formation de masse bactérienne donne de ratios plus élèves de produit souhaité sur un substrat assimilé et une production de déchets inférieures.
- Les thermophiles peuvent être utilisés directement ou indirectement dans la production d'énergie renouvelable.
- Les thermophiles produisent également d'importante enzymes industriels. (**Urbieta et *al*,2015).**

Partie 2 : Les Thermoenzymes

II.1 Les enzymes :

Les enzymes également connues sous le nom de biocatalyseurs sont une sorte de protéines qui ont un degré élevé de spécificité et d'efficacité catalytique dans les cellules vivantes **(Tan et *al*, 2019)**, le mot « enzyme » a été utilisé pour la premier fois par le physiologiste allemand Wilhelm Kuhne en 1878, lorsqu'il décrivait la capacité de la levure à produire de l'alcool à partir de sucre, il est dérivé des mots grec ; En signifiant « à l'intérieur » et Zume signifiant « levure » **(Robinson, 2015).**

Après des millions d'années d'évolution, ces macromachines sont capables de réaliser des tâches biochimiques très précises. Certaines enzymes ont été conçues par la nature pour fabriquer des composés chimiques, tandis que d'autre jouent un rôle dans la décomposition ou la modification de tels composés. **(Charnock et McCleary, 2005).**

II.1.1 Classification

En tant que type de biocatalyseurs très important, les enzymes jouent un rôle majeur dans le maintien des activités vitales des organismes elles dominent le métabolisme, la nutrition, la conversion énergétique et de nombreuses autres réactions chimiques.

Selon la propriété des réactions catalysées par les enzymes, le système de numérotation de la commission des enzymes (**E.C.**) a divisé les enzymes en 6 classes en 1961 ;

- Les oxydoréductases.
- Les transférases.
- Les hydrolases.
- Les lyases.
- Les isomérases.
- Les ligases.

Tableau 3 : Les principales classes d'enzymes dans le système EC. **(Robinson, 2015)**

Premier chiffre E.C	Classe d'enzymes	Type de réaction
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse de différentes liaisons chimiques
E.C.4	Lyases	Elimination des groupements
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

Ces six catégories n'ont pas changé pendant de nombreuses années, jusqu'à ce qu'une nouvelle classe « Les translocases » soit ajoutée en Aout 2018 **(Tao et *al*, 2020).**

II.2 Les thermo enzymes :

II.2.1 Définition :

Une enzyme ou une protéine est dite thermostable lorsqu'une température de dépliement élevée défini (Tm), ou une longue demi-vie à une température élevée sélectionnée est observé **(Turner et *al*, 2007),** la production de ces enzymes est la réponse d'un microorganisme a des conditions environnementales a haut température **(Suarez et *al*, 2002).** Elles peuvent être produites soit par fermentation optimisée des thermophiles, soit par clonage des mésophiles à croissance rapide, par la technologie de l'ADN recombinant **(Haki et Rakshit., 2003).**

Les enzymes hyperthermophiles ont développé des propriétés structure-fonction uniques de thermostabilité élevée et d'activité optimale à des températures supérieures à 70°c, certaines de ces enzymes sont active à des températures aussi élevées que 110°c et plus. Les organismes thermophiles se développent de manière optimale entre 50 et 80°c, leurs enzymes présentent des propriétés de thermostabilité qui se situent entre celles des enzymes hyperthermophiles et mésophiles et sont généralement actives de manière optimale entre 60 et 80°c **(Vieille et zeikus, 2001).**

En général les enzymes se dénaturent et perdent leurs activités à des températures supérieures à 50-60c°, contrairement aux enzymes thermostables qui ont l'avantage d'avoir une vitesse de réaction plus élevée, d'un rendement de procédé élevé, d'une viscosité plus faible, et de moins de problème de contamination **(Parakash et jaiswal, 2010).** A ce jour un grand nombre d'enzymes telles que les cellulases, les amylases, les pullulanases, les xylanases, les mannanases, les pectinases, les chitinases, les protéases, les lipases, les estérases, et les phytases ont été caractérisés à partir des microorganismes extrêmement thermophiles et hyperthermophiles **(Gomes et Steiner, 2004 ; Dumorné et *al*, 2017),** des études de la biodiversité dans les sources chaudes ont marqué la présence de communauté complexe contenant de nouveaux microorganismes qui peuvent être des sources potentielles de nouvelles enzymes **(López-López et *al*, 2013).**

II.2.1.1 Les Protéases :

Les protéases (peptidases ou enzymes protéolytiques) constituent un grand groupe d'enzymes qui hydrolysent les protéines en peptides court ou en acides aminés libres, Selon leurs sites d'action ces enzymes sont subdivisées en deux grands groupes, les exopeptidases et les endopeptidases.

En général les protéases microbiennes sont de nature extracellulaire et sont directement sécrétées dans le bouillon de fermentation par le producteur **(Souza et al, 2015).**

Les protéases présentent près de 65% du marché mondial des enzymes avec un large éventail d'application, en particulier dans les industries alimentaires, détergentes, textiles, du cuir, pharmaceutiques et chimiques **(Guangrong et *al*, 2008).**

Une nouvelle sérine alcaline protéase extracellulaire, la subtilisine appelée (SAPN) a été purifiée et caractérisée à partir du *Melghiribacillus thermohalophilus Nari2AT*, avec une activité optimale à 75°c et à pH 10, L'enzyme est utilisée pour la production des hydrolysats bioactifs déprotéinisés **(Mechri et *al*, 2019).**

II.2.1.2 Les Cellulases :

La cellulose est le biopolymere le plus abondant sur terre, avec environ 100 à 1000 milliard de tonne produite naturellement sous forme de biomasse végétale chaque année **(Zarafeta et *al*, 2016)**, La dégradation de la cellulose se fait à des températures élevées et a des pH alcalins ce qui rend les cellulases thermostables les bons candidats pour la catalyse de cette réaction **(Haki et Rakshit, 2003)**. La classification classique de ces enzymes est basée sur le mécanisme d'action de leurs domaines catalytiques et sur leur spécificité de substrat **(Escuder-Rodríguez et *al*, 2018).**

Plusieurs enzymes cellulolytiques hyperthermostables ont été isolées à partir de diverses bactéries thermophiles notamment les souches anaérobies *Thermotoga, Anaerocellum thermophilum*, et *Rhodothermus*, Des cellulases ascomycètes thermostables ont été caractérisées, ces enzymes sont stables et actives à des températures supérieures aux températures optimales pour la croissance du microorganisme (**Viikari et *al*, 2007).**

Les cellulases font partie des enzymes industrielles les plus importantes connues à ce jour, elles convertissent la cellulose en sucres qui conviennent à la consommation humaine, à grande échelle, ces sucres peuvent à leur tour être fermentés pour générer du bioéthanol et des produits biosourcés. Elles trouvent également une application dans l'industrie textile, de la lessive, des détergents et agroalimentaire et dans le recyclage du papier **(Rigoldi et *al*, 2018 ; Acharya et chaudhary, 2012).**

II.2.1.3 Les xylanases :

Le xylane est le deuxiéme polysaccharide le plus abondant dans la nature, et représente environ un tiers des sources de carbone organique sur terre, présent à la fois dans les bois durs et les plantes annuelles (**Chakdar et *al*,2016).**

Les xylanases jouent un rôle clé dans la dépolymérisation enzymatique de l'hémicellulose dont le xylane est le constituant majeur pour donner des sucres monomères. Récemment, les xylanases reçoivent une attention croissante pour la production de sucre à partir de la biomasse lignocellulosique **(Rigoldi et *al*, 2018).** Il est rapporté que la température optimale pour les activés de xylanases est de 50 à 60 °C avec une demi-vie d'environ 1h à 55°C **(Georis et *al*, 2000).**

Différents types de microorganismes produisent des xylanases, notamment les champignons thermophiles/thermotolérants, des levures et des bactéries thermophiles/extrêmophiles **(Ajeje et *al*, 2021).**

Les xylanases thermostables obtenues à partir des microorganismes thermophiles sont plus avantageuses par rapport à celles obtenues à partir des mésophiles pour les bioprocédés industriels y compris dans l'industrie du papier, les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, l'alimentation, etc. **(Bibra et *al*, 2018).**

Une nouvelle xylanase GH10 thermostable, appelée XynDZ5 a été découverte dans une culture d'enrichissement d'une source thermale islandaise d'une espèce de *Thermoanaerobacterium*, les résultats suggèrent que l'enzyme représente un nouveau candidat biocatalyseur approprié pour plusieurs application biotechnologiques à haute température de pulpe, de papier, de la boulangerie, de l'alimentation animale et des biocarburants **(Zarafeta et *al*, 2020).**

II.2.1.4 Enzymes utilisées en biologie moléculaire :

Les ADN polymérases sont des moteurs moléculaires qui dirigent la synthèse de l'ADN à partir des nucléotides, selon des homologies de séquence primaire et des analyses de structure, ces enzymes sont classées en six familles ; A, B, C, D, X, et Y **(Rothwell et Waksman, 2005).**

Les ADN polymérases thermostables jouent un rôle fondamental dans les techniques d'ingénierie du vivant grâce à leur aptitude à amplifier un gène donné à des millions de copies au moyen de la réaction de PCR **(Quérellou et Guèzennec, 2010)**. La clé principale pour cette réaction est la Taq polymérase isolée en 1969 à partir d'une bactérie thermophile par le microbiologiste américain Thomas Brock, cette enzyme est capable de supporter les nombreux cycles de montée en température atteignant 94°c **(Gregorie et *al*, 2009).**

II.2.1.5 Les lipases :

Les lipases hydrolysent les triglycérides à longue chaine pour former des diglycérides, des monoglycérides, des acides gras, et du glycérol **(Rigoldi et *al,* 2018).** L'activité hydrolytique de ces enzymes est significativement augmentée par la présence d'une interface lipide-eau, c'est ce qu'on appelle l'activation interfaciale **(Cho etKim, 2000).**

La plupart des lipases qui sont dérivées de microorganismes mésophiles, peuvent agir dans une large gamme de pH mais sont pour la majorité instable à des températures supérieures à 70°c **(Royter et *al,* 2009)**.

Plusieurs lipases thermostables ont été caractérisées à ce jour, provenant à la fois de bacteria et d'archeae, ces derniers comprenant les enzymes les plus thermostables et la plupart des lipases thermostables bactériennes ont été isolées à partir de souches de Bacillus avec des températures optimales entre 50 et 70°c **(Castilla et *al,* 2017)**.

Les lipases sont l'une des enzymes les plus importantes dans le domaine de la biotechnologie, elles sont utilisées dans plusieurs secteurs industriels comme les détergents, les aliments, la pharmacie et la production de biodiesel **(Ovando-Chacon et *al,* 2020).**

II.2.1.6 Les Amylases *:*

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon en monomère de glucose, et sont l'une des enzymes les plus intéressantes pour les procédés industriels **(Dalmaso et *al,* 2015).** Le polymère d'amidon nécessite une combinaison d'enzymes pour son hydrolyse complète, celles-ci comprennent de l'α-amylase, gluco-amylases ou β-amylases et des isoamylases ou des pullulanases **(Haki et Rakshit, 2003).**

Ces enzymes sont très importantes dans de nombreux domaines, tels que la chimie clinique, médicale et analytique, ainsi que dans les industries de textile, de l'alimentation, de la fermentation, du papier, … **(Fossi et al, 2014).**

Une amylase thermostable peut réduire le risque de contamination, le coût du refroidissement externe et augmenter le taux de diffusion **(Zhang et *al,* 2018).** Les α-amylases thermostables ont été isolées à partir de diverses sources, y compris les plantes, les animaux, et les microbes **(Parakash et Jaiswal, 2010).**

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie actuelle. L'une des applications les plus répandues de ces enzymes est dans l'industrie de l'amidon qui implique le processus de gélatinisation, de liquéfaction et de saccharification qui sont effectués à haut température, de textile, des aliments, de boulangerie, de brassage et de distillation **(Ardhi et *al,* 2020 ; Gupta et *al,* 2003).**

II.2.1.7 Les pectinases :

Les pectinases sont un groupe d'enzymes qui hydrolysent la dégradation des substances pectiques par des réactions de dépolymérisation et de désestérification **(Gomes et *al*, 2016)**, elles sont généralement classées en trois types selon leur mode d'action : la pectine Estérase, les Hydrolases et les Lyases **(Garg et *al*, 2016)**.

Elles sont produites par de nombreux microorganismes tels que les bactéries, les levures, ainsi que certains actinomycètes, la production microbiennes de ces enzymes a été largement, la majorité provient principalement d'une source fongique dont les espèces Aspergillus prédominent **(Khatri et *al*, 2015)**.

La pectinases est l'une des enzymes industrielles les plus importantes, elle peut être utilisée dans l'extraction des jus de fruits, la transformation des textiles, la fabrication du papier et des produits pharmaceutiques, l'alimentation humaine et animale, et dans le traitement des eaux usées industrielles **(Adedayo et *al*, 2021 ; Rehman et *al*, 2021).**

II.2.1.8 Les chitinases :

La chitine, un polymère β-1,4 de N-acétyle-D-glucosamine (GlcNAc), qui est largement distribué parmi les champignons, les crustacés, les mollusques, les protozoaires et les algues vertes, est le deuxième biopolymère le plus abondant trouvé dans la nature après la cellulose. Plusieurs millions de tonnes de chitine sont synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère **(Aliabadi et *al*, 2016)**.

Les chitinases (EC 3.2.1.14) sont des enzymes qui ont la capacité de dégrader la chitine en chitooligomère de faible poids moléculaires, présent dans plusieurs organismes tels que les bactéries, les champignons b, les levures, les plantes, les actinomycètes et les humains **(Hamid et *al*, 2013)**. Ces enzymes fonctionnent de manière optimale dans des conditions spécifiques, telles que la température, le PH, la concentration du substrat et la présence d'inhibiteur et d'activateur, ces aspects affectent la formation tridimensionnelle et le repliement polypeptidique de l'enzyme **(Jayanthi et *al*, 2019).**

Les chitinases ont reçu une attention croissante en raison de leurs vastes applications dans les domaines de la médecine, de l'agriculture, de la biotechnologie, de la gestion des déchets et des applications industrielles, notamment l'activité antifongiques, hypocholéstérolémique, antihypertensives et des améliorateurs de qualité alimentaire **(Zarie et *al*, 2010)**.

II.2.2 Avantages des thermoenzymes :

La plupart des procédés industriels sont réalisés à haute température où les biocatalyseurs d'origine mésophiles subissent une dénaturation et donc ne sont pas adaptés à la biocatalyse **(Sharma et *al*, 2013).**

Une attention particulière pour les enzymes provenant de microorganismes thermophiles à fait l'objet de plusieurs études **(Benkahoul et *al*, 2017),** les raisons fondamentales pour choisir ces enzymes sont bien sûr la thermostabilité intrinsèque, qui implique des possibilités de stockage prolongé (à température ambiante), une tolérance accrue aux solvants organiques, un risque réduit de contamination ainsi que de faible perte d'activité pendant le traitement (en restant en dessous de la Tm de l'enzyme) **(Turner et *al*, 2007)**.

Ces propriétés permettent leur utilisation dans des conditions parfois extrêmes (P. ex. pH très élevé où très faible, température élevée) où leurs équivalentes mésophiles seraient moins performantes. Parmi les principaux facteurs qui contribuent à la stabilité des enzymes thermophiles :

L'augmentation du pairage ionique, diminution du ratio surface/volume, l'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes, une diminution des contraintes conformationnelles et une stabilité des boucles, tous ces éléments sont intimement reliés par un dernier facteur très important : la composition et le changement au niveau d'acides aminés spécifiques **(Hupé, 2008)**.

Les écosystèmes hydrothermaux profonds constituent à l'évidence de nouvelles sources de micro-organismes d'intérêt biotechnologique et en particulier de micro-organismes producteurs de métabolites secondaires innovants, dont les polyesters et les exo polysaccharides. **(Cornec et *al*, 1997)**. Des efforts supplémentaires sont nécessaires pour accroître la mise en œuvre d'enzymes thermophiles et hyperthermophiles dans les industries, et pour rechercher de nouvelles enzymes provenant des différentes sources et créer de nouvelles méthodes pour exploiter ces enzymes pour plus d'applications industrielles **(EIbrahim et Ma, 2017).**

Partie 3 : Activité Antimicrobienne et Biofilm

III.1 Agent antimicrobien :

L'agent antimicrobien est un terme qui concerne principalement les antibiotiques, les antibactériens, les antifongiques, les antiviraux et les antiprotozoires, Ils peuvent être des médicaments, des produits chimiques, ou d'autre substances capables d'agir selon deux modes, soit tuer (microbicide), soit ralentir la croissance des microbes (microbiostatique) ***(Asif, 2017)*.**

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 **(Saga et Yamaguchi, 2009)**.

L'augmentation rapide des agents pathogènes multirésistants aux médicaments nécessite également l'attention du monde entier pour le développement de nouveaux antimicrobiens, de nouvelles options de traitement et de thérapie antimicrobienne alternatives **(Begani et *al*, 2019)**. Un examen commandé par le gouvernement britannique, a fait valoir que la résistance aux antimicrobiens pourrait tuer 10 millions de personnes par an d'ici 2050 **(Murray et *al*, 2022).**

La compétition pour les nutriments et l'espace dans un habitat donné conduit les organismes à développer leurs propres stratégies de survie et de croissance, dont l'une est la sécrétion de substances antimicrobiennes entraînant la mort ou l'altération de la croissance des organismes concurrents, ces substances possèdent une valeur clinique et industrielle prometteuse **(Alkhalili et *al*, 2016).**

III.2 Biofilms bactériens :

III.2.1 Définition :

Les Biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique **(Tremblay et *al*, 2014)**, cette matrice est constituée de protéines, de polysaccharide, ainsi que d'acide nucléique **(Vestby et *al*, 2020)**, le polysaccharide bactérien est le composant majeur de la

matrice du biofilm **(Liaqat et *al*,2019)**. Ils sont cliniquement pertinents, car ils sont responsables de jusqu'à deux tiers des infections nosocomiales et contribuent aux infections chroniques **(Haney et *al*, 2018)**. On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme de biofilms **(Richards et Melander, 2009).**

Les biofilms retrouvés dans les environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes, aux réponses immunitaires de l'hôte, ainsi qu'aux biocides, et sont beaucoup moins sensible aux antibiotiques et plus résistants aux agents antimicrobiens **(Costerton et *al*, 1999).**

III.2.2 Les étapes de formation de biofilm *:*

La formation de biofilm est généralement produisant en quatre étapes principales :

1- L'adhésion des cellules planctoniques.
2- La formation de microcolonies.
3- La maturation de biofilm.
4- Le détachement (également appelé dispersion) des bactéries qui peuvent ensuite coloniser de nouvelles zones **(Crouzet et *al*, 2014)**.

Ces quatre stades de développement indiquent des épisodes significatifs dans la formation du biofilm bactérien **(Stoodley et *al*, 2002).**

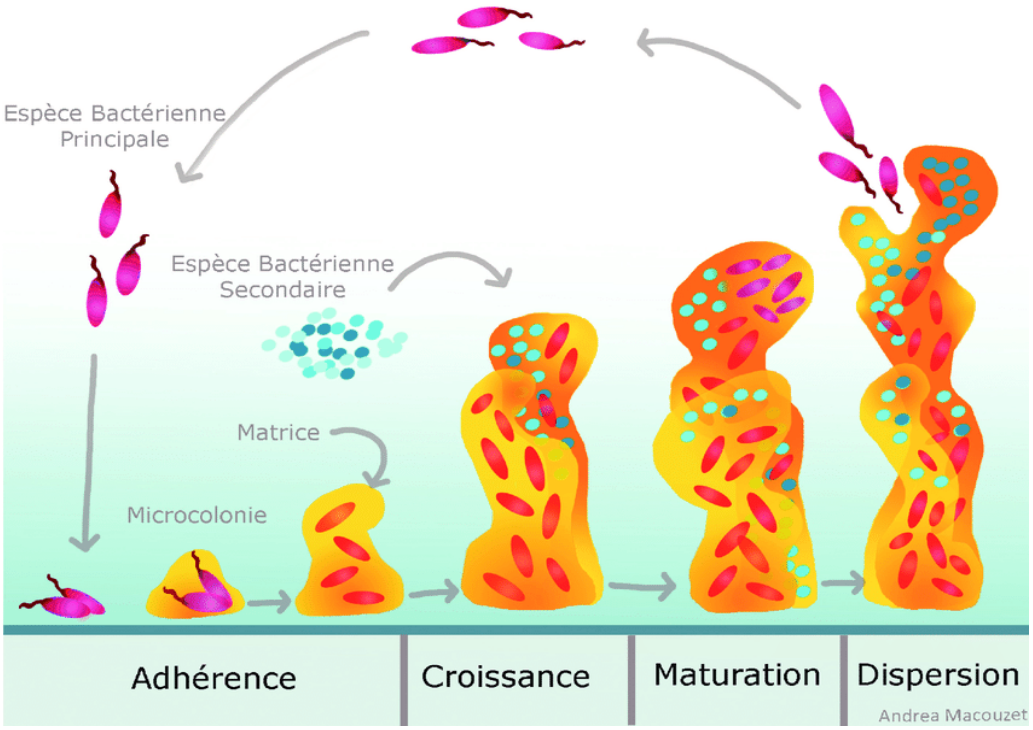


Figure. 3 lesEtapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien **(Tremblay et *al*, 2014)**.

Partie 4 : Optimisation et Modélisation

IV.I Plan d'expérience :

IV.I.1 Introduction :

La notion de modèle en mathématiques se présente sous un double aspect : d'une part, les mathématiques permettent de modéliser, c'est-à-dire de représenter, toutes sortes de situations, d'objets et de structures du monde réel, l'étude mathématique ou les simulations informatiques de ces représentations nous informant lorsque les représentations sont bonnes sur le monde réel d'autre part, une notion précise et formelle de modèle est définie et étudiée en logique mathématique par la théorie des modèles, ce qui établit un lien précis entre objets syntaxiques (les formules) et structures mathématiques, puis produit sous la forme de théorèmes toutes sortes d'informations sur la nature de ce lien, le tout constituant une théorie abstraite de l'activité de modélisation au sens précédent **(Hentabli et Sam, 2021).**

IV.I.2 Généralité sur le plan d'expérience :

IV.I.2.1 Définition :

La méthode des plans d'expériences (DOE) cherche à déterminer une relation entre 2 types de grandeurs :

- La réponse, qui correspond à la grandeur physique étudiée.
- Les facteurs, qui correspondent aux grandeurs physiques modifiables par, l'expérimentateur et sensées influer sur les variations de la réponse.

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée y, porte le nom de réponse, les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées facteurs *x*, on parle donc des facteurs qui influent sur une réponse, les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences.

IV.I.2.2 Objectif de plan d'expérience :

Ceci est une question courante dans les entreprises. En recherche et développement, souvent la moitié des ressources est utilisée pour résoudre des problèmes d'optimisation. Avec l'augmentation rapide du coût des expériences, il est essentiel que l'optimisation puisse être faite avec le moins possible d'expériences. Ceci est une des raisons importantes pour lesquelles il faut utiliser les plans d'expériences.

Des exemples typiques :

- Le développement de nouveaux produits et procédés.
- L'optimisation de la qualité et de la performance d'un produit existant.

- L'optimisation de procédés industriels dans les domaines suivants (chimie, polymères, matériaux, médicaments et produits pharmaceutiques, aliments et boissons, cosmétique, peintures).

IV.I.3 Espace expérimental :

Pour présenter l'espace expérimental nous utiliserons un espace à deux dimensions, ce qui facilitera les représentations graphiques. Il est ensuite facile d'étendre les notions introduites à des espaces multidimensionnels. Un facteur continu peut être représenté par un axe gradué et orienté. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental (figure 4).

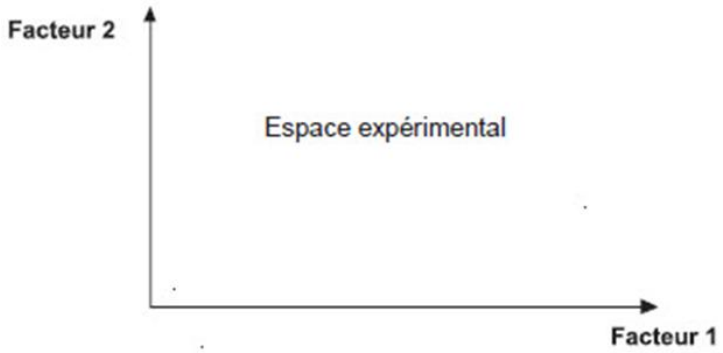


Figure4.L'espace expérimental de l'étude de deux facteurs pour un plan à deux dimensions.

IV.I.4 Domaine d'un facteur :

La valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience est appelée niveauLorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut (figure 5).

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur. Les variables centrées réduites idéique zéro [-1 0 1].

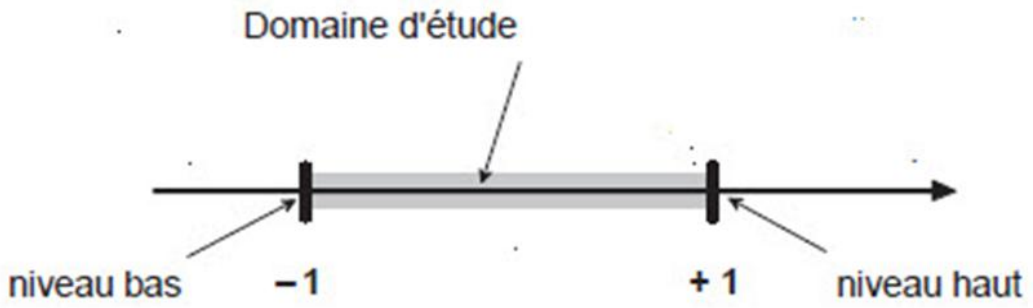


Figure5. Le domaine de variation des facteurs**.**

IV.I.5 Domaine d'étude :

Dans la pratique, l'expérimentateur sélectionne une partie de l'espace expérimental pour réaliser son étude. Cette zone particulière de l'espace expérimental est le domaine d'étude (figure 6). Ce domaine est défini par les niveaux hauts et les niveaux bas de tous les facteurs et éventuellement par des contraintes entre les facteurs, **(Goupy & Creighton, 2006).**

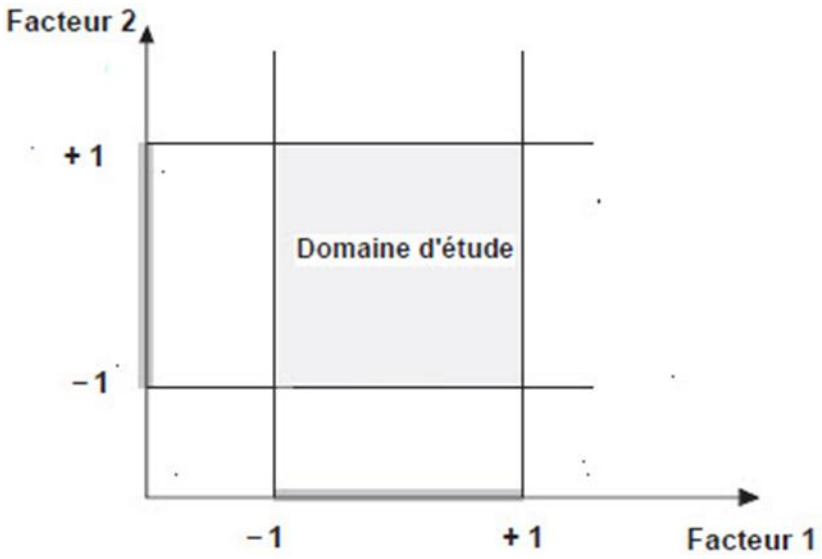


Figure 6. Le domaine d'étude est défini par la réunion des domaines des différents facteurs sans contraintes.

Il peut y avoir des contraintes sur le domaine d'étude La figure (7) illustre une réduction possible du domaine d'étude initial. Une zone du domaine d'étude initial échappe aux expériences.

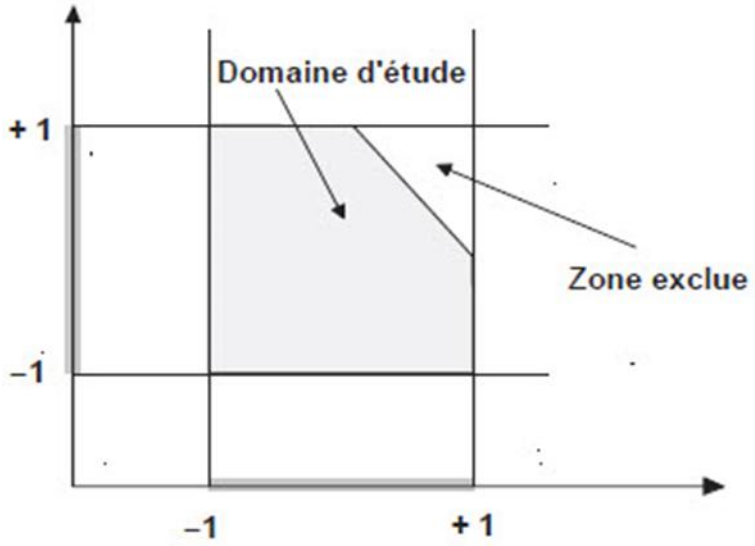


Figure7. Le domaine d'étude sous contraintes est représenté par la partie grisée.

IV.I.5.1 Méthodologie des plans sans contraintes :

Le choix du nombre et de l'emplacement des points d'expériences est le problème fondamental des plans d'expériences. On cherche à réaliser le minimum d'expériences tout en réduisant l'influence de l'erreur expérimentale sur les modélisations mathématiques qui serviront à prendre des décisions. On atteint ce but en considérant les propriétés mathématiques et statistiques qui relient la réponse aux facteurs. Lorsqu'il n'y a pas de contraintes sur le domaine d'étude, il existe des plans classiques qui possèdent d'excellentes qualités statistiques et qui permettent de modéliser les réponses dans les meilleures conditions (figure 8).

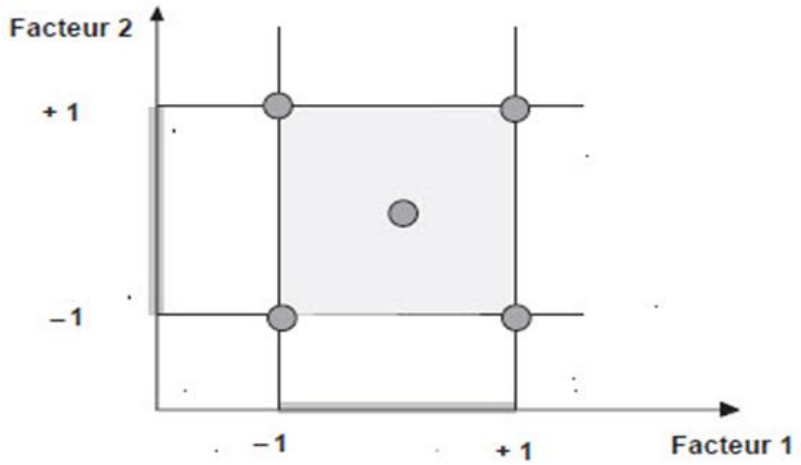


Figure8. Exemple de disposition des points expérimentaux dans un domaine sans contraintes.

IV.I.5.2 Surfaces de réponse :

À chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse (figure 9), **(Goupy & Creighton, 2006).**

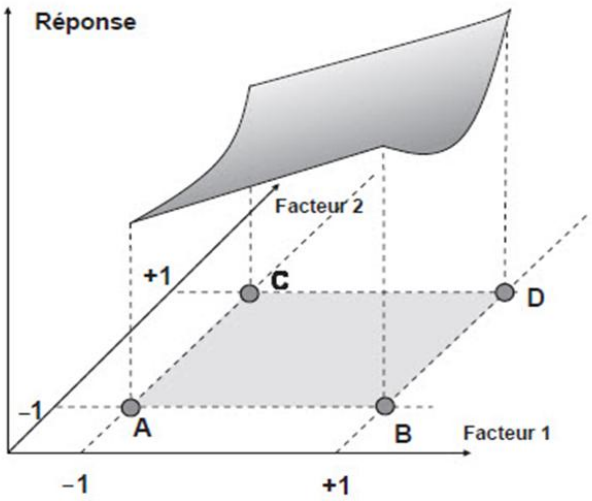


Figure 9. L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse.

IV.I.6 Les méthodes des plans d'expériences :

Les méthodes de plans d'expérience sont utilisées pour trois types d'investigations :

- **Les plans de criblage ou screening** sont utilisés au début d'une investigation. Ici, l'objectif premier est de réduire l'ensemble initial des facteurs qui peuvent affecter le résultat à un petit ensemble de facteurs qui ensemble influencent le plus le résultat.
- **Les plans en surface deréponse (MSR)** sont utilisés ensuite dans l'investigation pour l'optimisation finale, et lorsque l'on veut développer un modèle reliant les facteurs dominants aux réponses permettant de quantifier les résultats (performance, rendement, qualité).
- **Les plans spéciaux** sont nécessaires pour les mélanges. Ce type de problème est courant en chimie, dans les industries alimentaires, en cosmétique et en pharmacie. Ils sont nécessaires car les facteurs sont exprimés en pourcentages dont la somme fait 100%. Cela introduit une contrainte sur le plan et cela doit être résolu par des outils et des modèles spéciaux.

La construction d'un plan d'expériences consiste à extraire du domaine expérimental, un nombre suffisant N de combinaisons particulières afin d'estimer, avec une incertitude à la fois minimale mais aussi homogène, les p inconnues du modèle (additif ou polynomial)

tout en respectant au mieux les contraintes techniques et économiques de l'étude, **(Rabier, 2007)**.

IV.I.7 Les types de plans d'expériences :

Nous allons maintenant appliquer les notions et les propriétés que nous venons de décrire aux plans d'expériences les plus classiques. Il y a les plans suivants :

- Plans factoriels complets.
- Plans factoriels fractionnaires.
- Plans à plusieurs niveaux.
- Plans pour surfaces de réponse.
- Plans de mélanges.

IV.I.7.1 Plans factoriels complets :

Une première catégorie de plans d'expériences est destinée à fournir une information la plus complète possible sur des systèmes présentant relativement peu de facteurs. Ces plans consistent à tester toutes les combinaisons possibles, en faisant varier tous les facteurs à tous leurs niveaux de manière exhaustive, d'où leur nom de plans factoriels complets ou plus simplement plans complets.

Pour ce faire, *Yates et Hunter* ont proposé une technique simple pour le cas où chaque facteur n'a que deux niveaux. Elle consiste à numéroter les facteurs et à faire varier successivement leurs niveaux de la façon suivante :

Au premier essai, tous les facteurs sont au niveau bas, on change le niveau du premier facteur à chaque essai..., celui du deuxième facteur tous les 2 essais ..., et plus généralement, celui duKème facteur tous les 2k-1 essais. La méthode peut s'adapter au cas où les facteurs ont plus de deux niveaux, **(Gendre et *al*, 2009).**

IV.I.7.2 Notion de modélisation mathématique :

On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. On prend un développement limité de la série de *Taylor-Mac Laurin*. Les dérivées sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \cdots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\,\ldots\ldots z} x_i x_j \ldots\ldots x_z$$

Avec

y : est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.

x_i : représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai.

Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).

a_0, a_i, a_{ij} , a_{III} : sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences, ce modèle est appelé modèle postulé ou modèle a priori, **(Goupy & Creighton, 2006).**

IV.I.7.3 Le modèle de l'expérimentateur :

Deux compléments doivent être apportés au modèle précédemment décrit. Le premier complément est le manque d'ajustement. Cette expression traduit le fait que le modèle a priori est fort probablement différent du modèle réel qui régit le phénomène étudié. Il y a un écart entre ces deux modèles. Cet écart est le manque d'ajustement (lack of fit en anglais).

Le second complément est la prise en compte de la nature aléatoire de la réponse. En effet, si l'on mesure plusieurs fois une réponse en un même point expérimental, on n'obtient pas exactement le même résultat. Les résultats sont dispersés. Les dispersions ainsi constatées sont appelées erreurs expérimentales. Ces deux écarts, manque d'ajustement et erreur expérimentale, sont souvent réunis dans un seul écart, notée e. Le modèle utilisé par l'expérimentateur s'écrit alors :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \cdots . + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\ \ldots\ldots z} x_i x_j \ \ldots \ldots x_z + e$$

IV.I.7.4 Analyse statistique :

Cette étape de l'analyse statistique aboutit à la construction du tableau d'analyse de régression et à la détermination de la qualité descriptive du modèle **(Eriksson et *al*, 2000).**

- Le Q2 estime la capacité de prédiction du modèle, à savoir, sa capacité à généraliser à de nouvelles données invisibles, Le Q2 est défini comme :

$$Q^2 = 1 + \frac{PRESS}{SS_{tot}}$$

$$\text{Où} \qquad SS_{tot} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2$$

SS_{tot} : C'est la somme totale des carrés (total sum of squares) des échantillons de formation autour de la moyenne (proportionnelle à la variance de la réponse).

$\bar{y}$: C'est la réponse moyenne.

$$\bar{y} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i$$

- Lorsque le modèle de régression est un modèle MLR, la « *PRESS* » est calculée comme dans généralisée croisée validation.

$$PRESS_{MLR} = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{y_i - \hat{y}_i}{1 - x_i\ (X'X)^{-1}x'_i}\right)^2$$

Lorsque le modèle est un modèle de régression PLS, la presse est calculée dans une croisée procédure de validation.

$$PRESS_{PLS} = \sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_I^{CV})^2$$

$\hat{y}_I^{CV}$: Est le prédites -out gauche réponse des valeurs de la validation croisée procédure.

- Les modèles de régression sont également validés par la R2, Le coefficient de détermination (aussi parfois appelé le coefficient de corrélation multiple). Le R2 désigne la fraction de la réponse qui est expliquée par le modèle et est défini comme

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{res}}{SS_{tot}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y})^{2'}}$$

- L'ajusté R2 est la fraction de la variance de la réponse expliquée par le modèle, mais ajusté pour tenir compte des degrés de liberté du modèle, c'est-à-dire

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{SS_{res}/DF_{res}}{SS_{tot}/DF_{tot}} = 1 - (1 - R^2)\frac{n-1}{DF_{res'}}$$

Où $DF_{tot} = n - 1$: est les degrés de liberté de la variance de la population de la variable dépendante.

