

MASSI-279-111 / 03



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
مركز الميكروبيولوجيا التطبيقية للأغذية البيوتكنولوجية والبيئية



Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

Mr. DJABER Ismail

Inscrit sous le N° :
Date le 7/2/0
Code 16.04.2013

Thème

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES *BACILLUS*
EXTREMOPHILES ISOLES DE LA SOURCE THERMALE DE
HAMMAM DEBAGH -GUELMA- (GRIFFON A)
-SCREENING D'ACTIVITES ANTIMICROBIENNES-**

Soutenu le 27/06/2013



Devant le Jury composé de :

- Présidente :** Mme HASSAINE H. Maitre de conférences classe A Univ. Tlemcen
- Promotrice :** Mme KHELIL N. Maitre de conférences classe A Univ. Tlemcen
- Examineur :** Mr GHUELLAIL. Maitre-assistant chargé de cours Univ. Saïda

Année Universitaire : 2012-2013

MAST - 079 - 11 / 03



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
مخبر الميكربولوجيا التطبيقية للأغذية للبيوطي وللبيئة

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Inschrift sous le n° :
Date le 7/2/13
Code 16 04 2013

Présenté par

Mr. DJABER Ismail

Thème

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES *BACILLUS*
EXTREMOPHILES ISOLES DE LA SOURCE THERMALE DE
HAMMAM DEBAGH -GUELMA- (GRIFFON A)
-SCREENING D'ACTIVITES ANTIMICROBIENNES-**

Soutenu le 27/06/2013



Devant le Jury composé de :

- Présidente :** Mme HASSAINE H. Maitre de conférences classe A Univ. Tlemcen
- Promotrice :** Mme KHELIL N. Maitre de conférences classe A Univ. Tlemcen
- Examineur :** Mr GHUELLAL L. Maitre-assistant chargé de cours Univ. Saïda

Année Universitaire : 2012-2013



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطي وللبيئة



MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

DJABER ISMAIL

Thème

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES *BACILLUS*
EXTRÊMOPHILES ISOLÉS DE LA SOURCE THERMALE DE
HAMMAM DEBAGH -GUELMA-
(Griffon A)**

-CRIBLAGE D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE-



Soutenu le : 27 /06 /2013

Devant le Jury composé de :

Dr. HASSAINE Haféda	Maitre conférence classe A	Présidente
Dr. KHELIL Nihel	Maitre conférence classe A	Promotrice
Mr. GHELLAI Lotfi	Maitre assistant chargé de cours	Examineur

Année Universitaire : 2012-2013

REMERCIEMENTS

*Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire de **Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (L.A.M.A.A.B.E.)**, Université Abou Bakr Belkaid- Tlemcen.*

*Avant tout je remercie **ALLAH**, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.*

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à mon encadreur Madame **KHELIL Nihel** Maître de conférence classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, Sa générosité, mais surtout pour sa qualité humaine. J'ai eu vraiment un grand honneur de travailler sous sa direction.*

*Je remercie très sincèrement Madame **HASSAINE Haféda**. Maître de conférence classe A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen pour le grand honneur de présider le jury.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **GHELLAI Lotfi**., Maitres assistant chargé de cours à l'Université de Saïda, je vous remercie d'avoir bien voulu examiner ce modeste travail.*

*Je ne saurais oublier **Melle AISSAOUI Nadia**, **Melle NAS Fatima**, pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail, leur bonne humeur et leur soutien amical inébranlable. Ainsi pour leur aide et leur gentillesse et qu'elles savent bien que tous les mots de remerciements ne suffisent jamais pour leur montrer à quel point elles m'ont fait un grand plaisir.*

*J'adresse également un immense merci à tous les membres des équipes « Sécurité microbienne des aliments », « Substances naturelles antimicrobiennes », « Hygiène hospitalière » et « Extrêmophiles » du laboratoire **L.A.M.A.A.B.E** et très particulièrement **WAFAA**, **SAMIA**, **NASSIMA**, pour leur aide et leur soutien considérable ainsi que pour leur bonne humeur.*



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

*A ceux que personne ne peut compenser les sacrifices pour mon éducation et mon bien être, ceux qui m'ont accordée leur soutien, amour et bénédiction dans les instants les plus difficiles de mon existence, **mes parents**, qui me sont les plus chers au monde. Qu'Allah me les garde. Vos prières et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Je voudrais à travers ce modeste travail, vous rendre un hommage mérité et vous dire combien je suis fière de l'éducation que vous m'avez donnée. Puisse le Tout Puissant nous accorder de vous avoir encore longtemps auprès de nous pour que vous puissiez bénéficier de l'ombre de l'arbre que vous avez si jalousement protégé et entretenu.*

*A toutes mes sœurs, **WAFAA, ZINEB, IKRAM, AMEL**, qui ont cru en moi, qui m'ont encouragé et m'ont donnée la force d'aller jusqu'au bout. Qu'Allah les protège.*

*A ma chère nièce **DJIHENE** ma chéri que j'adore plus fort que moi-même, Qu'Allah la protège.*

*A tous mes collègues **AMINE, REDA, AHMED, AMINE Dersa, ZAKI, KHEREDDINE, DJAMEL, DIDEN, AZIZ, SARA, AICHA, HADJER, ALIA, et AMEL**, qui m'ont toujours encouragé, poussé et motivé dans mes études.*

