

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université SAAD DAHLEB Blida

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2 en Biologie

Option : Biochimie

Thème

*Mise en évidence d'activités enzymatiques et antibiotiques chez les souches
bactériennes symbiotiques d'origine marine isolées du littoral Algérien*

Présenté et soutenu par : Moulai Zakia

Belhadeb Narimen

Saighi Abir

Le :12 /09/2022

Devant le jury :

Promotrice : Mme TOBAL SEGHIR S. MAA USDB1

Président : Mme EDDAIKRA A. MCB USDB1

Examinatrice : Mme A. ROUAKI F. MCA USDB1

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

*On premier lieu et avant tout, nous remercions notre **Dieu** le tout puissant qui nous a éclairé notre chemin, et nous a donné le courage, la force, la patience.*

*Nous aimerons exprimer toute notre reconnaissance et notre respect à **Madame TOBAL SEGHIR. S MAA** à l'université de Blida 1. Non seulement pour nous avoir encadrées tout le long de ce travail avec enthousiasme et dynamisme mais aussi pour ses précieux conseils scientifiques, ses encouragements et son parfait sens de la responsabilité. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nous sommes sensibles à l'honneur que nous faites **Madame ROUAKI F.MCA** à l'université de Blida 1, présidant le jury de ce travail. Veuillez accepter notre profond respect et notre immense estimation.*

*Nous sommes particulièrement heureuses que **Madame EDDAIKRA A.MCB** à l'université de Blida 1, accepte de faire partie de notre jury et examinant notre modeste travail. Qu'elle trouve ici l'expression de nos sentiments les plus distingués.*

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire PFE de l'université SAAD DAHLEB BLIDA 1, c'est pourquoi un vif remerciement est adressé à l'ingénieur du laboratoire :

Madame IHSEN.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'ensemble de nos enseignants qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours pédagogique, que ce soit en Licence ou en Master.

Enfin merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

A mes chers parents : FOUAD Naima

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Votre compréhension et votre encouragement sont pour moi le soutien indispensable que vous êtes toujours su m'apporter. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Que Dieu le tout puissant vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

A la mémoire de mes grands parents

*Qui que vous ayez toujours été dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui mon succès. Que Dieu vous protège pour nous, mon grand-père **Mahmoud** et ma grand-mère **Dalila** et je n'oublierai jamais mon grand-père **Muhammad** et ma grand-mère **Zahia**. Que Dieu, vous accueille dans son paradis éternel*

A mon frère et mes sœurs

****YACINE, MOUNA, RAHMA, DOUAA, RITAJ*** En témoignage de ma tendresse pour vous, je vous dédie ce travail avec mes vœux de bonheur et de réussite. **Et à mon roi et mon prince AXEL l'ange de ma vie** vous avez été le seul lien avec moi dans toutes les étapes de mon succès. Merci d'être dans ma vie.*

*À mon adorable amie *NADA**

La personne plus proche de mon cœur je ne pourrai vous rendre ce que vous avez fait pour moi, je dois toute ma vie et tous mes succès pour vous, puisque si je suis arrivée là c'est bien grâce à vous. Que vous garde et vous protège pour nous.

*A mon amie **MAROUA BENNAI** pour leur encouragement permanent, et leur soutien moral.*

*De tout mon cœur je dédie ce modeste travail à mon enseignant **DR. KHIER MOKRANE** qui m'a ouvert les portails et m'a donné le courage*

*Merci infiniment à mes amies **ZAKIA ET NARIMEN**, pour leur appui constant, leur amitié et leur amour. Parce que finalement, le contenu de ce travail est un reflet de l'amour.*

Abir

Dédicaces

C'est avec tous mes sentiments que je dédie ce modeste travail, qui est le fruit de ma profonde reconnaissance à :

Ma mère HAKIMA qui est mon exemple et la raison pour laquelle j'avance dans ma vie et à mon père le meilleur père du monde ABDELKADER que j'aime trop et que je travaille pour lui rendre fière de moi. Que dieu les garde et les protège.

Mon frère MOHAMMED et mes sœurs MALIKA, HADJER, MOUNIRA et YASSMINE.

A mes nièces RACHA, LINA et MERIEM.

A mes neveux NAZIM et ABDELMOUNIM

A mes copines YASMINE, LYLIA, WISSEM, BOUCHRA et MAROUA

A ma chère enseignante Madame TOBAL

A mes chères partenaires ABIR et NARIMEN.

Zakia

Dédicaces

A ma très chère mère Fatma el Zohra

Ma vie, mon âme, je remercie depuis mon enfance jusqu'à maintenant Merci beaucoup ma vie, je n'ai pas trouvé les mots pour expliquer mes sentiments. J'espère qu'il est temps pour vous de lever la tête en moi et de me soutenir dans la joie de mon diplôme. je vous aime.

A mon cher père Yahia

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A ma princesse Nesrin

Ma petite sœur je te dis merci et je te souhaite bonheur, réussite et prospérité.

A la rose de ma vie ma tante Houria

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et votre amour et encouragements.

A Mustapha

Tu as toujours cru en moi et je tenais à t'en remercier.

A mes frères et ma famille

Ahmed, Saddam houssine, mezoura, hadjer

A mes chères et tous les personnes qui m'ont aidé

Mon professeur d'enfance Hassina et Fouzia, ma promotrice Salima, chef de laboratoire PFE ihssen, D.salma, D.labachri, Sarah Nage, Lila, Nabila, Latifa, Madame Imen

Tous mes petits enfants dans ma famille : Sabia, Ahmed, Zahra, Talin, Mohamed walid, abrahmen, roa, Naila...

Mes amis : Imen, hadjer, rahil, maroua, rahma, abir, zakia, sabrina,

Mes camarades : Lotfi, Walid et Bilel, Kamel, Allaa, Yassin, Sidali, Riadh, Aymen,

Mon oncle Nouredine et Sid Ahmed et Abdelkader, el Arbi, Monsieur Teffahi et Sebsi, Club Capcaxine, chef de dépôt de laboratoire M. abderhmen et M. Saïde, Monsieur le directeur de l'hôpital Bananié, Monsieur Fouad, garde de bloc de côté biotechnologie et agronomie M..... Mell Arezki, salma, riham et Bendalli et tous mes collègues de laboratoire maison de diabète

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu, même avec un mot, et je m'excuse de ne pas mentionner leurs noms.

Narimen

Résumé

Ce travail a pour objectif de valoriser la fraction microscopique des bioressources marines. Nous avons recherché chez une collection de souches symbiotiques à cinq espèces marines différentes, des éventuelles activités enzymatiques et /ou antimicrobiennes d'intérêt en biotechnologies et santé.

Des méthodes microbiologiques classiques sont utilisées pour l'isolement, la purification et l'identification préliminaire des souches. Les activités enzymatiques sont recherchées sur des milieux préparés par nos soins à base des substrats enzymatiques en question. Les éventuelles activités antibactériennes et antifongiques sont criblées par antagonisme, en affrontant nos souches à quatre espèces bactériennes et deux espèces fongiques pathogènes.

Quarante-deux souches bactériennes sont isolées et purifiées. L'étude des activités enzymatiques a montré que **80,95%** des souches possèdent une **gélatinase**. Près de **28.5%** ont une **cellulase** et **25%** ont une **amylase**, alors que **21.4%** des souches uniquement sont dotées d'une **estérase**. Les **23.8%** des activités **lipolytiques** sont réparties en **33,33%** d'activités **lipasiques**, et **2.38 %** d'activités **lipolytiqueliprotéolytique**. Enfin, **21%** seulement des souches présentent une activité **protéolytique**.

Nos résultats ont montré aussi que **71.41%** des bactéries symbiotiques marines ont présenté une activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. Par ailleurs, **61, 90 %** des souches inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus* et près de **52,38 %** inhibent celle d'*E. coli*. **33,33 %** uniquement de nos souches ont une activité vis-à-vis de *Bacillus cereus* et d'*Aspergillus niger* Alors qu'**aucune activité antifongique** n'a pu être enregistrée contre *Candida albicans*.

Nos résultats montrent le potentiel de certaines souches à produire des molécules enzymatiques et antibiotiques intéressantes. Ces dernières méritent d'être le sujet d'études ultérieures en termes de production, optimisation et ingénierie moléculaire.

Mots clés : microorganismes symbiotiques, bioressources marines, activités enzymatiques, activités antimicrobiennes, espèces marines.

Abstract

This work aims to enhance the invisible fraction of marine bioresources. We searched a collection of symbiotic strains with five different marine species for possible enzymatic and/or antimicrobial activities of interest in biotechnology and health.

Conventional microbiological methods are used for isolation, purification and preliminary strain identification. Enzymatic activities are sought on media prepared by us containing the enzymatic substrates in question. The possible antibacterial and antifungal activities are screened by antagonism, by confronting our strains with four bacterial species and two pathogenic fungal species.

Forty-two bacterial strains are isolated and purified. The study of enzymatic activities showed that 80.95% of the strains possess a gelatinase. Nearly 28.5% have a cellulase and 25% have an amylase, while 21.4% of the strains only have an esterase. The 23.8% of lipolytic activities are divided into 33,33% of lipase activities, and 2.38% of lipolyticliproteolytic activities. Finally, only 21% of the strains show proteolytic activity.

Our results also showed that 71.41% marine symbiotic bacteria exhibited antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, 61.90% of the strains inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and nearly 52.38% inhibit that of *E. coli*. 33.33% only of our strains have activity against *Bacillus cereus* and *Aspergillus niger* While no antifungal activity could be recorded against *Candida albicans*.

Our results show the potential of certain strains to produce interesting enzymatic and antibiotic molecules. The latter deserve to be the subject of further studies in terms of production, optimization and molecular engineering.

Keywords: symbiotic microorganisms, marine bioresources, enzymatic activities, antimicrobial activities, marine species.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تعزيز الجزء غير المرئي من المصادر الحيوية البحرية. بحثنا في مجموعة من السلالات التكافلية مع خمسة أنواع بحرية مختلفة عن الأنشطة الأنزيمية و / أو المضادة للميكروبات المحتملة ذات الأهمية في مجال التكنولوجيا الحيوية والصحة.

تستخدم الطرق الميكروبيولوجية التقليدية للعزل والتنقية والتعرف الأولي على السلالة. يتم البحث عن الأنشطة الأنزيمية على الوسائط التي أعدها والتي تحتوي على الركائز الأنزيمية المعنية. يتم فحص الأنشطة المضادة للبكتيريا والفطريات المحتملة عن طريق العداء ، من خلال مواجهة سلالاتنا بأربعة أنواع من البكتيريا ونوعين من الفطريات المسببة للأمراض تم عزل وتنقية 42 سلالة بكتيرية. أظهرت دراسة الأنشطة الأنزيمية أن 80.95٪ من السلالات تمتلك مادة الجيلاتيناز ما يقرب من 28.5٪ لديها سليلاز و 25٪ لديها أميليز ، بينما 21.4٪ من السلالات لديها إستريراز فقط. وتنقسم من أنشطة تحلل الدهون إلى 33.33٪ من أنشطة الليباز ، و 2.38٪ من أنشطة تحلل البروتينات. أخيراً فقط (23.33٪) . السلالات تظهر نشاطاً لتحلل البروتين 1٪

Pseudomonas أظهرت نتائجنا أيضاً أن 71.41٪ من البكتيريا التكافلية البحرية أظهرت نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد وتقريباً *Staphylococcus aureus* بالإضافة إلى ذلك ، 61.90٪ من السلالات تمنع نمو *aeruginosa*. *Aspergillus niger* و *Bacillus cereus* فقط من سلالاتنا لها نشاط ضد 33.33٪ *E. Coli* تمنع نمو 52.38٪ *Candida albicans*. بينما لم يتم تسجيل أي نشاط مضاد للفطريات ضد تظهر نتائجنا قدرة سلالات معينة على إنتاج جزيئات إنزيمية ومضادات حيوية مثيرة للاهتمام. هذا الأخير يستحق أن يكون موضوع مزيد من الدراسات من حيث الإنتاج والتحسين والهندسة الجزيئية

الأنشطة الأنزيمية، والأنشطة المضادة الكلمات المفتاحية : الكائنات الحية الدقيقة التكافلية الموارد الحيوية البحرية، للميكروبات ، الأنواع البحرية

Liste des tableaux

Tableau I : Nombre des espèces marines actualisé après 2010 en Algérie (ministère de l'aménagement de Territoire et de l'environnement)	6
Tableau II : Détail et informations sur le prélèvement des espèces.....	27
Tableau III : Collection de souches bactériennes isolées à partir des espèces marines	43
Tableau IV : Aspect macroscopique des souches isolées.....	46
Tableau V : Caractérisation physiologique des différentes isolats.....	52
Tableau VI : Les résultats d'activité lipolytique chez nos souches bactériennes	59
Tableau VII : Les souches isolées à des activité enzymatiques et antimicrobiennes intéressantes.....	71
Tableau VIII : Représente l'aspect microscopique de coloration de gram	97
Tableau IX : Les résultats des activité enzymatiques.....	102
Tableau X : Résultats des activité antimicrobiennes des souches isolées vis à vis des souches pathogènes de références.....	103
Tableau XI : Les abréviations utilisées sur nos collections des souches bactériennes isolées	104

Liste des figures

Figure 1 : A gauche la Zone accore côtière, région de Tipaza à Cherchell, à droite la Zone accore côtière, région de Alger les oiseaux, Hammamet.	5
Figure 2 : A gauche identification d' <i>A. taxiformis</i> par Delile extrait des planches (1813) à droite <i>Aspagopsis taxiformis</i> rhodophycée (cndrb.dz)	8
Figure 3 : <i>Spongia officinalis</i> (shutterstock)	8
Figure 4 : <i>Arbacia lixula</i> (shutterstock)	9
Figure 5 : <i>Echinaster sepositus</i> (shutterstock).....	10
Figure 6 : Coquille <i>Indothaïs lacera</i> (shutterstock)	11
Figure 7 : Mode de transmission des symbiontes microbiennes	13
Figure 8 : A gauche iridescence observée sur les bulles de savon à droite iridescence par une nappe d'huile.	18
Figure 9 : Les interférences dans une couche mince prise de (Zeng et al., 2018)	19
Figure 10 : Exemples des animaux iridescents : de la gauche vers la droite ; <i>Hoplia coerulea</i> , <i>Polymmatus icarus</i> et <i>Aglaiocercus coelestis</i>	21
Figure 11 : Colonies bactériennes bioluminescentes (SCINCE ET VIE).....	22
Figure 12 : Bactéries iridescentes (kientz.,2012).	22
Figure 13 : Position géographique de la station El far et Port de Cherchell (Google Earth et Google Maps)	26
Figure 14 : Schéma de préparation des dilutions à partir de la solution mère.....	28
Figure 15 : Technique des quadrants.	29
Figure 16 : Technique de purification des souches bactériennes.	29
Figure 17 : Schéma récapitulatif des étapes d'observation des souches à l'état frais.....	31
Figure 18 : Protocole de la coloration de Gram.	32
Figure 19 : Les tubes au viande-foie et leur incubation dans l'étuve.	32
Figure 20 : Les différents types respiratoires chez les bactéries.	33
Figure 21 : Les étapes suivies de gauche vers la droite ; organisation et numérotation des souches sur boîtes Pétri, écouvillonnage et perforation des puits.	40
Figure 22 : Schéma représentant l'expérience pour explique le phénomène de la coloration émise par les bactéries	41
Figure 23 : Observation microscopie de l'état frais chez quelque souche bactérienne.	49
Figure 24 : Résultat (+) et (-) de test oxydase et catalase en haut vers le bas.	51
Figure 25 : Résultats des activités enzymatiques recherchées.	54
Figure 26 : Zones d'hydrolyse du Tween 80 par les souches bactériennes (E6, E7, O34, O39, AR16, N21, K26, K31 et K32) testées après 24h d'incubation.....	56
Figure 27 : Zones d'hydrolyses de la cellulose des souches bactériennes (E6, E19, N21, N25, K26, K28, K32, O34, O35, O36, O39 et O40) testées après 48h d'incubation.	58
Figure 28 : Zones d'hydrolyses de l'amidon par les souches bactériennes testées (AR16.O39. O34.K31. K26.E6. AR12.O40. K28.N25. E19.N21. K29) après 48h d'incubation.	63
Figure 29 : Zones de l'hydrolyse de la caséinase par les souches bactériennes testées (E1. E2. E3. E6. AR11.AR15. N20.K33.O37) après 72h d'incubation.	65
Figure 30 : Résultat des activités antimicrobiennes marquées par les souches testées contre les souches bactériennes pathogènes.....	66
Figure 31 : Résultats de l'activité antibactérienne chez la collection de nos souches	68
Figure 32 : Résultats de l'activité antifongique chez la collection de nos	70
Figure 33 : Résultats de l'activité antifongique chez la collection de nos souches.....	71
Figure 34 : Résultats macroscopiques des souches bactériennes iridescentes	73

