

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieure de la Recherche Scientifique**  
**Université BLIDA 1**  
**Faculté des Sciences**  
**Département de Chimie**



Mémoire présenté par

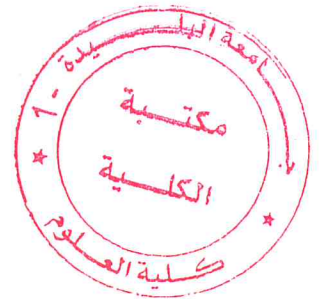
**NESSAL Amira**

**En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Produits Naturelles



**Titre**

**Etude chimique et microbiologique des métabolites  
produits par une souche d'origine marine**

Soutenu publiquement le 3 juillet 2017 devant le jury composé de

<i>Dr O.Touafek</i>	MCA	Présidente	Université de Blida 1
<i>Dr R.Zahi</i>	MCB	Membre	Université de Blida 1
<i>Pr M. EL HATTAB</i>	Pr	Promoteur	Université de Blida 1

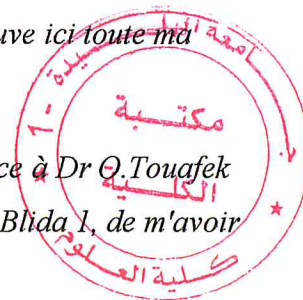
**Promotion 2016-2017**

## Remerciements

*Mes remerciements vont tout d'abord à ALLAH tout puissant pour m'avoir donné la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener à bien ce modeste Travail.*

*Je tiens à remercier très sincèrement mon promoteur Pr. EL HATTAB Mohamed de m'avoir encadrée, formée, dirigée et surtout de m'avoir fait confiance qu'il trouve ici toute ma gratitude.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Dr O.Touafek responsable du Master chimie des substances naturelles de l'Université de Blida 1, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.*



*J'adresse mes sincères remerciements à Dr R.Zahi, maitre de conférences de l'Université de Blida 1, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.*

*J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.*

*Je désire aussi remercier Melle HAMICHE SONIA, pour son aide, sa gentillesse, sa patience, ses conseils précieux, sa disponibilité qui a donné vie à ce travail.*

*De même, je tiens également à adresser mes remerciements à l'ingénieur du laboratoire de recherche « Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1 Melle MEBAREK Leyrat.*

*J'adresse également mes sincères remerciements aux doctorantes du laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécule (LCSN-BioM) pour leur gentillesse et leur aide dans la réalisation de ce modeste travail.*

*Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié.*

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce mémoire :*

*A ma très chère mère, pour tes sacrifices, ton soutien, ta générosité et ta tendresse. Tu étais toujours là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec tes précieux conseils. Aucun mot ne saurait exprimer ma grande reconnaissance, ma gratitude et mon profond amour. Qu'ALLAH te garde et te procure une bonne santé et une longue vie. Je t'aime maman.*

*A mon cher père, pour ta tendresse, ton soutien, tes conseils et tes encouragements. Veuillez trouver dans ce travail l'expression et le témoignage de mon attachement ma reconnaissance et mon respect. Qu'ALLAH t'accorde la santé et la longue vie. Je t'aime papa.*

*A mes très chères sœurs et frères*

*A ma très chère grand-mère*

*A mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, à tous les membres de la famille.*

*A toutes mes amies*

*A toutes les personnes à qui je réserve une place dans mon cœur et qui ont su être patientes, je leurs dédie ce modeste travail.*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin. Je vous dis merci*

## ملخص

يركز هذا العمل على إنتاج و دراسة المواد الكيميائية من المركبات المضادة للميكروبات من سلالة بكتيرية *Bacillus amyloliquefaciens*, عزلت حديثا من الطحلب البني *Zonaria tournefortii*, الذي تم حصده في القرن الذهبي تيبازة . تم إجراء دراسة تأثير السلالة البكتيرية العداء من خلال طريقة اسطوانات أجار, وسمح الكشف عن تأثير كايح من السلالة بالنسبة لثلاثة بكتيريا مستهدفة. وقد تم تحسين الوسط المغذي ووقت الإنتاج. تم اختبار أوساط الإنماء المعقدة بإتباع حركية الإنتاج . في ظل الظروف الأمثل للإنتاج, تم استخراج الميطابولات المضادة للميكروبات عن طريق التقطير بالبخار من الراشح , والتحليل الكيميائي للمنتجات المتقلبة التي تم الحصول عليها أجري من قبل CG/SM. سمح التحليل بالكشف عن 34 مركب. التركيب الكيميائي للجزء المتقلب يتميز بوجود غالبية المنتجات من نوع تربين وهي  $\delta$ - sesquiterpenes, (Epi-13-Manoyl oxide, manool, Sclarene) diterpenes و (D-Limonène) monoterpenes. كما أنه يحتوي على نسبة الهيدروكربون وسلسلة من المنتجات الدهنية يتكون من البارافينات.

الكلمات المفتاحية: *Zonaria tournefortii*, *Bacillus amyloliquefaciens* S13, جزء متقلب , نشاط مضادات الميكروبات , التحليل الكيميائي.

## Résumé

Le présent travail porte sur la production et l'étude chimique des métabolites antimicrobiens volatils de la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* S13, nouvellement isolée à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, récoltée au niveau de la *Corne d'Or* à *Tipaza*. L'étude de l'effet antagonisme de la souche bactérienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar, et a permis de détecter l'effet inhibiteur de la souche vis-à-vis de trois bactéries cibles. Le milieu de culture ainsi que le temps de production ont été optimisés. Des milieux de culture complexes de base sont testés en suivant des cinétiques de production. Dans les conditions de production optimales, l'extraction des métabolites antimicrobiens volatils a été réalisée par hydrodistillation sur le filtrat de culture, et l'analyse chimique des produits volatils obtenus a été réalisée par CG/SM. L'analyse a permis de révéler 34 composés. La composition chimique de la fraction volatile est caractérisée par la présence majoritaire de produits terpéniques à savoir des diterpènes (Sclarene, Manool, Epi-13-Manoyl oxide), des sesquiterpènes ( $\delta$ -Cadinene et T-Muurolol, Caryophyllene oxide) et des monoterpènes (D-Limonène). Elle renferme également une fraction d'hydrocarbures et une série de produits lipidiques constitués de paraffines.

**Mots clés :** *Zonaria tournefortii*, *Bacillus amyloliquefaciens* S13, fraction volatile, activité antimicrobienne, analyse chimique.

## Abstract

The present work concerns the production and the chemical study of the volatile antimicrobial métabolites of the bacteria *Bcillus amyloliquefaciens* S13, recently isolated from the brown alga *Zonaria tournefortii*, the alga was collected at the Golden horn of Tipaza. The study of the antagonism effect of the bacterial strain was realized by the method of the cylinders of Agar, and allowed to detect the inhibitory effect of the strain towards three target bacteria. The environment of culture as well as the time of production was optimized. Complex basic culture media were tested by following kinetics of production.

In the optimal conditions of production, the extraction of the volatile antimicrobial metabolites was realized by hydrodistillation on the filtrat of culture, and the chemical analysis of the obtained volatile products was realized by GC / SM. This last allowed to identify 34 compounds. The chemical composition of the volatile fraction is characterized by the presence of terpenes as major products including diterpenes (Sclarene, Manool, Epi-13-Manoyl oxide), sesquiterpenes (d-Cadinene and T-Muurolol, Caryophylleneoxide) and monoterpenes (D-Limonène). It also contains a fraction of hydrocarbon and a series of lipid products (constituted) by paraffin wax.

**Keywords:** *Zonaria tournefortii*, *Bcillus amyloliquefaciens* S13, volatile fraction, antimicrobial activity, chemical analysis.

## Liste des abréviations

- %** : Pourcent
- CG/SM** : Chromatographie en phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse
- °C** : Degré Celsius
- pH** : Potentiel Hydrogène
- tr.min<sup>-1</sup>** : tourne par minute
- ARN** : Acide ribonucléique
- LB** : Milieu Luria Bertani
- VNSS** : Milieu Vaätanen Nine Salt Solution
- ISP2** : Milieu International Streptomyces Project 2
- ATCC** : American Type Culture Collection

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Bactéries identifiées à partir de diverses espèces d'algues marines	5
<b>Tableau 2 :</b>	Champignons identifiés à partir de diverses espèces d'algues marines	8
<b>Tableau 3 :</b>	Métabolites secondaires isolés à partir de microorganismes dérivés d'algues marines	10
<b>Tableau 4 :</b>	Culture et fermentation des microorganismes pour la production de métabolites secondaires	16
<b>Tableau 5 :</b>	Résultats préliminaires des tests d'identification	32
<b>Tableau 6 :</b>	Cinétique de production des métabolites antimicrobienne de la souche <i>B. amyloliquefaciens S13</i> contre <i>Bacillus subtilis</i> en fonction des milieux de production	35
<b>Tableau 7 :</b>	Cinétique de production des métabolites antimicrobiens de la souche <i>B. amyloliquefaciens S13</i> contre <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en fonction des milieux de production	36
<b>Tableau 8 :</b>	Cinétique de production des métabolites antimicrobienne de la souche <i>B. amyloliquefaciens S13</i> contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction des milieux de production.	37
<b>Tableau 9 :</b>	Composition chimique de la fraction volatile produite par la souche Bactérienne <i>Bacillus amyloliquefaciens S13</i>	39



## Liste des planches

<b>Planche 1 :</b>	Structure d'un monoterpène identifiés dans la fraction volatile	42
<b>Planche 2 :</b>	Structure des sesquiterpènes identifiés dans la fraction volatile	43
<b>Planche 3 :</b>	Structure des diterpènes identifiés dans la fraction volatile	44

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Procédure générale pour la découverte de composés biologiquement actifs, tels que les agents antimicrobiens, d'origine microbienne	12
<b>Figure 2 :</b>	Photo de <i>Zonaria Tournefortii</i>	21
<b>Figure 3 :</b>	Repiquage de la Souche <i>Bacillus amyloliquefaciens S13</i>	27
<b>Figure 4 :</b>	Protocole expérimental de la cinétique de production des métabolites antimicrobiens	29
<b>Figure 5 :</b>	Dispositif expérimental d'hydrodistillation de la fraction volatile par Clevenger	30
<b>Figure 6 :</b>	Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)	31
<b>Figure 7 :</b>	Observation microscopique des cellules bactériennes après fixation (coloration de gram)	32
<b>Figure 8 :</b>	Résultat des tests bactériologiques	33
<b>Figure 9:</b>	Activité antimicrobienne de la souche <i>B.amyloliquefaciens S13</i> contre <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
<b>Figure 10:</b>	Activité antibactérienne de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens S13</i> en différents milieux complexes contre <i>Bacillus subtilis</i>	35
<b>Figure 11:</b>	Activité antibactérienne de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens S13</i> en différents milieux complexes contre <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
<b>Figure 12 :</b>	Activité antibactérienne de la souche <i>Bacillus amyloliquefaciens S13</i> en différents milieux complexes contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
<b>Figure 13 :</b>	Composition chimique de la fraction volatile produit par <i>B. amyloliquefaciens S13</i>	42
<b>Figure 14 :</b>	Profil chromatographique d'analyse de la fraction volatile produite par la souche bactérienne <i>Bacillus amyloliuefaciens S13</i>	45

## SOMMAIRE

Remerciements.....	i
Dédicaces .....	ii
ملخص.....	iii
Résumé.....	iv
Abstract .....	v
Liste des abréviations.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des planches .....	viii
Liste des figures .....	ix
Introduction générale .....	1

### Partie I : Synthèse bibliographique

I. 1 Microorganismes marins .....	4
I. 1.1 Notions générales sur les microorganismes marins.....	4
I. 1.2 Diversité des microorganismes sur les algues marines .....	4
I. 2 Métabolites secondaires biologiquement actifs dérivés de microorganismes associés aux algues marines.....	9
I. 3 Procédure générale pour la découverte de composés biologiquement actifs à partir de microorganismes associées aux algues marines.....	12
I. 3.1 Isolement des microorganismes.....	13
I. 3.1.1 Protocoles d'isolement des microorganismes épiphytes.....	13
I. 3.1.2 Protocoles d'isolement des microorganismes endophytes.....	14
I. 3.2 Culture des microorganismes pour la production des métabolites secondaires .....	15
I. 3.3 Criblage biologique .....	18
I. 3.4 Extraction et purification des composés biologiquement actifs .....	18
I. 3.5 Optimisation des conditions de culture des microorganismes.....	18
I. 4 Organismes biologiques objet de l'étude.....	20
I. 4.1 l'algue brune <i>Zonaria tournefortii</i> .....	20
I. 4.1.1 Systématique.....	20
I. 4.1.2 Description.....	21

I. 4.1.3 Biologie.....	21
I. 4.1.4 Ecologie .....	21
I. 4.2 Présentation de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	21
I. 4.2.1 Description.....	21
I. 4.2.2 Classification.....	22
I. 4.2.3 Ecologie et pathogenèse.....	22

## Partie II : Etude expérimentale

II. 1 Introduction.....	24
II. 2 Matériel et méthodologie expérimentale.....	24
II. 2.1 Origine de la souche bactérienne.....	24
II. 2.1.1 Récolte et isolement .....	24
II. 2.1.2 Conservation.....	24
II. 2.1.3 Identification phénotypique de la souche sélectionnée .....	25
II. 2.1.3.1 Etude morphologique et observation microscopique.....	25
II.2.1.3.2 Etudes physiologiques.....	25
II. 2.1.4 Identification moléculaire.....	26
II. 2.2. Milieux de culture.....	26
II. 2.2.1 Milieu de repiquage.....	26
II. 2.2.2 Milieux de production.....	27
II. 2.3 Etude de l'effet antagoniste de la souche bactérienne.....	28
II. 2.3.1 Microorganismes cibles.....	28
II. 2.3.2 Tests d'antagonisme par la méthode des cylindres d'agar .....	28
II. 2.4 Etude de la production des métabolites antimicrobiens sur milieux liquides .....	28
II. 2.4.1 Cinétiques de production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides .....	28
II. 2.4.2 Extraction des métabolites antimicrobiens volatils .....	29
II. 2.4.2.1 Description du dispositif d'extraction.....	29
II. 2.4.2.2 Traitement de l'hydrolat.....	30
II. 2.5 analyse de la fraction volatile par CG/SM.....	30

## **II. 3 Résultat et discussion**

III. 3.1 Etude morphologique et observation microscopique.....	32
III. 3.1.1 Observation a l'état frais.....	32
III. 3.1.2 Coloration de Gram.....	32
III. 3.2 Etudes physiologiques.....	32
III. 3.3 Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'Agar.....	34
III.3.4 Cinétique de production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides.....	34
III. 3.4 Analyse de la fraction volatile par CG/SM.....	39
Conclusion générale.....	47
Références bibliographiques.....	49
Annexe.....	55

**INTRODUCTION**  
**GÉNÉRALE**

## Introduction générale

Les microorganismes sont utilisés depuis des milliers d'années pour la transformation des produits alimentaires (boissons alcoolisées, pain, fromages, etc...). Plus récemment, et avec l'essor de la biotechnologie, des procédés exploitant certaines caractéristiques de microorganismes ont été développés, soit pour dégrader de nombreuses molécules organiques ou minérales afin de dépolluer les sols, les eaux ou l'air, soit pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes.

Les microorganismes marins, végétaux et animaux, constituent une source inépuisable, faiblement exploitée en métabolites secondaires dotés d'activités biologiques d'un intérêt capital dans la vie des humains [1].

Plusieurs espèces d'algues et d'invertébrés semblent être capables de régulariser la colonisation de leurs surfaces grâce à la production de métabolites secondaires [2]. En effet, l'exploration des micro-organismes en tant que producteurs d'agents thérapeutiques a seulement commencé au 20<sup>ème</sup> siècle. Cependant, malgré cette histoire relativement courte, près de 10% de tous les produits naturels biologiquement actifs actuellement connus sont d'origine microbienne. Ceux-ci comprennent la plupart des antibiotiques, ce qui démontre clairement le potentiel des micro-organismes à produire de nouveaux produits biologiquement actifs [3].

L'isolement et la caractérisation de molécules produites par des souches bactériennes marines permet d'évaluer la relation, souvent complexe entre les bactéries, les organismes marins environnant et les natures chimique des métabolites bio-synthétisés.

Les métabolites antimicrobiens désignent une substance naturelle qui a une action d'inhibition ou de destruction spécifique contre les bactéries. Actuellement, cette définition s'est encore élargie pour devenir : toute substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui a le pouvoir d'inhiber ou détruire des microorganismes (bactéries et champignons) et également d'avoir des actions anti inflammatoires, anti-suppresseurs et anti-tumorales [1].

