

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master 2 en Biologie
Option : Biochimie

Thème :

Evaluation du potentiel de production de biomolécules des souches bactériennes isolées à partir d'espèces marines de la côte de Tipaza.

Soutenu le 14/09/2021

Par : BENNAI Houria Meroua & BOURAHLA Sarah

Devant le jury :

Président :	Mme. AIT SAADI N	MCB	USDB1
Examinatrice :	Mme. MOHAMED MAHMOUD F	MCB	USDB1
Promotrice :	Mme. TOBAL SEGHIR S	MAA	USDB1

Remerciements :

Nous adressons en premier lieu notre reconnaissance à notre DIEU tout puissant, de nous avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à Mme AIT SAADI N, maitre de conférences B, à l'USDB1 d'avoir bien voulu accepter de présider le jury de cette mémoire.

Nous tenons à remercier également Mme MOHAMED MAHMOUD F, maitre de conférences B, à l'USDB1 d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Notre reconnaissance, et nos sincères remerciements vont à notre promotrice madame TOBAL S maitre assistante A, à l'université de BLIDA1 pour nous avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail. Ses orientations, ses encouragements, sa compréhension, sa disponibilité constante nous ont été d'une précieuse aide.

Nous tenons à remercier également Mme Hania, Mme Zakia, Mme Naziha, Mme Houria, Mme Chafika et Mme Hayat pour leur aide et leur encouragement.

Sans oublier de remercier les membres des clubs de plongée sous-marine qui nous ont assuré l'échantillonnage.

Dédicace :

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance

A mon très cher père Karim

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation.

A ma très chère mère Nadia

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté et la source de tendresse. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance.

A ma petite sœur adoré Yasmine ;

A mon très cher frère Khalil ;

A mon amie Djillali Imene.

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A ceux qui font tous les jours

Notre bonheur.

Maroua.

Résumé :

Les métabolites des organismes marins se sont avérés être une riche source pour la découverte de multiples molécules bioactives puissantes.

Les objectifs de ce travail étaient l'isolement et la purification d'une collection de souches bactériennes associées à 3 éponges marines collectées de la cote de Tipaza, et rechercher chez cette même collection de souches des éventuelles activités enzymatiques, antibactériennes, et antifongique.

A cet effet, les tests de criblage d'activités enzymatiques ont montré que 100% de nos souches sont dotées d'une gélatinase. Près de 76,92% ont une estérase, 69,23% possèdent une amylase et une lécithinase, 61,53% sont dotées d'une caséinase, et 30,76% d'une lipase.

L'investigation des éventuelles activités antimicrobiennes a permis de montrer, quant à elles, que 46,15% des souches isolées sont biologiquement actives contre *S. aureus* et *B. subtilis* suivie par 38,46% contre *C. albicans*, 7,69% contre *E. coli* et *A. brasiliensis*.

Cependant, aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée contre l'espèce *P. aeruginosa*.

En conclusion, ces résultats confirment la capacité de notre collection de souches bactériennes à synthétiser des métabolites secondaires bioactifs.

Mots clés : éponges marines, biotechnologie bleue, microorganismes symbiotiques, métabolites secondaires.

Abstract:

Marine metabolites have proven to be a rich source for the discovery of multiple powerful bioactive molecules.

The objectives of this work were to isolate and purify a collection of bacterial strains associated with 3 marine sponges collected from the Tipaza coast, and to search this same collection of strains for possible enzymatic, antibacterial, and antifungal activities.

For this purpose, enzyme screening tests have shown that 100% of our strains have gelatinase. Almost 76.92% have esterase, 69.23% have amylase and lecithin, 61.53% have caseinase, and 30.76% have lipase.

The investigation of possible antimicrobial activities showed that 46.15% of isolated strains are biologically active against *S. aureus* and *B. subtilis* followed by 38.46% against *C. albicans*, 7.69% against *E. coli* and *A. brasiliensis*.

However, no antibacterial activity was recorded against *P. aeruginosa*.

In conclusion, these results confirm the capacity of our collection of bacterial strains to synthesize bioactive secondary metabolites.

Keywords: marine sponges, blue biotechnology, symbiosis microorganisms, secondary metabolites

ملخص:

أثبتت نواتج الأيض للكائنات البحرية أنها مصدر غني لاكتشاف العديد من الجزيئات النشطة بيولوجياً القوية. وتمثلت أهداف هذا العمل في عزل وتنقية مجموعة من السلالات البكتيرية المرتبطة ب3 إسفنجات بحرية و التي تم تجميعها من ساحل تيبازة، والبحث عن هذه المجموعة نفسها من السلالات من أجل أنشطة إنزيمية ومضادة للجراثومة ومضادة للالتهابات.

لهذا الغرض، أظهرت اختبارات فحص الإنزيم أن 100% من سلالتنا تملك الجيلاتيناز. ما يقرب من 76.92% لديهم استراز، 69.23% لديهم الأميلاز والليسيثيناز، 61.53% لديهم كازيناز، و 30.76% لديهم ليباز.

كما أتاح التحقيق في الأنشطة المحتملة لمضادات الميكروبات أن 46.15% من السلالات المعزولة نشطة بيولوجياً ضد *S. aureus* and *B. subtilis* تليها 38.46% ضد *C. albicans*، و 7.69% ضد *E. Coli* و *A. Brasiliensis*.

ومع ذلك، لم يسجل أي نشاط مضاد للبكتيريا ضد *P. aeruginosa*.

في الختام، تؤكد هذه النتائج قدرة مجموعتنا من السلالات البكتيرية على تصنيع المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجياً.

الكلمات الرئيسية: الإسفنج البحري، التكنولوجيا الحيوية الزرقاء، الكائنات الدقيقة التكافلية، الأيض الثانوي

Liste d'abréviations :

Ifremer : L'Institut Français De Recherche Pour l'Exploitation De La Mer.

HMA : High Microbien Abundance (Eponge à Abondance Microbienne Elevée).

LMA : Low Microbien Abundance (Eponge à Faible Abondance Microbienne).

MET : Microscope Electronique à Transmission.

DGGE : Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant.

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique.

UFC/ml : Unité Formant Les Colonies Par Millilitre.

ATCC: American Type culture collection.

PCR : Polymérase Chain Réaction.

ARN : Acide Ribonucléique.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

Liste des Tableaux :

Tableau I: Exemples des éponges et leur produit naturel ayant des activités biologiques (Yoo Kyung Lee <i>et al.</i>, 2001)	13
Tableau II: Eponges et leur micro-organismes associés sources de produits naturels bioactifs (Lee <i>et al.</i>, 2001).....	17
Tableau III: Exemples d'enzymes isolées à partir d'éponges marines et ayant des caractéristiques industrielles comparables à celles des enzymes disponibles sur le marché (de Oliveira <i>et al.</i>, 2020).....	21
Tableau IV: Liste des composés à bioactivité positive découverts à partir d'éponges marines et de leurs associés de 2018 à 2021	23
Tableau V : La collection de souches bactériennes isolées à partir de nos éponges marines et leurs dilutions	39
Tableau VI: Résultats de l'étude macroscopique des souches isolées	41
Tableau VII: Résultats de l'étude de la forme et le mode de regroupement des souches bactériennes.	42
Tableau VIII : Résultats de screening enzymatique des souches isolées.	44
Tableau IX:Résultats des activités antibactériennes des souches isolées vis à vis de souches pathogènes de références.....	50
Tableau X: Résultats de l'activité antifongique des souches isolées des éponges marines vis à vis de <i>Candida albicans</i> et d'<i>Aspergillus brasiliensis</i>	52

Liste des Figures :

Figure 1: Organisation d'une éponge calcaire de type Ascon (Quintin., 2001).	6
Figure 2: Organisation d'une éponge calcaire de type Sycon (Quintin., 2001)	6
Figure 3: Organisation d'une éponge de type Leucon (Quintin., 2001)	7
Figure 4: Mode de transmission des symbiotes microbiennes par une éponge hypothétique (Thacker & Freeman., 2012)	9
Figure 5: Localisation des microorganismes symbiotes au sein des spongiaires (Lee et al., 2001).	10
Figure 6: structure de l'Ara-A (spongothymidine) (Kim & Dewapriya., 2012)	15
Figure 7: structure de l'Ara-C (cytarabine)	15
Figure 8: Structures chimiques des composés de 1-4 (Zhang et al., 2017).	16
Figure 9: Analyse de la couleur du muffin(Kiran et al., 2017)	19
Figure 10: Photo des trois éponges.	28
Figure 11: Protocol de coloration Gram	32
Figure 12: les différents types respiratoires des bactéries.	33

Sommaire :

Introduction :	1
Partie Bibliographique	
I. Généralités sur les éponges marines :	3
I.1. Description :	3
I.2. Biologie des éponges marines :	3
I.3. Nutrition des éponges marines :	4
I.4. Systématique des éponges marines :	5
I.4.1. Les <i>éponges calcaires</i> ou calcisponges : (Bowerbank, 1864)	5
I.4.2. Les hexactinellides ou éponges de verre (Schmidt, 1870)	7
I.4.3. Les démosponges (Sollas, 1885)	7
II. Symbiose spongiaires-microorganismes marins :	8
II.1. Mode d'acquisition des microorganismes symbiotiques :	8
II.2. Localisation des microorganismes symbiotiques :	10
II.3. Abondance des microorganismes symbiotiques :	11
II.4. Intérêt de la symbiose :	12
III. Valorisation et Exploitation des éponges marines dans différents secteurs :	14
III.1. Le secteur Médicale :	14
III.2. Le secteur industriel :	19
III.2.1. Dans l'industrie alimentaire :	19
III.2.2. Dans l'industrie chimique :	20
1. Laboratoire d'accueil :	26
2. Lieu et moment de l'échantillonnage :	26
3. Matériel :	26
3.1. Matériel biologique :	26
3.1.1. Espèces d'éponges marines présomptives :	26
3.1.2. Les germes tests :	26
3.1.2.1. Les souches bactériennes de références :	26

3.1.2.2. Les souches de champignons microscopiques :	27
3.2. Matériel non biologique	27
4. Méthodes :	28
4.1. Echantillonnage.....	28
.....	28
4.2. Isolement des souches bactériennes associées aux espèces marines :	29
4.2.1. L'étude de l'influence de la composition des milieux de culture utilisés sur la croissance bactérienne :	29
4.2.2. Préparation des solutions mères :	29
4.2.3. Préparation des dilutions :	30
4.2.4. Isolement des souches bactériennes associées aux éponges par épuisement sur milieu solide : technique des quadrants.....	30
4.2.5. Purification des souches :	30
4.3. Etude macroscopique et microscopique des souches bactériennes sélectionnées :	31
4.3.1. Etude macroscopique :	31
4.3.2. Etude microscopique :	31
4.3.2. Etat frais :	31
4.3.3. Observation microscopique après coloration :	32
4.3.3.1. Coloration simple au bleu de méthylène :	32
4.3.3.2. Coloration différentielle de Gram :	32
4.4. Recherche du type respiratoire :	33
.....	33
4.5. Recherche d'activités enzymatiques	34
4.5.1. Recherche d'une activité lipolytique	34
4.5.2. Recherche d'une caséinase.....	34
4.5.3. Recherche d'une amylase.....	35
4.5.4. Recherche d'une activité estérase.....	35
4.5.5. Recherche d'une activité gélatinase.....	36
4.6. Recherche d'activités antimicrobiennes	36
4.6.1. Recherche d'activités antibactériennes	36
4.6.2. Recherche d'activités antifongiques	37
5. Résultats et discussion :	39
5. 1. Isolement et purification des micro-organismes associés aux espèces marines :	39
5.2. Etudes macroscopiques des souches isolées :	41

5.3. Etude microscopique des souches isolées :	42
□ Coloration Gram :.....	42
□ Etude de la forme des souches et leurs modes de regroupement :.....	42
5.4. Type respiratoire :	43
5.5. Résultats de recherche des activités enzymatique des souches bactériennes :	44
5.6. Etude de potentiel activités antibactériennes des souches bactériennes :	50
5.7. Résultats des activités antifongiques des souches bactériennes :	52
Conclusion :	53
Références Bibliographiques :	54
Annexes :	60
.....	62

Introduction :

Notre planète bleue est un habitat dominé à près de 70 % de sa surface par les mers et les océans qui abritent une gigantesque biodiversité avec près de 240 000 espèces identifiées conformément à **Ifremer** en 2017, mais on estime que près de 90 % des espèces restent encore à découvrir !

Dans sa globalité, cette biodiversité marine est très différente de celle terrestre, ce qui peut être expliqué par la présence dans les océans de nombreux phylums endémiques mais aussi comme le suggèrent les nombreuses mises à jour d'espèces de toutes tailles et de formes nouvelles d'organisation du vivant, et donc on peut la considérer comme étant un ensemble de ressources exploitables, valorisables et utiles pour l'Homme : il s'agit de la biotechnologie bleue ou la biotechnologie marine (**Guezennec., 2014**).

Généralement, lorsque nous parlons de biotechnologies marines, il est évoqué comme organismes marins principaux les macro-algues, certaines espèces comme les serpents marins, les poissons venimeux, les cônes et leurs venins, ou encore des éponges...etc. (**Guezennec., 2014**). Et de ce fait, il s'avère que les éponges marines sont des mines d'or en raison de leur ubiquité et de leur biodiversité élevée. Elles sont connues pour être des hôtes de micro-organismes symbiotiques en leur fournissant régulièrement des aliments dans leurs choanocytes en filtrant l'eau de leur environnement. Ces organismes marins vivent fixés sur un substrat, et ne peuvent donc fuir pour éviter les prédateurs. C'est pourquoi, elles ont dû mettre en place différentes stratégies chimiques de défense par la synthèse de métabolites bioactives potentiellement utiles pour l'Homme.

Des centaines d'articles scientifiques décrivent leur activités biologiques diverses notamment des activités anti-cancéreuses (**Singh et al., 2008**) ; antivirales ; anti-inflammatoires (**Abad., 2008**) ; antibiotiques ; antifongiques ; immunosuppressives ; neuro-suppressives (**Mayer et al., 2009**)etc.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la fraction invisible de cette biodiversité à savoir les microorganismes symbiotiques aux trois éponges marines différentes.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une collection de souches microbiennes associées à nos éponges. Puis dans un deuxième temps, nous avons cherché chez cette même collection de souches des éventuelles activités enzymatiques et/ou antimicrobiennes d'intérêt en Biotechnologies et Santé.

Partie Bibliographique:

I. Généralités sur les éponges marines :

I.1. Description :

Les spongiaires, ou communément connus sous le nom des éponges marines, forment le groupe d'animaux sessiles le plus important sur les marges continentales à la fois par leur diversité, leur biomasse, et la variété des milieux colonisés (**Vacelet ., 1988**). Apparues il y a probablement près de 700 millions d'années, au Précambrien¹, plus de 8553 espèces d'éponges ont été déjà décrites (**Van Soest et al., 2012**), dont la plupart sont des espèces marines mais il existe également des espèces dulçaquicoles²(environ une cinquantaine d'espèces d'eau douce). Ces organismes sont largement répartis dans le monde et il est possible d'en trouver dans toutes les mers, des pôles à l'équateur, elles occupent verticalement l'ensemble de l'espace, depuis le médiolittoral³ jusqu'aux plaines abyssales.

I.2. Biologie des éponges marines :

Contrairement aux animaux les plus évolués, les éponges sont constituées de cellules faiblement liées entre elles qui ne forment pas de véritables tissus ce qui les fait classer dans le groupe des Parazoaires (stade intermédiaire entre les Protozoaires et les Métazoaires) on parle alors d'état Atissulaire. De ce fait, toutes les fonctions vitales sont assurées alors par ces cellules qui sont plus ou moins spécialisées (ce qui forme un avantage par rapport aux protozoaires qui doivent assurer l'ensemble des fonctions vitales avec leurs uniques cellules) (**Quintin., 2001**).

Les principaux types de cellules rencontrées sont les suivantes :

- **Les choanocytes ou cellules à collerette** (figure1) : assurant notamment le mouvement d'eau dans le corps de l'éponge mais qui jouent également un rôle lors de la reproduction.
- **Les amibocytes** : cellules mobiles responsable de transfert des éléments nutritifs.
- **Les scléroblastes (ou sclérocytes) et les spongioblastes** : assurent la sécrétion de squelette interne des éponges (spicules et spongine).
- **Les pinacocytes** : cellules responsables de la protection des éponges du monde extérieur.

¹ **Le Précambrien** : est la première ère géologique de l'histoire de la Terre. Elle commence à la création du globe il y a 4,55 milliards d'années, pour s'achever voilà 540 millions d'années.

² **Dulçaquicoles** : eaux douces.