A tous ceux qui me sont chers

Sommaire

I- Introduction.....	1
II- Synthèse bibliographique.....	3
1-Les microorganismes extrémophiles.....	3
1-1 Les extrémophiles	3
1-2 La biodiversité des extrémophiles.....	5
1-3 Les sources hydrothermales.....	5
1-4 Les microorganismes des sources hydrothermales.....	6
2- Caractérisation phénotypique et génotypique des <i>Bacillus</i> thermophiles et hyperthermophiles.	8
2-1 Les <i>Bacillus</i>	8
2-2 Taxonomie.....	8
2-3 Prélèvement et isolement.....	9
2-4 Caractéristiques morphologiques et culturales.....	10
2-5 Caractéristiques génétiques.....	11
3-Caractérisation des molécules antimicrobiennes	12
3-1 Les antibiotiques.....	12
3-2 Méthodes de screening des métabolites secondaires.....	12
3-2-1 Screening primaire.....	12
3-2-2 Screening secondaire.....	13
III- Matériels et méthodes.....	15
1-Matériel biologique.....	15
1-1 Source thermale étudiée.....	15
1-2 Echantillonnage.	18
1-3 Isolement.....	19
1-4 Purification et Conservation.....	19
2-Identification phénotypique des isolats.....	19
2-1 Caractérisation morphologique des isolats.....	19
2-1-1 Aspect microscopique.....	19
2-1-2 Aspect macroscopique.....	20
2-2 Caractérisation biochimique des isolats.....	20
2-2-1 Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	20
2-2-2 Test monnitrol-mobilité.....	20
2-2-3 Le type respiratoire.....	20
2-2-4 Système API 20 ^E	21
2-2-5 Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	21
2-2-5-1 Activité amylasiques.....	21
2-2-5-2 Activité Protéolytique.....	21
2-2-5-3 Activité lipolytique.....	21
3-Recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires des isolats.....	22
3-1 Germes test de référence utilisés.....	22
3-2 Recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires sur milieu solide (technique des cylindres d'agar)	23
3-3 Recherche des activités antimicrobiennes des surnageants.....	23
IV- Résultats et discussion.....	24

1-Isolement et purification des isolats.....	24
2-Characterisation phénotypique des isolats.....	24
2-1 Caractérisations morphologiques et culturales.....	24
2-1-1 Aspect microscopique.....	24
2-1-2 Aspect macroscopique.....	25
2-2 Caractérisation biochimique.....	26
2-2-1 Mise en évidence des enzymes respiratoires et le mannitol mobilité.....	26
2-2-2 Résultats de la plaque API 20 ^E	26
2-2-3 Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires.....	28
2-3 Discussion.....	30
3-Résultats de la recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires des isolats.....	33
3-1 Résultats de la recherche des activités antimicrobiennes extracellulaires sur milieu solide par la technique des cylindres d'agar.....	33
3-2 Résultats de la recherche des activités antimicrobiennes des surnageants (technique des puits)	36
3-3 Discussion.....	38
V- Conclusion générale.....	42
Références bibliographiques.....	44
Annexes.....	50

Liste des tableaux

Tableau N° 01 : Classification des extrémophiles et exemples des applications de certaines de leurs enzymes (Van den Burg, 2003).....	4
Tableau N° 02 : Exemples de conditions optimales de croissance d'extrémophiles (Dietrich et al., 2002).....	4
Tableau N° 03 : Différents sites d'isolements de souches de <i>Bacillus</i> thermophiles et hyperthermophiles.....	9
Tableau N° 04 : Caractéristiques morphologiques et culturales.....	10
Tableau N° 05 : Caractéristiques génétiques de deux souches de <i>Bacillus</i>	11
Tableau N° 06 : Caractéristiques physico-chimiques du hammam Debagh (Bouanane et al., 2011 ; Yakhlef et al., 2012).....	16
Tableau N° 07 : Souches microbiennes test utilisées dans la recherche des activités antimicrobiennes.....	22
Tableau N° 08 : Les résultats de la détermination de l'aspect macroscopique des bactéries isolées à partir du hammam Debagh.....	25
Tableau N° 09 : Résultats de la plaque API 20E des isolats.....	27
Tableau N° 10 : Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des isolats.....	29
Tableau N° 11 : Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats par la technique des cylindres d'agar.....	34
Tableau N° 12 : Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats LMB3001 et LMB3002 par la technique des puits.....	35

Liste des figures

Figure N° 01 : Les micro-organismes de l'extrême (Grosjean, 1996).....	3
Figure N° 02 : Sources chaudes, Krafla, N'amaskard, Islande (GOMRI, 2012).....	6
Figure N° 03 : Photo de la localisation de Hammam Debagh –Guelma- (Source : Google earth).....	15
Figure N° 04 : La source chaude de Guelma.....	17
Figure N° 05 : Prélèvement d'échantillons.....	18
Figure N° 06 : Aspect microscopique de LMB30012 et LMB3002	24
Figure N° 07 : Résultat de Test du mannitol- mobilité de la souche LMB3001	26
Figure N° 08 : Résultats des plaques api 20 ^E de quelques isolats	27
Figure N° 09 : Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des isolats.....	28
Figure N° 10 : L'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis de <i>Pseudomonas aëroginos</i> . 32	
Figure N° 11 : L'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ... 32	
Figure N° 12 : L'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> 33	
Figure N° 13 : L'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ... 33	
Figure N° 14 : L'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> 33	
Figure N° 15 : L'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ... 35	
Figure N° 16 : L'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeroginosa</i> 35	