Listes des abréviations

AAF : Aero-anaérobie-facultatif

AnS : Anaérobies stricts

AS : Aérobie stricte

ATCC : American Type Culture Collection

BN : bouillon nutritive

CMC : carboxyméthylcellulose

D : diamètre

E. Coli : *Escherichia coli*

EC : Enzyme Commission

GN : gélose nutritive

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

M.CMC : milieux cellulolytique

mA : micro-aérophile

MA : milieux amylolythique

ME : milieux esterasique

MG : milieux gélatinasiq

MH : Muller Hinton

ML : milieu lypolytique

MS : milieu Sabouraud

MTCC : Microbial Type Culture Collection

NaCl : Le chlorure de sodium

O₂ : dioxygène

O34 : oursin bactérie numéro 34

OGA : milieu Oxytétracycline-Glucose-Agar

Ox : d'oxalate N-N-diméthylparaphénylène.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

VF : milieu viande-foie

Sommaire

Introduction.....1

1 Revue bibliographique.....3

1.1	Généralités	4
1.1.1	Généralités sur la Méditerranée	4
1.1.2	Généralités sur le littoral Algérien	4
1.1.3	Généralités sur la biodiversité marine en Algérie	5
1.2	Aperçu sur les espèce marines étudiées	7
1.2.1	Les macro algues	7
1.2.1.1	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	7
1.2.2	Les spongiaires.....	8
1.2.2.1	<i>Spongia officinalis</i>	8
1.2.3	Les échinodermes	9
1.2.3.1	<i>Arbacia lixula</i>	9
1.2.3.2	<i>Echinaster sepositus</i>	9
1.2.4	Les mollusques	10
1.2.4.1	<i>Indothais lacera</i>	10
1.3	La symbiose microbienne	12
1.3.1	Définition de symbiose	12
1.3.2	Mode de transmission des microorganismes symbiotiques :	12
1.3.2.1	La transmission verticale	12
1.3.2.2	La transmission horizontale	13
1.3.3	L'intérêt de microorganismes symbiotiques.....	13
1.4	La biotechnologie bleue	14
1.4.1	Définition.....	14
1.4.2	Applications de la biotechnologie bleue	14
1.4.2.1	Industrie pharmaceutique	14
1.4.2.2	Industrie Alimentaire	15
1.4.2.3	Industrie cosmétique	16
1.4.2.4	Industrie chimique.....	17
1.5	l'Iridescence.....	18

1.5.1	Définition.....	18
1.5.1.1	La Interférence	19
1.5.1.2	La Diffraction	20
1.5.2	Iridescente chez les animaux et les bactéries	20
1.5.2.1	Chez les animaux	20
1.5.2.2	Chez les bactéries	21
1.5.3	Intérêt de l'iridescence	23

2 Matériel & Méthodes 24

2.1	Laboratoire d'accueil	25
2.2	Matériel	25
2.2.1	Matériel biologique	25
2.2.2	Matériel non biologique	25
2.3	Méthodes	26
2.3.1	Echantillonnage	26
2.3.2	Isolement des bactéries symbiotiques associées aux espèces marines	27
2.3.2.1	Préparation des solutions mères	27
2.3.2.2	Préparation des dilutions.....	28
2.3.2.3	<i>Isolement des bactéries sur milieu solide par la technique des quadrants.....</i>	28
2.3.3	Purification des souches	29
2.3.3.1	Purification des souches sur le milieu chromagar d'orientation.....	29
2.3.4	Etude macroscopique et microscopique des souches isolées.....	30
2.3.4.1	Etude macroscopique	30
2.3.4.2	Etude microscopique	30
2.3.5	Etude physiologique	32
2.3.5.1	<i>Recherche du type respiratoire sur milieu VF (Viande-Foie).....</i>	32
2.3.5.2	Test Catalase	33
2.3.5.3	Test Oxydase.....	34
2.3.6	Criblage des activités enzymatiques	34
2.3.6.1	Recherche d'une estérase.....	34
2.3.6.2	Recherche d'une gélatinase.....	35
2.3.6.3	Recherche d'une cellulase	35
2.3.6.4	Recherche d'activité lipolytique	36
2.3.6.5	Recherche d'une amylase	37
2.3.6.6	Recherche d'une caséinase.....	38
2.3.7	Criblage d'activités antimicrobiennes.....	38

2.3.7.1	Recherche de l'activité antibactérienne	41
2.3.7.2	Recherche de l'activité Antifongique	41
2.3.8	Recherche de l'origine de la coloration bactérienne observée.....	41

3 Résultats et discussion..... 42

3.1	Isolement et purification des micro-organismes symbiotiques associés aux espèces marins	43
3.2	Vérification de la pureté des souches sur le milieu chromagar « chromagar d'orientation »	45
3.3	Etude des souches sélectionné.....	46
3.3.1	Etude macroscopique des souches sélectionnées	46
3.3.2	Etude microscopique	49
3.3.2.1	Observation à l'état frais	49
3.3.2.2	Observation microscopique après coloration de Gram	49
3.4	Etudes physiologique.....	50
3.4.1	Type respiratoire sur VF.....	50
3.4.2	Teste catalase et oxydase	50
3.5	Criblage des activités enzymatiques des isolats	53
3.5.1	Activité estérasique	54
3.5.2	Activité Gèlatinasique.....	57
3.5.3	Activité cellulolytique	57
3.5.4	Activité lypolytique.....	59
3.5.5	Activité amylolytique.....	62
3.5.6	Activité protéolytique.....	63
3.6	Criblage des activités antimicrobiennes	66
3.6.1	Résultat de la recherche des activités antibactériennes.....	66
3.6.2	Résultat de la recherche des activités antifongiques.....	70
3.7	L'origine de la coloration bactérienne	72

4 Conclusion..... 75

5 Référence Bibliographiques 78

6 Annexes

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أَوْلَمْ يَرَ الَّذِينَ كَفَرُوا أَنَّ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ
كَانَتَا رَتْقًا فَفَتَقْنَاهُمَا وَجَعَلْنَا مِنَ الْمَاءِ كُلَّ شَيْءٍ
حَيٍّ أَفَلَا يُؤْمِنُونَ

(الأنبياء - 30)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَا بَغُوضَةً فَمَا
فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ
رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ
بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا
يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ

(سورة البقرة 26)

Introduction

Selon les estimations des scientifiques, la vie est née dans les océans il y a 3,8 milliards d'années (**Universalis**). Comparée aux 400 millions d'années de la vie continentale, nous pouvons en partie comprendre pourquoi la diversité génétique du milieu marin est de loin beaucoup plus grande que celle se trouvant sur tous les continents. En effet, on dénombre actuellement 28 phyla marins dont 13 phyla endémiques, mais seulement 11 phyla terrestres. Philippe (**Gouletque et al ;2013**)

La biodiversité d'un système dépend aussi largement de sa taille. Le milieu marin occupe près de 72% de la surface de la planète. La vie marine est en grande partie faite d'organismes unicellulaires procaryotes majoritairement méconnues, bien qu'ils jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques. Encore faut-il se rappeler que 90 % des espèces marines sont à identifier. (**Fradin et al ;1982**)

La biotechnologie marine appelée aussi la biotechnologie bleue est l'exploration et l'utilisation de la biodiversité marine comme source de nouveaux produits, en bio-prospectant l'environnement et en utilisant la biologie moléculaire et l'écologie microbienne dans les organismes marins pour obtenir des produits bénéfiques pour l'humanité. (**Mayer et al ;2017**)

La biotechnologie marine a des applications multiples dans le domaine de la santé où certains produits sont déjà en utilisation clinique ou encore en phases de tests cliniques (antidouleurs. Anticancéreux...), Ces produits ont des applications dans l'industrie pharmaceutique en tant qu'antioxydants, antibiotiques, analgésiques, antinéoplasiques, agents anti-inflammatoires et antifongiques (**Murray et al.,2013**).

Les polysaccharides issus d'algues (alginate. Carraghénanes...)qui servent de stabilisant ,gélifiant, épaississant utilisés dans les industries agro-alimentaire et cosmétiques et dans le domaines cosmétiques un premier succès Grâce à son partenaire Botanik, BIOTECAL a fêté en décembre 2016 la mise sur le marché du premier produit cosmétique contenant des produits 100% calédoniens dont des EPS,Ces derniers ont été testés cliniquement pour des effets lissants et hydratants pour la peau avec un indice de 90% de satisfaction par les évaluateurs.)

Dans les domaines des brocards, il s'agit de production d'enzymes dégradent les produits lignocellulosiques et de production de macroalgues génératrice de bicarbonate.

C'est dans cette optique, notre travail s'inscrit. Il vise à valoriser la fraction microscopique des bioressources marines notamment les microorganismes symbiotiques de quelques espèces marines.

Dans un premier temps, nous allons isoler puis purifier des microorganismes symbiotiques à cinq espèces marines pour construire une collection de souches microbiennes.

Dans un second temps, nous allons chercher chez cette collection de souches, par des moyens microbiologiques classiques, des éventuelles activités enzymatiques et / ou antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques) d'intérêt en biotechnologies et santé.

1 Revue bibliographique

1 Revue bibliographique

1 Revue bibliographique

1.1 Généralités

1.1.1 Généralités sur la Méditerranée

La Méditerranée se présente au plan structurel comme un ensemble de deux bassins (oriental et Occidental) séparés par un seuil dont la profondeur entre la Sicile et la Tunisie ne dépasse pas les **400 m**.

La circulation profonde dans cette zone est insuffisante, et à son point le plus profond, sa température est proche de celle de l'océan Atlantique dans le détroit de Gibraltar. Ainsi, la température des eaux méditerranéennes est d'environ **13C°**. La mer Méditerranée est considérée comme un océan tempéré chaud à **T°13C°** toute l'année et avec une salinité moyenne estimée à 38‰ (**Thibaut., 2001**).

En surface, elles peuvent atteindre **28°C** en été. La région se caractérise par des étés nettement secs et, selon les sous-régions, les plus fortes précipitations sont en automne ou en hiver (**A. DOUGUÉDROIT.,1997 ; E. XOPLAKI.,2002**). Ainsi la Méditerranée est considérée comme un véritable réservoir thermique (**Pagney., 1994**).

C'est une mer relativement profonde et la profondeur moyenne est estimée à **1500m**. Le point le plus profond de la Méditerranée est l'un des gouffres de Matapan (en Grèce) à **5121m**. Le plateau continental n'a pas plus de **200** mètres de profondeur.

Le courant général va de l'Ouest vers l'Est, entre en surface par le détroit de Gibraltar, suit les côtes algériennes, continue le long de la côte nord de la Sicile et remonte vers le Nord-Ouest en suivant les côtes italiennes (**Thibaut., 2001**).

1.1.2 Généralités sur le littoral Algérien

L'Algérie est le plus grand pays d'Afrique après la scission du Soudan.

Le littoral algérien s'étend sur **1 600 km** d'ouest en est, entre les longitudes 2, 2°W et 8,5°E. Le bassin algérien (parfois appelé Afrique du Nord) a un fond presque plat à environ **2700 m** (**Auzende.,1978**), et la salinité moyenne des eaux de surface sur la côte d'Oran, l'Algérie est comprise entre 35,85 % et 36,4% (**Millot.,1999**).

La bordure nord de l'Algérie a une forme assez simple, avec des plateaux continentaux très étroits (généralement moins de 10 km sauf pour quelques baies) et des pentes continentales abruptes (10° en moyenne, parfois 20°) (**Leclaire, 1968., 1972**).

1 Revue bibliographique

Les diverses ondulations de la côte avec des caractéristiques géomorphologiques et topographiques assez spécifiques de la Méditerranée occidentale se reflètent dans la hauteur du plateau continental extrêmement réduit en son centre. Les profonds canyons sous-marins se situent surtout sous les côtes de la région d'Alger et peuvent céder la place au fond normal de la zone côtière sur les bordures est et ouest, où les températures moyennes de l'eau sont élevées (figure 1).

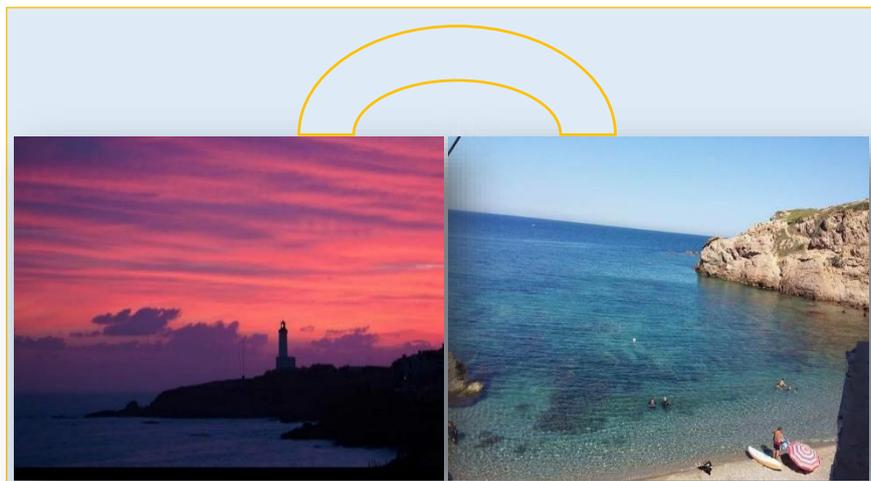


Figure 1 : A gauche la Zone accore côtière, région de Tipaza à Cherchell, à droite la Zone accore côtière, région de Alger les oiseaux, Hammamet.

1.1.3 Généralités sur la biodiversité marine en Algérie

Dans son patrimoine naturel, l'Algérie accorde une place privilégiée aux ressources biologiques et à leur diversité. La biodiversité algérienne globale compte environ 16 000 espèces (**Mediouni., 2000a**), cependant l'économie algérienne exploite moins de 1% de ce total.

A l'échelle mondiale, la biodiversité marine renferme un nombre non négligeable d'espèces (**Vaught *et al.*, 1989**).

