REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté Par :

ELYOUSFI Hadjer

LOUNNASE Ahlem

Thème :

Evaluation des activités enzymatique, antimicrobienne et l'aptitude de formation de biofilm des bactéries thermophiles isolées à partir de trois sources hydrothermales en Algérie

Soutenue publiquement le : **22** /06 /2023. Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Etablissement	
M. HAMZA. I	**MCB**	Univ. De Médéa	Président
M. BOUMEDIENE. F	**MCB**	Univ. De Médéa	Examinateur
M. HOCEINI. A	**MCB**	Univ. De Médéa	Encadreur

Année universitaire 2022/2023

بسم الله الرحمن الرحيم

Dédicace

Je suis avec joie et plaisir je veux partager avec vous ce bonheur d'avoir terminé ce travail

Alors merci Dieu Tout-Puissant qui m'a aidé à compléter ce mémoire

Et surtout à mon père qui m'a dessiné et ma mère qui m'a coloré et je leur dis de toutes les profondeurs de mon cœur je vous aime avec beaucoup d'amour

A tous mes frères et sœurs pour m'avoir soutenu, moi et leur petit, pour le neveu gâté Amir et mes neveux. Sans oublier

Tous les remerciements le respect pour le professeur tout au long de mon parcours académique, sans eux, je ne me tiendrais pas dans cette position

Et tous les amis de près ou de loin pour me soutenir et me donner de la motivation pour aller de l'avant. Et surtout bahia ahlem zahra aya kadija

J'exprime mes remerciements

Ma gratitude aux personnes les plus précieuses de mon cœur, mon mari Walid, qui m'ont insufflé espoir et volonté. Oh Dieu sauve-le en te sauvant espérons-le.

Merci beaucoup

HADJER

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect. Je ne vous remercierez jamais assez pour votre confiance, pour votre soutien tout au long de ma scolarité et pour vos sacrifices.

A mes frères et mes sœurs En témoignage de ma tendresse pour vous, je vous dédie ce travail avec mes vœux de bonheur et de réussite.

A tous mes amis surtout : hadjer, khadija ,zahra ,souhila ,

Mon mari Yahia

A tous mes professeurs

Et à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin

Que Dieu vous protège et vous bénisse tous

AHLEM

Résumé

*C*ette étude est une synthèse bibliographique sur les micro-organismes qualifiés de thermophiles.

Les thermophiles, sont des organismes vivants à des températures optimales de croissance comprises entre 50 et 80°C .Dans ce sens, Les organismes vivants en milieux extrêmes et en particulier les microorganismes ont, au cours de l'évolution, développés des stratégies adaptatives très variées pour maintenir l'intégrité de leur machinerie cellulaire à des conditions de température, pression ou salinité mortelles pour toute autre forme de vie .

Ce mémoire est une lecture essentielle pour une compréhension des **thermophiles** et évaluation **de l'activité enzymatique**, **antimicrobiennes** et la capacité de formation de **biofilm.** Pour cela, 30 souches thermophiles ont été isolées à partir des **sources** hydrothermales, afin de tester leur aptitude à produire quelques enzymes : l'amylase, la cellulase, lipase, la caséinase et la lécithine.

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), 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 l'amylase, la cellulase, lipase, la caséine et la lécithine. Ont montré que toutes les souches possédaient une ou plusieurs activités hydrolytiques, dominées par les activités protéolytiques et amylolytiques .Ces enzymes sont des métabolites essentiels qui permettent aux bactéries de cataboliser les nutriments dans l'environnement pour maintenir leur vie.

Les activités antimicrobiennes des souches ont été recherchées par la technique des cylindres d'agar. Elle nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches thermophiles contre des souches test standardisés : les **bactéries : «** Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis, staphylococcus aureus et staphylococcus epidimidis », Les **champignons** : « Candida albicans et Aspergillus brasilensis ».

En conclue la capacité de bactéries thermophiles isolées de sources chaudes à produire des agents antimicrobiens.

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 biofilm.

Les mots clés : Thermophiles, activité enzymatique, activité antimicrobienne, Biofilm.

ملخص

هذه الدراسة عبارة عن توليف ببليوغرافي على الكائنات الحية الدقيقة المؤهلة على أنها محبة للحرارة تصنف الحياة في درجات حرارة عالية في شكل محب للحرارة أو مفرط الحرارة .

بكتيريا مقاومة للحرارة هي كائنات حية في درجات حرارة النمو المثلى بين 50 و 80 درجة مئوية. وبهذا النمو المثالي بين المعنى ، طورت الكائنات الحية التي تعيش في بيئات قاسية وخاصة الكائنات الحية الدقيقة ، أثناء التطور ، استراتيجيات تكيفية متنوعة للغاية للحفاظ على سلامة آلياتها الخلوية في ظل ظروف درجة الحرارة أو الضغط أو الملوحة المميتة لجميع أشكال الحياة الأخرى .

هذه الأطروحة هي قراءة أساسية لفهم المحبة للحرارة وتقييم النشاط الأنزيمي ومضادات الميكروبات والقدرة . على تشكيل الأغشية الحيوية. لهذا الغرض، تم عزل 30 سلالة محبة للحرارة من الفتحات الحرارية المائية ، من أجل اختبار قدرتها على إنتاج بعض الإنزيمات مثل : الأميليز ، السليولاز ، الليباز ، الكازيناز والليسيثين .

تم إجراء فحص لأنشطة تحلل الأميلوليت ، و تحلل البروتين ، و تحلل الدهون ، و تحلل الخلايا. تم الكشف عن وجود هذه الأنشطة باستخدام الركائز ، النشا ، البكتين ، الكازين ، صفار البيض ، توين 20 ، توين 80 ، و كربوكسي ، ظهور أي منطقة واضحة حول الثقافة بعد 24 إلى 48 ساعة من الحضانة عند 60 درجة مئوية ، يشهد على أن السلالة تحتوي على الأميليز ، السليولاز ، الليباز ، الكازيناز والليسيثين. تبين أن جميع السلالات تمتلك نشاطا أو أكثر من أنشطة التحلل المائي ، تهيمن عليها أنشطة التحلل البروتيني والأميلوليتيك. هذه الإنزيمات هي مستقلبات أساسية تسمح للبكتيريا بهدم العناصر الغذائية في البيئة للحفاظ على حياتها.

تم فحص الأنشطة المضادة للميكروبات للسلالات بواسطة تقنية أسطوانة أجار لقد سمح لنا باكتشاف التأثير المثبط للسلالات المحبة للحرارة ضد سلالات الاختبار المعيارية البكتيريا «Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis, staphylococcus aureus Staphylococcus epidimidis.

الفطريات "Candida albicans and Aspergillus brasiliensis".

تم اختبار السلالات المعزولة لقدرتها على تكوين غشاء حيوي بتقنيتين: طريقة روج كونغو وطريقة الصفيحة الدقيقة للمعايرة. النتيجة التي تم الحصول عليها لإظهار قدرة السلالات على إنتاج الوحل.

الكلمات المفتاحية: محب للحرارة، النشاط الأنزيمي، النشاط المضاد للميكروبات، الأغشية الحيوية

Abstract

This study is a bibliographic synthesis on microorganisms qualified as thermophilic Life at high temperatures is classified in thermophilic or hyper thermophilic form Thermophiles, are living organisms at optimal growth temperatures between 50 and 80 ° C.

In this sense, organisms living in extrême environments and in particular microorganisms have, in the course of evolution, developed very varied adaptive strategies to maintain the integrity of their cellular machinery under conditions of temperature, pressure or salinity deadly for all other forms of life.

This dissertation is essential reading for an understanding of thermophiles and evaluation of enzymatic, antimicrobial activity and biofilm forming capacity. For this, 30 thermophilic strains were isolated from hydrothermal vents, in order to test their ability to produce some enzymes : amylase, cellulase, lipase, caseinase and lecithin A screening of amylolytic, proteolytic, lipolytic and cellulolytic activities was performed. The presence of these activities was detected using the substrates, starch, pectin, casein, egg yolk, tween 20, tween 80, and carboxymethylcellulose (CMC), The appearance of any clear area around the culture after 24 to 48 hours of incubation at 60 ° C, testifies that the strain has amylase, cellulase, lipase, caseinase and lecithin. All strains were shown to possess one or more hydrolytic activities, dominated by proteolytic and amylolytic activities. These enzymes are essential metabolites that allow bacteria to catabolize nutrients in the environment to sustain their lives. The antimicrobial activities of the strains were investigated by the agar cylinder technique. The results of the antimicrobial activity of the strains studied against standardized test strains: bacteria: "Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis, staph aureus and staphylococcus epidimidis", Fungi: "Candida albicans and Aspergillus brasiliensis".

The result is recorded in the table the isolated strains were tested for their ability to form a biofilm by two techniques: Rouge Congo method (RCA) and titration microplate method. The result obtained shows the ability of the strains to produce slime.

Keywords: Thermophiles, enzymatic activity, antimicrobial activity, Biofilm

Table de Matière

Table De Matières

Liste des : Figures, Tableaux, Abréviations

Introduction Générale

Partie 1 : Revue bibliographique 1

Chapitre I : Les sources thermales et les thermophiles 2

I : Le monde extrêmophile 3

I . Notion d'extrêmophiles : ……..4

I . 1. La diversité écologique: 4

I . 2- Définition: 6

I . 3 - Les extrémophiles dans leurs différents milieux:…… 7

I . 4 - Les microorganismes extrêmophiles et la température: 8

I . 5- Intérêt biotechnologique des extrêmophiles: …….. 9

II. Les niches écologiques :..... 9

II. 1. Biotopes chauds: 9

II. 1.1 Biotopes naturels: 10

II.1-2 Biotopes artificiels thermiques: 11

II . 2 . Sources thermales: 11

II . 2.1 Définition: 11

II . 2.2 Composition des eaux thermales : 12

II .4. Les bactéries des sources hydrothermales: 13

Chapitre II : Les bactéries thermophiles..... 14

I.1 Définition..... 15

I.2 Les principales bactéries thermophiles..... 15

I.3- Diversité (phylogenie) des thermophiles: 16

I.4- Adaptations physiologiques aux thermophiles: 17

I.5- Les besoins nutritif des bactéries thermophiles : 19

I.6 - Biotechnologie des thermophiles: 19

Chapitre III : Les Thermoenzymes: 21

1.Thermo-enzymes: 22

2. Les hydrolases: 23

2.1. Les protéases : 23

2.2. Les amylases: 24

2.3. Les cellulases: 24

2.4. Les pectinases: 25

2.5. Lipases: 26

2.6. Les xylanases: 26

2.7. Les chitinases: 27

2.8. Enzymes utilisées en biologie moléculaire 27

2. Potentiel enzymatique des bactéries thermophiles: 28

Chapitre IV : Activité antimicrobienne Et Biofilm..... 29

IV .1 Agent antimicrobien: 30

IV.2 Biofilms bactériens : 31

IV.2. 1. Généralités sur les biofilms :..... 31

IV.2.2 . Définition:..... 31

IV.2.3 . Composition 32

3.1. Micro-organismes.....32

3.2. La matrice(EPS) 33

IV.4 Les étapes de formation de Biofilm : 33

. 4.1 Film de conditionnement ou le film primaire.....33

4.2Transport des bactéries vers son support (surface) 34

4.2.1Adhérence réversible.....34

4.2.2. Adhésion irréversible.....34

Formation de microcolonies.....35

Maturation du biofilm.....35

6. Dispersion.....36

5-Rôle du biofilm.....37

Partie II: Matériels et Méthodes :..... 38

I.1- Objectifs du travail : 39

I- Lieu de travail : 40

II.1 Matériels : 40

II.1.1 Verrerie: 40

II.1.2 Appareillage: 40

II.1.3 Milieux culture: 40

II.1.4 Autres produits consommables: 40

II.1.5 Autres matériel: 40

II.2 **Méthode** : 41

II.2.1 revivification et identification des souches..... 41

II.2.1.1 Enrichissement et ensemencement: 41

II.2.1.2 Conservation: 41

II.2.1.3. Identification des souches purifient: 41

II.2.1.4 Identification phénotypique des souches: 41

A. Examen macroscopique: 42

B- Examen microscopique: 42

II.1. Mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires: 43

II.1.1 Amylase: 43

II.1.2 Caseinase: 43

II.1.3 esterase: 43

II.1.4 Cellulase: 43

II.1.5 La recherche de la Lécithinase: 44

II.2.3 Recherche des activités antimicrobiennes sur milieu solide (technique des cylindres d'agar) : 44

II.2.4 La recherche de la capacité de formation de Biofilm : 45

II.2.4.1 La méthode du Rouge Congo: 45

II.2.4.2 Méthode de microplaques de titration à 96 puits: 45

Parties III: Résultats et Discussion :..... 47

III.1. Isolement et identification des souches: 48

III. 1.1. Identification macroscopique: 48

III. 1.2. Identification microscopique: 50

III. II.2 Aspect microscopique: 51

III.2 L'activité enzymatique: 53

III.3 L'activité antimicrobienne:..... 56

III.3 Résultade l'activité antimicrobienne:.....57

III.4 L'aptitude de formation de biofilm : 60

III.4.1 Technique Rouge Congo: 61

III.4.2 Technique de microplaque de titration: 62

Conclusion.....67

Référence : 68

Annexe: 74

Annexe 1 : préparation de milieux de culture THERMUS THERMOPHILUS MEDUIM (TTM) 74

Annexe 2 : Solutions L'eau physiologique..... 74

Annexe 3 : coloration de Gram..... 74

Annexe 4 : Milieux pour les tests enzymatiques 76

Annexe 5 : Résulta del'activitéenzymatique..... 77

Annexe 6 : Appareillage: 79

Remerciements.....81

Liste des Figures

Liste des Figures

Figure. 1 Exemples de biotopes naturels chauds. Octopus Spring, parc nationalde Yellowstone, Volcan de Dallol (Ethiopie) (Bouacem,2016)……..... …. 05

Figure 2 : Effet de la température sur les taux de croissance des microorganismes (psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles et hyperthermophiles extrêmes)……..... 08

Figure 3 : Exemples de biotopes naturels chauds..... 10

Figure 4 : Exemples de sources thermales dans le monde..... 12

Figure 5: La thermophilie dans les trois domaines du vivant (Hickey and Singer 2004)..17

Figure 6 : Applications Biotechnologie des thermophiles (Mehta et al.,2016).....20

Figure 7: Étape de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien..... 36

Figure 8 : Caractères culturaux des souches cultivées..... 49

Figure 9 : Coloration de gram des souches thermophiles sous microscope optique au Grossissement X100, X40 …..... 52

Figure 10 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon) 57

Figure 11 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.....59

Figure 12 : Les résultats des tests enzymatiques 71

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés ……06

Tableau 2 : Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements Adapté **(Horikoshiet Bull, 2011).**..... 07

Tableau 3 : observation morphologique des colonies et des cellules bactériennes. 50

Tableau 4 : Caractérisations microscopique des isolats. 53

Tableau 5 : Activité enzymatique des souches..... 55

Tableau 6 : l'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon) 58

Tableau 7 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA. 60

Tableau 8 : Résultats de la technique de microplaque de titration 61

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ANRH : Agence Nationale des Ressources Hydrauliques

B.N : Bouillon Nutritif.

°C : Degré Celsius.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

D.O : Densité Optique.

E.C. : Commission des enzymes.

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.

RCA : Rouge Congo Agar.

T : Température. T20 : Tween 20. T80 : Tween 80.

TTM : Thermus thermuphilus medium.

PBS : Phosphate-buffered saline PH= 07

LCR : ligase chain reaction.

Introduction Générale

Introduction Générale

Les microorganismes sont omniprésents et habitent tout environnement pouvant leur offrir des conditions idéales pour leur croissance et leur reproduction.