DF_{res} : est les degrés de liberté de l'estimation de la variance de l'erreur de la population. Donc R^2_{adj} peut être négatif.

La valeur de $R^2_{adj} \leq R2 \leq 1$ n'augmente lorsque de nouvelles variables explicatives expliquent les données plus que ce qui peut être attribué au hasard, contrairement à la R2 ce qui augmente lorsque de nouvelles variables explicatives sont ajoutées au modèle.

Avec :

y_i La réponse mesurée au point i,

$\hat{y}$ La réponse calculée par le modèle au point ide tous les échantillons,

IV.I.8 Statistiques sommaires dans (Logiciel MODDE) :

Les statistiques sommaires sont présentés dans quatre paramètres (R2, Q2, validité du modèle, et reproductibilité) où 1, ou 100%, est parfait. R2 et Q2, les deux premières

colonnes, devrait être proche de la taille. La différence ne devrait pas être plus de 20% dans la plupart des situations, **(Umetrics, 2014).**

- **R^2 :** Montre l'ajustement du modèle, un modèle avec R^2 de 0,5 est un modèle avec assez faible importance.
- **Q2 :** Affiche une estimation de la précision de prévision de l'avenir. Q2 doit être supérieure à 0,1 pour un modèle important et supérieur à 0,5 pour un bon modèle. Q2 est le meilleur indicateur.
- **Validité du modèle :** Un test de problèmes modèles divers, une valeur inférieure à 0,25 pour modèle validité indique les problèmes modèles statistiquement significatifs, comme la présence de valeurs aberrantes, un incorrect modèle, ou un problème de transformation. Une faible valeur ici peut également indiquer qu'un terme, comme une interaction ou carrée est manquante. Lorsque l'erreur pure est très faible (réplique presque identique), la validité du modèle peut être faible, même si le modèle est bon et complet. Lorsque l'erreur pure est si faible que les répétitions sont considérées comme identiques par MODDE, la validité du modèle est étiquetée manquant car il ne peut être calculé. Validité du modèle pourrait être faible dans de très bons modèles (Q2> 0,9) en raison de la haute sensibilité du test ou extrêmement bonnes répliques.
- **Reproductibilité :** La variation des répliques par rapport à la variabilité globale, la reproductibilité doit être supérieure à 0,5. **(Eriksson et al, 2000).**

IV.II Machines à vecteur support :

IV.II.1 Introduction :

L'algorithme des machines à vecteurs de support a été développé dans les années 90 par Vapnik. Il a initialement été développé comme un algorithme de classification binaire supervisée. Il s'avère particulièrement efficace de par le fait qu'il peut traiter des problèmes mettant en jeu de grands nombres de descripteurs, qu'il assure une solution unique (pas de problèmes de minimum local comme les réseaux de neurones) et il a fourni de bons résultats sur des problèmes réels **(Li, 2006).**

L'algorithme sous sa forme initiale revient à chercher une frontière de décision linéaire entre deux classes, mais ce modèle peut considérablement être enrichi en se projetant dans un autre espace permettant d'augmenter la séparabilité des données. On peut alors appliquer le même algorithme dans ce nouvel espace, ce qui se traduit par une frontière de décision non linéaire dans l'espace initial. Nous reviendrons aux détails de cette méthode

dans le chapitre 3 puisque cette approche fait précisément l'objet du sujet **(Gherghout and Souici-Meslati, 2009; Mahé, 2003)**.

IV.II.2 SVM pour la régression :

Dans leur origine, les SVMs ont été développées pour des problèmes de classification. Cependant, leur nature leur permet de résoudre également des problèmes de régression. La régression est un cas particulier de classification où les classes des exemples ne sont pas dénombrables c-à-d. continues. Le problème consiste à trouver, en utilisant $= \{(x_1, y_1), \dots (x_n, y_n)\}$, une fonction $\hat{f}: \Re^m \rightarrow \Re$ qui rapproche le plus possible des y_i, en d'autres termes qui minimise la différence entre les $\hat{f}(x_i)$ et les y_i.

Souvent, $\hat{f}$ est considérée comme fonction linéaire : $\hat{f} = (w, x) + b$ où w est un vecteur et b est un scalaire. Le problème revient donc à trouver un hyperplan caractérisé par w^* et b^* qui minimise l'écart global entre $\hat{f}$ et les y_i (équation III.21).

$$(w^*, b^*) = argmin_{w,b} \sum_{i=1}^{n} (y_i - \langle w, x_i \rangle - b)^2$$

Pour résoudre ce problème, les SVMs utilisent une astuce semblable a celle utilisée en classification (Farag and Mohamed, 2004; Hamel, 2011). On propose de modéliser la fonction de régression par un hyperplan qui se situe au centre d'un hyper-tube de largeur 2ε contenant tous les exemples d'entrainement (figure III.6).

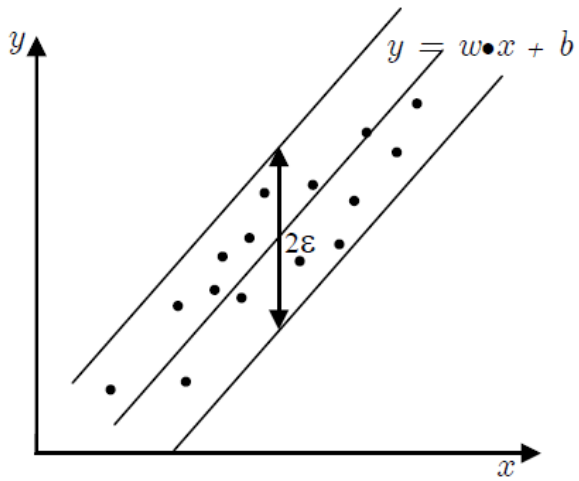


Figure10. Hyper-tube modélisant la fonction de régression.

Plusieurs hyper-tubes, de largeur 2ε contenant tous les exemples d'entrainement, peuvent exister. L'hyper-tube optimal est celui qui minimise la distance entre les exemples d'entrainement et ses frontières, autrement dit, qui maximise la distance des exemples de l'hyperplan du centre (figure 10).

La détermination de l'hyper-tube optimal est semblable à la détermination de l'hyperplan optimal de marge maximale dans le cas de classification. On doit donc

rechercher un hyper-tube de marge maximale avec tous les exemples d'entrainement à l'intérieur. Par une analyse similaire à celle du problème de classification, la solution du problème de régression est réduite à la résolution du problème dual d'optimisation quadratique de l'équation.

$$\begin{cases} Maximiser\ \alpha, \alpha' & -\frac{1}{2}\sum_{i,j=1}^{n}(\alpha_i - \alpha_i')(\alpha_j - \alpha_j')\langle x_i, x_j\rangle \\ & -\epsilon\sum_{i=1}^{n}(\alpha_i + \alpha_i') + \sum_{i=1}^{n} y_i(\alpha_i + \alpha_i') \\ & SousContraintes \\ & \sum_{i=1}^{n}(\alpha_i + \alpha_i') = 0 \\ & 0 \le \alpha_{i888888} + \alpha_i' \le C \end{cases}$$

Où les α_i et les α_i' sont les coefficients des exemples respectivement au dessus et au dessous de l'hyperplan et C est un paramètre pour leur pénalisation. La fonction de sortie $\hat{f}(x_i)$ peut être donnée par l'équation.

$$\hat{f}(x) = \sum_{i=1}^{n}(\alpha_i - \alpha_i')\langle x_i, x\rangle + b$$

Où b est calculé à partir d'un exemple dont $0 < \alpha_i < C$ (vecteur support) par l'équation.

$$b = y_i - \langle w, x_i\rangle + \epsilon$$

IV.II.3 Utilisation des noyaux :

Parmi les motivations les plus solides du développement des machines à vecteur support pour la régression, est leur extension simple aux cas non linéaires, grâce à l'utilisation des noyaux.

En effet, d'une manière similaire au cas de classification, on fait une transformation d'espace $\emptyset$ pour se trouver toujours face à une régression linéaire. La transformation d'espace inverse $\emptyset^{-1}$, permet de retourner à l'espace d'origine après la résolution dans le nouvel espace (figure11).

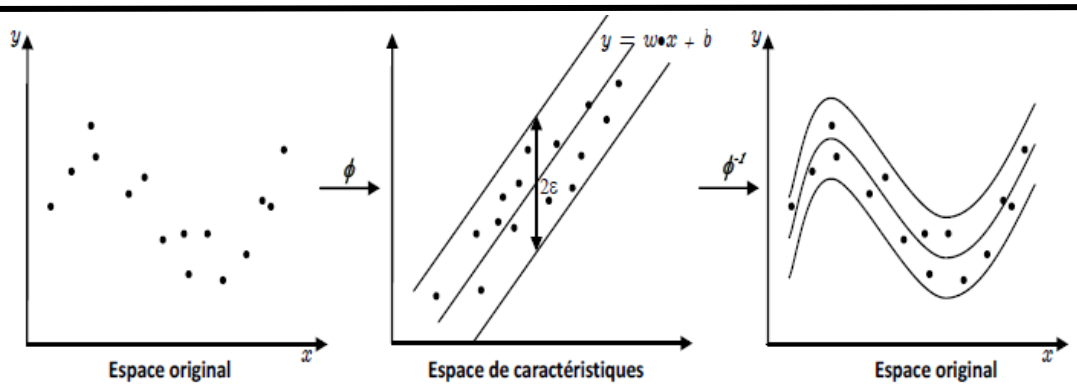


Figure11. Utilisation des noyaux pour la résolution de la régression non linéaire.

Comme dans le cas de classification, la transformation ∅ et son inverse sont réalisées grâce à une fonction réelle K(xi,xj) appelée Noyau (Kernel). Le produit scalaire dans les équations est remplacé par la fonction du noyau.

IV.II.4. Les noyaux :

Outre le passage au non linéaire, l'utilisation de noyaux permet une autre généralisation très utile dans la pratique : la définition des SVM sur des objets complexes comme des images, des graphes, des protéines où des automates pour ne citer qu'eux. Nous n'avons donc pas besoin de faire d'hypothèse sur la nature du domaine des observations X et un noyau k est défini de manière générale comme une fonction de deux variables sur $\Re$:

$$(x, x') \rightarrow \Re$$

Exemples de noyaux :

Les noyaux positifs se divisent en deux grandes familles principales : les noyaux radiaux qui dépendent d'une distance et les noyaux projectifs qui sont définis à partir d'un produit scalaire.

Tableau 4 : Exemples de noyaux .

Type	Nom	K(s,t)
Radial	Gaussien	$\exp\left(-\frac{r^2}{\sigma}\right), r = \|\|s-t\|\|$
	Laplacien	$\exp\left(-\frac{r}{\sigma}\right)$
	Rationnel	$1-\frac{r^2}{r^2+\sigma}$
	Loc gauss	$\max\left(0,1-\frac{r}{\sigma}\right)^p \exp\left(-\frac{r^2}{\sigma}\right)$

Non Stationnaire	X^2	$\exp\left(-\frac{r}{\sigma}\right), r = \sum_k \frac{(s_k - t_k)}{s_k + t_k}$
Projectif	Polynomial	$(s^T t)^P$
	Affine	$(s^T t + \sigma)^P$
	Cosinus	$\frac{s^T t}{\|s\|\|t\|}$
	Corrélation	$\exp\left(\frac{s^T t}{\|s\|\|t\|} - \sigma\right)$

La plupart de ces noyaux dépendent d'un paramètre σ appelé "largeur de bande" dont le réglage est souvent critique pour le bon fonctionnement de la méthode

IV.II.5 Évaluation du modèle :

La qualité d'un modèle de décision obtenu par la méthode SVM dépend de plusieurs paramètres, à savoir le paramètre de pénalisation sur les multiplicateurs de Lagrange *C*, le noyau utilisé et ses paramètres (σ dans le cas des noyaux radial et projective) et les exemples utilisés pour l'entrainement (les vecteurs supports).

Le choix des valeurs de ces paramètres se fait actuellement à travers plusieurs essais et évaluation pour atteindre des performances satisfaisantes du modèle. Les paramètres (C^*, K^*, σ^*) optimaux pour un modèle donné sont les paramètres qui lui permettent de donner une précision de 100%. Cette situation serait idéale si l'ensemble des exemples représentait parfaitement l'ensemble de tous les exemples possibles. Le modèle appris peut donner une très grande précision face aux exemples d'entrainement, mais se comporte très mal avec les nouveaux exemples.

Cela représente un phénomène très connu en apprentissage qui est le sur-apprentissage ou l'apprentissage par cœur. Le sur-apprentissage donne, généralement, des modèles à faible capacité de généralisation, et par conséquent la mesure de précision n'est pas suffisante pour qualifier les performances d'un modèle. Les méthodes d'évaluation permettent de tirer des conclusions sur le comportement d'un modèle face à tout l'espace d'exemples en limitant l'influence des exemples d'entrainement et du bruit qui peut y exister (erreurs d'étiquetage, erreurs d'acquisition, ...) et leur ordre sur le modèle.

IV.II.6 Réglage du *C* "chemin de régularisation" :

Outre le choix du noyau, l'autre hyperparamètre à régler dans les SVM est le terme d'équilibrage *C*. Une méthode classique mais couteuse consiste à faire de la validation croisée sur une grille prédéfinie de valeurs de *C* candidates. Il existe une alternative particulièrement élégante : la technique du chemin de régularisation qui permet de calculer,

pour un cout algorithmique analogue à celui du calcul d'une seule solution, un ensemble de solutions possibles pour un ensemble de valeurs de *C* remarquables.

En effet, la formulation duale des SVM est un programme quadratique paramétrique en fonction de *C*. Connaissant une solution pour un C_0 donnée, on peut montrer que cette solution varie linéairement lorsque *C* varie dans un voisinage de C_0. Afin d'illustrer ce fait et pour simplifier les calculs on considère le problème sans biais en posant $\lambda_0 = \frac{1}{C_0}$. La fonction cout à minimiser s'écrit :

$$J(f, \lambda_0) \sum_{i=1}^{n} h\big(y_i, f(x_i)\big) + \frac{\lambda_0}{2} \|f\|_H^2$$

Où $h(z) = \max(1 - z, 0)$ désigne la fonction charnière. La solution f_0 de ce problème est caractérisée par $0 \in \partial_f J(f_0)$ ou $\partial_f J(f_0)$ désigne le sou différentiel du cout au point f_0La sous différentielle de J par rapport f dépend des trois ensembles d'indice $I_0, I_\alpha, et I_1$ et s'écrit :

$$\partial_f J(f, \lambda_0) = \left\{\sum_{i \in I_\alpha} \alpha_i y_i K(x_i, *) - \sum_{i \in I_1} y_i K(x_i, *) + \lambda_0 f(*)\right\}$$

Avec αi ∈] − 1, 0[, le sou différentiel de la fonction h(z) au point z= 1. On considère maintenant λ_n un élément du voisinage de λ_0 pour lequel les ensembles $I_0, I_\alpha, and I_C$demeurent inchangés à l'optimum. En particulier aux points $x_j, j \in I_\alpha\big(f_0(x_i) = y_j\big)$: $\partial_f J(f)(x_i) = 0$. . En écrivant ces équations puis en en faisant la différence on obtient :

$$\sum_{i \in I_\alpha} \alpha_{i0} y_i K\big(x_i, x_j\big) = \sum_{i \in I_1} y_i K\big(x_i, x_j\big) - \lambda_0 y_i$$

$$\sum_{i \in I_\alpha} \alpha_{in} y_i K\big(x_i, x_j\big) = \sum_{i \in I_1} y_i K\big(x_i, x_j\big) - \lambda_n y_i$$

$$G(\alpha_n - \alpha_0) = (\lambda_0 - \lambda_n) y \text{ Avec } G_{ij} = y_i K(x_i, x_j)$$

Cette dernière équation nous permet de faire apparaître l'évolution linéaire de la solution lorsque λ varie puisque

$$\alpha_n = \alpha_0 + (\lambda_0 - \lambda_n) d \text{ Avec } d = G^{-1} y$$

Pour une valeur critique de λ les ensembles $I_0, I_\alpha et\ I_1$ changent, la matrice G change aussi ainsi que le vecteur d.

L'ensemble de toutes les valeurs critiques de λ et les solutions α associées forment un chemin de régularisation que l'on peut initialiser pour des valeurs très grandes de λ avec tous les points lorsque les deux classes sont équilibrées et qui évolue lorsque λ décroît en éliminant ou échangeant des exemples. **(Jodoin, 1994)**.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes :

Toute la partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences à l'université de Yahia Farès Médéa pendant la période allant de Mars à mai 2022.

II.1 Matériels :

II.1.1 Verrerie :

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.

II.1.3 Milieux culture :

TTM, gélose à l'amidon, gélose CMC, gélose à la pectine, gélose Tween 20, gélose tween 80, gélosé à base de lait écrémé, gélose au jaune d'œuf, bouillon nutritif, Mannitol Mobilité, Bouillon nitraté, Mueller Hinton ,GéloseSabouraud ,gélose a la base de rouge Congo.

II.1.4 Autres produits consommables :

NAOH, acide sulfurique,Lugol, fushin, violet de gentiane, alcool, rouge Congo, kovax, nitrate 1 et 2, VP 1 et 2, l'indole, L'huile de paraffine, poudre de zinc, L'eau distillé, disque catalase, l'eau physiologie (Na cl 1mol), l'eau physiologie, l'eau oxygéné,PBS.

II.1.5 Autres matériel :

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

II.2 Méthode :

II.2.1 revivification et identification des souches :

Les souches ont été isolées l'anné passée (2021) à partir de 3 sources hydrothermales en Algérie (Hammam Essalihine /Médéa, Hammam K'sana/Bouira, Hammam Righa /Ain defla).

II.2.1.1 Enrichissement et ensemencement :

A partir des souches bactériennes conservées de l'année passée (2021), une quantité a été pris à l'aide d'une pipette pasteur et méttée dans des eppendorfs contenants 500µL de BN **(annexe 1)**, et incubés à l'étuve (60°C) pendant 24h.

Après les 24h, 100µL des suspensions ont été ensemencées dans des boites pétries contenants le milieu TTM (Annex 2), incubées à l'étuve (60°C) pendant 24h.

II.2.1.2 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 :

L'examen macroscopique des colonies bactériennes a été réalisé directement à l'œil nu, il permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

Les éléments d'identification macroscopiques 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.) **(Thomas et *al,* 1970).**

B. Examen microscopique après coloration de Gram :

Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues. Cette paroi parson organisation permet de les classer soit dans les Gram+ ou les Gram-.

La technique de coloration différentielle décrite par **Gram (1884).**

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.
- La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape de coloration nécessite l'ajout de quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis préalablement fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute le Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant une minute, puis on rince et on ajoute quelques gouttes d'alcool 90° (ne va traverser que la paroi de certaines

bactéries « les Gram – », et décolorer leur cytoplasme) pendant 30 seconds. Puis on rince avec de l'eau distillée, En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute (étape sert à colorer les bactéries (Gram-) qui se sont décolorées lors du traitement précédant). La lame est lavée à l'eaudistillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique. De ce fait, les bactéries Gram – sont colorées en rose et le Gram + en violet. **(Annexe 3).**

Lecture : les lames ont été observées à l'aide d'un microscope optique au grossissement X100, X40.

C. Caractérisation biochimique :

Pour la détermination des caractères biochimiques des différentes souches isolées, nous avons utilisé quelques tests classiques d'orientation et la galerie Api 20 E.

- **Catalase :**

La production de la catalase est mise en évidence par une production d'oxygène (test positif) lorsque la bactérie est mise en contact avec du peroxyde d'hydrogène. Sa présence est révélée en déposant à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame en verre contenant une goutte d'eau oxygénée. La présence de l'enzymes traduit, en quelques secondes, par l'apparition de bulles d'air et dégagement gazeux **(Gerhardt etal.,1994). (Annexe 4).**

- **Oxydase :**

Ce test permet de mettre en évidence la présence du cytochrome oxydase, une enzyme catalysent une réaction d'oxydoréduction. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif N diméthyle paraphenylene diamine en dérivé violet. La technique est consistée à déposer sur un carré d'oxydase la colonie à tester et laisser agir. Après quelques secondes observer l'apparition ou pas de la couleur violette. (La coloration violette traduit la présence de l'oxydase) **(Delarras C. 2014). (Annexe 5).**

- **Nitrate réductase :**

La nitrate réductase est capable de catalyser la réaction de réduction de nitrates (NO3-) en nitrites (NO2-) et chez certaines bactéries en azote (N2). La technique consiste à réaliser une culture dans un bouillon nitraté. Incuber à 60°C pendant 24-48h, ajouter au moment de la lecture quelques gouttes des réactifs de (nitrate 1 et 2), le virage immédiat de la couleur du jaune en rouge nous indique que la souche est NR+, Si le milieu reste inchangé (jaune) on ajout alors de la poudre de Zinc, s'il devient rouge le test est négatif, et s'il reste jaune on dit donc que la souche est NR+ puisqu'elle a réduit le nitrate directement en azote **N2**.

- **Test Mannitol-Mobilité :**

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont testées en ensemençant le milieu Mannitol-Mobilité par piqure centrale et incubé a 60°C pendant 24 h. La mobilité est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la piqure d'inoculation. Tandis que la fermentation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du milieu au jaune **(Harley et Prescott, 2002)**.

- **La galerie Api 20 E :**

La galerie API 20E est un système standardisé se basant sur des tests biochimiques qui mettent en évidence les métabolismes bactériens. Elles sont utilisées en diagnostic in vitro pour la classification, la détermination et l'identification bactérienne des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif. (**GUIRAUD, 2003)**. **(Annexe 6).**

La galerie API 20E compote 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée, Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux et incubé à 50°C pendant 24h. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs (kovax, VP1, VP2 et l'indole). **(De Vos et *al*, 2009).**

Nous avons utilisés la galerie api 20 E à cause de la non-disponibilité des galeries 50 CHB spécifiques aux thermophiles comportant 50 micro-tubes renfermant essentiellement les sucres.

II.2.1.3 Mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires :

Les isolats sont soumis à une recherche de différents enzymes extracellulaires.

- **Amylase :**

La recherche de l'activité enzymatique de l'amylase est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à amidon L'incubation est effectuée pendant 24 à 48 heures à 60°C et la lecture se fait par inondation des boites avec une solution de lugol (Annexe 3). La présence de zones claires autour de l'ensemencement témoigne de la production d'amylases **(Gordon et *al*, 1973).**

- **Protéase :**

L'activité protéolytique est examinée par l'ensemencement des souches sur gélose au lait. Les souches testées sont incubées pendant 24 à 48 heures à 60°C. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies suite à l'hydrolyse de ce polymère **(Priest et *al*,1988).**

- **Estérase :**

Cette activité est recherchée par l'ensemencement des souches sur milieu à base de tween 80 et 20(annexe). Après incubation à 60°C pendant 24 à 48 heures, le développement d'un précipité (zone opaque) autour des colonies témoigne de la présence d'une lipase **(Gonzalez et *al*, 1978).**

- **Cellulase :**

Le milieu de base est supplémenté par 0,5% (p/v) de carboxyméthycellulose (CMC). Après incubation à 60°C pendant 24 à 48 heures, les boites de Pétri sont remplies d'une solution de rouge congo à 0,1% (p/v) et placées pendant 15 à 30 minutes à 55°C. La solution de rouge congo est remplacée par une solution à 1M de Na Cl et les boite sont laissées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production de cellulase ou de xylanase est appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies **(Bragger et *al.*, 1989).**

- **Lécithinase :**

Ce test est réalisé par ensemencement de la souche en une seule strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf). L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 48 heures d'incubation à 60°C, témoigne que la souche possède la lécithine **[De Vos et *al.*, 2009]. (Annexe 7).**

II.2.2 L'optimisation des paramètres de croissance :

Le but est d'étudier expérimentalement l'effet de quelques paramètres opératoires sur la croissance des souches bactériennes isolées de trois sources hydrothermales en Algérie. La partie expérimentale a été réalisé respectivement au sein de laboratoire pédagogique de faculté des sciences à l'Université de Médéa.

Nous avons étudié expérimentalement l'effet de quelques paramètres opératoires sur la réponse. L'optimisation de la réponse repose sur l'utilisation de la méthode de plan d'expériences (Logiciel MODDE) qui permis d'obtenir un modèle empirique quadratique en n'effectuant qu'un nombre minimal d'expérimentations.

II.2.2.1 Application de la méthode de pland'expérience :

Nous nous servirons des plans d'expérience pour quantifier les influences des variables Toutes les planifications des expériences et l'analyse statistique des résultats sont faites par le logiciel MODDE (version 6).

MODDE est un logiciel fonctionnant sous Windows permettant de définir des plans d'expériences, de les analyser et de les optimiser, le tout dans un unique produit convivial.

Le logiciel est conçu pour les techniciens et les ingénieurs de tous les secteurs de l'industrie.

Les étapes de la démarche de notre travail se déroulent dans un ordre similaire à savoir :

- Définition des objectifs et des réponses.
- Choix d'une stratégie expérimentale.
- Définition des facteurs.
- Définition du domaine expérimental.
- Expression du modèle.
- Construction du plan d'expériences.
- Expérimentation.
- Analyse globale des résultats d'essais.
- Analyse mathématique des résultats d'essais.
- Analyse statistique du modèle.
- Analyse graphique du modèle.
- Validation du modèle et des informations obtenues.

II.2.2.2 Définition des objectifs et des réponses :

Le but de cette étude est d'estimer l'effet des facteurs identifiés comme potentiellement influent la croissance des souches et maximiser la croissance par l'optimisation de ces facteurs et d'identifier ceux ayant une influence statistiquement significative sur les performances observées. Les interactions seront également observées afin de compléter l'estimation des effets moyens des facteurs.

A. Température de croissance :

Les souches ont été inoculées dans des tubes contenant 10ml de B.N (0.5 à 1Mc), la D.O a été mesurée le jour même, et incubés à différentes températures (30, 42,60 C°).

Leurs cinétiques se croissance sont ensuite suivies par spectrophotomètre les 2 jours suivants.

B. Paramètre du pH :

Les souches ont été inoculées dans des tubes contenant 10 ml du B.N ajusté à différente valeurs de pH (3, 7, 8,10), et incubées à 60°C.

Leurs cinétiques de croissances sont ensuite suivies par spectrophotomètre les 2 jours suivants.

C. Concentration en NaCl (%) :

Les souches ont été inoculées dans des tubes contenants 10ml du B.N préparés à base de différentes concentrations en NaCl (0.2, 0.5%, 5%, 10%, 15%), et incubées à 60°C.

Leurs cinétiques de croissances sont ensuite suivies par spectrophotomètre pendant 2 jours.

Cette étape définir 4 facteurs potentiellement influents sur la croissance de 21 souches observée, exprimé dans le tableau 5.

Tableau 5 : La nature des différents Facteurs.

Natures	**Facteurs**
Quantitative	La température
	Le pH
	La concentration de NaCl
	Les jours

II.2.2.3 Définition du domaine expérimental :

Le domaine expérimental est constitué de l'ensemble des combinaisons des facteurs qu'il est possible de réaliser. Dans notre cas, nous étudions les facteurs quantitatifs, le tableau (III.1.2) identifiés le domaine de ces facteurs.

Tableau 6 : Le domaine des facteurs étudiés :

Facteurs	Unité	Domaine
Température	°C	[30-60]
pH	/	[5-10]
NaCl	(p/v) %	[0.2-15]
Jours	H	[1-2]

II.2.2.4 Construction du plan d'expériences :

Nous avons choisi de réaliser le plan Box-Behnken pour déterminer les coefficients des modèles, donc nous avons 27 expériences.

Nous avons vu dans la partie théorique de plan d'expérience (Chapitre II) que les modèles associés aux études de criblage sont des modèles additifs et le modèle le plus valide s'écrit comme suit :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^{4} a_i x_i + \sum_{i=1}^{4} \sum_{j=i+1}^{4} a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^{4} a_{ii} x_i^2 \qquad \text{(III.1.1)}$$

*Avec***y** la croissnce, $\boldsymbol{X_1}$le pH , $\boldsymbol{X_2}$la température, $\boldsymbol{X_3}$NaCl et $\boldsymbol{X_4}$jours.

II.2.3 Recherche des activités antimicrobiennes sur milieu solide (technique des cylindres d'agar) :

Les activités antimicrobiennes des souches ont été recherchées par la technique des cylindres d'agar **[Eccleston et *al*., 2008 ; Radhika et *al*, 2011],** elle consiste à ensemencer les souches en stries serrées sur la gélose TTM de façon à obtenir un tapis. Après 24 heures

d'incubation à 60°C, des cylindres d'agar d'environ de 6 mm de diamètre sont prélevés et déposés sur des boites de pétri contenant de Muller-Hintone préalablement mélangé avec des souches tests (100ml Muller-Hintone avec 20ml de suspension), selon la technique recommandée par la **CLSI (2010)** (modifié), puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les champignons (ces températures d'incubation des germes test sont respectées tout au long du notre travail).

Les zones d'inhibition sont observées après 24 à 48 heures d'incubation. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif **(Kitouni, 2007).**

II.2.4 La recherche de la capacité de formation de biofilm :

Deux méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'aptitude des souches à la production du biofilm.

II.2.4.1 La méthode du Rouge Congo :

La méthode du Rouge Congo est une méthode qualitative **(Freeman et *al*, 1989)**. La gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection de souches productrices de slime. Sur ce milieu, 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 **(Ziebuhret *aI*, 2001).**

A. Technique :

- Préparer la gélose Rouge Congo (**voir annex).** Ensemencer en stries une colonie à la surface d'une boite de gélose Rouge Congo(RCA).
- Incuber les boites en 60°C pendant 48 heures.

B. Lecture :

Les souches productrices de biofilm donnent des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices debiofilm.

II.2.4.2 Méthode de microplaques de titration à 96 puits :

Suite aux nombreuses études rapportant l'effet de la composition du milieu de croissance sur la production du biofilm, il nous a semblé utile d'étudier la formation de biofilm par la technique de microplaques de titration décrite précédemment en utilisant le milieu B.N.

Le cristal violet a été utilisé pour colorer le biofilm, et après séchage, le colorant a été solubilisé avec l'alcool. Et cela conduit à une turbidité homogène du colorant ***(*Stepanovic et*al*, 2000)**. **(Hoceini. A 2017).**

A. Technique :

- A partir des colonies isolées, effectuer des cultures d'une nuit dans **B.N** et incubées dans l'étuve à 60°C.
- Après 24 heures, ajuster le DO des suspensions bactériennes à 0.5 McFarland (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 **(Al-Ahmad, 2012)**
- Laver les microplaques 3 fois par la solution PBS (phosphate-buffered saline pH=7) 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**Voir annexe 09).**

Chapitre III : Résultats et discussion

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

Trent deux souches d'aspects différents ont été isolées à partir des trois sites hydrothermaux, ces souches ont subi une série de test macroscopique, microscopique et biochimique. Les résultats de cette caractérisation sont présentés dans les tableaux suivants. **Tableaux (7, 8, 9, 10 et 11).**

III.1.1Observation 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 figure (10) illustre l'aspect macroscopique de quelques souches isolées de l'eau thermale. L'aspect des colonies bactériennes a été déterminé selon les critères de base décrits par **Harley et Prescott (2002)**.

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 12 et Tableau 7).**

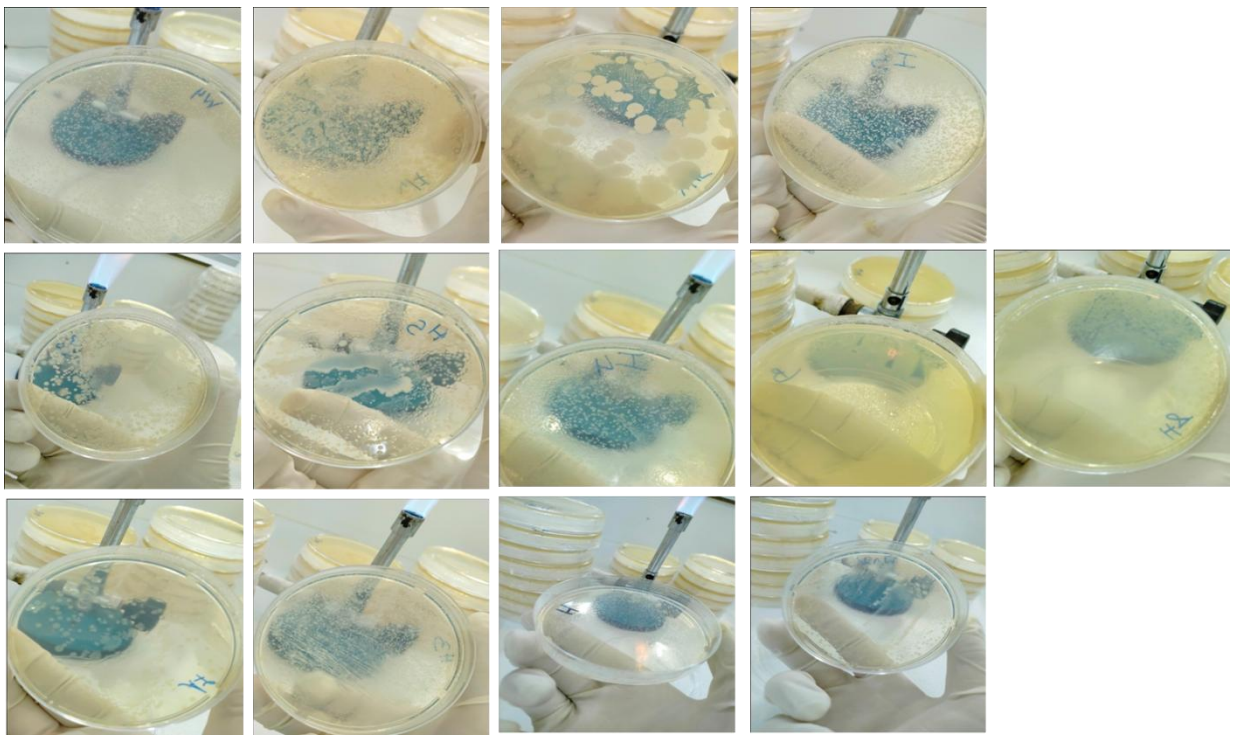


Figure 12 : Aspect macroscopique des souches (Photos personnelles).

Tableau 7 : Caractères culturaux des souches cultivées.

Souches	**Forme**	**Taille**	**Couleur**	**Aspect**
W1	Ronde irrégulier	Petite	Jaune	Rugueuse
W3	Ronde Irrégulier	Moyenne	Jaune claire	Lisse
W4	Irrégulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W5	Ronde irrégulier	Petite	Blanchâtre flou centre	Rugueuse
W6	Ronde régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse plate
W7	Ronde	Moyenne	Jaune	Lisse
W8	Ronde régulier	Petite	Transparente	Lisse
W9	Ronde bombée	Petite	Jaune	Lisse
W11	Irrégulier	Grande	Blanchâtre	Lisse plate
W12	Irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse plate
W13	Ronde irrégulier	Moyenne	Jaune	Lisse
A2	Ronde irrégulier	Grande	Jaunâtre	Lisse
W15	Ronde Régulier	Grande	Jaune Crémé	Rugueuse
H	Ronde	Petite	Transparente	Lisse
H2	Ronde Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
H3	Irrégulier	Petite	Jaune	Lisse
H4	Ronde bordure régulier	Moyenne	Transparente	Rugueuse
H5	Ronde	Petite	Blanchâtre	Lisse
H6	Irrégulier	Grande	Jaune	Rugueuse
I5	Ronde	Petite	Blanchâtre	Lisse
H13	Ronde	Petite	Blanchâtre	Lisse
B	Irrégulière	Petite	Blanchâtre	Rugueuse
H8	Ronde	Moyenne	Jaunâtre	Lisse

III.1.2Observation 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 13 et Tableau 08).**

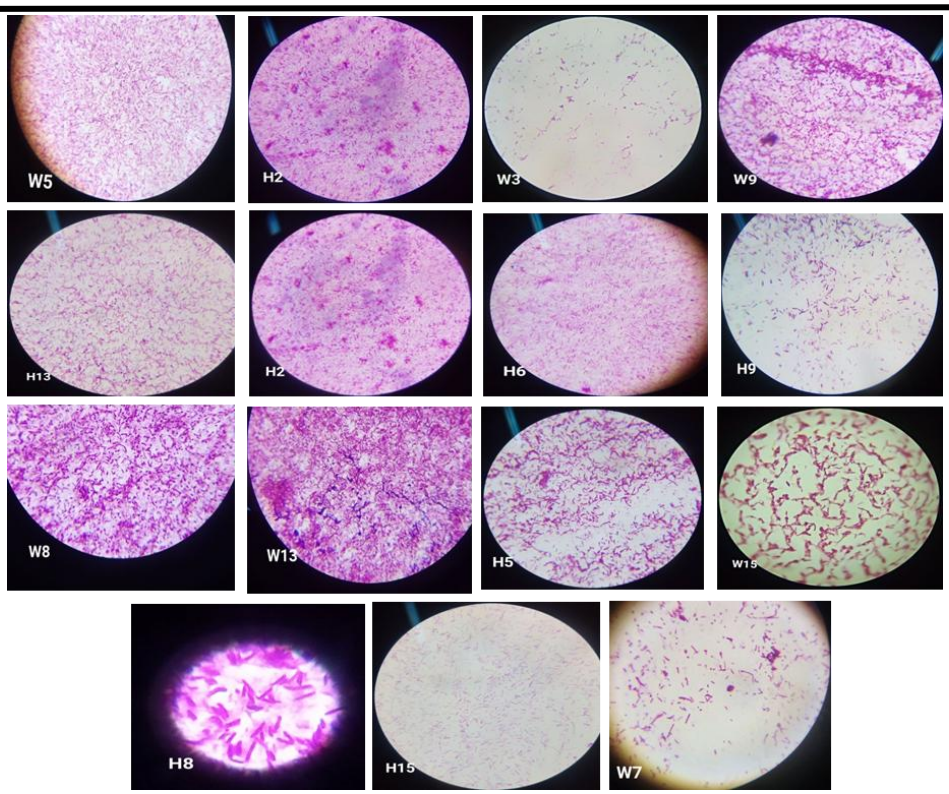


Figure 13 : Coloration de gram des souches thermophiles sous microscope optique au grossissement X100, X40 (Photos personnelles).