La biodiversité marine algérienne est considérée parmi les plus élevées du bassin méditerranéen (**Grimes *et al.*, 2004**). Le littoral algérien abrite des écosystèmes remarquables (**Tarik *et al.*, 2015**).

1 Revue bibliographique

La diversité biologique marine connue s'élève à **3183** espèces dont **3080** ont été confirmées après **1980**. Cette richesse comprend **720** genres et **655** familles. La flore marine est estimée, quant à elle, à **713** espèces regroupées dans **71** genres et **38** familles.

Si l'on rajoute la végétation littorale et insulaire, la faune ornithologique marine et littorale, la biodiversité totale connue de l'écosystème marin côtier algérien est de **4150** espèces, dont **4014** sont confirmées pour un total de **950** genres et **761** familles. Néanmoins, il faut souligner que ces chiffres ne reflètent pas la biodiversité réelle, mais plutôt celle connue (**Saida,2003**).

Les micro-organismes et procaryotes, peu étudiés dans ce contexte malgré leur potentiel biotechnologique avéré, mieux connu en milieux terrestres et dulcicole, ne sont pas discutés, d'autant que les avancées dans ce domaine demeurent très timides.

La totalité du phytoplancton du bassin occidental de la Méditerranée, est estimée à **700** taxa. La richesse spécifique du phytoplancton en Algérie atteindrait **303** espèces, pour un total de zooplancton de **457** espèces.

Tableau I : Nombre des espèces marines actualisé après 2010 en Algérie (**ministère de l'aménagement de Territoire et de l'environnement**)

Le Groupe	2000	2009	2014	Total
Algues macrophytes		468	295	
Spermaphytes	4	4	4	
Total flore		681	802	802
Mollusques			663	
Annélides polychètes			740	
Crustacés			864	
Divers groupes de fonds meubles			89	
Divers groupes de fonds durs			597	
Divers groupes zooplanctonique			154	
Total invertébrés	1892	1892	3107	3107
Reptiles	2		2	
Poissons	300		328	
Mammifères	9		11	
Total vertébrés	311		341	341
Total général				4250

1 Revue bibliographique

1.2 Aperçu sur les espèces marines étudiées

1.2.1 Les macro algues

Le terme macro algue fait référence à un groupe d'organismes eucaryotes multicellulaires capables de réaliser la photosynthèse est divisée en trois embranchements distincts : les *Phaeophyceae* (algues brunes), les *Rhodophyceae* (algues rouges) et les *Chlorophyceae* (algues vertes). D'un point de vue évolutif, les algues vertes se séparent des algues rouges avant de produire des plantes terrestres. Par conséquent, ils appartiennent au même groupe Archaeplastida. D'autre part, Les algues brunes émergent indépendamment après une endosymbiose secondaire L'ancêtre commun du groupe SAR (Résistance systémique acquise) des algues rouges unicellulaires. Les principales différences morpho-biologiques entre les macro algues et les plantes terrestres est qu'il n'y a pas de tissu conducteur de racines et de sève dans les algues, et une grande quantité de la diversité des cycles de reproduction, n'impliquent jamais de fleurs ou de graines (Maria.,2017).

1.2.1.1 *Asparagopsis taxiformis*

A.taxiformis a été décrite en 1845 en mer Méditerranée à Alexandrie en Egypte ,mais l'origine du spécimen décrit, est incertaine de même que l'Aire de distribution naturelle de cette espèce (figure 2).

C'est une algue rouge marine superficielle subtidale, de 10 à 30 cm de haut, avec des bases de stolons densément définies par des branches radialement latérales. La structure est uni axiale avec trois axes péri cellulaires. Les cellules d'*Asparagopsis taxiformis* sont denses et de couleurs entre le rouge et le brune et le rose (figure 2).

A.taxiformis est capable de faire une reproduction de façon sexuée et asexuée qui se caractérise par un stade gamétophyte macroscopique appelé "Asparagopsis" et un stade tétrasporophyte macroscopique appelé stade "Falkenbergia". Le succès de sa reproduction végétative peut expliquer la propagation rapide de *A.taxiformis* et sa large distribution cosmopolite des zones tropicales aux zones tempérées chaudes durant toute l'année même si elle semble présenter des phases de croissance plus importante entre la saison fraîche et le début de l'été (Price et al.1986,Bonin et al.,1987, Saliva et al.,1996, Boudourseque et al., 2002).

1 Revue bibliographique

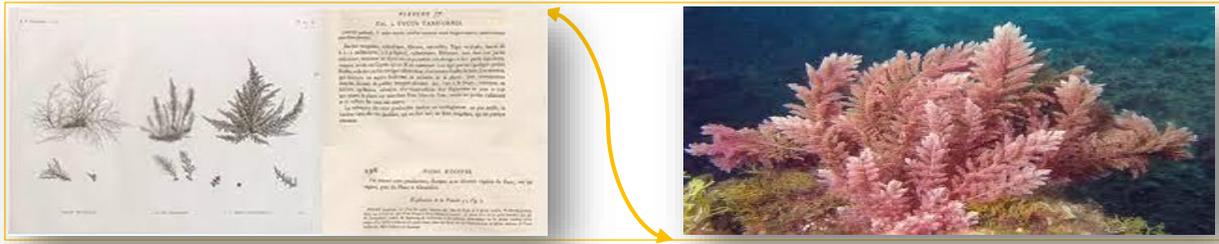


Figure 2 : A gauche identification d'*A. taxiformis* par Delile extrait des planches (1813) à droite *Aspagopsis taxiformis* rhodophycée (**cndrb.dz**)

1.2.2 Les spongiaires

Les spongiaires, sont des animaux marins non mobiles qui vivent fixés sur le sédiment. Leur répartition couvre l'ensemble des océans du globe. Elles inhalent et exhalent par des pores connectés à une chambre contenant des choanocytes qui sont des cellules flagellées permettant de ramener les aliments et ils se développent depuis les plus faibles profondeurs jusqu'à plus de 2000 mètres au-dessous du niveau de la mer. Ils sont subdivisés en trois classes : les *Demospongiae*, les *Hexactinellida* et les *Calcarea*.

1.2.2.1 *Spongia officinalis*

Spongia officinalis (**Linnaeus,1759**) est une éponge globulaire de couleur foncée, finement conuleuse, très compressible, spongieuse et élastique. À l'intérieur, elle est de couleur claire entre le noir et le blanc, plus foncées lorsqu'elles sont exposées à la lumière directe, claires lorsqu'elles poussent dans l'obscurité. Elle a généralement plusieurs oscules sur la face supérieure. Elle n'a pas de spicules, juste un réseau confus de fibres spongieuses jaunes (figure 3).

C'est une espèce méditerranéenne, signalée également à quelques reprises le long des côtes atlantiques de l'Espagne.



Figure 3: *Spongia officinalis* (**shutterstock**)

1 Revue bibliographique

1.2.3 Les échinodermes

Les échinodermes (Embranchement des *Echinodermata*) c'est l'une des meilleurs faunes reflétés dans les archives fossiles. Les plus anciens échinodermes reconnus proviennent de Cambrien, il y a environ 540 millions d'années. Ils sont considérés comme un taxon à partir de 1847 (**Bottjer et al., 2006**). Ils sont répartis sur toute la côte d'Ecosse et d'Irlande (**Byrne, 1990 ; Moulin et al., 2011**) depuis l'Atlantique Nord, (**Byrne, 1990 ; Moulin et al., 2011**) jusqu'au Maroc (**Bayed et al., 2005**), Sa distribution est affectée par la température, les espèces sont particulièrement communes dans les zones où les températures de l'eau varient entre 10 et 15°C en hiver et entre 18 et 25°C en été.

1.2.3.1 *Arbacia lixula*

L'oursin noir *Arbacia lixula* (**Linnaeus, 1758**) est considérée comme l'un des macro-invertébrés les plus fréquents dans les récifs méditerranéens peu profonds (**Gianguzza et al., 2013**). C'est un oursin noir régulier avec un épithélium homogène, relativement plat, avec de longues épines dures (Figure 4).



Figure 4 : *Arbacia lixula* (shutterstock)

1.2.3.2 *Echinaster sepositus*

Echinaster sepositus est une étoile de mer très commune sur la façade méditerranéenne. Elle affectionne les substrats durs comme les rochers, depuis la surface jusqu'à de grandes profondeurs (au moins 250 m de profondeur). Cette étoile de mer (figure 5) a un diamètre de 10 à 20 cm. Elle est de couleur rouge ou orange-rouge vif, leur reproduction est sexuée, du printemps à l'automne.

1 Revue bibliographique



Figure 5 : *Echinaster sepositus* (shutterstock)

1.2.4 Les mollusques

Les mollusques existent depuis longtemps et constituent une partie importante de la faune mondiale, car ils sont apparus en même temps que la plupart des phylums animaux il y a environ 550 millions d'années (**MolluscaBase**).

En Méditerranée, ils constituent l'un des groupes d'invertébrés les plus importants, représentant environ un quart des espèces. Ils sont également une importante source de nourriture pour de nombreux animaux marins et sont récoltés et élevés pour la consommation humaine (**MolluscaBase**).

Ils sont caractérisés par :

*Un manteau (avec un épiderme sécrétant une coquille de carbonate de calcium) qui recouvrant la masse viscérale

*Une masse viscérale dorsale contenant des organes internes.

*Un pied ventral, musclé, de formes variées.

*Un organe râpeux dans la partie antérieure du tube digestif, la radula.

1.2.4.1 *Indothais lacera*

Indothais lacera est une espèce d'escargot de mer, un mollusque gastéropode marin de la famille des Muricidae, les escargots murex ou escargots de roche.

Cette espèce est répartie dans l'océan Indien le long de l'Afrique du Sud, dans la mer Rouge (**ine, P.1986**), dans la mer Méditerranée et dans l'océan Pacifique le long de l'Asie du Sud-Est.

1 Revue bibliographique

Dont la coquille en forme de spirale mesure taille +3.5cm avec une largeur d'ouverture de 1,0-1,4 cm. Sa couleur est beige entrecoupée de quelques taches de différentes couleurs, et son pied très développé est particulièrement apprécié d'un point de vue gustatif (figure 6).



Figure 6 : Coquille *Indothais lacera* (shutterstock)

1 Revue bibliographique

1.3 La symbiose microbienne

Toute forme de vie sur terre se développe grâce à l'interaction qui se produit entre l'environnement et tous les êtres vivants ainsi aux relations qui s'établissent entre les différentes espèces.

1.3.1 Définition de symbiose

La symbiose peut être définie comme une association spécifique et durable de deux ou plusieurs espèces différentes qui sont en contact direct de l'un avec l'autre dans le but d'obtenir un bénéfice. Les partenaires du symbiote sont appelés l'hôte et le symbiote. La symbiose joue un rôle important dans la nutrition et adaptation à l'environnement. Il existe plusieurs types de bactéries symbiotiques. L'existence de populations symbiotiques dépend de certaines conditions environnementales, établissant ainsi la capacité des symbiotes à s'adapter rapidement aux changements environnementaux (Halary, S., 2009). Les relations symbiotiques sont très importantes dans l'environnement car elle permet à de nombreuses espèces de survivre. La symbiose est considérée comme un activateur de l'évolution de ces espèces en parvenant à améliorer leur mode de vie.

Le symbiote vit à l'intérieur ou à la surface de l'hôte. On parle d'une endosymbiose si l'microorganisme vit à l'intérieur des cellules de l'hôte ou dans les espaces qui les sépare. Si le symbiote vit à la surface de l'hôte, on parle d'une exosymbiose. Par ailleurs, on peut aussi classer la symbiose comme obligatoire lorsque la relation est nécessaire à la survie de l'un des participants, et facultative lorsque la relation profite à l'un des organismes mais n'est pas nécessaire à sa survie.

1.3.2 Mode de transmission des microorganismes symbiotiques :

Les symbiotes microbiens peuvent coloniser un nouvel organisme hôte par deux modes de transmissions possibles :

1.3.2.1 La transmission verticale :

Les symbiotes intracellulaires se transmettent majoritairement par la circonvolution de la lignée germinale femelle par l'intermédiaire de gamètes ou d'embryons (Szklarzewicz & Michalik 2017).

1 Revue bibliographique

1.3.2.2 La transmission horizontale :

Désignant l'acquisition d'un symbiote à partir de l'environnement ou d'autres individus porteurs. Le symbiote transmis horizontalement peut être un microorganisme avec un mode de vie libre ou provenir d'un autre organisme ou congénère sans qu'il y ait forcément d'apparentement entre les deux individus (Bright & amp ; Bulgheresi ., 2010).

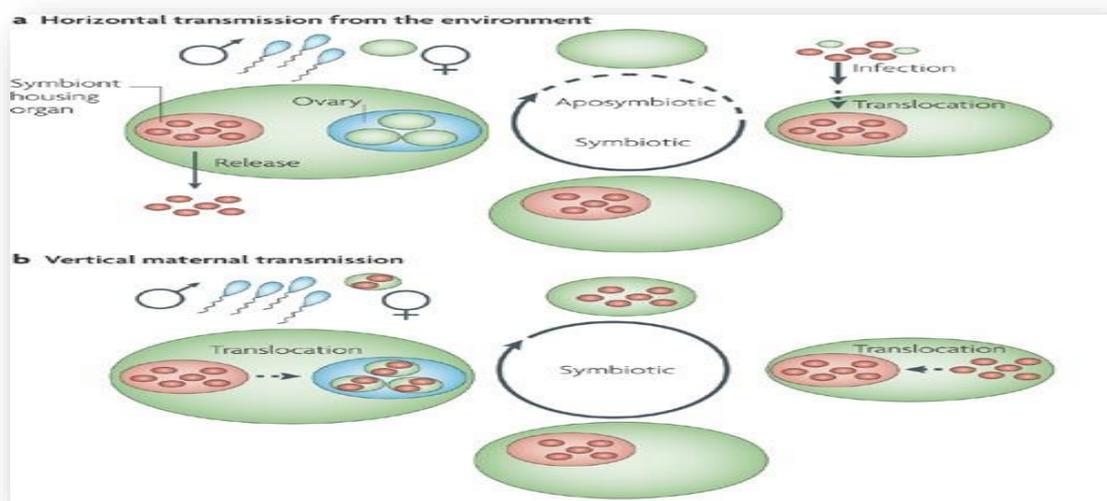


Figure 7 : Mode de transmission des symbiotes microbiennes (Bla, S. L. (s. d.). *Rimicaris exoculata*. 282)

1.3.3 L'intérêt de microorganismes symbiotiques

Certains symbiotes bactériens peuvent conférer une protection vis-à-vis des pathogènes ainsi que les agressions environnementales, en particulier lorsqu'un partenaire vit à l'intérieur d'autre. Il présente un grand intérêt en tant que source prometteuse de produits d'intérêt chimique et de métabolites secondaires réactifs. Les conditions chimiques et physiques du milieu marin et l'énorme pression des concurrents (prédateurs et agents pathogènes) ont entraîné la production d'une large gamme de métabolites secondaires chimiquement divers, dont certains sont considérés comme des composés principaux importants pour le développement de médicaments. Plus de 40 000 produits naturels marins ont été identifiés à partir d'une variété d'organismes marins, y compris des microorganismes qui se sont avérés être la véritable source de ces molécules bioactives. Ils aident également à la production de vitamines (Liu et al., 2019).