³ **Médiolittoral** : L'étage médiolittoral correspond à la zone de l'estran située entre le niveau moyen des hautes mers de vives eaux (coefficients de marée compris entre 90 et 105) et celui des basses mers de mortes eaux (coefficients de marée compris entre 35 et 50). Ces limites incluent la majeure partie de la zone de balancement des marées

- **Les porocytes** : cellules qui bordent les pores inhalants des éponges.
- **Les archéocytes** : cellules non différenciées et qui peuvent se transformer en n'importe quel type de cellules (il s'agit de cellules totipotentes).
- **Les collencytes** : cellules allongées qui sécrètent du collagène.
- **Les myocytes** : cellules allongées dont la structure ressemble à celle des cellules musculaires lisses, douées de propriétés contractiles.
- **Des cellules nerveuses.**

Histologiquement, leur corps est constitué de deux types de cellules appelées endoderme et ectoderme ou plus justement : choanoderme et pinacoderme, entre ces deux couches se trouve la mésogée ou mésenchyme dans laquelle évoluent librement les amibocytes, ainsi on peut trouver les spicules⁴ ou fibre de spongine (les éléments du squelette de l'éponge) (**Quintin., 2001**).

I.3.Nutrition des éponges marines :

La très grande majorité des éponges marines se nourrit par filtration d'eau. Certaines espèces peuvent filtrer jusqu'à 20 000 fois leur volume en une journée (tout dépend de leur rythme biologique ; de la température et de la profondeur dans laquelle elles vivent), les mouvements d'eau sont assurés par les choanocytes grâce au mouvement de leur flagelle, les particules nutritives sont phagocytées dans les microvillosités des choanocytes comme chez les protozoaires. Cependant, en raison de l'absence d'enzymes la digestion n'est pas réalisée dans le choanocyte, mais plutôt dans les amibocytes (**Quintin., 2001**).

Certaines espèces qui vivent à de grandes profondeurs sont carnivores, comme les *Cladorhizidae*, elles possèdent de longs filaments hérissés de spicules ce qui leur permet de piéger les petits animaux qui les traversent.

⁴ Spicules : petites pièces de calcaire ou de silice, et/ou de fibres de spongine.

I.4. Systématique des éponges marines :

Le phylum Porifera est fondé jusqu'à présent sur la nature et la forme des spicules. Trois classes existent aujourd'hui :

I.4.1. Les éponges calcaires ou calcisponges : (Bowerbank, 1864)

Elles représentent moins de 5 % des espèces du phylum Porifera. Elles sont typiquement marines, de petite taille (**Kirti Patel, 2010**). Elles nécessitent un substrat dur pour se fixer et vivent à 100 m de profondeur. Leur squelette est formé de spicules calcaires (carbonates, calcites) souvent en forme d'étoile disposées autour des pores inhalants et sécrétées par des cellules spéciales appelées calcoblastes.

Ce type d'éponge présente les 3 stades **Ascon**, **Sycon** et **Leucon**.

On distingue deux sous-classes :

- Homocoeles : cavité gastrique entièrement tapissée de choanocytes (Ascon).
- Hétérocoeles : forme complexe de type Sycon et Leucon.

1- Stade Ascon :

La ramification de la cavité gastrique permet la présentation des digitations nombreuses irrégulières, mais toute la cavité est tapissée par des choanocytes (forme homocoele). Lorsque la paroi externe se plie et s'étale, les ramifications de la cavité gastrique débouchent à l'extérieur, et par conséquent donne la formation de nouveaux oscules (figure 1).

2- Stade sycon :

La cavité gastro-vasculaire émet des digitations où se localisent les choanocytes, il s'agit des chambres vibratiles, le reste de la cavité est tapissée par des pinacocytes, et la structure est dite hétérocère. Une couche moyenne entoure les digitations ce qui la rend épaisse et dans celle-ci se creuse un système de canaux mettant en relation les pores inhalants et exhalants et les chambres vibratiles qui s'ouvrent directement dans la cavité gastrique. (figure2).

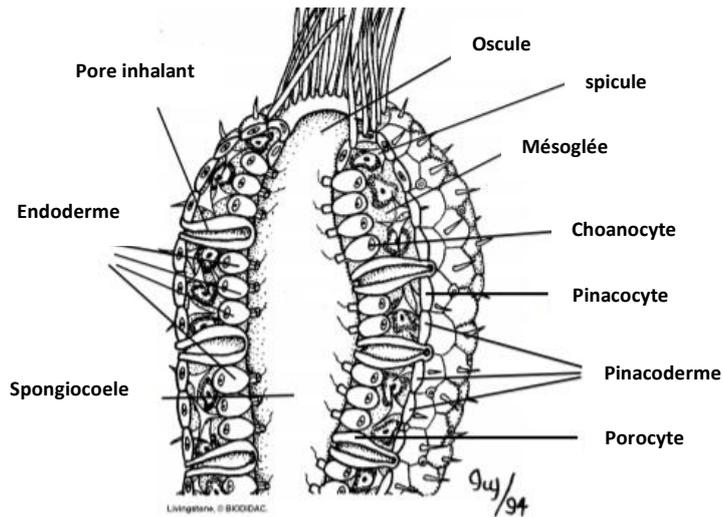


Figure 1: Organisation d'une éponge calcaire de type Ascon (Quintin., 2001).

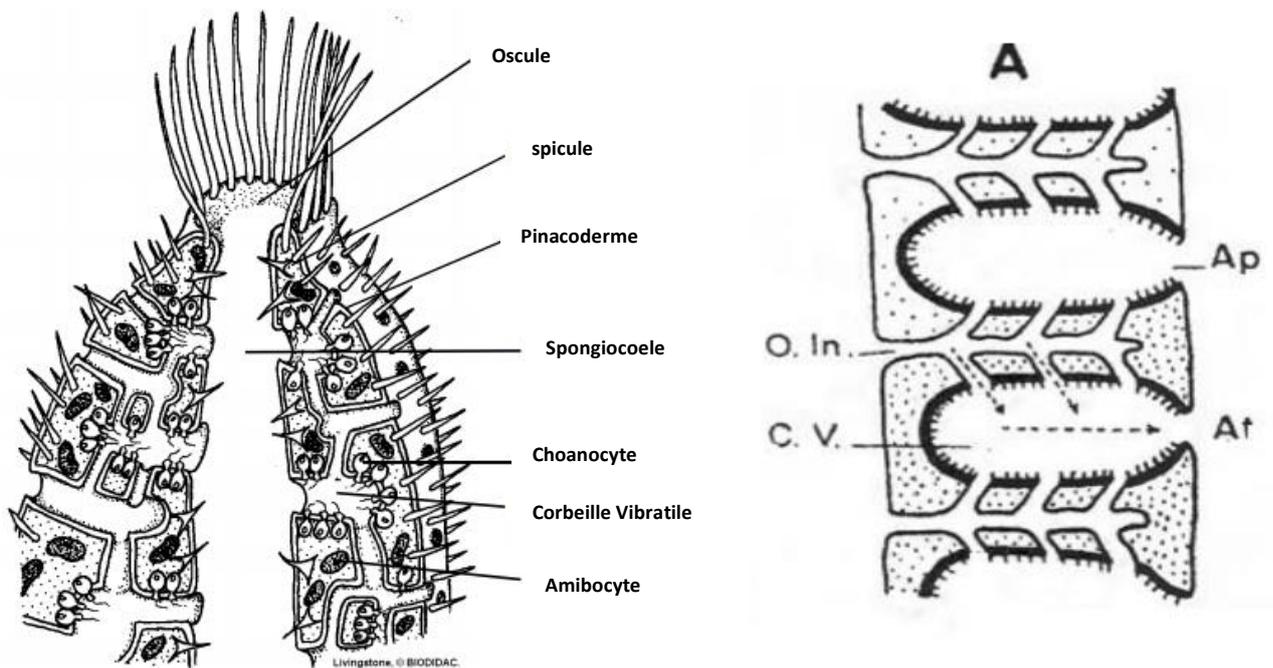


Figure 2: Organisation d'une éponge calcaire de type Sycon (Quintin., 2001)

At : atrium; Ap :apopyle; Cv : corbeille vibratile; O. in: orifice inhalant

- 3- **Stade Leucon** : ce sont les plus évoluées, La paroi est encore plus épaisse, et les chambres vibratiles se sont subdivisées en petites corbeilles vibratiles groupées dans lesquelles on peut trouver les choanocytes (comme chez les éponges *syconoïdes*) (figure3).

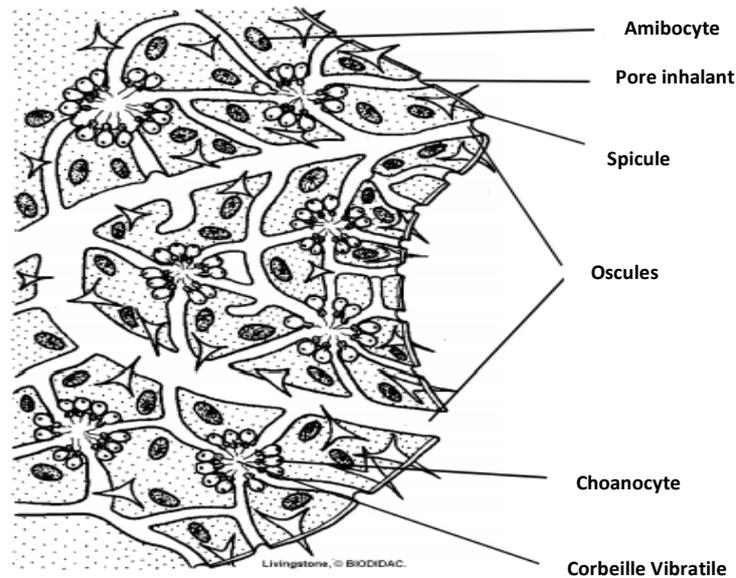


Figure 3: Organisation d'une éponge de type Leucon (Quintin., 2001)

I.4.2. Les hexactinellides ou éponges de verre (Schmidt, 1870)

Elles constituent 7 % des espèces de spongiaires. Ce sont plutôt des animaux des mers chaudes, vivant à des profondeurs importantes (entre 500 à 5000 m), elles sont dotées de spicules en silice creux et en forme d'étoile à 6 branches (qui sont à l'origine du nom hexactinellides). Certaines éponges sont de très grande taille et peuvent posséder des spicules de près de 60 cm de long et de plus d'un centimètre de diamètre.

I.4.3. Les démosponges (Sollas, 1885)

Elles représentent environ 85 % des espèces de ce phylum et sont présentes dans les différents milieux, de la zone de balancement des marées jusqu'aux abysses (8600m). Les spicules de ces éponges sont constitués de silice hydratée (opale) comme ils peuvent avoir des spicules siliceux et/ou des fibres de spongine.

II. Symbiose spongiaires-microorganismes marins :

II.1. Mode d'acquisition des microorganismes symbiotiques :

La symbiose peut être définie comme étant l'association spécifique et durable de 2 ou plusieurs espèces différentes, indépendamment des bénéfices/inconvénients tirés par chacun des partenaires. Les partenaires de la symbiose sont appelés l'hôte et le(s) symbionte(s). L'association des partenaires est nommée holobionte (**Croue ., 2001**).

Les éponges marines (phylum porifera) sont des organismes hôtes très fertiles avec une variété de micro-organismes symbiotiques qui représentent jusqu'à 40 % de leur volume. Il peut s'agir de bactéries (**Yoo kyung lee.,2001**), (**Hentschel et al 2001 ; Santavy et al 1990**), mais aussi de cyanobactéries (**Thacker et Starnes 2003 ; Arillo et al 1993**), d'algues unicellulaires (**Wilkinson., 1992**), et de champignons (**Maldonado et al 2005 ; Holler et al 2000**). Ils leur fournissent une nutrition complémentaire (**Vacelet et Donadey, 1977 ; Wilkinson, 1983 ; Arillo et al., 1993 ; Yahel et al., 2003 ; Freeman et Thacker, 2011**), en produisant des métabolites secondaires (**Flatt et al., 2005**). Ils améliorent également la rigidité du squelette de l'éponge (**Wilkinson et al., 1981**) et offrent une protection contre le rayonnement solaire ultraviolet (**Regoli et al., 2000**) . **Levi et Porte (1962)** ont été les premiers à identifier les particules granulaires présentes dans le mésohyl⁵ spongieux comme étant des cellules microbiennes.

La symbiose entre les éponges marines et les microorganismes peut être acquise par 2 principaux modes : par transmission verticale via les gamètes ou les embryons à partir de l'éponge parents (**Buchner., 1965; Mira et Moran., 2002**) alors que la transmission horizontale se produit habituellement à travers un stade de vie libre du symbionte et est souvent représentée comme une acquisition environnementale d'un symbionte (**Nyholm et McFall-Ngai, 2004; Heath et Tiffin, 2009**). Un mélange des deux principaux modes de transmission peut être appelé « transmission verticale par fuite », où les symbiotes sont transmis verticalement par l'intermédiaire de gamètes ou d'embryons et sont également acquis de l'environnement (**Vrijenhoek, 2010**), Chacun de ces modes de transmission présente des avantages et des inconvénients différents en termes de cycle de vie (**Ewald., 1987**).

⁵ **Mésohyl** : une matrice gélatineuse à l'intérieur d'une éponge, remplissant l'espace entre le pinacoderme externe et le choanoderme interne.

D'autre part, une éponge hôte peut posséder divers symbiotes, Par exemple *Theonella swinhoei* abrite une bactérie unicellulaire hétérotrophique, une cyanobactérie unicellulaire, et une bactérie filamenteuse hétérotrophique au même temps (Bewley *et al.*1996), une autre éponge qui appartient au *Aplysina* abrite une bactérie hétérogène *Bacillus sp* ; *Micrococcus sp* ; *Arthrobacter sp* ; *Vibrio sp* ; *Pseudoalteromonas sp...etc.* (Hentschel, U *et al.*, 2001).

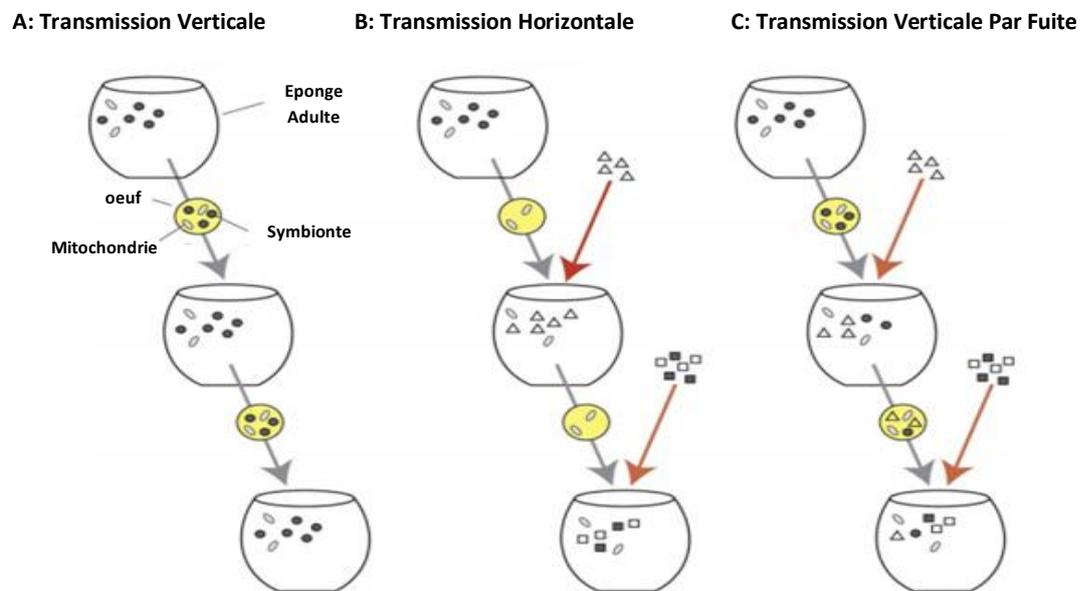


Figure 4: Mode de transmission des symbiotes microbiennes par une éponge hypothétique (Thacker & Freeman., 2012)

II.2. Localisation des microorganismes symbiotiques :

Chaque microorganisme semble avoir une localisation spécifique dans l'éponge hôte : extra et intra cellulaire. Les extracellulaires se localisent généralement dans la couche externe de l'éponges hôtes comme exo- symbiontes ou dans le mésohyl comme intra -symbiontes (Haygood *et al* 1999 ; Sumich., 1992). Cependant les intracellulaires ou les intranucléaire se trouve en permanence dans les cellules (chez *Pétrosia ficiformis* dans les bactériocytes) et dans le noyau (chez *Aplysina aerophoba*) de l'hôte (Flowers *et al* 1998 ; Friedrich *et al* 1999 ; Vacelet *et al* 1977).