Tableau 8 : Résultats de coloration de gram.

Souche	Forme	Gram	Regroupement
W4	Bacille	Positif +	Isolée
W3	Bacille	positif +	Isolée
W11	Bacille	Positif +	Isolée
W1	Bacille	Positif +	Isolée
W15	Bacille	Positif +	Isolée
H6	Bacille	Négatif -	Isolée
H13	Coccobacille	Négatif -	en Y
H9	Bacille	Positif +	en chainette
H2	Bacille	Positif +	Isolée
H15	Bacille	Négatif -	Isolée
H14	Bacille	Positif +	Isolée
H3	Bacille	Positif +	en chainette
H5	Bacille	Positif +	Isolée
H8	Bacille	Positif +	en chainette
H10	Bacille	Négatif -	Isolée
I5	Bacille	Positif +	en chainette
H11	Bacille	Négatif -	en chainette
W9	Bacille	Positif +	en chainette
5	Bacille	Négatif -	en chainette
M	Bacille	Positif +	en chainette
H4	Bacille	Négatif -	en chainette
W6	Bacille	Positif +	en chainette
11	Bacille	Positif +	en chainette
I4	Bacille	Positif +	en chainette
2	Bacille	Positif +	en chainette
A2	Bacille	Positif +	en chainette
W13	Bacille	Positif +	en chainette
W7	Coccobacille	Positif +	Isolée
W8	Coccobacille	Positif +	Isolée
W12	Coccobacille	Négatif -	en chainette
W5	Coccobacille	Positif +	Isolée
H	Bacille	Positif +	en chainette
B	Bacille	Positif +	en chainette
c	Bacille	Positif +	en chainette
A5	Bacille	Positif +	en chainette

L'examen microscopique a révélé les résultats représentés dans le tableau (08). Parmi les 32 souches, 24 sont des bacilles à Gram positif et 6 à Gram négatif, Cinq ont une forme coccobacilles, trois à Gram positif et deux Gram négatif.

La plupart des bactéries isolées des sources thermales en Algérie surtout, étaient des bacilles Gram positif. Une étude similaire a été réalisée par **LARBI (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, mais aussi, elle a trouvé aussi des bacilles Gram négatif et des Cocci Gram positif.

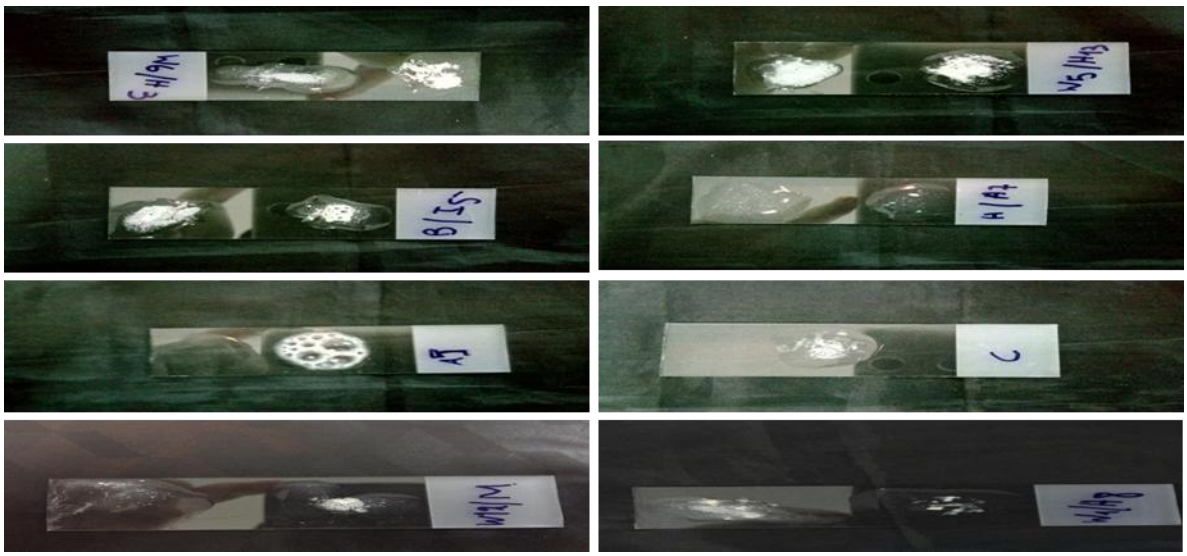
Une étude similaire a été réalisée par **AISSAT Ibtissam & MEKKI Nadjat 2018/2019**, qui ont pu isoler 10 souches bactériennes de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie) dont 9 isolats étaient des bacilles Gram positif, et un isolat de forme coccoïde, Gram négatif. Nos résultats concordent aussi avec ceux trouvés par **Gomri (2012)** qui a pu isoler 83

Une autre étude des souches isolées à partir d'échantillons de cendres et des sources chaudes a montré 84% du total des isolats étaient des gram (+) et le reste gram (-) **(Asad et *al*, 2011).**

III.1.3 Identification biochimiques des isolats :

A. Test catalase, oxydase, N.R et mannitol mobilité :

Les résultats de la caractérisation biochimique des souches isolée à partir des trois sources sont représentés dans **(Les Figure 14, 15, 16 et 17 etTableaux 9,10).**



Figures 14 : Les résultats de catalase des souches (Photos personnelles).

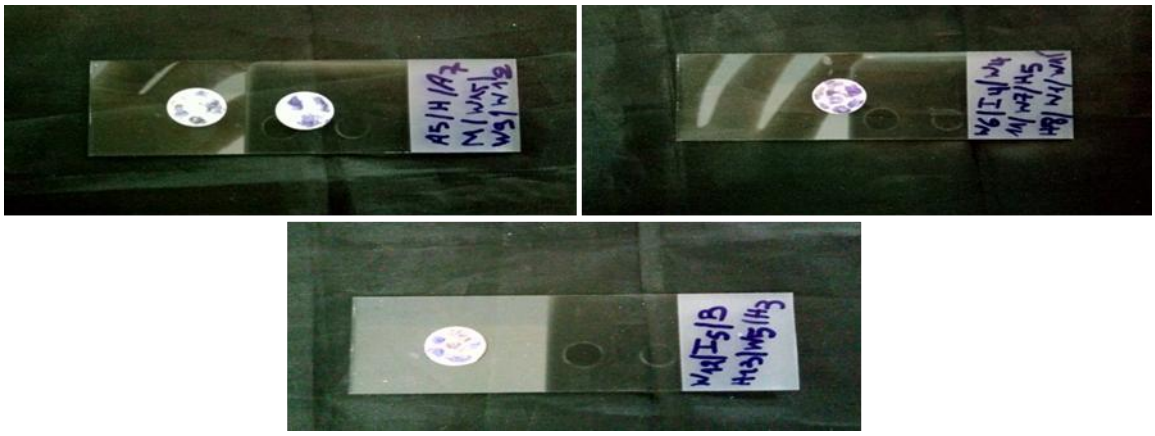


Figure 15 : Les résultats d'oxydase des souches (Photos personnelles).

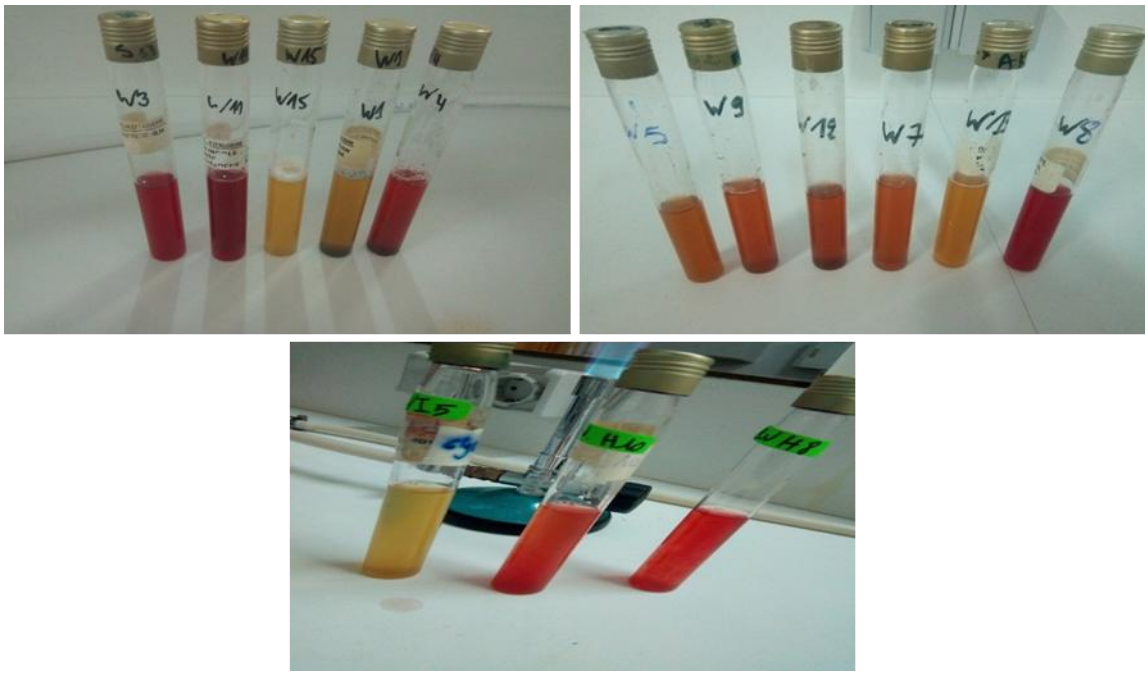


Figure 16 : Le test nitrate réductase des souches (Photos personnelles).

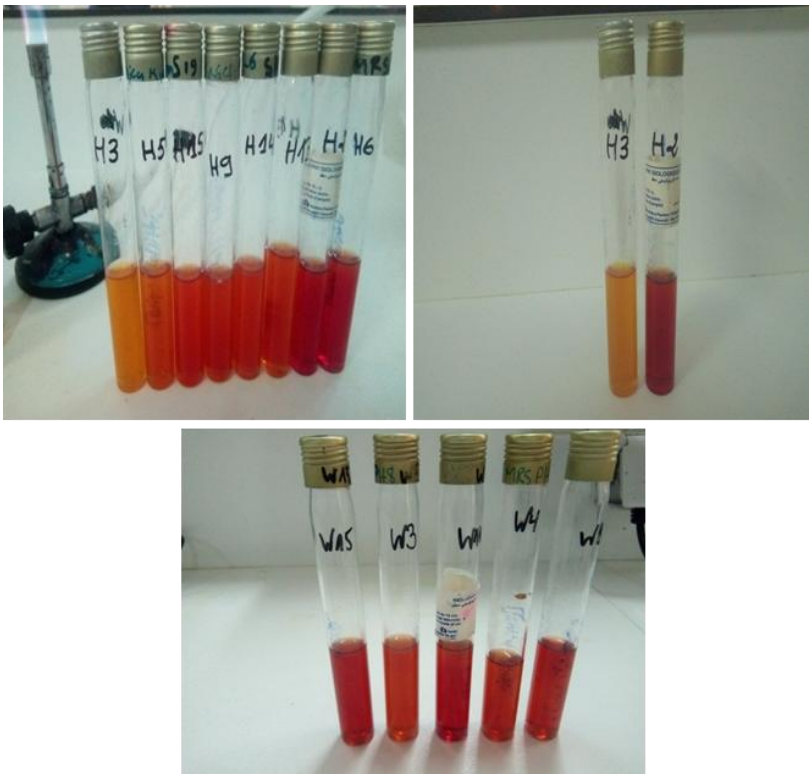


Figure 17 : Test de mannitol mobilité des souches (Photos personnelles).

Tableau 9 : Résultats d'oxydase et catalase

Souche	**H4**	**I4**	**W6**	**M**	**W9**	**11**	**H11**	**C**	**G**	**H8**	**H10**	**W5**
Oxydase	P+	P+	N-	P+	N-	P+	P+	P+	P+	N-	N-	N-
Catalase	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	N-	P+	P+

W13	**W12**	**W8**	**W7**	**H3**	**H5**	**H13**	**H14**	**H15**	**W1**	**W15**
P+	P+	N-	P+	P+	P+	P+	N-	P+	P+	P+
P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	N-

Tableau 10 : Les résultats de test nitrate réductase et mannitol mobilité.

Souches	5	W6	H4	I4	2	M	H11	11	A2	H8	H10	I5	W7	W12	H3
B. Nitraté	N^-	P^+	N^-	P^+	P^+	N^-	N^-	P^+	P^+	P^+	P^+	P^+	N^-	N-	P+
Manitol	N -	P +	P +	N -	P+	N-	P +	P+	N-	P+	P+	N-	P +	P+	P+
Mobilité	P +	P +	P+	P+	P+	P+	N-	N-	P+	P+	N-	P+	N -	P+	P+

H5	H15	H9	H14	H13	H2	H6	W3	W4	W11	W15	W1	W9	W13	W5	W8
P +	N -	N -	P +	P +	N-	N-	P +	N -	P +	P +	P +	P +	N -	P +	P +
P +	P +	P +	P +	P +	N-	N-	P +	P +	N -	N -	P +	P +	N -	P +	P +
P +	P +	N-	P +	P +	N-	N-	P +	N -	P +	P +	P +	P +	P +	P +	N -

Toutes les souches isolées sont oxydase positive à l'exception des souches : W6, W9, H8, H10, W5, W8, H14.

La plupart des souches sont catalase positive à l'exception des : H8 et W15.

Les souches W6, I4, 2, 11, A2, H8, H10, I5, H3, H5, H14, H13, W3, W11, W15, W1, W9, W5 et W8 sont N.R positive. Tandis que les souches 5, H4, M, H11, W7, W12, H15, H9, H2, H6, W4 et W13 sont N.R négative.

La plupart des souches sont mannitol positive, sauf que les souches 5, I4, M, A2, I5, H2, H6, W11, W15 et W13.

La majorité des souches sont mobiles alors que les souches H11, 11, H10, W7, H9, H2, H6, W4 et W8 sont immobiles.

Les souches étudiées sont généralement oxydase et catalase positives ; c'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies et anaérobies facultatives thermophiles **(Dinsdale et *al.*, 2001).**

B. Identification biochimique des souches par la galerie API 20 E :

La galerie API 20 E est un système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bâtonnets gram négatif non exigeants, utilise 21 tests biochimiques standardisés et miniaturisés et une base de données. Il se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Ces tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne qui reconstitue le milieu. Au cours de l'incubation, le métabolisme produit des changements de couleur qui sont spontanés, soit révélés par l'ajout de réactifs. (**Topić Popović,et *al* 2007).**

Les galeries ont été incubés à 50°C pendant 24h, les résultats obtenues sont les suivants:

(Figure 18 et Tableaux 11 et 12).



Figure 18 : les galeries API 20E après incubation (Photos personnelles).

Tableau 11 : Les résultats des galeries API 20E:

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
H4	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
I4	P+	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+
W6	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+
5	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
M	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	P+	P+	P+	P+	P+	P+	N-	P+	N-	N-	P+
2	N-	P+	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	P+	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
W9	P+	P+	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	P+	P+	N-	P+	P+	P+	P+	N-	N-	P+	P+
A2	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
H11	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	P+	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+
11	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+
C	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	P+	P+	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	P+
G	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	P+	P+	P+	N-	P+	N-	P+	N-	P+	P+
H10	P+	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	P+	N-	N-	N-	P+	N-	N-	P+
H8	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
I5	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
W13	P+	P+	N-	N-	P+	N-	N-	N-	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	N-	P+	N-	P+	P+
W12	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	p+	N-	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+
W8	P+	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	P+	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+
W5	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+
W7	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	P+	P+	P+	P+	P+	P+	N-	N-	N-
H14	N-	P+	N-	P+	N-	N-	N-	p+	N-	P+	P+	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
W1	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-
W15	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	P+	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-	N-

D'après les résultats du tableau 11, on constate que les souches I4, 5, W9, A2, H10, W13, W8, W1 et W15 possèdent une B-galactosidase. Toutes les souches sont Arginine dihydrolase négative, sauf que : 2, W9, W13, H14. L'ensemble des souches sont lysine décarboxylase négative. Seulement H8 et H14 qui sont ornithine décarboxylase positive. Parmi toutes les souches ; I4, M, 2, W9, H11, H10, I5, W13 et W8 possède un citrate perméase. Aucune des souches sont uréase positive et la majorité des souches sont Tryptophane désaminase négative à l'exception de W13 et H14. Pour le test Indole seulement W13 et W8 qui sont positive. Presque la moitié des souches produisent *L'acétoïne.*

Toutes les souches ont la gélatinase qui liquéfie la gélatine. On constate que les souches W15, W1, 5, A2, 2, H8 et I5 ne dégradent aucun sucre contrairement à W5, W12 et le reste des souches dégradent plusieurs sucres.

Tableau 12 : Identification des souches.

Souches	**Espèce**
W1	*Brevibacillus brevis*
W5	*Bacillus circulans*
W6	*Paenibacillus panacisoli*
W7	*Bacillus niacini*
W8	*Brevibacillus brevis*
W9	*Bacillus licheniformis*
W12	*Bacillus circulans*
W13	*Bacillus pumilus*
W15	*Brevibacillus brevis*
H4	*Bacillus farraginis*
H8	*Bacillus sporothermodurans*
H10	*Bacillus niacini*
H14	*Bacillus firmus*
I4	*Brevibacillus brevis*
I5	*Lysinibacillus sphaericus*
A2	*Brevibacillus brevis*
M	*Bacillus pumilus*
2	*Bacillus cereus*
5	*Paenibacillus residui*
11	*Bacillus acidiceler*

III.2 L'activité enzymatique :

Un screening des activités amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques et cellulolytiques a été effectué. La présence de ces activités a été détectée en utilisant les substrats, amidon, pectine, caséine, jaune d'œuf, tween 20, tween 80, et carboxymethylcellulose (CMC) **(Figure 19 et Tableau 13).**

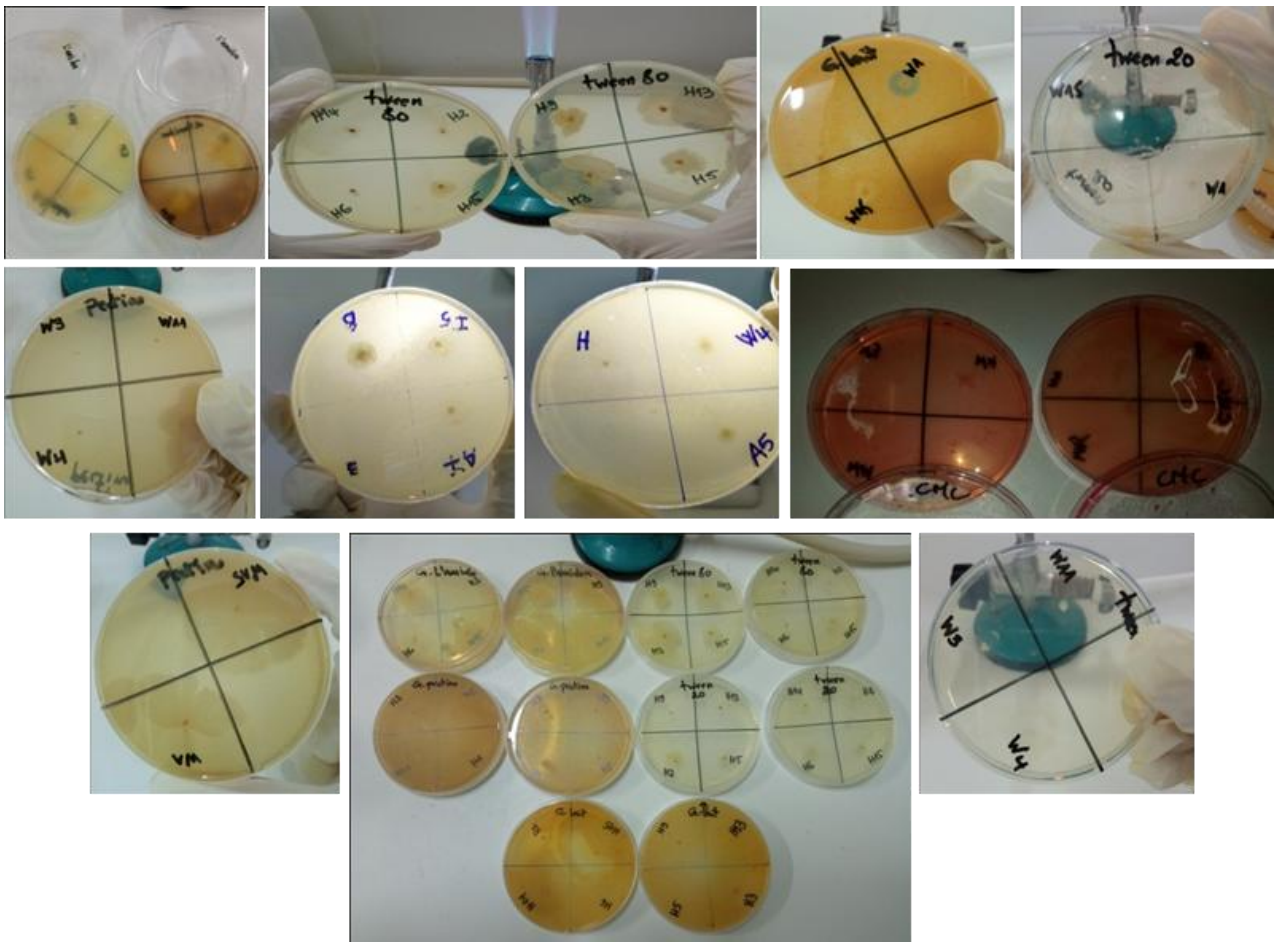


Figure 19 : Les résultats des tests enzymatiques (Photos personnelles).

Tableau 13 : Activité enzymatique des souches.

Souches	CMC	G.au lait	Tween 20	Tween 80	G.à l'amidon	G.à la pectine	G.jaune d'œuf
5 : *Paenibacillus residui*	N -	N -	N -	P +	P +	N -	N -
W6 : *Paenibacillus panacisoli*	P +	P +	P+	P +	P +	N -	N -
H4 : *Bacillus farraginis*	N -	N -	N -	P +	P +	N -	N -
I4 : *Brevibacillus brevis*	P +	P +	P+	P +	P +	N -	N -
2 : *Bacillus cereus*	P +	N -	N -	P +	P +	N -	P +
M : *Bacillus pumilus*	P +	N -	P+	P +	N -	N -	N -
H11	P +	N -	N -	P +	P +	N -	P +
11 : *Bacillus acidiceler*	N -	P +	N -	P +	P +	N -	N -
A2 : *Brevibacillus brevis*	P +	N -	N -	P +	P +	N -	P +
H8 : *Bacillus sporothermodurans*	N -	N -	P+	P +	P +	N -	N -
H10 : *Bacillus niacini*	P +	N -	P+	P +	P +	N -	N -
I5 : *Lysinibacillus sphaericus*	P +	P +	P+	P +	P +	N -	P +
W7 : *Bacillus niacini*	N -	N -	P+	P +	P +	N -	N -
W12 : *Bacillus circulans*	N -	N -	P+	P +	P +	N -	N -
H3	P +	P +	P+	P +	P +	P +	N -
H5	P +	P +	P+	P +	P +	P +	N -
H15	N -	P +	P+	P +	P +	N -	N -
H9	N -	N -	P+	P +	P +	N -	N -
H14 : *Bacillus firmus*	N -	P +	P+	P +	P +	P +	N -
H13	P +	P +	P+	P +	P +	N -	P +
H2	P +	P +	P+	P +	N -	P +	N -
H6	N -	P +	P+	P +	P +	P +	N -
W3	P +	N -	P+	P +	P +	N -	P +
W4	N -	N -	P+	P +	P +	N -	N -
W11	P +	N -	P+	P +	P +	N -	N -
W15 : *Brevibacillus brevis*	P +	P +	P+	P +	N -	P +	N -
W1 : *Brevibacillus brevis*	P +	P +	P+	P +	P +	P +	P +
W9 : *Bacillus licheniformis*	N -	N -	P+	P +	P +	N -	P +
W13 : *Bacillus pumilus*	N -	P +	P+	P +	P +	P +	P +
W5 : *Bacillus circulans*	P +	N -	P+	P +	P +	N -	N -
W8 : *Brevibacillus brevis*	N -	N -	P+	P +	P +	N -	N -
W14	N -	N -	N -	N -	P +	P +	P +

(P+) : hydrolyse complète. (N-) : absence de l'hydrolyse.

Parmis les 32 souches étudiées pour l'activité enzymatique, 17 souches dégradent le carboxymethylcellulose (CMC). La caséine a été hydrolysée par 14 souches. Pour l'activité lypolytique, 24 souches pouvant hydrolyser le Tween20 et toutes les souches sont positive pour le Tween 80 a part W14.L'amidon, pectine et lécithine ont été hydrolysées par 28, 9 et 10 souches respectivement.

Les bactéries thermophiles ont développé une variété de stratégies moléculaire pour survivre aux conditions environnementales extrêmes. Pour l'utilisation des substrats naturels un nombre de bactéries thermophiles, produisent une gamme d'enzymes hydrolytiques, (Protéase, cellulase, amylase, glucosidase, glucoamylase, glucosidase, glucoamylase, pullulanase…etc) **(Bertoldo et Antranikian, 2002).**

Des résultats similaires sur des bactéries isolées à partir d'eau thermale et de sol avoisinant des sources thermales à hammam Debagh, Guelma, Algérie, ont montré que toutes les souches possédaient une ou plusieurs activités hydrolytiques, dominées par les activités protéolytiques et amylolytiques **(Benkahoul et al, 2017).**

III.3 L'activité antimicrobienne :

Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches étudiées contre des souches test standardisés : les bactéries : « *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 »,

Les champignons :« *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 ».

Sont présentés dans **(figure 20** et **le tableau 14)** suivants :

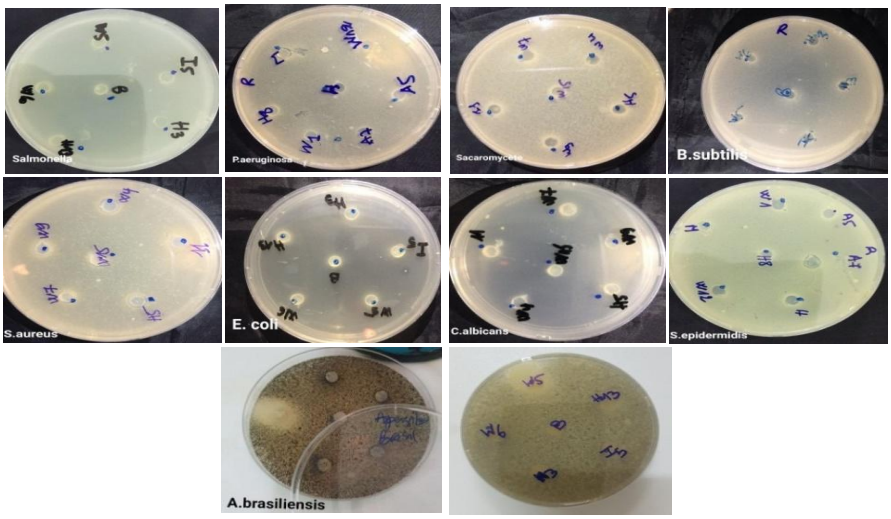


Figure20 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon)(Photos personnelles).

Tableau 14 : l'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon).

	S. aureus	*S. typhi-murium*	*E. coli*	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*	*S. epidermidis*	*A. brasiliensis*	*S. cerevisiae*	*C. albicans*
W5 : *Bacillus circulans*	-	-	-	-	-	-	+	-	-
W6 : *Paenibacillus panacisoli*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I5 : *Lysinibacillus sphaericus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	+	-	-	-	-	-	-	-	-
W4	+	-	-	-	-	-	-	-	-
W7 : *Bacillus niacini*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11 : *Bacillus acidiceler*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
W9 *: Bacillus licheniformis*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
W15 : *Brevibacillus brevis*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A7	-	-	-	-	-	+	-	-	-
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-
W12 : *Bacillus circulans*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M : *Bacillus pumilus*	-	-	-	-	+	+	-	-	-
W1 : *Brevibacillus brevis*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8 : *Bacillus sporothermodurans*	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D'après nos résultats, la capacité à présenter une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* a été détectée chez les souches H5, W4, W7, 11, W9, W15, H, W12 et W1, et aucune des souches à présenter une activité contre *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis,* et seulement la souche M qui a un effet cotre *pseudomonas aeruginosa*, et aucun effet a été détecté contre *staphylococcus epidimidis* sauf chez A7 et M.

Pour l'activité antifongique aucune souche à développer une activité contre *Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans,* a l'exception de la souche W5 qui à présenter une activité contre *Aspergillus brasiliensis* avec une zone d'inhibition importante.

En raison de la nature extrêmophile des microbes, leur produit pourrait être plus efficaces contre les microbes pathogènes couramment trouvés. Malgré des études approfondies sur les microorganismes vivant dans des conditions environnementales extrêmes, y compris les thermophiles, très peu d'informations sont disponibles sur leurs métabolites secondaires notamment dans la production de protéines antimicrobiennes **(Ojha et *al*, 2021)**.

Quatre souches bactériennes thermophiles présentant une activité antimicrobienne contre des agents pathogène testés ont été isolées de source chaude saoudienne **(Alrumman et *al*, 2019)**, Une autre étude a rapporté la capacité des bactéries thermophiles à produire des antimicrobiens isolées à partir de sources chaudes en Jordanie **(Fandi et *al*, 2014).**

- Il a été noté que les espèces de Bacillus produisent un grand nombre de composés biologiques actifs contre, les bactéries, les champignons, les protozoaires, et les virus **(Muhammad et al, 2009).**
- Une étude sur 30 isolats de *streptomyces* a été isolés et purifiés à partir des zones thermales de Nord de la Jordanie, a montré que la capacité à présenter une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* a été détectée chez 20% et 26% des isolats respectivement, tandis que la capacité à présenter une activité antifongique contre *Candida albicans* a été détectée chez 23% des isolats **(Abussaud et al, 2013).**
- 16 souches thermophiles du genre Bacillus ont été isolées des sources thermales de la Péninsule du Kamtchatka en Russie, l'étude a montré qu'au moins 8 souches étaient actives cotre les souches test Gram(+) avec une grande activité antimicrobienne a été observée avec les souches d'essai *Bacillus megterium* VKM41 et *Micrococcus*

*luteus***(Esikova et al, 2002). Al-Dhabi** a également isolé une bactérie *Streptomyce Sp.* Al-Dhabi-1 à partir des sédiments de la source chaude de Tharban, qui a une activité antimicrobienne **(Al-Dhabi et al, 2016).**

- Une autre étude sur un extrait d'acétate d'éthyle de *Bacillusparamycoides* LBKURCC218 isolé à partir de la source chaude de l'ouest de Sumatra en Indonésie a montré la présence d'une zone d'inhibition élevé contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* **(Octarya et al., 2022).**

III.4 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. **(Figures 21,22 et Tableaux 15,16)**

III.4.1 Technique Rouge Congo :

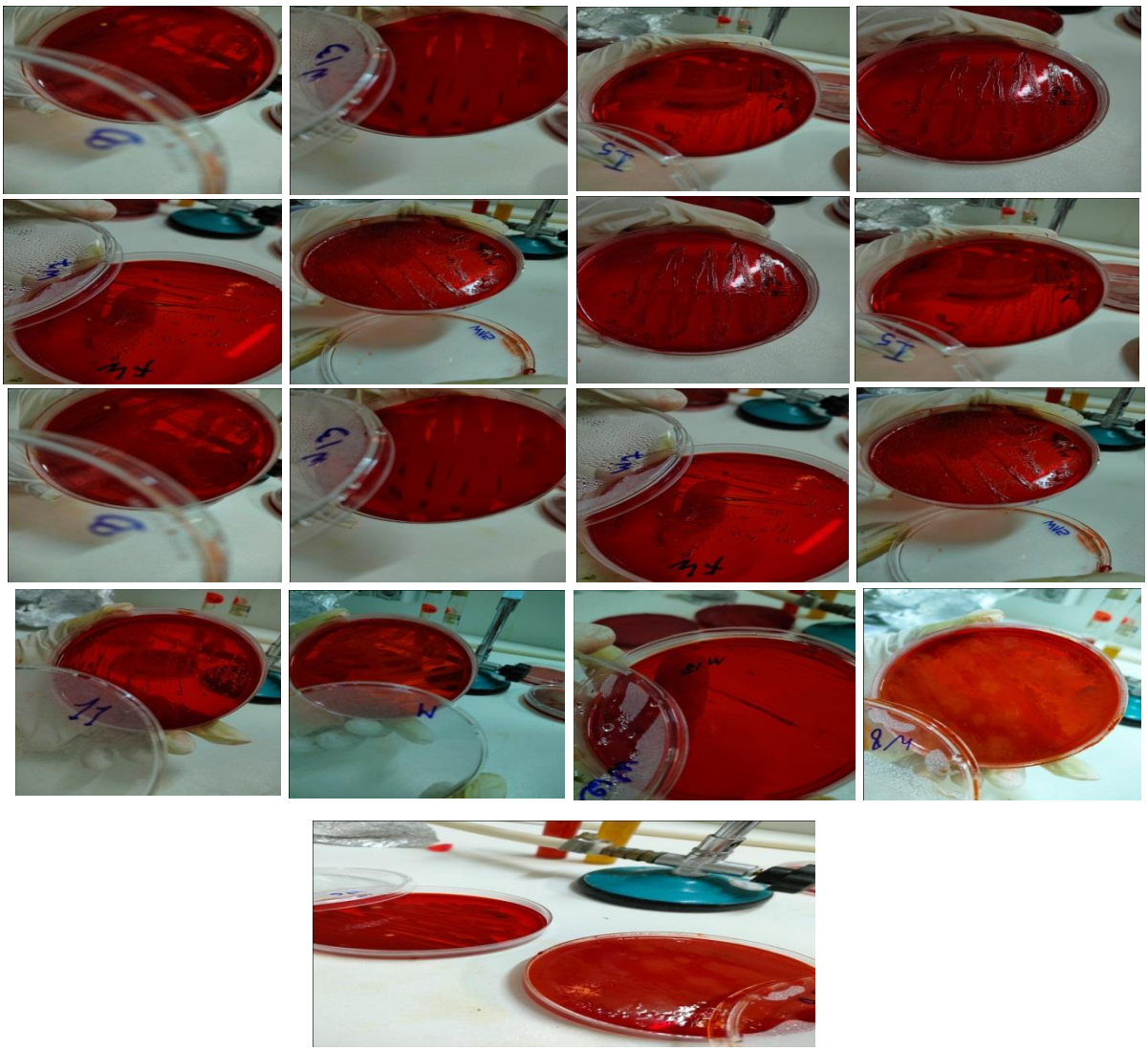


Figure 21 : La production de slime chez les souches (H8, W9, C, W5, H, A5, B, W13, I5, H3, W7, W15, M, W12, 11 et W8) (Photos personnelles).

Tableau 15 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souches	**Phénotype (slime)**
A5	Positive +
H8 :*Bacillus sporothermodurans*	Négative -
M :*Bacillus pumilus*	Positive +
C	Positive+
I5 :*Lysinibacillus sphaericus*	Positive +
11 :*Bacillus acidiceler*	Négative -
W5 :*Bacillus circulans*	Positive +
W4	Positive+
W1 :*Brevibacillus brevis*	Négative -
A7	Positive +
B	Positive +
W9 :*Bacillus licheniformis*	Positive +
W7 :*Bacillus niacini*	Positive +
W6 :*Paenibacillus panacisoli*	Positive +
H13	Positive +
H	Positive+
W12 :*Bacillus circulans*	Positive +
W8 :*Brevibacillus brevis*	Négative -
I4 : *Brevibacillus brevis*	Négative -
W15 :*Brevibacillus brevis*	Positive+
W13 :*Bacillus pumilus*	Négative -
H3	Positive +
H5	Positive +

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.

III.4.2 Technique de microplaque de titration :

Les valeurs seuils pour l'essai de B.N.

D.O min= 0,101.

D.O max= 0,303.

D.O min= D.O témoin moyen + 3. Ecartype = 0,77+3(0,08).

D.O max= 3. D.O min.

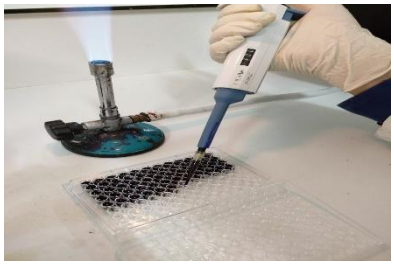


Figure 22 : Préparation de microplaque de titration (Photos personnelles).

Tableau 16 : Résultats de la technique de microplaque de titration.

Souche	D.O moyenne	Formation de biofilm
W1 :*Brevibacillus brevis.*	0.156	Moyennement
W13 :*Bacillus pumilus.*	0.110	Moyennement
H13	0.127	Moyennement
W9 :*Bacillus licheniformis.*	0.145	Moyennement
H8 :*Bacillus sporothermodurans.*	0.134	Moyennement
W12 :*Bacillus circulans.*	0.135	Moyennement
I5 :*Lysinibacillus sphaericus.*	0.113	Moyennement
W6 :*Paenibacillus panacisoli.*	0.113	Moyennement
A5	0.156	Moyennement
H	0.222	Moyennement
I4 :*Brevibacillus brevis.*	0.206	Moyennement
W15 :*Brevibacillus brevis.*	0.135	Moyennement
W8 :*Brevibacillus brevis.*	0.135	Moyennement
B	0.120	Moyennement
W5 :*Bacillus circulans.*	0.138	Moyennement
W7 : Bacillus niacini.	0.131	Moyennement
A7	0.135	Moyennement
M :*Bacillus pumilus.*	0.115	Moyennement
11 :*Bacillus acidiceler.*	0.109	Moyennement
H3	0.123	Moyennement
W4	0.405	Fortement
C	0.356	Fortement

Les valeurs inférieures à 0,101 représentent les souches non productrices de biofilm, les valeurs comprises entre 0,101-0,303 ont été associées avec les souches modérément productrices de biofilm, et les valeurs DO supérieures à 0,303 correspondent aux souches fortement productrices de biofilm.