1 Revue bibliographique

1.4 La biotechnologie bleue

1.4.1 Définition

La biotechnologie bleue est en général considérée comme l'utilisation des bioressources marines étant source d'applications biotechnologiques. Autrement, les ressources marines et les organismes marins sont utilisés pour développer des produits ou des services à des fins biotechnologiques (ECORYS., 2014). En revanche, la biotechnologie marine comprend également l'application de la biotechnologie développée à partir de n'importe quelle ressource (marine, terrestre, d'eau douce ou une combinaison des deux) au milieu marin et aux activités humaines qui s'y déroulent (Collins et al.,2018).

1.4.2 Applications de la biotechnologie bleue

1.4.2.1 Industrie pharmaceutique

L'exploration du milieu marin a conduit à la découverte de plusieurs substances issues d'organismes marins, dont la production devient une réalité pour l'industrie pharmaceutique. Ceux-ci comprennent les caroténoïdes, les acides gras polyinsaturés, les protéines et les enzymes (Pulz et al., 2004 ; De Jesus Raposo ; Murray et al., 2013), ces produits ont des applications dans l'industrie pharmaceutique en tant qu'antioxydants, antibiotiques, analgésiques, antinéoplasiques, agents anti-inflammatoires et antifongiques (Murray et al.,2013). Parmi les composés dérivés d'organismes marins en usage clinique, quatre sont des médicaments. Dans les applications cliniques, quatre sont utilisées pour traiter le cancer : la cytarabine (Cytosars®), la trabectédine (Yondeliss®), le mésylate d'éribuline (Halavens®) et le conjugué d'anticorps brentuximab vedotin (Acentriss®). (Jimenez et al., 2018).

Les protéases microbiennes telles que la serrapeptase, la serrazime, la lysostaphine, la L-asparaginase, la L-glutaminase, la streptokinase, la streptokinase-streptodornase et là xiaflex, sont utilisées dans le traitement des inflammations, des troubles des voies respiratoires, des maladies cardiovasculaires et du cancer (Chanalia et al., 2011). Grâce au développement de la microbiologie et de l'ingénierie des protéines, les protéases arrivent maintenant assez fréquemment sur le marché en tant que médicaments/agents thérapeutiques (Shankar et al.,2021).

1 Revue bibliographique

Les lipases sont importantes dans les applications pharmaceutiques des réactions de transestérification et d'hydrolyse. La lovastatine, un médicament par lequel cette lipase est largement utilisée pour l'hydrolyse asymétrique de l'ester de 3-phénylglycidate, un intermédiaire important dans la synthèse du chlorhydrate de diltiazem (**Gurung et al., 2013** **Sharma et al., 2014**). Les lipases marines ont présenté des activités anti biofilm contre des agents pathogènes alimentaires courants tels que *Bacillus cereus* **MTCC1272**, *Listeria sp.* **MTCC1143**, *Serratia sp.* **MTCC4822**, *E. coli* **MTCC443**, *P fluorescens* **MTCC1748**, et *Vibrio parahaemolyticus* **MTCC459**. (**Navvabi et al., 2018**)

L'une des applications les plus importantes des agarases qu'elles peuvent être utilisées dans la production d'oligosaccharides d'agar qui présentent diverses fonctions biologiques et physiologiques, notamment une activité antioxydante (**Wang et al., 2004**), des effets hydratants et blanchissants sur les cellules de mélanome (**Kobayashi et al., 1997**), une activité anti-inflammatoire (**Yun et al., 2013**), l'inhibition de la croissance bactérienne et (**Li et al., 2007**). (**Jahromi et al., 2018**), anti-obésité, antidiabétique, immunomodulatrice, antitumorale, antioxydante, etc (**Park et al., 2020**).

Lee et ses collègues (**Lee et al., 2017**) ont étudié l'activité antitumorale du néoagarohexaose (DP6) produit par la β -agarase DagA néoagarohexaose (DP6) contre des cellules de mélanome B16F1 (MCs) en contrôlant l'interférence entre les cellules dendritiques (DCs) et les cellules tueuses naturelles (NK) via le récepteur Toll-like 4 (TLR4). Il a été constaté que DP6 augmente l'activité antitumorale contre les MCs B16F1 par l'intermédiaire de via l'activation des cellules NK médiées par les DC, de manière dépendante de TLR4, ce qui indique que DP6 pourrait être considéré comme un prometteur pour l'immunothérapie du cancer (**Lee et al., 2017**).

1.4.2.2 Industrie Alimentaire

La biotechnologie bleue, où les milieux aquatiques inspirent à produire divers produits tels que les additifs alimentaires (**Hartmann et al., 2014**).

L'environnement marin offre une énorme source d'aliments sains avec des composés bioactifs et des métabolites secondaires dérivés d'algues, de champignons, de bactéries, crustacés, poissons, éponges et autres organismes marins (**Lordan et al., 2011**). Les enzymes et les exo polysaccharides obtenus à partir d'extrêmophiles ont des propriétés potentielles uniques pour de multiples applications (**Prabha et al., 2020**). Parmi ces enzymes on cite :

1 Revue bibliographique

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases, **E.C. 3.1.1.3**) sont des sérines hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des triacylglycérols (TAG) en glycérol et acides gras, la synthèse d'esters à partir de divers alcools et acides gras, et la transestérification. Elles ont plusieurs rôles, comme dans l'industrie alimentaire, où elles sont impliquées dans l'amélioration de la qualité du pain par des changements dans les lipides de la farine ; dans l'amélioration de la saveur du beurre, du fromage et de la margarine, et dans la synthèse de lipides structurés pour les aliments pour bébés. En outre, les lipases sont utiles pour augmenter le titre des acides gras polyinsaturés dans les huiles végétales et pour améliorer la digestibilité des lipides naturels.

La cellulase est un complexe de trois enzymes différentes : l'endoglucanase (**E.C.3.2.1.4**), l'exoglucanase (**E.C. 3.2.1.91**) et la β -glucosidase (**E.C. 3.2.1.21**) (**Singh et al., 2019**), impliquée dans les industries alimentaires pour le traitement des jus de fruits et dans l'extraction de la couleur des jus (**Barzkar et al., 2020**).

L'agarase dégrade l'agar en oligosaccharides d'agar qui ont un large éventail d'applications dans l'industrie alimentaire ; ils peuvent être utilisés pour les boissons, le pain et certains aliments à faible teneur en calories... (**Zhang et al., 2010**).

1.4.2.3 Industrie cosmétique

La biotechnologie marine joue un rôle important dans l'industrie cosmétique, en présentant de nouveaux composés pour la production de cosmétiques (**Vivó-Sesé et Pla, 2007**). Certains de ces cosmétiques dans lesquels sont incorporés des composés marins ont été obtenus par biotechnologie et sont déjà commercialisés. A titre d'exemple, le complexe DG-ADNR est l'un des composants de l'extrait enzymatique de lysat de *Micrococcus*. Le *Micrococcus* est dérivé du sol et des océans et possède une grande résistance aux rayons UV.

De plus, il contient l'enzyme UV-endonucléase, qui accélère la récupération des dommages causés par le soleil et agit dans la réparation de l'ADN. Actuellement, ce composé est inclus dans les crèmes pour le visage (**Emiliano, Guimaraes et al., 2012**).

Les cosmétiques blanchissants sont très demandés pour le traitement du lentigo, du masque de grossesse, de l'hyperpigmentation résiduelle ou l'hyperpigmentation consécutive à une intoxication médicamenteuse. La tyrosinase est l'enzyme clé de la synthèse de la mélanine. Des inhibiteurs de cette enzyme sont activement recherchés (**Pillaiyar, Manickam, et**

1 Revue bibliographique

al.,2017). De nombreux composés naturels provenant d'organismes marins ont déjà été employés comme inhibiteurs de la tyrosinase (**Guillerme et al., 2017**).

Les Japonais utilisent l'oligosaccharide d'agar comme additif cosmétique hydratant, et il a également de bons effets de conditionnement des cheveux (**Rasmussen et al., 2007**).

1.4.2.4 Industrie chimique

Plusieurs chercheurs dans le monde entier essaient maintenant d'exploiter les microbes pour l'isolement d'enzymes alcalines en raison de leur énorme potentiel dans l'industrie détergent (**Chakraborty et al., 2011**). La biotechnologie bleue offre cette opportunité en cherchant des enzymes utiles.

Les amylases (endo-1,4--d-glucanohydrolases **EC 3.2.1.1**) sont des endoenzymes extracellulaires qui hydrolysent aléatoirement l'amidon pour donner divers produits, y compris des dextrans et des polymères de plus en plus petits composé d'unités de glucose (**Gupta et al., 2003**).

Les enzymes permettent également d'abaisser les températures de lavage. Les amylases sont utilisées dans les détergents en poudre pour le linge et pour la lave-vaisselle automatique (**Gupta et al., 2003**).

On a trouvé que les micro-organismes sont les ressources les plus appropriées pour la production de protéases (**Zhang et al., 2010**). La protéase à sérine alcaline provenant d'une protéobactérie marine a été tolérante au sel, aux solvants, aux détergents et aux agents de blanchiment, et a montré un potentiel pour l'industrie des détergents et le lavage à sec (**Muffler et al., 2015**).

En fonction du site de clivage, les pectinases sont divisées en trois groupes : (1) les hydrolases composées de la polygalacturonase, PG (**EC 3.2.1.15**) ; (2) les lyases/trans-éliminations comprenant la pectinlyase, PNL (**EC 4.2.2.10**) et la pectate lyase, PL (**EC 4.2.2.2**) ; (3) pectine estérase, PE (**EC 3.1.1.11**) (**Yadav et al., 2009**). Les eaux usées provenant de l'industrie de transformation des agrumes contiennent des matières pectinacées qui sont à peine décomposées par les microbes lors du traitement par boues activées (**Tanabe et al., 1986**).

1 Revue bibliographique

Les industries de transformation des aliments végétaux libèrent de la pectine, contenant des eaux usées comme sous-produit. Le prétraitement de ces eaux usées avec des enzymes pectinolytiques facilite l'élimination de la pectine et les rend aptes à être décomposées par un traitement par boues activées (**Gupta et al., 2005**).

(**Hobbs et al., 2018**) ont caractérisés sept enzymes clés provenant d'une bactérie marine qui, ensemble, dégradent entièrement le squelette de la pectine en ses monosaccharides constitutifs. Ces enzymes peuvent être utilisées dans la production de biocarburants à partir de déchets végétaux.

1.5 Iridescence

1.5.1 Définition

Selon le dictionnaire Larousse l'iridescence :(Qui brille avec des reflets irisé), irisé :(qui a les couleurs de l'arc en ciel). D'après (**Mason .,1927**) : « iridescence a la capacité de modifier la couleur d'objet qui la présente quand angle de vision varie ». Entomologiquement parlant, l'iridescence est une réflectance strictement spectrale (de type arc-en-ciel) (**Nichols et al., 1989**). Le terme dérive du latin et du grec ' iris' qui signifie arc-en-ciel (« Barnhart Concise Dictionary of Etymology » 1988).

L'iridescence peut être décrite par un autre terme gonochorisme qui est une variation de couleur selon les angles de lumière et de vue qui n'est pas perçue comme de l'éclat (**Ershov et al., 2004**). L'origine de ce phénomène est liée aux interactions qui se produisent entre la lumière et la structure des matériaux (interférence, diffraction) (**Berthier 2010 ; Boulenguez 2009**), phénomène d'interférences qui peut avoir lieu, par exemple dans des couches minces, cas d'une bulle de savon ou par diffraction sur des réseaux, cas du disque compact (**Chiraz et al., 2018**) (figure 8).

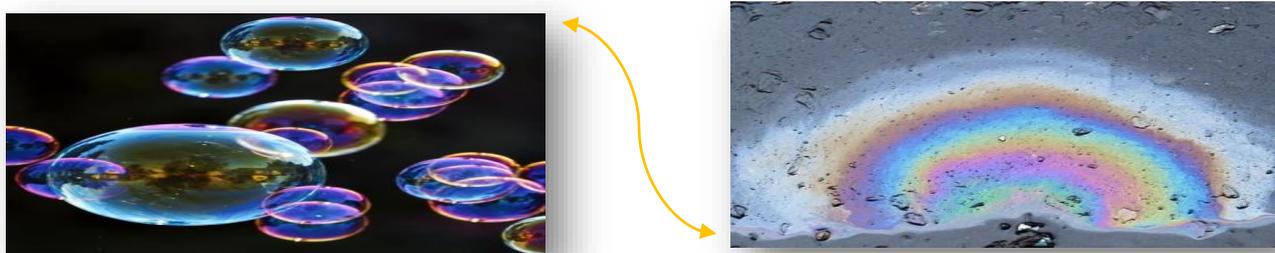


Figure 8 : A gauche iridescence observée sur les bulles de savon à droite iridescence par une nappe d'huile.

1 Revue bibliographique

1.5.1.1 Interférence

Les couleurs irisées sur les bulles de savon, les nappes d'huile ou d'essence sont causées par les interférences dans des couches minces. La réflexion est augmentée en superposant plusieurs couches. Chaque couche est caractérisée par son indice de réfraction (n) et son épaisseur (e).

Considérons une couche mince dans l'air (figure 9). Soit une onde électromagnétique de longueur d'onde (λ) incidente sur la couche mince. A la première interface, une partie de cette onde est réfléchie, l'autre est transmise. L'onde transmise se retrouve dans la couche en position d'onde incidente sur la seconde interface. Elle donne lieu à une onde transmise et une onde réfléchie. Ce jeu de va-et-vient se poursuit entre les deux faces de la couche et donne un nombre infini de rayons réfléchis et transmis (Berthier.,2010). Les deux premiers rayons réfléchis sont d'intensité similaire et les autres rayons sont négligeables. A l'infini, dans la direction spéculaire, ces deux rayons se superposent. Il y a interférence dans la réflexion (Chiraz et al., 2018).

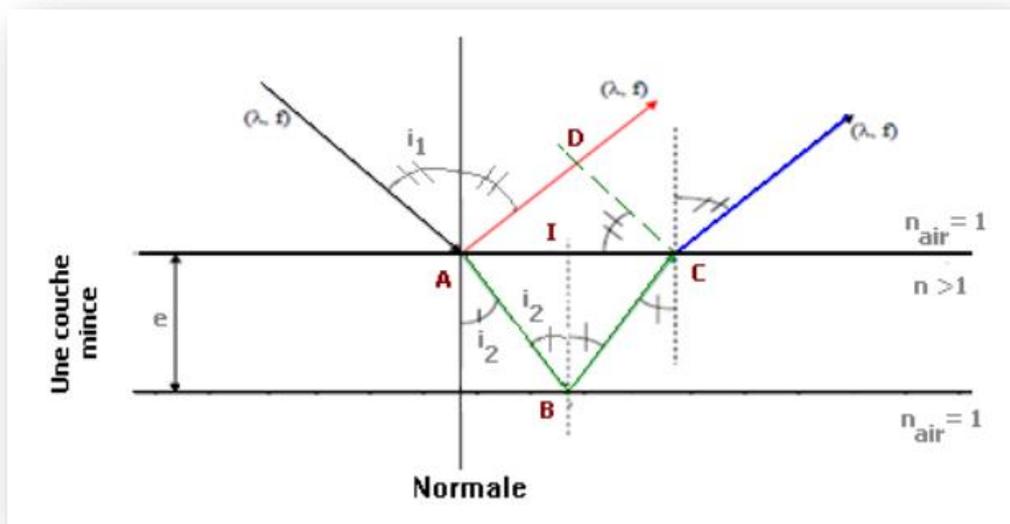


Figure 9 : Les interférences dans une couche mince prise de (Zeng et al., 2018)

[I 1] = [AD] : chemin optique parcouru par la 1 ère onde

[I 2] = [ABC] : chemin optique parcouru par la 2ème onde

1 Revue bibliographique

1.5.1.2 Diffraction

Le phénomène de diffraction de la lumière par des fentes et des objets produit de la couleur à partir de lumière blanche exemple : l'éclairage d'un écran avec une fine fente de dimension égale aux longueurs d'ondes dans le visible (entre **750 nm** et **400 nm**) (**Kientz .,2012**). Le principe d'un réseau de diffraction est montré en (annexe n°1)

1.5.2 Iridescente chez les animaux et les bactéries

1.5.2.1 Chez les animaux

À l'exception de la bioluminescence, les couleurs animales sont causées par deux principaux mécanismes, ou par leurs combinaisons :(1) la coloration pigmentaire et (2) la coloration structurelle (**Doucet et al.,2009**).