Le présent travail s'intègre dans cette large thématique et porte sur la production et l'étude chimique des métabolites antimicrobiens volatils produits par une souche bactérienne marine *Bacillus amyloliquefaciens* S13 nouvellement isolée a partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*.

Cette étude comporte deux principales parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons des concepts sur des notions générales sur les microorganismes marins, les métabolites isolés et la méthodologie expérimentale d'isolement.
- La seconde partie est réservée à une étude expérimentale consacrée à :
  - Identification phénotypique et moléculaire de *Bacillus amyloliquefaciens* S13
  - Etude de l'effet antagoniste de la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* S13
  - Cinétique de production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides
  - Extraction des métabolites antimicrobiens volatils
  - Etude de la composition chimique de fraction volatile par CG-SM



# **PARTIE I**

## **Synthèse bibliographique**

## **I. 1 Microorganismes marins**

### **I. 1.1 Notions générales sur les microorganismes marins**

Le milieu marin est un écosystème complexe avec une énorme pluralité de formes de vie qui sont associées entre eux, les associations les plus courantes sont entre les cellules eucaryotes et les micro-organismes [4]. Les surfaces d'organismes marins eucaryotes tels que les invertébrés et les algues offrent un habitat riche en nutriments particulièrement bien adapté pour la colonisation des microbes qui vivent adhérents à diverses communautés souvent immergées dans une matrice ou avec formation d'un biofilms défini comme : « *un assemblage de cellules microbiennes qui est irréversiblement associé à une surface, et enfermé dans une matrice de matériau de polysaccharide* » [5].

### **I. 1.2 Diversité des microorganismes sur les algues marines**

Les microorganismes marins vivant sur les surfaces d'organismes (algues) comprennent des levures, des champignons et des protistes, toute fois la littérature montre que la majorité des populations microbiennes associées aux algues sont des bactéries [5].

Plusieurs espèces d'algues marines prélevées de la mer, sont toujours accompagnées de souches bactériennes attachées à leurs cellules, ceci a provoqué la contamination dans la culture d'algues [4].

Les études descriptives des bactéries associées aux surfaces d'algues remontent à longtemps. Néanmoins, la complexité de ces études a particulièrement augmenté au cours des dernières années. Cet état de fait est lié à l'utilisation des méthodes performantes, notamment la biologie moléculaire. Les associations bactéries-macroalgues contiennent un certain nombre de nouvelles espèces bactériennes, genres et même des ordres, ce qui prouve que les macroalgues représentent une source distincte et riche de nouveaux taxons microbiens [6].

Les bactéries décrites à partir des surfaces d'algues ou des thalles d'algues appartiennent aux phylums supérieurs *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* (groupe CFB), cyanobactéries, *Firmicutes*, *Planctomycètes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Tenericutes* et la division *OP11*. En effet, dans toutes les études examinées, les *gamma-protéobactéries* sont les clades bactériens les plus fréquemment associés aux algues (37% de l'abondance relative), suivi par le groupe de la BFC (20%), Alphaproteobacteria (13%), Firmicutes (10%), et actinobactéries (9%).

Sur un niveau taxonomique inférieur, les commandes Flavobacterales (14% de l'abondance relative), Alteromonadales (12%), Vibrionales (10%), Pseudomonadales (9%), Bacillales (9%), Actinomycetales (8%), et Rhodobacterales (7%) étaient les plus abondants dans les communautés bactériennes associées aux algues.

Les représentants bactériens des grands groupes phylogénétiques mentionnés ci-dessus ont été isolés à partir de chacun des trois groupes d'algues (brunes, rouges et vertes).

Malgré cette similarité, les macroalgues vertes sont plus associées avec le groupe de BFC, et alphaproteobacteria par rapport aux algues brunes et rouges. D'autre part, les macroalgues brunes et rouges sont plus associées respectivement avec les espèces de Firmicutes, d'Actinobacteria et de Planctomycètes [7].

Les tableaux (1-2) regroupent respectivement, des souches bactériennes et des champignons isolées à partir des trois classes de macroalgues (brune, rouge, vertes). Pour chaque classe nous donnons des exemples à titre d'illustration non exhaustive.

**Tableau 1:** Bactéries identifiées à partir de diverses espèces d'algues marines

	Espèces	Bactéries	Réf
<b>Algue brune</b>	<i>Chordaria flagelliphormis</i>	<i>Pseudoalteromonas spp.</i>	[8]
	<i>Colpomenia sinuosa</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[9]
	<i>Desmarestia viridis</i>	<i>Bacillus spp.</i>	[8]
	<i>Ecklonia kurome</i> Okamura	<i>Croceitalea dokdonensis</i>	[10]
	<i>Fucus evanescens</i> C. Agardh	<i>Bacillus algicola</i>	[11]
	<i>Fucus serratus</i>	<i>Cellulophaga fucicola</i>	[12]
	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Fucobacter marina</i>	[13]
	<i>Sargassum sp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	[14]
	<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Formosa algae</i>	[15]
		<i>Maribacter aquivivus</i>	
	<i>Winogradskyella echinorum</i>		
	<i>Labrenzia marina</i>		
	<i>Paracoccus marcusii</i>		
	<i>Laminaria saccharina</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	[16]

<b>Algue rouge</b>	<i>Chondrus ocellatus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[17]
	<i>Gelidium amansii</i>	<i>Bacillus cereus</i>	[17]
	<i>Gracilaria corticata</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	[18]
	<i>Gracilaria salicornia</i>	<i>Vibrio spp.</i>	[18]
	<i>Gracilaria spp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	[8]
	<i>Gracilaria textorii</i>	<i>Halomonas venusta</i>	[19]
	<i>Grateloupia filicina</i>	<i>Bacillus cereus</i>	[17]
	<i>Hormosira banksii</i>	<i>Alkalibacterium subtropicum</i>	[20]
	<i>Laurencia spectabilis</i>	<i>Nocardia sp. ALAA</i>	[21]
	<i>Lomentaria catenata</i>	<i>Bacillus clausii</i>	[17]
		<i>Bacillus pumilus</i>	
	<i>Neogoniolithon fosliei</i>	<i>Pseudoalteromonas J010</i>	[22]
	<i>Pachymeniopsis lauceolata</i>	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	[17]
	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[23]
	<i>Plocamium telfairiae</i>	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	[17]
		<i>Vibrio campbelli</i>	
		<i>Bacillus anthracis</i>	
	<i>Polysiphonia lanosa</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	[23]
		<i>Bacillus pumilus</i>	
	<i>Polysiphonia urceolata</i>	<i>Uncultured Vibrio sp</i>	[19]
	<i>Vibrio tasmaniensis</i>		
	<i>Uncultured Vibrio sp</i>		
	<i>Vibrio splendidus,</i>		
<i>Porphyra leucosticte</i>	<i>Aquimarina agarilytica</i>	[24]	
<i>Porphyra yezoensis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	[17]	

<b>Algue verte</b>	<i>Acrosiphonia sonderi</i>	<i>Algibacter lectus</i>	[25]
		<i>Algoriphagus winogradskyi</i>	[7]
		<i>Formosa agariphila</i>	[26]
	<i>Capsosiphon fulvescens</i>	<i>Aequorivita capsosiphonis</i>	[4]
	Hahmeda sp	<i>Pseudoalteromonas sp. F-420</i>	[27]
	<i>Ulva fasciata</i>	<i>Marinomonas sp.</i>	[18]
	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Bacillus flexus</i>	[18]
		<i>Bacillus licheniformis</i>	[23]
		<i>Pseudoalteromonas ulvae sp. nov.</i>	[28]
	<i>Ulva linza</i>	<i>Erythrobacter longus</i>	[29]
	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Vibrio lentus</i>	[19]
	<i>Ulva prolifera</i>	<i>Huaishuia halophila</i>	[21]
	<i>Ulva fenestrata</i>	<i>Arenibacter certesii</i>	[30]
		<i>Arenibacter palladensis</i>	[31]
	<i>Maribacter stanieri</i>	[22]	

**Tableau 2:** Champignons identifiés à partir de diverses espèces d'algues marines

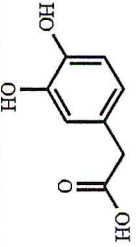
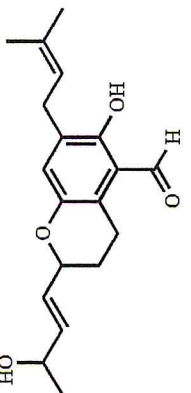
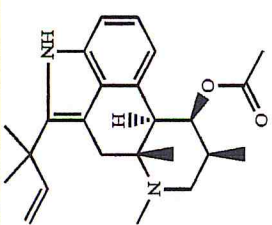
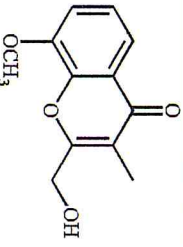
	<b>Espèces</b>	<b>Champignons</b>	<b>Réf</b>
<b>Algue brune</b> <i>(Phaeophyta)</i>	<i>Ishige okamurae</i>	<i>Aspergillus sp</i>	[29]
	<i>Laminaria sachalinensis</i>	<i>Aspergillus carneus</i> KMM 4638	[32]
	<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Eurotium cristatum</i> EN-220	[33]
<b>Algue rouge</b> <i>(Rodophyta)</i>	<i>Ceramium sp</i>	<i>Phaeosphaeria spartinae</i>	[34]
	<i>Algue non identifiée genre</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i> QEN-24S	[35]
	<i>Laurencia</i>		
	<i>Heterosiphonia japonica</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	[36]
	<i>Polysiphonia urceolata</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	[37]
	<i>Hypnea saidana</i>	<i>Phoma herbarum</i>	[29]
	<i>Acanthophora spicifera</i>	<i>Curvularia sp</i>	[38]
<b>Algue verte</b> <i>(Chlorophyta)</i>	<i>Ulva sp</i>	<i>Penicillium sp, Drechslera sp</i>	[39] [43]
	<i>Enteromorpha sp</i>	<i>Coniothyrium cereale</i>	[40]
	<i>Algue verte non identifiée</i>	<i>Aspergillus Fumigatus</i>	[41]
	<i>Enteromorpha prolifera</i>	<i>Eurotium herbariorum</i> HT-2	[42]

## **I.2 Métabolites secondaires biologiquement actifs dérivés de microorganismes associés aux algues marines**

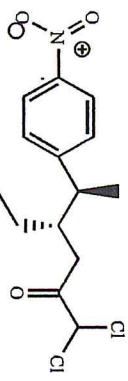
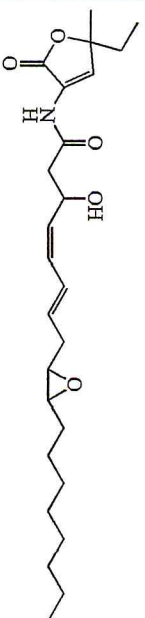
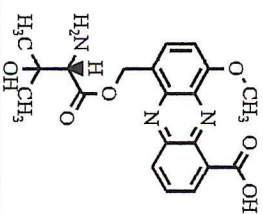
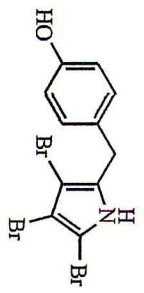
Depuis des milliers d'années les microorganismes sont employés pour la transformation des produits alimentaires. Avec la progression de la biotechnologie, des procédés exploitant certaines caractéristiques de microorganismes ont été améliorés, soit pour dégrader de nombreuses molécules organiques ou minérales afin de dépolluer les sols, les eaux ou l'air, soit pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes [1]. Les travaux antérieurs ont permis l'isolement de plusieurs métabolites secondaires à partir d'environnements différents. Cet état de fait a permis de développer des méthodologies de culture pour un large éventail de microorganismes. C'est pourquoi il est très important d'identifier les organismes qui produisent des métabolites secondaires bioactifs, et d'être capable de structurer un plan d'utilisation et de conservation de ces espèces qui représentent une source potentielle de développement de nouveaux médicaments [4]. En effet, les micro-organismes associés aux algues marines, par leurs nombreuses et complexes voies d'interactions avec l'hôte, constituent une immense source de composés biologiquement actifs. Par conséquent, des connaissances sur les interactions microorganisme-algues et les composés bioactifs utiles en biotechnologie produits par des microorganismes d'algues associées sont nécessaires avant de discuter du potentiel biotechnologique des algues et de leurs métabolites.

Les composés bioactifs isolés de microorganismes dérivés de différentes espèces d'algues marines décrits par différents auteurs sont regroupés dans le tableau 3 :

**Tableau 3 :** Métabolites secondaires isolés à partir de microorganismes dérivés d'algues marines

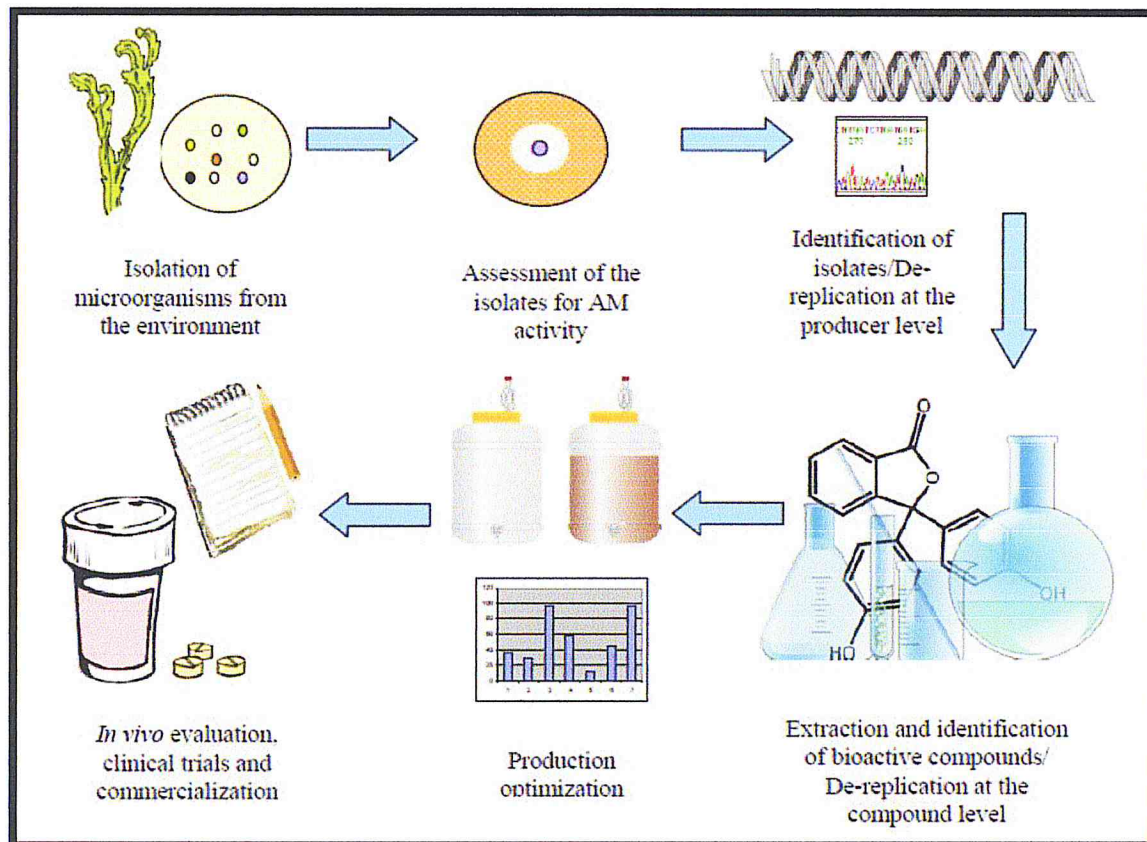
Organismes	Espèces	Composé isolés	Structure chimique	Classe chimique	Algues	Réf
Champignons	<i>Aspergillus sp.</i>	Acétique 3,4-dihydroxyphényl		Acide acétique	<i>Ishige okamurae</i> (Algue brune)	[29]
	<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetopyranin		Benzaldéhyde	<i>Polysiphonia urceolata</i> (Algue rouge)	[37]
	<i>Aspergillus Fumigatus</i>	Fumigaclavine C		Alcaloïde	Algue verte non définie	[41]
	<i>Penicillium sp.</i>	2-(4-hydroxyméthyl)-8-méthoxy-3-méthyl-4H-chromen-4-one		Chromone	<i>Ulva sp.</i> (Algue verte)	[39]



Bactéries	<i>Nocardia</i> sp. ALAA 2000	1,1-dichloro-4-ethyl-5-(4-nitrophenyl)-hexan-2-one		Phénol halogéné	<i>Laurenica spectabilis</i> (Algue rouge)	[21]
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. F-420	Korormicin		Dérivé de γ-lactone	<i>Halimeda</i> sp	[27]
	<i>Pelagibacter variabilis</i>	Pelagiomycin A		Phenazine	<i>Pocockiella variegata</i>	[44]
	<i>Pseudoalteromonas</i> J010	4'-((3,4,5-tribromo-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)methyl)phénol		Bromopyrrole	<i>Neogoniolithon fosliei</i>	[22]

### I. 3 Procédure générale pour la découverte de composés biologiquement actifs à partir de microorganismes associées aux algues marines

La procédure générale pour l'isolement de produits naturels à partir de micro-organismes associés aux algues marines comprend plusieurs étapes essentielles récapitulées par la figure suivante :



**Figure 1 :** Procédure générale pour la découverte de composés biologiquement actifs, tels que les agents antimicrobiens, d'origine microbienne.