Introduction générale

I-Introduction

Les organismes vivant en milieux extrêmes et en particulier les micro-organismes, au cours de l'évolution, ont développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. Les propriétés singulières de certaines de ces biomolécules ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies: chercheurs, ingénieurs et entreprises. La biotechnologie des extrémophiles a pour objectif de rechercher et d'exploiter ce nouveau gisement de ressources naturelles en biomolécules, notamment les enzymes, les biopolymères et les métabolites secondaires. La nature et l'évolution ayant généré un répertoire étendu de biomolécules, il paraît logique de puiser dans ce répertoire lorsque les propriétés d'une biomolécule répondent au cahier des charges d'une application biotechnologique. Si l'adaptation au cahier des charges n'est que partielle, la biomolécule peut néanmoins servir de point de départ à un processus d'ingénierie visant à améliorer ses performances ou de modèle pour la synthèse chimique de produits performants (Quérellou et Guézennec, 2013).

De nombreuses études s'accordent sur le fait que la contribution des microorganismes extrémophiles à la découverte de nouveaux composés notamment bioactifs va de plus en plus augmenter. En ce sens la connaissance des écosystèmes atypiques et des microorganismes associés à de tels environnements est porteuse d'espoirs quant à la découverte de nouvelles molécules (Guézennec, 2004).

Les études menées sur des *Bacillus* extrémophiles ont montré un grand intérêt aux applications biotechnologiques, notamment les molécules bioactives, présentant des caractéristiques spécifiques et particulières (Maugeri et al., 2001)

Ces molécules bioactives ouvrent des nouvelles frontières à explorer. Il s'agit des propriétés directement intéressantes pour des applications industrielles existantes dont ils peuvent optimiser les procédés, ainsi des perspectives de mise en œuvre de procédés biologiques nouveaux là où les méthodes de chimie seules peinent à satisfaire les exigences environnementales et à assurer la rentabilité des procédés (Quérellou et Guézennec, 2013).

Ces *Bacillus* ont montré des caractéristiques potentiellement utiles pour l'exploitation biotechnologique par leur intérêt considérable dans la production de plusieurs métabolites telle que les antibiotiques qui ont été rapidement identifiés comme d'importance au même titre que les enzymes thermostables (**Maugeri et al., 2001**)

Dans notre étude nous nous intéressons à des bactéries thermophiles et hyperthermophiles appartenant au genre *Bacillus* isolées à partir des sources hydrothermales, et nous vous présentons une synthèse bibliographique de quelques travaux pratiques récents, d'autant que la stratégie de notre pratique repose sur deux axes principaux :

- Un criblage de *Bacillus* thermophiles ou hyperthermophiles provenant de la source hydrothermale de hammam Debagh réparti à la région de Guelma situé au Nord-Est de l'Algérie (la source la plus chaude : 98°C).
- Un screening des activités antimicrobiennes de ces isolats.



Synthèse bibliographique

II- Synthèse bibliographique

1- Les microorganismes extrêmophiles

1-1 Les extrêmophiles :

Les extrêmophiles sont des micro-organismes qui se développent de manière optimale dans des conditions de milieux mortelles pour la quasi-totalité des autres espèces (Quéréllou et Guézennec, 2013).

Le nom donné «extrêmophiles» à ces microorganismes qui colonisent ces milieux d'apparence inhospitalière, il convient de distinguer :

- Les psychrophiles et thermophiles, qui croissent respectivement à des températures voisines de 0 °C (zone polaire) ou proches du point d'ébullition de l'eau (100 °C) au niveau des sites hydrothermaux d'origine océanique profond ou des geysers.
- Les barophiles, pouvant supporter des pressions allant jusqu'à 1 000 bars (source hydrothermale d'origine océanique profonde).
- Les acidophiles et les alcalophiles, qui poussent dans des milieux où le pH peut atteindre 0 ou 10 (effluents miniers, lac de soude africain).
- Les halophiles, que l'on trouve par exemple dans les marais salants et dont la concentration saline est proche de la saturation (de 20 à 35 %).
- D'autres milieux extrêmes, tels les solfatares (milieux riches en soufre), les nappes pétrolifères, les aires de décomposition organiques (Dietrich et al., 2002).
- Milieux anoxifier : c'est un milieu dépourvu d'oxygène.

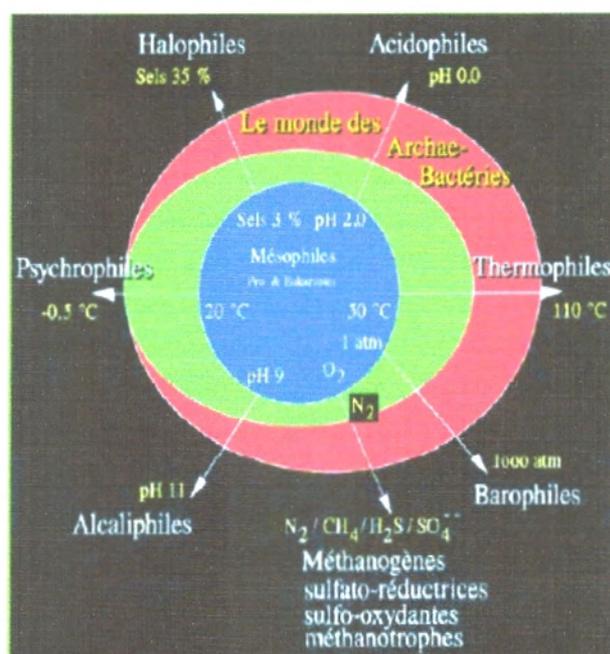


Figure N° 01 : Les micro-organismes de l'extrême (Grosjean, 1996)

Tableau N° 01: Classification des extrémophiles et exemples des applications de certaines de leurs enzymes (Van den Burg, 2003).