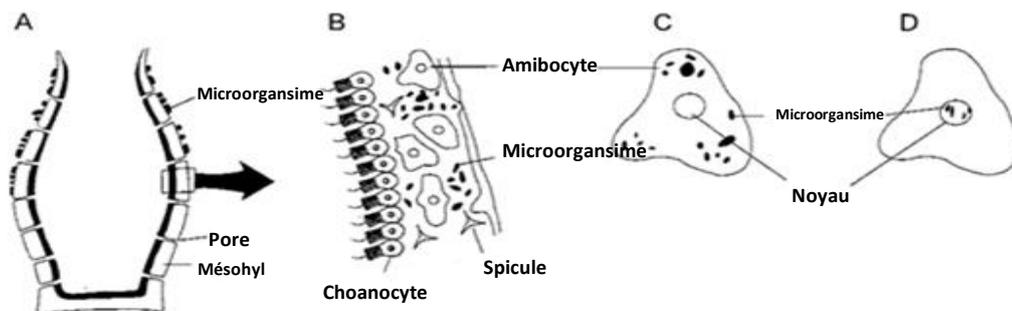


Figure 5: Localisation des microorganismes symbiotiques au sein des spongiaires (Lee et al., 2001).

A : Exosymbiose extracellulaire.

B : Endosymbiose extracellulaire

C : Symbiose intracellulaire

D : Symbiose intranucléaire

II.3. Abondance des microorganismes symbiotiques :

Les éponges sont d'anciens *Metazoa* évolutionnaires, les premiers organismes multicellulaires sur l'arbre de vie, Ils peuvent abriter de grandes quantités et une grande diversité microbienne (Taylor et al., 2007).

Des études de microscopie subséquentes ont systématiquement étudié la présence de bactéries chez les éponges, et ils se sont rendu compte qu'il existait des différences dans l'abondance microbienne entre les éponges (Reiswig, 1974 ; Vacelet et Donadey., 1977 ; Wilkinson., 1978).

Les éponges associées à de nombreux microorganismes ont été appelées « éponges bactériennes » ou « bactérisponges » (Reiswig., 1981) et plus tard « éponges à abondance microbienne élevée (HMA) » (Hentschel et al., 2003).

Dans l'une de ces premières études, la concentration microbienne de l'éponge *Aplysina fistularis* était d'environ 8×10^{10} cellules par mL de tissu, soit 20 % du volume total de l'échantillon (Reiswig, 1981). Ce nombre extraordinairement élevé de microorganismes a par la suite été confirmé pour d'autres éponges HMA (dans une gamme de 10^8 à 10^{10} bactéries par g ou ml de tissu). En revanche, les éponges « à faible abondance microbienne » LMA éponges ont des microbes $\leq 10^6$ par g de poids humide des éponges (Hentschel et al., 2003).

Les éponges LMA et HMA diffèrent non seulement en abondance microbienne, mais aussi en diversité microbienne. Weisz et al (2007) ont utilisé le microscope électronique à transmission (MET) pour identifier deux éponges HMA et une éponge LMA des Caraïbes. L'analyse d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) a révélé de multiples bandes chez les éponges HMA, un bon nombre de ces séquences de gènes respectifs d'ARNr 16S étaient étroitement liées aux séquences précédemment dérivées de l'éponge.

Alors que, la DGGE de l'éponge LMA a donné lieu à quelques bandes et la séquence du gène de l'ARNr 16S de la bande la plus dominante a montré une grande affinité avec les bactéries d'origine marine (Weisz et al., 2007). Une différence évidente dans la diversité bactérienne a également été observée dans une étude de la bibliothèque de clones utilisant l'éponge HMA *Ancorina alata* et l'éponge LMA *Polymastia sp* (Kamke et coll., 2010), l'analyse d'un nombre similaire de séquences de gènes d'ARNr 16S provenant des deux éponges a révélé la présence de huit phylas dans l'éponge HMA, mais seulement deux phylas dans l'éponge LMA.

II.4. Intérêt de la symbiose :

Les micro-organismes marins sont d'un grand intérêt comme source prometteuse de produits chimiquement intéressants et de métabolites secondaires actives. Les conditions chimiques et physiques dans le milieu marin et la pression intense exercée par les concurrents, (les prédateurs et les pathogènes) ont donné lieu à la production d'un large éventail de métabolites secondaires chimiquement diversifiés, dont certains sont considérés comme des composés phares très importants pour le développement de médicaments. Plus de 40 000 produits naturels marins ont été identifiés à partir de divers organismes marins, notamment les microorganismes qui sont avérées être la véritable origine de ces molécules bioactifs (**Liu et al., 2019**).

Le phylum de spongiaire fournit plus du tiers des molécules nouvelles isolées, 5 300 composés naturels différents ont été découverts à partir d'éponges et de leurs micro-organismes associés, et chaque année plusieurs centaines de nouveaux composés sont ajoutés (**Tableau 1**) (**John et coll., 2010; Keyzers et Coleman., 2005; Taylor et coll., 2007; Webster et Taylor., 2011**).

Tableau I: Exemples des éponges et leur produit naturel ayant des activités biologiques (Yoo Kyung Lee *et al.*, 2001)

Eponge	Composé bioactive	Activité biologique
<i>Acanthella sp.</i>	Kalihinol-A	Antibiotique
<i>Agelas dispar</i>	Aminozyoonemonin	Antibactérien
<i>Agelas dispar</i>	Pyridinebetaine A	Antibactérien
<i>Agelas mauritiana</i>	Agelasimine	Cytotoxique
<i>Agelas mauritiana</i>	Sceptrin	Antimicrobien
<i>Agelas nakamurai</i>	Ageliférine	Antibactérien
<i>Agelas nakamurai</i>	Debromosceptrin	Antibactérien
<i>Agelas novaecaledoniae</i>	Ageliférine	Somatostatine/inhibiteur VIP
<i>Agelas novaecaledoniae</i>	Sceptrin	Somatostatine/inhibiteur VIP
<i>Agelas novaecaledoniae</i>	Xestospongine B	Somatostatine/inhibiteur VIP
<i>Agelas sp.</i>	Agelasine	Anti leucémique
<i>Agelas sp.</i>	Agelasine F	Antituberculeux
<i>Agelas sp.</i>	Agelasine I	Antimicrobien
<i>Amphimedon sp.</i>	Pyridodémine	Cytotoxique
<i>Aplysina aerophoba</i>	Aeropylsinine I	Cytotoxique
<i>Batzella sp.</i>	Discorhabdin	Cytotoxique, inhibiteur enzymatique
<i>Batzella sp.</i>	Secobatzelline	Inhibiteur de phosphatase
<i>Crella sp.</i>	Crellastatins	Cytotoxique
<i>Corticium sp.</i>	Meridine	Antifongique
<i>Cymbastela sp.</i>	Agelastatins C, D	Insecticide
<i>Dysidea sp.</i>	Furodysinin	Antiparasitaire
<i>Echinoclathria sp.</i>	Echinoclathrines	Immunosuppresseur
<i>Fascaplysinopsis reticulata</i>	β -carbolicium salt	Antiparasitaire
<i>Haliclona sp.</i>	Manzamine A	Antitumorale
<i>Hyrtios erecta</i>	Heteronemin	Antiparasitaire
<i>Ianthella sp.</i>	34-sulfatobastadin 13	Inhibiteur du récepteur endothéline A
<i>Jaspis johnstoni</i>	Toyocamycin	Cytotoxique
<i>Latrunculia magnifica</i>	Latrunculin A	Neurotoxine
<i>Neosiphonia superstes</i>	Sphinxolides	Cytotoxique
<i>Notodoris citrina-leucetta chagosensis</i>	Naamidines & naamines	Antiparasitaire
<i>Psammaphysilla crassa</i>	Purealin	Antiparasitaire
<i>Psammaphysilla purpurea</i>	Purealidin A	Cytotoxique
<i>Reniera cratera</i>	Dorimidazole A	Antiparasitaire
<i>Rhaphisia lacazei</i>	Topsentins	Antiprolifératif
<i>Spongia sp.</i>	Spongianolide	Cytotoxique
<i>Tedania digitata</i>	1-méthylisoguanosine	Effecteur cardiovasculaire
<i>Verongia aerophoba</i>	Dienone	Cytotoxique
<i>Xestospongia sp.</i>	Xestoaminol A	Antiparasitaire

III. Valorisation et Exploitation des éponges marines dans différents secteurs :

Les microorganismes marins isolés pour la première fois dans le milieu marin au siècle dernier sont une autre source importante de composés naturels actifs. Cependant, nous nous intéresserons aux molécules bioactives produites par les microorganismes qui vivent en symbiose avec les éponges marines.

Plusieurs expériences ont montré que ces composés sont largement utilisés dans différents secteurs notamment dans :

III.1. Le secteur Médicale :

La relation entre les éponges et les médicaments remonte aux médecins alexandrins et a été décrite en détail par l'historien romain **Plinius**. Il a recommandé l'utilisation d'éponges contre les coups de soleil, et ils ont été utilisés contre toutes sortes de blessures, fractures osseuses, hydropisie, maux d'estomac, maladies infectieuses, tumeurs testiculaires (**Hofrichter et Sidri, 2001**), ou même comme implants après des opérations mammaires (**Arndt., 1938**).

Depuis le 18^{ème} siècle, les médecins russes, ukrainiens et polonais ont utilisé une éponge d'eau douce qu'ils appelaient **Badiaga** pour le traitement des patients (**Nozeman., 1788**), la poudre sèche de cette éponge est frottée sur la poitrine ou le dos des patients atteints de maladies pulmonaires ou sur les endroits douloureux en cas de douleurs aux pieds et aux jambes : comme les rhumatismes (**Schroder., 1942**).

L'intérêt pharmaceutique pour les éponges a été suscité au début des années 1950 par la découverte d'un nucléoside « spongothymidine » et « spongouridine » de l'éponge marine ***Cryptotethia crypta*** (**Bergmann et Feeney., 1950, 1951**). Ces nucléosides ont servi de base à la synthèse de l'**Ara-C** (**figure 7**), le premier agent anticancéreux d'origine marine, et du médicament antiviral **Ara-A**(**figure 6**) (**Proksch et coll., 2002**). L'Ara-C est actuellement utilisé dans le traitement de routine des patients atteints de leucémie et de lymphome. Un de ses dérivés fluorés a également été approuvé pour les patients atteints de cancer du pancréas, du sein, de la vessie et du poumon (**Schwartzmann., 2000**).

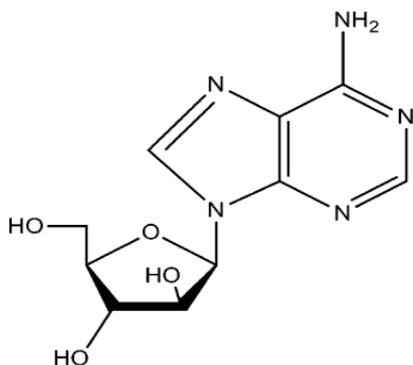


Figure 6: structure de l'Ara-A (spongothymidine) (Kim & Dewapriya., 2012)

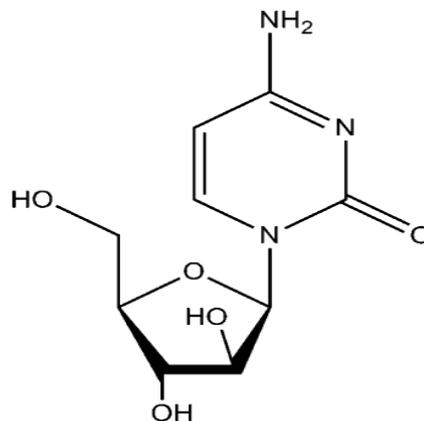


Figure 7: structure de l'Ara-C (cytarabine) (Kim & Dewapriya., 2012)

La plupart des composés bioactifs des éponges peuvent être classés comme anti-inflammatoires, antitumoraux, antibiotiques, antioxydants, des cytotoxiques.....etc.

Par exemple, *Alteramide A* un alcaloïde tétracyclique cytotoxique synthétisé par la bactérie *Alteromonas sp* associée à l'éponge *Halichondria okadai* (Shigemori et al., 1992).

De plus, Des antibiotiques polybromés isolés de l'éponge *Dysidea herbacea* synthétisés par des cyanobactéries filamenteuses endosymbiotiques appartenant à l'espèce *Oscillatoria spongilae* (Unson et Faulkner, 1993 ; Unson et al., 1994), Ou encore des métabolites antitumoraux **onnamide** et **théopédérine** synthétisés par un micro-organisme associé à l'éponge *Theonella swinhoei* (Bewley et al., 1996 ; Piel et al., 2004).

Aussi, Les polycétides aromatiques isolés du champignon marin (*Aspergillus versicolor*) dérivé de l'éponge *Petrosia sp* de l'île de Jeju-coree ont montré une capacité antioxydante beaucoup plus élevée que celle de l'hydroxytoluène butylé (Li et coll., 2011).

Sugiyama et al. (2009) ont signalé que les levures dérivées d'éponge marine *Halichondria okadai* sont capables de produire des dérivés d'indole antioxydantes. Ces résultats ont été très attrayants car ces microbes sont cultivables, et il y a une possibilité de production à grande échelle.

Aussi, deux nouvelles trichothécènes : **3-hydroxyroridin E (1)** et **130 - acetyltrichoverrin B (2)** isolés de *Myrothecium verrucaria* associée à l'éponge *Spongia sp.* (**Coll. No. 97103**) collectés sur la côte de Maui, HI, USA ont montré une cytotoxicité potentielle contre la leucémie lymphocytaire murine L1210 et les lignées cellulaires de tumeur du côlon humain H116 (**Amagata et al., 2003**).

En outre, une étude chimique sur un champignon d'origine marine *Aspergillus ustus* associé à l'éponge *Suberites domuncula* (prélevée dans la mer Adriatique) a conduit à l'isolement de deux nouveaux **drimanes sesquiterpenoïdes** (3 et 4) (**figure 8**). Les résultats des essais biologiques ont indiqué que ces sesquiterpènes présentaient un effet inhibiteur puissant sur les lignées cellulaires tumorales L5178Y, HeLa et PC12 avec des valeurs de la demi-concentration efficace maximale (CE_{50}) dont les valeurs varient entre 0,6 à 5,3 $\mu\text{g/mL}$ (**Liu et al., 2009**).

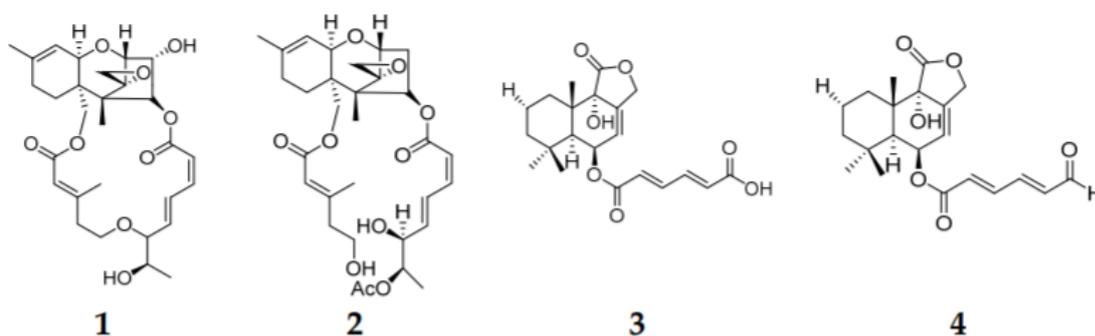


Figure 8: Structures chimiques des composés de 1-4 (Zhang et al., 2017).

Tableau II: Eponges et leur micro-organismes associés sources de produits naturels bioactifs (Lee et al., 2001).