La procédure commence par l'isolement des micro-organismes provenant de l'environnement, par exemple, à partir des surfaces des eucaryotes marins, suivi de l'évaluation de leur activité antimicrobienne et de l'identification de l'organisme producteur. Le composé bioactif est ensuite purifié et la structure chimique élucidée. Optimisation de la production peut être réalisée pour maximiser le rendement du composé désiré [45].

### **I. 3.1 Isolement des microorganismes**

Le processus commence par l'isolement des micro-organismes. Après avoir été recueillis, l'algue est placée dans une fiole Erlenmeyer et rincée avec de l'eau distillée; un petit échantillon est pris avec un écouvillon stérile à partir de la fiole et est inoculé dans un milieu qui permet la croissance de la plupart des microorganismes présents à la surface d'algue, puis est incubé pendant des périodes de 24 à 48 heures à 25 ° C, jusqu'à ce que les colonies en développement commencent à émerger. Par la suite, les microorganismes seront purifiés jusqu'à la troisième génération pour assurer l'intégrité des colonies pures et finalement il est important de prendre une des colonies de chaque souche purifiée et la conservée dans 15% de glycérol à -70 °C [4].

Les résultats de l'étape d'isolement peuvent être influencés par divers paramètres tels que la récolte, le prétraitement d'algues (stockage, refroidissement, transport, tamisage, filtrage, etc), les milieux de culture et les conditions d'incubation utilisées pour cultiver les microorganismes. En effet, la littérature décrit différents protocoles pour l'isolement de microorganismes épiphytes et endophytes, ainsi que les différentes conditions expérimentales utilisées pour le prétraitement d'algues.

#### **I. 3.1.1 Protocoles d'isolement des microorganismes épiphytes**

✓ Méthode développée par T. Lachnit et al [46].

Les algues ont été recueillies individuellement dans des sacs Ziploc stériles et transportées au laboratoire dans une glacière (<10 ° C). Dans les 2 h après le prélèvement, les algues ont été lavées 10 fois avec de l'eau de mer filtrée avec un filtre de 0,2 µm, pour éliminer les bactéries faiblement fixées. Les échantillons rincés ont été placés dans des boîtes de pétri vides stériles. 2 cm<sup>2</sup> de la surface de chacune des algues a été vigoureusement frottée avec un écouvillon stérile. Par la suite, les écouvillons ont été transférés dans des flacons stériles de 2 ml et congelés à -20 °C jusqu'à analyse plus approfondie.

✓ Méthode développée par M. Nishijima et al [10].

L'isolement a été réalisé immédiatement après la collecte des échantillons d'algues. Les surfaces d'algues ont été frottées avec un petit morceau de gaze stérile, qui a ensuite été trempé dans l'eau de mer stérilisée et agiter vigoureusement. Des portions (100 ml) de chaque échantillon non dilué et des échantillons dilués 10 fois avec l'eau de mer artificielle ont été étalées sur des plaques de gélose d'isolement.

✓ Méthode développée par Y.-K. Lee et al [31].

Les thalles d'algues ont été lavés avec de l'eau de mer stérile pour éliminer les microorganismes qui sont souvent faiblement attachés à la surface d'algues. Les thalles ont été ensuite découpés en morceaux carrés  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ . Chaque morceau a été découpé avec une lame stérile et transféré dans des micro-tubes de centrifugation auquel a été ajouté 1 ml d'eau stérilisée. Après agitation au vortex et centrifugation, 50  $\mu\text{l}$  de la phase aqueuse et 1/10, 1/100, 1/1000 des solutions diluées ont été étalées sur le milieu d'isolement. Les boîtes ont été cultivées à  $10^\circ \text{C}$  pendant 7 jours, et les colonies visibles ont été sélectionnées et sous-cultivées jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Les souches obtenues ont été maintenues dans une suspension de glycérol (20%, p / v) à  $-80^\circ \text{C}$ .

### **I. 3.1.2 Protocoles d'isolement des microorganismes endophytes**

✓ Méthode développée par A. Abdel-Lateff et al [43].

Les échantillons d'algues ont été rincées avec de l'eau stérile après stérilisation avec de l'éthanol 70%, et pressés sur des plaques de gélose pour détecter d'éventuelles spores fongiques résiduelles sur la surface des algues. Les algues stérilisées ont ensuite été découpées en morceaux et placées sur des plaques de gélose contenant du milieu d'isolement.

✓ Méthode développée par T. Shiba et N.Taga [11].

Les échantillons d'algues ont été rincés avec de l'eau de mer stérile pour éliminer les bactéries provenant de l'eau de mer de l'environnement. Les algues lavées ont été coupées pour donner cinq morceaux de 1cm. Après avoir été encore lavées avec de l'eau de mer stérile, ces cinq morceaux ont été mélangés pendant 3 minutes avec 30 ml d'eau de mer stérile contenant 1mg /ml de Tween 80. Les mélanges ont été glacés pour empêcher les bactéries de dommages de la chaleur. Les dilutions décimales d'algues et d'eau de mer ont été étalées sur des milieux d'isolement, et incubées à  $20^\circ \text{C}$  pendant 10 jours.

✓ Méthode développée par M. El-Gendy [21].

Les échantillons d'algues ont été Initialement lavés avec de l'eau de mer filtrée et stérilisée jusqu'à élimination totale des débris. Les surfaces d'algues ont été par la suite stérilisées par un lavage rapide à l'EtOH 70% et immédiatement immergées dans l'eau de mer stérilisée et filtrée. Un gramme de tissu d'algue a été transféré dans 99 ml de milieu de dissociation de l'éponge (sponge dissociation medium) (2,7% de NaCl, 0,008% de KCl, 0,01% de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8). Les échantillons ont été trempés pendant 20 minutes, puis le tissu et le diluant ont été macérés et l'homogénat a été étalé sur des plaques contenant le milieu d'isolement. Les plaques ont été incubées à température ambiante pendant 14 jours.

### I. 3.2 Culture des microorganismes pour la production des métabolites secondaires

La production de métabolites secondaires est généralement une caractéristique spécifique des microorganismes [47]. En effet, la fermentation est un procédé qui consiste à cultiver ces microorganismes dans le but de leur faire produire une substance ou une molécule d'intérêt. La plupart de ces procédés s'effectuent dans un environnement contrôlé avec des microorganismes choisis comme étant particulièrement producteurs, et une stratégie de fermentation prédéterminée.

À ce jour, les approches techniques utilisées pour cultiver les bactéries et les champignons marins ont atteint des normes différentes. Les échantillons prélevés sont exposés à différentes conditions et de formes de culture qui contribuent à l'obtention de micro-organismes capables de s'adapter aux conditions établies [4].

La culture des différents types de micro-organismes marins, particulièrement ceux qui ont un potentiel spécifique pour la production de métabolites biologiquement actifs, a été décrite principalement par des expériences à petite échelle. En effet, l'eau de mer artificielle ou 25:50:75:90 % eau de mer naturelle a servi de base pour des milieux nutritifs. Les concentrations en sources de carbone et d'azote ont atteint jusqu'à 2% (p/p): amidon, glucose, mélasse, glycerol, huile de soja, extrait de levure, extrait de malt, extrait de bœuf, peptone, liqueur de maïs et NZ-amine. En l'absence d'eau de mer artificielle ou naturelle, de fortes concentrations d'ions  $\text{Na}^+$  / $\text{Mg}^{2+}$  / $\text{Cl}^-$  ont été utilisées à la place. Les températures dans la gamme de 20 à 28 °C et un pH de 7,5 ont été favorisés [47].

La composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires [1]. Le tableau 4 regroupe les différentes compositions des milieux de culture ainsi que les conditions de culture des microorganismes associés d'algues marines utilisées pour la production de métabolites secondaires.

En effet, les métabolites secondaires sont généralement produits en faible quantité (de 1 à 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) par les souches sauvages, alors qu'une production ne devient rentable qu'à partir d'une synthèse de 5  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . L'amélioration du rendement repose sur l'optimisation des procédés de fermentation et la modification des souches, par recherche de mutants spontanés, par mutation dirigée lorsque les bases génétiques de la biosynthèse du métabolite sont connues, ou encore par construction de souches par coisement, fusion de protoplastes ou manipulation génétique.

**Tableau 4 : Culture et fermentation des microorganismes pour la production de métabolites secondaires**

Microorganismes	Métabolites isolés	Milieux de culture	Conditions de culture	Réf
<i>Aspergillus sp</i> <i>Phoma herbarum</i>	3,4-dihydroxyphényl (+)-époxydon	Milieu SWS : Soytone (0,1%) ; Amidon soluble (1,0%) ; Eau de mer (100%).	29 ° C ; 4 semaines (culture statique)	[29]
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetopyranin	Biomalt liquide : 3 g/L Extrait de malt, 3 g/L Extrait de levure, 5 g/L peptone, 24,4 g/L Sel de mer, 20 g/L Glucose.	40 jours ; Température ambiante	[37]
<i>Drechslera sp</i>	Sesquiterpene : Acide helminthosporique Helminthosporol Drechslerine A (+) Secolongifolene-diol	Milieu semi-solide (5L) : 5 g/L Biomalt, Eau de mer artificielle contenant les sels suivants (g/L): KBr (0,1), NaCl (23,48), MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (10.61), CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (1,47), KCl (0,66), SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (0,04), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3,92), NaHCO <sub>3</sub> (0,19), H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,03).	35tr/min ; 2 mois ; Température ambiante ; pH 5.5.	[43]
<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>QEN-24S</i>	1-(2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoyl)-glycerol	100 g de riz disponible dans le commerce ; 0,6 g Peptone ; 100 mL Eau distillée (Le milieu est maintenu pendant une nuit avant autoclavage).	Culture statique ; Température ambiante ; 30 jours.	[26]

<i>Phaeosphaeria spartinae</i>	Spartinoxide	10L du milieu solide Czapek-Dox avec 15 g/L d'agar.	40 jours, Température ambiante	[48]
<i>Curvularia sp</i>	Apralactone A	Le milieu solide de biomalt contenant 20 g/L de Biomalt, 15 g/L agar, Eau de mer artificielle contenant (g/L): KBr (0,1), NaCl (23,48), MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O (10,61), CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O × (1,47), KCl (0,66), SrCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O (0,04), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3,92), NaHCO <sub>3</sub> (0,19), H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,03).	7 semaines, Température ambiante	[49]
<i>Nocardia sp. AL44</i>	1,1-dichloro-4-ethyl-5-(4-nitro-phenyl)-hexan-2-one	Amidon 1,0% ; Glucose 1,0% ; Glycérol 1,0%, Poudre fine de maïs 0,25% ; Peptone 0,5%, Extrait de levure 0,2% ; NaNO <sub>3</sub> 0,1%, CaCO <sub>3</sub> 0,3% (Dans 100% Eau de mer).	120 tr/min ; 35°C ; 48 heures ; pH 7.2	[21]
<i>Penicillium sp</i>	Chromone A : 2-(hydroxymethyl)-8-methoxy-3-methyl-4H-chromen-4-one	Gélose à l'extrait de malt contenant : 50 g Extrait de malt, 15 g Gélose et 1 L d'eau de mer artificielle [(g / L): KBr (0,1), NaCl (23,48), MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (10,61), CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (1,47), KCl (0,66), SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (0,04), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3,92), NaHCO <sub>3</sub> (0,19), H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,03)]	2 mois ; Température ambiante	[39]

### **I. 3.3 Criblage biologique**

Après la croissance des micro-organismes au laboratoire sur des milieux nutritifs, le screening d'isolats pour l'activité biologique est effectué, par exemple, sur la base de l'inhibition de la croissance de micro-organismes qui entourent l'organisme d'essai, dans le cas d'agents antimicrobiens [45].

### **I. 3.4 Extraction et purification des composés biologiquement actifs**

Les milieux de production utilisés pour la préparation naturelle de métabolites secondaires biologiquement actifs sont complexes. Ces milieux peuvent devenir encore chargés vu que le microorganisme producteur peut sécréter plusieurs autres métabolites outre la ou les molécule(s) recherchée(s). L'extraction et la séparation de ces molécules d'intérêts du jus de fermentation, constituent une étape délicate et souvent tributaire de leurs caractéristiques. De ce fait, l'extraction et la purification de composés biologiquement actifs sont effectuées, suivies par l'élucidation structurale. A ce stade, une deuxième déréplication est réalisée pour exclure les composés déjà connus [45].

La procédure générale consiste à séparer par centrifugation la biomasse du jus de fermentation contenant les molécules d'intérêts. Par ailleurs, il est à noter que dans des cas assez rares, certaines molécules ne sont pas secrétées en totalité dans le surnageant et une fraction reste intracellulaire. Dans cette situation il faut traiter la biomasse par des moyens physiques. L'extraction et la purification des molécules actives du jus de fermentation nécessitent l'application de plusieurs techniques chimiques et physico chimiques. Cependant, bien que la procédure utilisée pour l'extraction et la purification des molécules bioactives soit assez générale, quelques étapes doivent être adaptées selon la nature de la molécule d'intérêt.

### **I. 3.5 Optimisation des conditions de culture des microorganismes**

Une fois les nouveaux composés sont identifiés, des expériences basées sur le choix de divers paramètres influençant le résultat d'expériences de culture, y compris la procédure d'enrichissement, les milieux de culture et les conditions d'incubation peuvent être évaluées afin d'optimiser les conditions de culture appropriées pour l'obtention des meilleurs résultats pour la croissance des microorganismes et la production de métabolites secondaires.

En effet, divers travaux de recherche ont rapporté l'optimisation des différentes conditions de croissance des microorganismes associées d'algues, dont nous citons le travail de *N-A. Mohammed et al.* [50] qui ont étudié dans un premier lieu l'influence de la composition du milieu de culture (salinité et composants) sur la production de métabolites bioactifs. En effet,



la bactérie *Enterobacter cloacae* isolée à partir de l'algue brune *Cystoseira myrica* a été cultivée en flacons de 250 ml contenant 100 ml des milieux suivants :

- Milieu I (50% eau de mer) contenant (g / l): extrait de levure 3, glucose 10, extrait de viande 1,5 et la peptone 6.
- Milieu II (50% de eau de mer) contenant (g / l): extrait de levure 4, glucose 4, extrait de malt 10.
- Milieu III (100% eau de mer) contenant (g / l): extrait de levure 4, glucose 4, extrait de malt 10.
- Milieu IV (50% eau de mer) contenant (g / l): peptone 5 et extrait de levure 1.
- Milieu V (100% d'eau de mer) contenant (g / l): peptone 5 et extrait de levure 1.

Les résultats de cette étude ont montré que le milieu I, principalement composé de 10 g de glucose dans 50% de l'eau de mer, est le plus favorable pour la production de composés bioactifs et a montré une inhibition contre la plupart des agents pathogènes utilisés. En revanche, la faible concentration du glucose dans les milieux II et III a conduit à une faible activité ou une perte complète d'activité. Ces résultats indiquent l'importance de la concentration de source de carbone et de salinité pour la production de composés bioactifs.

*N-A. Mohammed et al.* ont effectué également une étude physiologique portant sur l'influence de la température, le pH, les différents sels et sources de carbone, afin de déterminer les conditions appropriées pour la croissance de la bactérie *Enterobacter cloacae*.

#### ✓ Influence de la température

La bactérie a été incubée de manière statique dans Marine agar à différentes températures (40, 50, 60, et 70 ° C) pendant 28h afin de déterminer la température optimale pour la croissance.

#### ✓ Influence du pH

Les milieux bouillon nutritif (50 ml à 250 ml) ont été ajustés pour couvrir la gamme de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, et 10) à l'aide de NaOH 0,1 mol/l et 0,1 mol/l d'HCl et une solution tampon. Les suspensions (1 ml) ont été inoculées dans des flacons et agitées pendant 24 h. L'absorbance a été lue à 600 nm.