Type	Caractéristiques de croissance	Enzymes	Applications
Thermophiles	Hyperthermophiles T° > 80°C et thermophiles T° entre 60 et 80°C	Protéase Glycosyl hydrolases Chitinases Xylanases Lipases, esterases ADN polymerases Dehydrogenases	Détergents, hydrolyse en nourriture et alimentation, brassage, faisant cuire au four Amidon, cellulose, chitine, pectine, traitement, textiles Biologie moléculaire (par exemple ACP) Réactions d'oxydation
Psychrophiles	T° < 15°C	-protéase -Amylase -cellulase -Dehydrogenases	-Détergents, applications de nourriture (par exemple produits laitiers) -Détergents et boulangerie -Détergents, alimentation et textiles -Biodétecteurs
Halophiles	Haut sel, (par exemple NaCl de 2-5 M)	-Protéases -Dehydrogenases	-Synthèse de peptide -Biocatalysis dans des médias organiques
Alkaliphiles	pH > 9	-Proteases, cellulases	-Détergents, nourriture et alimentation
Acidophiles	pH < 2-3	-Amylases, glucoamylases Proteases, cellulases, Oxidases	-Traitement d'amidon -Composant d'alimentation -Désulfuration de charbon
Piezophiles	Pression-affectueux ; jusqu'à 130MPa	-Pour être défini	-Traitement des denrées alimentaires des produits alimentaires et production antibiotique

Tableau N° 02 : Exemples de conditions optimales de croissance d'extrémophiles (Dietrich et al., 2002)

Micro-organisme	Conditions optimales de croissance	Métabolisme
<i>Pyrolobus fumarii</i>	106 °C, pH 5,5	chimolithotrophe, aérobie
<i>Aquaspirillum arcticum</i>	4 °C	hétérotrophe, aérobie
<i>Picrophilus gen. nov.</i>	60 °C, pH 0,7	hétérotrophe, aérobie
<i>Clostridium paradoxum</i>	56 °C, pH 10,1	hétérotrophe, aérobie
<i>Haloanaerobium lacusroseus</i>	NaCl 200g.L ⁻¹ , 40 °C, pH 7,0	hétérotrophe, anaérobie

1-2 La biodiversité des extrêmophiles :

La biodiversité microbienne en milieu extrême varie de manière considérable selon le niveau d'extrémophilie et aussi en fonction des sources d'énergie et des donneurs et accepteurs d'électrons disponibles (**Quérellou et Guézennec, 2013**).

Elle est nulle dans les fluides hydrothermaux dont les températures dépassent fréquemment 200°C. Elle peut être réduite à une seule espèce de bactérie (*Candidatus Desulfurudis audaxviator*) comme dans le cas des eaux souterraines acides de drainage d'une mine d'or par 2,8 km de profondeur (**Chivian et al., 2008**) Elle est faible dans de nombreuses niches écologiques extrêmes, comme les cheminées hydrothermales de Lost City. Mais elle peut aussi être très élevée pour certaines sources hydrothermales profondes lorsque les sources d'énergie sont abondantes et qu'un écosystème complexe parvient à s'établir (**Quérellou et Guézennec, 2013**).

1-3 Les sources hydrothermales :

La découverte des sources hydrothermales profondes est quant à elle, plus récente puisque datant de 1977, quand à bord du sous-marin « Alvin », une équipe de géologues américains découvrait au large de l'Equateur, à près de 2600 m de profondeur, une forte activité volcanique et un fluide surchauffé s'échappant d'imposantes structures minérales aux allures de cheminées. Des campagnes de plongées ultérieures permettaient la découverte et l'exploration approfondie de nouveaux sites hydrothermaux. (Pacifique oriental, golfe de Californie, dorsale médio-atlantique, mer de Papouasie-Nouvelle-Guinée, bassin arrière arc de la fosse des Mariannes, etc.). Ces sites hydrothermaux sont caractérisés par des conditions de hautes pressions, de forts gradients de température (2°C à 400 °C), de fortes teneurs en éléments toxiques (métaux lourds, méthane, sulfures, etc...), l'absence totale de lumière et de faibles apports nutritionnels essentiellement liés aux apports détritiques des couches superficielle de l'océan (**Minic et al., 2006**).

Malgré de telles conditions et dans ces espaces que l'on imaginait volontiers désertiques des communautés microbiennes qui regroupent un grand nombre d'espèces se sont mis en place dans ces conditions extrêmes, notamment des bactéries capables de produire des molécules innovantes (**Guézennec, 2004**).

Beaucoup de sources hydrothermales existent sur terre. Les micro-organismes thermophiles liés à ces écosystèmes chauds ont suscité l'intérêt considérable ces dernières années. (Yakhlef *et al.*, 2012).



Figure N° 02: Sources chaudes, Krafla, N'amaskard, Islande (Gomri, 2012).