La vie à des températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles, sont des organismes vivants à des températures optimales de croissance comprises entre 50 et 80°C ; elles sont particulièrement attirés l'attention des chercheurs, car ils constituent potentiellement un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales comme les enzymes thermostables qui présentent des caractéristiques uniques et peuvent convenir à la réalisation des processus biotechnologiques propres et durables à des températures élevées **(Bhalla et al.,2011).** Les scientifiques ont été très intéressés à en apprendre davantage sur les caractéristiques et les différents mécanismes permettant la survie de ces microorganismes dans de tels milieux extrêmes **(Quérellou et Guézennec, 2010).**

Les enzymes des microorganismes thermophiles appelées également « thermoenzymes », sont thermostables et résistantes. Elles ont la capacité de catalyser des réactions à de hautes températures tout en conservant leurs propriétés et activités enzymatiques.

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).**

Un bon nombre de bactéries sont organisées en communautés structurées susceptibles de coloniser des surfaces solides. Cette structure représente le mode de vie normal d'une bactérie. C'est ce mode de comportement qui est prédominant des organismes unicellulaires et non le mode de flottaison libre de type dit planctonique. Après attachement à un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle Costerton a donné le nom de « biofilm » **(Filloux et Vallet,2003).**

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

- Identification macro et microscopique des souches étudies.
- -Evaluation de l'activité enzymatique des souches préalablement isolées sur les milieux (gélose à l'amidon, gélose CMC, gélose TTM, gélose tween 20, gélose tween 80, gélose à la base de lait écrémé, gélose au jaune d'œuf).
- -Evaluation de l'activité antimicrobienne et l'aptitude de formation de biofilm.

Ce travail est réparti en trois parties principales, à savoir :

- Une synthèse bibliographique ;
- Le matériel et méthodes utilisés ;
- Les résultats obtenu ainsi qu'une discussion et en fin une conclusion.

PARTIE I : Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les sources thermales
Et
Les thermophiles

Partie I : Le monde extrêmophile

1. La diversité écologique

La Terre possède un grand nombre d'écosystèmes très divers alliant plusieurs paramètres physico-chimiques dont certains sont extrêmes. Les sources chaudes, dont les exemples les plus connus sont celles du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis ainsi que les solfatares en Italie ou en Islande, combinent hautes températures et milieux très acides. Aussi, les lacs fermés, comme c'est le cas de la mer Morte, en plus d'un fort ensoleillement, sont connus pour leurs fortes concentrations en sels. Sous la surface des océans, il est possible de trouver des sources froides au niveau du plateau continental, ou des cheminées hydrothermales caractérisées par de très hautes chaleurs associées directement aux hautes pressions au niveau des dorsales océaniques **(Rothschild et Mancinelli, 2001 ; Cavicchioli et al., 2011).**

L'étude de la biodiversité de ces environnements extrêmes a permis de mettre en évidence la présence d'organismes appartenant aux trois domaines du vivant (Bacteria, Archaea et Eucarya)

Le terme « **extrêmophiles** » a été proposé pour la première fois, en 1974, par **Mac Elroy**, dans un article intitulé 'Some comments on the evolution of extremophiles' paru dans la revue Bioscience, il a été interprété de plusieurs façons pour enfin être associé aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement de la vie. **(Irwin et Baird, 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 Na cl jusqu'à saturation (35% en Nacl). **(Gregorie et al., 2009).**



Figure 1: Exemples de biotopes naturels chauds. Octopus Spring, parc national de Yellowstone, Volcan de Dallol (Ethiopie) **(Bouacem, 2016).**

Les extrêmophiles montrent une extraordinaire capacité d'adaptation aux conditions physicochimiques brutal régnant dans certains environnements dits extrêmes tant en termes de température, de salinité, de pH que de pression hydrostatique. Répandues dans ces niches écologiques extrêmement hostiles, ces microorganismes vivent en utilisant leur polyvalence adaptative dans différentes situations de stress. Ils ont développé plusieurs stratégies. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale**. (Van Den Burg.B.2003).**

I.2- Définition

Les extrêmophiles sont des micro-organismes qui peuvent développer de manière optimale dans des zones écologiques avec des conditions physiques et chimiques mortelles pour la plupart des autres organismes (Température proches ou supérieures à 100 °C).

Le terme extrêmophile est le plus souvent employé pour rapporter des microorganismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des Archaea. Le concept d'extrêmophilie, à la différence de celui de résistance aux conditions extrêmes, implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adapté aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions **(Quérellou, 2010).**

Tableau 1 : les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés **(Kristjiansson et hreggevidsson1995).**

Habitat	**Température (C°)**	**PH**	**Salinité (% W/V)**
Eau douce alcaline de sources chaudes.	> 60	> 7	<6
Champs acides solfatares.	> 60	<3	<6
Les boues anaérobies et le sol géothermiques.	> 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. 3 - Les extrémophiles dans leurs différents milieux

Beaucoup d'extrêmophiles peuvent être classés sous plusieurs catégories, on parle souvent de polyextrêmophilie en sachant qu'un environnement est souvent caractérisé par deux, voire plusieurs paramètres extrêmes**(Horikoshi et Bull, 2011).**

Parmi les micro-organismes extrêmophiles, on rencontre ceux qui vivent en présence de fortes concentrations en sel « halophiles » ceux qui développent à des températures froides ou chaudes « psychrophiles et thermophiles », et /ou dans des milieux très acides ou basiques « acidophiles et alcaliphiles » ou sous pression élevées piézophile. **(Horikoshi et Bull, 2011).**

Tableau 2 : Microorganismes extrêmophiles et leurs environnements Adapté **(Horikoshi and Bull 2011)**

Microorganismes extrêmophiles	**Environnement favorable à la croissance**
Acidophile	pH optimum de croissance < 3
Alcaliphile	pH optimum de croissance > 10
Halophile	Nécessite au moins 1M de sel pour la croissance
Hyper thermophile	Croissance optimale à des températures> 80°C
Thermophile	Croissance à des températures entre 60°C et 85°C
Eurypsychrophile (psychrotolérant)	Croissance à des températures>25°C, mais également<15°C
Stenopsychrophile (psychrophile)	Croissance à des températures entre 10°C et 20°C
Piezophile	Croissance sous haute pression—> 400 atm (40 MPa)
Endolithique	Croissance à l'intérieur des roches
Hipolithe	Croissance sur les roches et les déserts froids
Oligotrophe	Capable de croitre dans des environnements faibles en nutriments
Radiorésistant	Tolérance aux fortes concentrations de métaux lourds
Toxitolérant	Tolérance aux fortes concentrations d'agents toxiques (solvants organiques)
Xerophile	Croissance en présence d'une faible disponibilité d'eau, résistance à la dessiccation

I .4 Les microorganismes extrêmophiles et la température

La température est l'une des variables les plus importantes de notre environnement. Il est considéré comme un élément essentiel de la classification en biologie. Il affecte directement ou indirectement l'activité et la distribution des micro-organismes.

Les micro-organismes peuvent être divisés selon leur croissance à différentes températures : les bactéries **psychrophiles** qui se développent à basse température (<20°C), les bactéries **mésophiles** qui se développent à température moyenne (20-45°C) et les bactéries **thermophiles** qui se développent à haute température (>60°C) bactéries et **hyperthermophiles** (>80°C). Les procaryotes qui poussent au-dessus de 105°C sont considérés comme des thermophiles **extrêmes**. Cependant, cette classification est arbitraire car dans le monde bactérien, il existe un continuum de capacités de développement des micro-organismes à différentes températures. **(Madigan et Martinko, 2007).**

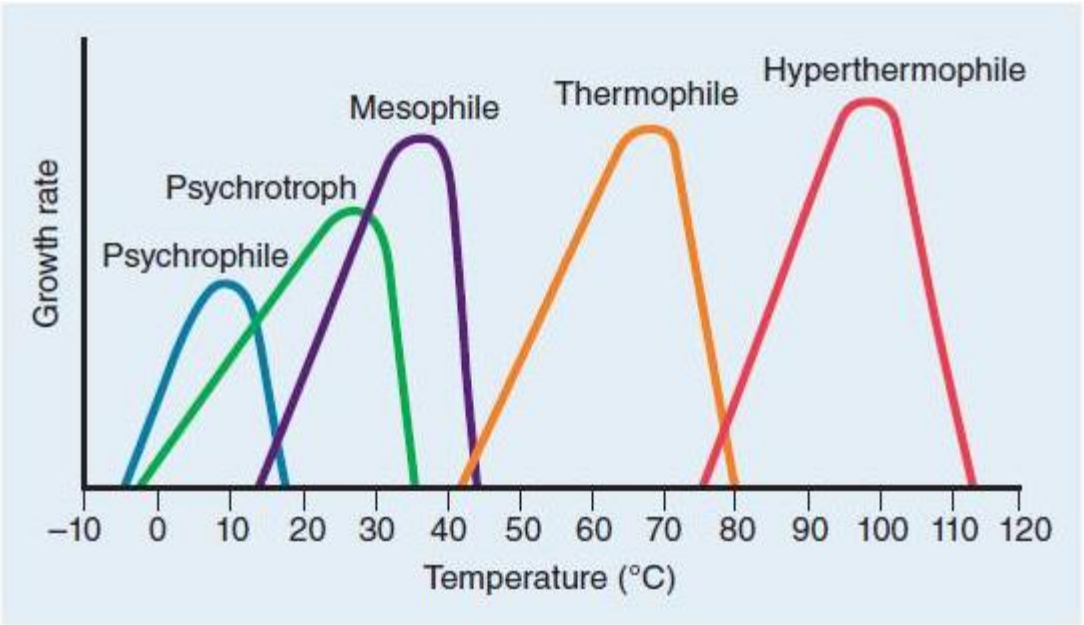


Figure 2 : Effet de la température sur les taux de croissance des microorganismes (psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles). **(Madigan et Martinko, 2007).**

I. 5- Intérêt biotechnologique des extrêmophiles

Les organismes extrêmophiles suscitent un intérêt biotechnologique particulier en raison de leur potentiel important dans la production de biomolécules hautement stables aux conditions physico-chimiques extrêmes. En effets seuls les enzymes produites par ces micro-organismes sont potentiellement actives dans les conditions extrêmes de température et pH. Dans ces conditions le risque de contamination par les germes est diminué **(AGUILAR, 1996).**

Les connaissances sur les extrêmophiles sont employées pour développer de nouveaux bioproduits, bioprocédés dans plusieurs domaines, tel que les industries des produits chimiques, pharmaceutiques, de produits de beauté, de textiles, de papier et alimentaire **(Antranikian, 2009).**

Applications médicales ; D'autre part, l'utilisation de ces organismes a également des applications dans les domaines de la médecine et des laboratoires. Ils peuvent être utilisés pour les réactions PCR en biologie moléculaire, pour la détection des maladies et pour le développement de médicaments **(Guézennec, J. 2010).**

Ils illustrent les capacités étonnantes d'adaptation de la vie aux milieux les plus divers et les plus hostiles, ce qui crédibilise l'idée que des formes de vie semblables se trouvent sur des planètes en apparence non viables.

II. Les niches écologiques :

II. 1. Biotopes chauds

Les biotopes chauds sont des environnements dans lesquels vivent les thermophiles. Ils sont généralement d'origine naturelle associés à des zones tectoniques actives mais peuvent aussi avoir une origine artificielle.

En écologie, un biotope est un lieu de vie défini par des caractéristiques physiques et chimiques déterminées relativement uniformes. Ce milieu héberge un ensemble de formes de vie composant la biocénose : flore, faune, fonge, et des populations de micro-organismes. **(GRÉGOIRE et al., 2009)**



Figure 3 : Exemples de biotopes naturels chauds**. (Bouacem, 2016).**

II. 1.1 Biotopes naturels

Les environnements naturellement chauffés se trouvent dans les sites volcaniques terrestres (y compris les roches volcaniques), les cheminées hydrothermales terrestres, les systèmes hydrothermaux sous-marins (sédiments, volcans submergés, fumerolles), les sites souterrains (tels que les réserves de pétrole) et les sols chauffés par le soleil. Les micro-organismes thermophiles sont largement répandus **(Gregoire, 2009).** Répartis sur notre planète dans des habitats géothermiques naturels, souvent associés à des ceintures tectoniques actives. Ces écosystèmes peuvent avoir une origine :

Géothermique terrestre : les propriétés de l'eau vont dépendre des roches qui la traversent et sont souvent associées à une activité volcanique, la température de l'eau in situ va dépendre de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100 °C et le pH acide ou alcalin de la surface de la Terre. C'est le cas des sources chaudes situées en Islande, aux Açores et même dans les parcs nationaux de Yellowstone **(figure 2) (Gregoire, 2009).**

Fluides hydrothermaux des grands fonds : Les fluides hydrothermaux jaillissent du fond marin par des cheminées noires, et la température du liquide varie de 20 à 400°C, selon l'endroit. Ce fluide hydrothermal est riche en composés réducteurs tels que H2S, CH4, NH4+ et en éléments métalliques tels que Mn2+, Fe2+, Lit, Cd2+, Cu2+ et Zn2+. Le mélange de ce liquide avec de l'eau de mer froide (2°C) entraîne la précipitation de divers sulfures métalliques et de sulfate de calcium anhydre, à l'origine de « fumeurs » et de « diffuseurs », formant progressivement des bouches hydrothermales. C'est dans cette zone de mélange turbulent, entre fluides hydrothermaux surchauffés et toxiques et eau de mer froide et oxygénée, que pourrait se développer la vie hydrothermale **(Minic et al., 2006).**

Pétrole : Certains de ces gisements de pétrole sous-marins et continentaux se trouvent entre 1,5 et 4 km de profondeur, avec des températures allant de 60 à 130°C et un pH généralement neutre. **(Gregoire, 2009).**

II.1-2 Biotopes artificiels thermiques

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

2. Sources thermales

Les sources thermales sont des environnements naturels présents partout dans le monde et leur utilisation représente une ressource socio-économique ayant un impact sur les applications médicales et de bien-être de sanus per aquam (SPA). Des équilibres physico-chimiques et microbiologiques caractérisent ces niches écologiques et leurs connaissances sont essentielles pour définir les propriétés de l'eau et soutenir une gestion appropriée **(Valeriani et al., 2018).**

2.1 Définition

Les sources thermales, ou sources chaudes, sont des résurgences naturelles d'eau chaude fortement minéralisées. Si elles sont souvent associées à des processus magmatiques et à la proximité d'un système volcanique, leur présence peut être également simplement liée à un gradient géothermique supérieur à la moyenne. **(Morgane Gillard., 2022)**

Il n'y a pas de définition précise d'une source chaude. Ce terme est généralement donné à toute source naturelle dont l'eau dépasse la température de l'environnement. La gamme de température est ainsi très étendue et s'étage de 20 à 100 °C. La source de chaleur est par contre totalement naturelle et provient de l'énergie géothermique.

Les sources thermales les plus connues et bien étudiées sont situées en Amérique du Nord (Parc national de Yellowstone), en Islande, à la Nouvelle-Zélande, au Japon, en Italie et à l'exUnion soviétique **(Lund et John, 2007)**. Dans la **figure 5**, sont citées quelques sources thermales dans le monde.

Le territoire algérien est aussi riche, il existe 280 sources thermales d'après une étude d'actualisation effectuée en 2015, dont le nombre croît régulièrement en s'approchant vers le Nord-Est. En effet, les températures mesurées à l'émergence varient de 19°C à Ben Haroun à 98°C à Hammam Meskhoutine **(Ouali, 2008)**.



Figure 4 : Exemples de sources thermales dans le monde. **(Kaki, 2016).**

2.2 Composition des eaux thermales

Les éléments les plus retrouvés dans une eau thermo-minérale sont :

➢ **Des gaz :** Oxygène, Azote, Dioxyde de carbone et Hydrogène sulfuré.

➢ **Des sels minéraux :** Chlorures, Sulfates, Calcium, Magnésium, Sodium, Potassium.

➢ **Des oligo-éléments :** Cuivre, Zinc, Arsenic, Bore, Brome, Fer, Manganèse…etc. **(Lucie Lefebvre ,2021).**

II .4. Les bactéries des sources hydrothermales :

Autour des sources hydrothermales, la température varie selon un gradient fluctuant, où se retrouvent différentes populations de bactéries.