Produit naturel	Microorganisme symbiotique	Eponge
Theonegramide	<i>Bactéries filamenteuses</i>	<i>Aciculites orientalis</i>
NC	<i>B, Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Antarctic sponge</i>
NC	<i>B, Arthrobacter sp</i>	<i>Aplysina sp.</i>
NC	<i>B, Bacillus sp</i>	<i>Aplysina sp.</i>
NC	<i>B, Micrococcus sp</i>	<i>Aplysina sp.</i>
NC	<i>B, Pseudoalteromonas sp</i>	<i>Aplysina sp.</i>
NC	<i>B, Vibrio sp</i>	<i>Aplysina sp.</i>
NC	<i>Archeon</i>	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>
métabolites Chlorinates	<i>Cyanobactérie</i>	<i>Dysidea herbacea</i>
Ethers-diphényliques polybromés	<i>C, Oscillatoria spongelliae</i>	<i>Dysidea herbacea</i>
Ethers biphényliques bromés	<i>B, Vibrio sp</i>	<i>Dysidea sp.</i>
Alteramide A	<i>B, Alteromonas sp</i>	<i>Halichondria okadai</i>
Composés neuroactifs	<i>B, Antarcticum vesiculatum</i>	<i>Halichondria panicea</i>
NC	<i>B, Pseudomonas insolita</i>	<i>Halichondria panicea</i>
NC	<i>B, Rhodobacter sp.</i>	<i>Halichondria panicea</i>
Composés neuroactifs	<i>B, Psychroserpens burtonensis</i>	<i>Halichondria panicea</i>
Composés antimicrobiennes	<i>B, Pseudomonas sp.</i>	<i>Homophymia sp.</i>
NC	<i>B, Vibrio sp</i>	<i>Hyatella sp.</i>
NC	<i>A, Actinobacteria sp.</i>	<i>Rhopaloeides odorabile</i>
NC	<i>B, Cytophaga sp.</i>	<i>Rhopaloeides odorabile</i>
NC	<i>Green sulfur bacteria</i>	<i>Rhopaloeides odorabile</i>
NC	<i>R, Ceratodictyon spongiosum</i>	<i>Sigmatocia symbiotica</i>
NC	<i>B, Pseudomonas sp</i>	<i>Suberea creba</i>
Quinolones	<i>B, Pseudomonas sp.</i>	<i>Suberea creba</i>
Diketopiperazines	<i>B, Micrococcus sp</i>	<i>Tedania ignis</i>

NC	<i>C, Aphanocapsa feldmanni</i>	<i>Theonella swinhoei</i>
Theopalauamide	<i>Filamentous bacteria</i>	<i>Theonella swinhoei</i>
Swinholide A	<i>Unicellular bacteria</i>	<i>Theonella swinhoei</i>
Urauchimycins A et B	<i>A, Streptomyces sp.</i>	<i>Eponge non identifiée</i>
NC	<i>B, Aeromonas sp.</i>	<i>Verongia sp.</i>
NC	<i>B, Pseudomonas sp.</i>	<i>Verongia sp.</i>
Composés antimicrobiennes	<i>B, Micrococcus luteus</i>	<i>Xestospongia sp.</i>

A : actinomycète ; B : bactérie ; C : cyanobactérie ; D : Dinoflagellé ; R : algue rouge ; NC : : il n'a pas été vérifié

III.2. Le secteur industriel :

III.2.1. Dans l'industrie alimentaire :

Dans une étude menée par **Kiran et al., 2017**, la souche *Nesterenkonia sp. MSA31* isolée d'une éponge marine *Fasciospongia cavernosa* s'est avérée être le producteur de biosurfactant le plus élevé parmi les autres isolats examinés sur la base de l'indice de stabilité.

Le lipopeptide **MSA31** a été caractérisé comme « halo-alcali et biosurfactant thermotolérant » qui peut être utilisé comme émulsifiant et agent stabilisant d'émulsion dans l'industrie alimentaire. Il est non toxique et montre une activité anti-biofilm contre un pathogène alimentaire de premier plan : *S. aureus*.

La propriété d'émulsification avec l'activité antioxydante ont montré que le lipopeptide MSA31 peut être très bénéfique pour l'industrie alimentaire.

Ainsi, les muffins préparés avec ce lipopeptide montraient une couleur jaune clair, et l'attrait était presque similaire au témoin positif. Cette étude a fourni une nouvelle perspective pour l'industrie alimentaire, car l'incorporation d'émulsifiant lipopeptidique pourrait améliorer la qualité des produits alimentaires à activité antioxydante ainsi qu'une activité antibiofilm contre *S. aureus*.



Figure 9: Analyse de la couleur du muffin(Kiran et al., 2017)

A : control positif (muffin préparé avec les œufs et la levure chimique) ; B : control négatif ; C : muffin préparé en utilisant le lipopeptide (0,75%)

III.2.2. Dans l'industrie chimique :

Les enzymes microbiennes marines ont de vastes applications dans les bioindustries, un certain nombre d'enzymes comme l'amylase, la caséine, la lipase, la gélatinase ...etc. ont été découvertes à partir de microbes isolés dans des environnements marins extrêmes. Ces enzymes sont thermostables, tolérant à une gamme variée de pH et d'autres conditions difficiles requises dans les applications industrielles. La nouveauté de leur structure et de leurs caractéristiques a montré une portée prometteuse pour les chercheurs du milieu universitaire et de l'industrie.

Les α -amylases par exemple sont utilisées dans la poudre de détergents à lessive depuis 1975. Aujourd'hui, 90% des détergents liquides contiennent de l' α -amylase (**Kottwitz et al.1994**) et leur demande pour les lave-vaisselles automatiques ne cesse de croître.

Autrement, des scientifiques des deux principaux fournisseurs d'enzymes détergents **Novozymes** et **Genencore International** ont utilisé l'ingénierie des protéines pour améliorer la stabilité de blanchiment des amylases (**Svendsen et al., 1994 ; Tierny et al., 1995 ; Bisgaard-Frantzen et al., 1995**). Ils ont indépendamment remplacé les acides aminés sensibles à l'oxydation par d'autres acides aminés, il s'agit de remplacer la **méthionine** à la position 197 par **leucine** dans l'amylase de *B. licheniformis* ce qui a entraîné une amylase avec une résistance améliorée contre les composés oxydatifs.

Cette amélioration de la stabilité à l'oxydation a amélioré la stabilité durant le stockage et le rendement de l'enzyme mutante dans les formulations de détergent contenant de l'eau de Javel. **Genencore International** et **Novozyme** ont introduit ces nouveaux produits sur le marché sous les noms commerciaux Purafect OxAm® et Duramyl®, respectivement.

Tableau III: Exemples d'enzymes isolées à partir d'éponges marines et ayant des caractéristiques industrielles comparables à celles des enzymes disponibles sur le marché (de Oliveira *et al.*, 2020)

Enzyme (producteur microbien)	T_{opt} (C°)	T_{rang} (C°)	pH_{opt}	pH_{rang}	Tolérance au sel/dépendance	Enzyme commercial Comparable	Applications potentielles de enzyme microbienne spongieuse	Références
Chitinase (<i>Streptomyces sp.</i> DA11)	50	30–60	8.0	6.0–9.0	45 g‰ psu	Chitinase à partir de <i>Streptomyces griseus</i>	contrôle de Phytopathogène	Han <i>et al.</i> (2008, 2009)
Laccase Pnh_Lac1 (<i>Peniophora sp.</i> CBMAI 1063)	30	30–60	5.0	4.0–6.0	Dépendance à ASW pour la production	MetZyme® LignO™	Traitement du déchets lignocellulosique ; bioraffinerie	Mainardi <i>et al.</i> (2018), Brenelli <i>et al.</i> (2019)
Lipase (<i>Pseudomonas sp.</i> MSI057)	37	20–50	9.0	5.0–12.0	Haute production enzymatique avec NaCl 1.5 M	CalB lipase	Industries alimentaires, détergentes, pharmaceutiques, de synthèse chimique	Kiran <i>et al.</i> (2008)
Lipase Lpc53E1 (bactérie non identifiée)	40	4–60	7.0	3.0–8.0	Augmente avec le NaCl 5 M	CalB lipase	Production de biens maritimes	Selvin <i>et al.</i> (2012)
Lipase LipA (bactérie non identifiée)	40	30–55	9.0	7.0–12.0	NA	CalB lipase	Industrie des détergents et synthèse organique à médiation enzymatique	Su <i>et al.</i> (2015)
Protéase (<i>Halococcus sp.</i>)	70	20–80	7.0	3.0–13.0	activité optimale avec NaCl 3 M	Alcalase	Detergent/industrie pharmaceutique	Gaonkar and Furtado (2020)

GUGFAWS-3)								
Protéase <i>(Roseobacter sp. MMD040)</i>	50	27–50	8.0	6.0–9.0	Haute production enzymatique avec NaCl 3 M	Alcalase	Aquaculture	Shanmughapriya <i>et al.</i> (2009)
L-Asparaginase AYA-1 <i>(Aspergillus sp. ALAA 2000)</i>	47	20–70	6.0	3.0–12.0	NA	PEG-asparaginase	Industrie Pharmaceutique	Ahmed <i>et al.</i> (2015)
L-Asparaginase AYA-2 <i>(Aspergillus sp. ALAA 2000)</i>	67	20–70	10.0	3.0–12.0	NA	PEG-asparaginase	Industrie Pharmaceutique	Ahmed <i>et al.</i> (2015)

ASW : eau de mer artificiel ; NA : pas disponible ; pH opt : pH optimale ; psu : unité de salinité pratique ;
Trang : plage de température ; Topt : température optimale.

Tableau IV: Liste des composés à bioactivité positive découverts à partir d'éponges marines et de leurs associés de 2018 à 2021

(Varijakzhan et al., 2021).

Eponges marines et leur associées	Location	Composé	Classification	Activité biologique
Acanthostrongylophora ingens (Thiele, 1899)	South Sulawesi, Indonesia	epi-tetrahydrohalicyclamine B et tetrahydrohalicyclamine B, acanthocycloamine A, halicyclamine B chloromethylhalicyclamine B et diketopiperazines.	Alcaloïdes	Activité antibactérienne, réduit la production d'amyloïde β -42 et activité antikinase
Aspergillus sp., a marine fungus associated with marine sponge (not specified)	Xuwen County, China	Misszrtine A	Alcaloïdes	Activité anticancéreuse contre les cellules HL-60 et LNCap .
Cacospongia mycofijiensis (Kakou, Crews and Bakus, 1987)	'Eua, Kingdom of Tonga	Zampanolides B, C et D	Macrolide	Activités anti-prolifératives et anti-mitotoiques avec activité de stabilisation des microtubules.
Dactylspongia elegans T3 (Thiele, 1899)	North Sulawesi, Indonesia	Nakijiquinone V, illimaquinone, smenospongine et dyctioceratine C.	Sesquiterpène aminoquinone, sesquiterpène quinones et sesquiterpène hydroquinone.	Activité antibactérienne
Dactylspongia elegans T3 (Thiele, 1899)	Yongxing Island in the South China Sea	19-methoxy-dictyoceratin-A	Sesquiterpène quinones	Activité anticancéreuse contre les lignées cellulaires cancéreuses humaines DU145,

				SW1990, Huh7 et PANC-1
<i>Haliclona gracilis</i> (Miklucho-Maclay, 1870)	Shikotan Island	Gracilosulfates A, B, C, D, E, F et G	Stéroïde	Activité anti-tumorale contre le cancer de la prostate humain
<i>Fascaplysinopsis reticulata</i> (Hentschel, 1912)	Passe Bateau, Mayotte	6-bromo-8,1'-dihydro-isoplysin A et 5,6-dibromo-8,1'-dihydro-isoplysin A	Alcaloïdes dérivés du tryptophane	Activité antibactérienne contre <i>Vibrio</i> sp.
<i>Haliclona</i> sp. (Grant, 1836)	Mayotte	Osirisynes G, H et I	Polyacétylènes à longue chaîne hautement oxygénés	Activité inhibitrice de l'enzyme contre la protéasome kinase .
<i>Monascus</i> sp. (Tiegh, 1884), a marine fungus associated with the marine sponge <i>Clathria frondifera</i> (Bowerbank, 1875)	Gulf of Mannar	Monacolin X	Polykétide	Activités anti-prolifératives et anti-migratoires contre des lignées cellulaires de cancer du sein humain.
<i>Mycale</i> aff. <i>nularosette</i> (Hoshino, 1981)	Miyagi, Japan	Mycalolide A, mycalolide B and 38-hydroxymycalolide B	Macrolide	La dépolymérisation de l'actine entraîne une cytokinésie incomplète
<i>Setosphaeria</i> sp. (Leonard and Suggs, 1974), marine fungus associated with the marine sponge <i>Callyspongia</i> sp. (Duchassaing and Michelotti, 1864)	Xuwen County, China	Botryorhodines I and J	Depsidones	Activités antifongiques modérées contre les champignons phytopathogènes <i>Colletotrichum asianum</i> et <i>Colletotrichum acutatum</i> .
<i>Stylissa carteri</i> (Dendy, 1889)	Indonesia		Flavonoïde, triterpénoïde et stéroïde	Activité anticancéreuse contre le cancer du sein Lignée cellulaire MDA MB 231.

Partie Expérimentale:

1. Laboratoire d'accueil :

La partie pratique a été réalisée au niveau du laboratoire BPC de la station expérimentale de l'université Saad DAHLEB (Blida 1) durant la période s'étalant du 12 Avril au 10 juin 2021. Plusieurs contraintes logistiques ; notamment les pannes de l'autoclave et du réfrigérateur du laboratoire ainsi que le changement du responsable du dépôt des produits chimiques ont considérablement impacté notre travail.

2. Lieu et moment de l'échantillonnage :

L'échantillonnage a été réalisé, le mois de mars 2021 près des côtes de Tipaza. Le Littoral de Tipaza possède une façade maritime de près de 145,81 km.

3. Matériel :

3.1. Matériel biologique :

3.1.1. Espèces d'éponges marines présumées :

Trois types différents d'éponges marines : une éponge verte, une éponge marron et une éponge orange.

3.1.2. Les germes tests :

3.1.2.1. Les souches bactériennes de références :

Quatre souches de référence dont trois ATCC ont été utilisées. Il s'agit de :

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 19095) ;
-
- *Escherichia coli* (ATCC8739) ;
- *Bacillus subtilis* (ATCC633) ;
- *Pseudomonas aeruginosa* (CNR ISPA PS 20) ;

Les souches bactériennes ont été repiquées sur différents milieux, dont l'apparition des colonies en couleur bleue sur milieu Chromagar CCA, vertes sur Mueller Hinton, et jaunes sur milieu Chapman confirme la pureté d'*Escherichia coli* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Staphylococcus aureus* respectivement.

3.1.2.2. Les souches de champignons microscopiques :

L'activité antifongique de notre collection de souches est étudiée contre une levure et une moisissure. Il s'agit de :

- *Candida albicans* (ATCC 10231) ;
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Les souches ont été repiquées sur milieu Sabouraud dans le but de vérifier leur pureté

3.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans notre expérimentation est résumé dans l'annexe n°1.

4. Méthodes :

4.1. Echantillonnage

Trois espèces présumptives d'éponges marines ont été échantillonnées par des plongeurs professionnels à des profondeurs situées entre 16 à 20 mètres et à une distance de plusieurs Kilomètres de la cote de Tipaza. Les échantillons d'éponges sont coupés puis mis dans des bocaux en verre préalablement stérilisés avant de remonter en surface. La température de l'eau était aux alentours de 17 °C. Les échantillons (figure 10) sont ensuite transportés dans une glacière et maintenus à 4 °C jusqu'à utilisation.



Figure 10: Photo des trois éponges.

De gauche à droite les éponges A, B et C.

4.2. Isolement des souches bactériennes associées aux espèces marines :

Cette étape a pour but d'isoler des bactéries cultivables associées à nos éponges marines.

4.2.1. L'étude de l'influence de la composition des milieux de culture utilisés sur la croissance bactérienne :

Au début de notre recherche, nous avons réalisé une étude sur l'effet de la composition des milieux de culture utilisés sur la croissance bactérienne.

A cet effet, nous avons préparé des géloses et des bouillons à base d'eau de mer à concentration en sel différente.

Et effectivement, il s'est avéré que la composition des milieux de culture influe sur la croissance bactérienne, la raison pour laquelle nous avons opté pour les milieux géloses et bouillons à basse concentration en sel pour continuer nos isollements.

La composition de nos milieux de culture est détaillée dans annexe n°2.

4.2.2. Préparation des solutions mères :

Les éponges sont d'abord rincées à l'eau de mer stérile à plusieurs reprises tout en les essorant vigoureusement à la fin de chaque rinçage. Puis à l'aide d'un coton imbibé d'alcool à 70% on désinfecte délicatement leurs surfaces sans laisser s'infiltrer l'alcool. Les échantillons sont découpés par la suite avec une paire de ciseau stérile puis broyés aseptiquement à l'aide d'un mortier stérilisé. Les solutions mères sont obtenues en mettant en suspension 10 g de chaque échantillon d'éponge broyé dans 90 ml d'un bouillon nutritif à base d'eau de mer. Pour l'éponge A, qui servait pour nos premiers essais, deux solutions mères sont obtenues en fonction du bouillon nutritif à base d'eau de mer utilisé. La différence entre les deux bouillons nutritifs à base d'eau de mer, préparés par nos soins, réside dans la concentration finale en sels.