1-4 Les microorganismes des sources hydrothermales :

Les sources hydrothermales profondes comportent des milieux extrêmement divers. En effet, depuis l'eau de mer environnante et les sédiments superficiels avoisinants 2°C jusqu'aux zones chaudes des fumeurs, il existe des gradients thermiques qui permettent le développement de psychrophiles (organismes inféodés aux milieux froids), de mésophiles et de thermophiles et hyperthermophiles. Mais si le fonctionnement de ces écosystèmes hydrothermaux recèle encore un certain nombre de mystères, il est rapidement apparu qu'un challenge pouvait être mis en place autour de l'exploitation biotechnologique des microorganismes adaptés à ces conditions extrêmes. Ce challenge serait alors basé sur une simple hypothèse : à un environnement extrême doit nécessairement correspondre une biodiversité bactérienne adaptée à cet environnement. Et cette biodiversité ne serait elle pas

alors source de microorganismes atypiques pouvant synthétiser, en conditions de laboratoire, de nouvelles molécules bioactives, de nouveaux médicaments ? (**Guézennec, 2004**).

La première phase d'une approche biotechnologique passe par la constitution d'une collection originale de microorganismes. Cette collection compte à ce jour plus de 1500 isolats dont les soixante quinze pourcent correspondent à des microorganismes mésophiles et le reste à des microorganismes thermophiles et hyperthermophiles avec pour certains d'entre eux des optima de croissance en température supérieurs à 100°C (**Guézennec, 2004**). Par exemple en Algérie, très peu de travaux publiés sur des microorganismes extrêmophiles provenant de sources hydrothermales mais nous pouvons citer les travaux de l'équipe (**Bouanane et al., 2011**) qui a isolé une nouvelle bactérie : *Caldicoprobarter algeriensis* appartient à l'ordre des Clostridiales et la famille des Caldicoprobacteraceae de la source hydrothermale de Guelma (Algérie).

2- Caractérisation phénotypique et génotypique des *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries regroupant plusieurs espèces partageant des caractéristiques très semblable, comme montrent les résultats de l'étude de (Nazina et al., 2001) concernant la taxonomie des *Bacillus* thermophiles.

2-1 Les *Bacillus* :

Les *Bacillus* forment un genre des bactéries très diverses, sont des bactéries à gram positif, de forme bacillaire, elles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables (De vos et al., 2009).

Les dimensions de cellules végétatives vont de 0.5 µm par 1.2 µm à 2.5 µm par 10 µm de diamètre. Le genre *Bacillus* est un genre ubiquitaire

2-2 Taxonomie des *Bacillus* :

La classification de *Bacillus* est très compliquée grâce à sa diversité morphologique, physiologique, et phylogénétique, *Bacillus* appartient à la famille des Bacillaceae, à l'ordre des Bacillales, à la classe des Bacilles, au phylum des Firmicutes (De vos et al., 2009).

Bacillus se distingue aussi par le nombre et la diversité de ses espèces. De nombreuses espèces, dont la classification n'est pas encore bien définie.

Le genre *Bacillus* renferme plusieurs groupes, acidophile, alcalophiles, thermophiles, hyperthermophiles, et halophiles (De vos et al., 2009). Chaque groupe appartient à un milieu qui favorise les bonnes conditions de développement.

Parmi les thermophiles nous pouvons citer : *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* et *Bacillus thermodenitrificans* (Sunna et al., 1997)



2-3 Prélèvement et isolement :

L'isolement des souches de *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles peut se réaliser dans des différents écosystèmes tels que les passages hydrothermiques peu profond et sources thermales marines.

Tableau N° 03 : Différents sites d'isolement de souches de *Bacillus* thermophiles et hyperthermophiles.

L'équipe	Souches	Sites d'isolement	Température	pH
(Nicolaus et al., 2002)	4001	le cheminée « Seccafumosa » lucrino appelé par localité (Pozzuoli,Italie)	80 °c	7.6
	4002-4003-4004	Au bord de la mer de « maronti » (Ischion,Italie)	90 °c	7.6
	4005	« Cartaromana » (Ischion,Italie)	70 °c	6.9
	4006-4007-4008- 4009-4010-4011	« Sorecto » (Ischion,Italie)	65 °c	/
	4012-4013-4014	« Castiglione » (Ischion,Italie)	85 °c	7.6
(Nicolaus et al., 2000)	B3-72	« Ile de vulcono » (Iles éoliennes,Italie)	70 °c	5.2
(Gugliandolo et al., 2003)	4-1T	« Iles éoliennes, Italie » à l'emplacement vulcano- puntacongliara	45 °c	6.9

La culture de ces souches a été faite sur milieu BMB 2216 difco aux températures et aux PH correspondant a chaque taxon. (Gugliandolo et al., 2003 ; Nicolaus et al., 2002 ; Nicolaus et al., 2000).

2-4 Caractéristiques morphologiques et culturelles :

Caractéristiques morphologiques et culturelles : collections des souches du genre *Bacillus*

Tableau N° 04 : Caractéristiques morphologiques et culturelles.