Les résultats obtenus, suivant une approche qualitative, ont permis de mettre en évidence la capacité de toutes les souches à former des biofilms en microplaques à 96 puits après culture en B.N.

Les souches W1, W13, H13, W9, H8, W12, I5, W6, A5, H, I4, W15, W8, B, W5, W7, A7, M, 11 et H3 sont caractérisées par une moyenne production de biofilm tandis que les souches W4 et C sont fortement productrices de biofilm.

La capacité à former des biofilms ne se limite pas aux bactéries aérobies mésophiles, ils sont également évidents dans les environnements à haute température, tels que les endroits géothermiques terrestres et les évents hydrothermaux. Il a été démontré que plusieurs hyperthermophiles aérobies (microorganismes avec des températures de croissance optimales égales ou supérieures à 80 %) produisent des exopolysaccharides **(Psysz et *al*, 2004)**.

Une étude sur une bactérie thermophile « *Bacillus haynessii cam B6* », isolé d'une source chaude Chilienne a démontré la capacité de la bactérie a formé de biofilm **(Marin et *al*, 2022).**

Dans le secteur de l'industrie alimentaire les biofilms peuvent causés la détérioration des produits, la réduction de la capacité de production, la corrosion, les pannes d'équipements, le blocage des tuyaux et les infections **(Kilic, 2020)**. Des études ont montré la formation de biofilm sur les équipements de ces laiteries par des souches mésophiles du groupe Bacillus cereus et des souches thermophiles de genre Geobacillus, ces biofilms résistent aux opérations de nettoyage et sont une source de contamination chronique du lait pasteurisé **(Malek, 2019)**.

III.5 Optimisation des paramètres de croissance :

III.5.1 Analyse globale des résultats d'essais :

Chacun des essais a été réalisé 2 fois. Les valeurs relevées lors des mesures étant des valeurs particulières de variables aléatoires, En présence d'une valeur suspecte, l'essai est réalisé de nouveau et la valeur suspecte est écartée. Les résultats des 27 essais×21 souches de la matrice d'expériences sont présentés dans **(Tableau 43 annexe 8).**

III.5.2 Analyse mathématique des résultats d'essais

L'analyse mathématique consiste essentiellement à identifier lescoefficients des modèles à partir des résultats des *27* expériences réalisées. L'application de la méthode des moindres carrés sur les résultats d'essais a permis d'obtenir les 15 coefficients de chacun des modèles, fournis-en**(Tableau 44 annexe 8).**

III.5.3 Analyse statistique globale des modèles

L'analyse de la variance (ANOVA) permet d'étudier le comportement d'une variable quantitative et à expliquer en fonction d'une ou de plusieurs variables nominales catégorielles, cette analyse donne les résultats présentés en **(Tableaux 17 à 37).**

Nous obtenons pour la réponse une valeur nul de *P* ce qui conforte l'hypothèse de l'utilisation des modèles quadratiques pour modéliser la réponse.

III.5.4 Courbe de criblage :

La valeur élevée du coefficient de détermination R^2ajusté associée aux modèles de Temps se traduit par des graphiques d'adéquation, sur lesquels l'alignement des nuages de points est très proche de la première bissectrice**.**Les parcelles avec les points proches d'une droite indiquent de bons modèles.

III.5.5 Courbes iso-réponse :

Ces courbes montrent les variations des facteurs sur la réponse et les maximums locaux de chaque répartition.

III.5.6 Représentation graphique de l'effet des facteurs :

Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO des souches.

Tous les résultats d'analyse statistique des modèles sont présentés dans **(Figures 23 à 85).**

Tableau 17 : Analyse de ANOVA de la souche S1.

S1	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	158,436	6,09367			2,46854
Regression	14	153,249	10,9463	25,3246	0,000	3,30852
Residual	12	5,1869	0,432242			0,657451
N = 27	Q2 =	0,864	Cond. no. =	Infinite		

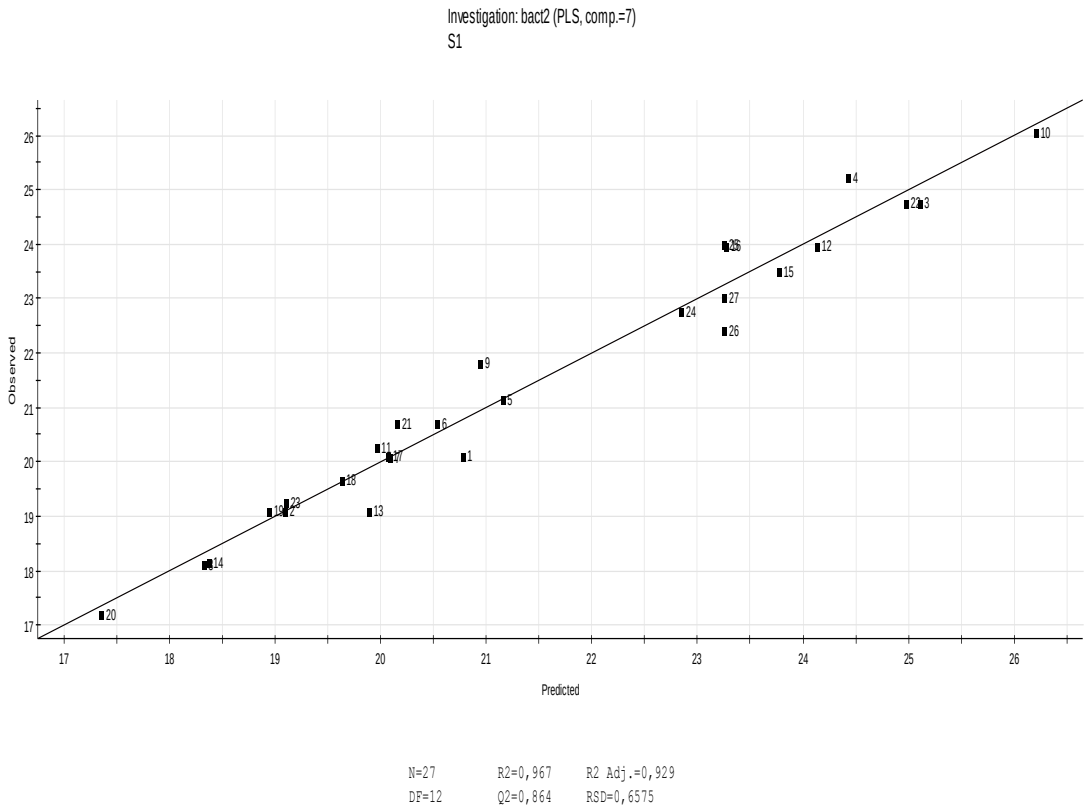


Figure 23 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S1.

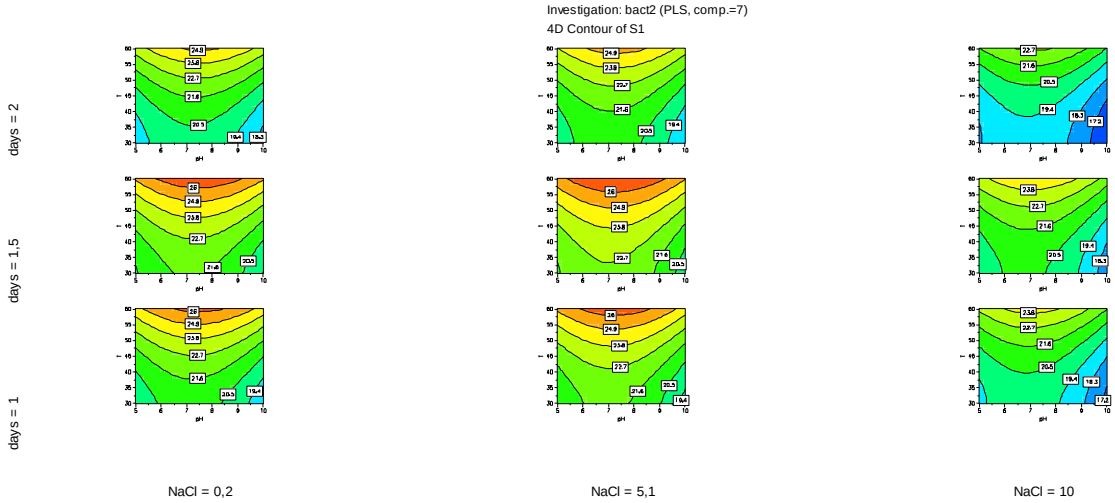


Figure 24 : Courbe isoréponse 4D de la souche S1

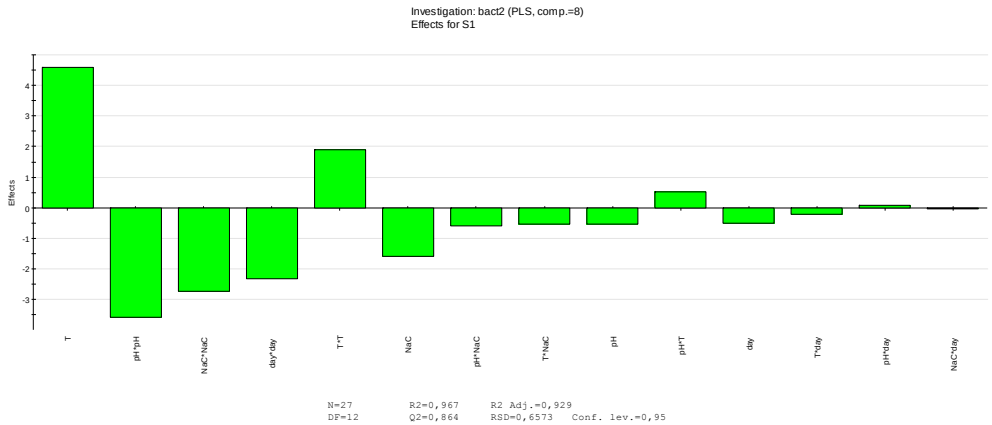


Figure 25 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S1.

Tableau18 : Analyse de ANOVA de la souche S2.

S2	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	437,153	16,8136			4,10044
Regression	14	425,668	30,4049	31,7688	0,000	5,51406
Residual	12	11,4848	0,957069			0,978299
N = 27	Q2 =	0,892	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,974	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,943	RSD =	0,9783		

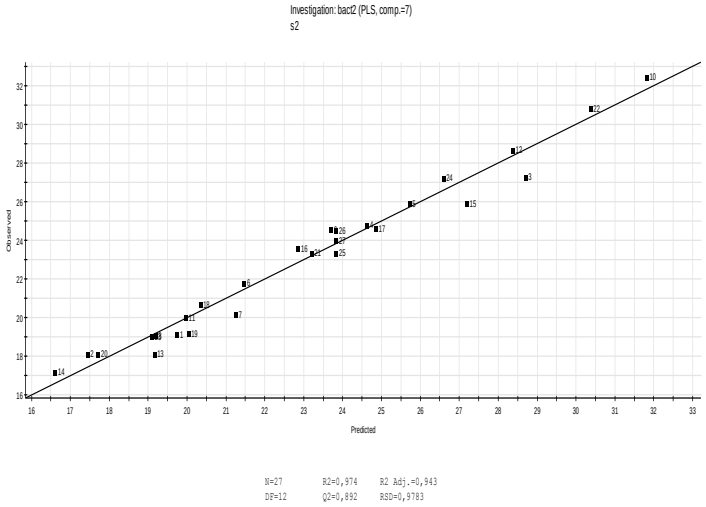


Figure 26 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S2.

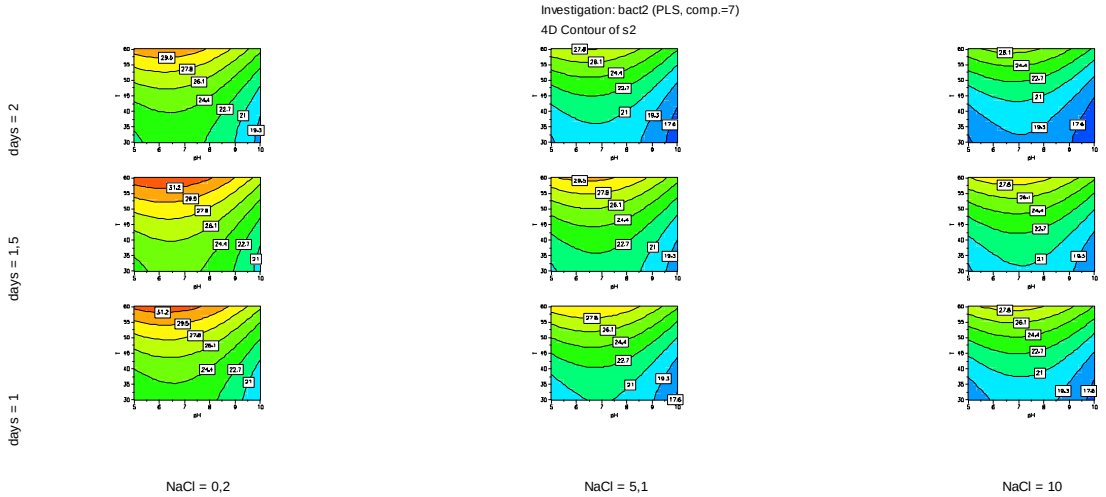


Figure 27 : Courbe isoréponse 4D de la souche S2.

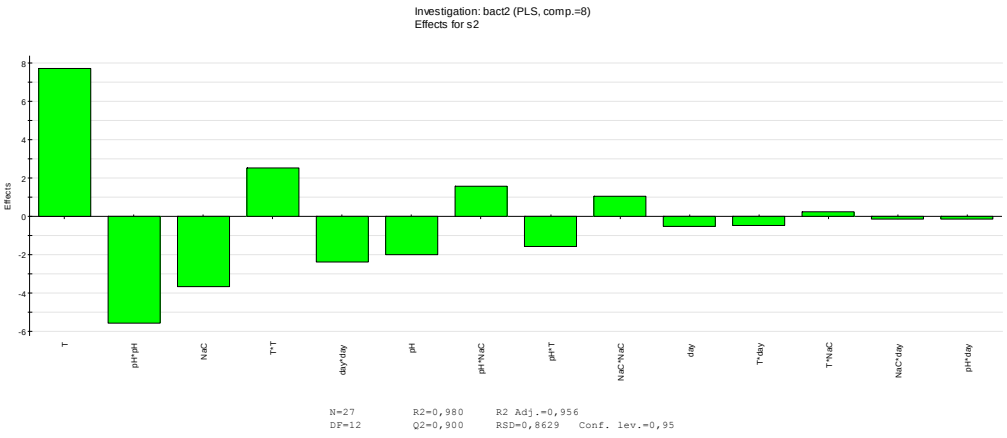


Figure 28 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S2.

Tableau 19 : Analyse de ANOVA de la souche S3.

S3	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	729,363	28,0524			5,29645
Regression	14	708,095	50,5782	28,5373	0,000	7,11184
Residual	12	21,2683	1,77236			1,3313
N = 27	Q2 =	0,838	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,971	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,937	RSD =	1,3313		

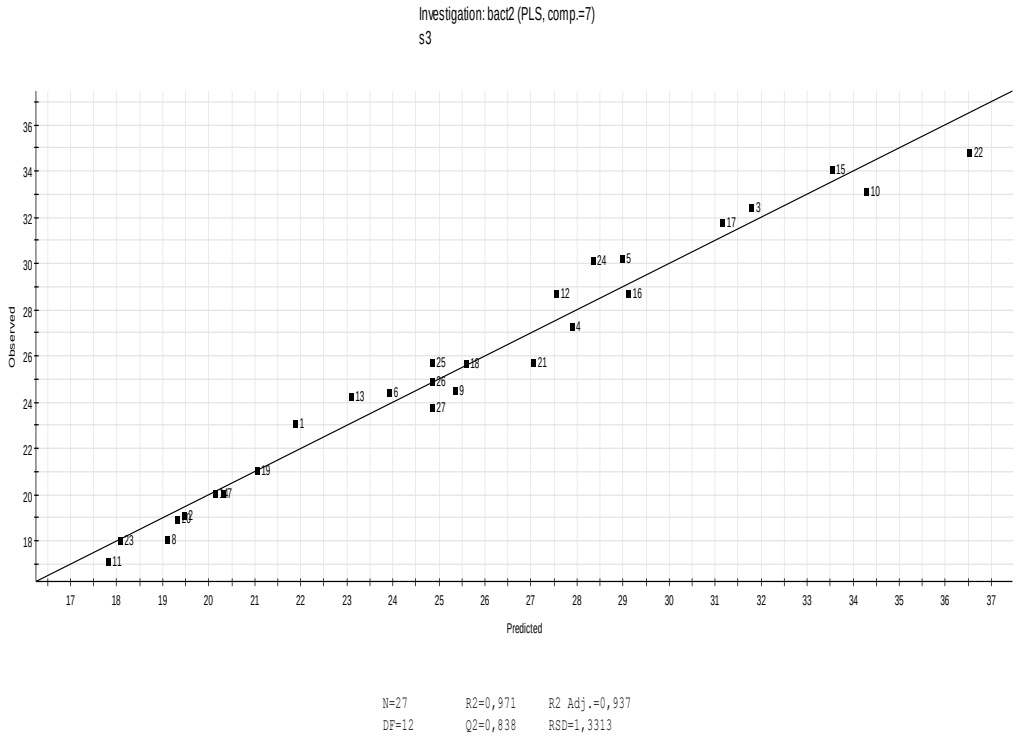


Figure 29 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S3

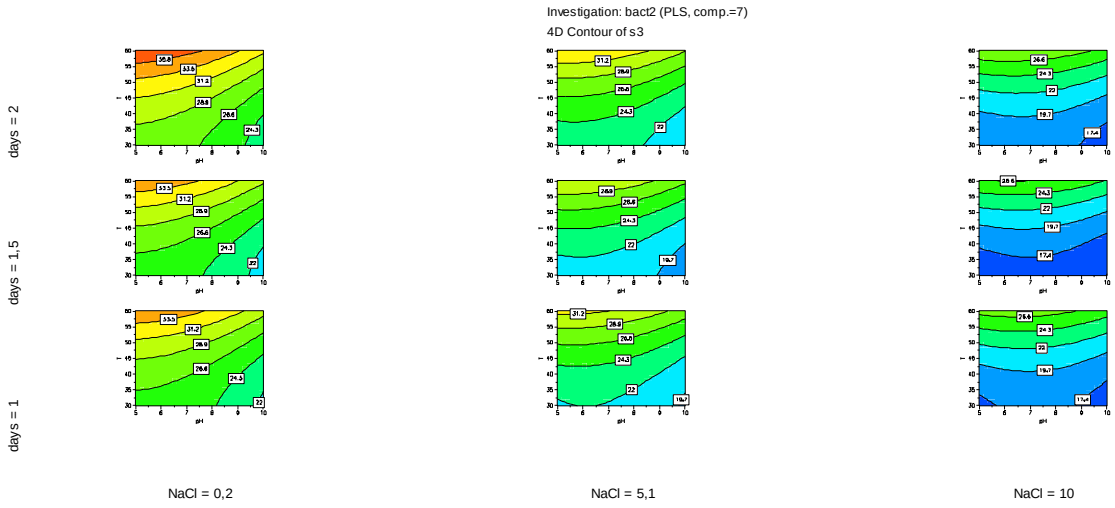


Figure 30 : Courbe isoréponse 4D de la souche S3

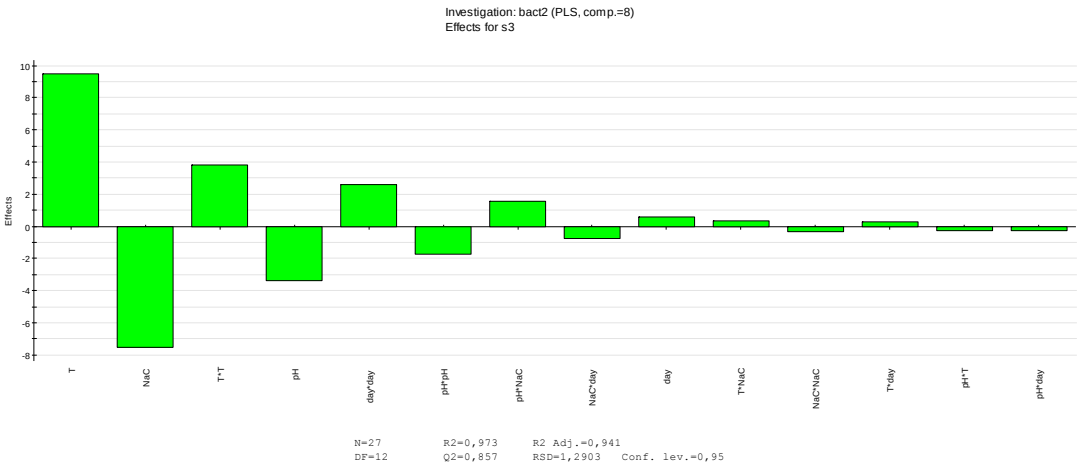


Figure 31 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S3.

Tableau 20 : Analyse de ANOVA de la souche S4.

S4	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	6733,78	258,991			16,0932
Regression	14	6624,42	473,173	51,923	0,000	21,7525
Residual	12	109,356	9,11297			3,01877
N = 27	Q2 =	0,780	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,984	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,965	RSD =	3,0188		

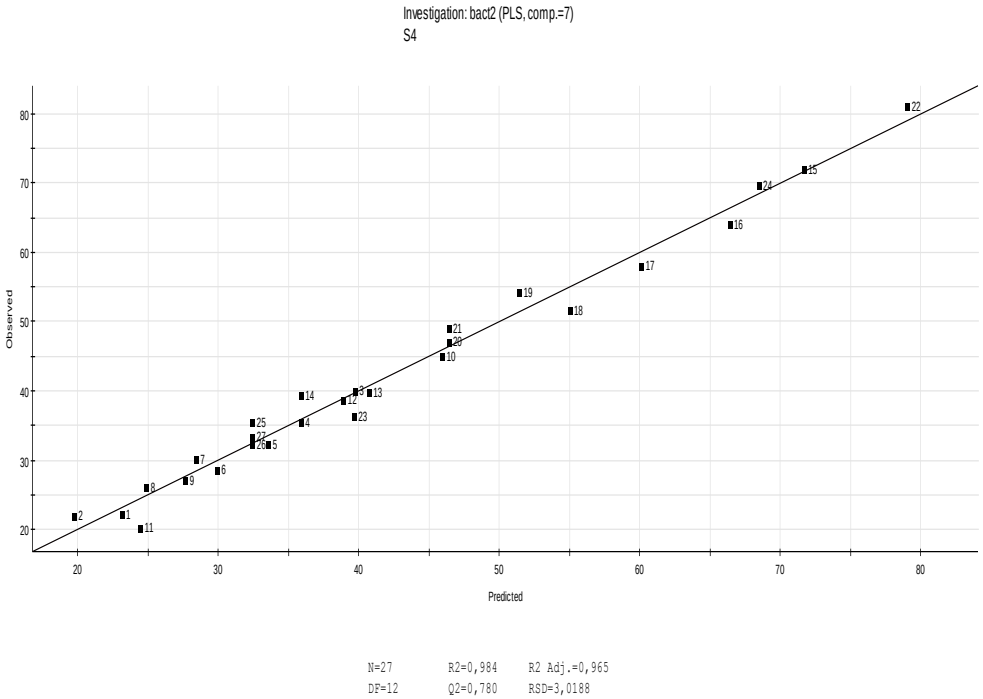


Figure 32 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S4.

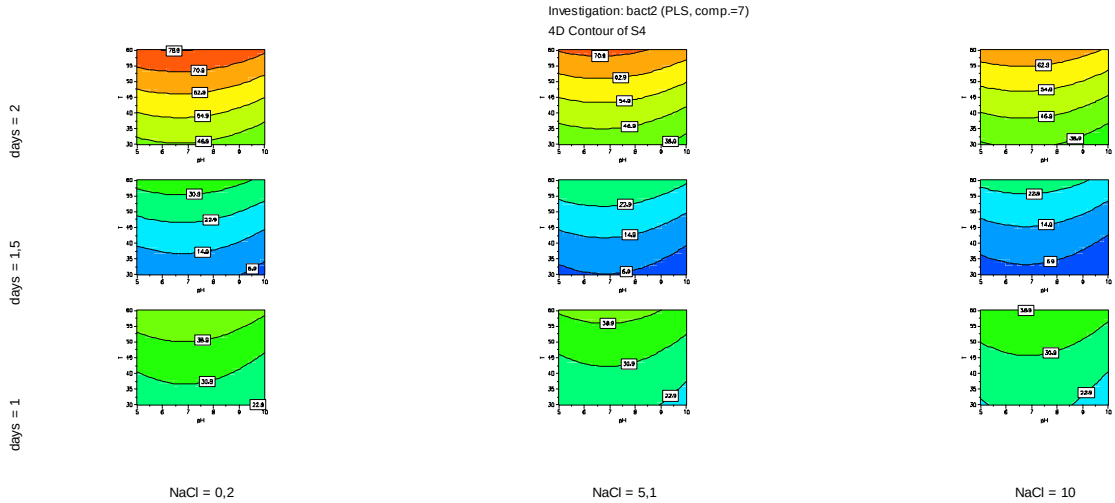


Figure 33 : Courbe isoréponse 4D de la souche S4.

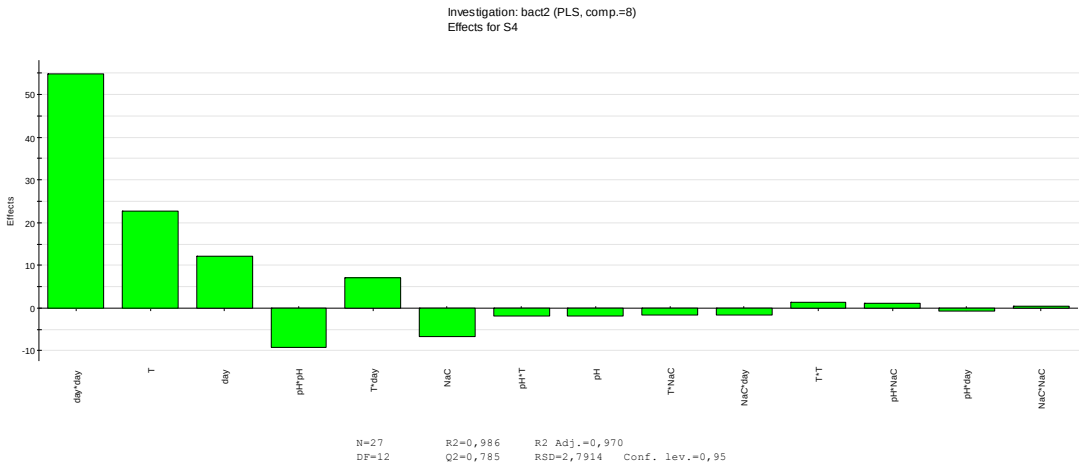


Figure 34 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S4.

Tableau 21 : Analyse de ANOVA de la souche S5.

S5	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	1221,79	46,9918			6,85506
Regression	14	1196,7	85,4787	40,8901	0,000	9,24547
Residual	12	25,0854	2,09045			1,44584
N = 27	Q2 =	0,893	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,979	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,956	RSD =	1,4458		

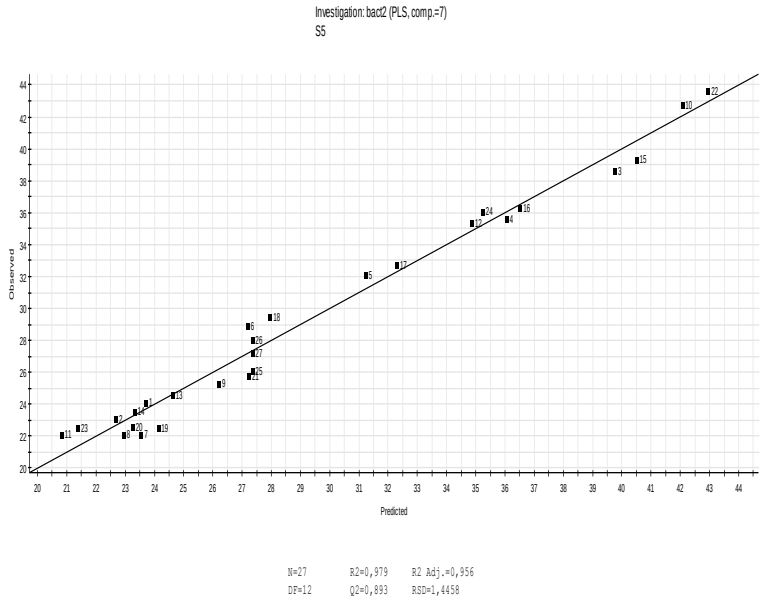


Figure 35 :Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S5.

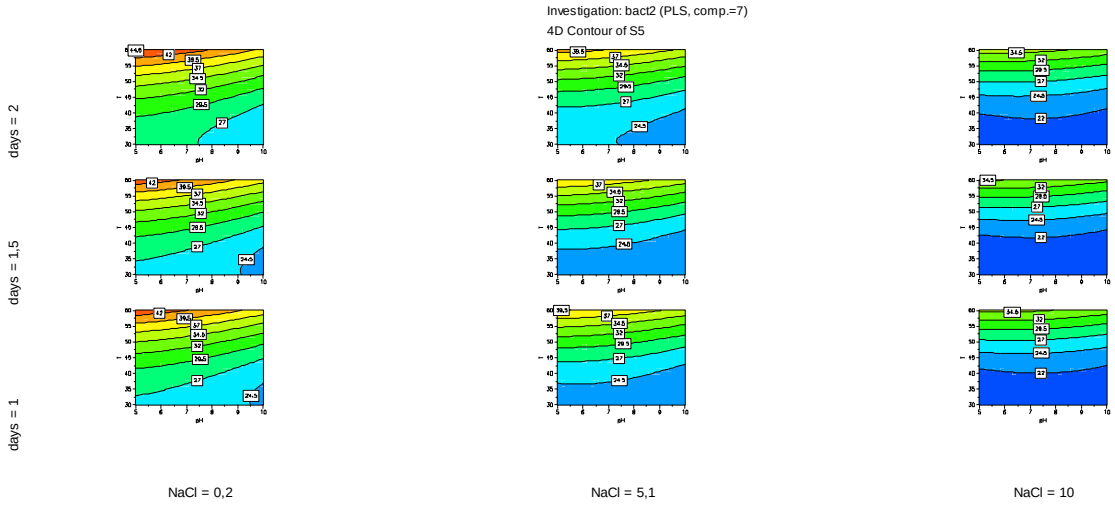


Figure 36 : Courbe isoréponse 4D de la souche S5.

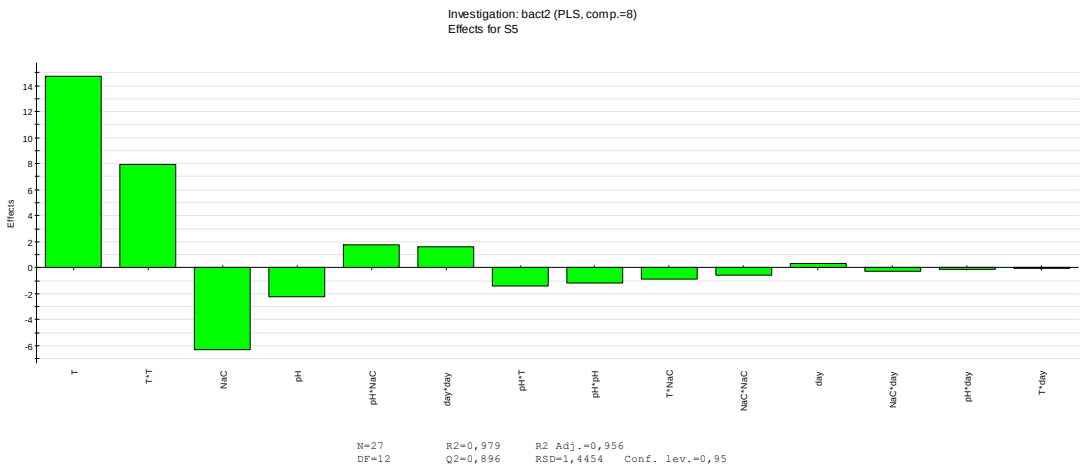


Figure 37: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S5

Tableau 22 : Analyse de ANOVA de la souche S6

S6	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	2242,55	86,252			9,28719
Regression	14	2228,75	159,196	138,389	0,000	12,6173
Residual	12	13,8042	1,15035			1,07255
N = 27	Q2 =	0,953	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,994	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,987	RSD =	1,0725		

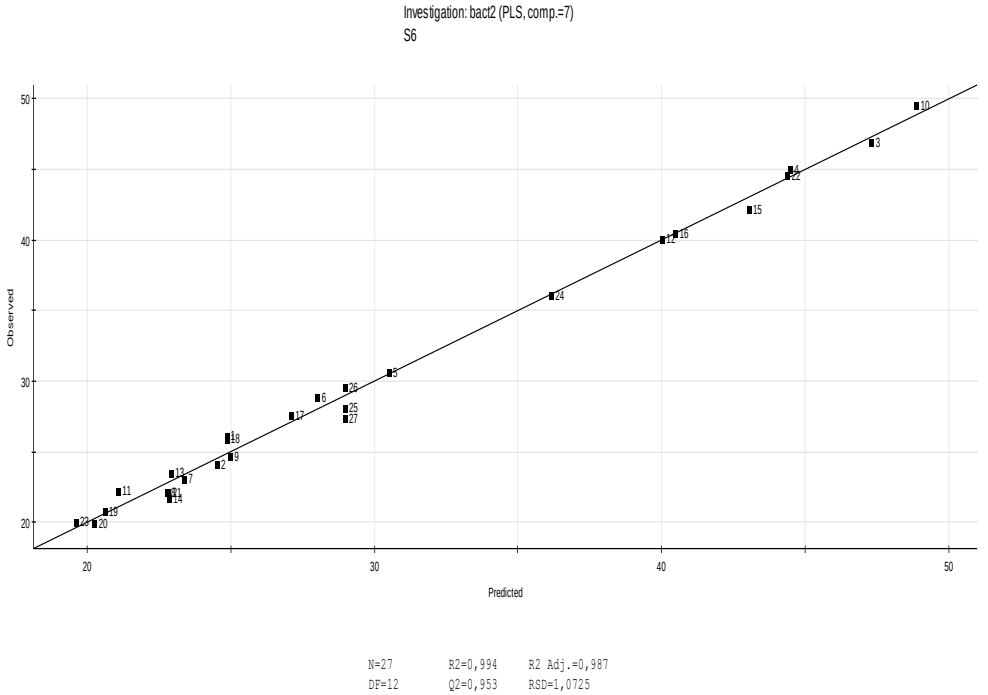


Figure 38 :Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S6.

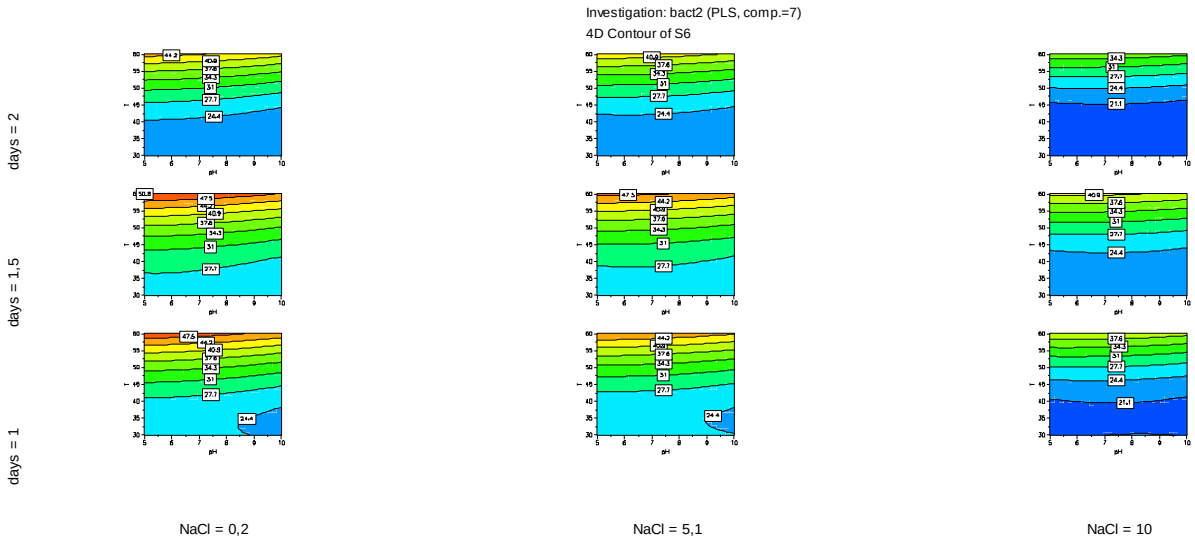


Figure 39 : Courbe isoréponse 4D de la souche S6.

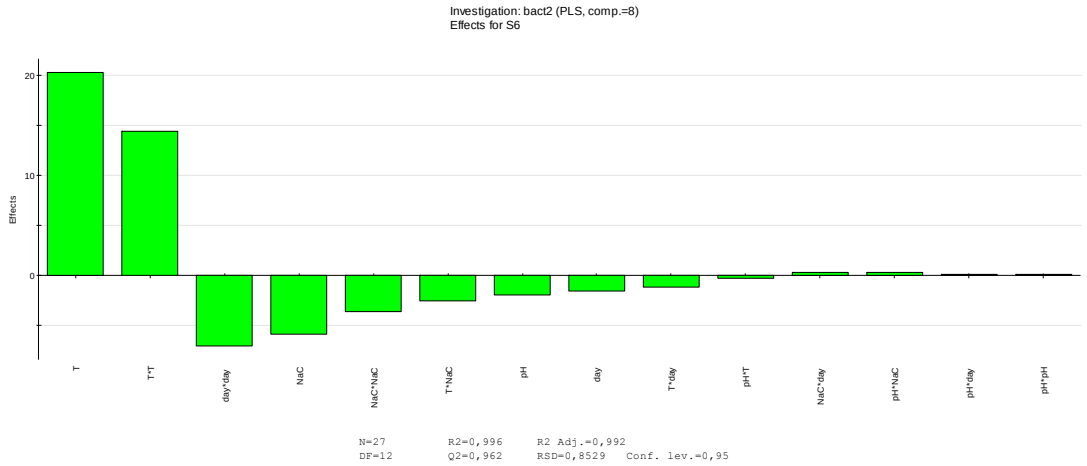


Figure 40 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S6.