La plupart des bactéries de ces écosystèmes sont des Archaea. Mais on peut trouver des bactéries de type sulfo.-oxydantes (Beggiatoa, Pyrodiciiuin, Thermococcus, Pyrococcus,Thiothrix) , des bactéries sulfatoréductrices (Archaegiobus), des bactéries méthanogènes (Methanococcus) et quelques autres ayant des actions nitrifiantes et dénitrifiantes. Ces microorganismes présentent diverses caractéristiques spécifiques concernant notamment l'ARN ribosomal, les lipides, l'architecture membranaires et l'ADN, qui diffèrent de celles connues chez les autres organismes vivants procaryotes et eucaryotes. **(Minic et al., 2006).**

Chapitre II :

Les bactéries thermophile

Généralités

Plusieurs habitats naturellement thermophiles sur la terre abritent une flore bactérienne spéciale, supportant les hautes températures. Existe plusieurs catégories de bactéries poussant à des. Températures supérieures à 55°C En effet, les bactéries dites thermophiles ont une température optimale de croissance supérieure à 55°C, alors que celles poussant à des températures Supérieures à 65C sont considérées comme étant des thermophiles extrêmes, et celles croissant à 80°C et plus sont nommées hyper thermophile **(Wiegel et Kevbrin, 2004).**

I.1 Définition

Plusieurs définitions ont été proposées pour définir **thermophile**. Le plus reconnu est celui de Thomas D Brock, un microbiologiste qui a découvert les microbes thermophiles. Selon cette définition, les thermophiles sont des organismes dont la température optimale de croissance est supérieure à 60°C **(Alain et al., 2010)**.

Les thermophiles peuvent vivre et se reproduire à des températures comprises entre 50 et 70°C. Ils peuvent pousser entre 25 et 40°C, mais la croissance est faible. Les thermophiles existent chez les eucaryotes tels que les protozoaires, les champignons et les algues, et les procaryotes tels que les streptomyces, les cyanobactéries, les clostridies et les bacilles. Les eucaryotes connus ne peuvent pas survivre à des températures supérieures à 60 degrés Celsius. La bactérie Thermus aquaticus est un exemple de thermophile ; la haute thermotolérance de son ADN polymérase est utilisée dans la réaction en chaîne par polymérase **(Xue et al .,2003).**

I.2 Les principales bactéries thermophiles

- Bacillus (Bacillus stearothermophilus, Geobacillus stearothermophilus, Bacillus coagulans,),
- Thermus, Thermomicrobium, symbiobacterium, Clostridium (Clostridium thermocellum**). (Patrick, 2007).**

I.3- Diversité (phylogenie) des thermophiles

Les études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal ont permis de mettre en évidence l'existence de trois domaines du vivant Bacteria, Archaea, et Eucarya.

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 algues unicellulaires, de 60-62°C chez les champignons microscopiques et de 70°C chez les protozoaires. Chez les procaryotes, l'on compte un grand nombre d'hyperthermophiles dont beaucoup sont affiliés aux archées. Le microorganisme le plus hyperthermophile connu à ce jour est l'archéa Pyrolobus fumarii capable de se diviser à la température maximale de 113°C et incapable de se développer en dessous de 90°C. La croissance d'archées à des températures maximales de 121 voire 122°C a également été rapportée. **(Woese CR, Whelis ML. 1990).**

Les hyperthermophiles les plus extrêmes sont des Archaea, ils appartiennent aux genres Pyrobaculum, Pyrodictium, Pyrococcus et Methanopyrus, comme l'espèce Pyrococcus abyssi ou « la boule de feu des abysses » qui a été isolée au niveau d'une cheminée de source hydrothermale à 2000 m de profondeur, au Nord du bassin Fidjien, dans l'océan Pacifique, son optimum de croissance est à 96°C. Alors que les bactéries, Thermotoga maritima et Aquifex pyrophilus croissent à des températures de 90°C et 95°C respectivement **(Hickey and Singer, 2004).**

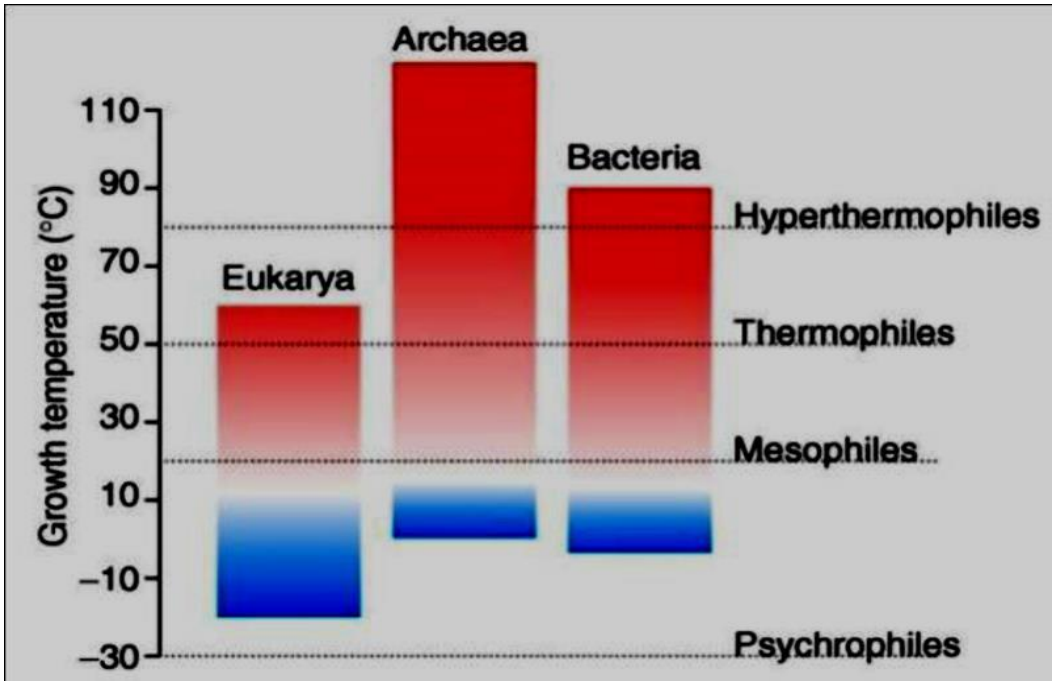


Figure 5 : La thermophilie dans les trois domaines du vivant **(Hickey and Singer, 2004).**

I.4- Adaptations physiologiques aux thermophiles

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 thermophiles. L'analyse de biomolécules importantes chez les bactéries thermophiles a révélé des différences structurales subtiles dans les protéines, les acides nucléiques et les lipides**. (Alain et al., 2010).**

- **Protéines**

Les protéines des thermophiles et hyperthermophiles sont plus thermostables que celles de leurs homologues mésophiles et fonctionnent de manière optimale à haute température. Cette thermostabilité intrinsèque des protéines en général 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. La synthèse en grandes quantités de solutés osmo-compatibles contribue également à protéger les protéines d'une dégradation thermique **(Santos et al., 2011)**.

Protéines de choc thermique : Les thermophiles produisent un groupe particulier de protéines « chaperons », « chaperonines » ou « heat shock proteins » agissant à haute température par le maintien du repliement correct et fonctionnel des protéines cellulaires. Chez certains hyperthermophiles, elles sont synthétisées de manière continue et abondante. Elles sont essentielles à la survie cellulaire **(Di Giulio, 2005).**

Un contenu élevé en bases G et C ; Il est souvent remarqué, lors des séquençages des métagénomes issus d'environnements chauds que leur contenu en Guanine et Cytosine (G+C) est plus élevé. En plus, il a été démontré que les ARN de transfert et les ARN ribosomiques avaient un contenu plus élevé en G+C, et ceci afin d'être plus stables à haute température et éviter ainsi les erreurs lors de la traduction. **(Lewin et al.,2013 ; Ranawat et Rawat ,2017)**

- **Les membranes cytoplasmiques**

Les membranes cytoplasmiques des microorganismes thermophiles possèdent une structure particulière leur permettant de rester stables et fonctionnelles aux températures élevées. Un exemple d'adaptation thermique évolutive est la modification de la composition lipidique membranaire. La stabilité de la membrane bicouche et la perméabilité de la membrane doivent être maintenues à des températures élevées et ceci est obtenu par la modification des pourcentages des différents lipides. Cela rend leurs mécanismes d'adaptation de la membrane à la température différente. Alors que les archées thermophiles maintiennent la fonctionnalité de la membrane à toute la plage de températures grâce à leurs chaînes isoprénoïdes uniques, les bactéries thermophiles présentent des modifications de la composition en acides gras en fonction de la température. (**Ferrera et Reysenbach,2007).**

Acides nucléiques

L'ADN est instable à haute température .Transfert horizontal de gènes (HGT) est l'un de ces mécanismes de bactéries qui fournit les capacités d'adaptation et de thermotolérance. Un l'exemple est inverser enzyme gyrase qui est transféré des archées aux bactéries. La gyrase inverse aide au super enroulement, ce qui réduit la température de fusion de l'ADN. Ainsi, les bactéries commenceront à se développer lentement à une température plus élevée. Le transfert de ces gènes d'une bactérie à une autre par HGT aidera à acquérir les mêmes traits et à devenir thermophiles. **(Xue et al, 2003).**

I.5- Les besoins nutritif des bactéries thermophiles :

Les bactéries thermophiles ont parfois des besoins nutritifs particuliers voire même essentiels. Plusieurs auteurs ont rapporté ces observations, comme par exemple **(Sürücü 1999)**. Dans ses travaux, il expose les besoins spécifiques des thermophiles au niveau des acides aminés, des vitamines et des minéraux. La méthionine s'avérait être absolument essentielle dans ce cas, alors-que l'histidine stimulait la croissance. Les vitamines BI (thiamine) et B2 (riboflavine) stimulaient aussi la croissance. Au niveau des minéraux, le magnésium, mais aussi le calcium et le fer, semblaient très important. Ses travaux démontraient aussi un effet nutritionnel synergique dans ses cultures, car les espèces dominantes étaient moins exigeantes, sur le plan nutritionnel, en culture mixte qu'en culture pure **(Mair,1986).**

I.6 - Biotechnologie des thermophiles

Les thermophiles sont utilisés dans divers procédés se déroulant à haute température et intéressant des domaines aussi variés que la chimie, la pharmacie, l'agro-alimentaire, ou encore la biologie moléculaire.

- ✓ Les travaux de recherche sur les thermophiles sont pour une grande part motivés par les applications biotechnologiques, deux types d'applications différentes peuvent être distingués. La première repose sur l'utilisation directe des organismes et la seconde sur leurs biomolécules, ce sont les enzymes, mais aussi

les protéines, les lipides, les osmolytes (thermolytes) et une grande diversité de métabolites secondaires. **(Alain et al., 2010).**

- ✓ Une activité métabolique élevée entraine une augmentation des taux de formation de produit.
- ✓ Inactivation ou élimination des microorganismes / pathogènes mésophiles.
- ✓ 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. **(Urbieta etal, 2015).**

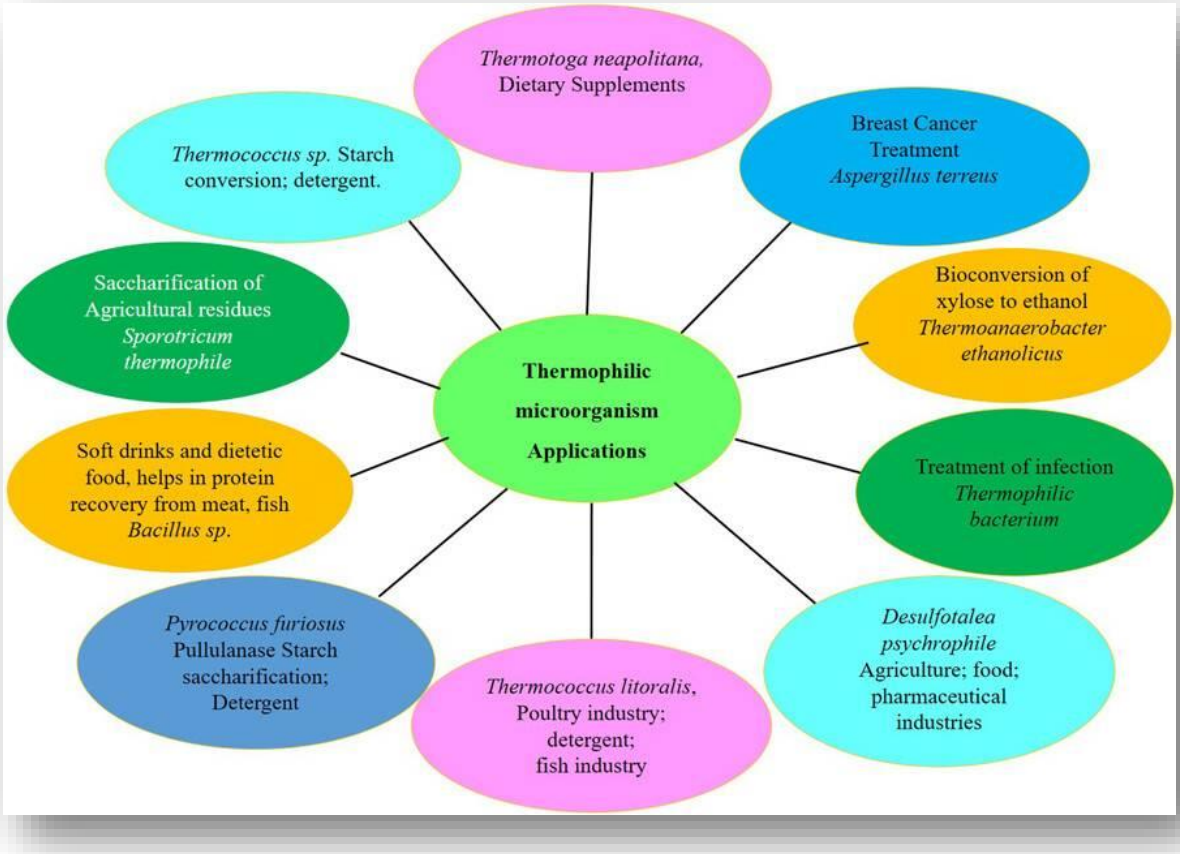


Figure 6 : Applications Biotechnologie des thermophiles (Mehta et al., 2016).

Chapitre III :

Les Thermo-enzymes

Thermo-enzymes

Les enzymes thermostables **(thermo enzyme)** sont des macromolécules issues de microorganisme thermophiles de nature protéique caractérisées par leur activité catalytique qui gouverne des réactions biochimiques spécifiques, Grâce à leur caractéristiques physico- chimiques qui en font des outils particulièrement intéressants pour de nombreuses applications,

Les thermo-enzymes sont souvent plus stables, faciles à utiliser, elles permettent, d'une part, de réduire le nombre d'étapes dans certains procédés industriels, d'augmenter la productivité, et d'autre part d'accéder à des nouveaux domaines d'applications du fait de leurs résistances vis-à-vis de la température. Les principaux facteurs qui contribuent à la stabilité des enzymes thermophiles sont : l'augmentation du pairage ionique, l'augmentation des interactions hydrophobes (ex : à l'interface des sous-unités), une diminution du ratio surface/volume, I 'augmentation du nombre de ponts disulfures et hydrogènes, une diminution des contraintes conformation elles et une stabilité des boucles**. (Hiteshi et Gupta,2014 ; Sarmiento et al .,2015 ;Bialkowska et al .,2016)**

Les enzymes produites par les thermophiles et les hyper-thermophiles (bactéries, champignons) sont habituellement thermostables, c'est-à-dire qu'elles sont résistantes à l'inactivation iréversible à des températures élevées. On les appelle thermozymes ou thermo-enzymes **(Li et al.,2005)**. Les enzymes produites par les mésophiles sont, quant à elles, connues sous le nom de mésozymes. Ces dernières ne sont souvent pas appropriées pour certains procédés industriels qui requièrent des conditions réactionnelles parfois rudes et particulières (température, pH, présence de solvants).