L'équipe	Souche	Caractéristiques morphologiques et culturels
Gugliandolo et al., 2003	<i>Bacillus</i> 4-1T	Aérobie T°optimale : 55°C pH : 7 gram positif diamètre : de 0.2 à 0.5 µm spore cylindrique
Nicolaus et al., 2002	<i>Bacillus</i> de 4001 jusqu'à 4014	Aérobies T°optimale : entre 50 et 85°C pH : 7.5 la plus part sont des tiges gram positifs diamètre : de 1 à 3 µm spores de morphologies différentes
Nicolaus et al., 2000	<i>Bacillus</i> B 3-72	Aérobie T°optimal : entre 65°C pH : 7 gram positif spores ovales catalase positif

2-5 Caractéristiques génétiques :

Pour les caractéristiques génétiques les deux équipes de (Nicolaus et al., 2000) et (Ghgliandolo et al., 2003) ont déterminé le contenu de l'ADN en G+C mol/% et la séquence du gène de ARN16s afin de confirmer la nouveauté des taxons, les différents techniques utilisées par ces derniers sont représentées dans le tableau 05

Tableau N° 05 : Caractéristiques génétiques de deux souches de *Bacillus*.

L'équipe	Souche	Techniques	Resultats	
(Nicolaus et al., 2000)	B3-72	La teneur en G+C mol% est effectuée come décrit par (Mesbah et al., 1989).	G+C = 52.5 appartient a la gamme des <i>Bacillus</i> thermophiles du groupe 5	La souche B3-72 a groupé au niveau de similitude de 65% avec <i>Bacillus thermodenitricans</i>
		Le modèle de restriction de l'ADN16s est exécuté selon la méthode (Rainey et al., 1994)	La souche B3-72 est différente de souches de référence.	
(Ghgliandolo et al., 2003)	4-1T	La teneur en G+C mol% est effectuée come rapportée par (Maugeri et al., 2001)	G+C= 40.8: tombant dans la chaine des valeurs déterminer pour l'espèce de <i>Bacillus</i> du groupe 1 comme définie par (Ash et al., 1991) dans les quels cette souche (4-1T) appartient phylogénétiquement	La similitude binaire de la séquence du gène et les espèces les plus voisins génétiquement sont clairement en dessous de 97%, la souche 4-1T est considérée comme une nouvelle espèce de <i>Bacillus</i> .
		les valeurs de similitude binaire de la séquence du gène ARN 16s effectuée comme rapporté par (Maugeri et al., 2001)	étendues entre 95 et 96%	

3- Caractérisation des molécules antimicrobiennes :

3-1 Les antibiotiques :

Les antibiotiques sont des substances chimiques et /ou organiques produites par un petit nombre de microorganismes et exerçant une action toxiques envers d'autres microorganismes dont principalement les bactéries. Cette action peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est alors bactériostatique et réversible, mais elle peut aussi être létale et dans ce cas elle est bactéricide et irréversible. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (**Prescot, 1995**).

Le nombre de substances antimicrobiennes produites par le genre *Bacillus* est proche de 167, dont 66 sont isolées de *B. subtilis*, 23 à partir de *B. brevis* et le reste à partir des autres espèces. Les principaux antibiotiques produits par des espèces de ce genre sont : la polymyxine, la difficidine, la subtiline, la mycobacilline, la bacitracine par *B. subtilis* ; la gramicidine et la tyrothricine par *B. brevis* ; la cerexine et la zwittermicine par *B. cereus* ; la circuline par *B. circulans* ; la laterosporine par *B. laterosporus* ; la bacitracine par *B. licheniformis* ; la polymyxine et la colistine par *B. polymyxa* ; et la pumuline par *B. pumilus* (**Awais et al., 2010**).

La grande partie de substances antimicrobiennes produites par le genre *Bacillus* est de nature peptidique tels que la bacitracine, la gramicidine, la tyrocidine, la subtiline, la bacilysine etc... (**Fariha et al., 2009**). La majorité de ces substances agissent sur les bactéries à Gram positif, cependant la polymyxine, la colistine et la circuline possèdent une activité contre les bactéries à Gram négatif et la bacillomycine, la mycobacilline, et la fungistatine agissent sur les champignons et les levures (**Syed et al., 2009**).

3-2 Méthodes de screening des métabolites secondaires :

Plusieurs méthodes ont été développées pour le screening de métabolites secondaires essentiellement les substances antimicrobiennes (**Cannell, 1998**)

3-2-1 Screening primaire :

Le screening primaire permet de détecter in vitro et sur milieu gélosé l'effet inhibiteur des microorganismes sélectionnés vis-à-vis des germes cibles, il est rapide, sensible, et raisonnable. Il peut être réalisé par plusieurs techniques

✓ **Technique des cylindres d'agar (plug agar) :**

Elle consiste à prélever des cylindres d'agar à partir de la culture du microorganisme d'intérêt et les mettre sur milieu gélosé préalablementensemencé par le microorganisme test. Les substances diffusent sur la gélose et l'observation d'une zone d'inhibition autour des cylindres après incubation indique la présence de l'effet inhibiteur (**Eccleston et al., 2008**).

✓ **Technique des stries transversales (Cross streak) :**

Elle consiste à ensemencer le germe sélectionné en strie au centre d'un milieu de culture gélosé, et après incubation (3 à 7 jours) à une température appropriée, le milieu est ensemencé par les germes test en stries de manière à former un angle de 90° avec le germe d'intérêt. Après ré-incubation, l'interaction microbienne est analysée par la mesure de la zone d'inhibition (**Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008**).

3-2-2 Screening secondaire :

Un screening secondaire suit habituellement le screening primaire, et seulement les microorganismes présentant une activité inhibitrice sont retenus. Il a comme objectif de récupérer les substances bioactives à partir d'une culture liquide (filtrat ou surnageant) des germes sélectionnés. Le filtrat ou le surnageant peuvent être analysés directement ou après extraction, par des solvants organiques, par plusieurs techniques (**Khanna et al., 2011**).