Tableau 23 : Analyse de ANOVA de la souche S7.

S7	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	961,146	36,9671			6,08006
Regression	14	941,854	67,2753	41,848	0,000	8,20215
Residual	12	19,2914	1,60761			1,26792
N = 27	Q2 =	0,877	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,980	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,957	RSD =	1,2679		

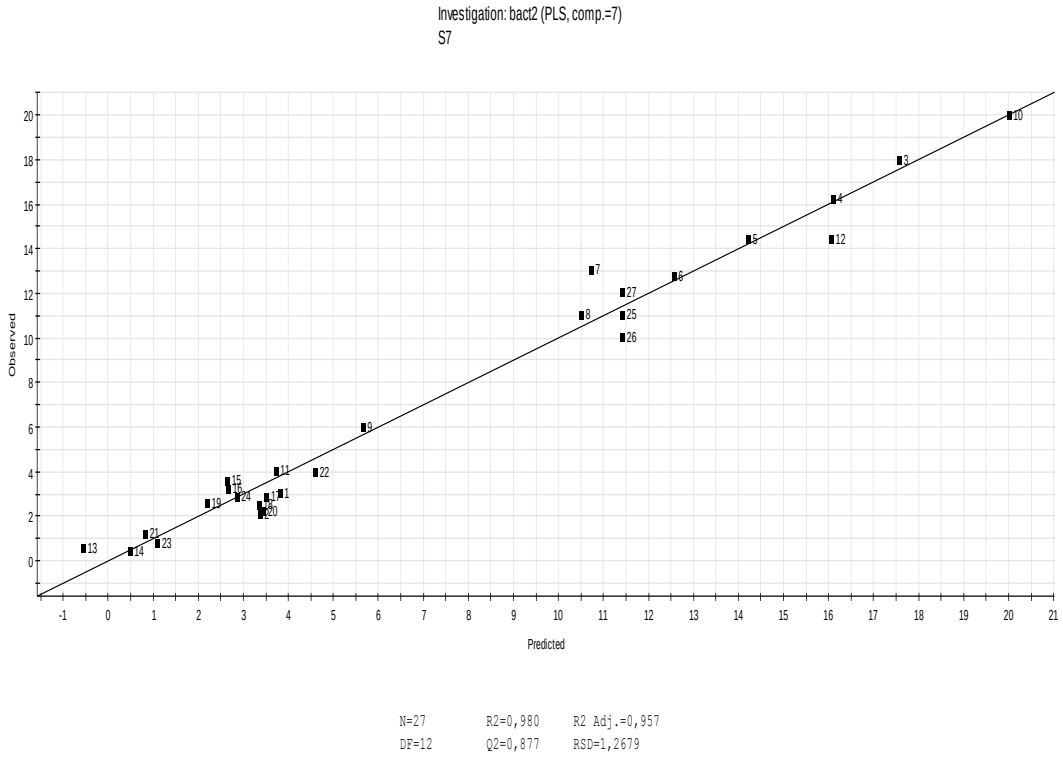


Figure 41 :Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S7.

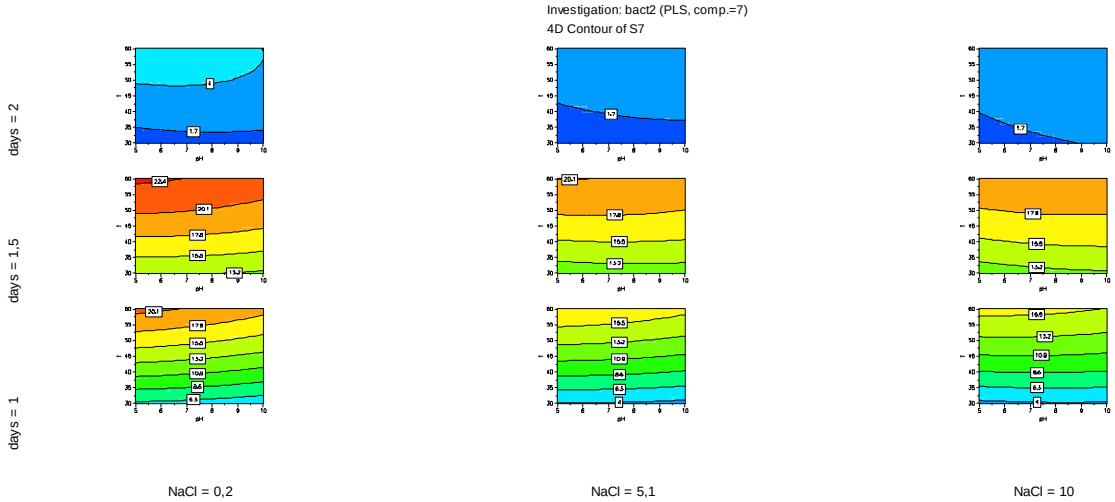


Figure 42 : Courbe isoréponse 4D de la souche S7.

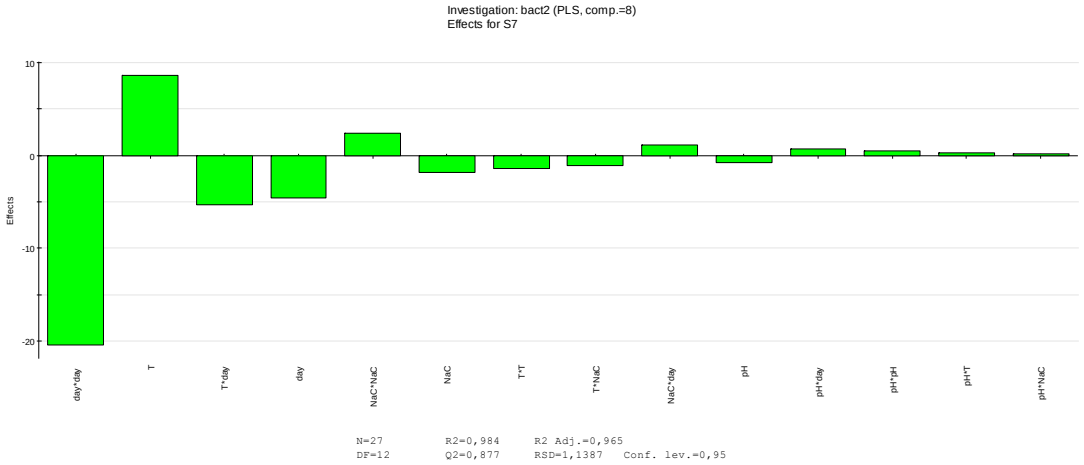


Figure 43: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S7.

Tableau 24 : Analyse de ANOVA de la souche S8.

S8	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**	**SD**
Total Corrected	26	3212,23	123,547			11,1152
Regression	14	3140,07	224,291	37,3014	0,000	14,9763
Residual	12	72,1552	6,01294			2,45213
N = 27	Q2 =	0,878	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,978	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,951	RSD =	2,4521		

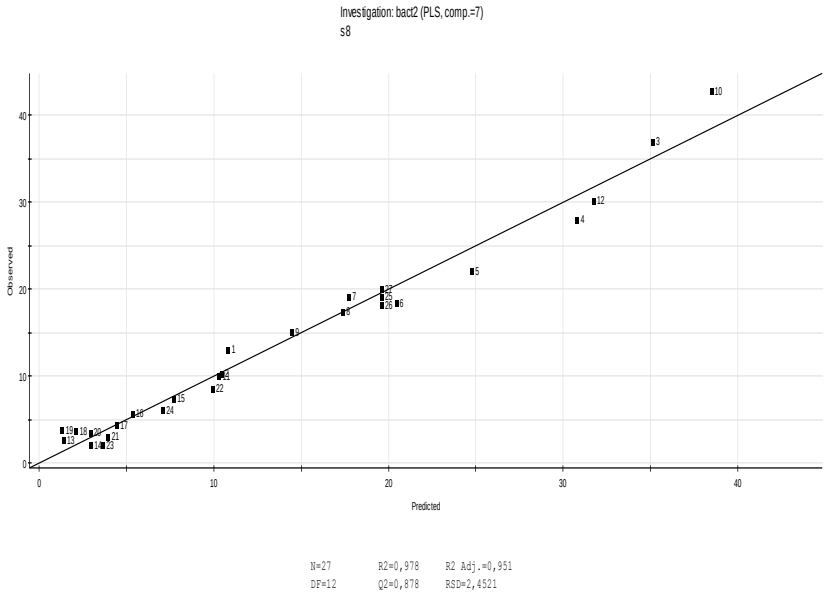


Figure 44 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S8.

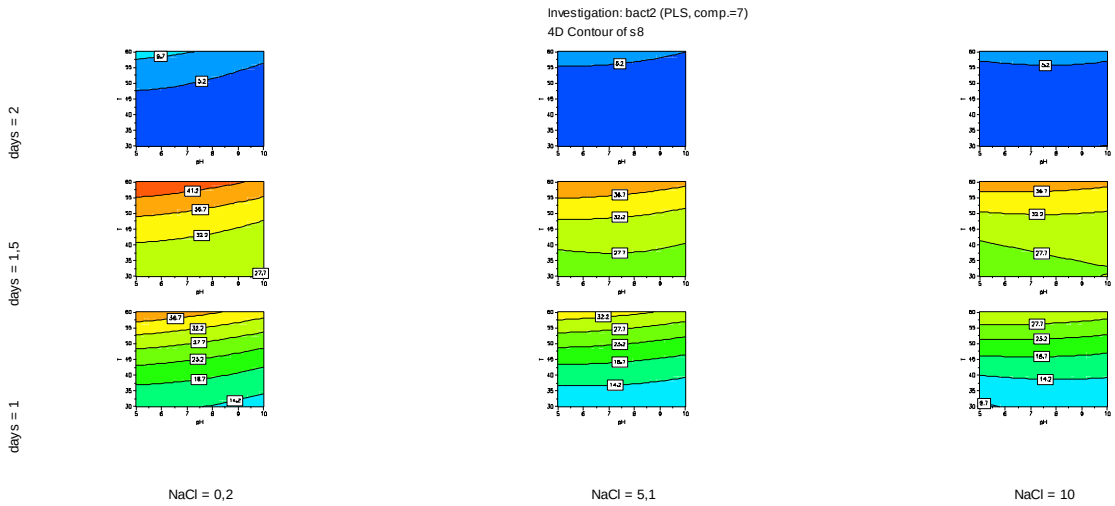


Figure 45 : Courbe isoréponse 4D de la souche S8.

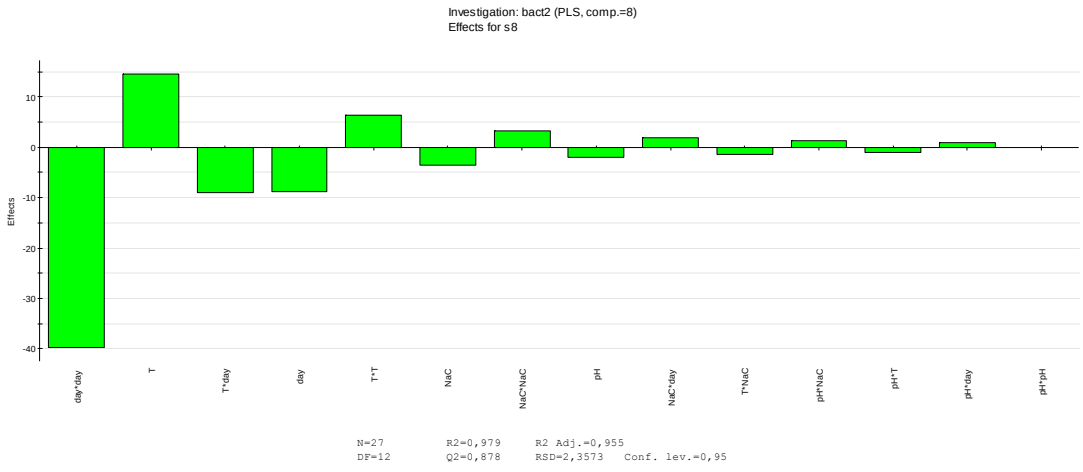


Figure 46 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S8.

Tableau25 : Analyse de ANOVA de la souche S9.

S9	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	3565,1	137,119			11,7098
Regression	14	3522,91	251,636	71,5673	0,000	15,8631
Residual	12	42,193	3,51608			1,87512
N = 27	Q2 =	0,915	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,988	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,974	RSD =	1,8751		

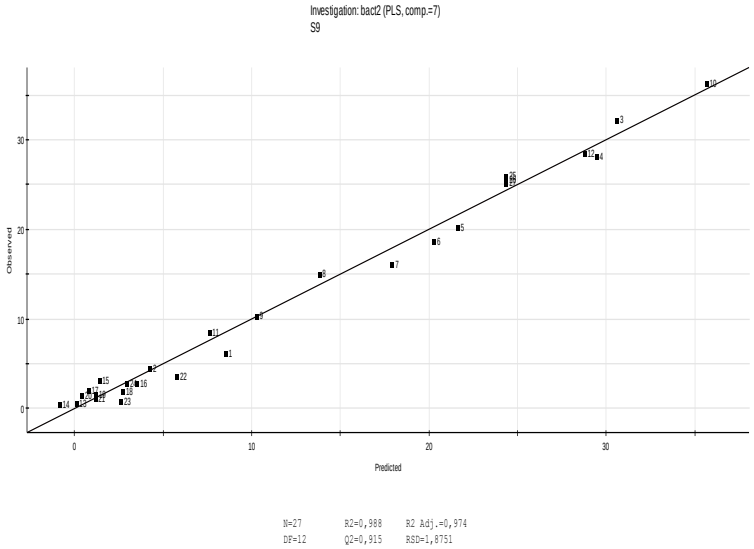


Figure 47 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S9.

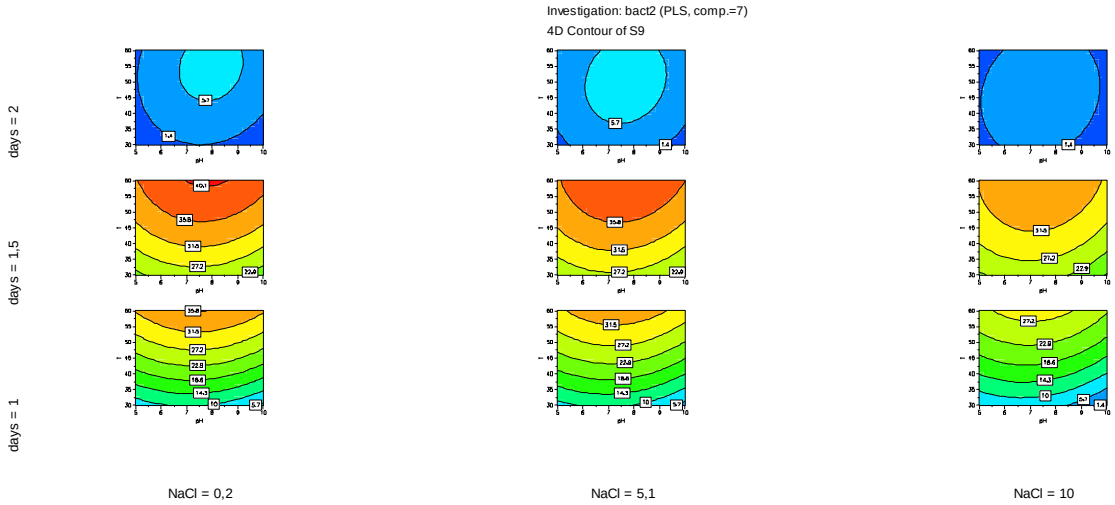


Figure 48 : Courbe isoréponse 4D de la souche S9.

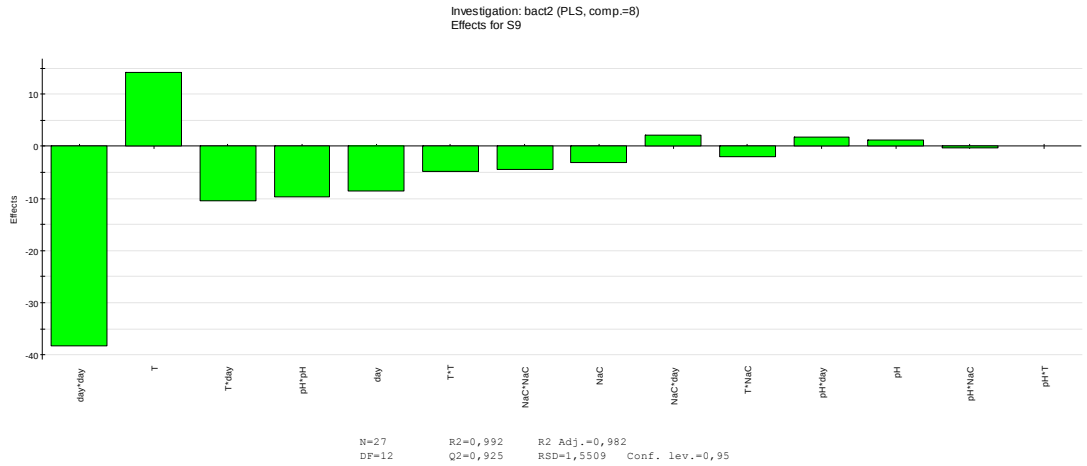


Figure 49 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S9.

Tableau 26 : Analyse de ANOVA de la souche S10

S10	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	10764,6	414,022			20,3475
Regression	14	10650,8	760,773	80,2586	0,000	27,5821
Residual	12	113,748	9,47903			3,0788
N = 27	Q2 =	0,792	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,989	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,977	RSD =	3,0788		

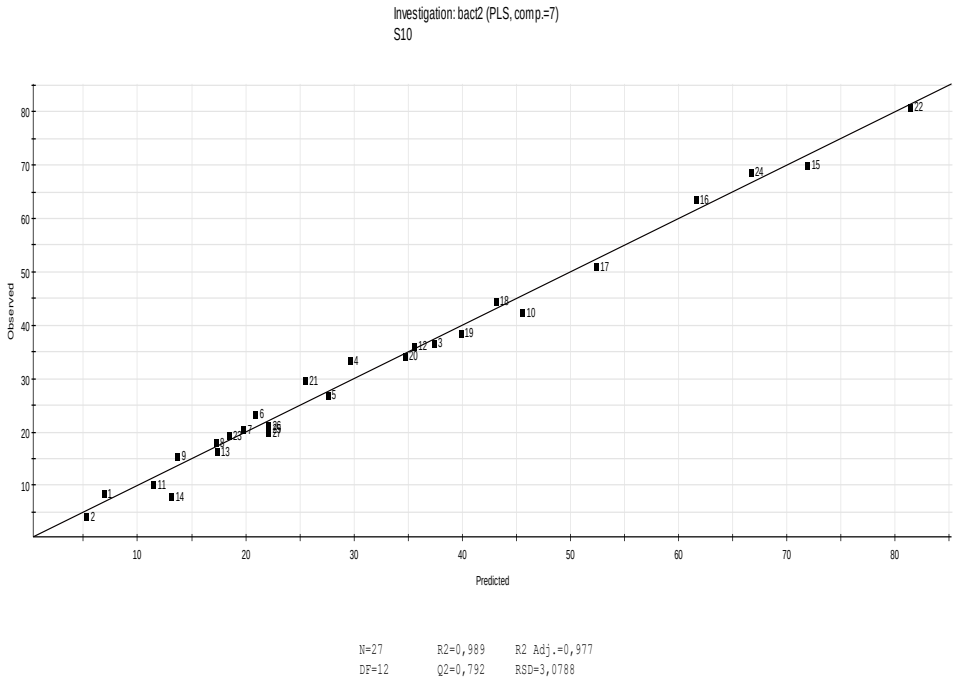


Figure 50 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S10.

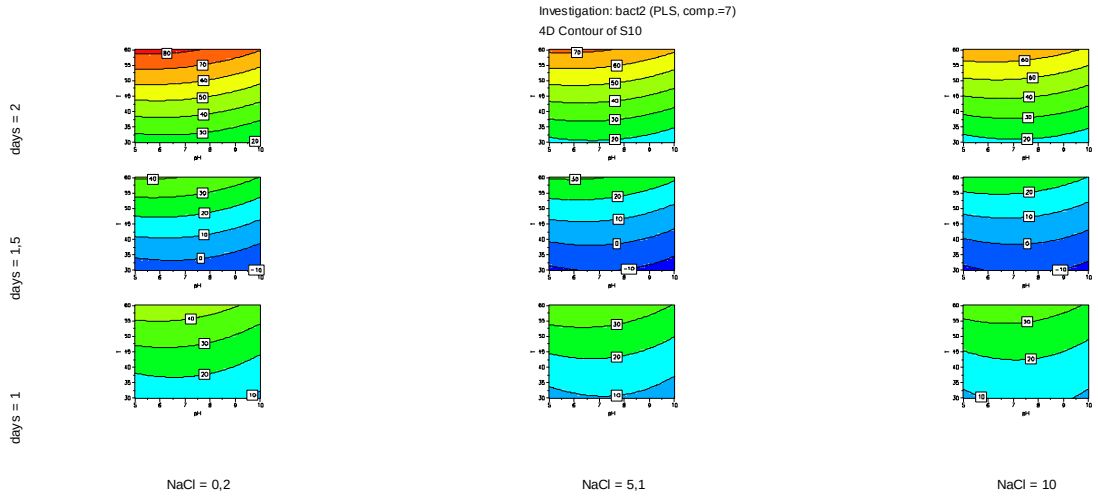


Figure 51 : Courbe isoréponse 4D de la souche S10

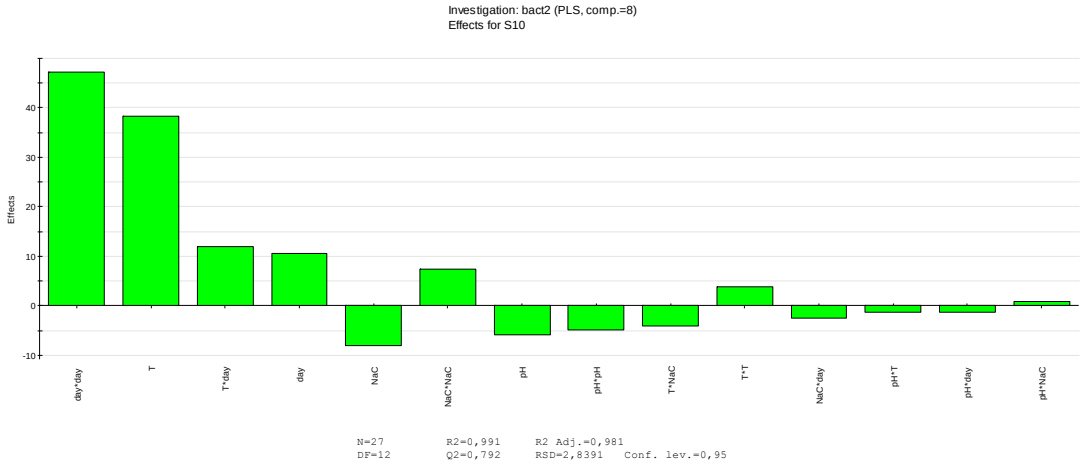


Figure52: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S10.

Tableau 27 : Analyse de ANOVA de la souche S11.

S11	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	2731,39	105,053			10,2496
Regression	14	2665,57	190,398	34,7116	0,000	13,7985
Residual	12	65,8216	5,48513			2,34204
N = 27	Q2 =	0,858	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,976	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,948	RSD =	2,3420		

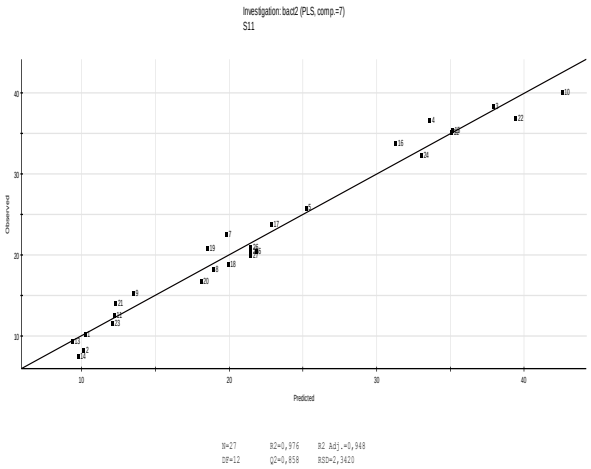


Figure 53 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S11**.**

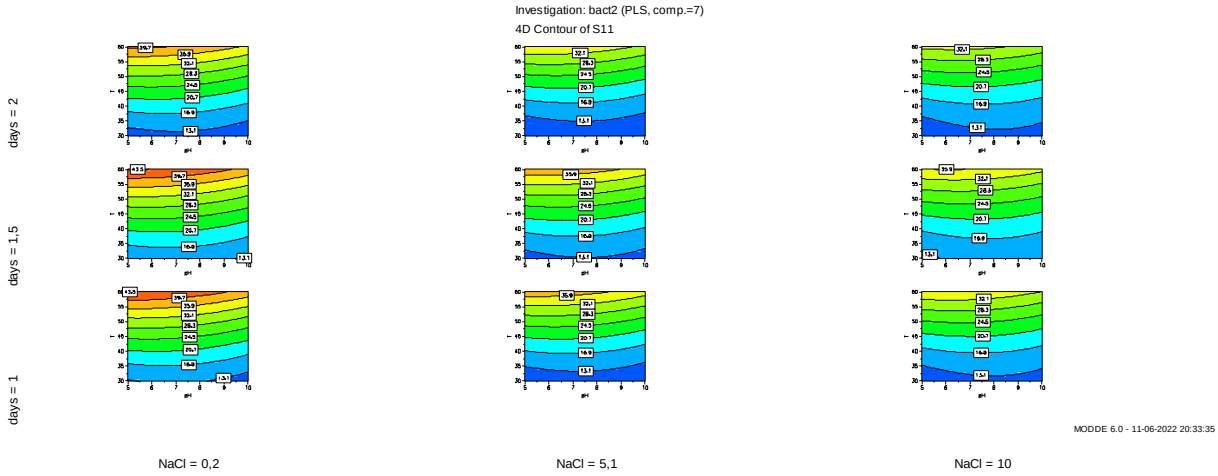


Figure 54 : Courbe isoréponse 4D de la souche S11.

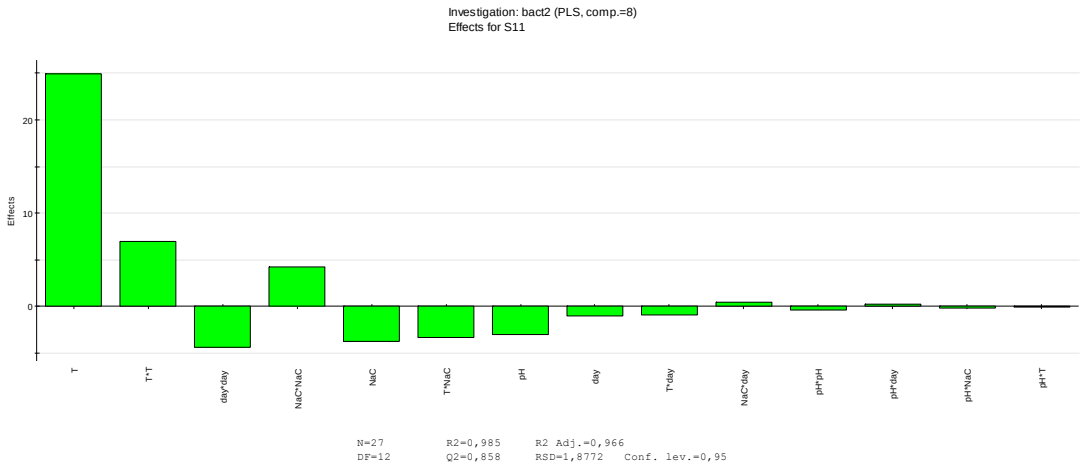


Figure 55 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S11.

Tableau 28 : Analyse de ANOVA de la souche S12.

S12	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	3533,2	135,892			11,6573
Regression	14	3462,55	247,325	42,0064	0,000	15,7266
Residual	12	70,6534	5,88779			2,42648
N = 27	Q2 =	0,859	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,980	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,957	RSD =	2,4265		

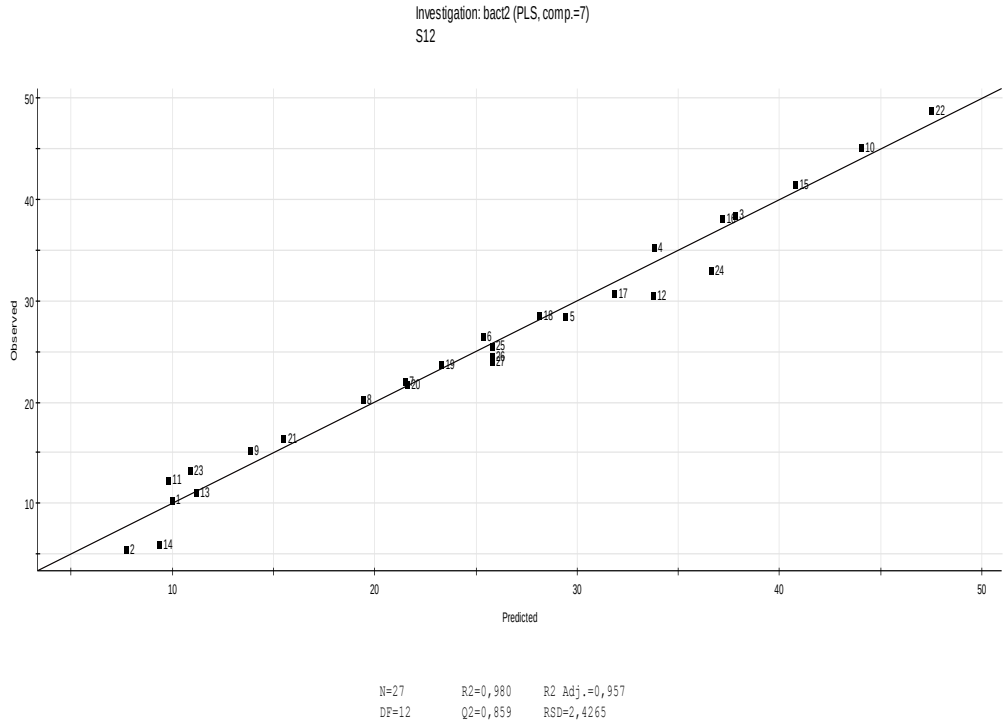


Figure 56 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S12.

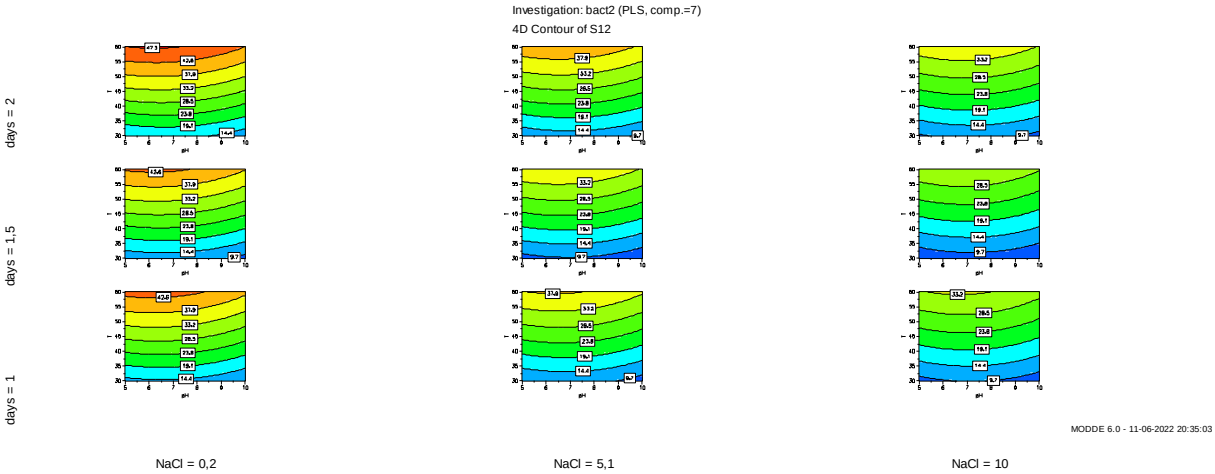


Figure 57 : Courbe isoréponse 4D de la souche S12.

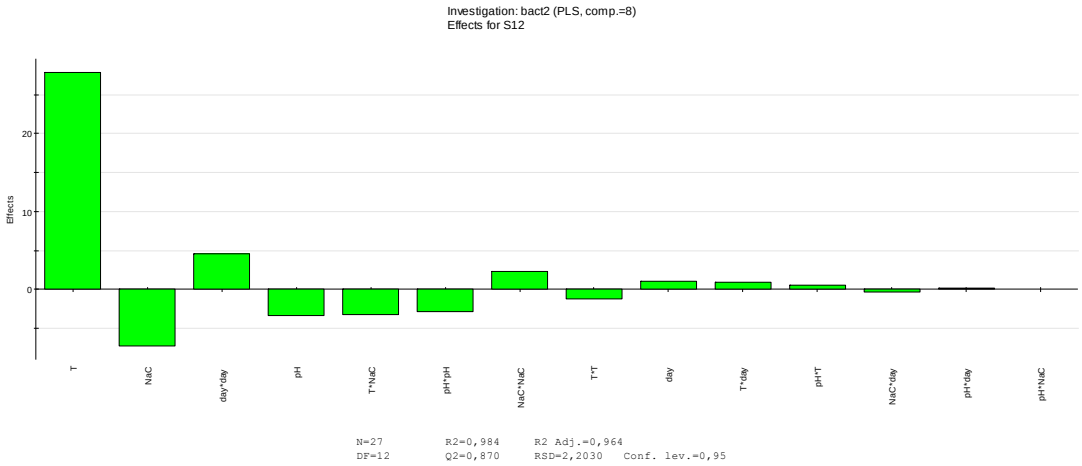


Figure 58 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S12.

Tableau 29 : Analyse de ANOVA de la souche S13.

S13	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**	**SD**
Total Corrected	26	3150,35	121,167			11,0076
Regression	14	3128,83	223,488	124,596	0,000	14,9495
Residual	12	21,5244	1,7937			1,33929
N = 27	Q2 =	0,939	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,993	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,985	RSD =	1,3393		

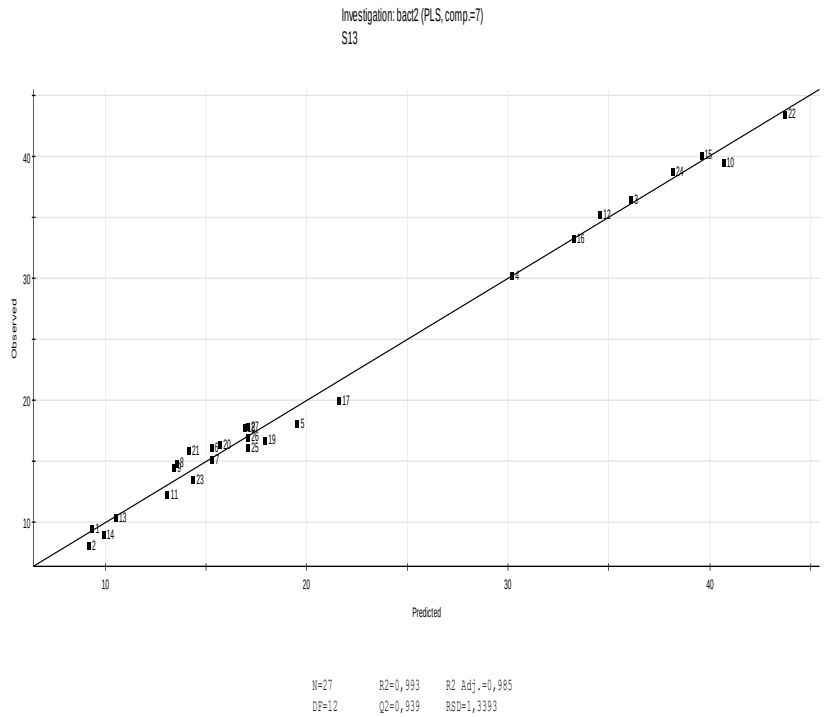


Figure 59 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S13.

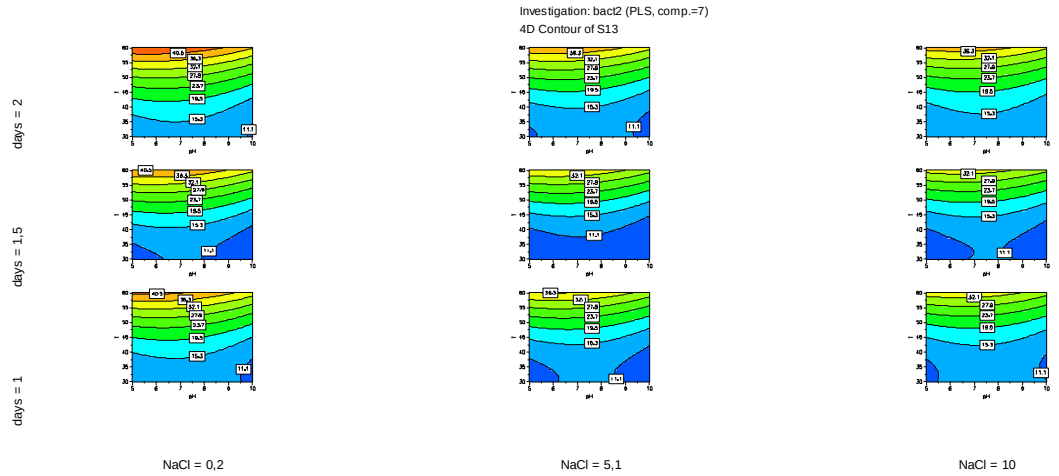


Figure 60 : Courbe isoréponse 4D de la souche S13.