#### ✓ Influence des différents sels

La composition suivante : Peptone 0,3, extrait de levure 0,15, Agar 0,5 (g / l) a été ajoutée à 50 ml de 0,1 mol/l de chacune des solutions de sels suivantes: FeCl<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, K.phthalate, ZnSO<sub>4</sub>, EDTA.2Na, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>0.7H<sub>2</sub>O, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl, KI, CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, et MnCl<sub>2</sub>.

Une suspension (1 ml) a été utilisée pour inoculer le milieu, qui a été agitée à 30 °C, et l'absorbance a été lue à 600 nm après 28 h.

✓ Influence des différentes sources de carbone

Les sources de carbone telles que : galactose, glucose, raffinose, lactose, mannose, cellobiose, mannitol, glycérol, saccharose et maltose ont été utilisées dans des poids équivalents aux montants de carbone dans 2 g de glucose et ajoutés séparément à 50 ml du milieu contenant les éléments suivants (g/l): extrait de levure 0,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1, et MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5. Les milieux ont été inoculés avec 1 ml de suspension, incubés pendant 28 h, et l'absorbance est lue à 600 nm.

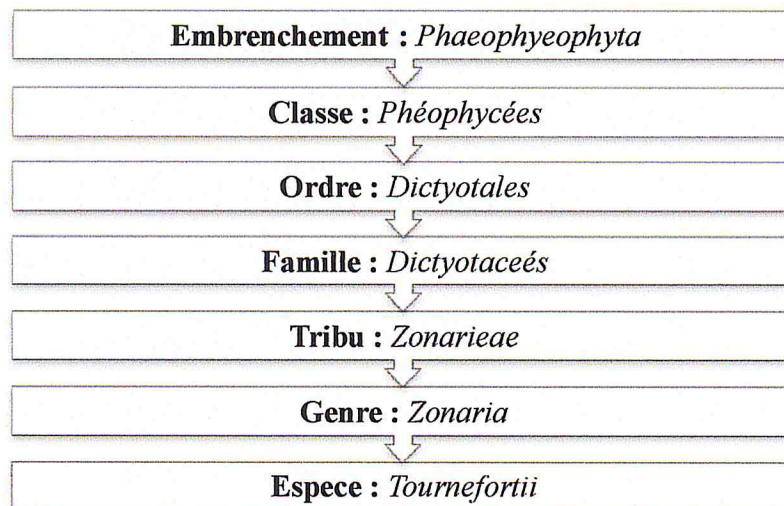
Les résultats de cette étude indiquent que les conditions favorables à la croissance maximale de la bactérie isolée étaient à 30 ° C et à un pH de 7. Les résultats de l'influence des différentes sources de carbones montrent que le maltose (100%) était l'élément nutritif le plus favorable pour l'organisme, suivi par le mannose (96,8%) et le raffinose (89,6%). L'addition de sels de potassium KI (100%) et KCl (59,5%) sur un milieu de culture a donné les résultats les plus favorables, suivis par le CaCl<sub>2</sub> (56,6) et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (51,6%).

## I. 4 Organismes biologiques objet de l'étude

### I. 4.1 L'algue brune *Zonaria tournefortii*

#### I. 4.1.1 Systématique

Actuellement appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne, antérieurement, cette espèce portait l'appellation *Fucus tournefourtii* (Lamouroux), *Zonari flavaclement C. Agardh* et *Padinatournefourtii* (Lamouroux) Montagne [51]. Cette espèce a pour systématique :



#### I. 4.1.2 Description

*Zonaria tournefortii*, est une algue possédant un thalle vertical, fixé au substrat par un crampon, très ramifié, composé de segments linéaires [52]. Les plantes matures sont touffues, de plus en plus en érections, et atteignant une hauteur de 6 à 7 pouces [53]. La couleur normale de l'algue est, en effet, d'un fauve verdâtre tirant sur le brun, et ce n'est que chez quelques individus malades que celle-ci passe au fauve clair jaunâtre [54].

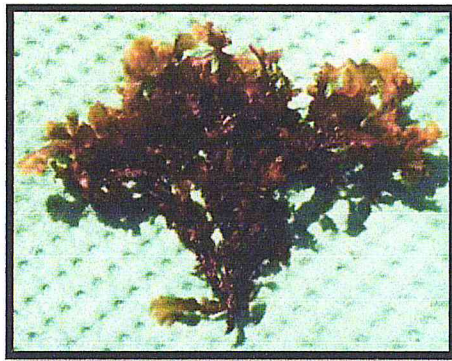


Figure 2 : photo de *Zonaria tournefortii*

#### I. 4.1.3 Biologie

Cette algue à biotopes sciaphiles est présente toute l'année. Elle est gamétophyte et sporophyte, à spores dispersés à la surface du thalle. Elle se trouve de la surface jusqu'à une quarantaine de mètres de profondeur [55].

#### I. 4.1.4 Ecologie

*Zonaria tournefortii* est une algue brune (ordre Dictyotale) se trouvant généralement dans les eaux profondes [52]. Elle possède une raie de répartition sur les côtes nord-est de l'océan atlantique (Afrique occidentale), dans l'atlantique nord-est et la méditerranée (à l'exception du golfe du lion et de l'adriatique) [51].

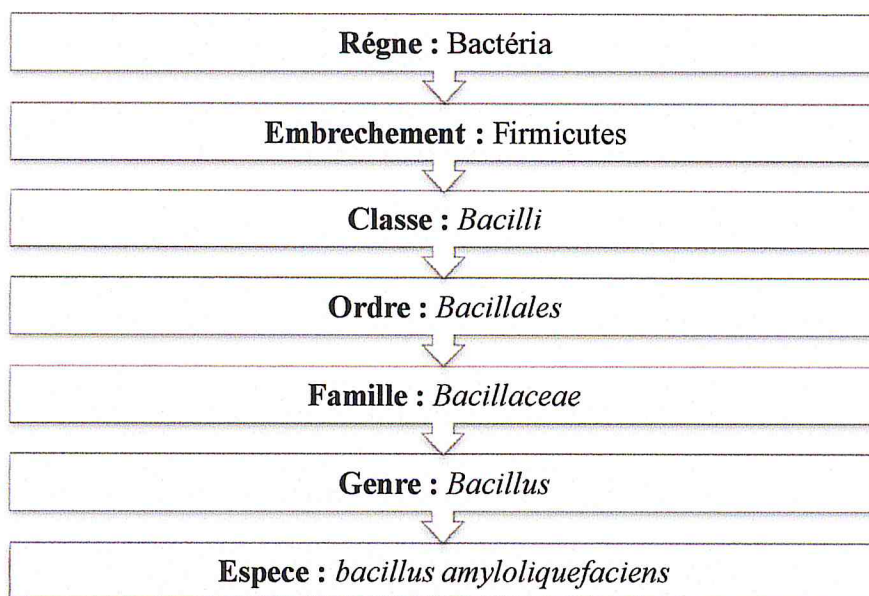
### I. 4.2 Présentation de *Bacillus amyloliquefaciens*

#### I. 4.2.1 Description

*Bacillus amyloliquefaciens* sont des tiges Gram positives avec des flagelles peritrichous permettant la mobilité. Les cellules apparaissent souvent comme de longues chaînes à la différence de beaucoup d'autres espèces de *Bacillus* qui se forment en une seule cellule. La température optimale pour la croissance cellulaire est comprise entre 30 et 40 degrés Celsius. Comme d'autres espèces de *bacillus*, *bacillus amyloliquefaciens* forme des endospores permettant une survie pendant une longue période de temps. Les endospores apparaissent centralement dans les cellules qui n'ont pas d'aspect gonflé [56].

### I. 4.2.2 Classification

Le genre *Bacillus* est omniprésent dans la nature, il est classé comme décrit par la figure suivant: [57].



### I. 4.2.3 Ecologie et pathogenèse

*Bacillus amyloliquefaciens* est une bactérie de sol non pathogène. Comme d'autres espèces de *bacillus*, *bacillus amyloliquefaciens* est capable de produire des endospores lui permettant de survivre pendant de longues périodes de temps.

L'espèce présente également des propriétés antifongiques qui sont influencées par la disponibilité de l'azote dans l'environnement [58].

# **PARTIE II**

## **Etude expérimentale**

## II. 1 Introduction

Le travail expérimental porte sur l'extraction et l'étude de la composition chimique des métabolites antimicrobiens volatils produits par une souche bactérienne marine « *Bacillus amyloliquefaciens* S13 » nouvellement isolée à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*. L'étude expérimentale comporte les parties suivantes :

- Identification phénotypique et moléculaire de *Bacillus amyloliquefaciens* S13
- Etude de l'effet antagoniste de la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* S13
- Cinétique de production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides
- Extraction des métabolites antimicrobiens volatils
- Etude de la composition chimique de fraction volatile par CG-SM

Les analyses bactériologiques et l'extraction des produits volatils ont été effectuées au niveau du laboratoire de recherche Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules de l'Université de Blida 1. L'analyse de la fraction volatile par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses physico-chimiques (CRAPC).

## II. 2 Matériel et méthodologie expérimentale

### II. 2.1 Origine de la souche bactérienne

#### II. 2.1.1 Récolte et isolement

La souche bactérienne (*Bacillus amyloliquefaciens* S13) a été nouvellement isolée dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) de l'Université de Blida 1 à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*.

Le prélèvement de l'espèce d'algue a été effectué en utilisant du matériel (gants, flacons, bistouri) stérilisés, La souche bactérienne (*Bacillus amyloliquefaciens* S13) a été ensuite isolée comme décrits dans la littérature [46, 10, 31, 43, 11,21].

#### II. 2.1.2 Conservation

- Conservation à courte durée : La souche pure a été repiquée sur milieu VNSS solide et conservée à +4 °C.
- Conservation à longue durée : A partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, la souche est conservée dans le milieu VNSS liquide en présence de 30 % de glycérol à - 80 °C.

### **II. 2.1.3 Identification phénotypique de la souche sélectionnée**

L'identification de la souche sélectionnée a été accomplie par des études morphologiques et physiologiques basées sur des observations microscopiques et des tests biochimiques.

#### **II. 2.1.3.1 Etude morphologique et observation microscopique**

##### **a) Observation a l'état frais**

La mobilité des bactéries a été étudiée par observation microscopique à l'état frais sur cultures en phase de croissance dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle, et confirmée par repiquage sur milieu spécifique : mannitol-mobilité.

##### **b) Coloration de Gram**

La coloration de gram est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (gram négatifs), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (gram positives).

Sur une lame en verre propre, un frottis de la souche isolée a été réalisé puis fixé par la chaleur sur la flamme du bec bunsen.

Le frottis préparé a été coloré avec une solution de violet de gentiane, qui est un colorant basique, pendant une minute. L'eau a été ajoutée pour éliminer l'excès de colorant en veillant à ne pas détacher le frottis. Après, le frottis a été recouvert de quelques gouttes de lugol pendant 30 secondes, puis rincé à l'eau. Le frottis a été ensuite décoloré par lavage avec un mélange d'éthanol. Cette dernière étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de gram.

Les bactéries de coloration gram positive gardent le violet de gentiane tandis que les autres le perdent et se décolorent. Le frotti sera recoloré au moyen d'un colorant basique de couleur rose (la fuchsine de Ziehl) diluée pendant 15 secondes puis rincé abondamment à l'eau du robinet.

Une fois séchée, la lame est examinée sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion ( $\times 100$ ).

#### **II.2.1.3.2 Etudes physiologiques**

##### **a) Test de l'oxydase**

Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-diméthyl paranitrophénylène-diamine, qui aura été préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile est déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif.

### **b) Test de la catalase**

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre à l'aide d'une pipette pasteur, une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes).

Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène.

### **c) Test de l'indole**

La production de l'indole est mise en évidence sur une eau peptonée, après ensemencement et incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h. Quelques gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu, après agitation, la présence d'indole se manifeste par apparition d'un anneau rouge en surface.

### **d) Test de mannitol-mobilité**

Ce test permet à la fois l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de l'hydrolyse du mannose et aussi de déterminer la mobilité. Le tube est ensemencé par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit et incubé pendant 24 h à la température adéquate. Un virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune à orange se manifeste en cas de réaction positive et la lecture de la mobilité est comme suit:

- Envahissement du milieu : La bactérie est dite mobile.
- Croissance concentrée autour de la piqure centrale : La bactérie est dite immobile.

## **II. 2.1.4 Identification moléculaire**

L'identification moléculaire de la souche bactérienne a été effectuée par ARN16S dans le cadre de la collaboration scientifique avec le CBS à Sfax (Tunisie) soutenue par le projet de recherche algéro-tunisien « TNDZMicrooZymes 2012-2016 ».

## **II. 2.2. Milieux de culture**

Le milieu de culture est un support qui permet la croissance des bactéries, champignons et levures. Il se compose d'un mélange des substances qui favorisent la multiplication des microorganismes. Il peut se présenter sous forme liquide ou solide, par addition d'agar (solidifiant).

### **II. 2.2.1 Milieu de repiquage**

Le repiquage des souches a été effectué par le milieu Luria Bertani (LB). La composition chimique est constituée de : 10 g peptone, 5 g extrait de levure, 10 g NaCl et 20g agar. Le milieu de culture Luria Bertani (LB) a été coulé aseptiquement dans des boîtes de Pétri, puis laissé refroidir et solidifier sur la paillasse.



Les souches bactériennes ont été ensemencés à l'aide d'une pipette pasteur sur les boites de Pétri. Ces boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 h.



**Figure 3 :** Repiquage de la Souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13

### II. 2.2.2 Milieux de production

La composition chimique des différents milieux de culture de production utilisés dans notre étude est donnée ci-après.

- ***Milieu Vaätanen Nine Salt Solution (VNSS)***

17,6 g NaCl, 1,47 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,08 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,25 g KCl, 0,04 g KBr, 1,87 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,41 g CaCl<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O, 0,01 g SrCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O, 0,010 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 g Peptone, 0,5 g Extrait de levure, 0,5 g Glucose, 0,5 g Amidon soluble, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 0,01 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

- ***Milieu 333***

5 g Glucose, 3 g Peptone, 3 g Extrait de levure, 10 g Amidon, 2 g CaCO<sub>3</sub>, 3 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, dans 1 L L'eau distillée.

- ***Milieu international streptomyces project 2 (ISP2)***

4 g Extrait de levure, 10 g Extrait de malte, 4 g Glucose, dans 1 L L'eau distillée.

- ***Milieu Bennett***

10 g Glucose, g Peptone, g Extrait de levure, dans 1 L L'eau distillée.

- ***Milieu Zobell***

0,5 g Peptone, 0,1 g Extrait de levure, 800 ml eau de mer, 1L eau ultra pur.

Tous les milieux de culture utilisés ont été stérilisés par autoclavage (Annexe 1) pendant 20 min à 120 °C et leur pH a été ajusté à 7.2 par les solutions : NaOH (0.1 N) et HCl (0.1N).

## **II. 2.3 Etude de l'effet antagoniste de la souche bactérienne**

### **II. 2.3.1 Microorganismes cibles**

Le test antagoniste a été réalisé sur un panel de micro-organismes identifiés avec un numéro ATCC (*American Type Culture Collection*) comprenant huit bactéries, cinq à Gram positif, *Bacillus subtilis* (ATCC 6663), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 49594), *Micrococcus luteus* (LB 14110) et *Bacillus cereus* (ATCC 14975), et trois à Gram négatif, à savoir *Escherichia coli* (ATCC 43300), *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 23308) et *Salmonella enterica* (CIP 80.39), deux levures, *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) et un champignon *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

### **II. 2.3.2 Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'Agar**

La technique consiste à ensemencer un tapis bactérien de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 sur le milieu ISP<sub>2</sub>. Après incubation à 30°C pendant 7 jours, des cylindres d'agar de 9 mm de diamètre ont été ensuite prélevés et déposés à la surface du milieu ISP<sub>2</sub> préalablement ensemencé avec les bactéries-tests. Les boîtes ont été maintenues à 4°C pendant 4 heures avant d'être incubées pour permettre une meilleure diffusion, puis elles ont été incubées pendant 24 heures à 37°C pour les bactéries et à 28°C pour les champignons et les levures. Le résultat positif a été traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance de la souche testée.