1.5.2.1.1 La coloration Pigmentaire

Selon (**Chiraz et al., 2018**) : « Les pigments sont des petites particules solides qui apportent la couleur à une préparation liquide ou solide. Il y a plusieurs sortes de pigments selon leurs propriétés optiques »

Les couleurs pigmentaires, dans lesquelles les longueurs d'onde de la lumière entrante sont sélectivement absorbées par une entité moléculaire spécifique, appelée pigment. La lumière réfléchi est donc appauvrie en certaines longueurs d'onde par rapport à la lumière entrante (**Gruson .,2019**).

1.5.2.1.2 La coloration structurale

Les couleurs structurelles sont produites par l'interaction physique entre la lumière et des variations à l'échelle nanométrique dans les tissus tégumentaires de certains animaux. On trouve des couleurs iridescentes dans une grande diversité de taxons animaux, allant des minuscules copépodes marins aux insectes et oiseaux terrestres. Chez les animaux, l'iridescence est causée par l'interaction de la lumière avec les tissus biologiques qui sont nanostructures afin de produire des films minces ou des réseaux de diffraction (**Doucet et al., 2009**).

1 Revue bibliographique



Figure 10 : Exemples des animaux iridescents : de la gauche vers la droite ; *Hoplia coerulea*, *Polymmatius icarus* et *Agelaiocercus coelestis*.

1.5.2.2 Chez les bactéries

La coloration chez bactéries est reconnue comme étant des pigments, fluorescence ou bioluminescent (Kientz .,2012) et l'iridescence.

1.5.2.2.1 La Pigmentation chez les bactéries

Les pigments bactériens synthétisés dans la paroi cellulaire ou l'espace périplasmique sont les: pyrroles, phénazines, caroténoïdes, xanthophylles, quinines et les dérivés quinone, Astaxanthin, Canthaxanthin, Indigoidine, Prodigiosin, Pyocyanin, Violacein, Zeaxanthin et Xanthomonadin (Kientz .,2012),(Ahmad et al., 2013).

1.5.2.2.2 La Fluorescence chez les bactéries

Les molécules fluorescentes sont des peptides complexes (sidérophores) telles les pyoverdines et pseudobactines. La pyoverdine est structurée par, plusieurs groupements aromatiques, elle absorbe à environ **400 nm** et émet à **460 nm** (bleu) (Kientz .,2012) .

Pseudomonas sensu stricto produisent et excrètent, dans des conditions de limitation du fer, des sidérophores jaune-vert fluorescents, appelés pyoverdines (Cornelis et al., 2002).

1.5.2.2.3 Bioluminescence chez les bactéries

La luciférase des bactéries, contrairement à celle de tout autre groupe lumineux (à l'exception peut-être des champignons), est liée à la voie respiratoire, fonctionnant comme un

1 Revue bibliographique

transfert d'électrons directement vers l'oxygène au niveau de la flavine réduite. La réaction d'émission de lumière se déroule ensuite par la réaction de l'oxygène moléculaire avec la flavine réduite pour former une espèce proxy intermédiaire luciférase-flavine, dont la décomposition fournit une énergie (environ 210 kJ mol⁻¹) suffisante pour laisser l'un des produits dans un état singulier excité électroniquement, avec émission ultérieure de lumière (Hastings et al., 1985).

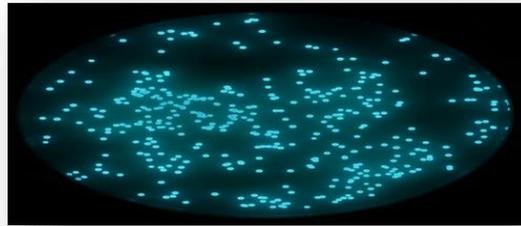


Figure 11: Colonies bactériennes bioluminescentes (SCINCE ET VIE).

1.5.2.2.4 L'iridescence chez les bactéries

L'iridescence bactérienne qui est un nouveau critère observé par transillumination, les bactéries iridescentes contrairement aux bactéries pigmentées se colorent par plusieurs couleurs selon l'angle d'observation.

L'iridescence a été peu étudiée dans le royaume des procaryotes. Dr Pijper qui découvrit accidentellement l'effet coloré particulier de colonies coccoïdes (Pijper, 1918). Il évoqua un phénomène de coloration différent de la pigmentation. Pour un étalement homogène, les couleurs étaient visibles dans le noir avec une source concentrée de lumière sur une boîte de culture placée entre l'observateur et la lumière.

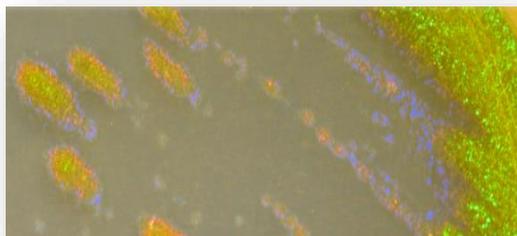


Figure 12 : Bactéries iridescentes (kientz.,2012).

1 Revue bibliographique

1.5.3 Intérêt de l'iridescence

L'iridescence peut offrir des rôles communicatifs intraspécifique (ex : comportement sexuel) ou interspécifique (ex : avertissement). Les autres rôles seraient liés à la photoprotection, la thermorégulation, la répulsion d'eau, la réduction de frictions. Le phénomène est très répandu dans le monde vivant.

Chez les bactéries, l'exploration des rôles fonctionnels de l'iridescence n'a jamais été faite.

Les structures périodiques sont également responsables de la réduction de la mécanique chez certains animaux fouisseurs (**Piñero-Vidal et al., s. d.**). Un rôle mécanique similaire pourrait également être investigué pour l'iridescence bactérienne (**Kientz., 2012**). La présence de bactéries iridescentes dans des roches qui a combiné des conditions stressantes de l'exposition solaire, la dessiccation et les grandes fluctuations de la salinité, peut guider aux rôles biologiques possibles des bactéries iridescentes. (Thermorégulation, protection UV, filtrage de la lumière et prévention de la dessiccation) (**Meadows et al., 2009 ; Seago et al., 2009**).

Nous supposons alors que les rôles de l'iridescence pourraient concorder avec un mode de vie associé. Une fonction de tolérance à la chaleur a même été avancée pour l'association avec les Flavobacteriaceae car celle-ci est restreinte à des climats chauds. Cette fonction pourrait potentiellement être liée à l'iridescence bactérienne car la thermorégulation fait partie des rôles non communicatifs de l'iridescence décrits chez des organismes supérieurs (**Meadows et al., 2009**).

2 Matériel et méthodes

2 Matériel & Méthodes

2 Matériel et méthodes

2.1 Laboratoire d'accueil

La partie pratique a été réalisée au niveau de deux laboratoires :

*Laboratoire PFE de département de biotechnologie et d'écologie agricole de l'université Saad DAHLEB (Blida 1) durant la période s'étalant du **25.03.2022** au **01.06.2022**.

*Laboratoire d'hygiène de wilaya de Blida à Bananier.

2.2 Matériel

2.2.1 Matériel biologique

* Espèces marine :

L'algue rouge (*A.taxiformis*), L'éponge (*S.officinalis*), L'oursin (*A.lixula*), L'étoile de mer (*E.sepositus*), le coquillage (*Indothais lacera*).

* Les germes tests :

Les souches bactériennes de références :

- *Pseudomonas aeruginosa* cultivée sur milieu Cétrimide
- *Staphylococcus aureus* **ATCC 19095** cultivée sur milieu Chapman
- *Escherichia coli* **ATCC8739** cultivée sur milieu MAC CONKEY
- *Bacillus cereus* cultivée sur milieu gélose à amidon

Les souches de champignons microscopiques :

- *Candida albicans*
- *Aspergillus niger*

2.2.2 Matériel non biologique

L'ensemble de la verrerie et le gros matériel habituellement présent dans un laboratoire de microbiologie voir annexe n °2.

2 Matériel et méthodes

2.3 Méthodes

2.3.1 Echantillonnage

Des plongeurs professionnels nous ont aimablement assuré l'échantillonnage des espèces marines, de manière aseptique, dans des bocaux en verre, à fermeture hermétique qui ont été préalablement stérilisés. Cinq espèces marines différentes ont été prélevées en mois de mars 2022 à partir des sites indiqués dans la figure 13 ci-après :

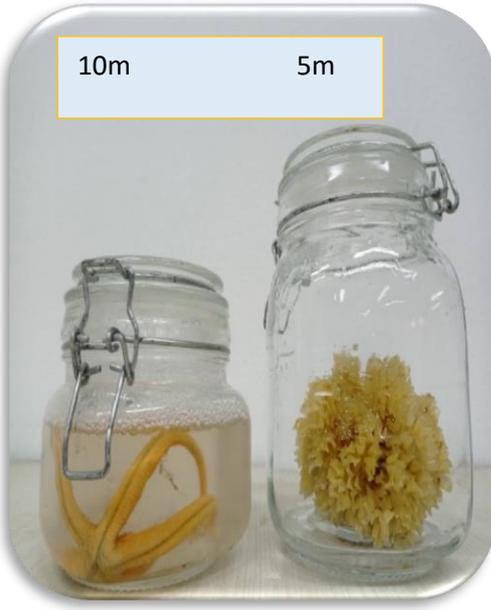


Figure 13 : Position géographique de la station El far et Port de Cherchell (Google Earth et Google Maps)

Les échantillons sont transportés dans une glacière jusqu' au laboratoire puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation Le Tableau II donne plus de détails sur les échantillons.

2 Matériel et méthodes

Tableau II : Détail et informations sur le prélèvement des espèces.

Wilaya	Alger	Tipaza
Site d'échantillonnage	plage Hammamet	Port de Cherchell
Date de prélèvement	18.03.2022	28.03.2022
Heure de prélèvement	12h30min	11h53min
La distance (plage-site de prélèvement)	10 km	15 km
Profondeurs	Entre 3m et 20m	Entre 5m et 10m
Types.d'espèces : <i>A.taxformis</i> , <i>S.officinalis</i> , <i>A.lixula</i> , <i>E.sepositus</i> , <i>I.lacera</i>		

2.3.2 Isolement des bactéries symbiotiques associées aux espèces marines

Tous les échantillons sont rincés maintes fois à l'eau de mer stérile avant d'antiseptiser les tissus superficiels des espèces marines (à l'exception des espèces d'algues) à l'aide d'un coton imbibé d'alcool à 70°.

2.3.2.1 Préparation des solutions mères

Les échantillons sont découpés avec des ciseaux stériles puis broyés aseptiquement à l'aide d'un mortier préalablement stérilisé. Les solutions mères sont obtenues en mettant en suspension **10 g** de chaque échantillon broyé dans **90 ml** de bouillon nutritif à base d'eau de mer préparé par nos soins (Annexe 3). L'homogénéisation est assurée grâce au vortex pendant au moins **10 minutes**. Les solutions mères ainsi obtenues sont incubées, en mode statique, dans une étuve réglée à **30 °C** pendant **24h**.

2 Matériel et méthodes

2.3.2.2 Préparation des dilutions

- **Principe**

Une dilution en série est une dilution répétée d'une solution mère pour amplifier rapidement le facteur de dilution.

- **Mode opératoire**

A partir de chaque solution mère incubée, une série de dilutions décimales jusqu' à 10^{-7} est réalisée dans des conditions d'asepsie. On transvase aseptiquement un ml de chaque solution mère dans un tube à essai contenant 9 ml de bouillon nutritif à base d'eau de mer. Cette opération est répétée jusqu'au tube de la dilution la plus élevée.

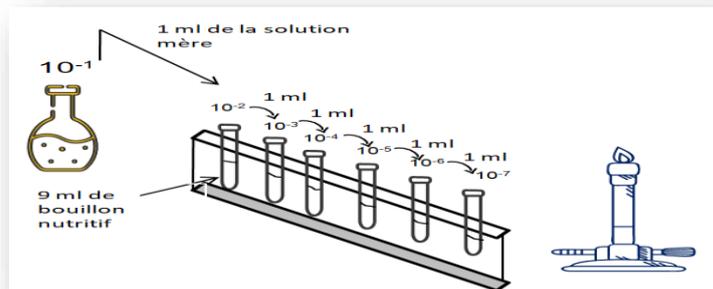


Figure 14 : Schéma de préparation des dilutions à partir de la solution mère

2.3.2.3 Isolement des bactéries sur milieu solide par la technique

Des quadrants

- **Principe**

Epuiser un dépôt initial (à partir des bouillons de cultures) en faisant des étalements successifs dans quatre différentes directions.

- **Mode opératoire**

Les souches sont isolées sur une gélose nutritive à base d'eau de mer (Annexe 3), pour cela on aensemencé par la technique des quadrants où on a divisé notre boîte Pétrie sur quatre. Sur le premier quadrant on dépose l'inoculum en utilisant l'anse en platine flambée en assurant qu'elle s'est refroidie, pour chaque échantillon, en allant de la dilution la plus élevée (10^{-7}) jusqu'à la dilution la moins élevée (10^{-1}), l'ensemencement se fait du haut vers le bas en assurant

2 Matériel et méthodes

que l'anse ne se retourne pas en arrière pour qu'elle ne se charge pas des bactéries afin d'isoler le maximum des bactéries. On fait tourner notre boîte Pétri 90° et on ensemence comme le premier quadrant en desserrant les stries, la même chose pour le troisième et le quatrième quadrant. On ferme hermétiquement nos boîtes Pétries par un papier film, on les incube dans l'étuve stérilisée par un coton imbibé à l'alcool à 30°C pendant 24 heures.

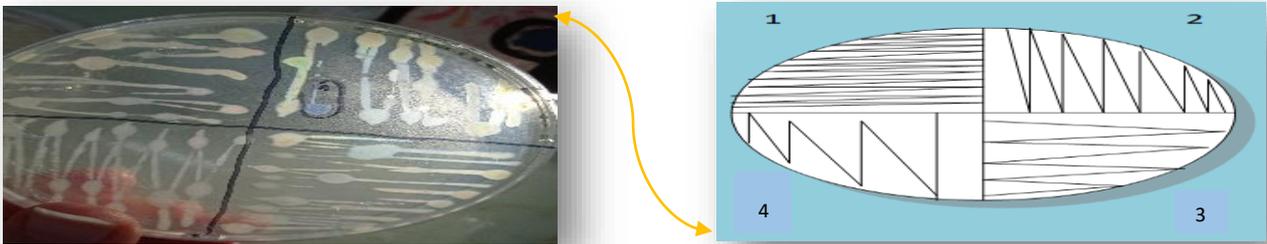


Figure 15 : Technique des quadrants.