Les thermo-enzymes possèdent des avantages biotechnologiques par rapport aux mésozymes. Elles sont plus résistantes que les mésozymes à la dénaturation thermique et chimique (**Zrikus et al., 1998)**. Elles sont plus faciles à purifier par traitement à la chaleur **(Li et al., 2005).** En raison de leur thermo stabilité, les réactions catalysées par des thermo-ezymes sont moins susceptibles d'être contaminées par des microorganismes et ont souvent des taux réactionnels plus élevés que les mêmes réactions catalysées par des mésozymes. Ainsi que, le fait d'opérer des procédés à des températures élevées entraîne une diminution de la viscosité du milieu réactionnel en plus d'augmenter la solubilité des substrats **(Bruins et al., 2001).**

2. Les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes de dégradation qui provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-0 des peroxydes‹ C-N des amides **(Bornscheuer, 2002).**

2.1. Les protéases

Les enzymes protéolytiques ou les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui relie deux acides aminés dans une chaine peptidique **(Benedykt et Katarzyana, 2008 ; Mukherjee et al., 2008 ; Reddy et al., 2008)** .Les protéases sont classées en deux groupes, les protéases extracellulaires et les intracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques. Les protéases extracellulaires sont importantes pour I'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule **(Kalisz, 1988)**. Ces dernières sont plus intéressantes à utiliser en industrie, car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction**. (Rao et al., 1998).**

Elles se différencient également selon leur mode d'action en deux groupes, les **endopeptidases** et les **exopeptidases**. Les exopeptidases agissent seulement sur les liaisons peptidiques proches des extrémités de la chaîne peptidique. Par contre, les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique **(Rao et al., 1998).** La majorité des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases.Celles-ci sont classées en quatre groupes selon la nature de leur site catalytique :

Les **protéases sérines** (EC 3.4.21l.x),

Les **protéases cystéines** (EC 3.4.22.x),

Les **protéases aspartiques** (EC 3.4.23.x) et

Les **métalloprotéases** (EC 3.4.24.x).

Ces dernières forment le groupe de protéases le plus varié. **(Rambaud et al., 2004 ; Antranikian, 2009).**

2.2. Les amylases

Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des enzymes appartenant à la troisième classe, celle des hydrolases, de type endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. En effet, les amylases catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrines et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables **(Gupta et al., 2003)**. Elles sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires au maintien de la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme et à son activité **(Fogarty et al, 1980)**.

Les amylases sont classées en deux catégories, endoamylases et exoamylases. Les endoamylases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de diverses longueurs de chaîne. Les exoamylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts **(Gupta et al, 2003).**

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

2.3. Les cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)-B-D-Glucanohydrolase] sont des enzymes qui peuvent hydrolyser la cellulose en sucres simples en formant un système enzymatique complexe **(Kader, 1999 ; Korish, 2003)**. Elles appartiennent à une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1, 4 B-D glycosidiques **(Beguin et Aubert, 1994).**

Les cellulases sont classées selon leurs structures. En effet, pour l'hydrolyse totale de la cellulose, il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires **(Seriban, 1993).**

- Les endo-1,4-ß-glucanases: ces endoglucanases coupent aléatoirement les liaisons oglycosidiques internes donnant ainsi des chaînes glucanes de différentes longueurs.

- Les exo-1,4-ß-D-glucanases: ces exoglucanases agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du B-cellobiose comme produit final.
- Les B-glucosidases: qui hydrolysent les disaccharides « B-cellobiose » et produisent le glucose **(Bayer et al., 1994; Singh, 1999).**

Les cellulases représentent environ 20 % du marché mondial des enzymes **(Bhat, 2000 ; Miettinen-Oinonen, 2004; Wang et al., 2004; Lekchiri et al., 2006)**. Elles possèdent un large éventail d'applications dans les industries du textiles pour le bioblanchiment des tissus et aussi dans les détergents de blanchisserie utilisés pour ramollir les tissus **(Kaur et al., 2007 ; Aygan et Arikan, 2008)**. L'intérêt porté aux cellulases augmente également dans la production du bioéthanol comme les enzymes qui sont employées pour hydrolyser les matériaux cellulosiques prétraités pour les sucres fermentescibles **(Wang et al., 2009).**

2.4. Les pectinases

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont des enzymes qui se caractérisent par leur pouvoir de dégrader la pectine. Elles forment un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine. Ces dernières représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale. Alors, cette action se résume dans le clivage de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ouvrant ainsi les liaisons glycosidiques, réduisant I'adhésion intracellulaire et la rigidité tissulaire. Ce qui aboutit par conséquent à la dégradation de la paroi cellulaire, l'éclatement des cellules, et donc, au symptôme de macération **(Bateman et Basham, 1976).**

Les enzymes pectinolytiques sont classées en trois grands groupes, selon leurs modes d'action sur l'acide polygalacturonique (PGA) (unité fondamentale de la pectine), à savoir : les protopectinases, les estérases et les dépolymérases. Les protopectinases sont des enzymes ayant pour rôle de dégrader la protopectine insoluble et donner naissance à des pectines solubles hautement polymérisées ; les esterases catalysent la désestérification des pectines par l'élimination des esters méthoxyles,et les dépolymerases catalysent le clivage hydrolytique des liaisons α-(1-4)-glycosidiques de l'acide D-galacturonique **(Jayani et al., 2005).**

2.5. Lipases

Les lipases sont l'une des classes d'enzymes les plus couramment utilisées en biocatalyse. Elles catalysent l'hydrolyse des triacylglycérols en diacylglycérol, monoacylglycérol, glycérol et acides gras libres. La réaction s'inverse dans des conditions anhydres et l'enzyme est capable de synthétiser de nouvelles molécules par estérification, alcoolyse et transestérification **(Novozymes, 2016)**. Les lipases thermostables sont nécessaires dans de nombreux domaines et présentent plusieurs avantages pour le déroulement des réactions hydrolytiques à haute température. Un taux plus élevé de formation de produit, une grande dissolution de substrats hydrophobes, une énergie cinétique accrue des réactifs et une efficacité de conversion élevée sont observées avec ces enzymes **(Salihu et Alam, 2014).** Plusieurs bactéries thermophiles, particulièrement celles faisant partie des genres Geobacillus et Anoxybacillus sont décrites comme produisant des lipases thermostables dont certaines peuvent présenter une température d'activité optimale de 70 °C **(Novozymes, 2016).**

2.6. Les xylanases

Sont importantes sur le plan industriel et ont une demande croissante sur le marché. Il s'agit d'enzymes hydrolytiques (O-glycoside hydrolases) qui clivent au niveau de la liaison β-1, 4-xylosidique du xylane, un constituant important de la paroi cellulaire végétale (**Debnath et al, 2019).** Généralement, les xylanases sont produites par des cultures fongiques, car ces enzymes sont utilisées dans la nature par les champignons pour leur croissance. Des bactéries thermophiles appartenant à Thermoanaerobacterium, Thermotoga, Alicyclobacillus, Anoxybacillus et Cellulomonas sont connues pour leur production de xylanases **(Sanchez et Demain, 2017).**

2.7. Les chitinases

La chitine est l'élément structural principal de la plupart des mycètes et de quelques invertébrés **(Antranikian et al, 2005)**. C‟est un homopolymère linéaire de N-acétyl-Dglucosamine à liaison α (1-4). Dans les environnements marins, la chitine est produite en grande quantités et sa conversion est assurée par des enzymes chitinolytiques qui sont

- ✓ des chitines endo-hydrolases (Chitinases A : EC 3.2.1.14),
- ✓ des oligomères exo-hydrolases (Chitinases B : EC 3.2.1.52)
- ✓ et la N-acétyle-D-glycosaminidase (Chitobiase C : EC 3.2.1.30).

Les enzymes chitinolytiques sont employées pour une large action sur plusieurs substrats et dérivés chitineux (**Antranikian, 2008)**. La présence d‟enzymes chitinolytiques a été observée chez les archées et les bactéries**.** Les gènes codant ces enzymes ont été isolés, clonés et caractérisés. Plusieurs espèces microbiennes sont à l'origine de la synthèse de chitinases: Thermococcus chitinophagus**,** Colletotrichum gloeosporioides Cg-10 (et Bacillus licheniformis **(Andronopoulou et Vorgias, 2004).**

2.8 Enzymes utilisées en biologie moléculaire :

La technologie de l'ADN recombinant repose sur l'utilisation d'une gamme très diversifiée d'enzymes : Enzyme de restriction, ADN polymérase, ADN ligase, etc. ADN polymérase Les molécules résistantes à la chaleur jouent un rôle fondamental dans les technologies d'ingénierie du vivant. On peut déjà mentionner l'extraordinaire succès de la méthode PCR (polymerase chain reaction) La réplication de l'ADN est autorisée pour "n" copies. Enzymes les plus couramment utilisées pour l'amplification Le gène a été obtenu à partir de Thermus aquaticus **(Air et Harris, 1974),** suivi des ADN polymérases isolées d'archées hyperthermophiles (Tfu Pol de Thermococcus fumicolans, Pab Pol de Pyrococcus abyssi), une phosphatase alcaline Pour l'immunomarquage et l'ADN ligase. La LCR (ligase chain reaction) utilise la Tth ligase de Thermus thermophilus et Permet l'identification des gènes anormaux **(Antranikian, 2008).**

2. Potentiel enzymatique des bactéries thermophiles

Les thermo-enzymes sont des macromolécules catalytiques issues de microorganismes thermophiles. Une des premières utilisations des biomolécules issues des thermophiles a été l'emploi de leurs polymérases pour la réplication in vitro des acides nucléiques. Actuellement, un nombre considérable d'enzymes thermostables issues de microorganismes thermophiles sont employées en biologie moléculaire et dans les technologies de l'ADN recombinant : des ADN et des ARN polymérases ; des transcriptases reverses ; des enzymes de restriction ; des ligases et des nucléases, etc. **(Sharma et al., 2013; Kumar et al., 2016a; Beygmoradi et Homaei, 2017; Straub et al., 2018).** Une large panoplie d'enzymes isolées à partir de thermophiles sont également employées en biocatalyse pour la production et la transformation de molécules de grande valeur en analyse

Les xylanases sont aussi utilisées dans le domaine agroalimentaire et surtout dans le secteur de clarification des jus. L‟utilisation de ces enzymes permet la diminution du taux de matières insolubles jusqu'à 27 % ce qui donne un meilleur rendement et facilite la filtration de jus. En effet, le rendement d‟extraction des jus de fruits est nettement amélioré par l‟application d‟une mixture d‟enzyme: xylanase, pectinase et cellulase **(Karmakar et Ray, 2011).**

Les cellulase sont des enzymes très importantes utilisées dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques, thérapeutique, l'industrie des détergents et la papeterie, pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques **(Hamoudi, 2011).** Ils sont également utilisés en nutrition animale, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes et dans la production de biocarburants (pour la couverture énergétique) **(Smeets et al., 2004).**

Chapitre IV : Activité antimicrobienne Et Biofilm

IV .1 Agent antimicrobien

Antimicrobien est un terme faisant principalement référence aux antibiotiques, Agents antibactériens, antifongiques, antiviraux et antiprotozoaires, qui peuvent être Médicaments, produits chimiques ou autres substances pouvant agir de deux manières mode, qui tue (microbicides) ou ralentit la croissance des micro-organismes (inhibition microbienne). **(Asif, 2017).**

Le premier agent antibactérien au monde est Salvarsan , un traitement Syphilis synthétisée par Ehrlich en 1910. En 1953, les sulfamides ont été Développés par Domagk et d'autres chercheurs, les médicaments sont des composés Synthétique, avec des limites d'innocuité et d'efficacité. 1928 Flamand La pénicilline a été découverte et la croissance de Staphylococcus aureus s'est avérée être Réprimé dans les zones autour de la moisissure bleue contaminée (un type de champignon) genre Penicillium) dans des boîtes de Pétri, conduisant à la découverte de Les micro-organismes produisent des substances qui inhibent la croissance d'autres organismes Micro-organismes **(Saga et Yamaguchi, 2009).**

Augmentation rapide des agents pathogènes multi résistants Une attention mondiale est également nécessaire pour développer de nouveaux Antimicrobiens, nouvelles options de traitement et thérapies antimicrobiennes Alternatives **(Begani et al., 2019).** Un examen commandé par le gouvernement britannique, On pense que la résistance aux antibiotiques tue 10 millions de personnes par an d'ici 2050 **(Murray et al, 2022).** Stimule la concurrence pour les nutriments et l'espace dans un habitat donné Les organismes développent leurs propres stratégies de survie et de croissance, dont l'une est Sécrétion de substances antimicrobiennes causant la mort ou des blessures croissance d'organismes concurrents, ces substances ont des effets cliniques et Industrie prometteuse **(Alkhalili et al, 2016).**

IV.2 Biofilms bactériens :

1. Généralités sur les biofilms :

Il est maintenant reconnu que la capacité de développer un biofilm est un trait distinct de divers micro-organismes. On pense qu'environ 80% de la biomasse microbienne sur Terre existe sous forme de biofilm, qui comprend divers types de micro-organismes (**Filloux & Vallet, 2003),** tels que ceux qui entraînent la détérioration des aliments et les espèces pathogènes responsables de nombreuses infections. De plus, ce mode de vie sert de mécanisme permettant la croissance de micro-organismes dans différents environnements **(Dufour & Svoboda, 2005).**

Il fournit également une protection vitale contre les facteurs environnementaux tels que les défenses de l'hôte et des prédateurs, les substances toxiques, la dessiccation et les agents antimicrobiens grâce à la coopération bactérienne. De plus, il permet la production et l'acquisition de nutriments par croisement entre bactéries, facilitant la création d'un environnement physico-chimique propice à la croissance des différentes espèces présentes au sein du biofilm **(Dufour & Svoboda, 2005).**

2 . Définition

Un biofilm est un ensemble de microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèce différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il constitue un ensemble de cellules isolées et de micro colonies de cellules filles, associés entre elles et/ou au surfaces **(Alain Branger et al, 2012).**

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes capables de synthétiser et de sécréter une matrice protectrice en se liant fortement à un support (e.g : un tissu**) (Phillips PL et al.,2010).**

Les bactéries en biofilm peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique (ex : cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (canalisations, coques des navire et cathéters) comme il est possible à un biofilm d'adhérer sur des matériaux « anti-adhésifs » tels que le polytétrafluoroéthylène (ou téflon) **(Uhlich et al.,2006; Tremblay et al., 2015).** De plus, les biofilms adultes sont des structures bien organisées dans lesquelles les canaux d'eau sont dispersés et peuvent fournir des passages à l'échange d'aliments, métabolites et produits inutilisés (**Akbas, 2015).**

En outre, les bactéries présentes dans un biofilm possèdent des propriétés très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension) parmi lesquelles des modifications structurales telles que la disparition des flagelles, la synthèse d'exo polymères, la mise en place d'un système de communication chimique quorum sensing **(Flemming, 1990 ; Costerton et al., 1995).** Ces bactéries expriment un phénotype différent de celles en suspension dans lequel entre 3 et 50% du protéome total est modifié par rapport à celui des cellules planctoniques **(Sauer 2003 ; Jouenne et al., 2004).**

IV.3 Composition :

Selon Costerton (1999), les biofilms sont principalement composés de la matrice qu'ils synthétisent et de micro-organismes, bien que les micro-organismes constituent 2 à 5 % de la matrice, la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée dès le biofilm Biofilm Dépend de l'espèce concernée.