## **II. 2.4 Etude de la production des métabolites antimicrobiens sur milieux liquides**

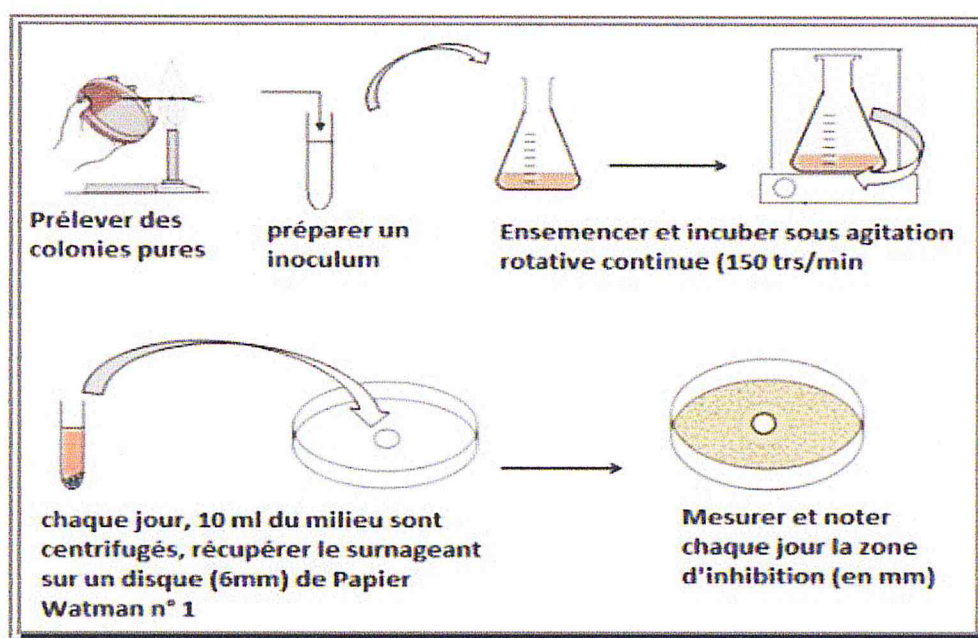
### **II. 2.4.1 Cinétiques de production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides**

Dans le but de déterminer le milieu de culture qui donne une meilleure production des métabolites antimicrobiens en un temps optimal, nous avons comparé cinq milieux de cultures différents à savoir ISP<sub>2</sub>, 333, Bennett, VNSS, *Zobell*.

Les différents milieux de culture ont été préparés dans des flacons de volume de 500 ml contenant chacun 100 ml de chaque milieu, le pH a été ajusté à 7,2. Une préculture de la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* S13 a été préparée dans un flacon contenant 30 ml du milieu ISP<sub>2</sub> et incubée à 30°C pendant 24 heures. Un volume de 3 ml de la préculture a été utilisé pour inoculer 100 ml des différents milieux de cultures (ISP<sub>2</sub>, 333, Bennett, VNSS, *Zobell*). Les cultures ont été ensuite incubées dans un incubateur agitateur (Annexe 1) à 30°C pendant 7 jours. Des prélèvements ont été effectués en cours de fermentation toutes les 24 h afin de réaliser la cinétique de production.

Les cultures prélevées ont été centrifugées à l'aide d'une centrifugeuse de type HETTICH (Annexe 1) à 60 tour/min pendant 30 minutes afin de récupérer le surnageant de culture nécessaire pour la réalisation des activités antimicrobiennes.

L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la méthode des puits qui consiste à déposer 20  $\mu$ l du surnageant de culture par puits sur des boîtes du milieu ISP<sub>2</sub> préalablement ensemencées par les souches indicatrices, après diffusion, les boîtes ont été incubés à 37°C pendant 24h. Les diamètres d'inhibition autour des disques ont été alors mesurés.

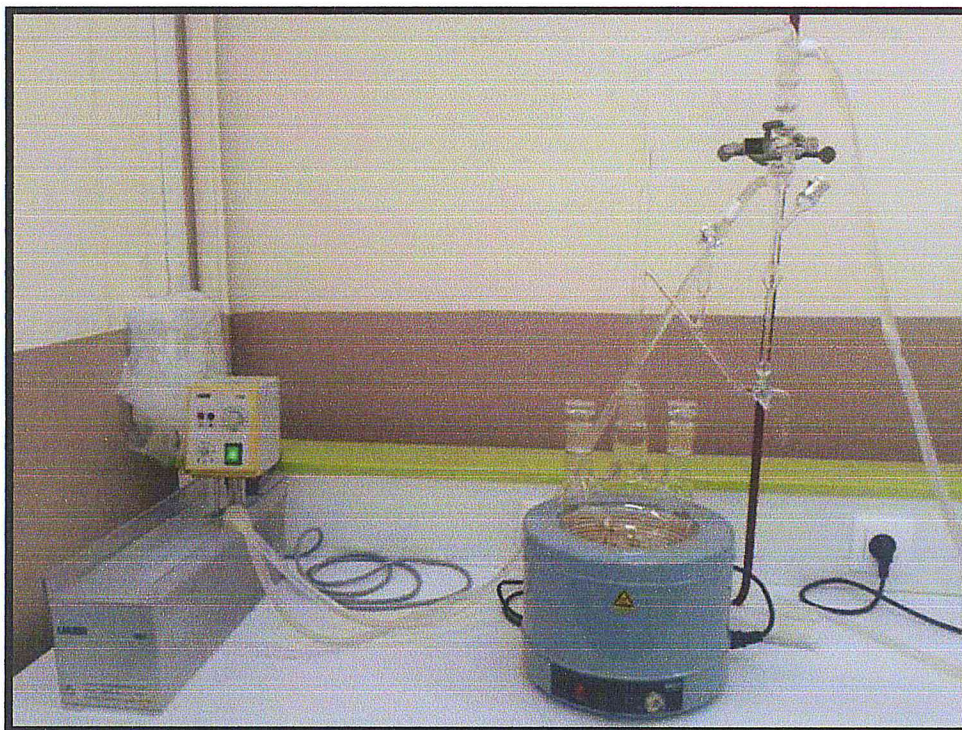


**Figure 4** : Protocole expérimental de la cinétique de production des métabolites antimicrobiens

## II. 2.4.2 Extraction des métabolites antimicrobiens volatils

### II. 2.4.2.1 Description du dispositif d'extraction

L'extraction des métabolites antimicrobiens volatils a été réalisée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger (Figure 5). Le procédé consiste à faire soumettre le surnageant de culture obtenu après centrifugation dans les conditions optimales à une hydrodistillation. Il se produit alors l'entraînement des produits volatils sous forme d'hétéroazéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullitions des deux composés. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les produits volatils se séparent de l'eau par différence de densité.



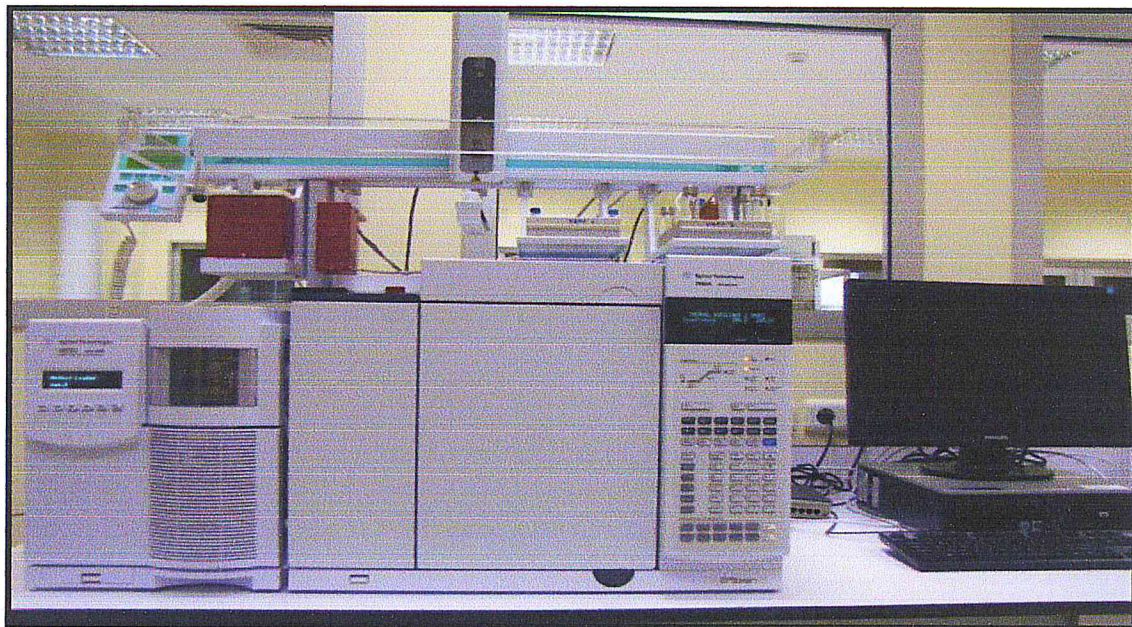
**Figure 5 :** Dispositif expérimental d'hydrodistillation de la fraction volatile par Clevenger

#### **II. 2.4.2.2 Traitement de l'hydrolat**

L'hydrolat (fraction volatile et eau) obtenu de l'étape d'hydrodistillation est soumis à une extraction liquide-liquide avec un volume d'éther diéthylique distillé afin de récupérer la fraction volatile. Le mélange se sépare en deux phases distinctes (Annexe 2): une phase organique contenant la fraction volatile solubilisée dans l'éther diéthylique en haut et une phase aqueuse formée d'eau et de quelques traces de la fraction volatile soluble dans l'eau. La phase aqueuse subit une deuxième extraction avec l'éther diéthylique pour épuiser au maximum la fraction volatile. Les phases organiques obtenues de chaque extraction sont regroupées et filtrées sur du sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) afin d'éliminer toute traces d'eau et enfin l'évaporation de l'éther a été effectuée en utilisant l'évaporateur rotatif (Annexe 2). La fraction volatile ainsi obtenue est mise dans un flacon propre hermétiquement fermé et conservée à 4°C pour des analyses ultérieures.

#### **II. 2.5 Analyse de la fraction volatile par CG/SM**

La fraction volatile obtenue a été soumise à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'analyse a été réalisée sur un chromatographe de type HP 6800 couplé à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973.



**Figure 6 :** Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

Les conditions d'analyses sont les suivantes :

**Injecteur**

Température : 250°C

Mode d'injection : Splitless (avec division) =1/90

Volume injecté : 1µl

**Colonne :**

Type : HP-5MS

Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane.

**Température du four :**

90°C pendant 5 min, 3°C/min jusqu'à 250°C, isotherme pendant 10 min.

**Gaz vecteur :**

Nature : Hélium

Débit GV : 0.8ml/min

**Détecteur de masse :**

Mode d'analyse : Scan TIC (m/z : 30 - 550)

Température de l'interface : 270 °C

Type d'ionisation : Impact électronique

Intensité du filament : 70 ev

Type de l'analyseur de masse : Quadripôles

Température de la source : 230 °C

### III. 3 Résultats et discussions

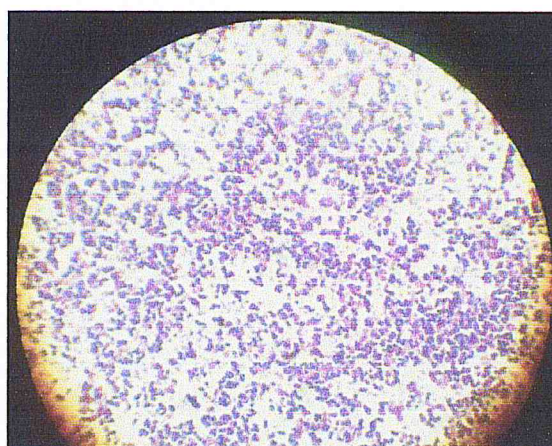
#### III. 3.1 Etude morphologique et observation microscopique

##### III. 3.1.1 Observation a l'état frais

L'observation microscopique, à l'état frais, a montré que la souche S13 est une bactérie en forme de bacille mobile.

##### III. 3.1.2 Coloration de Gram

L'observation du frottis coloré au microscope optique à l'objectif à immersion (G×100) montre que la souche isolée est à coloration de gram positive.



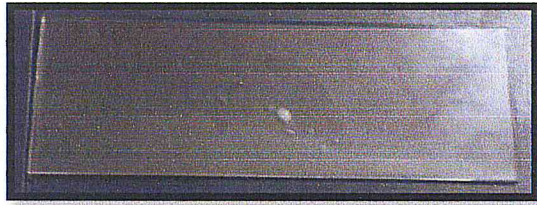
**Figure 7 :** Observation microscopique des cellules bactériennes après fixation (coloration de gram).

#### III. 3.2 Etudes physiologiques

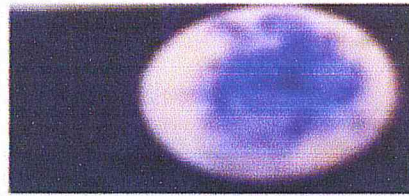
Nous avons effectué des tests bactériologiques préliminaires d'orientation. Cette analyse a révélé qu'il s'agit d'une souche, mobile, Gram positive, oxydase positive et catalase positive (tableau 5). Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène, L'apparition d'une coloration violette indique que le test est positif (oxydase positif), Sur le milieu mannitol- mobilité, la fermentation du mannitol a été observée grâce au virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune orangé, la présence d'indole se manifeste par apparition d'un anneau rouge en surface (figure 8).

**Tableau 5 :** Résultats préliminaires des tests d'identification

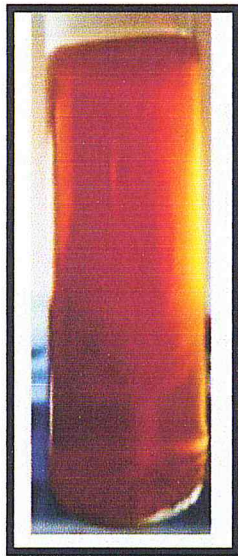
Test	Résultat
Catalase	+
Oxydase	+
Mannitol	+
Indole	+



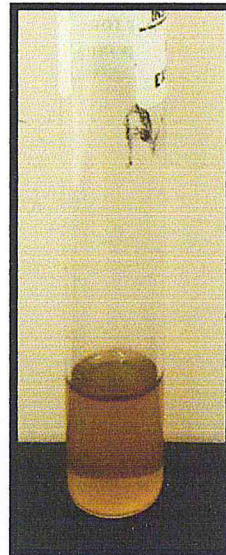
**A : Test de la Catalase : Formation de bulles de gaz**



**B : Test de l'Oxydase : apparition d'une couleur violette.**



**C : Test du mannitol- mobilité**



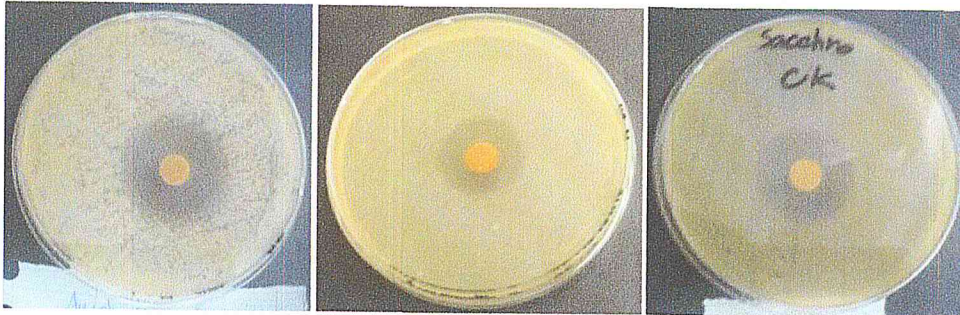
**D : Test de l'indole : apparition d'un anneau rouge en surface.**

**Figure 8 : Résultat des tests bactériologiques**

### III. 3.2 Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'Agar

Le test antagonisme de la souche bactérienne *B. amyloliquefaciens* a été mis en évidence par la technique des cylindres d'Agar. La technique nous a permis de détecter l'effet inhibiteur de la souche vis-à-vis des bactéries-tests et champignons-tests utilisés.

Les résultats obtenus (figure 9) montrent que la souche *B. amyloliquefaciens* présente une activité contre *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Saccharomyces cerevisiae* seulement, alors que l'activité inhibitrice contre les autres bactéries n'a pas été observée.



**Figure 9** : Activité antimicrobienne de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 contre *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les résultats de ce premier test montrent que la souche *B. amyloliquefaciens* S13 présente une activité antimicrobienne, nous allons donc poursuivre le travail par l'étude de la production des métabolites antimicrobiens en milieux de culture liquide. A partir des résultats de ce test, nous retenons également les souches cibles à utiliser pour la cinétique de production. Ce sont trois souches, deux bactéries (*Bacillus subtilis* gram positive, *Agrobacterium tumefaciens* gram négative), et une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, les plus sensibles à l'activité antimicrobienne de la souche *B. amyloliquefaciens*. Nous les utiliserons donc comme germes cibles, lors de la cinétique de production en milieux de culture agités.

### III. 3.3 Cinétique de production des métabolites antimicrobiens en milieux liquides

Afin d'évaluer l'influence du milieu de culture sur la production des métabolites antimicrobiens produits par la souche *B. amyloliquefaciens* S13, cinq milieux (ISP<sub>2</sub>, VNSS Bennett, 333, et Zobell) ont été utilisés.