Les flacons contenant les solutions mères sont ensuite incubés, en mode statique, dans une étuve réglée à 30 °C pendant 24h.

4.2.3. Préparation des dilutions :

Après les 24 heures d'incubation, une série de dilutions décimales jusqu' à 10^{-5} est réalisée. Un ml de chaque solution mère est pipeté puis transvasé aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml d'un bouillon nutritif à base d'eau de mer. L'opération continue de la sorte pour chaque type d'éponge jusqu'au tube de la dilution la plus élevée.

4.2.4. Isolement des souches bactériennes associées aux éponges par épuisement sur milieu solide : technique des quadrants

La technique des quadrants consiste à disperser les microorganismes trouvés dans un mélange, à la surface d'un milieu solide dans le but d'obtenir des colonies séparées et permettre ainsi de les isoler. Elle permet aussi de vérifier la pureté d'une souche bactérienne.

A l'aide d'une pipette pasteur stérilisée, on dépose l'inoculum provenant de chaque dilution sur une boîte Pétri contenant une gélose nutritive (GN) à base d'eau de mer.

L'inoculum est étalé sur le premier quadrant de la boîte en stries serrées tout en évitant de revenir en arrière car l'anse risque de se recharger et l'isolement sera par conséquent moins réussi. On retourne ensuite la boîte à 90° afin d'étaler les bactéries sur le cadran suivant. L'opération est répétée avec les deux cadrans restants tout en veillant que l'anse de platine soit flambée en passant d'un quadrant à l'autre. L'incubation dure 24 heures à 30° C. Toutes les manipulations sont réalisées en respectant les règles d'asepsie

4.2.5. Purification des souches :

Après isolement, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie ayant un aspect macroscopique différent est ensemencée, à part, sur un nouveau milieu GN à base d'eau de mer puis purifiée par plusieurs repiquages successifs. La pureté des souches est contrôlée par observations microscopiques. C'est ainsi que notre collection de souches est obtenue puis conservée pour les tests ultérieurs.

4.3. Etude macroscopique et microscopique des souches bactériennes sélectionnées :

4.3.1. Etude macroscopique :

L'observation des colonies peut être d'un grand intérêt taxonomique, Il s'agit d'un examen qui se fait à l'œil nu ou à faible grossissement, Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées. Les éléments d'identification macroscopiques retenus sont :

- La forme des colonies, exemple : rondes, irrégulières.....etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre, exemple : grande, petite, punctiformes.
- La couleur de la colonie.
- L'élévation, exemple : convexe, concave, plate.
- L'opacité, exemple : opaque, translucide ou transparente.
- La surface, exemple : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.
- La consistance : colonie a consistance granuleuse ou visqueuse.
- L'odeur : présence / absence.

4.3.2. Etude microscopique :

4.3.2. Etat frais :

L'état frais permet l'observation de microorganismes vivants, la détermination de leur aspect morphologique, de leur mode groupement, de leur mobilité éventuelle et de la quantité approximative de bactérie. L'observation se fait au microscope photonique.

On dépose une goutte d'eau physiologique sur une lame de verre propre. A l'aide de l'anse de platine on apporte et on dissocie dans cette goutte l'inoculum bactérien. On recouvre la goutte d'une lamelle couvre objet et on observe immédiatement au microscope photonique en commençant par objectif x 40.

4.3.3. Observation microscopique après coloration :

4.3.3.1. Coloration simple au bleu de méthylène :

- Mettez quelques gouttes de bleu de méthylène sur le frottis correctement fixé.
- Laisser en contact 1 à 2 mn.
- Observer au microscope photonique (objectif x40).
- Ajouter une goutte d'huile à immersion sur la lame au grossissement x 1000 au microscope optique.

4.3.3.2. Coloration différentielle de Gram :

La coloration de Gram a été mise au point par **Christian Gram** en **1884**, il s'agit d'un test microbiologique classique qui permet de distinguer deux types de bactéries : les bactéries Gram (+) et les bactéries Gram (-) en se basant sur la couleur de la paroi cellulaire après avoir utilisé la méthode de la coloration. Les étapes de la coloration de Gram sont décrites dans l'annexe n°3.

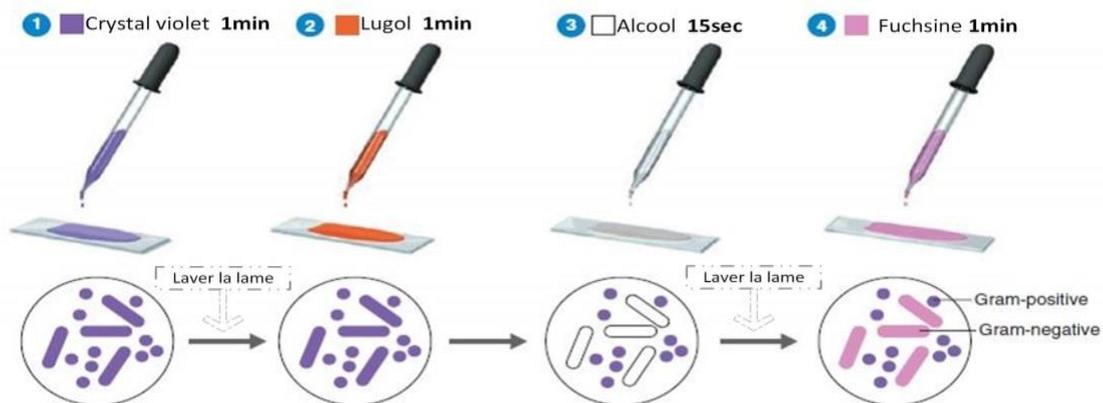


Figure 11: Protocol de coloration Gram

4.4. Recherche du type respiratoire :

Ce test est effectué selon les recommandations de **Guiraud, (1998)**. La gélose viande foie répartie en tube et régénérée par un chauffage durant 30 minutes au bain-marie bouillon. L'ensemencement est réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant des spires, de façon àensemencer uniformément le milieu sur toute la hauteur du tube. Après refroidissement, le milieu est incubé à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

Après incubation, il est possible de reconnaître 4 principaux modes de respiration (figure 12):

- **Aérobies stricts** : pour les souches qui se cultivent uniquement dans la zone superficielle du tube.
- **Anaérobies stricts** : pour les souches qui se cultivent uniquement en profondeur du tube.
- **Aérobies anaérobies facultatifs** : pour les souches qui se développent sur toute la hauteur du tube.
- **Micro-aérophiles** : pour les souches qui forment un anneau dans la zone intermédiaire aérobie-anaérobie.

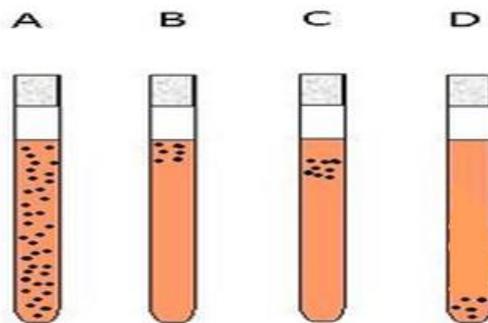


Figure 12: les différents types respiratoires des bactéries.

A : Aérobie anaérobie facultatif ; B : Aérobie strict ; C : Micro-aérophile ; D : Anaérobie strict

4.5. Recherche d'activités enzymatiques

4.5.1. Recherche d'une activité lipolytique

Les lipases sont des hydrolases qui agissent dans des conditions aqueuses sur les liaisons de carboxylester présentes dans le triacylglycérol afin de libérer les acides gras et le glycérol (Gupta *et al.*, 2004).

Pour cela, une émulsion de jaune d'œuf est préparée en mélangeant stérilement à quantités égales, le jaune d'œuf et l'eau physiologique, puis 20 ml de cette émulsion sont additionnés à 180 ml de GN préparée à base d'eau de mer, cette dernière est coulée dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les souches sont ensemencées par spots et incubées à 30 C° pendant 24H (Genta et Heluane., 2001).

- **Lecture des résultats :**

Le jaune d'œuf contient des phospholipides dont on distingue les triglycérides, les lipoprotéines, et les phosphatidyl-choline ou lécithine. Ils peuvent être mis en évidence par une lipase, une lipoprotéinase, et une lécithinase respectivement.

- **La lipoprotéinase :** la présence de cette enzyme se traduit par l'apparition d'un halo d'éclaircissement autour de la colonie suite à la dégradation des protéines du complexe lipoprotéique et qui augmente par conséquent la solubilité de ses lécithines et de ses lipides.
- **La lécithinase :** son action sur la lécithine libère la choline soluble et un triglycéride peu soluble qui précipite et qui donne naissance à une zone opaque autour de la colonie (Esselmann et Pinghui Liu., 1960).
- **La lipase :** une zone opaque floue autour de la colonie témoigne la dégradation des triglycérides et la précipitation des acides gras (De vos *et al.*, 2009).

4.5.2. Recherche d'une caséinase

La mise en évidence d'une caséinase chez les souches isolées est effectuée par ensemencement en spot sur un milieu GN à base d'eau de mer double agar additionnée à 50 % (v/v) de lait 0% matières grasses. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant les 72 heures qui suivent l'incubation à 30 C°.

- **Lecture des résultats :**

L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine par la bactérie (**Balaji et Rajasekaran., 2012**).

4.5.3. Recherche d'une amylase

Les amylases sont des enzymes capables d'hydrolyser les molécules d'amidon en polymères composés d'unités de glucose (**Souza et al., 2010**).

La présence de l'amylase est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par (**Amoozegar et al. 2003**), en utilisant la gélose nutritive préparée à base d'eau de mer additionnée à 1% (p/v) d'amidon soluble. Après incubation à 30 °C pendant 24 H, les colonies sont inondées avec une solution de lugol.

- **Lecture des résultats :**

L'hydrolyse est mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**De VOS et al., 2009**).

4.5.4. Recherche d'une activité estérase

Les estérases sont des hydrolases qui divisent les liaisons esters. Elles sont généralement classées comme Cholinestérases (y compris l'acétylcholinestérase), Carboxylestérases, et Arylestérases.

Ce test permet de révéler les souches possédant une activité estérase, il est effectué sur des boîtes de Pétri contenant une gélose nutritive à base d'eau de mer additionnée à 1% (v/v) de Tween 80 (**Gonzalez et al, 1978**). L'ensemencement des souches est effectué par la technique des spots. L'incubation se fait à 30 °C pendant 24 H à 48 H.

- **Lecture des résultats :**

Le développement d'un précipité autour du site de dépôt témoigne de l'hydrolyse de tween 80 (**Sabaou., 1980**).

4.5.5. Recherche d'une activité gélatinase

Il s'agit d'un métallo-endopeptidase ou métalloprotéinase, la gélatinase microbienne est capable d'hydrolyser la gélatine en sous-composés (polypeptides, peptides et acides aminés) qui peuvent traverser la membrane cellulaire et être utilisé par l'organisme.

Pour ce faire, des tubes contenant une gélose à base de gélatine (150g/l) sont ensemencés par piqueur centrale. L'incubation se fait par passage à l'étuve pendant 24 H à 30 C°.

- **Lecture des résultats :**

Après incubation une 1^{er} lecture est lancée, les tubes sont mises immédiatement dans le réfrigérateur a 4C° pendant 30 min :

-Si le milieu demeure liquide cela veut dire que la souche possède une gélatinase.

-Si le milieu devient solide cela veut dire que la souche ne possède pas une gélatinase.

Une deuxième lecture est procédée après 7 jours d'incubation sur paillasse.

4.6. Recherche d'activités antimicrobiennes

4.6.1. Recherche d'activités antibactériennes

L'étude de l'activité antibactérienne des souches a été testée par la technique des cylindres d'agar décrite par **Mounyr Balouiri et al (2016)** contre 3 souches de références (ATCC) et contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Des colonies bien isolées provenant de souches de références ont été transférées dans des tubes contenant du bouillon nutritif afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de 0.5 McFarland (10^8 UFC/ml). Par la suite, la surface entière de la gélose Muller Hinton est ensemencée par écouvillonnage.

À l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur stérilisée, on découpe des disques de gélose contenant les souches à tester. Puis on les dépose sur le milieu MH préalablement ensemencé par la suspension bactérienne.

Après 15 min de diffusion, les boites sont incubées dans une étuve à 30 C° pendant 24 H.

- **Lecture des résultats :**

L'activité antimicrobienne est estimée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse (**Tortorano et al ., 1979 ;Hosny et al ., 2011**).

4.6.2. Recherche d'activités antifongiques

Il s'agit d'un test qualitatif qui a pour but de vérifier la capacité de nos souches à produire des métabolites actives pouvant inhiber la croissance des champignons et ou des levures tests. Le criblage a été fait par l'antagonisme positif de nos bactéries vis-à-vis d'un champignon *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) et une levure *Candida albicans* (ATCC 10231)

Technique : Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (sur milieu Sabouraud) (**Ben abdallah et al., 2019**).

- ✓ Pour *Candida albicans* :

L'inoculum de levure est préparé par la dissociation de 2 à 3 colonies isolées âgées de 24h dans de l'eau physiologique stérile. L'inoculum est ensuiteensemencé par écouvillonnage sur un milieu Sabouraud déjà coulé. Les cylindres d'agar des bactéries à tester sont déposés. L'incubation est faite à 30° C pendant 24h.

- ✓ *Aspergillus brasiliensis* :

La souche est repiquée sur milieu Sabouraud puis incubée à 30°C pendant 3 à 4 jours. Ensuite, on dépose les cylindres d'*aspergillus* coupés à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur stérilisée au centre d'une boîte coulée préalablement avec le milieu MH ainsi que les cylindres d'agar contenant les souches à tester. L'incubation se fait à 30 ° C pendant 72 H.

La présence d'une zone d'inhibition confirme la présence d'une activité antifongique.

Résultats et Discussion:

5. Résultats et discussion :

5. 1. Isolement et purification des micro-organismes associés aux espèces marines :

Nous avons utilisé deux milieux gélosés et deux bouillons nutritifs de compositions différentes : des milieux BN et GN préparés par la dissolution de la poudre déshydratée dans de l'eau de mer (**nommés milieu GN' et BN' à base d'eau de mer**), et d'autres que nous avons préparé en dissolvant de l'extrait de viande, l'extrait de levure, le peptone, et de l'agar pour la GN dans un volume d'eau de mer (**nommés GN et BN à base d'eau de mer**).

Les milieux GN et BN nous ont permis d'isoler des souches à partir de dilutions plus élevées (jusqu'à 10^{-6}) comparés aux milieux GN' et BN' (jusqu'à 10^{-4}). Nous avons conclu que les milieux GN' et BN' du fait de leur composition en sel plus élevée inhibaient la croissance des souches symbiotiques dominantes

C'est à la base de ces résultats préliminaires que nous avons continué les isolements sur les milieux GN et BN à base d'eau de mer dans le but de récupérer un maximum de souches dominantes.

Par ailleurs, la raison pour laquelle nous avons utilisé l'eau de mer stérilisée pour la préparation de nos milieux de cultures au lieu de l'eau distillée est de garder les microéléments ainsi que les oligo-éléments contenus dans l'eau de mer et qu'on ne pourrait pas tous assurer dans la composition de nos milieux de culture.

Tableau V : La collection de souches bactériennes isolées à partir de nos éponges marines et leurs dilutions

Eponge 1	Eponge2	Eponge3
A1 (-3)	B1 (-5)	C1 (-5)
A2 (-6)	B2 (-2)	C2 (-5)
A3 (-2)	B3 (-3)	C3 (-2)
A4 (-2)	B4 (-3)	
A5 (-2)	B5 (-3)	

Cependant, notre objectif ultime était d'avoir une collection de souches d'aspects macroscopiques et microscopiques différents et non pas d'isoler tous les micro-organismes associés aux éponges marines ce qui est d'ailleurs quasi-impossible de le faire puisqu'une très grande majorité des bactéries symbiotiques ont des exigences qu'elles ne trouveront pas forcément dans la composition de nos milieux de culture. De ce fait, une collection de 13 souches bactériennes symbiotiques à nos trois éponges a été réalisée.

Autrement, il existe d'autres méthodes qui permettent l'identification de tous ces microorganismes comme la métagénomique. Afin d'étudier une communauté bactérienne dans son ensemble, il est aujourd'hui possible de séquencer l'ADN de toutes les bactéries présentes dans un milieu donné (sol, eau, tube digestif de l'homme et des animaux, échantillons cliniques...). Cette approche utilisée pour la première fois par Handelsman et coll en 1998, nous renseigne sur la diversité et l'abondance relative des micro-organismes présents.