3.1. Micro-organismes :

Les biofilms sont constitués de communautés bactériennes complexes dans lesquelles plusieurs espèces peuvent être trouvées attachées à différents matériaux **(Akbas, 2015)** Dans des conditions naturelles, des biofilms d'une seule espèce dans les environnements industriels en raison du stress environnemental Relativement faible. Le choix d'exercer est déterminé par les conditions du processus technologique **(Sutherland, 2001 ; Malek et al., 2013).** En effet, la plupart des biofilms sont généralement composés de différents types de micro-organismes : bactéries, algues, protozoaires, mycètes, dans lequel chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées **(Branger et al., 2007 ; Alnnasouri, 2010).**

3.2. La matrice(EPS) :

La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend de la disponibilité nutritive, la synthèse et la sécrétion de matière extracellulaire. Cette matrice peut être constituée non seulement de polysaccharides, mais elle comprend aussi des protéines, des 'acides nucléiques, des 'agents tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations. Cette composition est variée selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (**Tremblay et al, 2014).** Elle fournit aux microorganismes des avantages structurels et fonctionnels, tels que :

1. L'hydratation
2. La capture de ressource
3. La capacité digestive
4. La protection et la résistance aux agents antimicrobiens
5. Les interactions réciproques intercellulaires qui peuvent améliorer la capacité du métabolisme de cellules dans le biofilm **(Flemming et al., 2016).**

III.4 Les étapes de formation de Biofilm :

Les bactéries semblent initier la formation de biofilms en réponse à des stress environnementaux, tels que le manque d'oxygène ou de nutriments ou la présence de traitements. Les biofilms peuvent se développer sur une variété de surfaces, y compris les tissus vivants, les dispositifs médicaux ou tout support trouvé dans le sol ou les environnements aquatiques. Il existe généralement cinq étapes dans la formation des biofilms : **(Phillips PL et al., 2010).**

.4 .1Film de conditionnement ou le film primaire

La première étape de formation se **déroule** en quelques minutes, c'est une étape rapide le film est formé par des dépôts de particules vient du milieu environnant en tant qu'une matière minérale (sel, glucides ; lipides..) .ce dernier sert aux modification des propriétés physicochimiques de surface pour la création d'un microenvironnement favorable à l'adhésion stable des bactéries ainsi la prévention de l'approche des **(Squinazi, 2013); (Bezoui, 2016)]**

4. 2.Transport des bactéries vers son support (surface)

Transport des microorganismes à proximité de surface à partir du milieu ou le biofilm en phase de dispersion, ce transport dépend de plusieurs facteurs dont la nature, les mouvements (sédimentation, mouvement de brownies) et le milieu. Le chimiotactisme qui est un facteur biologique est défini comme un ensemble des mouvements des flagelles d'une cellule ou des récepteurs spécifique sensible aux variations de concentration des nutriments présents **(Bezoui, 2016).**

Adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, le bactérioplancton s'approche des surfaces solides par sédimentation ou mouvement actif **(Phillips PL et al., 2010).** Ils s'y fixent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrocinétiques. Cette étape est influencée par les conditions environnementales impliquant le pH, la température, l'oxygène et la concentration en nutriments. Les bactéries se fixent plus facilement sur les surfaces rugueuses, hydrophobes et non polaires **(Beloin et al., 2008).**

Adhésion irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour E. coli, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (**Beloin et al., 2008 ;Van Houdt et Michiels,2005).**

3.3 Formation de microcolonies

Après l'étape d'adhésion les bactéries fixées se développent et se divisent soit par fission binaire soit par division asymétrique .Cela implique une prolifération cellulaire et une colonisation de la surface, ce qui conduit à l'activation des seconds messagers, à la communication intercellulaire et à la sécrétion initiale de la matrice EPS **(Guzmán-Soto et al., 2021).**

3.4 Maturation du biofilm

La structure complexe des biofilms se produit avec la formation de canaux d'eau Les pores entre les microcolonies permettent le transport de l'oxygène et des nutriments nécessaires à la croissance microbienne, ainsi que l'élimination des déchets **(MyriamAuger, 2012).** Production et sécrétion d'enzymes ou de toxines conduisant à la dégradation tissus environnants de l'hôte, permettant ainsi la libération de nutriments **(Jacobsen et al., 2008).** Les biofilms sont constitués à environ 85 % de matrice extracellulaire et 15 % des micro-organismes **(Behlau et Gilmore, 2008)**. La matrice extracellulaire est principalement composée d'eau (97%) et comprend également des polymères d'exopolysaccharides, Protéines, acides nucléiques, phospholipides, nutriments et métabolites **(Beloin et al., 2008).** La matrice a un rôle protecteur et structurant.

Les bactéries acquièrent des schémas de croissance, de physiologie et de métabolisme distincts bactéries planctoniques. Ces modifications phénotypiques sont causées par Profils d'expression génique. Les biofilms matures ont une structure tridimensionnelle avec plusieurs microenvironnements différents qui changent en fonction de l'osmolarité, du pH et de la densité cellulaire. En raison de cette L'hétérogénéité, dans laquelle l'état métabolique des bactéries diffère selon leur localisation : plusieurs phénotypes bactériens au sein des biofilms Le contact étroit entre les micro-organismes est propice au transfert horizontal de substances. Riel génétique. Ce phénomène contribue notamment à la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques **(Trautner et Darouiche, 2004).**

6.6. Dispersion

La dernière étape de formation sous l'effet du vieillissement de biofilm .il existe deux types de dispersion : la dispersion passive se fait par le biais de flux ou les forces Cisc aisément en trois types qui sont l'érosion (est un détachement continu des cellules individuelles), relargage (est un détachement massif des bactéries) et l'abrasion (par collision des particules). La dispersion active se fait grâce aux signaux enviromentaux (azote, carbone…) elle est effectuée par plusieurs facteurs comme la physiologie des cellules elle-même, modification des propriétés de surface (**Kaplan, 2010).**

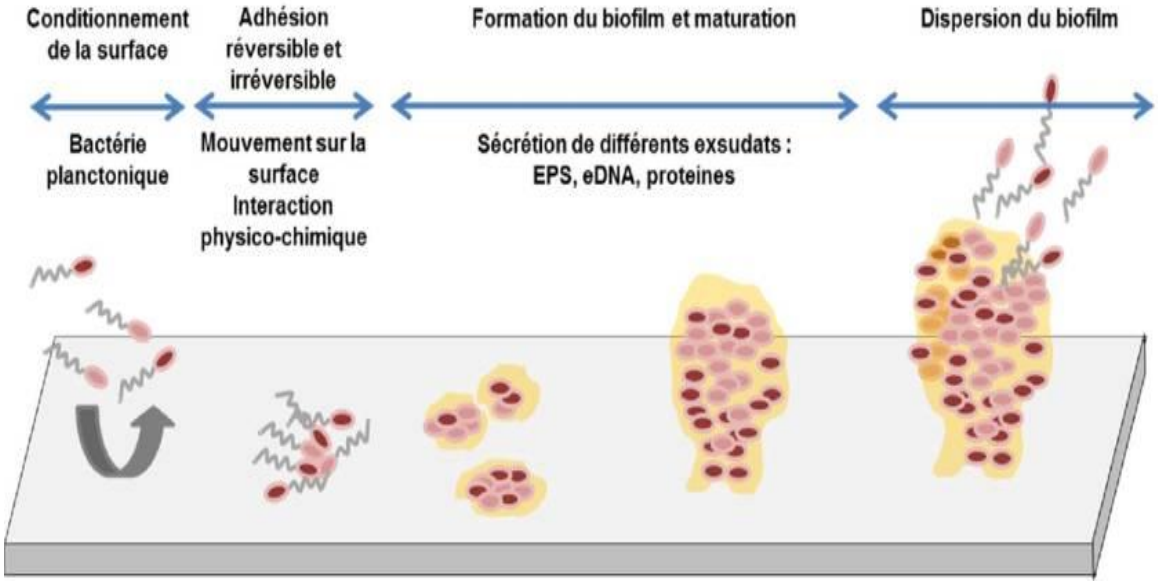


Figure 07 ; Les étapes de formation de Biofilm **(Phillips PL et al.2010)**

5. Rôle du biofilm

Selon l'impact des biofilms sur l'homme, tels que l'environnement, la sécurité alimentaire, la production animale et végétale et les domaines médicaux, les biofilms peuvent être divisés en trois catégories : les biofilms bénéfiques, les biofilms nocifs et les biofilms neutres.

Le premier type joue un rôle clé dans de nombreux processus tels que le traitement des eaux usées, la biodégradation et la bio remédiation. Lors du traitement des eaux usées, ils se forment dans des bioréacteurs et participent à l'élimination des matières organiques, à l'adsorption des matières en suspension et à l'épuration des eaux usées brutes. Dans la biodégradation et la bio remédiation, les biofilms forment des communautés microbiennes uniques pour dégrader les herbicides et les antibiotiques.

Le deuxième type il intervient dans plusieurs types d'infections chez l'homme, y compris les infections associées aux dispositifs médicaux par différents micro-organismes dont les staphylocoques **(**Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis**)**,les caries dentaires, la cystite, les infections pulmonaires associées à la mucoviscidose et l'endocardite, si les dispositifs médicaux contiennent des biofilms, ils entrent en contact avec les tissus humains, les bactéries survivent et prolifèrent, et entrainent une infection nocive. Enfin le biofilm neutre existe dans la vie quotidienne humaine mais ne présente aucun dommage ou avantage en raison de l'absence d'effets nocifs ou bénéfiques, ils peuvent parfois être transformés en biofilms utiles dans des conditions unique **(Yin et al., 2020).**

Partie II : Matériel et Méthodes

I- MATERIELS ET MÉTHODES

Objectifs du travail :

- Isolement et identification phénotypique des souches thermophiles isolées à partir des sources hydrothermales
- Evaluation de l'activité enzymatique des souches préalablement isolée sur les milieux (gélose à l'amidon, gélose CMC, gélose Tween 20, gélose tween 80, gélosé à base de lait écrémé, gélose au jaune d'œuf).
- Evaluation de l'activité antimicrobienne et l'aptitude de formation de biofilm des bactéries thermophiles.

Lieu de travail

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences à l'université de Dr Yahia Farés Médéa pendant la période allant de Mars à mai 2023.

I.1 Matériels :

I.1.1 Verrerie :

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

I.1.2 Appareillage :

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

I.1.3 Milieux culture :

TTM, gélose à l'amidon, gélose CMC, gélose Tween 20, gélose tween 80, gélosé à base de lait écrémé, gélose au jaune d'œuf, bouillon nutritif, Mueller Hinton ،gélose a la base de rouge Congo**.**

I.1.4 Autres produits consommables :

NA OH , acide sulfurique, Lugol , fushin , violet de gentiane, alcool, rouge Congo, l'indole, L'huile de paraffine, poudre de zinc, L'eau distillé, l'eau physiologie (Na cl 1mol), l'eau physiologie , PBS .

I.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 filme, les écouvillons.

II.1 Méthode :

II.1.2 revivification et identification des souches :

Les souches ont été isolées l'année passée (2022) à partir des sources hydrothermales en Algérie.

II. 1.2.1 Enrichissement et ensemencement :

A partir des souches bactériennes conservées de l'année passée(2022), 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.1.2.2 Conservation :

Les souches pures sont conservées à 4 °C dans les mêmes milieux.

II.1.2.3. Identification des souches purifiées :

L'identification des isolats est basée sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques.

II.1.2.4 Identification phénotypique des souches :

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

- **Coloration de Gram :**

  - 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.

  - Sur chacune des lames dont les souches sont fixées, quelques gouttes de violet de gentiane sont déposées et laissées agir pendant 1min.

  - Après rinçage avec de l'eau de robinet, du lugol est redéposé pendant 1min pour le mordançage.

- Ensuite, la décoloration est faite par l'alcool à 95° pendant 30 secondes puis un autre rinçage est effectué.

- Enfin, un deuxième colorant (fuschine de Ziehl) est déposé pendant 30 secondes **(Larpent, 1990).**

- Après le dernier lavage et séchage des lames, l'observation est réalisée au microscope électronique (10 X 100) par l'ajout d'une goutte d'huile d'immersion.

A. Examen macroscopique :

Une fois les souches purifiées, l'observation de l'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, pigmentation, opacité, etc.), permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

B- Examen microscopique :

La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram de l'isolat sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration différentielle décrite par Gram (1884) à l'aide d'un microscope électronique. 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.

II.2. Mise en évidence des enzymes hydrolytiques extracellulaires

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

II.2.1 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 1 à 3 jours 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).**

II.2.2 Caseinase

L'activité protéolytique est examinée par l'ensemencement des souches sur gélose au lait. Les souches testées sont incubées pendant 1 à 2 jours 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).**

II.2.3 esterase

Cette activité est recherchée par l'ensemencement des souches sur milieu à base de tween 80 et 20. Après incubation à 60°C pendant 1 à 2 jours, le développement d'un précipité (zone opaque) autour des colonies témoigne de la présence d'une lipase **(Gonzalez et al, 1978).**

II.2.4 Cellulase

Le milieu de base est supplémenté par 0,5% (p/v) de carboxyméthycellulose (CMC). Après incubation à 60°C pendant 1 à 2 jours, 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 NaCl 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).**

II.2.5 La recherche de la Lécithinase

Ce test est réalisé par ensemencement de la souche en une seule strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf). L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubation à 60°C, témoigne que la souche possède la lécithinase **[De Vos et al., 2009]. (Annexe 7)**

II.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-Hinton 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. 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. 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 intercellulaire adhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse par 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 de Biofilm.

II.4.2 Méthode de microplaques de titration à 96 puits :

L'étude de la formation de biofilms est réalisée par coloration au cristal violet (CV). Cette technique permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms puisque la coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé **(Musket al., 2005).** La formation du biofilm a été réalisée dans des microplaques à 96 puits selon le protocole **(d'OToole et al. 2000).**

Technique :

- ✓ Une suspension bactérienne est préparée dans un tube de B.N (Thermuse thermophiluse sans agar) et incubées dans l'étuve à 60°C pendant 48 h.
- ✓ Cette suspension est ajustée à une densité optique (DO) à 600 nm de 0,5 McFarland (l'équivalent de 108 UFC/ml) à I 'aide d'un Densitomètre.
- ✓ Un volume de 200 ul de chaque suspension bactérienne est déposé dans les puits d'une microplaque à 96 puits. Par la suite, la microplaque est incubée à 60°C pendant 24 h et sans agitation.
- ✓ Après incubation, le contenu de chaque puits est enlevé délicatement.
- ✓ 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 puits 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 de microplaque).**

Parties III:

Résultats et Discussion

1. Isolement et identification des souches ;

Deux éléments ont peut-être limité le nombre de souches qui ont été isolées : le pH (7) des milieux de culture et la température d‟incubation des boites (60°C). Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles sont différents de ceux des bactéries mésophiles. En effet, plusieurs auteurs ont noté un besoin particulier de vitamines, d‟acides aminés mais aussi de calcium et de magnésium pour stimuler ou permettre la croissance des bactéries thermophiles **(Sürücü, 1999)**.