L'activité antimicrobienne est détectée en utilisant trois souches bactériennes, à savoir *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Saccharomyces cerevisiae*.

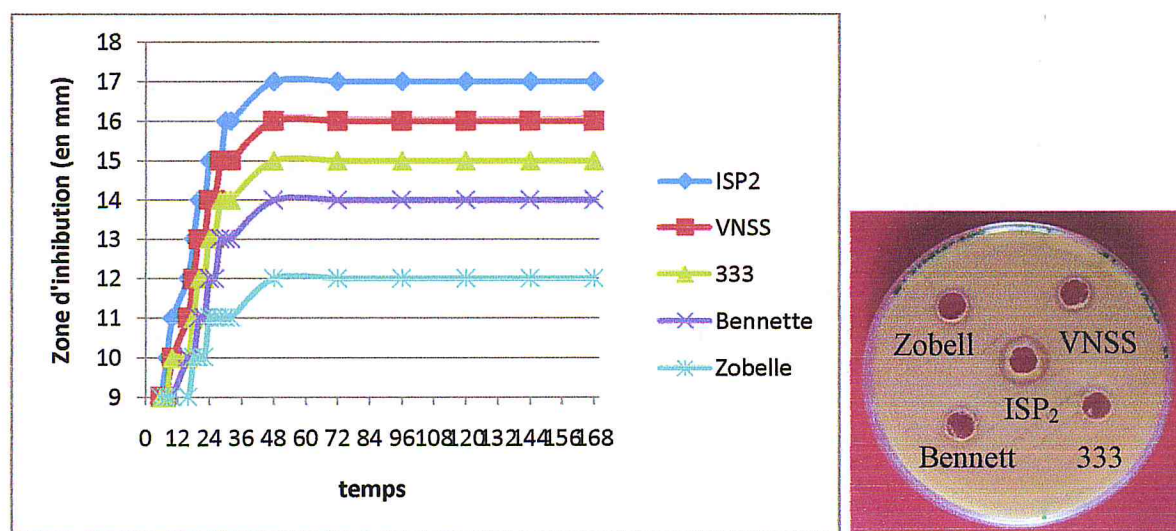
Au cours de la fermentation, la production des métabolites antimicrobiens (méthode de diffusion des puits) est mesurée quotidiennement pendant 7 jours.



Les résultats obtenus sont donnés sur les tableaux (6-8) et les figures (10-12).

**Tableau 6 :** Cinétique de production des métabolites antimicrobiens de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 contre *Bacillus subtilis* en fonction des milieux de production

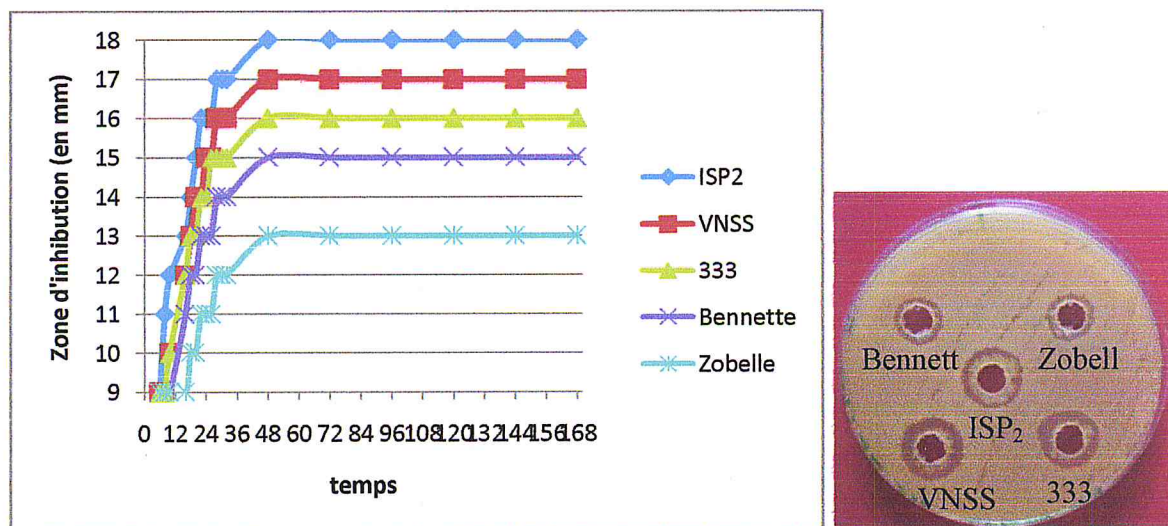
temps (h)	ISP2	VNSS	333	Bennett	Zobell
6	9	9	9	9	9
8	10	9	9	9	9
16	12	11	10	10	9
18	13	12	11	10	10
20	14	13	12	11	10
22	14	13	12	11	10
24	15	14	13	12	11
26	15	14	13	12	11
28	15	15	14	13	11
30	16	15	14	13	11
32	16	15	14	13	11
48	17	16	15	14	12
72	17	16	15	14	12
96	17	16	15	14	12
120	17	16	15	14	12
144	17	16	15	14	12
168	17	16	15	14	12



**Figure 10 :** Activité antibactérienne de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 en différents milieux complexes contre *Bacillus subtilis*

**Tableau 7 :** Cinétique de production des métabolites antimicrobiens de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 contre *Agrobacterium tumefaciens* en fonction des milieux de production

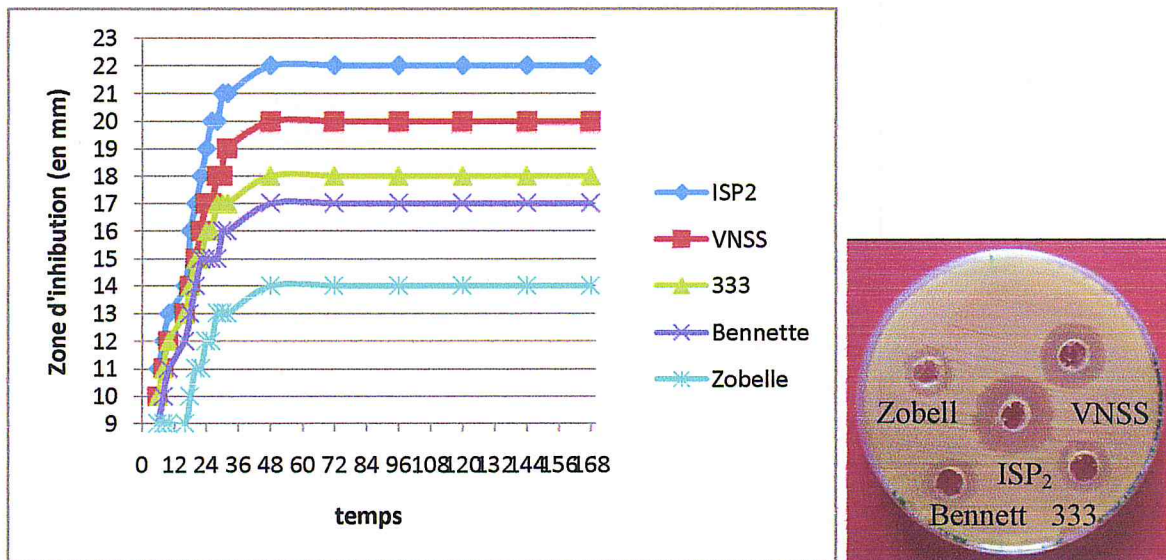
temps (h)	ISP2	VNSS	333	Bennett	Zobell
6	9	9	9	9	9
8	11	9	9	9	9
16	13	12	12	11	9
18	14	13	13	12	10
20	15	14	13	12	10
22	16	14	14	13	11
24	16	15	14	13	11
26	16	15	15	13	11
28	17	16	15	14	12
30	17	16	15	14	12
32	17	16	15	14	12
48	18	17	16	15	13
72	18	17	16	15	13
96	18	17	16	15	13
120	18	17	16	15	13
144	18	17	16	15	13
168	18	17	16	15	13



**Figure 11 :** Activité antibactérienne de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 en différents milieux complexes contre *Agrobacterium tumefaciens*

**Tableau 8 :** Cinétique de production des métabolites antimicrobiens de la souche *B. amyloliquefaciens* S13 contre *Saccharomyces cerevisiae* en fonction des milieux de production

temps (h)	ISP2	VNSS	333	Bennett	Zobell
6	11	10	10	9	9
8	12	11	11	10	9
16	14	13	13	12	9
18	16	14	14	13	10
20	17	15	15	14	11
22	18	16	15	15	11
24	19	17	16	15	12
26	20	17	16	15	12
28	20	18	17	15	13
30	21	18	17	16	13
32	21	19	17	16	13
48	22	20	18	17	14
72	22	20	18	17	14
96	22	20	18	17	14
120	22	20	18	17	14
144	22	20	18	17	14
168	22	20	18	17	14



**Figure 12 :** Activité antibactérienne de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 en différents milieux complexes contre *Saccharomyces cerevisiae*

A travers l'examen des résultats obtenus tableaux (6-8) et figure (10-12), nous avons constaté que, indépendamment des cinq milieux utilisés (ISP<sub>2</sub>, VNSS, Bennet, 333, Zobell), la production des métabolites antimicrobiens contre les trois souches (*Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*) débute directement par une phase d'accélération jusqu'à 48 h où la production atteint son maximum, s'en suit un pallier où l'activité reste relativement constante.

Toutefois ; nous avons constaté que la meilleure activité a été obtenue sur le milieu ISP<sub>2</sub> par *Saccharomyces cerevisiae* avec un diamètre d'inhibition de 22 mm, suivi de celle obtenue sur le milieu VNSS par la même souche avec un diamètre d'inhibition de 20 mm. Cependant, les quatre milieux ISP<sub>2</sub>, VNSS, Bennet et 333, et à l'exception du résultat montré précédemment, ont mené à des activités relativement proches pour les trois souches avec des diamètres d'inhibition compris entre 14 et 18 mm. Il y a lieu de révéler que le milieu Zobell mène à des activités faibles pour les trois souches.

A travers ces résultats, nous constatons que le milieu ISP<sub>2</sub> donne les meilleurs résultats, il va être utilisé pour la suite du travail. Également, nous avons retenu un temps de 48 h pour la production.

### III. 3.4 Analyse de la fraction volatile par CG/SM

L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant (II.2.5) a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 9. Le profil chromatographique de la fraction volatile est présentée par la figure 14.

**Tableau 9 :** Composition chimique de la fraction volatile produite par la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens S13*

Ordre d'élution	Tr (min)	Nom du composé	Formule	% Aire
01	5,65	Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.03
02	22,20	2-Tetradecene (E)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	0.11
03	26,48	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0.18
04	29,37	2,4-Di-tert-butylphenol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	3.14
05	29,67	δ-Cadinene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.25
06	32,92	Caryophyllene oxide	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0.14
07	33,62	Hexadecene	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	0.34
08	35,51	Muurolo-4,10(14)-dien-1β-ol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0.17
09	36,26	T.-Muurolool	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.24
10	36,52	Copaene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.05
11	36,96	α-Cadinol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.18
12	38,02	Cadaline	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub>	0.06
13	44,34	5-Octadecene	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>	0.63
14	46,98	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	0.09
15	49,82	8,15-Pimaradiene	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	0.59
16	50,71	7,9-Di-tert-butyl-1 oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	0.39
17	50,89	Biformene	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	1.15
18	51,37	Isopimara-8(14)15-diene	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	0.14

19	51,67	15,16-Dinorlabdane,8,13:13,20-diepoxy-,(13S)-	$C_{18}H_{30}O_2$	0.43
20	52,17	15,16-Dinorlabd-8(20)-en-13-one	$C_{18}H_{30}O$	13.17
21	53,71	Sclarene : Labda-8(20),13(16),14-triene	$C_{20}H_{32}$	1.76
22	54,25	E-15-Heptadecenal	$C_{17}H_{32}O$	0.27
23	55,06	Epi-13-Manoyl oxide : 8 $\alpha$ -13-oxy-14-en-epilabdane	$C_{20}H_{34}O$	29.39
24	55,76	Kaur-16-ene	$C_{20}H_{32}$	0.12
25	57,11	Manool : Labda-8(20),14-dien-13-ol	$C_{20}H_{34}O$	17.39
26	60,64	<b>NI 1</b>	/	0.35
27	64,69	Labda-8(17),13E-dien-15-al	$C_{20}H_{32}O$	0.88
28	64,90	Labda-8(17),13Z-dien-15-ol	$C_{20}H_{34}O$	9.51
29	66,28	<b>NI 2</b>	/	1.87
30	67,67	n-Tricosane	$C_{23}H_{48}$	0.56
31	68,71	<b>NI 3</b>	/	1.93
32	70,74	<b>NI 4</b>	/	5.26
33	75,60	Pentacosane	$C_{25}H_{52}$	0.38
34	82,97	Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	0.24

NI : Non identifiés.

Les données de spectres de masse des produits non identifiés sont représentées sous forme de m/z (abondance en %) pour les principaux fragments :

NI1 : 18 (28), 28 (71), 41 (87), 55 (84), 69 (75), 81 (95), 91(54), 95 (98), 105 (33), 109 (57), 137 (100), 149 (19), 216 (33), 259 (13), 274 (20).

NI2 : 28 (26), 43 (80), 55 (57), 67 (45), 81 (61) ,95 (45), 109 (36), 121 (34), 135 (56), 175 (33), 190 (33), 205 (72), 291 (100).

NI3 : 43 (83), 55 (53), 69 (78), 83 (100), 95 (85), 109 (62), 123 (53), 137 (89), 149 (33), 161 (17), 177 (18), 189 (17), 204 (31), 257 (63).

NI4 : 43 (100), 55 (38), 67 (29), 81 (50), 95 (32), 107 (31), 121 (30), 135 (56), 147 (28), 161 (15), 175 (47), 190 (60), 255 (81), 333 (92).

L'analyse par CG/SM de la fraction volatile du surnagent de culture a permis de relever 34 composés. L'identification a été faite en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS.75K.1 de l'appareil ainsi que sur les données de la littérature. Nous avons pu identifier avec exactitude 30 produits, Concernant les produits non identifiés, nous avons donné le rapport m/z ainsi que le pourcentage des principaux fragments de leur spectre de masse.

L'examen de la composition chimique des produits identifiés (tableau 9) révèle la présence de trois classes, la classe des terpènes, largement majoritaire, la classe des hydrocarbures (alcane et alcène) et une classe de composés diversement fonctionnalisés.

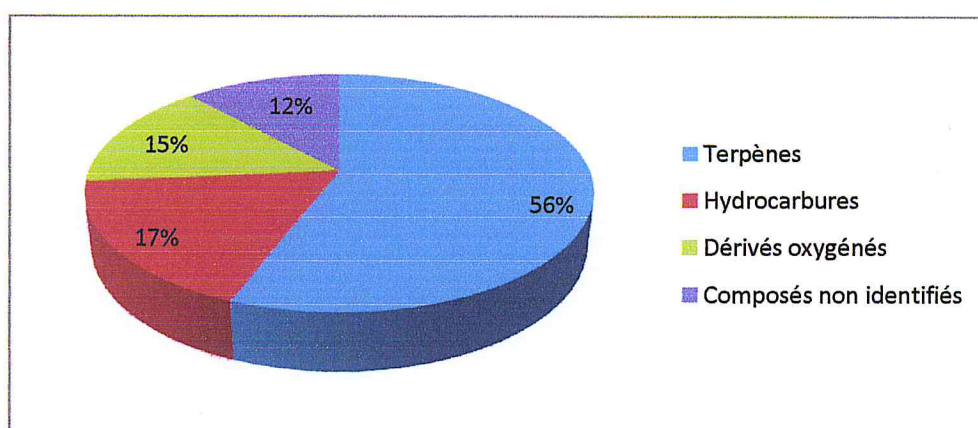
Dans la classe des terpènes, on retrouve un monoterpène (planche 1), en l'occurrence le limonene, sept sesquiterpènes (planche 2) ( $\delta$ -Cadinene, Caryophyllene oxide, Muurola-4,10(14)-dien-1 $\beta$ -ol, T.-Muurolol, Copaene,  $\alpha$ -Cadinol, Cadalin) et un groupe de diterpènes appartenant au même squelette à savoir les labdanes (planche 3). La classe des diterpènes se retrouvent quelques fois dans la composition des huiles essentielles d'organismes terrestres et même marines [59-60].

La classe des hydrocarbures saturés (alcane) et insaturés (alcène) se retrouvent couramment dans la composition des huiles essentielles [61].