Comparée à la métagénomique, la méthode classique utilisée dans notre étude présente beaucoup d'inconvénients parmi lesquelles on cite la composition du milieu de culture utilisé pour l'isolement et la température d'incubation des microorganismes qui influent de manière directe sur la croissance des microorganismes.

Pour tenter d'évaluer un large spectre de diversité bactérienne dans les deux éponges *A. fucorum* et *E. major*, **Margassery et al (2012)** ont pu isoler 335 souches bactériennes à partir des extraits de tissus de ces éponges qui les avaient inoculées dans 3 différents milieux le SYP-SW, le milieu de la chitine et le MMA à 18C° pendant 3-4 semaines.

Cette différence de milieux utilisés, de température, et de temps d'incubation pourrait être à l'origine des différences dans le nombre des souches isolées dans notre travail et celui des autres chercheurs.

5.2. Etudes macroscopiques des souches isolées :

Les résultats de l'étude macroscopique portant sur : l'aspect de surface, l'opacité, la taille, la consistance, la forme, et le contour des colonies sont résumées dans le tableau V.

Tableau VI: Résultats de l'étude macroscopique des souches isolées

<u>Souches</u>	<u>Aspect de surface</u>	<u>Opacité</u>	<u>Taille</u>	<u>Consistance</u>	<u>Forme</u>	<u>Contour</u>
A1	Brillant	Opaque	Grande	Crème	Irrégulière	Régulier
A2	Lisse	Transparent	Petite	Crème	Ronde	Régulier
A3	Brillant	Opaque	Grande	Crème	Ronde	Régulier
A4	Brillant	Opaque	Moyenne	Crème	Ronde	Régulier
A5	Brillant	Opaque	Moyenne	Crème	Ronde	Régulier
B1	Brillant	Opaque	Grande	Crème	Ronde	Régulier
B2	Brillant	Opaque	Petite	Crème	Ronde	Régulier
B3	Brillant	Opaque	Moyenne	Crème	Ronde	Régulier
B4	Brillant	Opaque	Moyenne	Crème	Ronde	Régulier
B5	Brillant	Opaque	Moyenne	Crème	Ronde	Régulier
C1	Sèche	Opaque	Moyenne	Sèche	Irrégulière	Irrégulier
C2	Brillant	Opaque	Petite	Crème	Ronde	Régulier
C3	Brillant	Transparent	Petite	Sèche	Ronde	Régulier

Le Tableau VI présente l'aspect macroscopique des souches isolées sur milieu GN, nous avons pu observer des colonies de différentes : tailles, formes, contours, opacités, et consistances. A titre d'exemple, la souche A2 se présente sous formes de colonies de petites tailles, rondes, contours réguliers, crèmes, lisses, et transparentes contrairement à C1 qui se manifeste par des colonies de tailles moyennes, formes irréguliers, contours irréguliers, opaque, crèmes, et sèches.

5.3. Etude microscopique des souches isolées :

- **Coloration Gram :**

D'après le test réalisé, toutes les bactéries appartiennent au groupe de bactérie Gram positive.

- **Etude de la forme des souches et leurs modes de regroupement :**

Tableau VII: Résultats de l'étude de la forme et le mode de regroupement des souches bactériennes.

Souches bactériennes	Forme	Type de regroupement
A1	Bacille	En chaine
A2	Bacille	Isolé
A3	Cocci	En amas
A4	Bacille	Isolé
A5	Bacille	Isolé
B1	Cocci	En amas
B2	Cocci	Isolé
B3	Cocci	En amas
B4	Cocci	En amas
B5	Cocci	Isolé
C1	Bacille	Isolé
C2	Bacille	En chaine
C3	Bacille avec suspicion de spores	En chaine

La coloration de Gram combinée à une observation microscopique que nous avons réalisés sur les souches ont révélé qu'il y a deux formes de cellules : des bacilles comme c'est le cas pour les souches A1, A2, A4, A5, C1, C2, et C3 et des cocci : A3, B1, B2, B3, B4, et B5, et qu'elles appartiennent toutes au groupe de bactéries Gram positive.

5.4. Type respiratoire :

Les résultats du test sur le milieu viande foie révèle que toutes les souches sont des souches Aero-anaérobie facultatives.

5.5. Résultats de recherche des activités enzymatique des souches bactériennes :

Tableau VIII : Résultats de screening enzymatique des souches isolées.

<u>Souches</u> <u>bactériennes</u>	<u>Caséinase</u>	<u>Amylase</u>	<u>Lécithinase</u>	<u>Lipase</u>	<u>Estérase</u>	<u>Gélatinase</u>	
						<u>Après 24 H</u>	<u>Après 7 jrs</u>
A1	-	-	-	+ sc	-	-	+
A2	+ 2mm	+ 1mm	-	-	+ 2mm	+	+
A3	+1mm	+ 1mm	+sc	+ sc	+1mm	-	+
A4	+2mm	-	+sc	-	+2mm	-	+
A5	+2mm	-	+1mm	-	+2mm	+	+
B1	+1mm	+ 1mm	+ 1mm	-	+1mm	-	+
B2	+3mm	+2mm	+ sc	-	-	+	+
B3	+2mm	+1mm	+ 1 mm	-	+2mm	+	+
B4	-	+2mm	+ sc	-	-	-	+
B5	-	-	+sc	-	+1mm	-	+

C1	-	+3mm	-	+ 4mm	+1mm	-	+
C2	+1mm	+1mm	-	-	+2mm	-	+
C3	-	+1mm	+ 1mm	+ 2mm	+1mm	+	+

Sc : sous colonie

La recherche des activités enzymatiques (amylase, caséinase, lipase, lécithinase, gélatinase, et estérase) chez notre collection de souches a été réalisée sur différents milieux spécifiques.

Cependant, ces tests de criblages enzymatiques ne donnent pas une mesure précise mais plutôt une appréciation souvent subjective des activités enzymatiques.

Le tableau VIII présente les résultats des activités enzymatiques trouvées chez notre collection de souches.

- **Recherche de la caséinase** : 61,53% des souches (soit 8 souches sur les 13 isolées) sont caséinase positive.

Ce résultat corrobore avec celui de **Byoung-Jun Yoon (2011)**, car il a trouvé dans son étude effectuée sur la bactérie *Aquimarina spongiae sp* isolée de l'éponge *Halichondria oshoro* de l'île de jeju- corée du sud qu'elle était capable d'hydrolyser la caséine additionnée au milieu.

Cette enzyme qui était principalement utilisée jusqu'aux années 1960 dans des applications techniques non alimentaires telles que dans le revêtement du papier, la finition du cuiretc. est utilisée au cours de ces 30 dernières années dans la production alimentaire dans le but d'améliorer la texture, les propriétés physiques des mousses.....etc.

- **Recherche de l'amylase** : 69,23% des souches (soit 9 souches bactériennes) sont amylase positive.

Mohapatra.B et al (2003) ont trouvé que 25% des bactéries provenant de *Azorica sp* (éponge) et *Sargassum sp* (algue) ont une activité amylolytique importante.

L'étude élaborée par **S. Shanmughapriya et al en 2009** a révélé que 27% des souches hétérotrophiques isolées de l'éponge marine *F. cavernosa* présentaient des zones claires autour des colonies, dont la souche MMD047 qui présentait une grande zone claire (>30 mm) autour de la colonie. La souche la plus performante qu'on a pu isoler présente le dixième de cette activité.

L'amylase est l'un des principaux enzymes utilisés dans l'industrie notamment celles d'origine microbienne grâce à sa thermo-stabilité.

Par exemple, l' α -amylase isolée à partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, et *Bacillus amyloliquefaciens* est utilisée dans l'industrie des détergents qui est considérée comme premier utilisateur de cet enzyme dont 90% des détergents liquides contiennent de l'amylase dans leurs compositions (lessives ; liquides pour la lave-vaisselle) grâce à sa forte capacité d'éliminer les taches tenaces dans des températures basses et à un pH alcalin (exemple de Détersif pour lave-vaisselle **Finish** qui contient 0,01% d'amylase dans sa composition).

De plus, il est utilisé dans l'industrie de textile au cours du processus de désencollage pour éliminer l'amidon utilisé pendant le processus de tissage afin de renforcer le fil et d'empêcher sa rupture sans pour autant endommager les fibres.

- **Recherche de la lécithinase** : 69,23% des souches (soit 9 souches bactériennes) présentent un résultat lécithinase positives.

Pseudoalteromonas phenolica isolée de l'eau de mer en 1999 par **Alim Isnansetyo et al** était lécithinase positive.

- **Recherche de la lipase** : 30,76% des souches (soit 4 souches bactériennes) possèdent une lipase.

Gopi Mohan et al (2016) ont trouvé que certaines bactéries isolées des éponges marines possèdent une lipase et qu'elles étaient capables d'hydrolyser les triglycérides.

les bactéries *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* SE3(T) et *Bacillus licheniformis*(ATCC14580 (T)) isolées à partir des éponges *Pione vastifica* et *Siphonochalina siphonella* respectivement collectés au nord de la mer rouge dans la région d'Obhur, à Djeddah, en Arabie saoudite par **Fehmida et al en 2018** ont montré une activité lipolytique par contre les souches *Vibrio caribbeanicus* ATCC BAA-2122(T) et *Pseudoalteromonas shioyasakiensis*.SE3(T) isolées des éponges *Pione vastifica* et *Siphonochalina siphonella* respectivement ne possédaient pas cette activité.

Les lipases microbiennes constituent un groupe important d'enzymes biotechnologiques en raison de la polyvalence de leurs propriétés appliquées et la facilité de leurs productions en masse.

Ils sont utilisés au cours de processus de dégraissage de cuir, car ils peuvent remplacer les tensides lors de l'élimination des graisses des peaux de bovins mais pour celles des moutons ils sont utilisés avec des tensioactifs.

La société indienne MAPs propose une gamme de lipases pour dégraissage qui fonctionnent à des pH différents (**Palkodegrease** : lipase qui fonctionne dans des conditions de pH neutre à alcalin ; **Palkodegrease AL** : fonctionne dans des conditions de pH acide).

- **Recherche de l'estérase** : 76,92% des souches (soit 10 souches isolées) présentent une estérase.

Stephen Jackson et al (2015) rapportent que les bactéries *Maribacter vacoletii* (W13M1A^T) et *Maribacter spongiicola* (W15M10^T) isolées des éponges *Suberites carnosus* et *Leucosolenia sp* respectivement de Lough Hyne, Co. Cork en Irlande ont été capable d'hydrolyser le tween 80 .

Patnayak et Sree en 2005 ont trouvé que la bactérie *Bacillus subtilis* (RRL-8) isolée de *Aurora globostellata* n'hydrolyse pas le tween 80.

Cette enzyme joue un rôle important dans la fabrication des médicaments chirale et qui sont très utilisés dans le traitement de certaines maladies.

Par exemple les estérases issues de *Trichosporon brassicae* (levure) sont largement utilisé pour la production de l'acide propionique (S)- et/ou (R)-ketoprofene [2- (3-benzoylphenyl) optiquement pure qui est très efficace dans la réduction de l'inflammation et le soulagement de la douleur résultant de l'arthrite, des coups de soleil, des menstruations et de la fièvre (**Panda et Gowrishankar., 2005**).

Les estérases sont aussi utilisées dans la production laitière, jus de fruits...etc. afin de transformer les huiles et gras de faibles valeurs en graisses plus précieuses.

Par exemple, les estérases de *Lactobacillus casei* CL96 permettent l'hydrolyse de la matière grasse du lait dans le but d'améliorer la saveur pendant la production des fromages (**Choi et Lee., 2001**).

- **Recherche de la Gélatinase :** 100% des souches isolées ont pu dégrader la gélatine additionnée à leurs milieux de culture BN.

Selvin *et al.*, 2004 ont trouvé que *Streptomyces sp* isolée de *Dendrilla nigra* de la côte sud-est de l'Inde est gélatinase positive. Même résultat a été obtenu par **Lee *et al.*, 2006**, la bactérie *Shewanella ircinia* isolée à partir de l'éponge *Ircinia dendroides* de la mer méditerranéenne en mars 2004 s'est avérée être capable d'hydrolyser la gélatine.

De nos jours, la gélatinase a reçu une attention considérable en tant que cible du développement de médicaments en raison de son rôle potentiel dans la dégradation du tissu conjonctif associée aux métastases tumorales.

Les utilisations potentielles de la gélatinase et leur forte demande nécessite la découverte de nouvelles souches de bactéries qui produisent cet enzyme avec des propriétés nouvelles et le développement de médium industriel à faible coût et des formulations d'extraction (Balan *et al.*, 2012).

En conséquence, et d'après les résultats obtenus on peut classer nos souches selon la présence ou non des enzymes recherchées selon un ordre décroissant : A3 qui possède toutes les enzymes suivie par B1 ; B3 ; et C3 avec 5 enzymes, A2 ; A4 ; A5 ; B2 ; et C2 avec 4 enzymes, B4 ; et B5 avec 3 enzymes, et A1 avec 2 enzymes seulement. Ces dernières peuvent être une source pour la production de ces enzymes et les utiliser au profit de la biotechnologie.

5.6. Etude de potentiel activités antibactériennes des souches bactériennes :

Tableau IX: Résultats des activités antibactériennes des souches isolées vis à vis de souches pathogènes de références.

<u>Souches</u> <u>bactérienne</u>	<u>Activité antibactérienne</u>			
	<i>S. aureus</i> (ATCC 19095)	<i>P. aeruginosa</i> (CNR ISPA PS 20)	<i>E. coli</i> (ATCC8739)	<i>B. subtilis</i> (ATCC633)
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	-	-	-	-
A4	-	-	-	-
A5	-	-	+9mm	-
B1	-	-	-	+14mm
B2	+ 8mm	-	-	+10mm
B3	+11mm	-	-	+12mm
B4	+14mm	-	-	+10mm
B5	+ 10mm	-	-	+10mm
C1	+16mm	-	-	+16mm
C2	+10mm	-	-	-
C3	-	-	-	-

Nos souches d'origine marine ont été testées *in vitro* pour évaluer leurs activités antibactériennes. Ces dernières se comportent différemment vis-à-vis des souches pathogènes.

D'après les résultats obtenus, les meilleures activités antibactériennes ont été enregistrées par 46.15% de nos souches contre *S.aureus* et *B.subtillis*. Seulement 07.69% de nos souches sont actives contre *E.coli*. Cependant, aucune activité contre *P.aeruginosa* n'a été enregistrée. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 9 et 16mm.

Par comparaison avec **Zeng et al., 2013** qui ont trouvé que les souches isolées à partir de l'éponge marine *Tedania anhelans* de l'île de Gulangyu en Avril 2008 (B12 et B13) montraient une forte activité ; soit une zone de **6 mm** contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, nous pouvons dire que nos souches sont bien plus performantes puisqu'elles montrent des activités antibactériennes plus importantes avec des zones d'inhibition allant de **9mm** jusqu'au **16 mm**.

D'autres travaux ont montré que certaines souches symbiotiques aux éponges marines ont une activité intéressante contre *Pseudomonas aeruginosa* à l'instar des travaux de **Selvin et al., 2004**. Ces derniers ont trouvé que la souche BTL7 isolée de *Dendrilla nigra* a pu résister contre *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC741) mais aussi contre beaucoup d'autres comme *Micrococcus luteus* (MTCC106), *Bacillus cereus* (MTCC430), *E. coli* (MTCC40), *Salmonella typhi* (MTCC733), *Staphylococcus aureus* (MTCC87), *Vibrio fisheri* (MTCC1738), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC530), *B. subtilus* (MTCC441) et *Clostridium botulinum* (MTCC1215).

5.7. Résultats des activités antifongiques des souches bactériennes :

Tableau X: Résultats de l'activité antifongique des souches isolées des éponges marines vis à vis de *Candida albicans* et d'*Aspergillus brasiliensis*

<u>Souches bactériennes</u>	<u>Activité antifongique</u>	
	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	<i>A. brasiliensis</i> (ATCC 16404)
A1	-	-
A2	-	-
A3	-	-
A4	-	-
A5	-	-
B1	+ 8mm	-
B2	+6mm	-
B3	+ 7mm	-
B4	+ 8mm	-
B5	+ 11mm	-
C1	-	-
C2	-	+22mm
C3	-	-

Quant à l'activité antifongique, 38,46% des souches ont marqué des activités contre *C.albicans* avec des zones d'inhibition allant de 6 à 11 mm. Tandis que 07,69% seulement (soit 1 souche) a marqué une activité contre *A.brasiliensis*, dont le diamètre de la zone est 22mm.