2.3.3 Purification des souches

- **Principe**

Après culture bactérienne, différentes souches sont obtenues. La purification se fait par repiquages successifs des colonies ayant un aspect macroscopique différent.

- **Mode opératoire**

Pour avoir une culture moins chargée et des colonies plus isolées l'instrument d'ensemencement est flambé en passant d'un quadrant à un autre (figure 16).

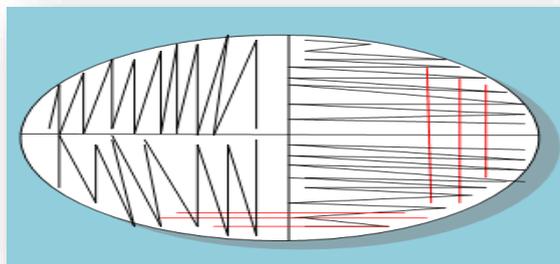


Figure 16: Technique de purification des souches bactériennes.

2.3.3.1 Purification des souches sur le milieu chromagar d'orientation

Le milieu CHROMagar® contient un mélange de colorants, permettant la reconnaissance de *C. albicans* (colonies vertes), *C. tropicalis* (colonies bleu métallique), *C.*

2 Matériel et méthodes

krusei (colonies rose pâle et mates). Les autres espèces se présentent sous forme de colonies blanches à violettes, lisses à brillantes (Ouanes *et al.* 2013). Les souches bactériennes ont été piquée sur le milieu CHROMagar afin de confirmer la pureté de nos souches, et l'absence des contaminants.

2.3.4 Etude macroscopique et microscopique des souches isolées

2.3.4.1 Etude macroscopique

C'est une description des caractères morphologiques des souches, après culture sur milieu GN à base d'eau de mer. On caractérise nos souches selon la taille de la colonie, sa forme, son élévation, son contour, sa surface, sa couleur ... etc.

2.3.4.2 Etude microscopique

Cette étape à était faite par le microscope optique.

2.3.4.2.1 Observation de l'état frais

- **Principe**

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler certains modes de groupement.

- **Mode opératoire**

À l'aide d'une pipette Pasteur, on prend une goutte d'eau physiologique stérile et on la dépose sur une lamelle propre. On prend, par la suite, à partir de la colonie une toute petite fraction qu'on dissocie dans la goutte d'eau, on couvre par une lamelle, on ajoute une goutte d'huile à immersion et on passe immédiatement à l'observation sous microscope optique à un grossissement **X 1000 (figure 17)**.

2 Matériel et méthodes

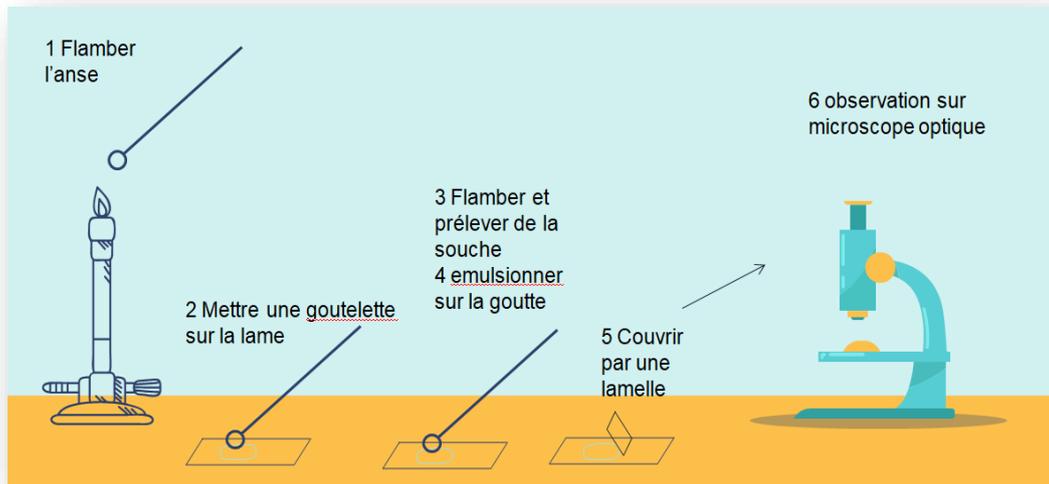


Figure 17 : Schéma récapitulatif des étapes d'observation des souches à l'état frais.

2.3.4.2.2 Observation microscopique après coloration de Gram

- **Principe**

L'observation microscopique après une coloration permet de mieux visualiser les structures. La coloration différentielle de Gram décrite par **Gram en 1884** permet entre autres de différencier entre les bactéries Gram positif et Gram négatif selon la nature de la paroi de ces dernières. Les bactéries ayant une couleur violette sont Gram positif (**Berraho.,2009**).et celles colorées en rose sont Gram négatif.

- **Mode opératoire**

- ❖ **Préparation d'un frottis**

Nous avons déposé une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre, ensuite prélevé une petite quantité de la souche bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur et l'étalé par des mouvements circulaires en l'émulsionnant dans la goutte d'eau ; et, en fin, passé la lame sur la flamme du bec bunsen en écrasant cette dernière trois fois ou plus afin de sécher et fixer l'échantillon.

- ❖ **Protocole de la coloration de Gram (Larpent., 1990).**

Nous avons recouvert la lame avec le Violet de Gentiane pendant une minute, ensuite rincé et recouvert la lame avec le Lugo pendant une minute suivie encore avec un rinçage, puis, utilisé l'alcool pendant 30 secondes et par la fin, recouvert la lame avec La Fuchsine pendant une

2 Matériel et méthodes

minute. Nous avons suivi ces étapes par rinçage puis séchage. L'observation se fait en ajoutant une goutte d'huile à immersion à grossissement **X 1000**.

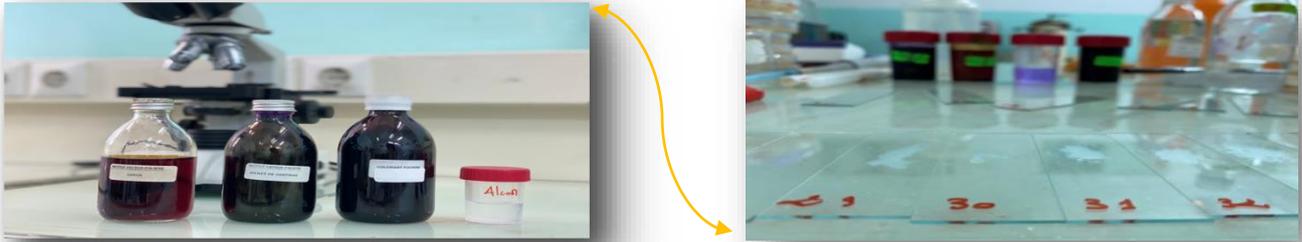


Figure 18 : Protocole de la coloration de Gram.

2.3.5 Etude physiologique

2.3.5.1 Recherche du type respiratoire sur milieu VF (Viande-Foie)

- **Principe**

Une bactérie a des besoins respiratoires spécifiques. Le type respiratoire ou le type énergétique d'une bactérie détermine quel rapport à cette dernière avec le dioxygène O₂ de l'air ou de l'eau.

- **Mode opératoire**

La détermination du type respiratoire s'effectue sur une gélose viande-foie (**Annexe 3**), répartie en tubes et régénérée par chauffage dans un bain-marie bouillon pendant 30 minutes. A l'état semi-solide (45 ° C), les tubes sont inoculés à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée délicatement en décrivant des spirales, de façon àensemencer uniformément le milieu sur toute la hauteur du tube. L'incubation se fait à une température de 30°C pendant 24heures (**Prescott, 2002**).

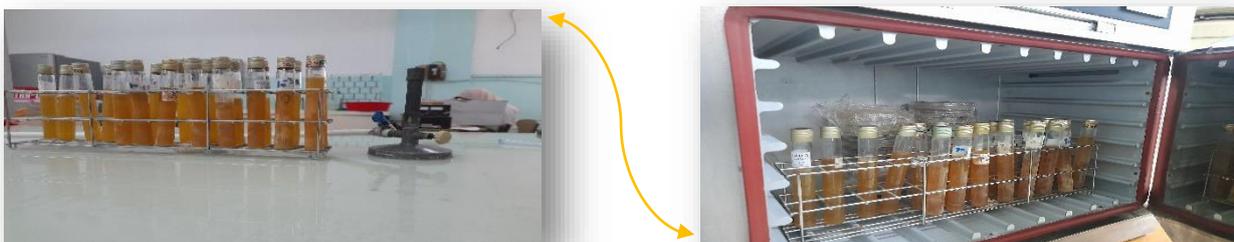


Figure 19 : Les tubes au viande-foie et leur incubation dans l'étuve.

2 Matériel et méthodes

➤ Lecture de résultats

Après incubation, il est possible de reconnaître différents modes de respiration (**figure 20**) :

- * Aérobie stricts (tube 1) : pour les souches qui se cultivent uniquement dans la zone superficielle du tube.
- * Micro-aérophiles (tube 2) : pour les souches qui forment un anneau dans la zone intermédiaire aérobie-anaérobie.
- * Aérobie anaérobie facultatifs (tube 3) : pour les souches qui se développent sur toute la hauteur du tube.
- * Anaérobie stricts (tube 4) : pour les souches qui se cultivent uniquement en profondeur du tube.

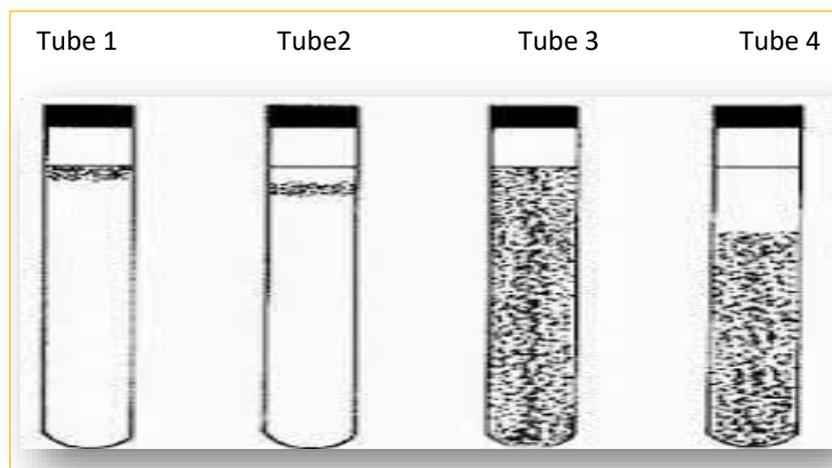


Figure 20 : Les différents types respiratoires chez les bactéries.

2.3.5.2 Test Catalase

La catalase est un enzyme responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par une souche bactérienne.

Principe

Le principe du test consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée au niveau d'une lame et dans une zone toujours stérile à proximité de bec benzène.

2 Matériel et méthodes

➤ Lecture des résultats

Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de l'enzyme (catalase +) (Joffin *et al.*, 2006 ; Tankeshwar, 2013).

2.3.5.3 Test oxydase

Le test oxydase permet la détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries. Cet enzyme intervient à la fin de la chaîne respiratoire.

Le cytochrome oxydase est une protéine membranaire, localisée dans la membrane interne des mitochondries chez les eucaryotes et dans la membrane cytoplasmique chez les procaryotes. Elle permet la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Sa production est mise en évidence sur des disques oxydase (**OX**) imprégnés d'oxalate N-N-diméthylparaphénylène.

- **Principe**

Le principe du test consiste à mettre une colonie de l'isolat sur le disque « Ox » imbibé d'eau physiologique dans une zone toujours stérile à proximité de bec benzène.

➤ Lecture des résultats

Une couleur bleu violacé se manifeste en quelques secondes (**30 S**) si la réaction est positive (Joffin *et al.*, 2006 ; Delarras, 2014).

2.3.6 Criblage des activités enzymatiques

2.3.6.1 Recherche d'une estérase

Ce test permet de révéler la présence d'une estérase chez les souches testées.

Principe

Le principe est d'utiliser un milieu contenant le tween 80° qui est un substrat de l'enzyme recherchée et la détection de sa dégradation.

Mode opératoire

Le test est effectué sur des boîtes Pétri contenant une gélose nutritive à base d'eau de mer additionnée de Tween **80** à raison de **1%** (v/v) (Gonzalez *et al.*, 1978) (Annexe 4). L'ensemencement des souches est effectué par la technique des spots. L'incubation se fait à **30 °C** pendant **24 h**.

2 Matériel et méthodes

➤ Lecture de résultats

Après incubation, le développement d'un précipité autour des colonies de dépôt témoigne de l'hydrolyse de tween 80 (siarra., 1957).

La présence se traduit par l'apparition d'une auréole opaque autour des colonies.

L'absence se traduit par la disparition d'une auréole opaque autour des colonies.

2.3.6.2 Recherche d'une gélatinase

Principe

L'ajout de la gélatine au milieu de culture permet le screening de l'activité gélatinasiqque de nos souches par sa dégradation et la liquéfaction du milieu.

Mode opératoire

Le milieu utilisé est une GN à base d'eau de mer additionnée de **15 %** de gélatine, conditionné dans des tubes à essai (Annexe 4). L'ensemencement se fait par piqueur centrale. (Jacque Harris.,2018). L'incubation se fait à **30 °C**.

➤ Lecture de résultats

1ere lecture : après une incubation de **24h**, les tubes sont mis dans le réfrigérateur à **4C°** pendant **30 min**.

2ème lecture : après **48h** d'incubation sur paillasse et par la suit les tubes sera mises immédiatement dans le réfrigérateur a **4C°** pendant **30 min**.

3ème lecteur : est procédée après **7 jours** d'incubation sur paillasse.

Une liquéfaction du milieu (gélatinase +) est à chaque fois recherchée. Un milieu toujours solide est synonyme de l'absence d'une gélatinase chez la souche testée.

2.3.6.3 Recherche d'une cellulase

Principe

L'activité cellulolytique a été estimée par la capacité de l'hydrolyse de cellulase. Donc ce test est utilisé pour sélectionner les souches bactériennes ayant une activité cellulolytique (Bragger et al., 1989. En ajoutant la cellulose sous forme de CMC dans le milieu de culture.

2 Matériel et méthodes

Mode opératoire

Cette activité est mesurée par cultivant les souches bactériennes par spot sur milieu gélose nutritive à base d'eau de mer contenant **0.5%** (w/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) (Annexe 4) ensuite Les boîtes sont incubées à **30°C** pendant **48h**.

➤ Lecture de résultats

Après incubation, les boîtes de Pétri sont remplies d'une solution de rouge Congo à 0,1% (w/v) (Annexe 5) et placées pendant **15 à 30 min** à **30°C**. Les boîtes sont lavées par une solution à 1M de NaCl (Annexe 5) pendant **5 à 10 min** à température ambiante avant la lecture (**Bragger et al., 1989**).

La présence de cellulase est traduite par l'apparition de zones claires autour des colonies.

L'absence de cellulase est traduite par la disparition de zones claires autour des colonies.