Dans la classe diversement fonctionnalisée, on retrouve des composés phénoliques comme le 2,4-Di-tert-butylphenol et des structures plus complexes comme 7,9-Di-tert-butyl-1 oxaspiro (4,5) deca-6,9-diene-2,8-dione. Ce sont des composés couramment rencontrés dans la composition chimique des huiles essentielles de divers organismes.

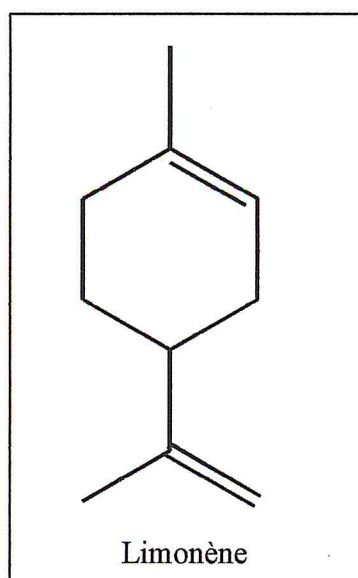
Nous avons représenté les différentes classes chimiques présentes dans la composition chimique (tableau 9) sous forme d'un secteur (figure 13).

La composition chimique de la fraction volatile de *Zonaria tournefortii* est dominée par la présence de 56 % des terpènes, dont les principaux sont des diterpènes, sesquiterpènes et un monoterpène. Nous avons notés la présence des dérivés oxygénés avec une teneur de 15 %. Les hydrocarbures représentent 17 % de la composition globale, notamment les alcènes et les alcanes. Le nombre de composés non identifiés représente 12 %.



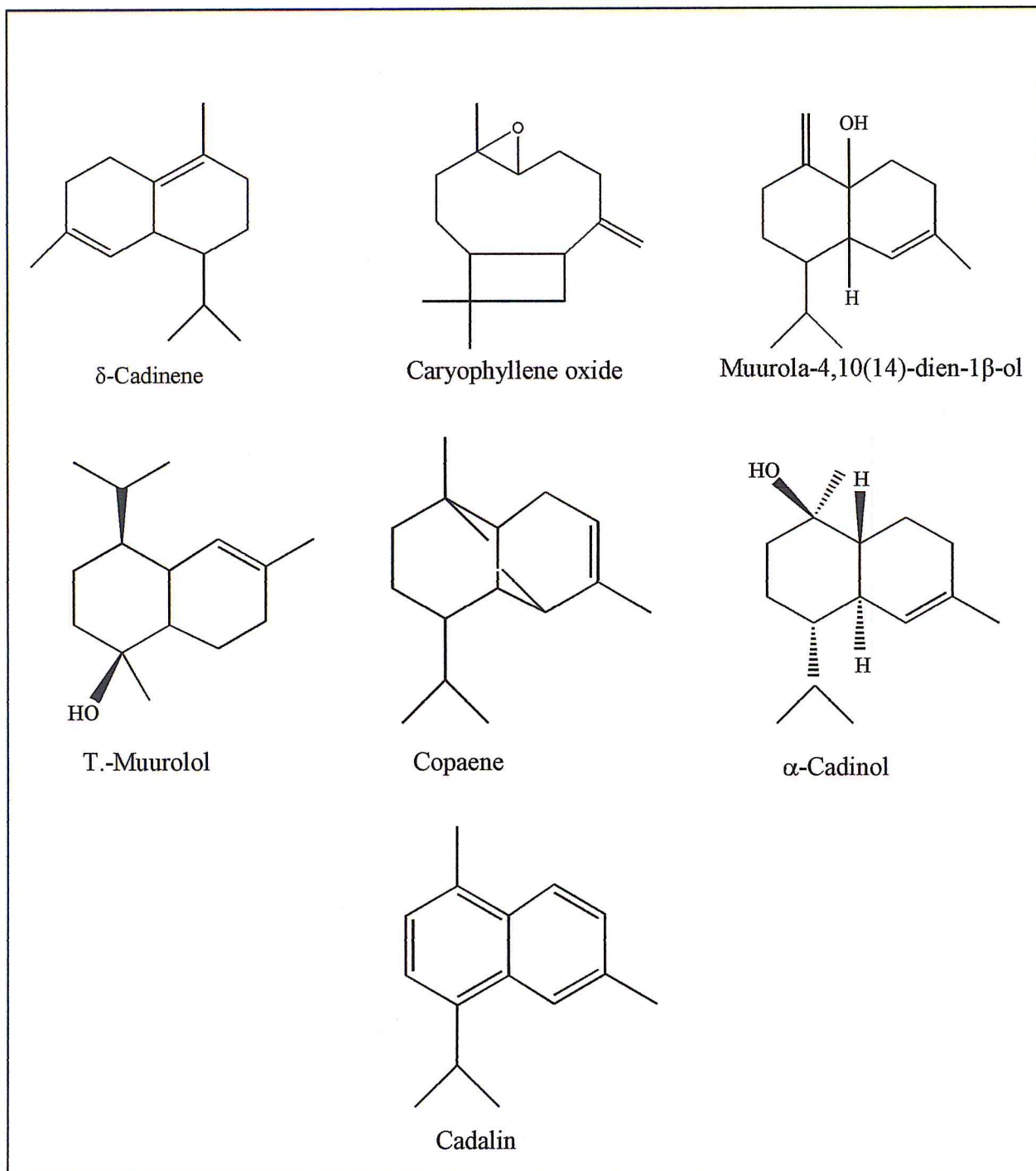
**Figure 13 :** Composition chimique de la fraction volatile produit par *B. amyloliquefaciens* S13

➤ **Structure des terpènes identifiés dans la fraction volatile de *Zonaria Tournefortii***

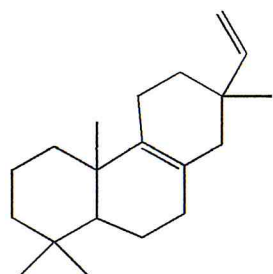


**Planche 1 :** Structure d'un monoterpène identifiés dans la fraction volatile

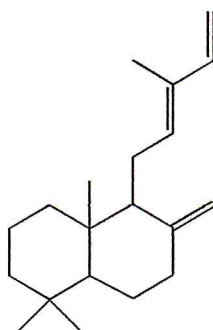




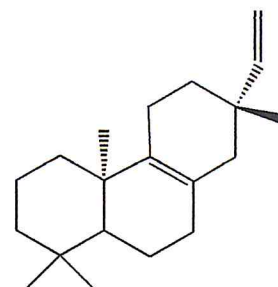
**Planche 2** : Structure des sesquiterpènes identifiés dans la fraction volatile



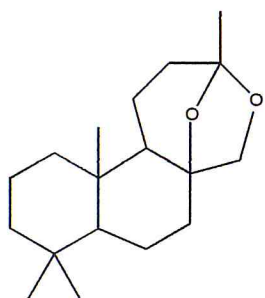
8, 15-Pimaradiene



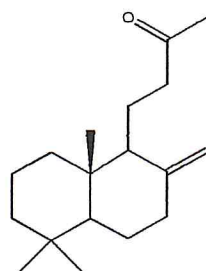
Biformene



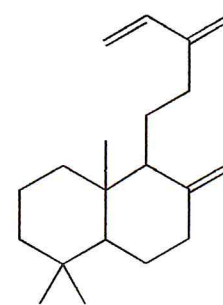
Isopimara-8(14)15-diene



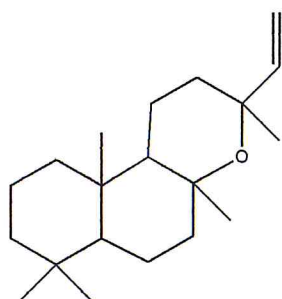
15, 16-Dinorlabdane, 8, 13:13, 20-diepoxy-, (13S)-



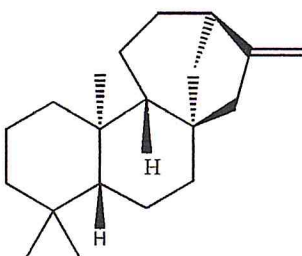
15, 16-Dinorlabd-8(20)-en-13-one



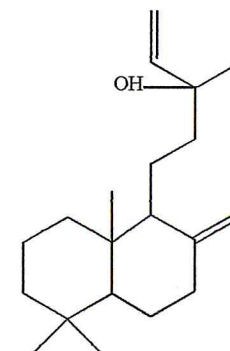
Sclarene : Labda-8(20),13(16),14-triene



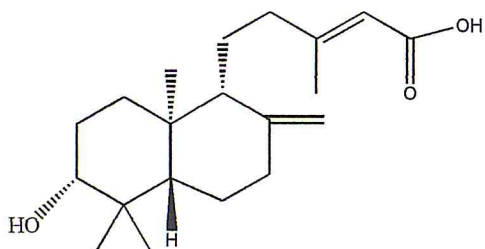
Epi-13-Manoyl oxide



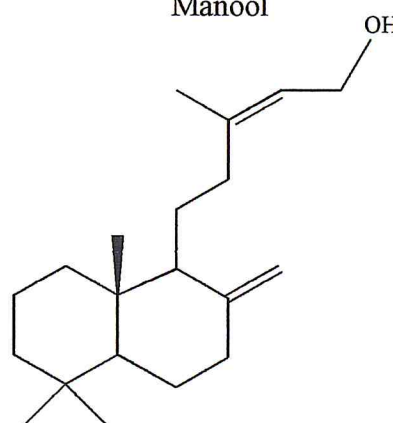
Kaur-16-ene



Manool



Labda-8(17), 13E-dien-15-al



Labda-8(17), 13Z-dien-15-ol

Planche 3 : Structure des diterpènes identifiés dans la fraction volatile

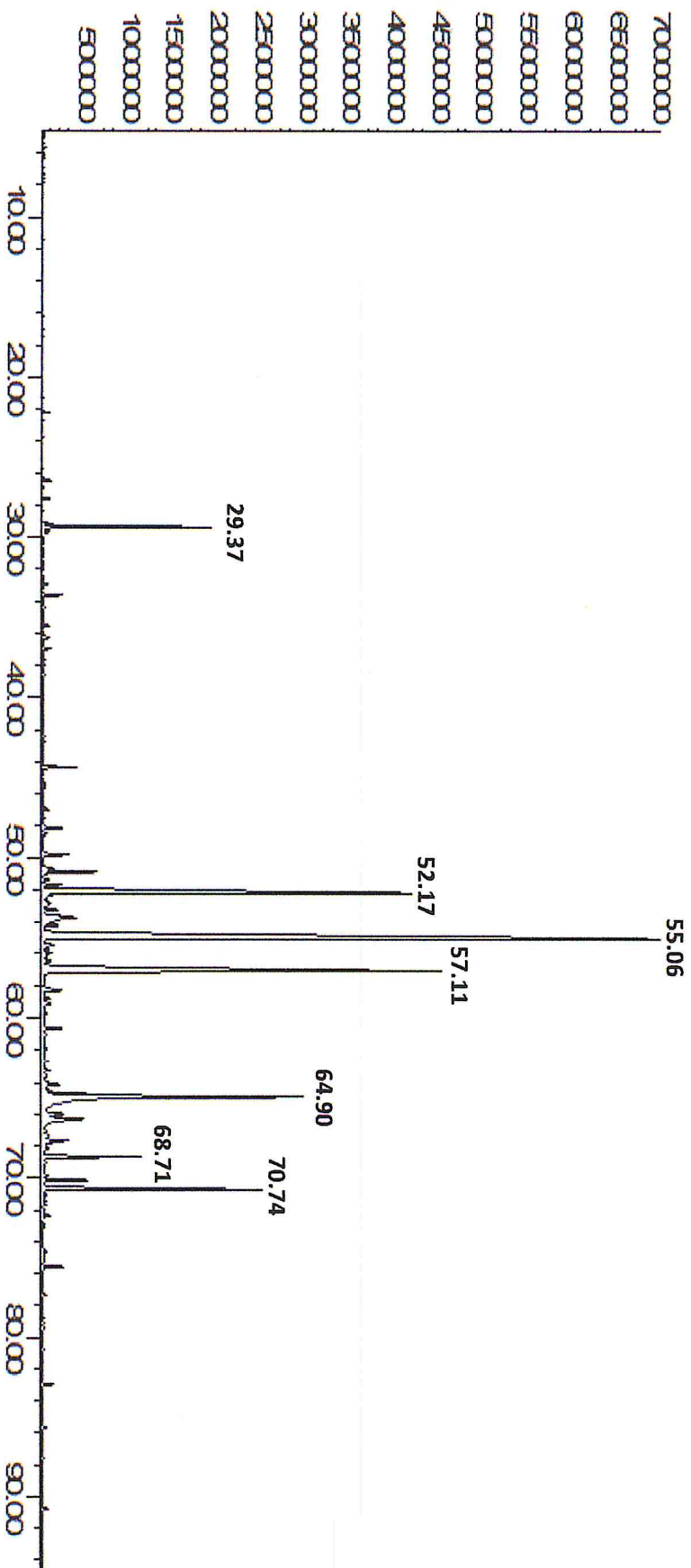


Figure 14 : Profil chromatographique d'analyse de la fraction volatile produite par la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* S13

# **CONCLUSION GENERALE**

## Conclusion générale

Le présent travail est consacré à l'étude des métabolites antimicrobiens volatils de la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* S13 nouvellement isolée à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*.

Le test antagonisme de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 a été réalisé par la technique des cylindres d'Agar. La technique nous a permis de détecter l'effet inhibiteur de la souche vis-à-vis des bactéries et champignons-test. Les résultats de ce premier test montrent que la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13 présente une activité contre trois bactéries (*Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Saccharomyces cerevisiae*).

Afin de déterminer le milieu et le temps de production optimal, cinq milieux de culture différents à savoir (ISP<sub>2</sub>, 333, Bennett, VNSS, Zobell) ont été comparés. A travers les résultats obtenus, nous avons constaté que le milieu de culture ISP<sub>2</sub> est le milieu de production le plus performant des métabolites antimicrobiens. Les mêmes résultats ont abouti à un temps optimal de production de 48 h.

Dans les conditions optimales, nous avons réalisés la production des métabolites antimicrobiens volatils dont l'extraction a été effectuée en utilisant un appareil de type clevenger, le procédé est basé sur l'entraînement hétéroazéotropique. L'hydrolat obtenu a été traité avec de l'éther diéthylique, deux phases ont été obtenues, une phase organique contenant les produits désirés et une phase aqueuse. La phase organique est séchée sur de sulfate de sodium suivie d'une distillation du solvant. Les produits antimicrobiens volatils sont récupérés dans de l'acétate d'éthyle est analysé par chromatographie en phase gazeuses couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). L'analyse a permis de relever 34 produits dont quatre sont non identifiés. La composition chimique est largement dominée par une classe de diterpènes de squelette type- labdane. Le diterpène majoritaire est le manoyl oxide.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- 1- **S. SMAOUI**, « Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés », Thèse de doctorat, Université de Toulouse, 2010.
- 2- **K. G. Boyd, D. R. Adams & J. G. Burgess**, « Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces », *Biofouling, Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 14(3), 227-236, 1999.
- 3- **A. Penesyany, S. Kjelleberg and S. Egan**, « Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms », *J. Mar. Drugs*, 8, 438-459, 2010.
- 4- **I. E. Soria-Mercado, L. J. Villarreal-Gómez, G. Guerra Rivas and N. E. Ayala Sánchez**, « Bioactive Compounds from Bacteria Associated to Marine Algae », 4 (4), 519-524, 2009.
- 5- **M. Martin, D. Portetelle, G. Michel, M. Vandenberg**, « Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(7), 2917-35, 2014.
- 6- **F. Goecke, A. Labes, J. Wiese, J. F. Imhoff**, « Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria », *Mar Ecol Prog Ser*, 409, 267-300, 2010.
- 7- **J. Hollants, F. Leliaert, O. De Clerck and A. Willems**, « What we can learn from sushi: a review on seaweed–bacterial associations », *FEMS Microbiol Ecol*, 83(1), 1-16, 2013.
- 8- **I. A. Beleneva<sup>1</sup> and N. V. Zhukova**, « Bacterial Communities of Some Brown and Red Algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan », *Microbiology*, 75, 348-357, 2006.
- 9- **M. Kanagasabhapathy, H. sasaki, S. Haldar, S. Yamasaki and S. Nagata**, « Actibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of japan », *Annals of microbiology*, 56(2), 167-173, 2006.
- 10- **M. Nishijima, T. Takadera, N. Imamura, H. Kasai, K. D An, K. Adachi, T. Nagao, H. Sano and K. Yamasato**, « *Microbulbifer variabilis* sp. nov. And *Microbulbifer epialgicus* sp. nov., isolated from Pacific marine algae, possess a rod–coccus cell cycle in association with the growth phase », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1696-1707, 2009.
- 11- **T. Shiba, N. Taga**, « Heterotrophic Bacteria Attached To Seaweeds », *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 47, 251-258, 1980.
- 12- **S. Chandan, j. Aman, J. Sivakumar and P. Malaiyarasa pandian**, « Surface associated bacteria of marine algae in kovalam beach, Chennai, had screened for its antifouling activity », *INDIAN J. MAR. SCI.*, 42(4), 489-502, 2013.
- 13- **M. H. Kossuga et al.** « Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites », *Journal of Pharmacognosy*, 22(2), 257-267, 2012.
- 14- **M. T. Jamal and M.S. A. Mudarris**, « Separation of YbdN Bioactive Protein from *Bacillus subtilis* Isolated from the Red Sea algae *Sargassum* sp. with Bioactivity against Antibiotic Resistant Bacterial Pathogens », *JKAU: Mar. Sci.*, 21, 53-64, 2010.