Une étude antérieure a montré que la bactérie **EA 329** isolée de l'éponge *Siphonochalina siphonella* a montré des activités antifongiques assez importante contre *Phytophthora capsici* et *Pythium ultimum* avec des zones d'inhibition dont le diamètre varie entre 10 à 12mm, tandis que la bactérie **EA 269** isolée de l'éponge *Pione vastifica* a montré une activité antifongique seulement contre *Pythium ultimum* avec un diamètre d'inhibition variant entre 7 à 9 mm (Bibi *et al.*, 2018).

Conclusion :

Les micro-organismes marins sont d'un grand intérêt comme source prometteuse de produits chimiquement intéressants et de métabolites secondaires bioactifs.

Dans notre présente étude, nous avons testé la capacité de nos souches bactériennes isolées à partir de 3 éponges marines à synthétiser des molécules bioactives pouvant apporter une source naturelle de métabolites trouvant ainsi leurs applications dans divers domaines de la biotechnologie.

D'après nos résultats, la plupart de nos souches ont montré un résultat positif pour toutes les enzymes testées dont 100% sont dotées d'une gélatinase, près de 76,92% ont une estérase, 69,23% possèdent une amylase et une lécithinase, 61,53% présentent une caséinase, et 30,76% une lipase.

Quant à l'activité antibactérienne ; elle a permis de sélectionner 13 souches dotées d'activité contre les germes *B.subtilis* (46,15%) ; *S.aureaus* (46,15%) ; et *E.coli* (7,69%) avec des zones d'inhibition dont le diamètre varie entre 8mm et 16mm.

L'étude de l'activité antifongique nous a permis de sélectionner 6 souches bactériennes qui présentent un antagonisme vis-à-vis de *C.albicans* (38,46%) et *A.brasiliensis* (7,69%) avec des rayons d'inhibition assez important allant de 6mm jusqu'à 22mm.

Ces résultats confirment la capacité de ces micro-organismes symbiotiques à synthétiser des métabolites secondaires bioactifs dotés notamment de propriétés antibactériennes et antifongiques.

En perspective, des recherches supplémentaires doivent être menées afin de :

- Identifier toutes les souches bactériennes isolées et les espèces d'éponges par le biais de techniques de biologie moléculaire.
- Purifier et caractériser les enzymes mis en évidence et optimiser leur production.
- Purifier et caractériser les molécules antibactériennes et antifongiques et optimiser leur production.

Références Bibliographiques :

- Abad, M. J., Bedoya, L. M., & Bermejo, P. (2008). Natural Marine Anti-inflammatory Products. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(8), 740-754. <https://doi.org/10.2174/138955708784912148>
- Adrian, T. E. (2007). Novel Marine-Derived Anti-Cancer Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 13(33), 3417-3426.
- Balan, S. S., Nethaji, R., Sankar, S., & Jayalakshmi, S. (2012). Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3, Supplement), S1811-S1816. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60500-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60500-0)
- Balouri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Belkadi, Z., Koliai, Y. (2016). Isolement de bactéries rhizosphériques à activité antagoniste et essai dans le biocontrôle de *Botrytis cinerea* sur la tomate
- Bent Mohamed, A et mint Sidi Baba, A. (2008). MANUEL DE TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE. UNIVERSITE DE NOUAKCHOTT ; FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES ; DEPARTEMENT DE BIOLOGIE. Page 13-14
- Ben Abdallah, R., Frikha, D., Maalej, S., et Sassi, S. (2019). Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines.
- Bibi, F., Alvi, S. A., Al-Sofyani, A., Yasir, M., Kensarah, E. A., & Azhar, E. I. (2018). Two marine sponges-associated cultivable bacteria: Diversity and biological activities. *Genetics and Molecular Research*, 17(2). <https://doi.org/10.4238/gmr16039910>
- Choi, Y.-J., & Lee, B. (2001). Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(1), 59-63. <https://doi.org/10.1007/s004490100233>
- Croué, J. (s. d.). *Bactéries associées à l'éponge Méditerranéenne Crambe crambe : Diversité et possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques*. 229.
- De Oliveira, B. F. R., Carr, C. M., Dobson, A. D. W., & Laport, M. S. (2020). Harnessing the sponge microbiome for industrial biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(19), 8131-8154. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10817-3>

- Djenane Zahia. (2012). Criblage de souches autochtones de Bacillus en vue de la mise en évidence des molécules actives présentant un intérêt en biotechnologie industrielle et santé.
- Espinel-Ingroff, A., Arthington-Skaggs, B., Iqbal, N., Ellis, D., Pfaller, M., Messer, S., Rinaldi, M., Fothergill, A., Gibbs, D., & Wang, A. (2007). Multicenter Evaluation of a New Disk Agar Diffusion Method for Susceptibility Testing of Filamentous Fungi with Voriconazole, Posaconazole, Itraconazole, Amphotericin B, and Caspofungin. *Journal of clinical microbiology*, 45, 1811-1820. <https://doi.org/10.1128/JCM.00134-07>
- Esselmann, M. T., & Liu, P. V. (1961). LECITHINASE PRODUCTION BY GRAM-NEGATIVE BACTERIA. *Journal of Bacteriology*, 81(6), 939-945. <https://doi.org/10.1128/jb.81.6.939-945.1961>
- Giles, E. C., Kamke, J., Moitinho-Silva, L., Taylor, M. W., Hentschel, U., Ravasi, T., & Schmitt, S. (2013). Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(1), 232-241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01467.x>
- Guezennec, J., Chalkadiakis, E., Lerat, E., Lerat, L. (2014). Bactéries marines et biotechnologie
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases : A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- Hammou-Tani, S. (2017). Identification des bactéries formant dans le lait de vache pasteurisé
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- Isnansetyo, A., & Kamei, Y. (2003). Pseudoalteromonas phenolica sp. Nov., a novel marine bacterium that produces phenolic anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus substances. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 583-588. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02431-0>

- Jackson, S. A., Kennedy, J., Morrissey, J. P., O’Gara, F., & Dobson, A. D. W. Y. 2015. (s. d.). *Maribacter spongiicola* sp. Nov. And *Maribacter vacetii* sp. Nov., isolated from marine sponges, and emended description of the genus *Maribacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_7), 2097-2103. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000224>
- Kim, S., & Dewapriya, P. (2012). Bioactive Compounds from Marine Sponges and Their Symbiotic Microbes. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 65, p. 137-151). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00008-1>
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Priyadharsini, G. B., Poulouse, N., & Selvin, J. (2017a). Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia* sp. And Its Application in Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01138>
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Priyadharsini, G. B., Poulouse, N., & Selvin, J. (2017b). Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia* sp. And Its Application in Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01138>
- Kirti patel. (2010). Extraction de métabolites bioactifs d’éponges marines du pacifique sud.
- Kobayashi, Junichi., & Ishibashi, Masami. (1993). Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chemical Reviews*, 93(5), 1753-1769. <https://doi.org/10.1021/cr00021a005>
- Laport, M., Santos, O., & Muricy, G. (2009). Marine Sponges : Potential Sources of New Antimicrobial Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 86-105. <https://doi.org/10.2174/138920109787048625>
- Larbi Daouadji Kelthoum. (2015). Isolement et caractérisation des souches productrice de lipase.
- Lavaud, M. C., Banaigs, M. B., Debitus, M. C., Martin, M. M.-T., Bodo, M. B., & Al-Mourabit, M. A. (s. d.). *Extraction de métabolites bioactifs d’éponges marines du Pacifique Sud*. 266.

- Lee, O. O., Lau, S. C. K., Tsoi, M. M. Y., Li, X., Plakhotnikova, I., Dobretsov, S., Wu, M. C. S., Wong, P.-K., Weinbauer, M., & Qian, P.-Y. 2006. (s. d.). *Shewanella ircinia* sp. Nov., a novel member of the family Shewanellaceae, isolated from the marine sponge *Ircinia dendroides* in the Bay of Villefranche, Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(12), 2871-2877. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64562-0>
- Liu, L., Zheng, Y.-Y., Shao, C.-L., & Wang, C.-Y. (2019). Metabolites from marine invertebrates and their symbiotic microorganisms: Molecular diversity discovery, mining, and application. *Marine Life Science & Technology*, 1(1), 60-94. <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00021-2>
- Margassery, L. M., Kennedy, J., O’Gara, F., Dobson, A. D., & Morrissey, J. P. (2012). Diversity and antibacterial activity of bacteria isolated from the coastal marine sponges *Amphilectus fucorum* and *Eurypon major*. *Letters in Applied Microbiology*, 55(1), 2-8. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03256.x>
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S., & Hamann, M. T. (2009). Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(5), 283-308. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.011>
- Mohapatra, B. R., Bapuji, M., & Sree, A. (2003). Production of Industrial Enzymes (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. *Acta Biotechnologica*, 23(1), 75-84. <https://doi.org/10.1002/abio.200390011>
- Patnayak, S., & Sree, A. (2005). Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. *Letters in Applied Microbiology*, 40(5), 358-363. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01671.x>
- Ruocco, N., Costantini, S., Palumbo, F., & Costantini, M. (2017). Marine Sponges and Bacteria as Challenging Sources of Enzyme Inhibitors for Pharmacological Applications. *Marine Drugs*, 15(6), 173. <https://doi.org/10.3390/md15060173>
- Sagar, S., Kaur, M., & Minneman, K. P. (2010). Antiviral Lead Compounds from Marine Sponges. *Marine Drugs*, 8(10), 2619-2638. <https://doi.org/10.3390/md8102619>

- Schläppy, M.-L., Schöttner, S. I., Lavik, G., Kuypers, M. M. M., de Beer, D., & Hoffmann, F. (2010). Evidence of nitrification and denitrification in high and low microbial abundance sponges. *Marine Biology*, 157(3), 593-602. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1344-5>
- Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Gandhimathi, R., Baskar, T. B., Manilal, A., & Sujith, S. (2009). Erratum to: Optimization, production, and partial characterization of an alkalophilic amylase produced by sponge associated marine bacterium *Halobacterium salinarum* MMD047. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(6), 871-871. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-1003-1>
- Shen, D., Xu, J.-H., Wu, H.-Y., & Liu, Y.-Y. (2002). Significantly improved esterase activity of *Trichosporon brassicae* cells for ketoprofen resolution by 2-propanol treatment. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18(4), 219-224. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00099-1)
- Simon, C., & Daniel, R. (2011). Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153-1161. <https://doi.org/10.1128/AEM.02345-10>
- Singh, R., Sharma, M., Joshi, P., & Rawat, D. S. (2008). Clinical Status of Anti-Cancer Agents Derived from Marine Sources. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 8(6), 603-617.
- Sipkema, D., Franssen, M. C. R., Osinga, R., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2005). Marine Sponges as Pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7(3), 142. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-0405-5>
- Souad, A., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Souad, K. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11, 69-81.
- Souza, P. M. de, & Magalhães, P. de O. e. (2010). Application of microbial α -amylase in industry—A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Thacker, R. W., & Freeman, C. J. (2012). Sponge–Microbe Symbioses. In *Advances in Marine Biology* (Vol. 62, p. 57-111). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394283-8.00002-3>

- Varijakzhan, D., Loh, J.-Y., Yap, W.-S., Yusoff, K., Seboussi, R., Lim, S.-H. E., Lai, K.-S., & Chong, C.-M. (2021). Bioactive Compounds from Marine Sponges : Fundamentals and Applications. *Marine Drugs*, 19(5), 246. <https://doi.org/10.3390/md19050246>
- Williams, F. M. (1985). *Clinical Significance of Esterases in Man. Clinical Pharmacokinetics*, 10(5), 392–403. doi:10.2165/00003088-198510050-00002
- Yoo Kyung Lee., Jung-Hyun Lee., et Hong Kum Lee. (2001). Microbial symbiosis in marine sponge. *The journal of microbiology* , 254-264.
- Yoon, B.-J., You, H.-S., Lee, D.-H., & Oh, D.-C. (2011). Aquimarina spongiae sp. Nov., isolated from marine sponge Halichondria oshoro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 417-421. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022046-0>
- Zhang, H., Zhao, Z., & Wang, H. (2017). Cytotoxic Natural Products from Marine Sponge-Derived Microorganisms. *Marine Drugs*, 15(3), 68. <https://doi.org/10.3390/md1503006>

Annexes :

- **Annexe I :**

Matériel non biologique :

L'appareillage utilisé est celui retrouvé habituellement dans un laboratoire de microbiologie :

Verrerie, balance, bec bunsen, pH mètre, agitateur magnétique, étuve, autoclave, réfrigérateur, pipette pasteur, boîtes de pétri, vortex, microscope photonique.

- **Annexe II :**

Composition des milieux de culture :

Préparation de bouillon nutritif :

- Extrait de levure1,50g/L
- Extrait de viande.....1,50 g/L
- Peptone.....5,00 g/L
- Eau de mer.....1000mL
pH : 7,4±0,2 à 25°C

Préparation de gélose nutritive :

- Agar15,000 g
- Peptone.....5,000 g
- Extrait de viande.....1,500 g
- Extrait de levure.....1,500 g
pH : 7,4±0,2 à 25°C

Préparation de Muller Hinton :

- Extrait de viande.....2,00 g
- Peptone.....17,5 g
- Agar17,0 g
- Amidon.....1,5 g
- Eau de mer1000mL
pH : 7,3±0,1 à 25°C

Préparation de milieu Sabouraud :

- Peptone.....10,0 g
- Glucose.....40,0 g
- Agar.....15,0 g
- Eau distillée.....1000mL
pH :5,6

- **Annexe III :**

Etapes de coloration Gram :

- La première étape consiste à préparer un frottis :

Sur une lame propre on dépose 2 gouttes d'eau physiologique stérile, puis à l'aide de pipette pasteur on prélève une petite quantité de la souche bactérienne et on l'étale par des mouvements circulaires.

On Passe la lame 3 fois sur la flamme du bec bunsen afin de sécher et fixer l'échantillon.
(Tuer les bactéries, fixer leur structure cytotologique, et de les adhérer à la lame)

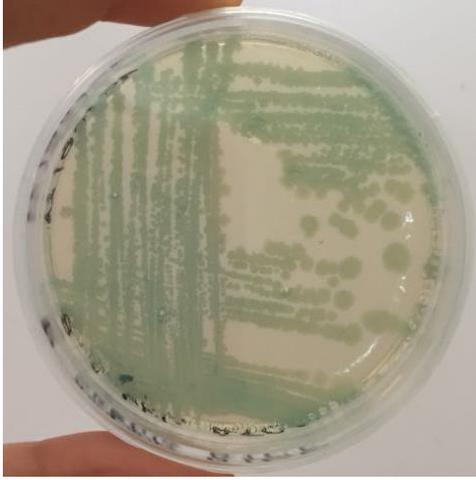
- La seconde étape c'est la coloration :

-Il s'agit de recouvrir la lame avec les colorants : violet de gentiane (1min), lugol (1min), alcool (30 sec), et la fushine (1min).

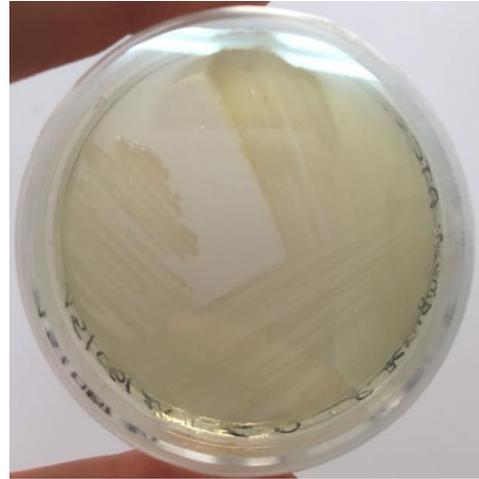
- Observation par microscope grossissement $\times 100$ en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion (**Singleton, 1999**)
- Les bactéries Gram (+) apparaissent en violet alors que celles (-) apparaissent en rose.