1.1. Identification macroscopique

L'observation des colonies sur milieu solide TTM, après incubation à 60°C pendant 48 à 72h. Elle permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc.) **(Badis et al, 2005).**

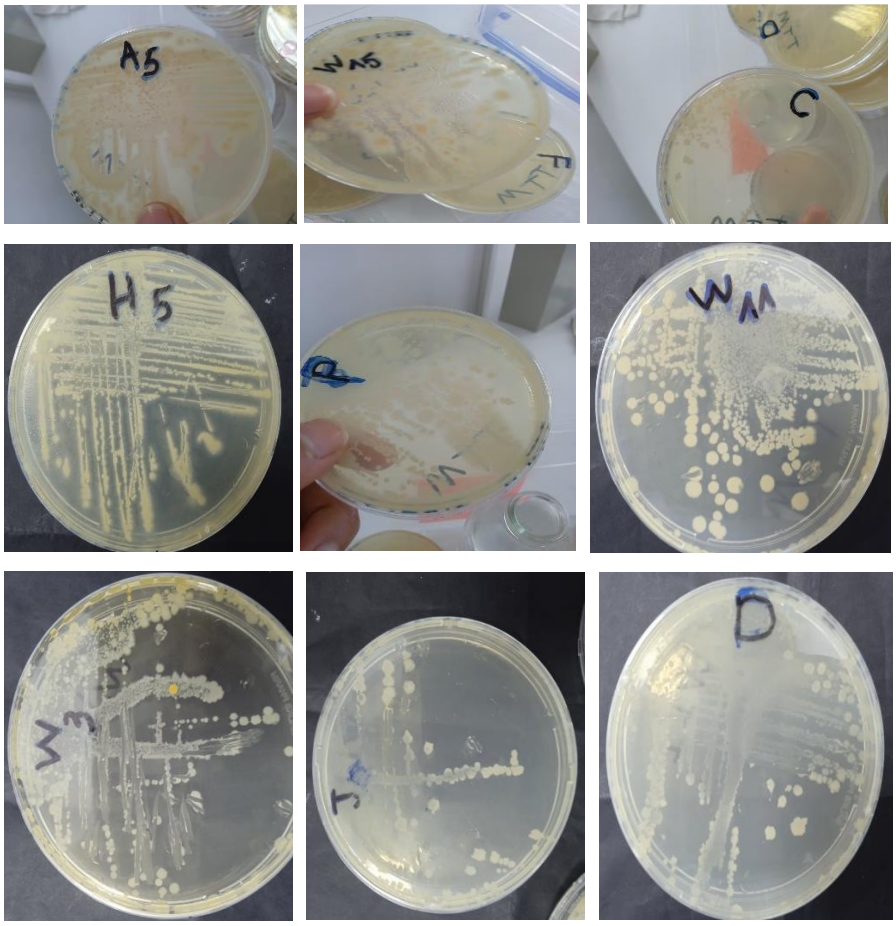


Figure 08 : l'aspect macroscopique des souches cultivées.

Tableau 03 ; observation morphologique des colonies et des cellules bactériennes.

SOUCHES	FORME	TAILLE	COULEUR	ASPECT
W2	Ronde régulier	Petite	Jaune foncé	Lisse
W3	Ronde régulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
W4	Ronde régulier	Petite	Blanchâtre flou centre	Rugueuse
W5	Ronde régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W6	Ronde régulier	Petite	Jaune claire	Lisse
W7	Ronde régulier	Petite	Jaune crémé	Rugueuse
W9	Ronde irrégulier	Petite	transparent	Lisse
W10	Ronde irrégulier	Petite	transparent	Lisse
W11	Ronde régulier	Moyenne	Blanchâtre	Rugueuse
W15	Ronde irrégulier	Moyenne	Jaune claire	Rugueuse
A	Ronde irrégulier	Grande	Jaune foncé	Rugueuse
A5	Ronde irrégulier	Petite	Jaune	Rugueuse
B	Ronde régulier	Moyenne	transparent	Lisse
P	Ronde régulier	Petite	Jaune	Lisse
C	Ronde régulier	Moyenne	Blanchâtre flou centre	Lisse
D	Ronde irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
E	Ronde irrégulier	Petite	Transparent flou centre	Rugueuse
F	irrégulier	Petite	Blanchâtre	Rugueuse
Ft	Ronde régulier	Moyenne	Jaune	Lisse
J	Ronde irrégulier	Grande	Jaune claire	Lisse
H	Ronde	Moyenne	Jaune claire	Lisse
H2	Ronde régulier	Grande	Jaune flou centre	Lisse
H5	Ronde	Petite	Blanchâtre	Lisse
H8	Ronde	Moyenne	Jaune crémé	Lisse
H11	Ronde régulier	Moyenne	Jaunâtre Lisse	Lisse
I10	Ronde irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Rugueuse
I15	irrégulier	Grande	Jaune foncé	Lisse
I17	irrégulier	Moyenne	Jaune crémé	Rugueuse
G	irrégulier	Moyenne	Jaune flou centre	Lisse
K	Ronde régulier	Moyenne	Jaune flou centre	Lisse

La description morphologique des colonies et des cellules bactériennes des souches bactériennes sélectionnées est rapportée dans le **(tableau 03)**. Les colonies obtenues sont généralement rondes avec une couleur jaune, blanche, transparente, crème, marron. Leur consistance est généralement crémeuse, visqueuse d‟opacité translucide à opaque. La plupart des souches sont lisses

1.2. Identification microscopique

L'examen microscopique **(**grossissement **X 40** et/ou grossissement **X 100)** permet l'étude de la forme des cellules (soit sphérique, ovoïde, allongée), s'effectue à l'aide d'un microscope électronique. Elle permet de distinguer deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram négatif, se colorent en rose et les bactéries à Gram positif, apparaissent violettes **(Berraho, 2009)**. Ainsi que la précision de la morphologie et le mode de regroupement des colonies. **(Figure 09).**

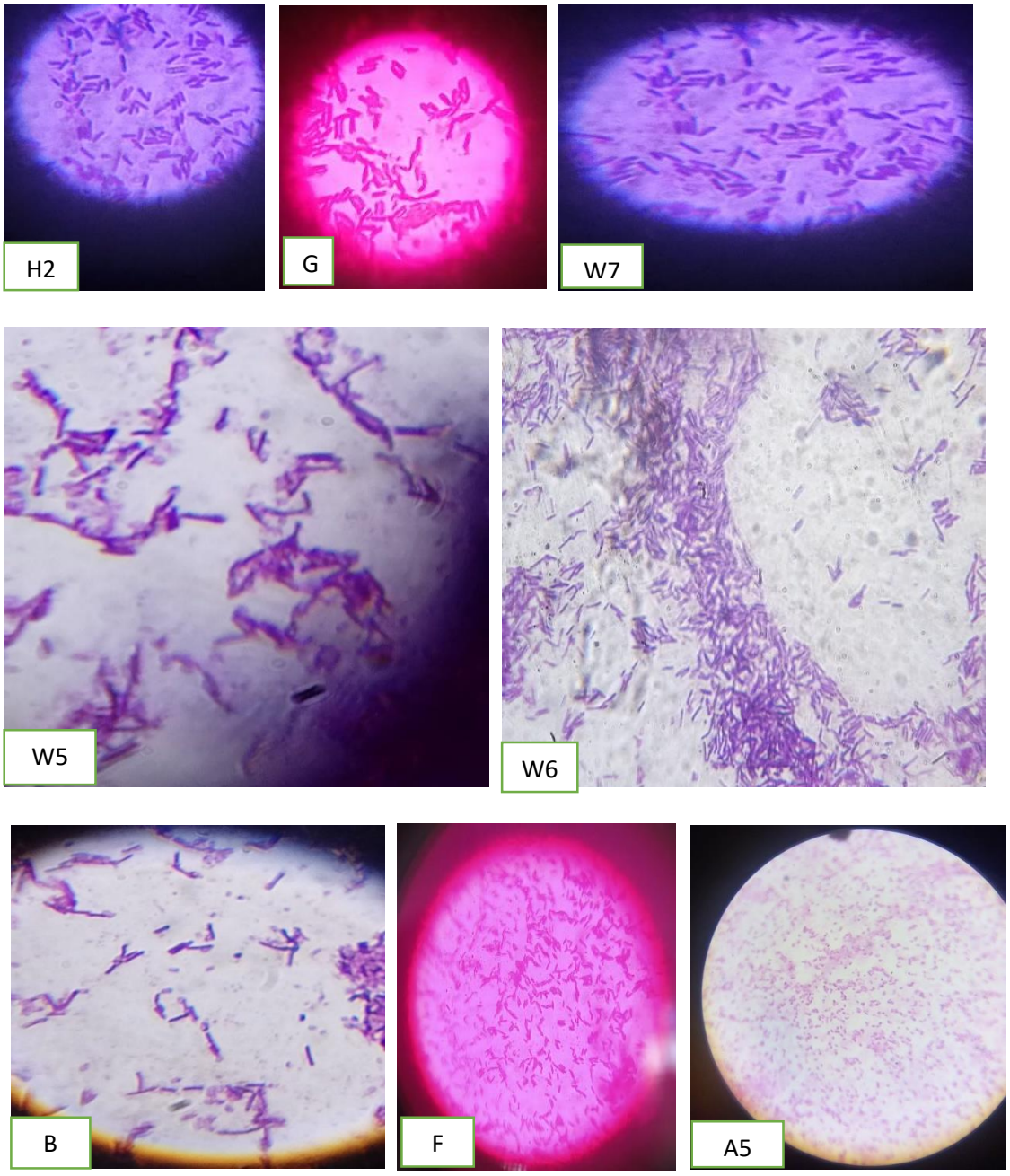


Figure 9 : Coloration de Gram des souches thermophiles sous microscope optique au grossissement X100, X40.

Tableau 04 : Résultats de coloration de Gram.

Souches	forme	Gram	Regroupement
A	Bacille	Positif +	en chainette
B	Bacille	Négatif -	Isolée
C	Bacille	Positif +	Isolée avec Spore terminale
D	Coccobacille	Positif +	en chainette
E	Bacille	Positif +	en chainette
F	Bacille	Positif +	en chainette
Ft	Coccobacille	Positif +	en chainette
J	Bacille	Positif +	Isolée avec Spore terminale
H	Coccobacille	Positif +	en chainette avec Spore terminale
H2	Bacille	Positif +	Isolée
H5	Coccobacille	Positif +	en chainette
H8	Bacille	Positif +	En chainette
H11	Bacille	Positif +	Isolée en chaines
P	Bacille	Positif +	Isolée
K	Coccobacille	Positif +	en chainette
A5	Coccobacille	Positif +	Isolée
W2	Bacille	Positif +	Isolée
W3	Bacille	Positif +	Isolés, en longue chaines
W4	Bacille	Positif +	en chainette avec Spore terminale
W5	Bacille	Positif +	en chainette
W6	Bacille	Positif +	Isolés, en longue chaines
W7	Bacille	Positif +	Isolée
W9	Coccobacille	Positif +	en chainette avec Spore terminale
W10	Bacille	Positif +	Isolée
W11	Bacille	Positif +	Isolée
W15	Bacille	Positif +	en chainette
I10	Bacille	Positif +	Isolée
I15	Bacille	Positif +	en chainette
I17	Bacille	Positif +	Isolés, en longue chaines
G	Bacille	Positif +	en chainette

1.3Aspect microscopique

L'examen microscopique a révélé les résultats représentés dans le **tableau (04).** Parmi les **30 souches**, **24** sont des bacilles à **Gram positif** et **6** à **Gram négatif**, sept ont une forme coccobacilles, à Gram positif. La plupart des bactéries isolées des sources thermales en Algérie surtout, étaient des bacilles Gram positif.

Les formes cellulaires observées en microscopie électronique sont les suivantes : Des bacilles parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangées en longues chaînes ou en chaînettes. Ainsi différents types phénotypiques ont été retrouvés aussi bien dans les échantillons de la source d'eau thermale que dans la boue et sédiment. Ceci qui nous laisse supposer que la température n'est pas l'unique facteur qui joue sur la diversité des organismes présents dans ce type d'environnement. D'autres facteurs comme la composition minérale et organique, la localisation géographique des sites géothermaux peuvent également entrer en jeu.

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) **(Figure11 et Tableau 05).**

Tableau 05 : Activité enzymatique des souches.

souches	CMC	G. au lait	Tween 20	Tween 80	G. à l'amidon	G. jaune d'œuf
A	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -
B	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -
C	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -	Négatif -	Positif +
D	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -	Négatif -	Positif +
E	Négatif -	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -	Négatif -
F	Négatif -	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -
Ft	Positif +	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -	Négatif -
J	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -	Négatif -
H	Positif +	Positif +	Positif +	Positif +	Négatif -	Négatif -
H2	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -
H5	Positif +	Positif +	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -
H8	Positif +	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +
H11	Positif +	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -
W2	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +	Positif +
W3	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -
W4	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -
W5	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -
W6	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -
W7	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -	Positif +	Positif +
W9	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +
W10	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -
W11	Négatif -	Négatif -	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -
W15	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -	Positif +	Positif +
I10	Positif +	Positif +	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -
I15	Positif +	Négatif -	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -
I17	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -
K	Positif +	Négatif -	Négatif -	Positif +	Positif +	Négatif -
P	Négatif -	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -
A5	Négatif -	Positif +	Négatif -	Négatif -	Positif +	Positif +
G	Positif +	Négatif -	Positif +	Négatif -	Positif +	Positif +

Parmi les 30 souches étudiées pour **l'activité enzymatique**, **10** souches dégradent le carboxymethylcellulose **(CMC**). **La caséine** a été hydrolysée par **12** souches. Pour l'activité **lypolytique**, **13** souches pouvant hydrolyser **le Tween 20**, et **12** souches sont positive pour le **Tween 80** .**L'amidon**, et **lécithine** ont été hydrolysées par **14**, **9** souches respectivement.

Ont montré que toutes les souches possédaient une ou plusieurs activités hydrolytiques, dominées par les activités protéolytiques et amylolytiques **(Benkahoul et al, 2017).**

Les bacilles thermophiles et hyperthermophiles représentent une très bonne source d'enzymes, ils sont donc les plus utilisés en biotechnologie **(Lagzian et al., 2012)**. Ces bactéries ont développé de multiples stratégies moléculaires pour survivre à des conditions environnementales extrêmes. Pour utiliser des substrats naturels comme l'amidon, de nombreuses bactéries thermophiles produisent une série d'enzymes amylolytiques (β-amylase, I-glucosidase, glucoamylase, pullulanase, cyclodextrine glycosyltransférase). Ils sont également capables de dégrader d'autres polysaccharides comme le glycogène apporté par les cellules animales ou microbiennes **(Bertoldo et Antranikian, 2001).**

Ces enzymes sont des métabolites essentiels qui permettent aux bactéries de cataboliser les nutriments dans l'environnement pour maintenir leur vie. De plus, ces capacités naturelles sont utilisées dans divers domaines de la biotechnologie **(Zhao et al., 2010).** Les espèces de Bacillus sont très intéressantes pour le développement d'applications industrielles pour un certain nombre de raisons. Leur vitesse de croissance rapide se traduit par des cycles de fermentation courts, leur capacité à sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire, et le fait que certaines espèces soient sur la liste GRAS (Generally Regarded as Safe) de la FDA (Food and Drug Administration) suscitent l'intérêt des industriels **(Schallmey et al., 2004).** Une plus grande capacité d'adaptation signifie une machinerie métabolique plus développée par rapport aux organismes qui en sont dépourvus **(Cohen, 2011) .**

3. L'activité antimicrobienne :

Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches étudiées contre des souches test standardisés : les bactéries : « Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis, pseudomonas aeruginosa et staphylococcus epidimidis », Les champignons : « Candida albicans et Aspergillus brasiliensis ». Sont présentés dans **(figure 10 et le tableau 06) suivants :**

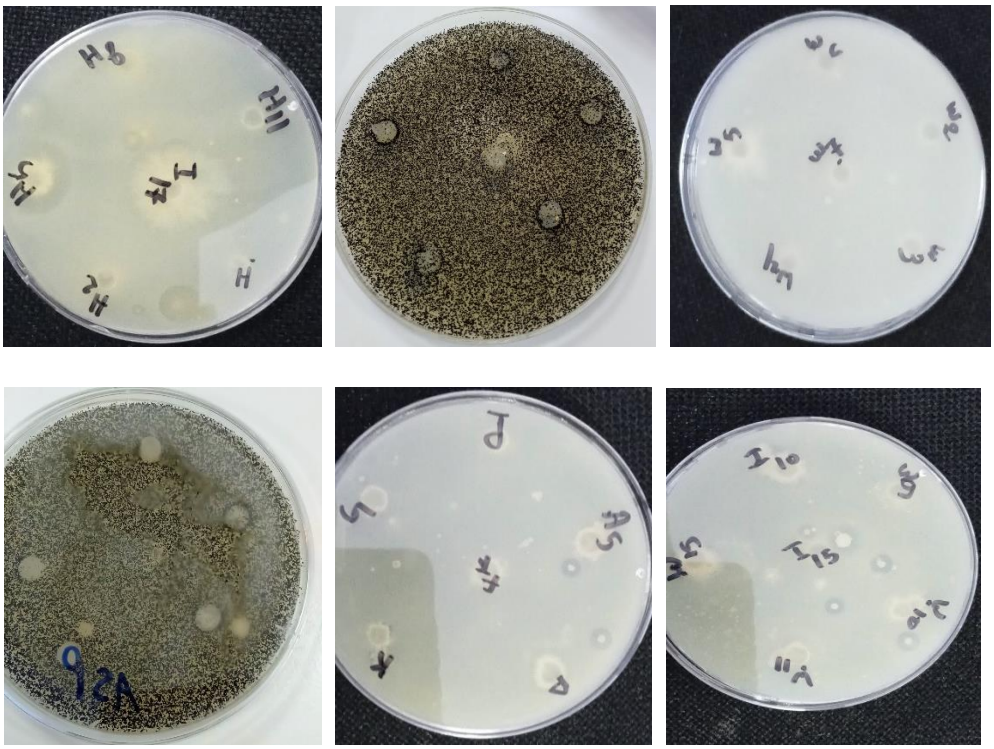


Figure 10 : les souches tests (bactérie et champignon).