✓ **Technique des disques en papier (filter paper discs) :**

Elle consiste à déposer des disques stériles en papier filtre, imbibés par un volume défini du filtrat, du surnageant ou de l'extrait organique du germe sélectionné, sur un milieu gélosé préalablementensemencé par le germe test, après incubation, les zones d'inhibition sont mesurées autour des disques (**Lancini et Parenti, 1982**).

✓ **Technique des puits :**

Elle consiste à former des puits sur un milieu gélosé préalablementensemencé par le germe test et les remplir par un volume précis du filtrat, du surnageant ou de l'extrait organique du germe sélectionné (**Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008**).

✓ **La concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

La CMI (ou MIC) est définie comme la plus petite concentration d'un composé antimicrobien qui inhibe la croissance d'une souche après une période d'incubation

appropriée. Elle est déterminée in vitro, par des dilutions en gélose ou en bouillon. Les germes cibles sont testés pour leur capacité à montrer une croissance visible sur une série de boîtes pétries contenant milieu gélosé (dilution en gélose) ou sur des microplaques (microdilution en bouillon) contenant des dilutions appropriées de l'agent antimicrobien. L'observation est réalisée après une nuit d'incubation, la plus faible concentration dans laquelle il n'y a pas de croissance visible du germe cible correspond à la CMI (**Khanna et al., 2011**).

Matériel et Méthodes



III- Matériel et méthodes

1-Matériel biologique :

1-1-Source thermale étudiée :

Hamam Debagh constitue la source **la plus chaude** en Algérie, il se situe à 20 Km au sud du Chef-lieu de la wilaya de Guelma ($36^{\circ} 27'N$, $7^{\circ}16'E$) et à 320m d'altitude.



Figure N° 03: Photo de la localisation de Hamam Debagh –Guelma- (Source : Google earth).



Ce site comporte neuf griffons d'eau chaude présentant les mêmes caractéristiques physico-chimiques mentionnées dans le tableau N° 06, mais la température diffère. Le griffon A d'où proviennent les échantillons est une température de 90°C et un pH 7,3.

Tableau N° 06 : Caractéristiques physico-chimiques du hammam Debagh (Bouanane et al., 2011 ; Yakhlef et al., 2012)

Hammam Debagh	
T (°C)	90 – 98
PH	7.3
Débit (L/s)	1650
Ca	130
Mg ²⁺	37.4
K ⁺	46 mg/l
Na ⁺	240
Cl ⁻	370
SO ₄ ²⁻	385
HCO ₃ ⁻	183
H ₂ S	6.80
As	0.45