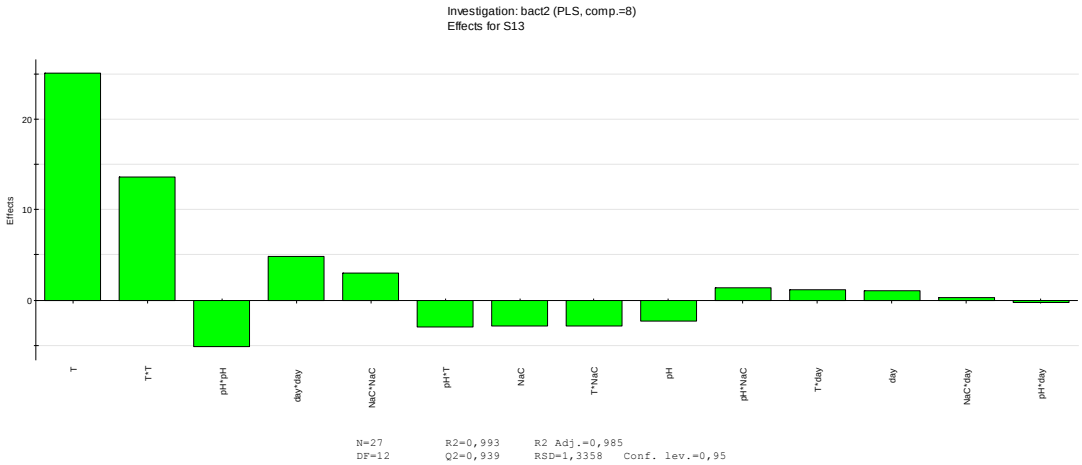


Figure 61: Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S13.

Tableau 30 : Analyse de ANOVA de la souche S14.

S14	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	16665,7	640,988			25,3177
Regression	14	16323,1	1165,93	40,8359	0,000	34,1458
Residual	12	342,62	28,5517			5,34338
N = 27	Q2 =	0,714	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,979	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,955	RSD =	5,3434		

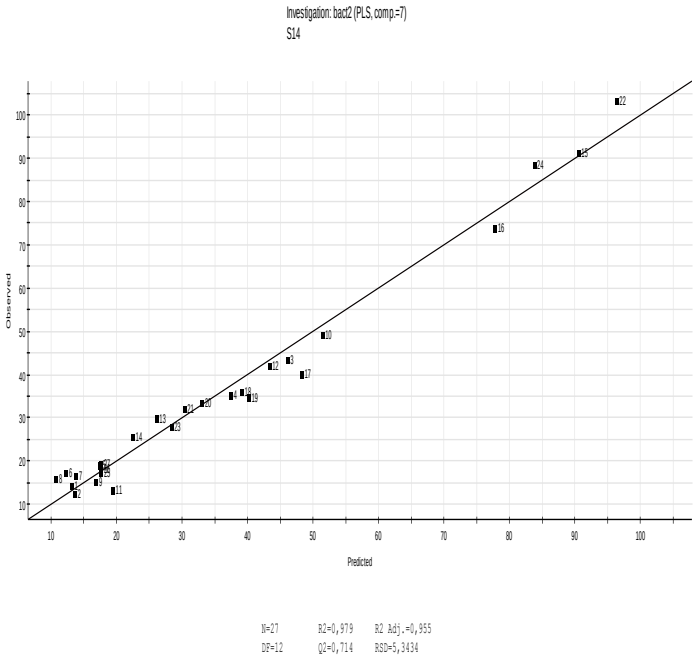


Figure 62 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S14

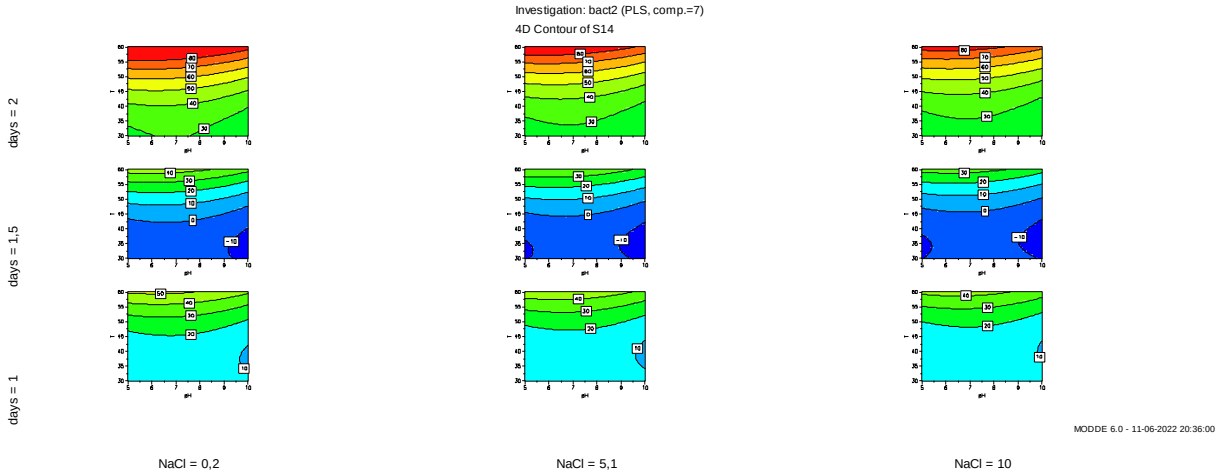


Figure 63 : Courbe isoréponse 4D de la souche S14.

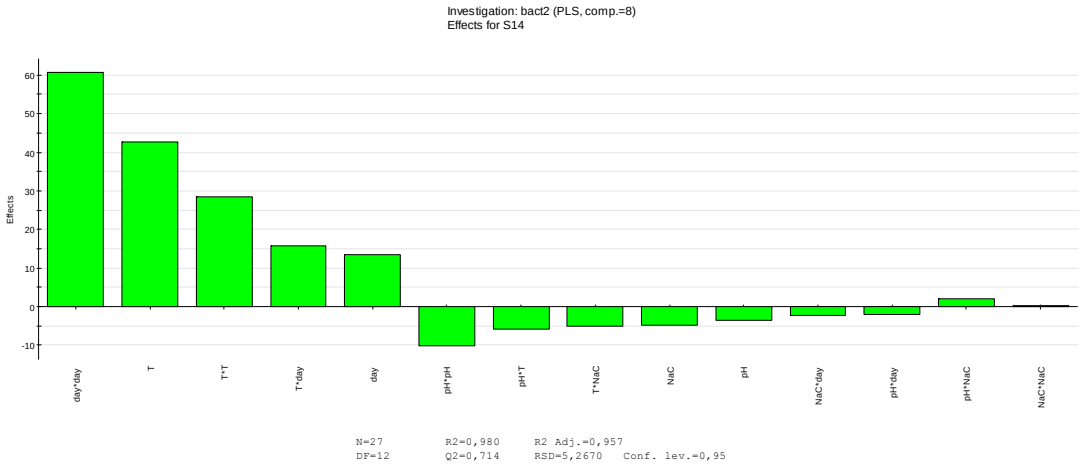


Figure 64 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S14.

Tableau 31 : Analyse de ANOVA de la souche S15.

S15	DF	SS	MS	F	P	SD
Total Corrected	26	21258,3	817,625			28,5941
Regression	14	20902,8	1493,05	50,399	0,000	38,6401
Residual	12	355,496	29,6246			5,44285
N = 27	Q2 =	0,755	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,983	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,964	RSD =	5,4429		

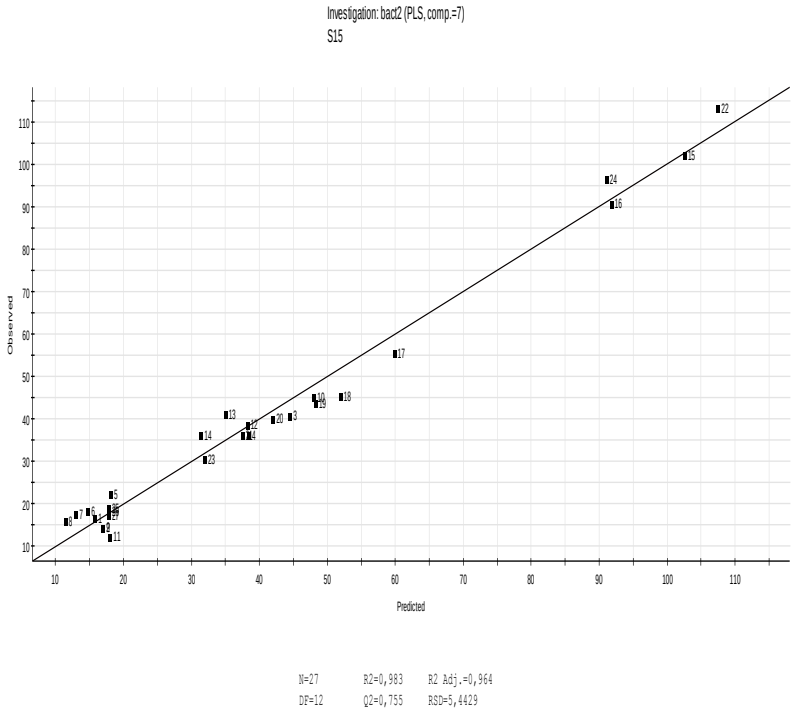


Figure 65 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S15.

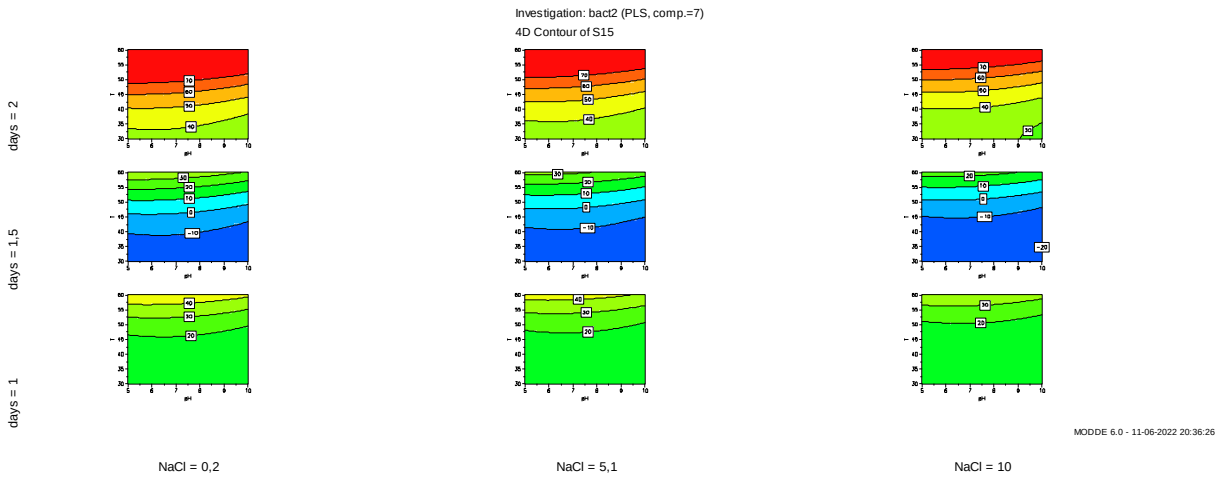


Figure 66 : Courbe isoréponse 4D de la souche S15.

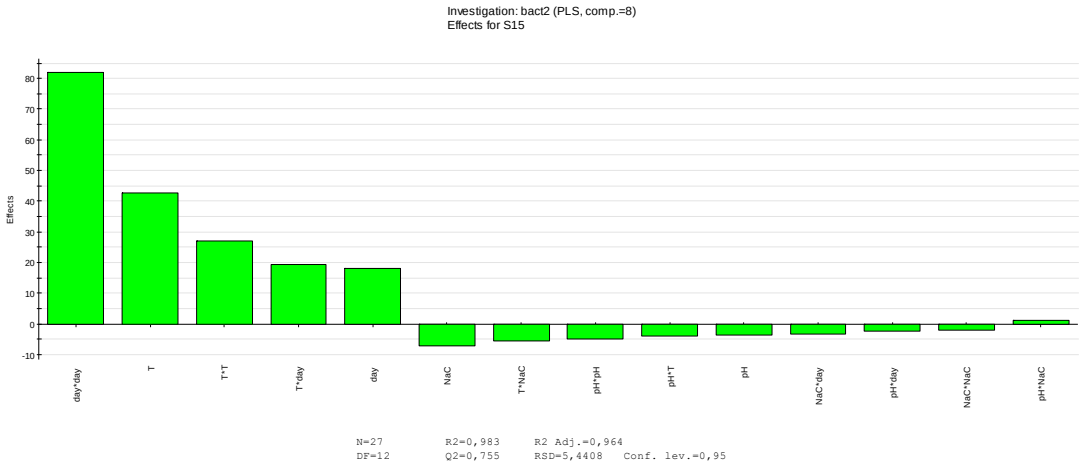


Figure 67 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S15.

Tableau 32 : Analyse de ANOVA de la souche S16.

S16	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	7550,35	290,398			17,0411
Regression	14	7509,46	536,39	157,412	0,000	23,1601
Residual	12	40,8905	3,40754			1,84595
N = 27	Q2 =	0,954	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,995	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,988	RSD =	1,8460		

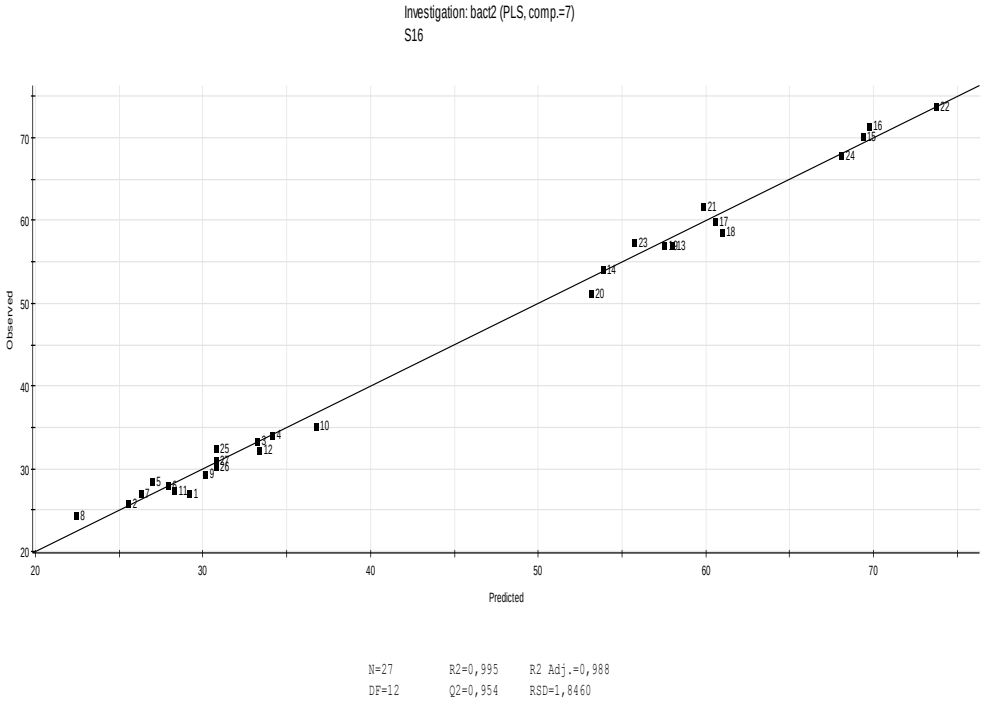


Figure 68 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S16.

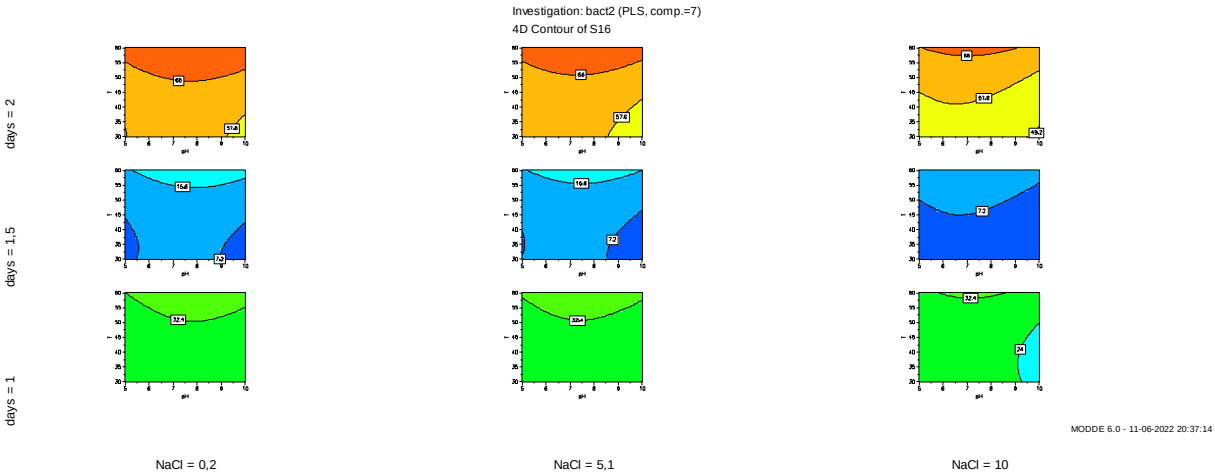


Figure 69 : Courbe isoréponse 4D de la souche S16.

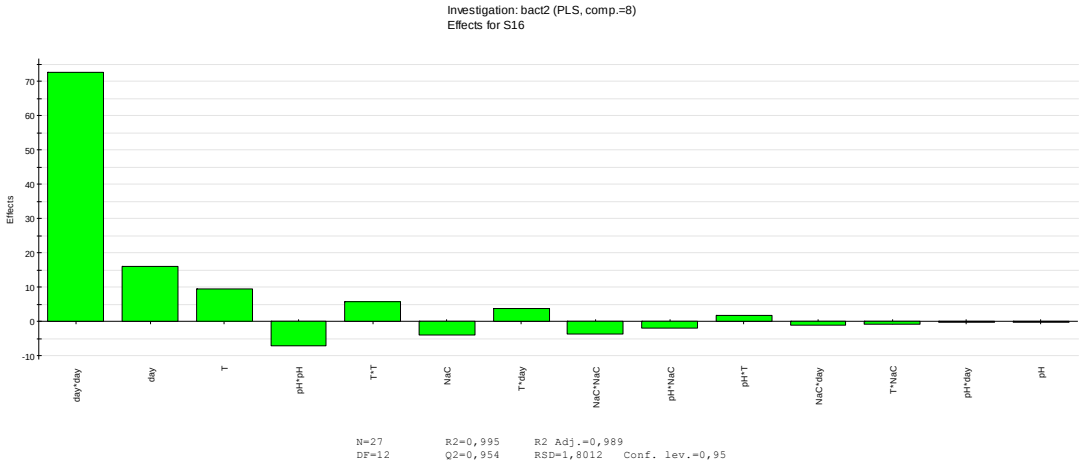


Figure 70 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S16.

Tableau 33 : Analyse de ANOVA de la souche S17.

S17	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	11971,9	460,456			21,4582
Regression	14	11873,1	848,076	102,999	0,000	29,1217
Residual	12	98,8059	8,23383			2,86946
N = 27	Q2 =	0,900	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,992	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,982	RSD =	2,8695		

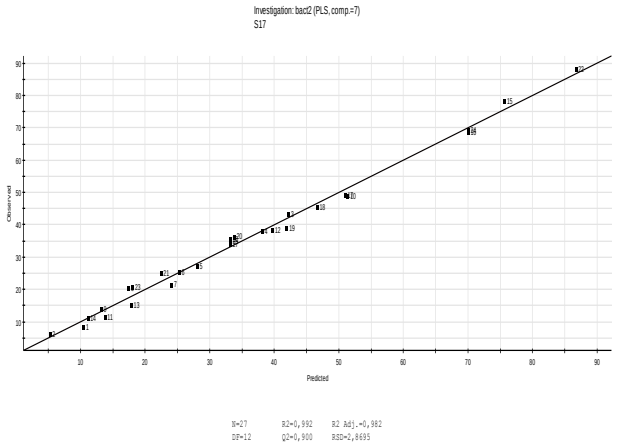


Figure 71 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S17

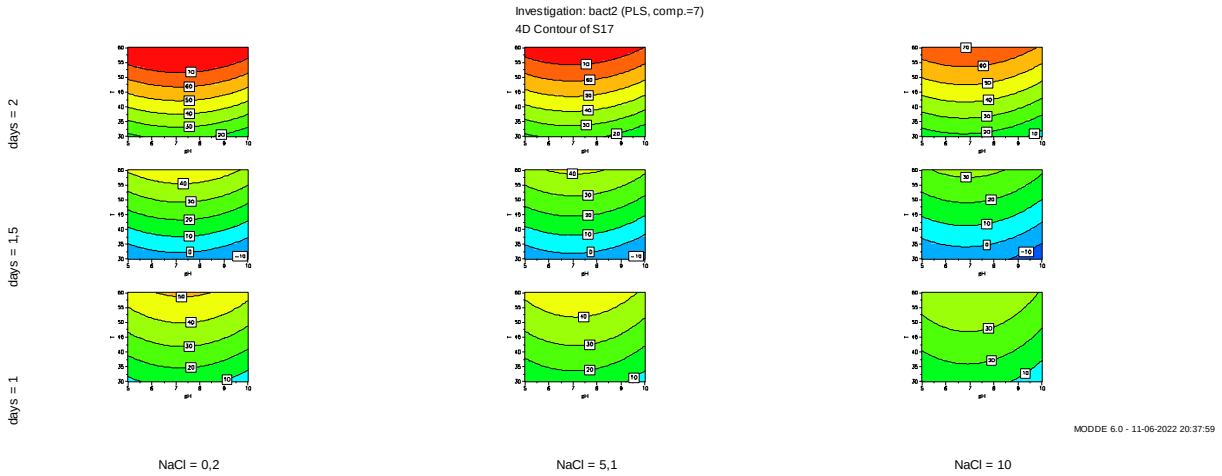


Figure 72 : Courbe isoréponse 4D de la souche S 17.

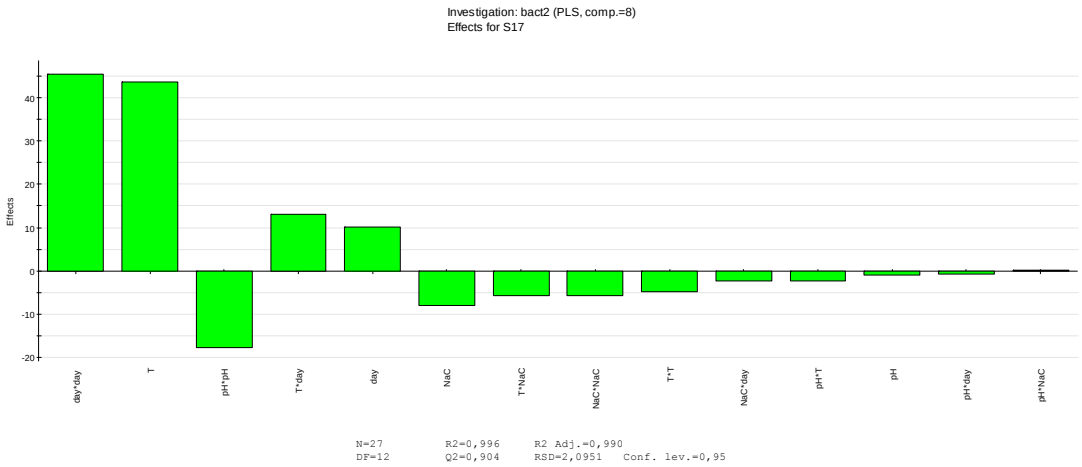


Figure 73 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S17.

Tableau 34 : Analyse de ANOVA de la souche S18.

S18	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	3216,68	123,718			11,1229
Regression	14	3185,09	227,506	86,4137	0,000	15,0833
Residual	12	31,5931	2,63276			1,62258
N = 27	Q2 =	0,912	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,990	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,979	RSD =	1,6226		

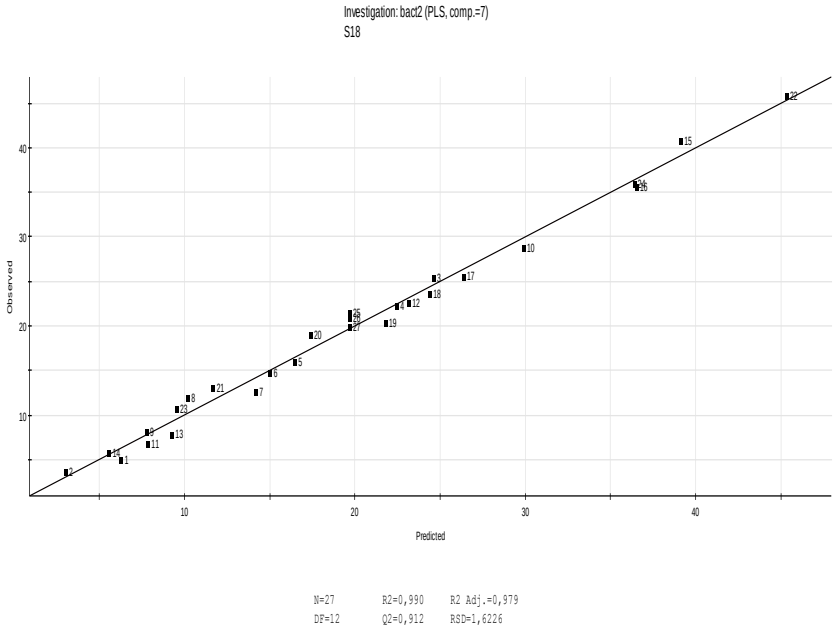


Figure 74 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S18.

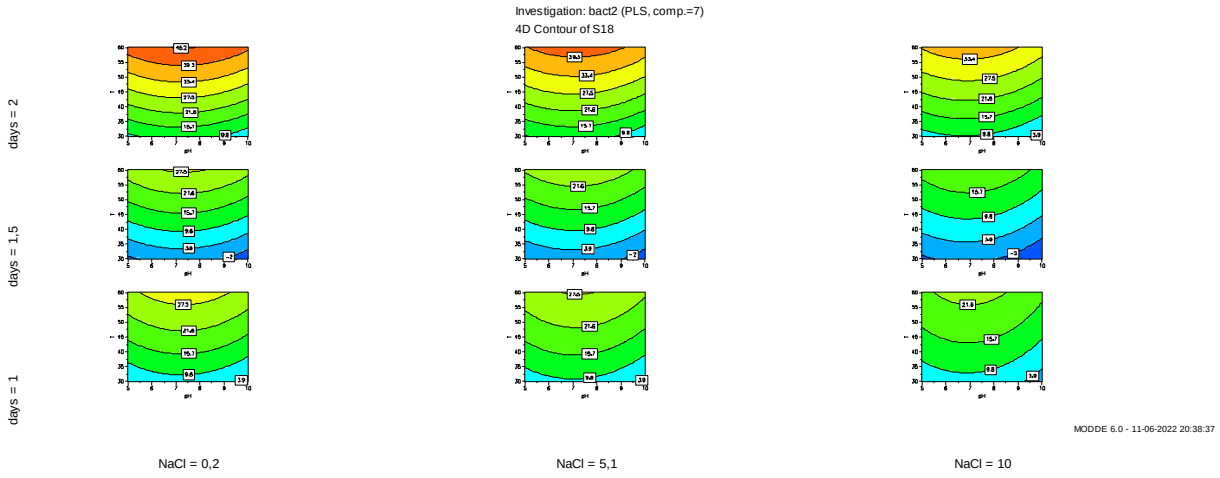


Figure 75 : Courbe isoréponse 4D de la souche S18.

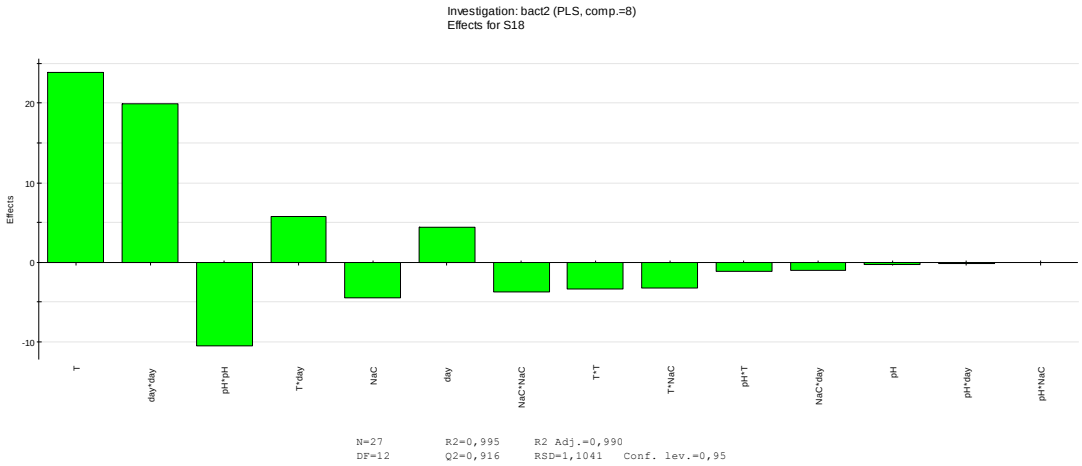


Figure 76 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S18.

Tableau 35 : Analyse de ANOVA de la souche S19.

S19	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	6664,9	256,342			16,0107
Regression	14	6608,11	472,008	99,746	0,000	21,7257
Residual	12	56,7852	4,7321			2,17534
N = 27	Q2 =	0,889	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,991	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,982	RSD =	2,1753		

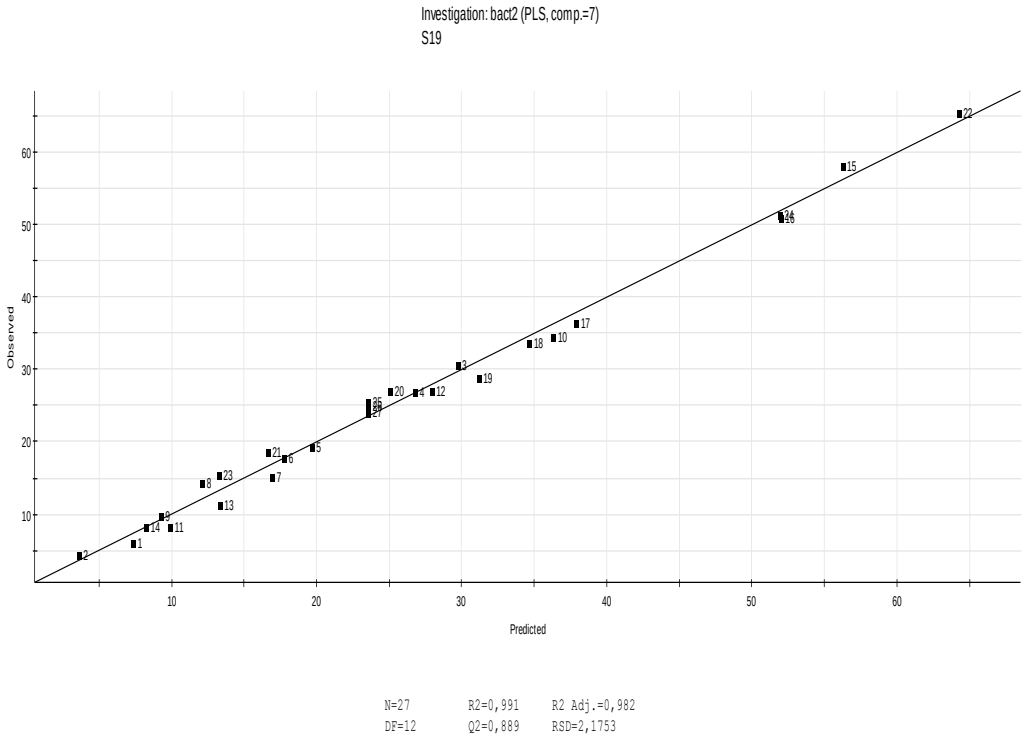


Figure 77 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S19.

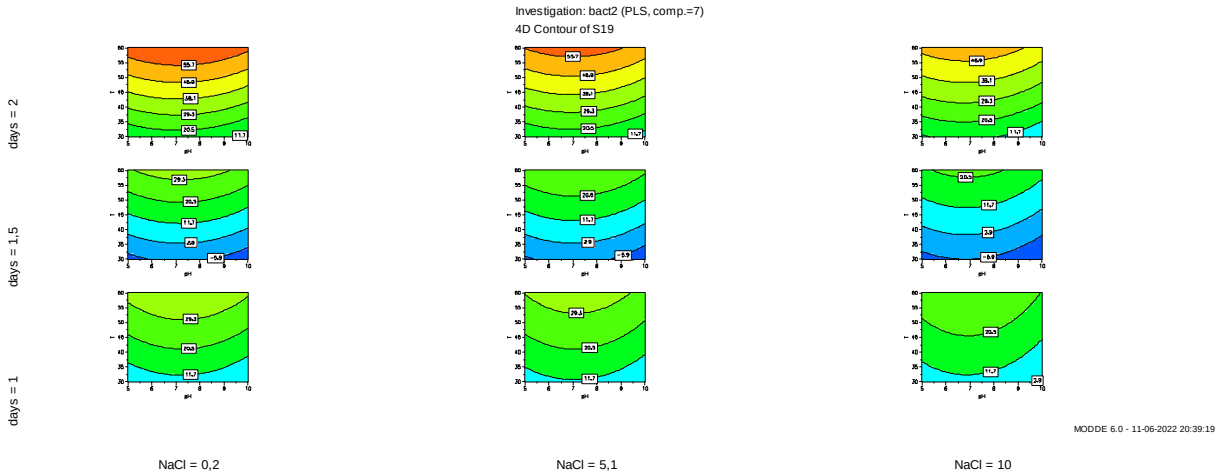


Figure 78 : Courbe isoréponse 4D de la souche S19.

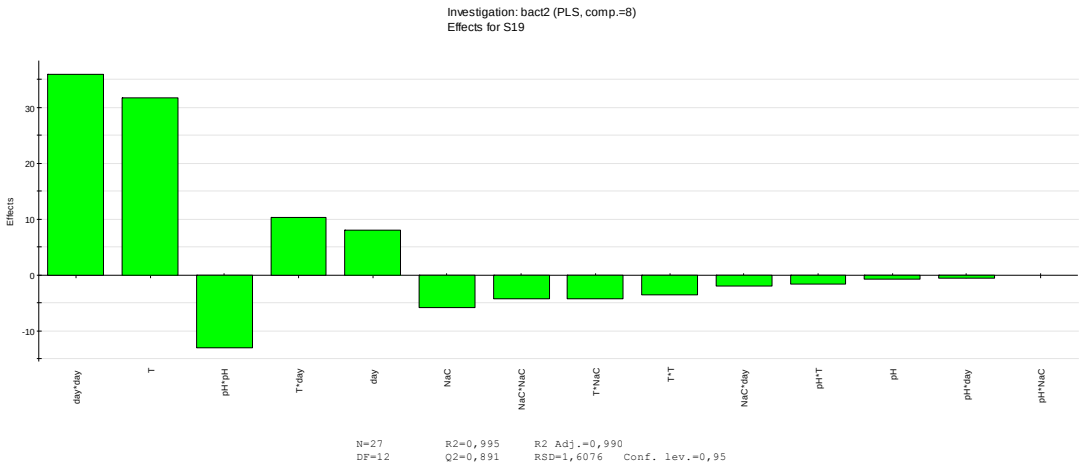


Figure 79 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S20.

Tableau 36 : Analyse de ANOVA de la souche S20.

S20	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**	**SD**
Total Corrected	26	15865,6	610,214			24,7025
Regression	14	15736,4	1124,03	104,425	0,000	33,5265
Residual	12	129,168	10,764			3,28086
N = 27	Q2 =	0,895	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,992	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,982	RSD =	3,2809		

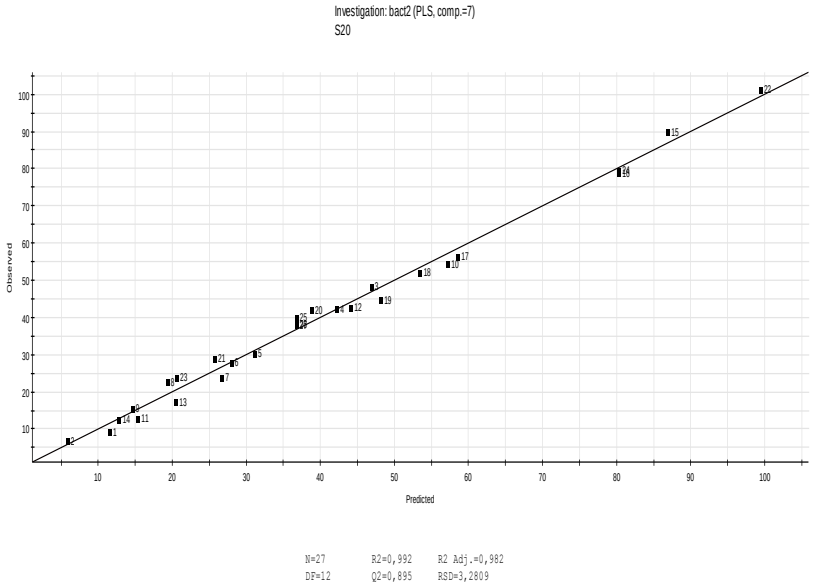


Figure 80 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S20.