Tableau 06 : l'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches tests (bactérie et champignon).

	S. aureu	E. coli	B. subtilis	Salmonella typhimurium	S. epidermidis	Aspergillus brasiliensis	C. albicans
A	–	–	–	–	+	–	–
B	+	–	–	–	–	–	–
C	–	–	–	–	–	+	–
D	–	–	–	–	+	–	–
E	–	–	–	–	–	–	–
F	–	–	–	–	–	+	–
Ft	–	–	–	–	–	–	–
J	–	–	–	–	–	+	–
H	–	–	–	–	–	–	–
H2	–	–	–	–	–	–	–
H5	+	–	–	–	–	–	–
H8	–	–	–	–	–	–	–
H11	–	–	–	–	–	–	–
W2	+	–	–	+	–	–	–
W3	–	–	–	–	–	+	–
W4	–	–	–	–	–	–	–
W5	–	–	–	+	–	–	–
W6	+	–	–	–	–	–	–
W7	+	–	–	+	–	+	
W9	–	–	–	–	–	–	–
W10	–	–	–	–	+	+	–
W11	–	–	–	–	–	–	–
W15	–	–	–	–	–	–	–
I10	–	–	–	–	–	–	–
I15	–	–	–	–	+	–	–
I17	–	–	–	–	–	+	–
A5	–	–	–	–	+	–	–
P	–	–	–	+	–	–	–
K	–	–	–	–	–	–	–
G	–	–	–	–	–	–	–

L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar. Elle nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches thermophiles envers les bactéries et les champignons tests utilisées **(Tortora et al., 1979).**

D'après nos résultats, la capacité à présenter une activité antibactérienne contre Staphylococcus aureus a été détectée chez les souches H5, W2, W7, W6, W15, B et aucune des souches à présenter une activité contre Escherichia coli et Bacillus subtilis, et les souches W2, W5, W7, P qui a un effet cotre Salmonella typhimurium, et aucun effet a été détecté contre staphylococcus epidimidis sauf chez A, D, W10 et I15.

Pour l'activité antifongique aucune souche à développer une activité contre Candida albicans, a l'exception de les souche W7, W10, I17 , J ,W3 ,C ,F qui à présenter une activité contre Aspergillus brasiliensis avec une zone d'inhibition importante.

Selon **Srivibool et Sukchotiratana, (2006),** qui ont obtenu des résultats comparables, expliquèrent que l'absence d'activité antibactérienne ou antifongique ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car n'étant pas polaire ou bien constituée de composés non polaires.

Leurs produits peuvent être plus efficaces contre les agents pathogènes courants en raison de la nature thermophile extrême des microbes. Malgré des recherches approfondies sur les micro-organismes vivant dans des conditions environnementales extrêmes, y compris les thermophiles, il existe très peu d'informations sur leurs métabolites secondaires, en particulier dans la production de protéines antimicrobiennes **(ojha et al., 2021).**

Quatre souches de bactéries thermophiles isolées de sources chaudes saoudiennes ont montré une activité antibactérienne contre des agents pathogènes testés **(Alrumman et al., 2019),** et une autre étude a rapporté la capacité de bactéries thermophiles isolées de sources chaudes jordaniennes à produire des agents antimicrobiens **(Fandi et al., 2014).**

Il a été noté que Bacillus produit un certain nombre de composés biologiques actifs contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus **(Muhammad et al., 2009).**

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).**

Le choix du bouillon BHIB a été dicté par sa spécificité et sa richesse permettant une bonne croissance aux bactéries-tests et offrant des résultats claires grâce à sa limpidité.

4.1. 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 de Microplaques de titration. **(Figures 11, et Tableaux 07)**



Figures 11 : Résultats de La production de slime chez les souches (H2, W9, C, W7, H, A5, D, E ,I17 , W15, Ft, W12, P et K).

4. 2. Technique Rouge Congo :

Tableau 07 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souches	Phénotype (slime)
A	Négative -
B	Positive +
C	Positive +
D	Positive +
E	Négative -
F	Positive +
Ft	Positive +
J	Négative -
H	Positive +
H2	Positive +
H5	Positive +
H8	Négative -
H11	Positive +
W2	Positive +
I10	Positive +

Souches	Phénotype (slime)
W3	Positive +
W4	Positive +
W5	Négative -
W6	Positive +
W7	Négative -
W9	Positive +
W10	Positive +
W11	Positive +
W15	Positive +
K	Positive +
P	Positive +
A5	Négative -
G	Positive +
I15	Positive +
I17	Positive +

Sur ce milieu, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse par contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif **(Ziebuhret al, 2001).**

Après 48 heures d'incubation, la production de slime est remarquée respectivement chez les souches C, I5, I17 ,I10, W2 , W3, W4, , B, W9, W6, H8, H2, W10,W11, W15, H5 et P , k, E, F, G, Ft, D à l'opposé des autres souches exprimant un phénotype négatif.

4.2 Technique de microplaque de titration :

L'estimation quantitative du taux de formation de biofilm par les bactéries thermophiles est obtenue par la mesure de la DO à **630 nm** au lecteur de microplaque**.** Les résultats obtenus sont présentés dans le **(Tableau 08).**

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

Entre la microplaque 1et2 ;

D.O **min** = 0,817.

D.O **max** = 2,452.

D.O **min** = D.O témoin moyen **+** 3. Ecartype **=** 0,794+3(0,02).

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

Entre la microplaque 3et4 ;

D.O **min** = 0,544.

D.O **max** = 1,632.

D.O **min** = D.O témoin moyen **+** 3. Ecartype **=** 0,273+3(0,09).

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

Tableau 08 : Résultats de la technique de microplaque de titration.

Souches	**D.O** moyenne	Formation de biofilm
A	**0,251**	Faiblement
B	**0,622**	Moyennement
C	**0,447**	Faiblement
D	**0,368**	Faiblement
E	**0,562**	Moyennement
F	**0,658**	Moyennement
J	**0,397**	Faiblement
H	**0,733**	Moyennement
H2	**1,008**	Moyennement
H5	**0,595**	Moyennement
H8	**1,400**	Moyennement
H11	**0,352**	Faiblement
W2	**0,931**	Moyennement
W3	**1,040**	Moyennement
W4	**1,262**	Moyennement
W5	**1,267**	Moyennement
W6	**1,295**	Moyennement
W7	**1,468**	Moyennement
W9	**1,254**	Moyennement
W10	**0,978**	Moyennement
W11	**0,249**	Moyennement
W15	**0,414**	Moyennement
I10	**0,315**	Moyennement
I15	**0,272**	Moyennement
I17	**0,441**	Moyennement
A5	**0,450**	Faiblement
P	**0,449**	Faiblement
K	**0,568**	Faiblement
FT	**0,639**	Moyennement
G	**0,631**	Faiblement

Pour la microplaque 1et2 ;

- Les valeurs **inférieures** à 0,817 représentent les souches **non productrices de Biofilm**,
- Les valeurs **comprises entre** (0,817 - 2,452) ont été associées avec les souches **modérément** productrices de Biofilm,
- Les valeurs **DO moyenne** supérieures à 2,452 correspondent aux souches **fortement** productrices de Biofilm.

Pour la microplaque 3et4 ;

- Les valeurs **inférieures** à 0,544 représentent les souches **non productrices de Biofilm**,
- Les valeurs **comprises entre** (0,544 - 1,632) ont été associées avec les souches **modérément** productrices de Biofilm,
- Les valeurs **DO moyenne** supérieures à 1,632 correspondent aux souches **fortement** productrices de Biofilm.

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

Les souches W15, W10, , W9, H8, W2, I5, W6, I15 , H, W4, W15, W3, B, ,I17, F, Ft ,E , K ,W5, W7, A5, H5, H2, et I10, sont caractérisées par une Moyennement production de Biofilm tandis que les souches A ,C, D, J, G , A5, P,k , H11 sont faible productrices de Biofilm.

Le test sur microplaque utilisant le cristal violet est une méthode indirecte de quantification des biofilms. Le cristal violet ne colore pas spécifiquement toute la biomasse viable ou morte, ni la matrice du biofilm. Cette coloration évalue la réponse globale du biofilm d'une souche **(Burton et al., 2007)**

Les résultats obtenus avec les souches sélectionnées montrent qu'elles sont capables d'adhérer au polystyrène révélant, ainsi leurs aptitudes à s'organiser en biofilm. La

capacité de former un biofilm est liée principalement à l'adhérence du microorganisme à une surface **(Costerton et al., 1987).**

Ceci a été confirmé dans un premier temps avec les valeurs de la densité optique lues à **600nm** et dans un second temps à travers les traitements relatifs à la classification des souches en catégories par rapport à la valeur seuil (**DO).**

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).**

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).**

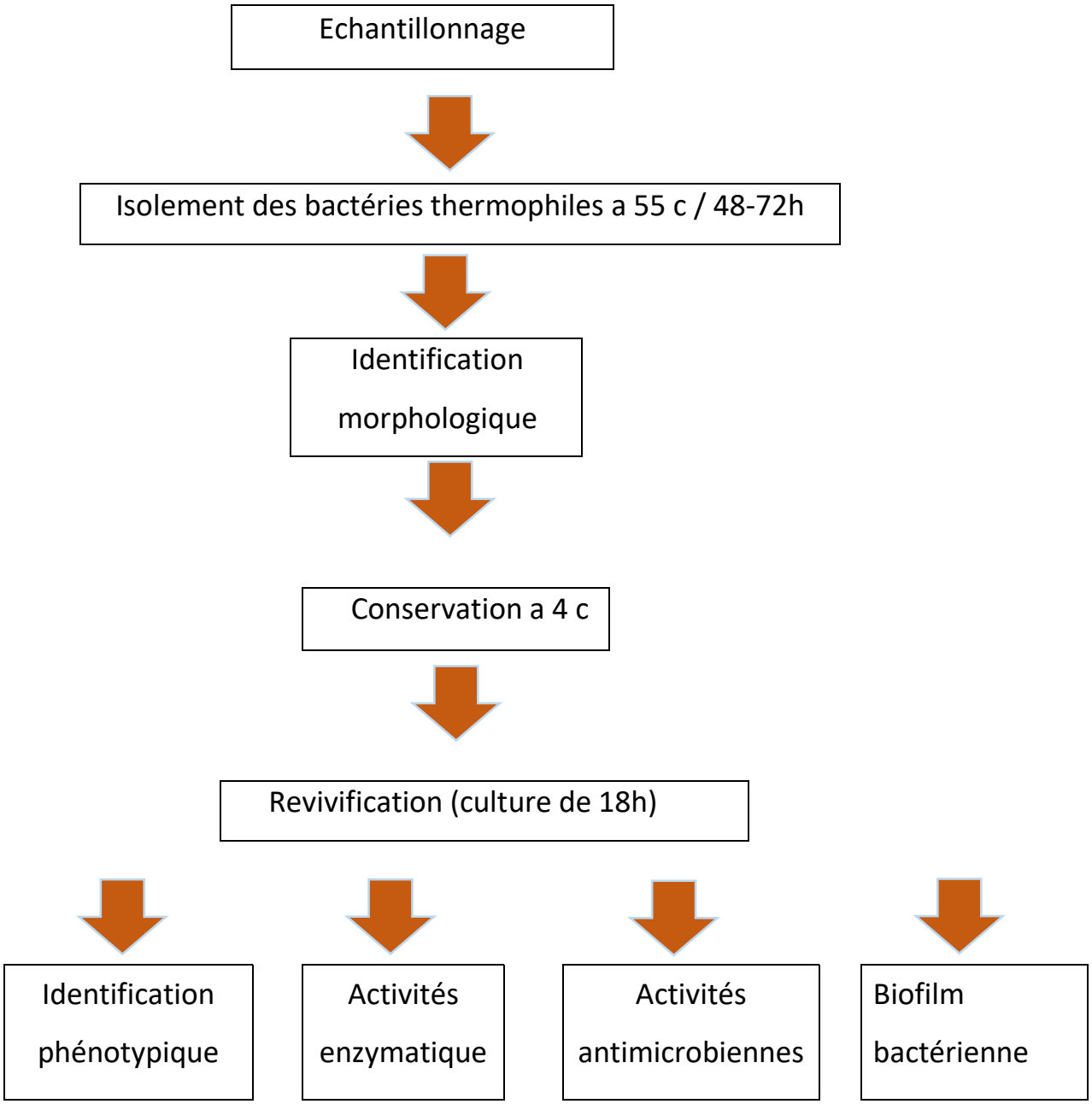


Diagramme de protocole expérimental

Conclusion

Cette étude est une synthèse bibliographique pour une compréhension les micro-organismes qualifiés thermophiles, et évaluation de **l'activité enzymatique**, **antimicrobiennes** et la capacité de formation de **biofilm** des souches bactériennes isolées des sources hydrothermales en Algérie.

Les extrêmophiles sont des microorganismes sollicités par beaucoup d'applications dans plusieurs domaines entre autres l'agriculture, les détergents, la pétrochimie, la bio remédiation des sols et bien d'autres. Les microorganismes **thermophiles** se développant de façon optimale à des températures supérieures à 50°C sont parmi ceux les mieux étudiés. Ils sont isolés à partir de différents environnements extrêmes et leurs **enzymes** présentent une thermo stabilité très recherchée par différentes industries à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles.

Une mise en évidence de la production de Cinq enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéase, amylase, caséinase, cellulase et pectinase) par 30 souches bactériennes. Ces microorganismes ont été isolés depuis sources hydrothermale en Algérie. Pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, des différents milieux gélosés sont utilisés avec addition de substrat, spécifique pour chaque enzyme. Les souches ont montrés clairement la capacité de chaque souche isolée à produire au moins une enzyme.

Les micro-organismes thermophiles sont d'abondantes sources d'enzymes uniques pouvant être utilisées en particulier en biotechnologie.

Les activités antimicrobiennes des souches ont été recherchées par la technique des cylindres d'agar. La recherche de l'activité antimicrobienne montre la présence de cet effet contre Staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidiset, 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.

A

A -Antranikian, G. (2009). Extremophiles and biotechnology in : Encyclopedia of life sciences (ELS). John Wiley & Sons

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,

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).

Antranikian, G. 2008. Industrial relevance of thermophiles and their enzymes. Thermophiles : Biology and technology at High Temperatures, CRC Press,368

Antranikian, G., Vorgias, C.E., Bertoldo, C. 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts., in: Marine biotechnology I, Springer, 219-262

B

Brock T. D(1965 The road to Yellowstone-and Beyond. Annual Review of Microbiology ;)

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

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

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

C

CANGANELLA, F. (2012). ECOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE DES MICRO-ORGANISMES EXTREMOPHILES, EN PARTICULIER THERMOPHILES ANAEROBIES. EXTREMOPHILES : RESSOURCES DURABLES ET IMPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES, 175-203.

CORNEC, L., LOAEC, M., ROUGEAUX, H., GUEZENNEC, J., & DIETRICH, J. (1997). MOLECULES D'INTERET BIOTECHNOLOGIQUE ISSUES DES MICRO-ORGANISMES HYDROTHERMAUX : ENZYMES THERMOSTABLES ET POLYSACCHARIDES.