- **Annexe IV :**

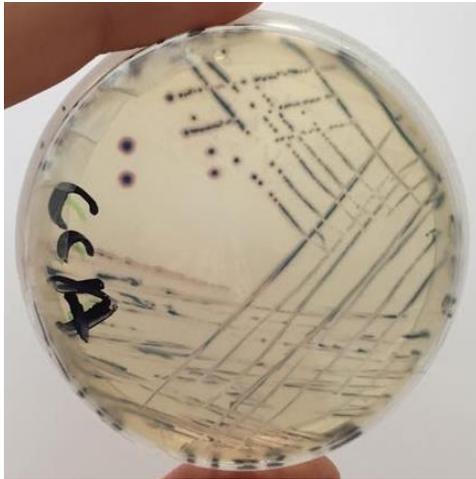
Souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne :



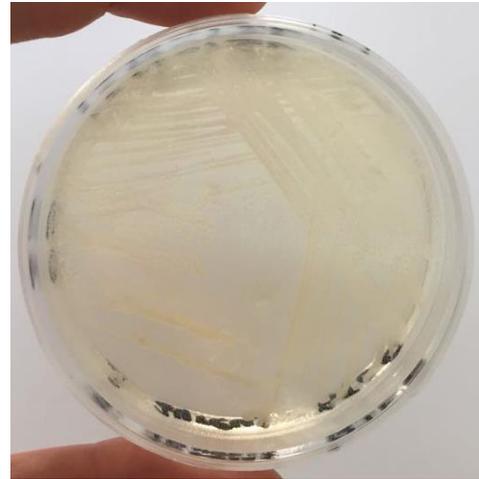
Bacillus subtilis



Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli



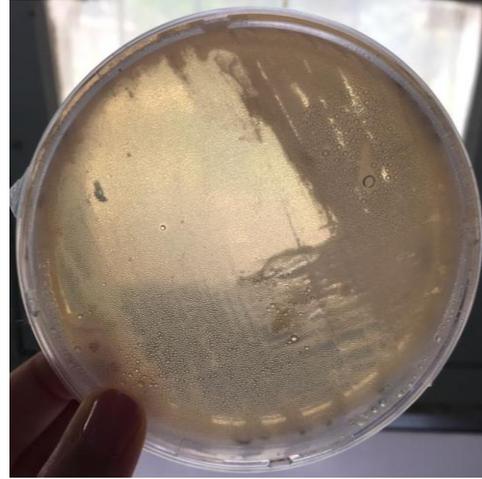
Staphylococcus aureus

- **Annexe V :**

Souches utilisées pour l'études d'activité antifongique :



Aspergillus brasiliensis

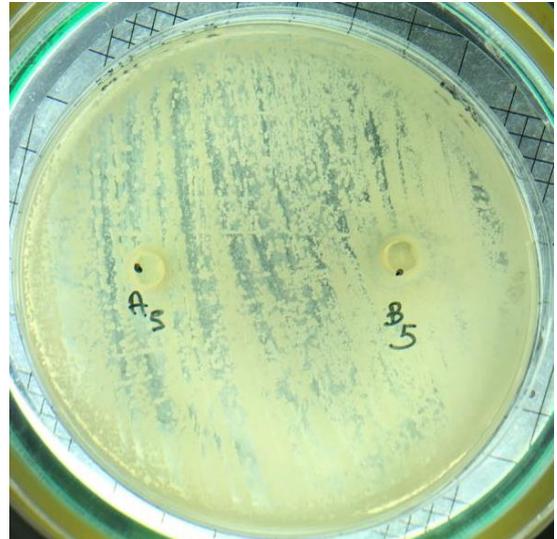
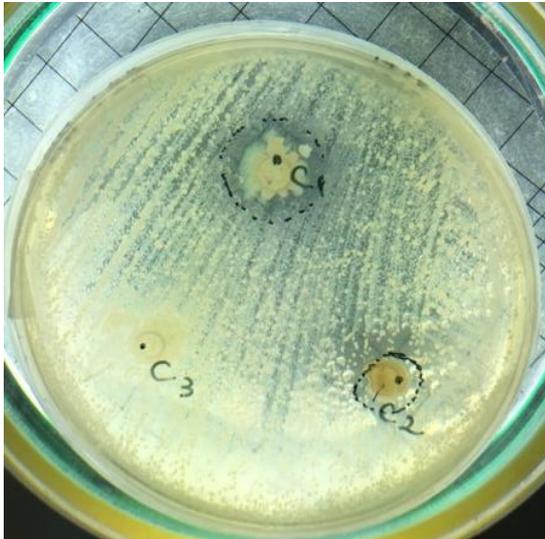
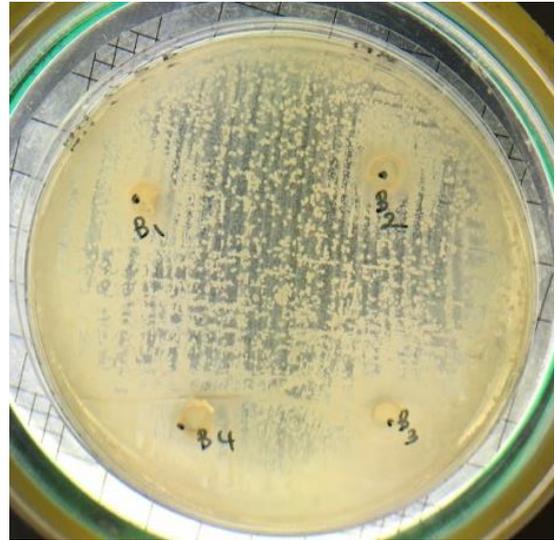
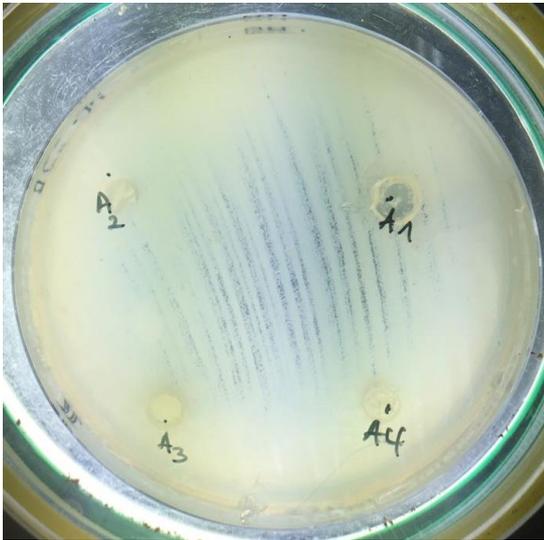


Candida albicans

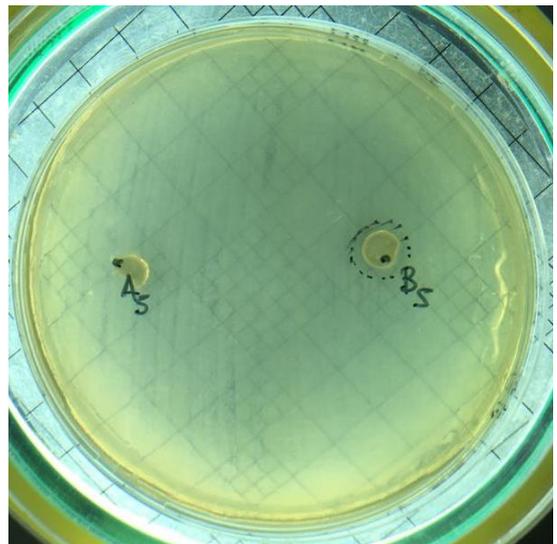
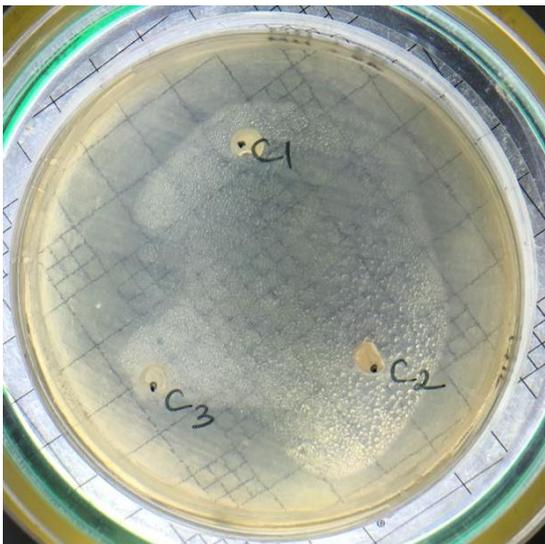
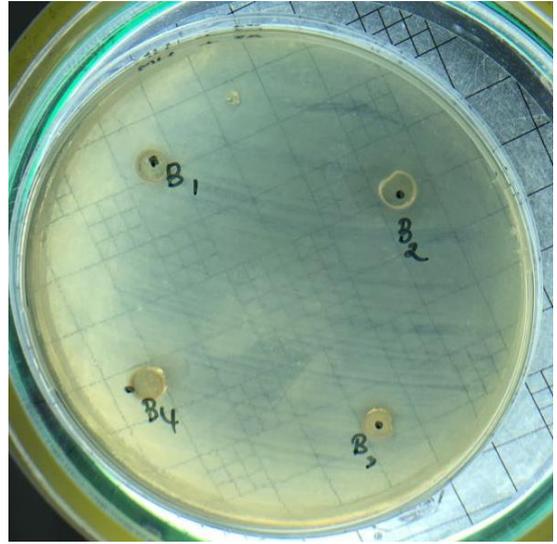
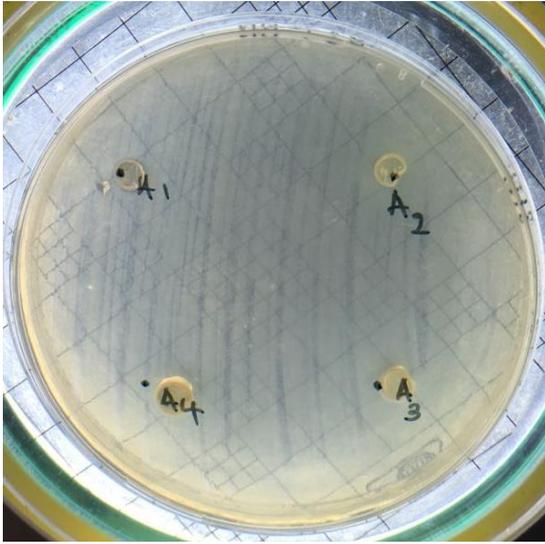
- Annexe VI :

Résultats de l'activité antibactérienne de notre collection de souches :

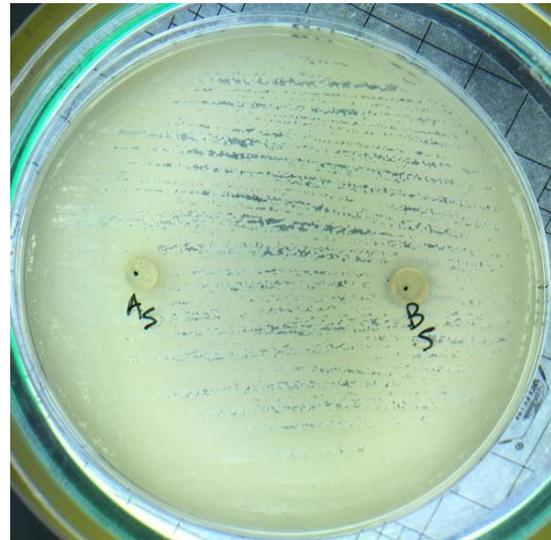
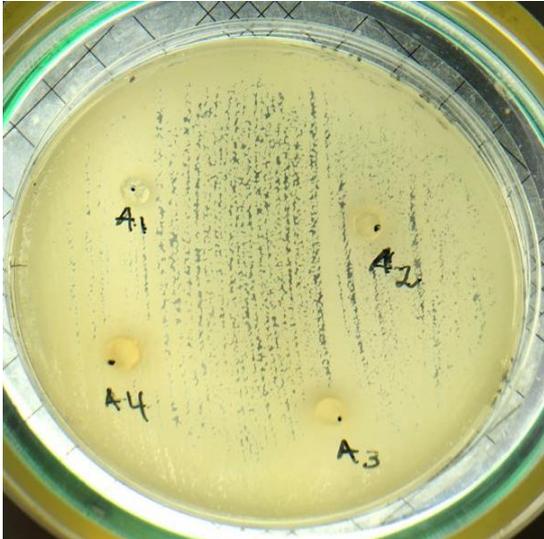
- Contre *Staphylococcus aureus* :



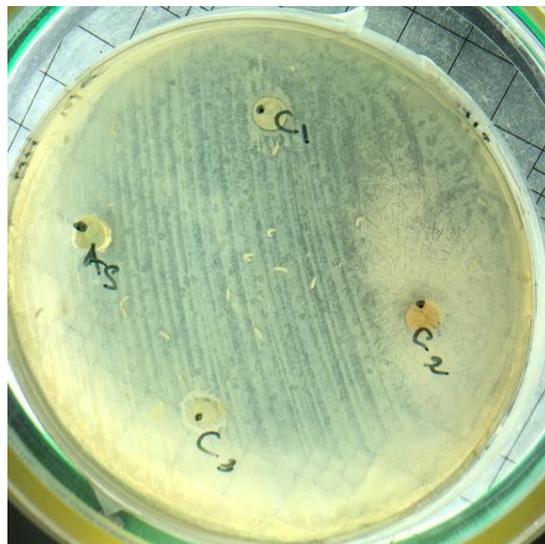
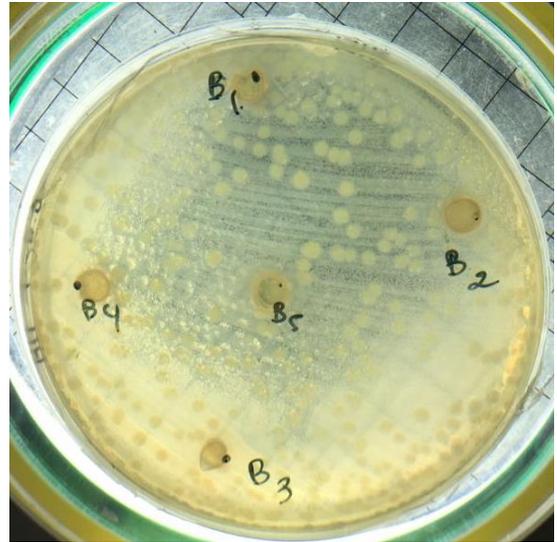
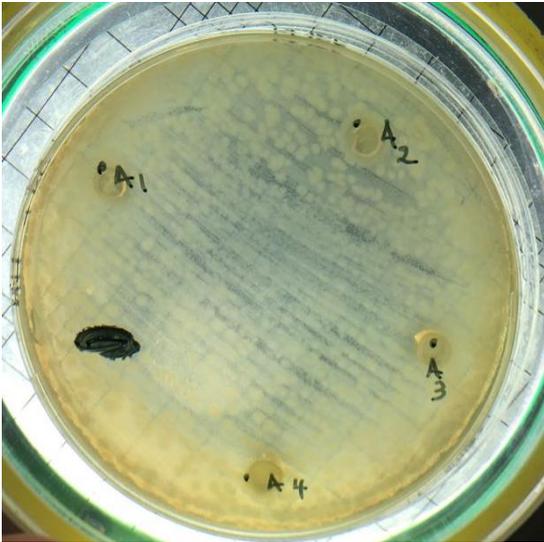
▪ Contre *pseudomonas aeruginosa* :



▪ Contre *Bacillus subtilis* :



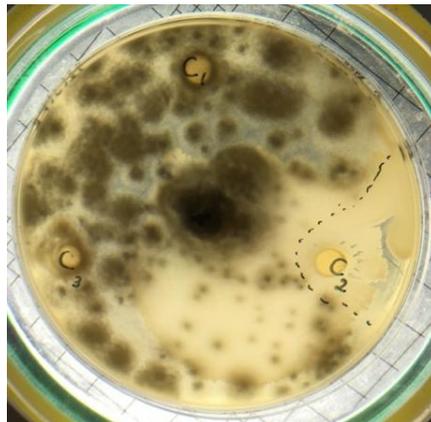
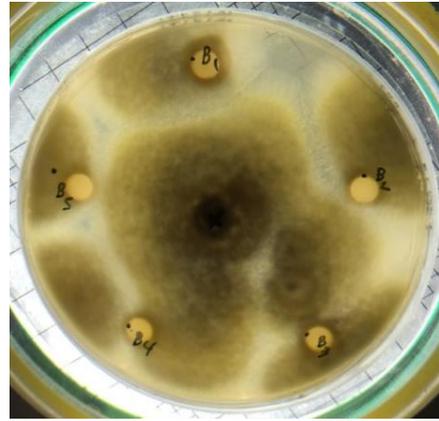
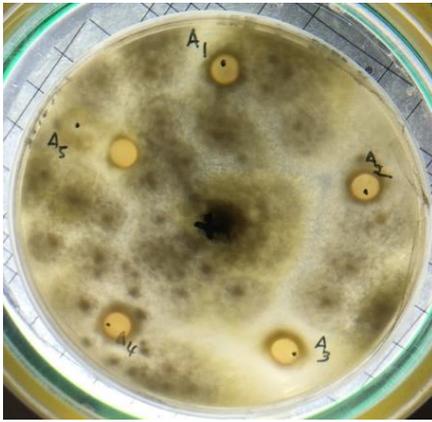
▪ Contre *Escherichia coli* :



- **Annexe VII :**

Résultats de l'activité antifongique de notre collection de souches :

- **Contre *Aspergillus brasiliensis* :**



▪ Contre *Candida albicans* :