2.3.6.4 Recherche d'activité lipolytique

Principe :

En utilisant un milieu spécifique contenant le jaune d'œuf qui contient plusieurs types de lipides dont : Les triglycérides (peuvent être hydrolysés par une lipase), les lécithines (peuvent être hydrolysés par une lécithinase), les lipoprotéines (peuvent être hydrolysés par une lipoprotéinase). On peut révéler les différentes activités lipase, lécithinase et lipoprotéinase (si elles existent) par différents critères chez les bactéries

Mode opératoire :

Une émulsion de jaune d'œuf est préparée par mélange aseptique de grandes quantités à quantité égale, de jaune d'œuf et d'eau physiologique, puis on ajoute **20 ml** de cette lotion **180 ml** de GN préparé à partir d'eau de mer, et on termine par couler le milieu dans une boîte de Pétri stérile. Après solidification du milieu, les souches sontensemencées et cultivées à **30°C** pendant **24 heures** (**Genta et Heluane., 2001**)

Les lipases sont des enzymes hydrosolubles capables d'hydrolyse fonctionnelle des esters, spécifiquement pour la conversion de :

Glycérides  Glycérol  Acides gras (Gupta et al., 2003).

2 Matériel et méthodes

A cet effet, une émulsion de jaune d'œuf est préparée par mélange aseptique de grandes quantités à quantité égale, de jaune d'œuf et d'eau physiologique, puis on ajoute **20 ml** de cette lotion **180 ml** de GN préparé à partir d'eau de mer, et on termine par couler le milieu dans une boîte de Pétri stérile. Après solidification du milieu, les souches sontensemencées et cultivées à **30°C** pendant **24 heures** (**Genta et Heluane., 2001**).

➤ Lecture de résultats

Le control des résultats et fait Apres incubation de 24h à T° 30C° ,

*la Lécithinase : apparition d'une zone opaque autour de colonie grâce à la précipitation de résulte (**Esselmann et Liu., 1961**).

Lécithine  la choline soluble  les triglycérides peu solubles.

*Lipoprotéinase : La présence de cette enzyme entraîne l'apparition de l'auréole de claircissement autour des colonies après dégradation complexe de lipoprotéique.

* Lipase : la présence de cette enzyme entraine l'apparition de zones opaques floues autour des colonies démontrent l'action de lipase sur le triglycéride et par la suit la précipitation des acides gras (**De vos et al., 2009**).

2.3.6.5 Recherche d'une amylase

Principe

L'activité amylolytique a été estimée par l'hydrolyse de l'amidon en utilisant un milieu contenant l'amidon comme source d'énergie, l'ajout du Lugol permet de détecter les zones riches en amidon qui se colorent par un bleu violacé, contrairement aux zones où l'amidon est hydrolysé par les couches testées.

Mode opératoire

Cette activité est mesurée par cultivant les souches bactériennes par spot sur milieu gélose nutritive à base d'eau de mer contenant 1% d'amidon soluble (Annexe 4) (**De Vos et al., 2009**). Les boites sont incubées à 30°C pendant 48h.

2 Matériel et méthodes

➤ Lecture de résultats

Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de Lugol, Pendant 30s suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. (**Gordon et al., 1973 ; De Vos et al., 2009**).

La présence se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (absence de coloration autour des colonies).

L'absence se traduit par une couleur brune/ bleue noire autour de la culture.

2.3.6.6 Recherche d'une caséinase

Principe

Le principe est d'utiliser un milieu spécifique contenant la caséine comme source de carbone ce qui ne laisse pousser que les microorganismes exprimant un système enzymatique à activité caséinase, on révèle si ces microorganismes ont les propriétés enzymatiques recherchées, La gélose au lait a été choisie en raison de sa préparation simple, de sa teneur élevée en protéines et de son faible coût.

Mode opératoire

- Un milieu gélosé (annexe 3) contenant 5 % de lait écrémé a été utilisé pour les bactéries afin de démontrer l'activité protéolytique (**Gordon et al., 1973 ; De Vos et al., 2009**).

L'ensemencement se fait par spot sur le milieu et l'incubation se fait à 30°C pendant **48h à 72h**

- **Lecture de résultats**

Après incubation la lecture de résultat se traduit par une présence ou absence d'enzyme :

La présence d'une zone claire autour de la strie indique l'hydrolyse des protéines.

L'absence de l'enzyme absence de zone d'hydrolyse autour de la culture. (**Gordon et al., 1973 ; De Vos et al., 2009**).

2.3.7 Criblage d'activités antimicrobiennes

Rappelons que Cette partie d'étude a été réalisé dans le laboratoire d'hygiène de Wilaya de Blida.

Nous n'avons pas testé la totalité de nos souches, mais que 21 souches (**O40, K33, K28, O35, K26, O39, O36, O41, N20, O37, AR11, N23, N22, N25, E6, O38, E7, E2, E3, O34 et E1**).

2 Matériel et méthodes

Suivant le protocole de (**Balouiri et al., 2016**), et en choisissant deux méthodes pour chaque souche :

- ✓ La méthode des puits.
- ✓ La méthode des disques.

Principe de la méthode des puits

Le principe est de laisser diffuser à travers un puit, une suspension bactérienne (agent antimicrobien) dans le milieu de culture contenant l'agent microbien à tester afin de déterminer sa capacité antimicrobienne vis-à-vis l'agent testé.

Principe de la méthode des disques

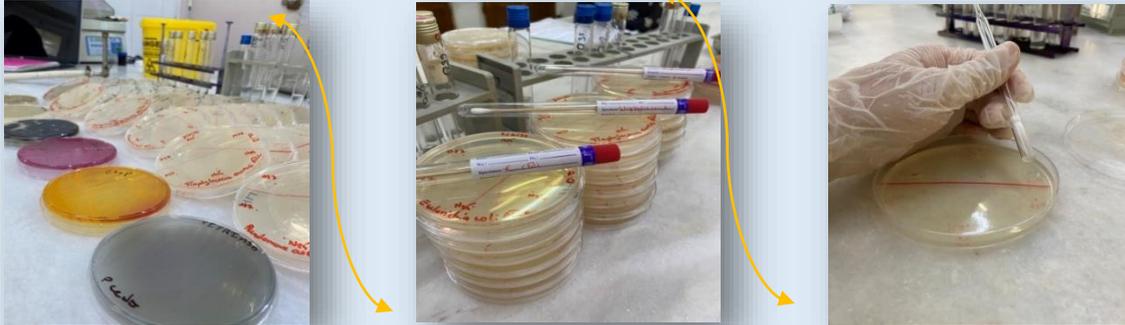
Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester. Après incubation, les boîtes de Petri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

Mode opératoire

On a tout d'abord préparé les suspensions bactériennes de turbidité égale à **0.5 McFarland (108 UFC/ml)**, puis toute la surface du milieu (**Muller Hinton (MH)** pour l'activité antibactérienne et le **milieu Sabouraud (MS)** pour l'activité antifongique) est écouvillonnée par les souches pathogènes (**figure 21**) en utilisant un écouvillon stérile. Par la suite, pour chaque bactérie on dépose un disque stérile sur le **MH/MS** et en parallèle on perfore des disques à l'aide d'une pipette Pasteur (l'extrémité épaisse de 6 mm de diamètre) formant un puits. Puis à l'aide d'une micropipette on dépose **40 µl** de la suspension bactérienne de la souche à tester dans le puits et sur le disque (**figure 21**).

L'étude de l'activité antimicrobienne des souches testées est effectuée en mesurant le diamètre de la zone claire qui apparaît après leurs incubations sur différents milieux contenant les souches pathogènes (pendant **24h** sauf *Aspergillus niger* pendant **5 jours** jusqu'à **7 jours**).

2 Matériel et méthodes



Souches pathogènes utilisées pour la mise en évidence d'activité antimicrobienne

Figure 21 : Les étapes suivies de gauche vers la droite ; organisation et numérotation des souches sur boîtes Pétri, écouvillonnage et perforation des puits.

2 Matériel et méthodes

2.3.7.1 Recherche de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne est testée contre quatre (04) souches bactériennes pathogènes qui sont :

- *Pseudomonas aeruginosa* cultivée sur milieu Cétrimide
- *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 cultivée sur milieu Chapman
- *Escherichia coli* ATCC8739 cultivée sur milieu MAC CONKEY
- *Bacillus cereus* cultivée sur milieu gélose à amidon

2.3.7.2 Recherche de l'activité Antifongique

L'activité antifongique est testée contre deux (02) souches fongiques pathogènes qui sont :

- *Candida albicans* cultivé sur milieu OGA
- *Aspergillus niger* cultivé sur milieu OGA

2.3.8 Recherche de l'origine de la coloration bactérienne observée

Selon le protocole suivi par (Kientz 2012), on observe les différentes couleurs dans une pièce noire en utilisant une source de lumière intense (Figure 22).

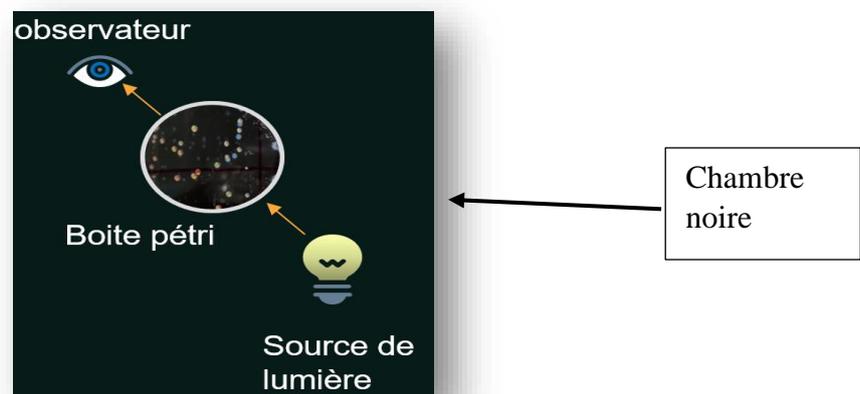


Figure 22 : Schéma représentant l'expérience pour expliquer le phénomène de la coloration émise par les bactéries .

3 résultats et discussion

3 Résultats et discussion

3 résultats et discussion

3.1 Isolement et purification des micro-organismes symbiotiques associés aux espèces marines

Notre collection de 42 souches bactériennes est présentée dans le tableau ci-dessous. Chaque souche est identifiée par une ou deux lettre(s) suivie par un chiffre.

Tableau III : Collection de souches bactériennes isolées à partir des espèces marines.

<i>Spongia officinalis</i> (éponge) 11 souches	<i>Asparagopsis taxiformis</i> (algue rouge) 8 souches	<i>Echinaster sepositus</i> (Étoile de mer) 6 souches	<i>Indothais lacera</i> (coquillage) 8 souches	<i>Arbacia lixula</i> (oursin) 9 souches
E1	AR11	N20	K26	O34
E2	AR12	N21	K27	O35
E3	AR13	N22	K28	O36
E4	AR14	N23	K29	O37
E5	AR15	N24	K30	O38
E6	AR16	N25	K31	O39
E7	AR17	/	K32	O40
E8	AR18	/	K33	O41
E9	/	/	/	O42
E10	/	/	/	/
E19	/	/	/	/

Quarante-deux souches ont été isolées à partir des cinq échantillons marins. Le nombre de souches isolées varie selon l'espèce marine en question, ce qui corrobore avec les travaux de (Harazi et al., 2020) qui ont pu isoler 4 souches à partir d'un oursin noir *Arbacia lixula* ; et les travaux de (Widowati et al., 2014) qui ont isolé 19 bactéries à partir de l'algue rouge *Gracilaria verrucosa* ; en parallèle, (Bauvais., 2015) a isolé 113 souches à partir d'une éponge *Spongia officinalis*. Les milieux utilisés pour l'isolement sont préparés par nos soins à base

3 résultats et discussion

d'eau de mer (ils ont la même composition d'une GNO mais exempte de sel **annexe n° 1**) ce qui permet d'assurer les oligo-éléments ainsi que les éléments traces indispensables à la croissance des microorganismes marins.

Dans leur expérience **Bennai** ces co-auteurs (**2021**), ont montré que ces milieux d'isolement à base d'eau de mer permettent d'isoler un nombre plus élevé de souches bactériennes. Aussi ces milieux permettent d'isoler des souches à partir des dilutions les plus élevées (jusqu'à 10^{-7}). Donc ces milieux de cultures permettent d'isoler plus de souches bactériennes symbiotiques, notamment les souches bactériennes symbiotiques dominantes, comparés aux milieux ordinaires à base d'eau distillée. Une gélose nutritive ordinaire (GNO) inhibe la croissance des souches symbiotiques dominantes en raison de sa teneur plus élevée en sel, selon les mêmes auteurs.

Remarquons à ce niveau que nous n'avons pu isoler que des souches bactériennes. Aucune levure ou moisissure, par exemple, n'a pu être isolée sur nos milieux de culture bien qu'ils ne soient pas sélectifs des souches bactériennes. Et ce même après de plus longues périodes d'incubation (jusqu'à **14** jours). Si nous examinons la composition de nos milieux de culture, ils auraient facilement permis la croissance d'autres types de microorganismes. Nous pouvons conclure alors, que la flore symbiotique de chacune des cinq espèces marines serait composée du moins d'une fraction majoritairement écrasante de souches bactériennes.

Par ailleurs ; l'absence des représentants des autres types microbiens dans les boîtes Pétri n'est pas la preuve irréfutable qui permet leur exclusion complète de la composition de la flore symbiotique de nos espèces marines. L'idée qu'ils soient tellement minoritaires ou d'une croissance exigeante est possible. D'ailleurs ; (**Borzykh et al., 2018**) ont identifiés 52 espèces de champignons filamenteux à partir des coquilles. Ces composés ont montré une activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes 7001, y compris *Staphylococcus aureus* 3089 résistant à la méthicilline et *Vibrio parahaemolyticus*

Pour le faire, l'approche métagénomique (qui signifie au-delà de la génomique) permet d'étudier les organismes directement dans leur environnement sans passer par une étape de culture en laboratoire. Contrairement à la génomique qui consiste à séquencer un génome unique, c'est une technique de séquençage et d'analyse de l'ADN complet contenu dans un milieu donné selon (**Maillet., 2013**) : « la génomique à la métagénomique Si on ne peut pas cultiver un grand nombre de microorganismes, il est tout de même possible de les étudier, directement dans leur milieu. Il est alors impossible d'isoler une seule espèce des autres et la

3 résultats et discussion

génomique classique ne peut être utilisée. Comme lors du passage de la génétique à la génomique, on fait face ici à une différence d'échelle. La génétique étudie les gènes d'un organisme, la génomique, le génome d'un organisme, ici on travaille sur un ensemble de génomes inconnus : on parle alors de métagénomique>>. Elle permet donc de séquencer les génomes de plusieurs espèces différentes présentes dans un échantillon et de donner des éléments de réponses sur leurs diversités ainsi que leurs abondances. . Ainsi, la métagénomique offre l'opportunité d'étudier les bactéries totales pas seulement celle cultivables et de ne pas ignorer des interactions impliquant plus de deux partenaires (Villain., 2018).

Sur le même sillage, l'équipes de chercheurs (Thomas et al., 2010) ont pu identifier les bactéries associées à l'éponge *Cymbastela concentrica*.

3.2 Vérification de la pureté des souches sur le milieu chromagar « chromagar d'orientation »

Les substrats chromogéniques utilisés dans les milieux chromogènes confèrent des couleurs clairement distinguables aux différents types de colonies. En fait, ils mettent en évidence une enzyme spécifique d'une espèce bactérienne (ou fongique) ou d'un groupe d'espèces qui scinde le substrat chromogénique. En présence d'oxygène, le chromogène forme un dimère qui colore la colonie typique. Ceci permet une différenciation et une identification facile et rapide des microorganismes.