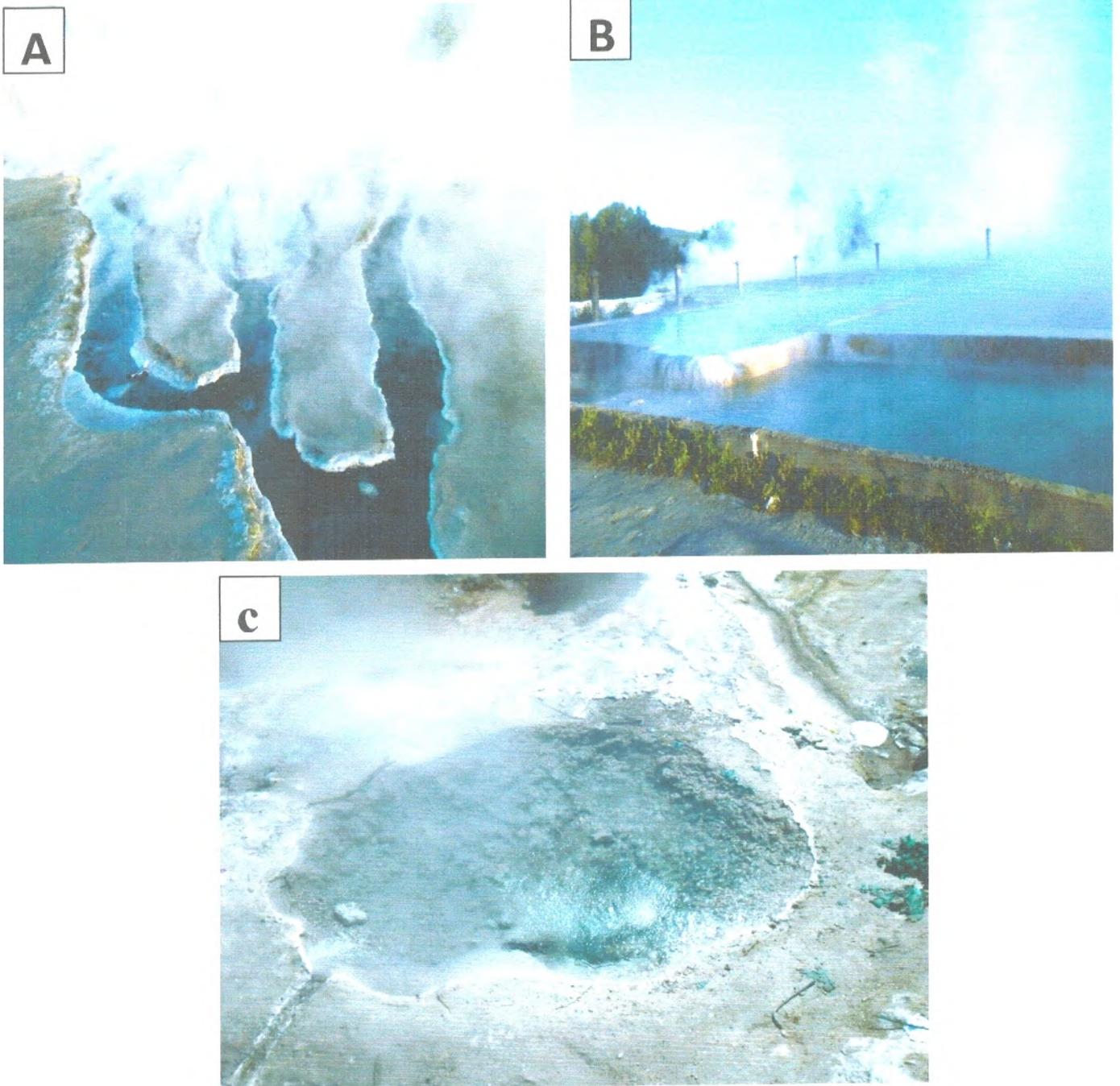


Figure N° 04: La source chaude de Guelma

A, B : Source hydrothermales de Hammam Debagh

C : Griffon A, site de prélèvement

1-2 Echantillonnage :

Les prélèvements d'eau ont été effectués lors du mois de mars 2013 à partir de griffon A (température=90°C et PH=7,3).

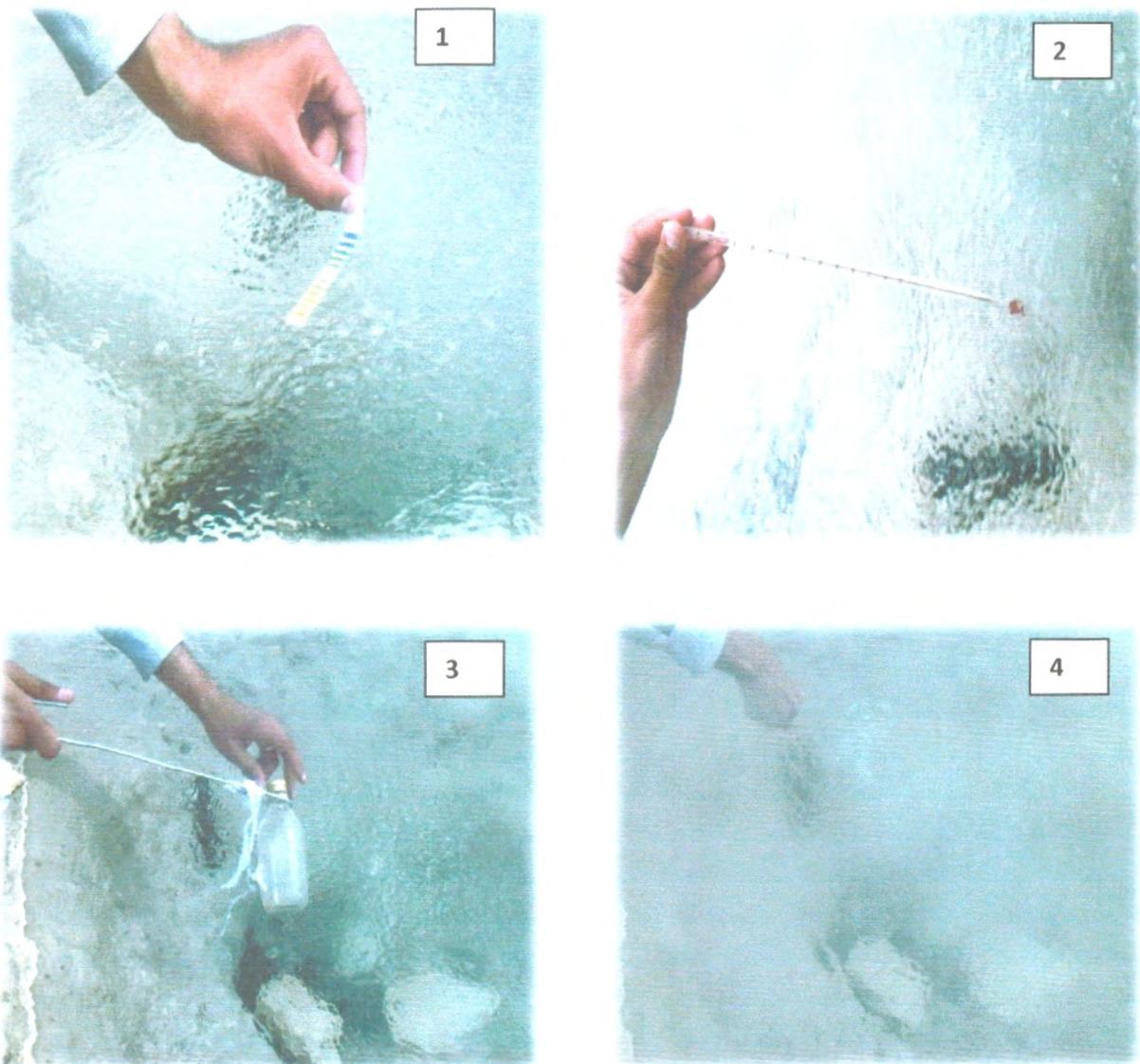


Figure N° 05 : Prélèvement d'échantillons

1 : Mesure de pH 2 : Mesure de la température

3, 4 : Prélèvement d'échantillons