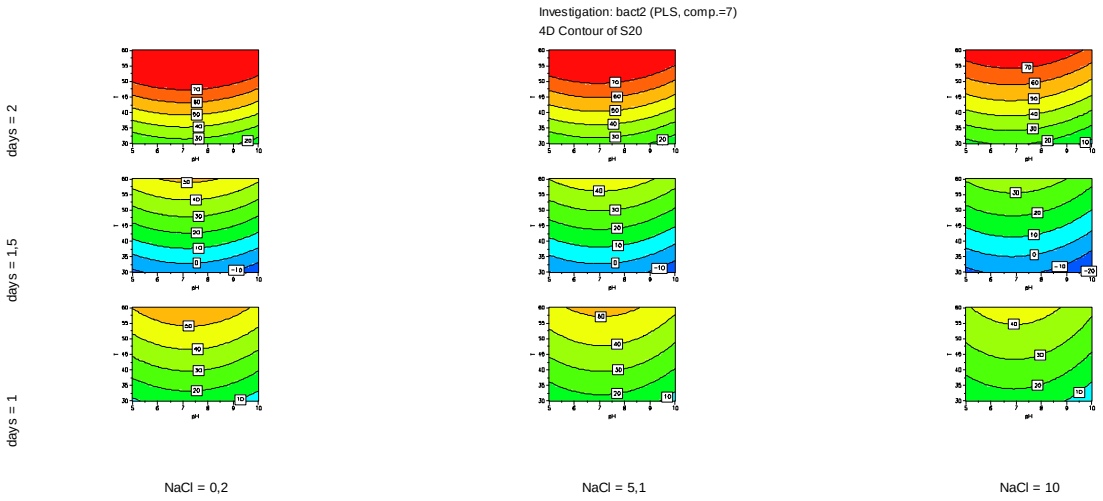


Figure 81 : Courbe isoréponse 4D de la souche S20.

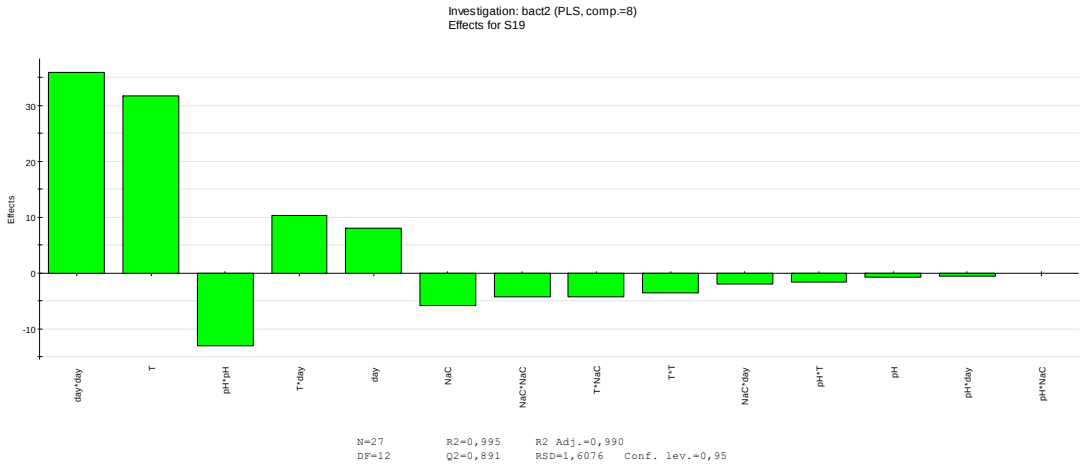


Figure 82 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S20.

Tableau 37 : Analyse de ANOVA de la souche S21.

S21	DF	SS	MS	F	p	SD
Total Corrected	26	3465,21	133,277			11,5446
Regression	14	3432,5	245,179	89,9491	0,000	15,6582
Residual	12	32,709	2,72575			1,65098
N = 27	Q2 =	0,930	Cond. no. =	Infinite		
DF = 12	R2 =	0,991	Y-miss =	0		
Comp. = 7	R2 Adj. =	0,980	RSD =	1,6510		

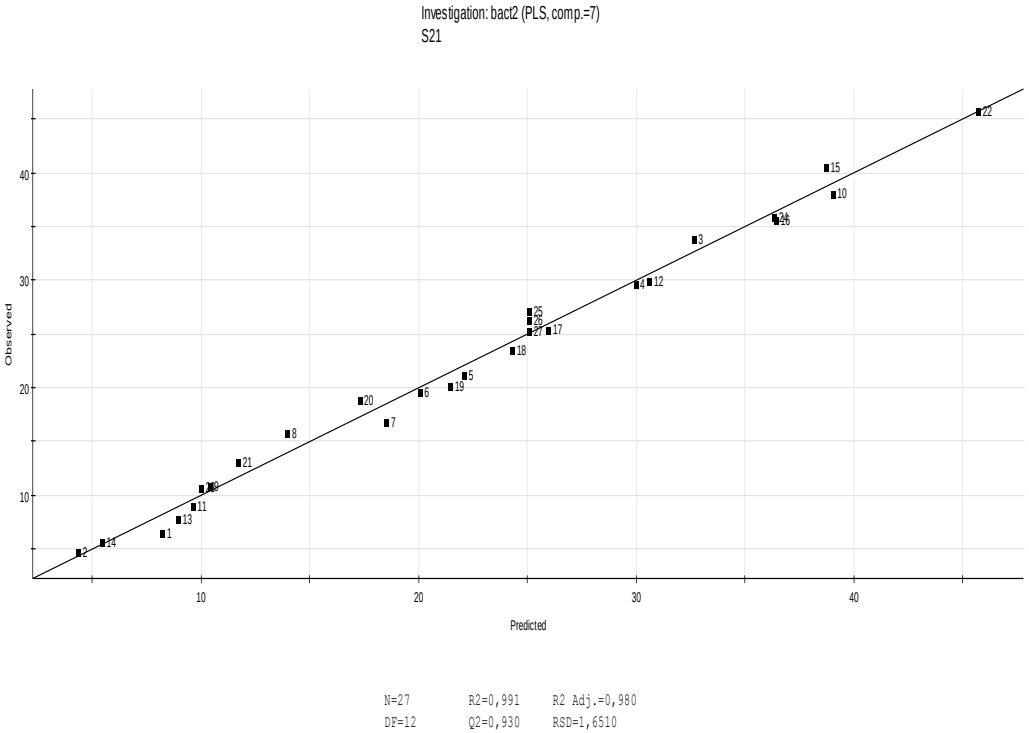


Figure 83 : Régression linéaire entre les valeurs prédits et expérimentales de la DO de souche S21.

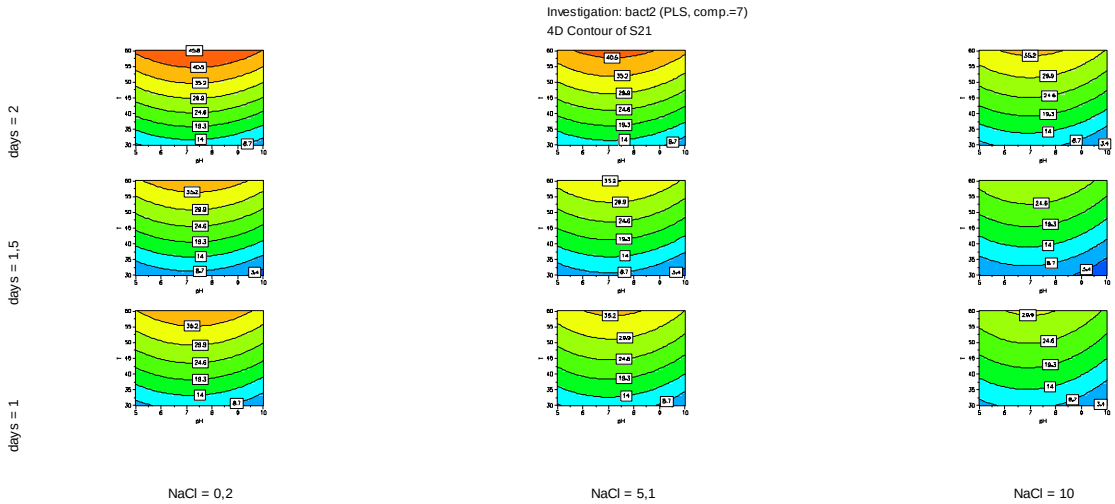


Figure 84 : Courbe isoréponse 4D de la souche S21.

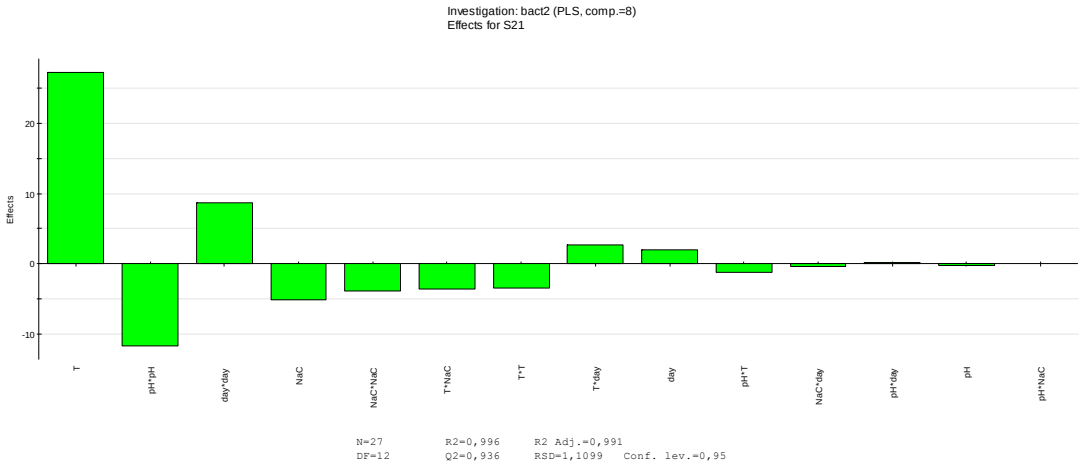


Figure 85 : Influence des facteurs de modèle sur la réponse DO de la souche S21.

Tableau 38 : Tableau récapitulatif des résultats de l'optimisation des paramètres de croissance des souches identifiées.

Espèce	**pH**	**T**	**NaCl**	**Jours**
H4 : *Bacillus Farraginis*	7,1	60	0,2	1,2
I4 : *Brevibacillus Brevis*	6,1	60	0,2	1,4
5 : *Paenibacillus residui*	5,6	60	0,2	1,8
W6 : *Paenibacillus Panacisoli*	6,3	60	0,2	1,9
2 : *Bacillus Cereus*	6,1	60	0,2	2
M : *Bacillus Pumilus*	6,1	60	0,2	2
W9 : *Bacillus licheniformis*	6	60	0,2	1
11 : *Bacillus Acidiceler*	6	60	0,2	1
H11	6	60	0,2	1
A2 : *Brevibacillus Brevis*	6	60	0,2	1
H8 :*Bacillus sporothermodurans*	6	60	0,2	1
H10 : *Bacillus niacini*	6	60	0,2	1
I5 : *Lysinibacillus Sphaericus*	6	60	0,2	1
W5 : *Bacillus Circulans*	6	60	0,2	1
W13 : *Bacillus Pumilus*	5,5	60	0,2	1,9
W12 : *Bacillus Circulans*	5,5	60	0,2	1,9
W8 : *Brevibacillus Brevis*	5,5	60	0,2	1,9
W7 : *Bacillus Niacini*	5,5	60	0,2	2
H14 : *Bacillus Firmus*	5,5	60	0,2	2
W1 : *Brevibacillus Brevis*	6,2	60	0,2	2
W15 : *Brevibacillus Brevis*	6,1	60	0,2	2

D'après les résultats obtenus à partir de plan d'expérience, toutes les souches testées ont pu se développer dans une température entre 30 et 60°C avec un optimum à 60°C, et a des valeurs de pH de 5 à 10avec une croissance optimale entre 5.5 et 7, l'ensemble des

souches ont pu tolère des concentrations de sel jusqu'à 15% (p/v), l'optimum de croissance est produit à 0.2% de NaCl (p/v).

- Une étude sur des bactéries thermophiles formant des endospores appartenant au genre *Anoxybacillus, Bacillus, Brevibacillus* et *Geobacillus*, isolées à partir de 2 sources hydrothermales en Algérie, montre que ces souches étaient modérément thermophiles et neutrophiles, avec des plages de croissance entre 30 et 75°c et une croissance optimale entre 50 et 60°c, et a des valeurs de pH 5 a 9 avec une croissance optimales entre pH 6.5 et 7.5, le totale des souches ont pu croître à 0% (p/v) de Nacl et tolérés des concentration compris entre 1et 10% (p/v), avec une croissance optimale a 3% (p/v) pour la souche la plus halotolérante **(Gomri et al., 2018).**
- Une autre étude sur 293 souches bactériennes qui ont été isolées d'eau et des sédiments des huit sources chaudes terrestres dans le nord-est de l'Algérie,tous les isolats testés pour la tolérance à la température ont pu se développer entre 30 et 80°c avec des variations entre les souches. Il a été noté que toutes les souches se développent à 55°c en 24H à une semaine, parmi eux, 40.2% tolérent 65°c, 10.87% peuvent tolérer 75°c, tandis que seulement 5.11% des isolats peuvent se développer à 80°c et 52.8% à 37°c. Le sel n'était pas nécessaire pour la croissance, les isolats ont toléré des concentrations de sel dans un milieu additionné de 1à 15% de Nacl (p/v). Alors qu'aucune des souches n'a pu se développer à 20%. Le nombre de souches en croissance a diminué à mesure que la concentration en sel augmentait. De plus, les valeurs de pH testées variaient de 5 à 9, presque toutes les souches ont poussé à un pH compris entre 6.5 et 8.5 **(Benammar et *al*, 2020).** Une *Actinomycete* thermophile isolé par **(Begani et *al*, 2018)**à partir d'un échantillon de sol dans la région de Bikaner du désert de Thar au Rajasthan, la croissance de la souche D8 observée dans la plage de pH de 5 à 11 avec un optimum à pH 7. La souche a bien poussé dans la plage de température de 25 à 55°c avec une température optimale de 45°c, et elle a montré une tolérance au sel allant jusqu'à 7.5% avec un optimum à 2.5% de Nacl.

III.6 Modélisation des résultats obtenus le long de ce travail par support vector machine (SVM) :

L'objective de notre travail est de modélisé les données expérimentales obtenu dans la première partie.

III.6.1 Analyse statistique des données :

La base de données considérée rapporte le croissance (DO) de 21 Souche dans 4 condition opératoire et regroupant en total 655 points expérimentaux.

Le tableau 39 récapitule les variables dépendantes et indépendantes, leurs plages, unité de mesure, et le domaine d'étude.

Tableau 39 Informations les plus importantes sur les données ajustées dans ce travail.

Données	**unité**	**min**	**max**
Gram	-	0*	1*
CMC	-	0	1
G, au lait	-	0	1
Tween 20	-	0	1
G, à l'amidon	-	0	1
G, pectine	-	0	1
G, j, d'œuf	-	0	1
B, nitraté	-	0	1
Mobilité	-	0	1
ONPG	-	0	1
ADH	-	0	1
ODC	-	0	1
CIT	-	0	1
TDA	-	0	1
IND	-	0	1
VP	-	0	1
GLU	-	0	1
MAN	-	0	1
INO	-	0	1
SOR	-	0	1
RHA	-	0	1
SAC	-	0	1
MEL	-	0	1
AMY	-	0	1
ARA	-	0	1
pH	-	5	10
T	°C	30	60
Concentration de NaCl	%(p/v)	0,2	15
Jours	jour	1	2

*** positive = 1**
*** Négative=2**

III.6.2 Modèle DA-SVMr.

Des papiers précédents ont traité le couplage des algorithmes d'optimisation basés sur l'intelligence en essaim avec des machines d'apprentissage automatique et les résultats étaient prometteurs [1,2].

Dans cette partie, la base de données obtenue à partir de la partie expérimentale ajustée pour développer le modèle SVMr est utilisée, tandis que le modèle proposé est basé sur l'algorithme d'apprentissage SVMr associé à l'algorithme de libellule DA pour l'optimisation de ses hyper-paramètres. Les étapes menant au développement du modèle optimal DA-SVMr hybride sont illustrées dans l'organigramme présenté à **(Figure 86).**

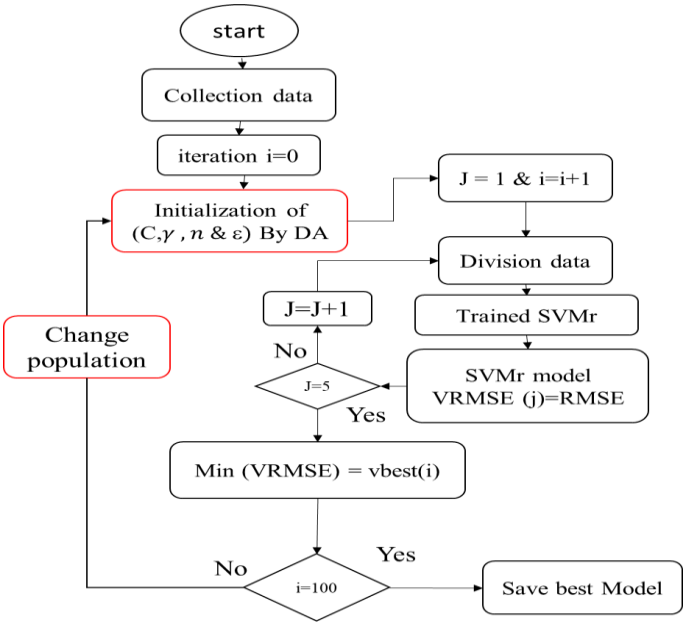


Figure 86 : Organigramme du processus d'optimisation par DA-SVM.

Le principe de l'algorithme d'apprentissage de la machine reste le même, cependant, l'algorithme DA alimente initialement le SVM avec une combinaison aléatoire d'hyper-paramètres dans leurs plages préalablement définies. Au cours de cinq itérations, les étapes commençant par la division des données et jusqu'au développement du modèle SVMr sont répétées et la valeur minimale de RMSE obtenue est sauvegardée comme meilleure valeur.

Ensuite, l'algorithme de libellule DA génère une nouvelle population d'hyper-paramètres pour l'algorithme SVMr et le même ensemble d'étapes est répété afin d'obtenir un nouveau meilleur RMSE, et cela se répète pour 100 essais, parmi lesquels le RMSE minimal correspond au modèle DA-SVMr optimal résultant.

Différents critères d'évaluation statistique des modèles sont adoptés dans le présent travail afin d'évaluer la capacité prédictive des modèles développés, l'erreur quadratique moyenne

(RMSE), l'erreur absolue moyenne (MAE), l'erreur de pourcentage absolu moyen (MAPE), le coefficient de corrélation (R), le coefficient de détermination (R^2) et la coordonnée d'interception τ. Les équations mathématiques pour ces paramètres sont :

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\left(\gamma_i^{\infty Exp} - \gamma_i^{\infty cal}\right)^2}$$

$$MAE = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left|\left(\gamma_i^{\infty Exp} - \gamma_i^{\infty cal}\right)\right|$$

$$MAPE(\%) = \frac{100}{N}\sum_{i=1}^{N}\left|\frac{\gamma_i^{\infty Exp} - \gamma_i^{\infty cal}}{\gamma_i^{\infty Exp}}\right|$$

$$R = \frac{\left[\sum_{i=1}^{N}\left(\gamma_i^{\infty Exp} - \overline{\gamma}^{exp}\right) * \left(\gamma_i^{\infty cal} - \gamma^{\infty cal}\right)\right]}{\left[\sqrt{\sum_{i=1}^{N}\left(\gamma_i^{\infty Exp} - \bar{\gamma}^{exp}\right)^2} * \sqrt{\left(\gamma_i^{\infty cal} - \gamma^{\infty cal}\right)^2}\right]}$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(\gamma_i^{exp} - \gamma_i^{cal})^2}{\sum_{i=1}^{n}(\gamma_i^{exp} - \bar{\gamma}^{exp})^2}$$

Afin d'évaluer la capacité prédictive du modèle SVMr optimisé, le vecteur d'accord de validation et le graphique d'accord de validation de la variable de réponse prédite par rapport à la variable expérimentale correspondant à l'ensemble de données de validation uniquement sont analysés. En utilisant la fonction Matlab "postreg", la régression linéaire de la sortie calculée par rapport à la sortie expérimentale est visualisée voire figure01. Le tableau 01 représente les paramètres de model optimale.

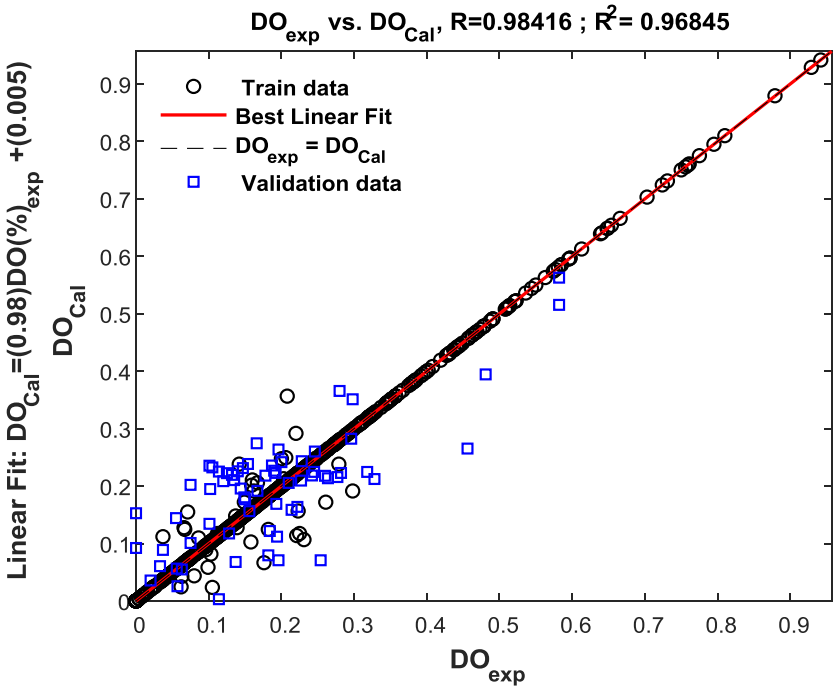


Figure 87 : Corrélation léniaire entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales.

Tableau 40 : **hyper-paramètres de modèle SVM.**

Noyau	**C**	**ε**	**γ**	**Quantité de vecteurs de support**
Gaussienne	422	0.006	1.0	590

- Interface graphique :

Une application exécutable a été développée afin de faciliter l'utilisation de modèle établie.

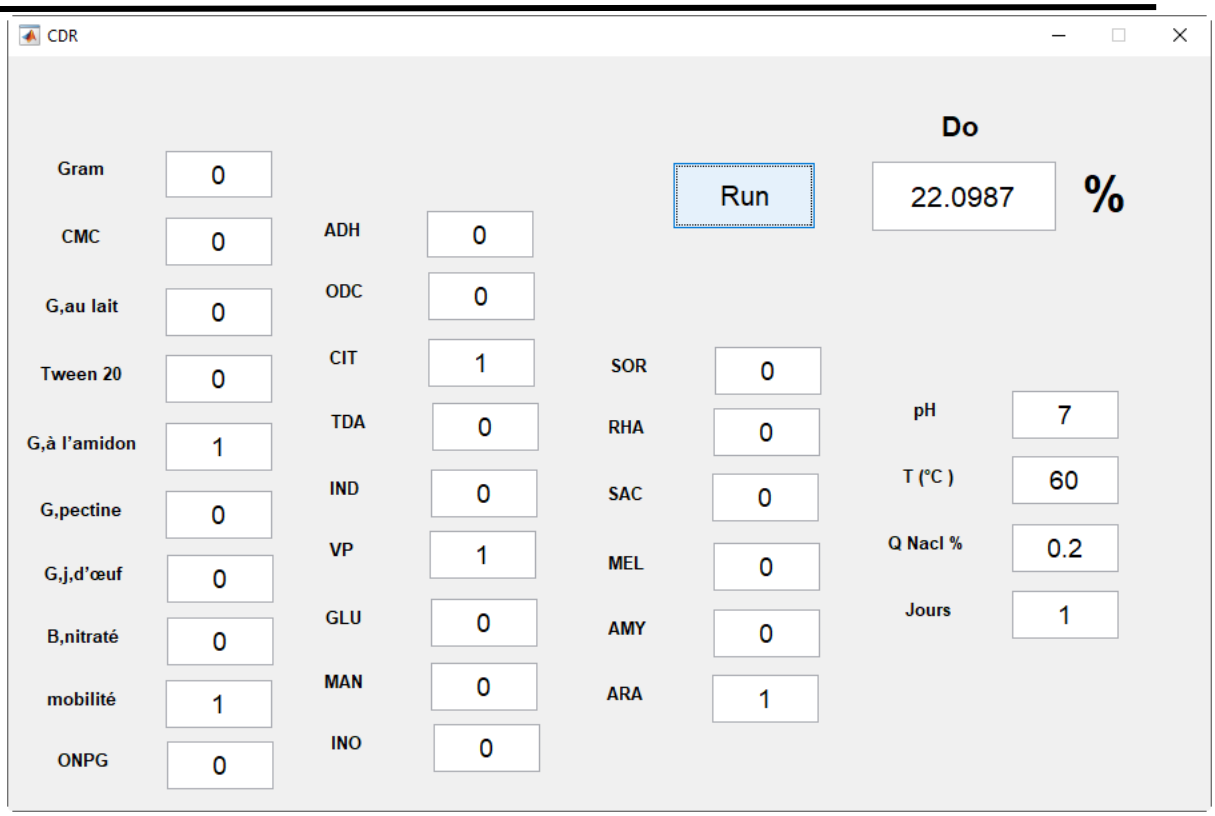


Figure 88 : Interface graphique (capture d'écran).

Conclusion

Conclusion

Les microorganismes thermophiles possèdent la capacité d'adaptation à des environnements chauds tels que les sources hydrothermales.

Ce travail est une étude d'optimisation des paramètres de croissances, de l'évaluation de l'activité enzymatique et antimicrobienne et de la capacité de formation de biofilm des souches bactériennes isolées 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).

33 souches sont subies une caractérisation phénotypique suivie d'une analyse biochimique. Les résultats ont montré que la plupart des souches sont des bacilles Gram positif ces dernies présentent 4 genres Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus, et Lysinibacillus.

Ces souches ont fait l'objet d'une évaluation des activités enzymatiques sur sept milieux gélosés additionnés de différents substrats : amidon, caséine, carboxymethylcellulose, Tween 80, tween 20 et Jaune d'œuf, pour la détermination des activités amylolytique, protéolytique, cellulolytique et lipolytique respectivement. Les résultats obtenus ont révélé une diversité de l'activité hydrolytique des enzymes extracellulaires de ses souches avec la prédominance de l'activité amylolytique avec 29 souches amylase positif.

La recherche de l'activité antimicrobiennes montre la présence de cet effet contre *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *staphylococcus epidermidis* et *Aspergillus brasiliensis* pour quelques souches. Ainsi les méthodes quantitatives et qualitatives de l'aptitude de formation de biofilm de ces bactéries ont évalué également la capacité de ces derniers à produire du slime.

L'étude d'optimisation des paramètres de croissance montre que pour la majorité des souches la Température 60°c, la concentration de NaCl a (0.2%) et le pH entre 5.5 et 7.1 sont les meilleures conditions pour une croissance maximale.

En vue de l'importance des microorganismes thermophiles, notre étude ouvre des perspectives diverses :

- La purification et la caractérisation des activitées enzymatiques les plus importantes.
- Une identification des substances inhibitrices, élargir le spectre d'activité contre d'autre souches pathogènes et testé un vivo l'effet de ces souches afin de l'intégrer dans le domaine pharmaceutique.
- Une optimisation supplémentaire d'autre paramètres de croissance pour une activité enzymatique et anti microbienne optimale
- La validation et le développement des modèles qui permettraient d'étudier l'effet d'autre facteurs affectant la croissance de ces souches.

Conclusion

Et il nous seraient intéressant à l'avenir d'exploiter d'autre sources hydrothermales en Algérie pour l'isolement et l'identification de nouveau microorganismes thermophiles.

Enfin, dans ce travail la modélisation des données expérimentales a permis de construire un modèle descriptif de l’évolution de la population bactérienne étudiées.

Référence Biographique

A

Abussaud, M. J., Alanagreh, L., & Abu-Elteen, K. (2013). Isolation, characterization and antimicrobial activity of Streptomyces strains from hot spring areas in the northern part of Jordan. *African Journal of Biotechnology*, *12*(51), 7124-7132.

Acharya, S., & Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(3), 844-856.

Adedayo, M. R., Mohammed, M. T., Ajiboye, A. E., & Abdulmumini, S. A. (2021). Pectinolytic activity of aspergillus niger and Aspergillus flavus grown on grapefruit (citrus Parasidis) peel in solid state fermentation. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, *27*(2), 93-105.

Adigüzel, A., Inan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce, M., Beldüz, A. O., & Bariş, Ö. (2011). Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, *35*(3), 267-274.

Aissat, I., & Mekki, N. (2019). *Isolement et caractérisation de bactéries de la source naturelle de Hammam Guergour (Nord de Sétif-Algérie)* (Doctoral dissertation, Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila).

Ajeje, S. B., Hu, Y., Song, G., Peter, S. B., Afful, R. G., Sun, F., Asadollahi, M. A., Amiri, H., Abdulkhani, A., & Sun, H. (2021). Thermostable Cellulases / Xylanases From Thermophilic and Hyperthermophilic Microorganisms: Current Perspective. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *9*, 794304. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794304.

Alain K., Geslin C., Godfroy A., Prieur D. (2010). Les thermophiles [en ligne] https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche_big2010_thermophiles (Consulté le 3/6/2019).

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Duraipandiyan, V., Valan Arasu, M., & Salem-Bekhit, M. M. (2016). Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic Streptomyces sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. *Extremophiles*, *20*(1), 79-90.

Aliabadi, N., Aminzadeh, S., Karkhane, A. A., & Haghbeen, K. (2016). Thermostable chitinase from Cohnella sp. A01: isolation and product optimization. *Brazilian journal of microbiology*, *47*, 931-940.

Alkhalili, R. N., Bernfur, K., Dishisha, T., Mamo, G., Schelin, J., Canbäck, B., ... & Hatti-Kaul, R. (2016). Antimicrobial protein candidates from the Thermophilic Geobacillus

sp. strain ZGt-1: production, proteomics, and bioinformatics analysis. *International journal of molecular sciences*, *17*(8), 1363.

Alrumman, S. A., Mostafa, Y. S., Al-Qahtani, S. T., 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.

Amroune, M., Bouktir, T., & Musirin, I. (2018). Power system voltage stability assessment using a hybrid approach combining dragonfly optimization algorithm and support vector regression. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *43*(6), 3023-3036.

Ardhi, A., Sidauruk, A. N., Suraya, N., Pratiwi, N. W., & Pato, U. (2020). Molecular identification of amylase-producing thermophilic bacteria isolated from Bukit Gadang Hot Spring, West Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *21*(3).

Asif, M. (2017). Review on Antimicrobial Agents. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, *1*(5), 179-185.

B

Baltaci, M. O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, G., & Adiguzel, A. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnologically important enzyme production. *Geomicrobiology journal*, *34*(1), 53-62.

Bertoldo, C., & Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*, *6*(2), 151-160.

Bragger J M., Daniel R M., Coolbear T., Morgan HW. (1989).Very stableenzymes fromextremely thermophilic archae bacteria and eubacteria. AppliedMicrobiologyAndBiotechnology,31:556-561.

Begani, J., Lakhani, J., & Harwani, D. (2019). A broad-spectrum antimicrobial activity of thermophilic sp. producing Nocardiopsis multiple extracellular enzymes of industrial and therapeutic use. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *5*(3), 525-534.

Benkahoul, M., Talhi, A., & Boulefkhad, N. (2017). Bactéries des environnements chauds Algériens: isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 25-35.

Benammar, L., İnan Bektaş, K. A. D. R. İ. Y. E., Menasria, T., Beldüz, A. O., Güler, H. I., Bedaida, I. K., ... & Ayachi, A. (2020). Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(4), 1987-2007.

Bibra, M., Kunreddy, V. R., & Sani, R. K. (2018). Thermostable xylanase production by Geobacillus sp. strain DUSELR13, and its application in ethanol production with lignocellulosic biomass. *Microorganisms*, *6*(3), 93.

Bouacem, k. (2016). Caractérisation des souches bactériennes isolées à partir de source thermale du Nord-Algérien (thèse de doctorat, Faculté des sciences biologiques).

Bouanane-Darenfed, A., Fardeau, M. L., Grégoire, P., Joseph, M., Kebbouche-Gana, S., Benayad, T., ... & Ollivier, B. (2011). Caldicoprobacteralgeriensis sp. nov. A new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Current Microbiology*, *62*(3), 826-832.

C

Capdepuy, M., & Canellas, J. (1995). La flore bactérienne des eaux thermales et minérales. *La Houille Blanche*, (2-3), 70-72.

Canganella, F. (2012). Ecologie et biotechnologie des micro-organismes extrêmophiles, en particulier thermophiles anaérobies. *Extrémophiles : ressources durables et implications biotechnologiques*, 175-203.

Castilla, A., Panizza, P., Rodríguez, D., Bonino, L., Díaz, P., Irazoqui, G., & Giordano, S. R. (2017).A novel thermophilic and halophilic esterase from Janibacter sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme and microbial technology*, *98*, 86-95.

Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, *6*(2), 1-15.

Charnock, S. J., & McCleary, B. V. (2005). Les enzymes: Applications industrielles et analytiques. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle*, *32*(116), 11-15.

Cho, A. R., Yoo, S. K., & Kim, E. J. (2000). Cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of a thermophilic lipase from Bacillus thermoleovorans ID-1. *FEMS microbiology letters*, *186*(2), 235-238.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. *CLSI document M07-A9*, *32*.

Cornec, L., Loaec, M., Rougeaux, H., Guezennec, J., & Dietrich, J. (1997). Molécules d'intérêt biotechnologique issues des micro-organismes hydrothermaux: enzymes thermostables et polysaccharides.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, *284*(5418), 1318-1322.

Crouzet, M., Le Senechal, C., Brözel, V. S., Costaglioli, P., Barthe, C., Bonneu, M., ... & Vilain, S. (2014). Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC microbiology*, *14*(1), 1-12.

D

Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, *13*(4), 1925-1965.

De Vos P., Garrity G M., Jones D., Krieg NR., Ludwig W., Rainey FA.,Schleifer K.H.,Whitman W. B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.2 ed,The Firmicute,Springer, New York, 3:63-67.

Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bacteries et de levure-moisissures. International Standar Book N umber 978-2-7430-1565-7, 772.

Dinsdale, A. E., Halket, G., Coorevits, A., Van Landschoot, A., Busse, H. J., De Vos, P., & Logan, N. A. (2011). Emended descriptions of Geobacillus thermoleovorans and Geobacillus thermocatenulatus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *61*(8), 1802-1810.

Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., & Renganathan, P. (2017). Extremozymes: a potential source for industrial applications.

E

Eccleston, G. P., Brooks, P. R., & Kurtböke, D. I. (2008). The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the Sunshine Coast in Australia. *Marine Drugs*, *6*(2), 243-261.

E Ibrahim, N., & Ma, K. (2017). Industrial applications of thermostable enzymes from extremophilic microorganisms. *Current Biochemical Engineering*, *4*(2), 75-98.

Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C., & Wold, S. (2000). Design of experiments. Principles and Applications, 172–174. Jour.

Escuder-Rodríguez, J. J., DeCastro, M. E., Cerdán, M. E., Rodríguez-Belmonte, E., Becerra, M., & González-Siso, M. I. (2018). Cellulases from thermophiles found by metagenomics. *Microorganisms*, *6*(3), 66.

Esikova, T. Z., Temirov, Y. V., Sokolov, S. L., & Alakhov, Y. B. (2002). Secondary antimicrobial metabolites produced by thermophilic Bacillus spp. strains VK2 and VK21. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *38*(3), 226-231.

F

Fandi, K., Al-Muaikel, N., & Al-Momani, F. (2014). Antimicrobial activities of some thermophiles isolated from Jordan hot springs. *International Journal of Chemical, Environmental, and Biological sciences*, *2*(1), 57-60.

Farag, A., & Mohamed, R. M. (2004). Regression using support vector machines: basic foundations.

Fekraoui, A., & Abouriche, A. (1999). Ressources Géothermiques du Nord de l'Algérie-Eléments de l'Atlas Géothermique. *Revue des Energies Renouvelables*, 159-162.

Ferrera I., Reysenbach A L. (2007). Thermophiles in: Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons ; P : 1-9.

Fossi, B. T., Tavea, F., Fontem, L. A., Ndjouenkeu, R., & Wanji, S. (2014). Microbial interactions for enhancement of α-amylase production by Bacillus amyloliquefaciens 04BBA15 and Lactobacillus fermentum 04BBA19. *Biotechnology Reports*, *4*, 99-106.

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.

G

Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, *6*(1), 1-13.

Georis, J., Esteves, F. D. L., Lamotte-Brasseur, J., Bougnet, V., Devreese, B., Giannotta, F., ... & Frère, J. M. (2000). An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein science*, *9*(3), 466-475.

Gerhardt P., Murray R G E., Wood W A., Kring N R. (1994). Methodes for general and Molecular Bacteriology. American society for Microbiology, Washington, D.C : 791.

Gendre, Savary, & Soulier. (2009). Les plans d'expériences, 1–14.

Gherghout, Y., & Souici-Meslati, L. (2009). Reconnaissance de caractères arabes manuscrits par les séparateurs à vastes marges (SVM). In *Proceedings of the International Conference on Applied Informatics (ICAI), Bordj Bou Arreridg-Algeria* (Vol. 3, pp. 220-223).

Gilbert, G. K. (1875). *Report on the Geology of Portions of Nevada, Utah, California and Arizona: Examined in the Years 1871 and 1872*.

Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology*, *42*(4), 223-225.

Gomes, E., Souza, A. R. D., Orjuela, G. L., Silva, R. D., Oliveira, T. B. D., & Rodrigues, A. (2016). Applications and benefits of thermophilic microorganisms and their enzymes for industrial biotechnology. In *Gene expression systems in fungi: advancements and applications* (pp. 459-492). Springer, Cham.

Gomri, M. A., & Kharroub, K. (2012). Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est Algérien (Doctoral dissertation, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة).

Gomri, M. A., El Moulouk Khaldi, T., & Kharroub, K. (2018). Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods. *Annals of Microbiology*, *68*(12), 915-929.

Goupy, & Creighton. (2006). Introduction aux plans d'experiences. (Donud, Ed.) (3ème). Paris.

Gordone E., Haynesw C., Pang C.H (1973). The Genus *Bacillus* (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC : United States Department of Agriculture .

Grégoire, P., Fardeau, M. L., Guasco, S., Bouanane, A., Michotey, V., & Bonin, P. (2009). Les micro-organismes de l'extrême. *La Presse thermale et climatique*, *146*, 49-61.