- 15- **F. Goecke, A. Labes, J. Wiese and J. F. Imhoff**, « Phylogenetic analysis and antibiotic activity of bacteria isolated from the surface of two co-occurring macroalgae from the Baltic Sea », *European Journal of Phycology*, 48(1), 47-60, 2013.
- 16- **J. Wiese, V. Thiel, K. Nagel, T. Staufenberger, J. F. Imhoff**, « Diversity of Antibiotic-Active Bacteria Associated with the Brown Alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea », *Mar Biotechnol*, 11, 287-300, 2009.
- 17- **T. Staufenberger, V. Thiel, J. Wiese and J. F. Imhoff**, « Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina* », *FEMS Microbiol Ecol*, 64, 65-77, 2008.
- 18- **R. Pal Singh, V. A. Mantri, C. R. K. Reddy, B. Jha**, « Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis-inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata* », *Aquat Biol*, 12, 13-21, 2011.
- 19- **WANG et al**, « Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species », *CHIN. J. OCEANOL. LIMNOL*, 27(3), 487-492, 2009.
- 20- **I. Yu. Bakunina, L. S. Shevchenko, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Shevchenko, S. A. Alekseeva, V. V. Mikhailov, and T. N. Zvyagintseva**, « Screening of Marine Bacteria for Fucoidanases », *Microbiology*, 69, 303-308, 2000.
- 21- **M. M. El-Gendy, U. W. Hawas, M. Jaspars**, « Novel Bioactive Metabolites from a Marine Derived Bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000 », *J. Antibiot*, 61(6), 379-386, 2008.
- 22- **J. Tebben, C. Motti, D. Tapiolas, P. Thomas-Hall and T. Harder**, « A Coralline Algal-Associated Bacterium, *Pseudoalteromonas* Strain J010, Yields Five New Korormicins and a Bromopyrrole », *Mar. Drugs*, 12, 2802-2815, 2014.
- 23- **M. L. Prieto, L. O'Sullivan, S. P. Tan, P. McLoughlin, H. Hughes, P. M. O'Connor, P. D. Cotter, P. G. Lawlor and G. E. Gardiner**, « Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived *Bacillus* spp », *Mar. Drugs*, 10, 2280-2299, 2012.
- 24- **Soon Dong Lee**, « *Phycococcus jejuensis* gen. nov, sp. nov, an actinomycete isolated from seaweed », *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2369-2373, 2006.
- 25- **G. A. Toledo, W. Green, R. A. Gonzalez, I. Christoffersen, M. Podar, H. W. Chang, T. Hemscheidt, H. G. Trapido-Rosenthal, J. M. Short, R. R. Bidigare, and E. J. Mathur**, « High Throughput Cultivation for Isolation of Novel Marine Microorganisms », *Oceanography*, 19, 2006.
- 26- **S. S. Gao, X. M. Li, F. Y. Du, C. S. Li, P. Proksch and B. G. Wang**, « Secondary Metabolites from a Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S », *Mar. Drugs*, 9, 59-70, 2011.
- 27- **Z. Yoshikawa, T. Takadera, K. Adachi, M. Nishijima and H. San**, « Korormicin, a Novel Antibiotic Specifically Active against Marine Gram-negative Bacteria, Produced by a Marine Bacterium », *the journal of antibiotics*, 50, 1997.
- 28- **S. Egan, C. Holmstrom and S. Kjelleberg**, « *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov, a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1499-1504, 2001.





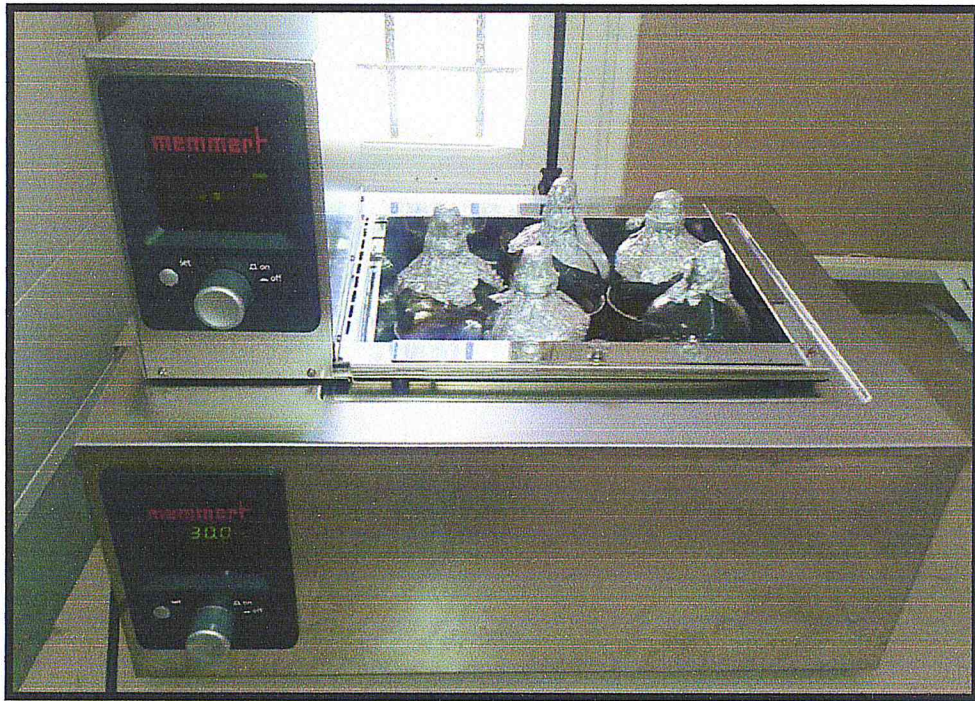
- 29- **Mi Jeong Jo, Seong Ja Bae<sup>1</sup>, Byeng Wha Son, Chi Yeon Kim and Gun Do Kim**, « 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid and (+)-epoxydon isolated from marine algae-derived microorganisms induce down regulation of epidermal growth factor activated mitogenic signaling cascade in Hela cells », Jo et al. *Cancer Cell International*, 13:49, 2013.
- 30- **H. S. Kang, H. L. Yang and S. D. Lee**, « Nitratireductor kimnyeongensis sp. nov, isolated from seaweed », *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1036-1039, 2009.
- 31- **Y. K. Lee, H. J. Jung, and H. K. Lee**, « Marine Bacteria Associated with the Korean Brown Alga, *Undaria pinnatifida* », *The Journal of Microbiology*, 44, 694-698, 2006.
- 32- **O. I. Zhuravleva, S. S. Afiyatullof, V. A. Denisenko, S. P. Ermakova, N. N. Slinkina, P. S. Dmitrenok, N. Y. Kim**, « Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* Blochwitz », *Phytochemistry*, 80, 123-131, 2012.
- 33- **F. Y. Du, X. M. Li, C. S. Li, Z. Shang, B. G. Wang**, « Cristatumins A–D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220 », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 4650-4653, 2012.
- 34- **M. F. Elsebai, S. Kehraus, M. Gütschow and G. M. König**, « New Polyketides from the Marine-derived Fungus *Phaeosphaeria spartinae* », *Natural Product Communications*, 4(11), 1463-1468, 2009.
- 35- **S. S. Gao, X. M. Li, C. S. Li, P. Proksch, B. G. Wang**, « Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S », *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 21, 2894-2897, 2011.
- 36- **M. F. Qiao, N. Y. Ji, X. H. Liu, K. Li, Q. M. Zhu, Q. Z. Xue**, « Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae* », *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 20, 5677-5680, 2010.
- 37- **S. Wang, X. M. Li, F. Teuscher, D. L. Li, A. Diesel, R. Ebel, P. Proksch and B. G. Wang**, « Chaetopyranin, a Benzaldehyde Derivative, and Other Related Metabolites from *Chaetomium globosum*, an Endophytic Fungus Derived from the Marine Red Alga *Polysiphonia urceolata* », *Journal of Natural Products*, 69(11), 1622-1625, 2006.
- 38- **H. Greve, P. J. Schupp, E. Eguereva, S. Kehraus, G. Kelter, A. Maier, H. H. Fiebig, and G. M. König**, « Apralactone A and a New Stereochemical Class of Curvularins from the Marine-Derived Fungus *Curvularia* sp », *European J Org Chem*, 30, 2008.
- 39- **A. M. Gamal-Eldeen, A. Abdel-Lateff, T. Okino**, « Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A; a new chromone derivative from algicolous marine fungus *Penicillium* sp », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, 317-322, 2009.
- 40- **M. F. Elsebai, M. Nazir, S. Kehraus, E. Egereva, K. N. Ioset, L. Marcourt, D. Jeannerat, M. Gütschow, J. L. Wolfender and G. M. König**, « Polyketide Skeletons from the Marine Alga-Derived Fungus *Coniothyrium cereal* », *Eur. J. Org. Chem*, 6197-6203, 2012.

- 41- Y. X. Li, S.W.A. Himaya, P. Dewapriya, C. Zhang and S. K. Kim, « Fumigaclavine C from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus Fumigatus* Induces Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells », *Mar. Drugs*, 11, 5063-5086, 2013.
- 42- Y. Li, K. L. Sun, Y. Wang, P. Fu, P. P. Liu, C. Wang, W. M. Zhu, « A cytotoxic pyrrolidinoindoline diketopiperazine dimer from the algal fungus *Eurotium herbariorum* HT-2 », *Chinese Chemical Letters*, 24, 1049-1052, 2013.
- 43- A. Abdel-Lateff, T. Okino, W. M. Alarif, S. S. Al-Lihaibi, « Sesquiterpenes from the marine algicolous fungus *Drechslera* sp », *Journal of Saudi Chemical Society*, 17, 161-165, 2013.
- 44- N. Imamura, M. Nishijima, T. Takadera, K. Adachi, M. Sakai and H. Sano, « New Anticancer Antibiotics Pelagiomycins, Produced by a New Marine Bacterium *Pelagibacter variabilis* », *the journal of antibiotics*, 50, 1997.
- 45- A. Penesyanyan, S. Kjelleberg and S. Egan, « Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms », *J. Mar. Drugs*, 8, 438-459, 2010.
- 46- T. Lachnit, M. Blümel, J. F. Imhoff, M. Wahl, « Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat », *Aquat Biol*, 5, 181-186, 2009.
- 47- I. Wagner-Döbler, W. Beil, S. Lang, M. Meiners, H. Laatsch, « Integrated Approach To Explore the Potential of Marine Microorganisms for the Production of Bioactive Metabolites », *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 74, 207-238, 2002.
- 48- M. T. Jamal and M.S. A. Mudarris, « Separation of YbdN Bioactive Protein from *Bacillus subtilis* Isolated from the Red Sea algae *Sargassum* sp. with Bioactivity against Antibiotic Resistant Bacterial Pathogens », *JKAU: Mar. Sci*, 21, 53-64, 2010.
- 49- H. Greve, P. J. Schupp, E. Eguereva, S. Kehraus, G. Kelter, A. Maier, H. H. Fiebig, and G. M. König, « Apralactone A and a New Stereochemical Class of Curvularins from the Marine-Derived Fungus *Curvularia* sp », *European J Org Chem*, 30, 2008.
- 50- N. A. Mohammed, H. M. Hassan, M. E. Rateb, E. F. Ahmed, U. W. Hawas, S. Sameer, R. Ebel, M. M. El-Safty, M. S. Abdel Hameed, O. H. Hammouda, « Diketopiperazine derivatives from *Enterobacter cloacae* isolated from the Red Sea alga *Cystoseira myrica* », *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 12, 163-172, 2013.
- 51- F. Debray, « Catalogue des algues du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie », Librairie A, Ed. Jourdan-Alger, 78p, 1893.
- 52- J. A. Phillips, « Genus and species concepts in *Zonaria* and *Homoeostrichus* (Dictyotales, Phaeophyceae), including the description of *Exallosorus* gen. nov », *Journal of Phycology*, 32(3), 303-311, 1997.
- 53- C. J. Hillson, « Seaweeds, A Color-Coded, Illustrated Guide to Common Marine Plants of the East Coast of the United States », Pennsylvania State University, 194p, 1977.
- 54- M. C. Durieu de Maisonneuve, Delamare, « Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840, 1841, 1842... », Imprimerie nationale, 600p, 1849.
- 55- J. Cabioch, J. Y. Fločh, A. Le Toquin, C. F. Boudouresque, A. Meinesz, M. Verlaque, « Guide des Algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique », Ed. Delachaux et Niestlé, 231p, 1992.

- 56- F. G. Priest, M. Goodfellow, L. A. Shute, and R. C. W. Berkeley « *Bacillus amyloliquefaciens* sp. Nov, Nom. Rev », International Journal of Sytematic Bacteriology, 37, 69-71, 1987.
- 57- M. Dj. Bounoua, « Essais d'utilisation des *pseudomonas spp.* et *Bacillus spp.* dans le biocontrôle de *Fasarium oxysporum f.sp. lycopersici* sur tomate et *verticillium dahliaesur* l'olivier », Mémoire de Magister en biotechnologie, Université d'Oran.
- 58- A. Caldeira *et al.* « Dynamique environnementale de *Bacillus amyloquefaciens* CCM1 1051 activité antifongique sous différents modèles d'azote », Journal of Applied Microbiology, 104, 806-816, 2007.
- 59- B. Demirci, M. Toyota, F. Demirci, M. Y. Dadandi, K. H. Can Baser, « Anticandidal pimaradiene diterpene from *Phlomis* essential oils », Comptes Rendus Chimie, 12(5), 612-621, 2009.
- 60- S. Basar, A. Koch, W. A. König, « A verticillane-type diterpene from *Boswellia carteri* essential oil », Flavors and Fragrances Journal, 16 (5), 315-318, 2001.
- 61- Z. Demirel, F. F. Yilmaz-Koz, N. U. Karabay-Yavasoglu, G. Ozdemir, A. Sukatar, « Antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts and the essential oil composition of *Laurencia obtusa* and *Laurencia obtusa* var. *pyramidata* », Romanian Biotechnological Letters, 16(1), 5927-5936, 2011.

# ANNEXE

## ANNEXE 1



**Incubateur agitateur**



**Centrifugeuse**

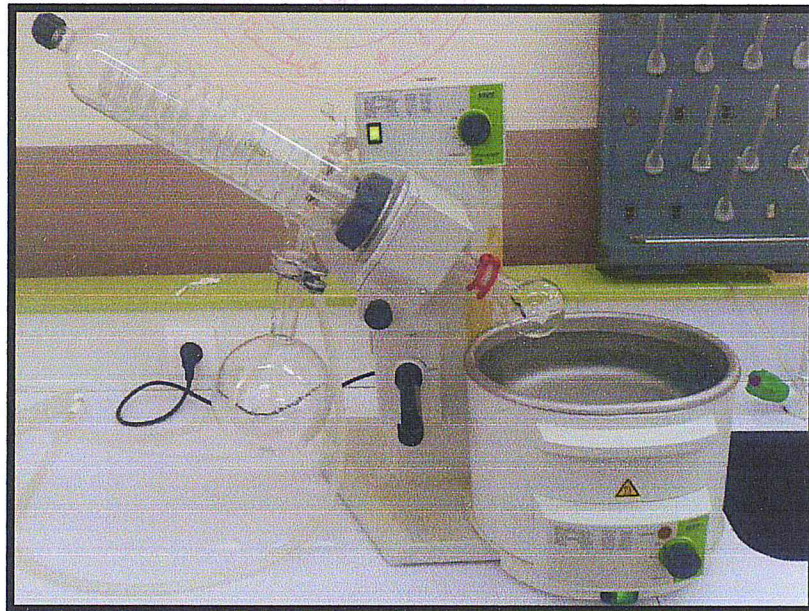


**Autoclave**

## ANNEXE 2



**Extraction liquide-liquide**



**Evaporateur rotatif**