D

DI GIULIO, 2005, « THE OCEAN ABYSSES WITNESSED THE ORIGIN OF THE GENETIC CODE [ARCHIVE] ».

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.

F

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

Ferrera I., Reysenbach A L. 2007. Thermophiles in : Encyclopedia of life

G

GRÉGOIRE, PATRICK, ET AL. LES MICRO-ORGANISMES DE L'EXTREME. LA PRESSE THERMALE ET CLIMATIQUE, **2009, 146: 49-61**.

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.

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

GORDONE E., HAYNESW C., PANG C.H (1973). The Genus Bacillus (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC : United States Department of Agriculture. Grégoire,

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.

ℋ

HORIKOSHI K., BULL A.T.)2011(. PROLOGUE : DEFINITION, CATEGORIES, DISTRIBUTION, ORIGIN AND EVOLUTION, PIONEERING STUDIES, AND EMERGING FIELDS OF EXTREMOPHILES IN: EXTREMOPHILES HANDBOOK. ED. HORIKOSHI K.

HOLDEN, J. F. (2009). EXTREMOPHILES: HOT ENVIRONMENTS, DALAM ENCYCLOPEDIA OF MICROBIOLOGY

Irwin J. A., Baird A. W. 2004. Extremophiles and their application to veterinary medicine. Irish Veterinary Journal. Volume 57 (6).

𝒦

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

Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Micrābiology and Molecular Biology Reviews, 66(3), 506- 577.

ℳ

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.

Madigan M., Martinco J. 2007. Biologie des micro-organismes. 11ème éd. Paris : Pearson éducation France.1047p.

Mukherjee, A.K. 2007. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by Bacillus subtilis strains in laundry detergent formulations. Letters in Applied Microbiology, 45(3), 330-5.

O

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

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.

P

P. LOPEZ-GARCIA, 2002. LA VIE DANS LES MILIEUX EXTREMES, 433E CONFERENCE DE L'UNIVERSITE DE TOUS LES SAVOIRS.

Peduzzi. R., Tonolla. M., Boucher-Rodoni. R. (2006). Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques

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.

P. LOPEZ-GARCIA, **2002.** LA VIE DANS LES MILIEUX EXTREMES, 433E CONFERENCE DE L'UNIVERSITE DE TOUS LES SAVOIR.

Q

QUERELLOU, J., & GUEZENNEC, J. Biotechnologie des extrêmophiles Biotechnologie des extrêmophiles.

R

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

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.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, **V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62 (3), 597-635.

S

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.

SÜRÜCÜ, G. 1999. Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes Water Science and Technology. vol. 40, no. 1, p. 53-60.

U

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

Van Den Burg. B. (2003). Extrêmophiles as a source for novel enzymes. Curr. Opin.Microbiol, 6, 213–218.

W

WIEGEL, J. CANGANELLA, F. (2001). EXTREME THERMOPHILES IN; ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES.WILEY ED.

WOESE CR, KANDLER O, WHEELIS ML. (1990). TOWARDS A NATURAL SYSTEM OF ORGANISMS: PROPOSAL FOR THE DOMAINSARCHAEA, BACTERIA, AND EUCARYA. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 87, 4576–4579.

X

XUE ET AL., 2003, « TRANSFER RNA PARALOGS: EVIDENCE FOR GENETIC CODE-AMINO ACID BIOSYNTHESIS COEVOLUTION AND ARCHAEAL ROOT OF LIFE », GENE 310, 59 – 66.

TICE.AGROCAMPUS-OUEST.FR

Z

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.

HÜPS: //TICE.AGROCAMPUS OUEST.FR/PLUGINFILE. PHP / 29732 / MOD_RESOURCE / CO NTENT / 2 / HIGIENE ALIMENTAIRE / HTML / D4E4_D4E1 070_2.HTML # NAVIGATIONOUEST.FR

Annexe

Annexe1 : préparation de milieux de culture **T**HERMUS **T**HERMOPHILUS **M**EDUIM (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

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

Annexe

Fuschine de ziehl :

Fuschine 1g

Alcool éthylique à 95 ..... 10ml

Phénol ajoutés 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 : 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 2g
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 Rouge Congo

Le bouillon cœur serval ..... 37 g/L

Saccharose ..... 50 g/L
agar Rouge Congo ..... 0,8 g/L

Solution de PBS (Phosphate – bufferd saline PH= 07)

Na CL .....8 g/L

K cl .....0,2 g/L

Na2 HPO4.....1,42 g/L

KH2 PO4.....0,24 g/L

Annexe 05 : Résulta de l'activité enzymatique :

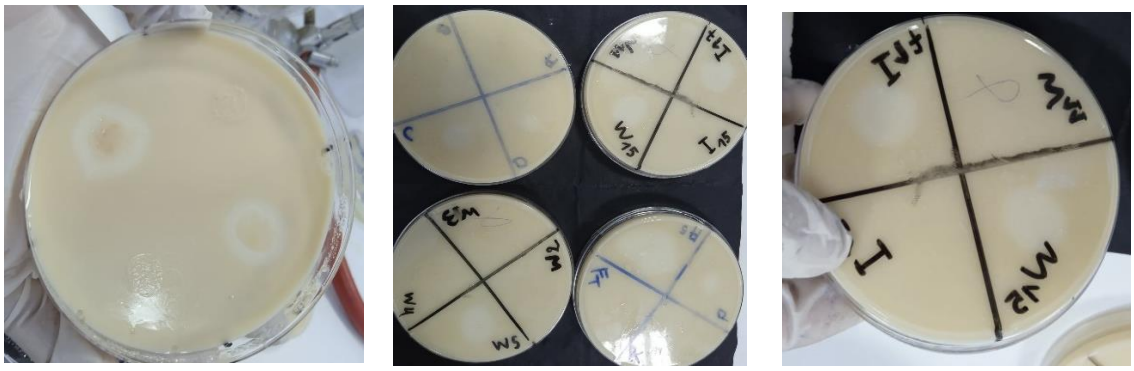


Figure12 : les résultats de lait écrémé

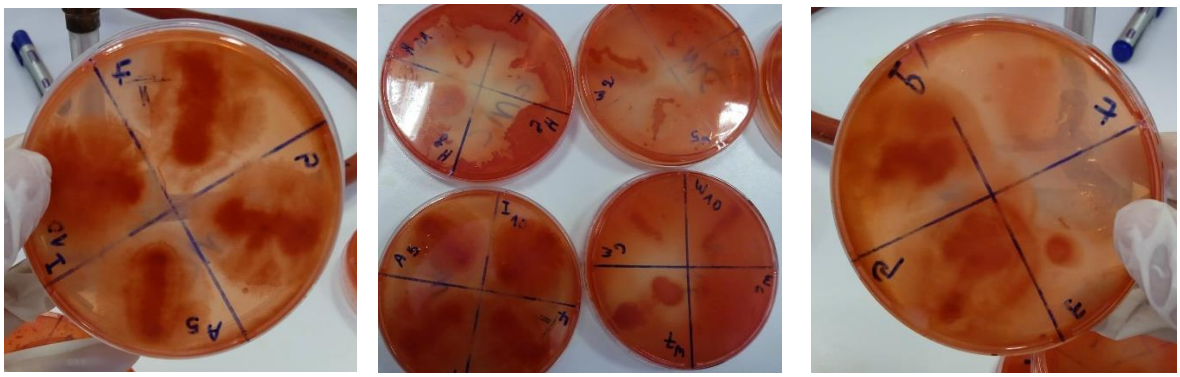


Figure 13: les résultats de CMC

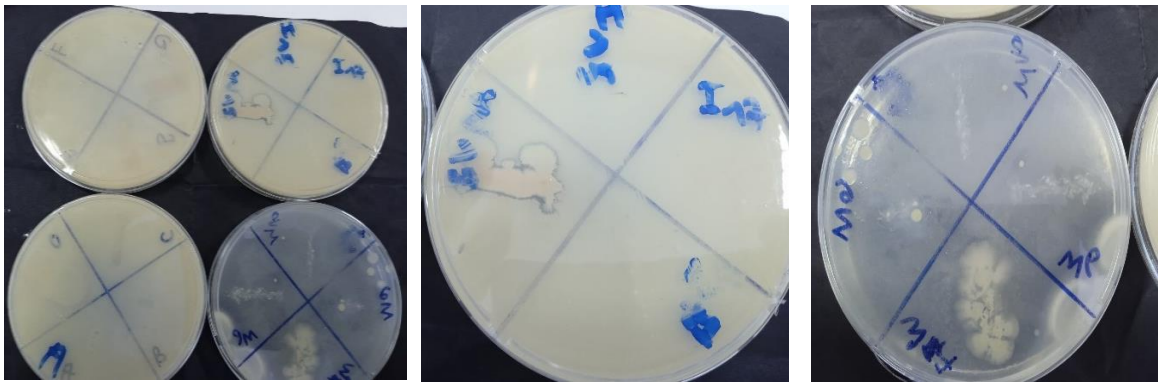


Figure14 : les résultats de **jaune d'œuf**

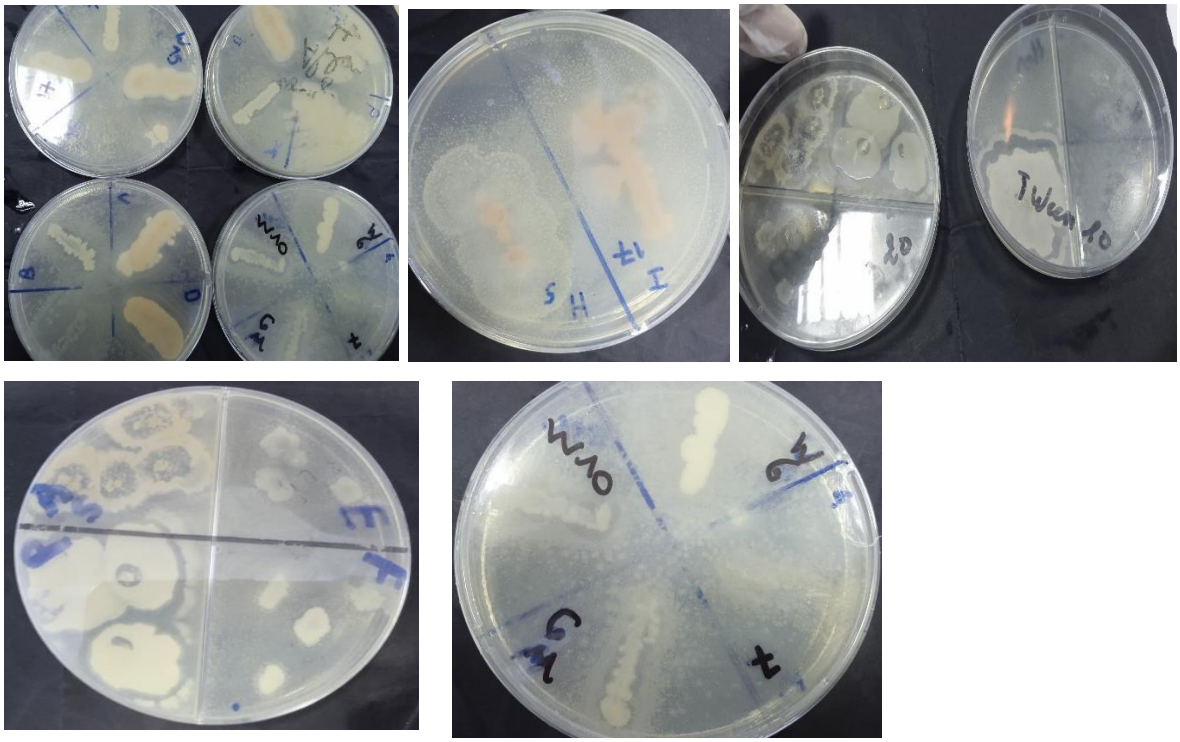


Figure 15: les résultats de T20 et T80

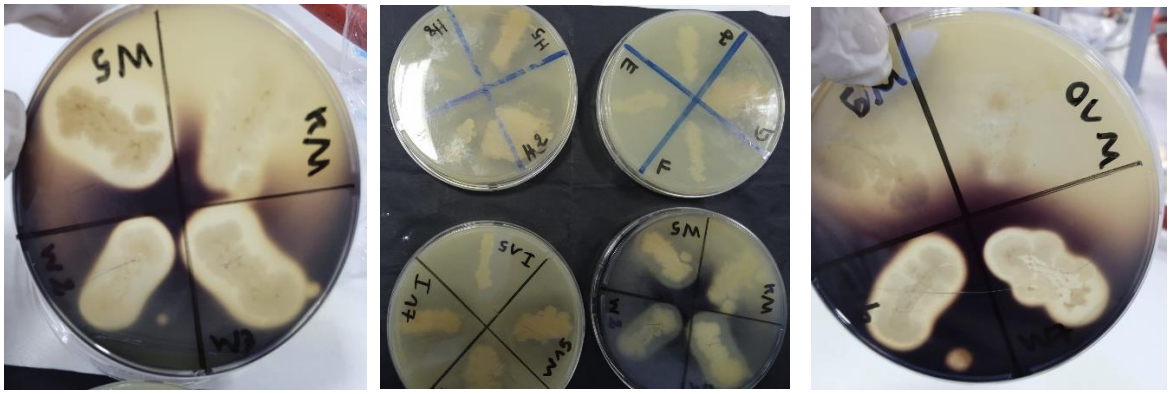
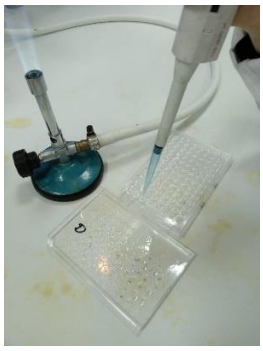


Figure 16: les résultats de l'amidon

Annexe 06 : Appareillage.



Microscope Eléctronique



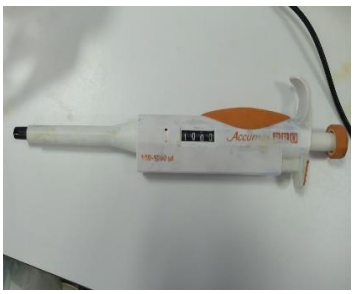
Préparation de la Microplaque Pour le biofilm



vortex



PH mètre



Micropipette



Densitomètre



Autoclave (stérilisateur)



Bain mari



Réfrigérateur



Agitateur



Etuve



Balance



Bec Bunsen



Lecteur ELISA

Remerciements

Que la paix, la miséricorde et les bénédictions d'Allah soient sur vous !

Nous louons Dieu Tout-Puissant qui nous a aidés à mener à bien cette humble recherche scientifique entre vos mains et qui nous a inspiré la santé, le bien-être et la détermination.

Dieu merci, merci beaucoup

Après tous les mots de remerciement et de louange et d'un cœur plein de fraternité et d'amour, j'adresse mes sincères remerciements et ma grande conformité à tous les employés de l'Université Dr. Yahia Farés.

Et nous remercions **Mlle Hoceini Amina** de nous avoir donné l'occasion de travailler sous sa supervision pour tous les conseils et informations précieuses qu'il nous a donnés qui ont contribué à enrichir le Sujet de notre étude dans ses différents aspects.

Nous adressons également nos sincères remerciements aux membres de l'estimé comité de discussion à **Mme. I. HAMZA** d'avoir accepté de présider le jury et à **Mme. F. BOUMEDIENE** d'avoir accepté d'étudier ce travail.

Là où vous avez eu une grande part afin de réaliser une partie importante de cette note scientifique éducative, malgré les grandes contraintes imposées par les circonstances difficiles que nous avons tous traversées, nous demandons à Dieu Tout-Puissant de nous récompenser et de vous récompenser avec la meilleure récompense et de faire tout ce que vous avez fourni aux étudiants dans la balance de vos bonnes actions.

Nos sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire collégial, et bien sûr à tous les étudiants du programme Master 2 Microbiologie Appliquée.