Guangrong, H., Dehui, D., Weilian, H., & Jiaxin, J. (2008). Optimization of medium composition for thermostable protease production by Bacillus sp. HS08 with a statistical method. *African Journal of Biotechnology*, *7*(8).

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, *38*(11), 1599-1616.

H

Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, *89*(1), 17-34.

Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., & Javed, S. (2013). Chitinases: an update. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, *5*(1), 21.

Hamel, L. H. (2011). *Knowledge discovery with support vector machines*. John Wiley & Sons.

Haney, E. F., Trimble, M. J., Cheng, J. T., Vallé, Q., & Hancock, R. E. (2018). Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules*, *8*(2), 29.

Harley J P., Prescott L M., Klein D A. (2002). Microbiologie, 5emeEdition, 449p.

Hentabli. M, Sam. I. (2017). Etude expérimentale et modélisation de cinétique de séchage, Mémoire master, Université de Médéa.

Holden, J. F. (2009). Extremophiles: Hot Environments, dalam Encyclopedia of Microbiology.

Hupé, J. F. (2008). *Enrichissement et recherche de certaines activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies thermophiles* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).

Harley J P., Prescott L M., Klein D A. (2002). Microbiologie, 5emeEdition, 449p.

J

Jayanthi, N., Purwanto, M. G. M., Chrisnasari, R., Pantjajani, T., Wahjudi, A., & Sugiarto, M. (2019, June). Characterization of thermostable chitinase from Bacillus licheniformis B2. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 293, No. 1, p. 012030). IOP Publishing.

Jodouin, J. F. (1994). *Les réseaux de neurones : principes et définitions*. Hermès.

K

Kambourova, M., Radchenkova, N., Tomova, I. et Bojadjieva, I. (2016). Les thermophiles comme source prometteuse d'exopolysaccharides aux propriétés intéressantes. Dans *Biotechnology of Extremophiles :* (pp. 117-139). Springer, Cham.

Kamat, T., & Kerkar, S. (2011). Antimicrobial potential of Bacillus marismortal, a salt pan isolate of Cavellosim, Goa-India.

Keskes, S., Hanini, S., Hentabli, M., & Laidi, M. (2020). Artificial Intelligence and Mathematical Modelling of the Drying Kinetics of Pharmaceutical Powders. *Kemija u Industriji*, *69*.

Khatri, B. P., Bhattarai, T., Shrestha, S., & Maharjan, J. (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from Aspergillus niger strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. *SpringerPlus*, *4*(1), 1-8.

Kilic, T. (2020). Biofilm-Forming Ability and Effect of Sanitation Agents on Biofilm-Control of Thermophile Geobacillus sp. D413 and Geobacillus toebii E134. *Polish Journal of Microbiology*, *69*(4), 411.

Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Constantine: Université Mentouri, 2007: 68-71).

Kristjansson, J. K., & Hreggvidsson, G. O. (1995). Ecology and habitats of extremophiles. *World journal of microbiology and biotechnology*, *11*(1), 17-25

L

Larbi Daouadji, K. (2015). Isolement et identification des souches productrices de lipase (Doctoral dissertation).

Li, M. (2006). *Sequence and text classification : features and classifiers* (Doctoral dissertation, University of East Anglia).

Liaqat, I., Liaqat, M., Ali, S., Ali, N. M., Haneef, U., & Mirza, S. A. (2019). Biofilm formation, maturation and prevention: a review. *J Bacteriol Mycol*, *6*(1), 1092.

López-López, O., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2013). Hot spring metagenomics. *Life*, *3*(2), 308-320.

M

Mahé, P. (2003). Rapport de stage Noyaux pour graphes et Support Vector Machines pour le criblage virtuel de molécules.

Malek, F. (2019). Bactéries sporulées et biofilms : un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. *Canadian journal of microbiology*, *65*(6), 405-420.

Marín-Sanhueza, C., Echeverría-Vega, A., Gómez, A., Cabrera-Barjas, G., Romero, R., & Banerjee, A. (2022). Stress dependent biofilm formation and bioactive melanin pigment production by a thermophilic Bacillus species from chilean hot spring. *Polymers*, *14*(4), 680.

Mechri, S., Bouacem, K., Jabeur, F., Mohamed, S., Addou, N. A., Dab, A., ... & Jaouadi, B. (2019). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable and halotolerant subtilisin SAPN, a serine protease from Melghiribacillus thermohalophilus Nari2AT for chitin extraction from crab and shrimp shell by-products. *Extremophiles*, *23*(5), 529-547.

Minic, Z., Serre, V., & Hervé, G. (2006). Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes Rendus Biologies*, *329*(7), 527-540.

Muhammad, S. A., Ahmad, S., & Hameed, A. (2009). ANTIBIOTIC PRODUCTION BY THERMOPHILIC BACILLUS SPECIE SAT-4. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, *22*(3).

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*.

N

Niu, C., & Gilbert, E. S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and environmental microbiology*, *70*(12), 6951-6956.

O

Oshima, T., & Moriya, T. (2008). A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high- temperature compost. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1125*(1), 338-344.

Ouali, S., Khellaf, A., & Baddari, K. (2006). Etude géothermique du Sud de l'Algérie. *Revue des énergies renouvelables*, *9* (4), 297-306.

Ouali, S., Hadjiat, MM, Ait-Ouali, A., Salhi, K., & Malek, A. (2018). Cartographie et caractérisation des ressources géothermiques de l'Algérie. *Journal des énergies renouvelables*, *21* (1), 54-61.

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.

OctaryaZ., NugrohoT. T., NurulitaY., & Saryono. (2022). Molecular Identification, GC-MS Analysis of Bioactive Compounds and Antimicrobial Activity of Thermophilic Bacteria Derived from West Sumatra Hot-Spring Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, *29*(4), 549-561. https://doi.org/10.4308/hjb.29.4.549-561

Ovando-Chacon, S. L., Tacias-Pascacio, V. G., Ovando-Chacon, G. E., Rosales-Quintero, A., Rodriguez-Leon, A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., & Servin-Martinez, A. (2020). Characterization of thermophilic microorganisms in the geothermal water flow of El Chichón volcano crater lake. *Water*, *12*(8), 2172.

O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Molecular microbiology*, *30*(2), 295-304.

P

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.

Prakash, O., & Jaiswal, N. (2010). α-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, *160*(8), 2401-2414.

Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, *30*(2), 285-293.

Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*, *3*(9), 1494-1500.

Pysz, M. A., Conners, S. B., Montero, C. I., Shockley, K. R., Johnson, M. R., Ward, D. E., & Kelly, R. M. (2004). Transcriptional analysis of biofilm formation processes in the anaerobic, hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 6098-6112.

Q

Querellou, J., & Guezennec, J. Biotechnologie des extrêmophiles Biotechnologie des extrêmophiles.

R

Radhika S., Bharathi S., Radhakrishnan M. and Alagurunathan R. (2011). Bioprospecting of Fresh Water *Actinobacteria*: Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. *Journal of Pharmacy Research*., 4(8), 2584-2586.

Rehman, H., Baloch, A. H., & Nawaz, M. A. (2021). Pectinase: Immobilization and Applications. A review. *Trends in Peptide and Protein Sciences*, *6*, 1-16.

Richards, J. J., & Melander, C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*, *10*(14), 2287-2294.

Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering*, *2*(1), 011501.

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, *59*, 1.

Rothwell, P. J., & Waksman, G. (2005). Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advances in protein chemistry*, *71*, 401-440.

Royter, M., Schmidt, M., Elend, C., Höbenreich, H., Schäfer, T., Bornscheuer, U. T., & Antranikian, G. (2009). Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus SOL1 and Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis. *Extremophiles*, *13*(5), 769-783.

S

Saga, T., & Yamaguchi, K. (2009). History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Jmaj*, *52*(2), 103-108.

Saibi, H. (2009). Ressources géothermiques en Algérie. *Revues des énergies renouvelables et durables*, *13* (9), 2544-2552.

Sharma, R., Thakur, V., Sharma, M., & Birkeland, N. K. (2013). Biocatalysis through thermostable lipases: adding flavor to chemistry. In *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology* (pp. 905-927). Springer, Dordrecht.

Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., ... & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*, 337-346.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, *40*(2), 175-179.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*, *56*(1), 187-209.

Suarez Nunez, C., Alazard, D., Vives Ramirez, F., Monroy Hermosillo, O., & Fernandez Linares, L. (2002). Las enzimas termoestables y sus aplicaciones industriales. *BioTecnología*, *7*(1), 7.

T

Tan, J. X., Lv, H., Wang, F., Dao, F. Y., Chen, W., & Ding, H. (2019). A survey for predicting enzyme family classes using machine learning methods. *Current drug targets*, *20*(5), 540-55.

Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020). The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access*, *8*, 89802-89811.

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

Turner, P., Mamo, G., & Karlsson, E. N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial cell factories*, *6*(1), 1-23.

U

Umetrics. (2014). User guide to Modde. User Guide to Modde (Vol. 11). Sweden, Stortorget 21.

Urbieta, MS, Donati, ER, Chan, KG, Shahar, S., Sin, LL et Goh, KM (2015). Les thermophiles à l'ère génomique : biodiversité, science et applications. *Progrès biotechnologiques*, *33* (6), 633-647.

V

Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, *9*(2), 59.

Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., & Siika-Aho, M. (2007). Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Biofuels*, 121-145.

Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews*, *65*(1), 1-43.

Z

Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergsdottir, S. R., Ladoukakis, E., Isupov, M. N., ... & Kolisis, F. N. (2016). Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. *PLoS One*, *11*(1), e0146454.

Zarafeta, D., Galanopoulou, A. P., Leni, M. E., Kaili, S. I., Chegkazi, M. S., Chrysina, E. D., ... & Skretas, G. (2020). XynDZ5: a new thermostable GH10 xylanase. *Frontiers in microbiology*, *11*, 545.

Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Ghoroghi, A., Motallebi, A., ... & Sahebghadam Lotfi, A. (2010). Serratia marcescens B4A chitinase product optimization using Taguchi approach. *Iranian journal of Biotechnology*, *8*(4), 252-262.

Ziebuhr W, Lobner I, Krimmer V, Hacker J (2001). Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. Methods in Enzymology 336: 195-203.

Zhang, L., Yin, H., Zhao, Q., Yang, C., & Wang, Y. (2018). High alkaline activity of a thermostable α-amylase (cyclomaltodextrinase) from thermoacidophilic Alicyclobacillus isolate. *Annals of Microbiology*, *68*(12), 881-888.

Annexe1 : préparation de milieux de culture

THERMUS THERMOPHILUS MEDUIM (TTM)

Extrait de levure 4g

Proteose peptone 8g

NaCl 2g

L'eau distillé 1000ml

Agar 28g

Ajusté pH à 7.0

Annexe2 : Solutions

L'eau physiologique

Chlorure de sodium 9g

Eau distillée 1000ml

Hydroxyde de sodium (Na OH)

Hydroxyde de sodium 4g

Eau distillée 100ml

Acide sulfurique (H_2SO_4)

Acide sulfurique 5,4ml

Eau distillée 100ml

Rouge Congo à 0.1%

Rouge congo 0,1g

Eau distillée 100ml

L'eau physiologique (Na cl 1mol)

Chlorure de sodium ..... 22 ,24g

Eau distillée 500ml

Annexe 3 : 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

Fuschine de ziehl :

Fuschine 1g

Alcool éthylique à 95 ..... 10ml

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

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).

Annexe 4 : Test de Catalase

Technique

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
- Dissocier la colonie dans la goutte.

- Observer immédiatement.

Lecture

Catalase positive : dégagement immédiat de bulles de gaz.

Catalase négative : absence de dégagement de bulles de gaz.

Annexe 5 : Test d'oxydase

Technique

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné.
- Avec une pipette Pasteur prélever une colonie et la déposer doucement sur le disque.

Lecture

Oxydase positive : virage de couleur rose-rouge.

Oxydase négative : absence de couleur.

Annexe 6 : Tableau de Lecture et l'identification

Tests	Regroupementsactives	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Béta-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine déshydrolase	Jaune	Rouge
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orange
ODC	Ornithine	Orthinedécarboxyl	Jaune	Orange /rou

		ase		**ge**
CIT	**Sodium citrate**	**Utilisation de citrate**	**Vert**	**Blue vert / Orange**
H2S	**Thiosulfate de sodium**	**Production de H2S**	**Incolore**	**Noire**
URE	**Urée**	**Uréase**	**Jaune**	**Rouge/orange**
TDA	**Tryptophane**	**Tryptophane**	**Jaune**	**Marron**
IND	**Tryptophane**	**Production d'indole**	**Incolore**	**rose**
VP	**Pyruvate de sodium**	**Production d'acétoine**	**VP1+VP 2**	
			Incolore	**Rose/Rouge**
GEL	**Gélatine emprisonnant de charbon**	**Gélatinase**	**Pas de diffusion de pigment**	**Diffusion de pigment noir**
GLU	**Glucose**	**Glucose Fermentation /oxydation**	**Bleu vert/Bleu**	**Jaune**
MAN	**Mannitol**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
INO	**Inositol**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
SOR	**Sorbitol**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu**	**Jaune**

			vert	
RHA	**Rhamnose**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
SAC	**Sucrose**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
MEL	**Mlebiose**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
AMY	**Amygdaline**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**
ARA	**Arabinose**	**Fermentation /oxydation**	**Bleu /bleu vert**	**Jaune**

Réaction de nétrate :

		Couleur	
Regroupement actif	**TEST**	**Jaune**	**Rouge**
NO 3-NO2	**Production de NO2 réduction au stade N2.**	**NIT1+NIT2** ⟶	**2 ,3min**







Figure : Galerie API 20E(Photos personnelles).

Annexe 7 : Milieux pour les tests enzymatiques

Gélose à l'amidon

TTM ..... l00 ml

Amidon ..... 01 g

Gélose au lait

Poudre de lait ..... 05 g

Eau distillée ..... 50 ml

Agar ..... 02 g

Stériliser à l'autoclave 15min à 115 °C.

Milieu CMC

CMC 20g

Extrait de levure 5g

Agar 15g

Eau distillé 1000ml

pH=5

Milieu de base contenant 1% (v/v) de ou de Tween 80

TTM 100ml

Tween 80 ..... 1ml

Milieu de base contenant 1% (v/v) de ou de Tween 20

TTM 100ml

Tween 20 ..... 1ml

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

Milieu TTM 90ml

Emulsion de Jaune d'œuf 10ml

Milieu Pectine

Na Cl 0.1g

CaCl2* 2H2O 0.04g

MgSO4 * 7H20 ..... 0.05g

Pectine 1g

Extrait de levure 0.2g

Peptone 0.4g

Agar 3g

Eau distillée 100ml

Milieu Rouge Congo

Le bouillon cœur cerval..... 37

g/Lsaccharose 50g/L

agar ..... 10 g/L

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

Annexe

Résulta de l’activités enzymatiques

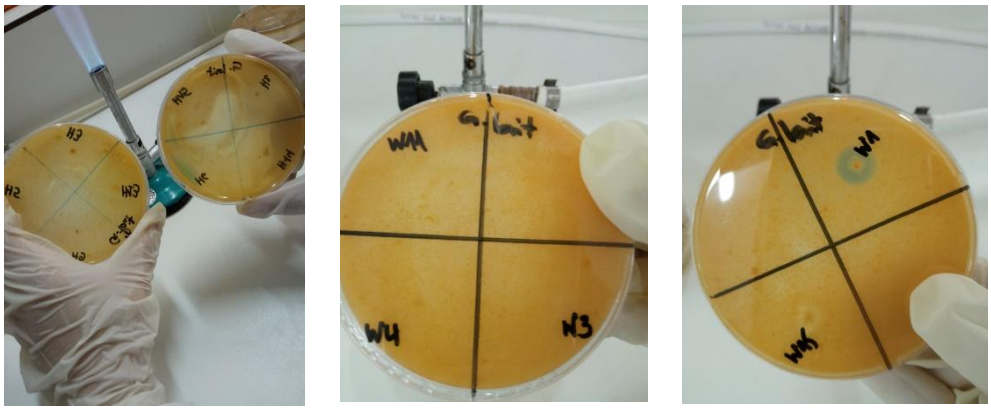


Figure : les résultats de lait écrémé (Photos personnelles).

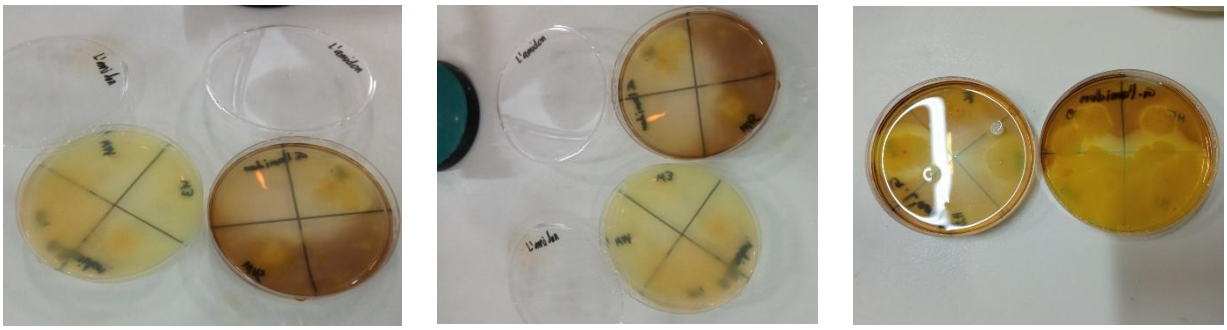


Figure : les résultats de l’amidon (Photos personnelles).

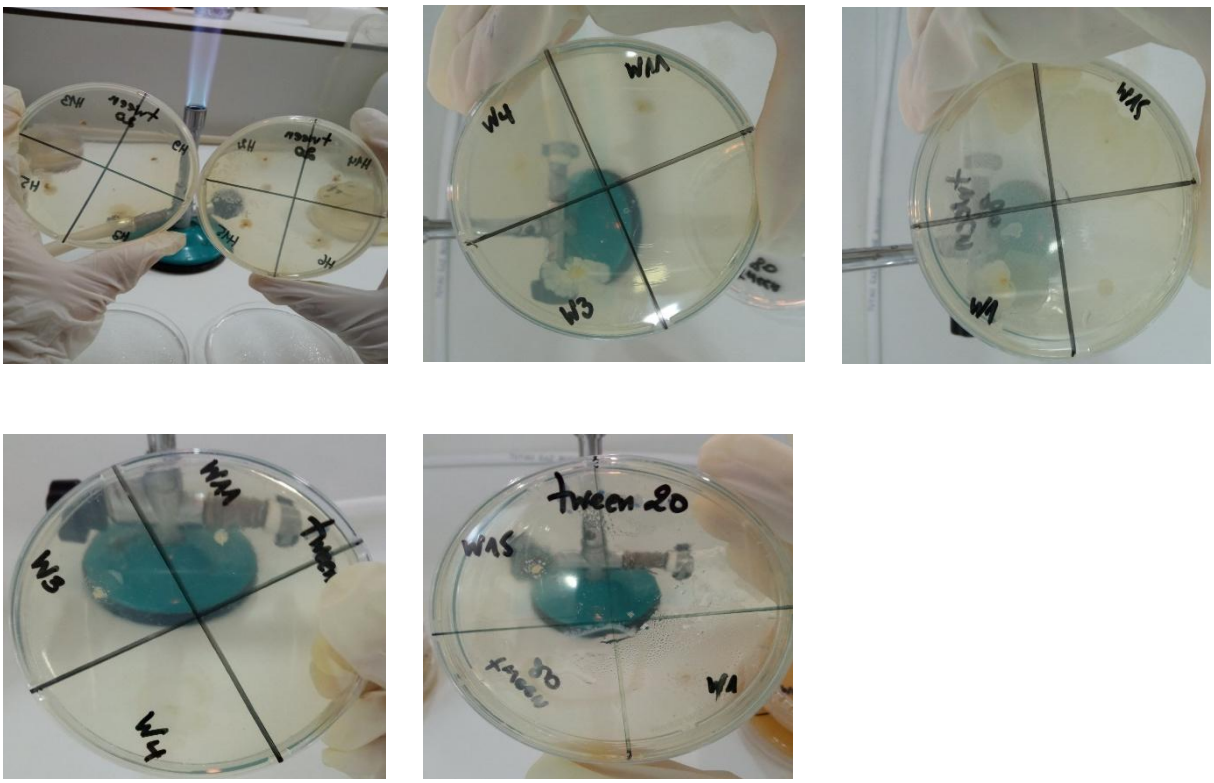


Figure : les résultats de T20 et T80 (Photos personnelles).

Annexe

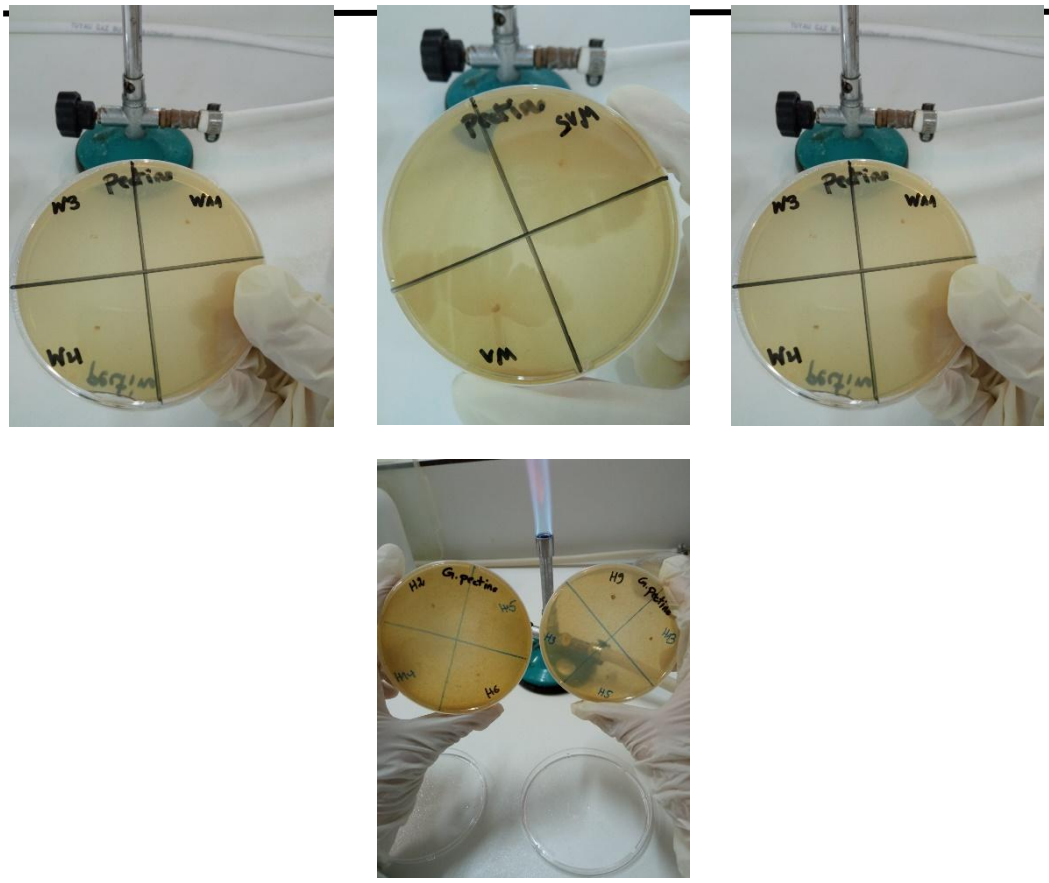


Figure : les résultat pectine

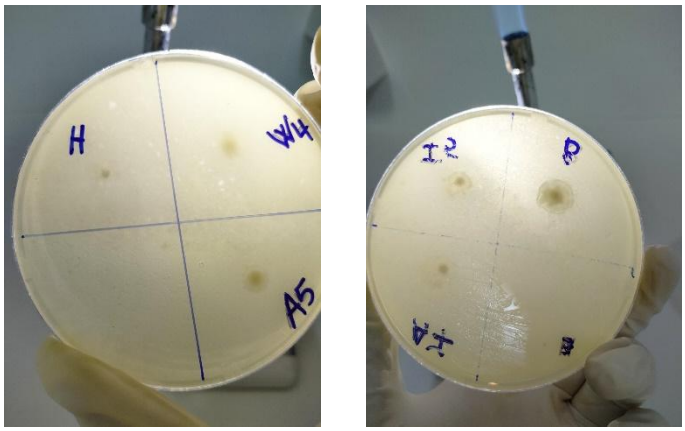


Figure : les résultats de jaune d'œuf.

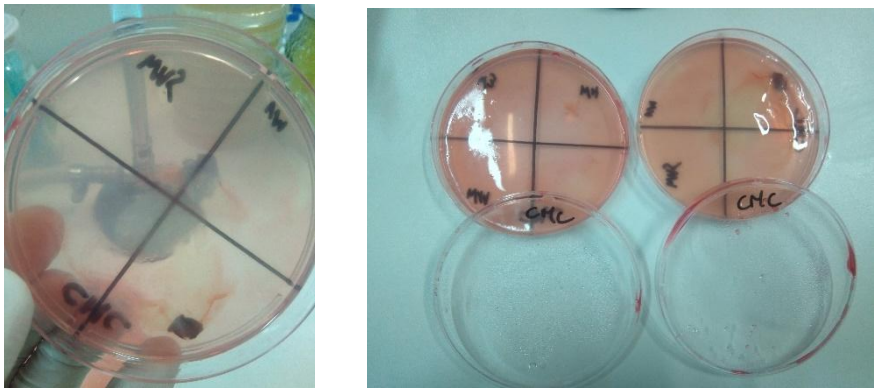


Figure : les résultats de CMC.

Annexe 8 :

Tableau : les résultats d'essai.

pH	T	NaCl	Days	S1	s2	s3	S4	S5	S6	S7	s8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21
5	30	5	1	20,1	19,1	23,1	22,1	24,1	26,1	3,0	13,1	6,2	8,6	10,2	10,3	9,5	14,2	16,5	27,1	8,4	4,9	5,9	9,3	6,5
10	30	5	1	19,1	18,1	19,1	21,9	23,1	24,1	2,1	10,3	4,5	4,2	8,2	5,5	8,2	12,2	14,5	25,8	6,1	3,6	4,3	6,8	4,7
5	60	5	1	24,7	27,3	32,4	40,1	38,6	46,9	18,0	37,1	32,2	36,8	38,5	38,5	36,5	43,5	40,8	33,4	43,5	25,4	30,6	48,3	33,8
10	60	5	1	25,2	24,8	27,3	35,6	35,6	45,0	16,3	28,1	28,2	33,5	36,8	35,3	30,2	35,2	36,2	34,1	38,1	22,3	26,8	42,3	29,6
5	45	0,2	1	21,2	25,9	30,2	32,3	32,1	30,6	14,5	22,0	20,2	26,9	25,8	28,5	18,2	19,2	22,2	28,6	27,3	16,0	19,2	30,3	21,2
10	45	0,2	1	20,7	21,8	24,4	28,7	28,9	28,8	12,8	18,5	18,7	23,5	20,5	26,5	16,2	17,2	18,2	28,0	25,2	14,7	17,7	28,0	19,6
5	45	10	1	20,1	20,2	20,1	30,1	22,1	23,1	13,1	19,2	16,0	20,3	22,6	22,0	15,2	16,5	17,5	27,1	21,6	12,6	15,2	24,0	16,8
10	45	10	1	18,1	19,1	18,1	26,1	22,1	22,1	11,1	17,5	15,0	18,0	18,3	20,2	14,9	15,9	16,0	24,4	20,3	11,9	14,3	22,5	15,8
7	30	0,2	1	21,8	24,6	24,5	27,2	25,3	24,6	6,0	15,0	10,3	15,6	15,2	15,2	14,5	15,2	14,5	29,4	13,9	8,1	9,8	15,5	10,8
7	6	0,2	1	26,	32,	33,	45,	42,	49,	20,	42,	36,	42,	40,	45,	39,	49,2	45,2	35,	49,	28,	34,	54,4	38,

Annexe

	0			0	4	1	0	7	5	0	8	3	5	2	2	5			2	0	7	5		1
7	30	10	1	20,3	20,0	17,1	20,1	22,1	22,3	4,0	10,0	8,5	10,2	12,5	12,3	12,3	13,2	12,2	27,4	11,5	6,7	8,1	12,8	8,9
7	60	10	1	24,0	28,7	28,7	38,7	35,4	40,1	14,5	30,2	28,5	36,2	35,2	30,6	35,2	42,1	38,5	32,3	38,4	22,5	27,0	42,7	29,9
5	30	5	2	19,1	18,1	24,3	39,8	24,6	23,5	0,6	2,6	0,6	16,3	9,4	11,1	10,5	29,8	41,3	57,0	15,1	7,8	11,2	17,3	7,8
10	30	5	2	18,1	17,2	20,1	39,4	23,6	21,7	0,4	2,1	0,5	8,0	7,5	5,9	9,0	25,6	36,3	54,2	10,9	5,7	8,1	12,6	5,7
5	60	5	2	23,5	25,9	34,1	72,1	39,4	42,2	3,6	7,4	3,2	69,9	35,4	41,6	40,2	91,4	102,0	70,1	78,2	40,7	58,1	89,8	40,6
10	60	5	2	24,0	23,5	28,7	64,0	36,3	40,5	3,3	5,6	2,8	63,7	33,9	38,1	33,2	73,9	90,5	71,5	68,5	35,6	50,9	78,7	35,5
5	45	0,2	2	20,1	24,6	31,7	58,1	32,7	27,5	2,9	4,4	2,0	51,1	23,7	30,8	20,0	40,3	55,5	60,0	49,1	25,5	36,5	56,4	25,5
10	45	0,2	2	19,7	20,7	25,6	51,6	29,5	26,0	2,6	3,7	1,9	44,7	18,9	28,6	17,8	36,1	45,5	58,7	45,3	23,6	33,7	52,0	23,5
5	45	10	2	19,1	19,2	21,1	54,2	22,5	20,8	2,6	3,8	1,6	38,6	20,8	23,8	16,7	34,7	43,8	56,9	38,9	20,2	28,9	44,6	20,2
10	45	10	2	17,2	18,1	19,0	47,0	22,6	19,9	2,2	3,5	1,5	34,2	16,8	21,8	16,4	33,4	40,0	51,3	36,5	19,0	27,1	41,9	18,9
7	30	0,2	2	20,7	23,3	25,8	49,0	25,8	22,1	1,2	3,0	1,0	29,6	14,0	16,4	16,0	31,9	36,3	61,8	25,0	13,0	18,6	28,7	13,0

Annexe

7	60	0,2	2	24,7	30,8	34,8	81,0	43,6	44,5	4,0	8,6	3,6	80,8	37,0	48,8	43,5	103,3	113,0	73,8	88,1	45,8	65,5	101,2	45,7
7	30	10	2	19,3	19,0	18,0	36,2	22,5	20,0	0,8	2,0	0,9	19,4	11,5	13,3	13,5	27,7	30,5	57,5	20,7	10,7	15,3	23,7	10,7
7	60	10	2	22,8	27,2	30,1	69,6	36,1	36,1	2,9	6,0	2,8	68,8	32,4	33,0	38,7	88,4	96,3	67,9	69,2	36,0	51,4	79,4	35,9
7	45	5	1	24,0	23,3	25,7	35,4	26,1	28,1	11,1	19,2	25,9	20,8	20,5	25,5	16,2	17,1	19,1	32,4	35,0	21,5	25,6	39,9	27,1
7	45	5	1	22,4	24,5	24,9	32,3	28,0	29,5	10,1	18,1	25,5	21,2	21,0	24,5	17,0	18,2	18,2	30,2	35,4	20,8	24,9	38,2	26,3
7	45	5	1	23,0	24,0	23,8	33,4	27,2	27,3	12,0	20,0	25,2	20,0	20,0	24,1	17,9	19,5	17,4	31,1	34,0	19,9	23,9	37,8	25,2

Annexe

Tableau III.1.11 Coefficients de modèles.

S1	Coeff. S1	Coeff. S2	Coeff. S3	Coeff. S4	Coeff. S5	Coeff. S6	Coeff. S7	Coeff. S8	Coeff. S9	Coeff. S10
Constant	1,247	-3,440	34,095	199,604	41,921	23,791	-101,703	-154,899	-221,525	159,964
pH	3,857	5,517	2,191	8,601	1,417	1,344	0,156	1,153	7,846	9,191
T	-0,233	-0,187	-0,369	-0,289	-0,933	-1,782	1,249	0,415	2,192	-0,040
NaC	0,760	-1,006	-1,116	0,106	-0,681	0,675	-0,801	-1,667	0,871	-0,870
day	13,346	16,500	-14,601	-318,931	-7,809	40,020	124,357	240,887	240,182	-295,817
pH*pH	-0,288	-0,386	-0,178	-0,593	-0,092	-0,077	-0,032	-0,082	-0,646	-0,546
T*T	0,004	0,006	0,008	0,005	0,018	0,031	-0,004	0,013	-0,009	0,007
NaC*NaC	-0,057	0,031	-0,013	0,031	-0,012	-0,088	0,037	0,054	-0,072	0,129
day*day	-4,646	-5,236	5,504	108,485	3,127	-13,397	-40,244	-78,736	-77,733	95,750
pH*T	0,007	-0,012	-0,010	-0,003	-0,018	-0,017	-0,007	-0,026	0,021	-0,041
pH*NaC	-0,023	0,045	0,078	0,001	0,070	0,038	0,029	0,081	-0,056	0,085

Annexe

pH*day	0,034	-0,051	-0,102	-0,287	-0,055	0,053	0,294	0,390	0,661	-0,519
T*NaC	-0,004	0,001	0,003	-0,013	-0,006	-0,017	-0,007	-0,009	-0,014	-0,026
T*day	-0,015	-0,031	0,018	0,478	-0,005	-0,078	-0,352	-0,600	-0,693	0,802
NaC*day	-0,006	-0,037	-0,148	-0,364	-0,050	0,066	0,224	0,395	0,419	-0,483

Annexe

Coeff. S11	Coeff. S12	Coeff. S13	Coeff. S14	Coeff. S15	Coeff. S16	Coeff. S17	Coeff. S18	Coeff. S19	Coeff. S20	Coeff. S21
-21,852	-20,885	32,450	300,767	402,581	292,956	93,787	25,508	80,381	120,007	-30,304
3,560	4,947	6,939	12,993	7,900	6,701	16,978	9,799	12,456	19,064	10,855
0,048	1,430	-1,620	-5,294	-5,343	-1,430	1,029	0,784	0,684	1,059	1,232
-0,585	-0,280	-0,517	1,259	2,066	1,588	3,186	1,827	2,406	3,602	1,728
21,780	-31,443	-29,853	-373,631	-503,257	-411,415	-280,662	-122,336	-222,334	-335,612	-52,747
-0,205	-0,355	-0,399	-0,698	-0,365	-0,517	-1,170	-0,689	-0,855	-1,307	-0,780
0,013	-0,004	0,030	0,065	0,060	0,013	-0,007	-0,005	-0,006	-0,008	-0,006
0,061	0,028	0,065	0,025	-0,041	-0,067	-0,080	-0,053	-0,060	-0,087	-0,056
-7,265	10,268	9,624	120,476	163,828	144,875	88,701	38,458	70,340	106,170	16,064
-0,028	-0,012	-0,038	-0,061	-0,048	0,030	0,007	0,007	0,006	0,007	0,008
0,051	0,041	0,051	0,042	0,036	-0,099	-0,079	-0,051	-0,059	-0,087	-0,051
0,094	0,080	-0,089	-0,811	-0,935	-0,101	-0,307	-0,091	-0,261	-0,389	0,079
-0,021	-0,021	-0,020	-0,036	-0,037	-0,005	-0,042	-0,023	-0,030	-0,047	-0,026
-0,063	0,059	0,077	1,049	1,298	0,242	0,869	0,385	0,687	1,036	0,179
0,111	-0,063	0,056	-0,460	-0,674	-0,234	-0,510	-0,227	-0,405	-0,608	-0,097

Annexe 9 : Appareillage.



PH mètre.



Distillateur



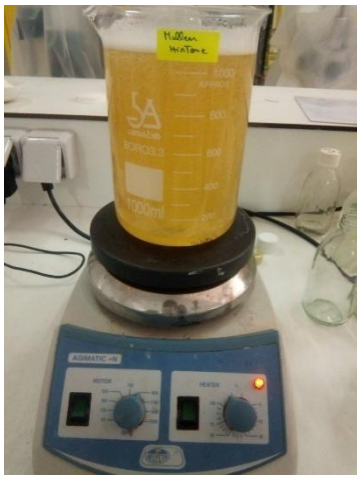
Vortex



Microscope



Bec Bunsen



Agitateur



Balance



Lecteur ELISA



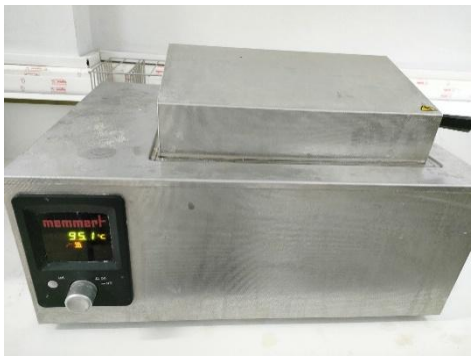
Autoclave (stérilisateur)



Incubateur



Hot microbiologique



Bain mari



Etuve



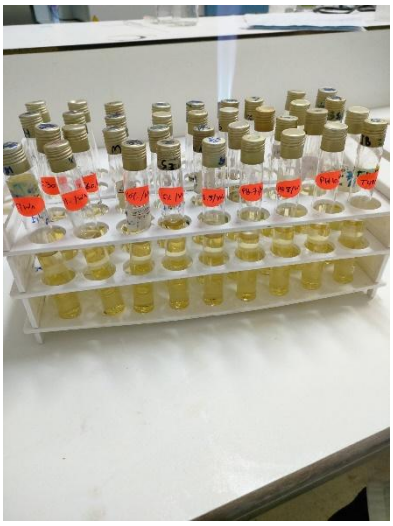
Micropipette



Réfrigérateur



Spectrophotomètre UV visible SP-3000nano.



Préparation de suspension Pour l'optimisation.