L'identification est basée sur la détection d'enzymes au travers de substrats chromogéniques intégrés dans la gélose en associés à des tests rapides réalisés directement sur les colonies, tels que les tests enzymatiques, l'examen microscopique, la détection des oxydases et des catalases. Les substrats chromogènes révèlent les enzymes métaboliques bactériennes, ce qui fait que les colonies prennent une couleur et une morphologie caractéristiques, le milieu CHROMagar Orientation détecte les enzymes β -galactosidase (couleur rose), Tryptophan deaminase (couleur marron) et β -glucosidase (couleur bleue) (Carricajo et al., 1999).

L'ensemencement des colonies bactériennes préalablement isolées et purifiées par plusieurs repiquages successifs (sur milieu GN à base d'eau de mer), sur le milieu « chromagar-orientation » a permis de révéler les colonies superposées et / ou très semblables au point d'être totalement confondues sur GN à base d'eau de mer. Aussi les contaminations d'origine humaine

3 résultats et discussion

ou provenant de l'environnement du laboratoire, bien que très peu nombrables ont pu être facilement éliminés. C'est ainsi que notre collection de 42 souches a été construite et validée.

3.3 Etude des souches sélectionnées

3.3.1 Etude macroscopique des souches sélectionnées

L'aspect d'une colonie est l'un des premiers critères visant son identification. L'examen macroscopique des cultures est la première étude effectuée après l'isolement et la purification des souches bactériennes. Cette étude est basée sur des observations à l'œil nu (ou par fois au moyen d'une loupe, sous différents angles d'éclairage) permettant de différencier les caractéristiques des souches étudiées avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

Les résultats de l'étude macroscopique sont présentés dans (**Table IV**) ci-dessous. Nous avons pu observer des colonies de tailles, formes, contours et consistances variables. Par exemple le plus part des colonies sont de petites tailles, rondes, au contours irréguliers, crémeuses, lisses, transparentes, tandis que certaines apparaissent comme des colonies de taille moyenne, de forme irrégulière, aux contours irréguliers et texture crémeuse.

3 résultats et discussion

Tableau IV: Aspect macroscopique des souches isolées.

	irridescence	taille	forme	Aspet	couleur	Contur
E1	OUI	Petite	Ronde bombée	Crémeux brillante	Blanche	Régulier
E2	NON	Grosse	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	Régulier
E3	NON	Moyenne	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	Régulier
E4	OUI	Moyenne	Ronde plate	Crémeux	Transparent	Régulier
E5	OUI	Petite	Ronde plate	Crémeux	transparent	régulier
E6	OUI	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Transparent	régulier
E7	NON	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
E8	OUI	petite	Ronde plate	Crémeux	Blanche	régulier
E9	Non	petite	Ronde	Crémeux	Blanche	
E10	Non	Petite	Ronde	Crémeux	Blanche	
E19	Oui	Petite	Ronde	Crémeux	Blanche	régulier
AR11	non	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
AR12	NON	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
AR13	NON	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
AR14	oui	Petite	Ronde	Crémeux	Blanche	régulier
AR15	NON	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
AR16	NON	Grosse	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
AR17	oui	Moyenne	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
AR18	NON	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier

3 résultats et discussion

Tableau IV : Aspect macroscopique des souches isolées (suite)

O37	oui	Grande	Longue bombée	Crémeux	Blanche	régulier
O38	oui	Grande	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
O39	NON	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
O40	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
O41	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
O42	NON	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
K27	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
K28	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
K29	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier
K30	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
K31	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
K32	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
K33	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
O34	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
O35	oui	Petite	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	irrégulier
O36	oui	Grande	Ronde bombée	Crémeux	Blanche	régulier

3 résultats et discussion

3.3.2 Etude microscopique

3.3.2.1 Observation à l'état frais

L'observation de l'état frais consiste à l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique stérile, placée entre lame et lamelle sous microscope optique grossissement **X 1000**. Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement ainsi que la mobilité des cellules bactériennes.

L'observation de l'état frais de nos bactéries montre que certains isolats sont très mobiles, tandis que la plupart sont immobiles et présentent un mouvement Brownien. Les formes cellulaires observées en microscopie photonique sont : des bâtonnets parfois enflés à l'extrémité isolés ou arrangés en longues chaînes selon les isolats (**figure 23**).

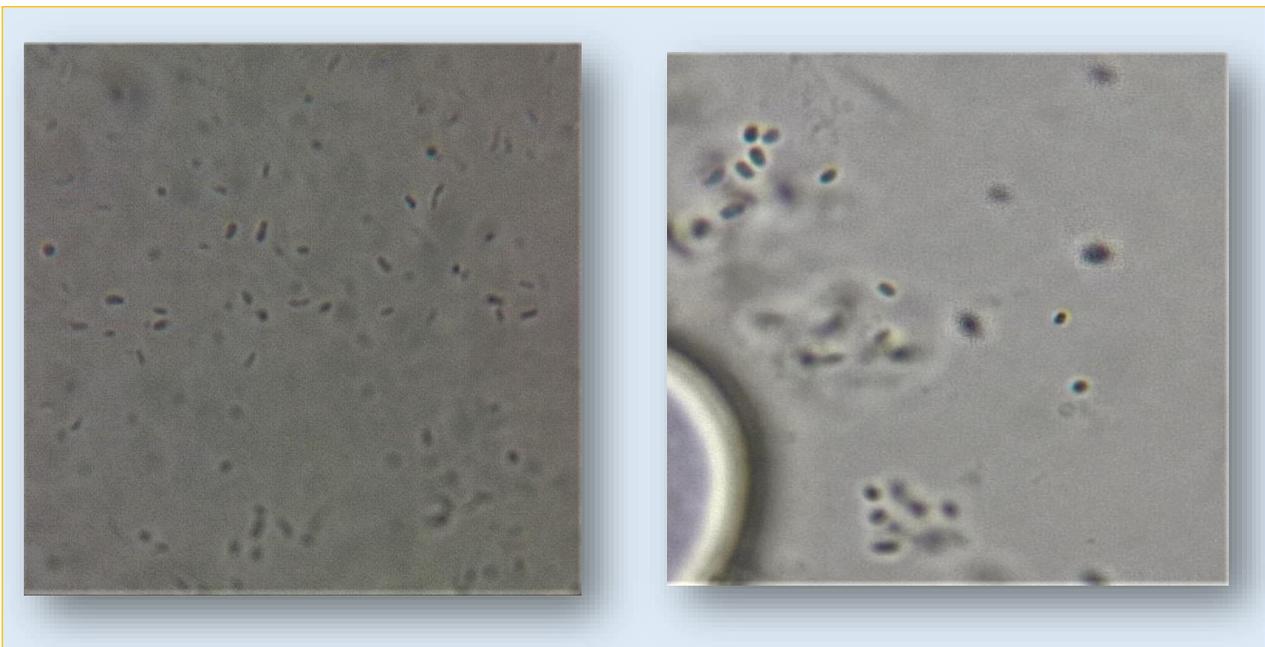


Figure 23 : Observation microscopique de l'état frais chez quelque souche bactérienne.

3.3.2.2 Observation microscopique après coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement (mode d'assemblage), la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal

3 résultats et discussion

violet. Celles qui possèdent une enveloppe externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol. (Gram-), alors que celles qui n'en possèdent pas vont retenir le colorant (Gram+).

25 souches sont Gram positif et **17** Gram négatif (**Tableau VIII annexe 6**) Les formes cellulaires observées en microscopie photonique sont : des bâtonnets parfois enflés aux extrémités isolés ou arrangés en longues chaînes selon les isolats La majorité des souches sont des bacilles. L'aspect coccobacille est rencontré uniquement chez 5 souches (E8, E10, AR15, N23, K29).

3.4 Etudes physiologique

3.4.1 Type respiratoire sur VF

Le type respiratoire des bactéries est déterminé par la culture sur milieu Viande-Foie. Nous avons testé 38 souches bactérienne à cause de la présence d'une contamination.

15 souches ont un type respiratoire **aéro-anaérobie-facultatif**. Il s'agit des souches : O35, K33, O38, AR11, AR14, AR15, O36.E1, AR17, E10, K28, K29, K30, O42 et E6.

Alors que **17** souches ont un type respiratoire **micro-aérophile**. Il s'agit de : E5, E3, N22, N23, E2, E4, E19, AR12, AR13, AR16, AR18, N20, N21, K31, K32, O39 et O40.

6 souches (O4, N25, E8, E7, O34 et O37) seulement sont **Aérobies stricts**.

3.4.2 Teste catalase et oxydase

Les résultats de la caractérisation biochimique de teste catalase et oxydase des isolats bactériens sont représentés dans (**Tableau VII**) et **figure 24** représente l'aspect d'un résultat positif (+) et négatif (-) des deux tests.

3 résultats et discussion

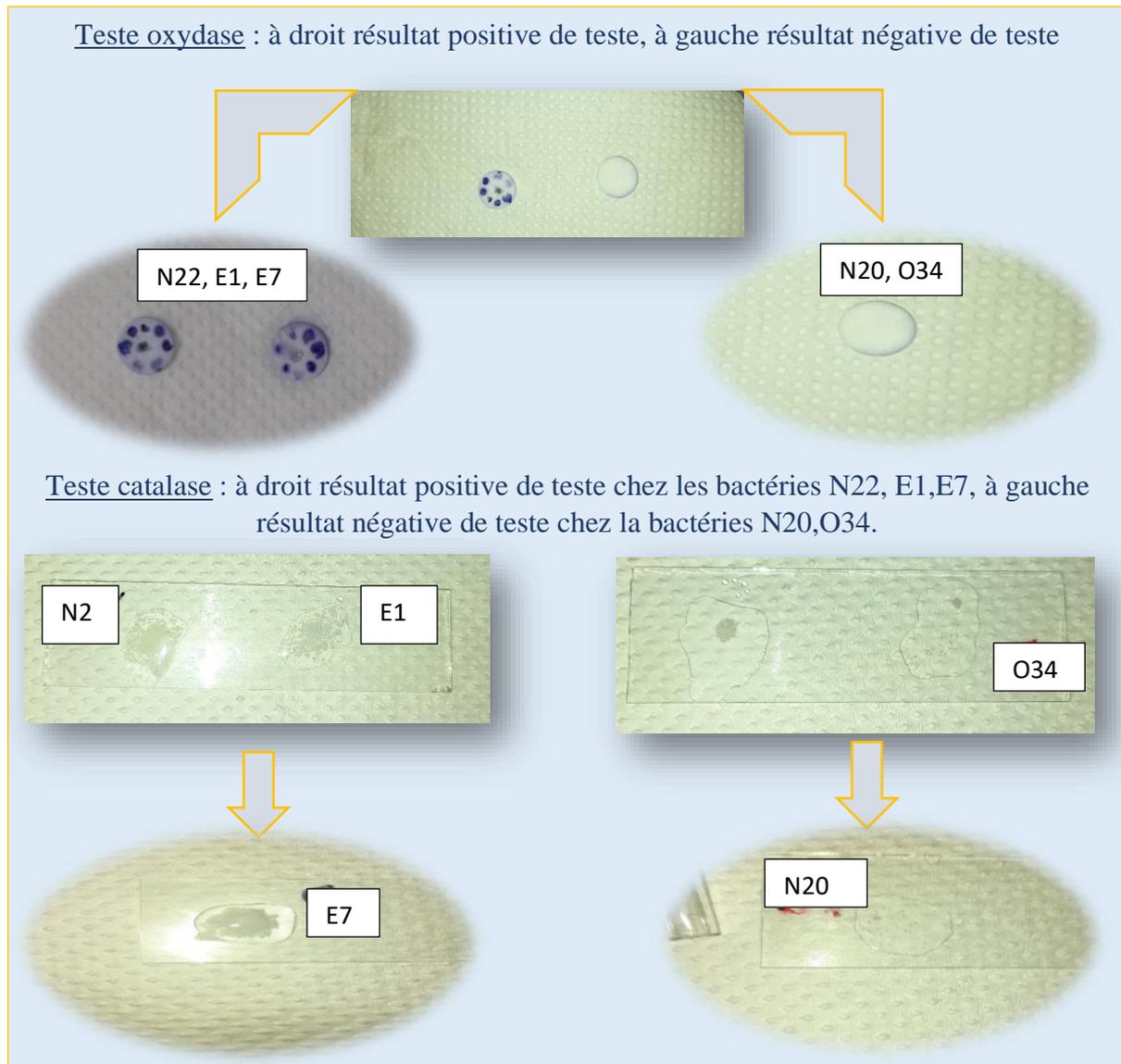


Figure 24 : Résultat (+) et (-) de test oxydase et catalase en haut vers le bas.

3 résultats et discussion

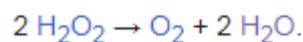
Tableau V : Caractérisations physiologique des différents isolats

La souches bactérienne	Teste catalase	Teste oxydase
E1	+	-
E2	+	-
E3	-	+
E4	+	-
E5	+	-
E6	+	+
E7	+	-
E8	+	+
E9	+	-
E10	+	+
E19	+	+
AR11	+	-
AR12	+	+
AR13	+	+
AR14	+	-
AR15	+	-
AR16	+	-
AR17	+	-
AR18	+	+
N20	+	+
N21	-	+
N22	+	+
N23	-	+
N24	+	-
N25	-	+
K26	+	-
K27	+	-
K28	-	+
K29	+	+
K30	+	+
K31	+	+
K32	+	+
K33	+	+
O34	+	+
O35	+	-
O36	+	+
O37	+	+
O38	+	+
O39	+	-
O40	+	+
O41	+	+
O42	+	+

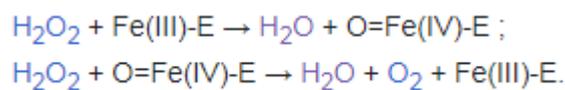
3 résultats et discussion

Le **tableau V** montre que toutes les souches bactériennes étudiées possèdent au moins l'une des deux enzymes respiratoires recherchées (oxydase et catalase).

37 souches sont catalase positive alors que 05 souches sont catalase négative c'est le cas de souches type respiratoire micro-aérophile et N25, K28 sont aéro-anaérobie-facultatives. Les souches qui possèdent une catalase dégageaient des bulles suite au dépôt du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (**Joffin et al., 2006 ; Tankeshwar, 2013**). La catalase est une oxydoréductase héminique qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène selon la réaction :



La liaison oxygène-oxygène du peroxyde d'hydrogène est coupée par l'atome de fer du groupement hème, en créant une molécule d'eau et une liaison fer-oxygène très oxydante. Celle-ci peut oxyder une nouvelle molécule de peroxyde d'hydrogène, donnant du dioxygène.



C'est le cas de la plupart des isolats bactériens AFF (aérobies-anaérobies facultatives).

Nos résultats montrent 26 souches « oxydase positive » et 16 souches « oxydase négative ». Les souches qui ont une oxydase présentait une couleur bleue foncée/violette sur le disque oxydase (**Joffin et al., 2006 ; Delarras., 2014**). Ceci qui signifie la présence d'une cytochrome-oxydase. Cette dernière catalyse la réaction qui permet la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire. (**Knobloch., 2019**) a isolé 2 bactéries *Endozoicomonas. Strains* et *Endozoicomonas numazuensis* qui sont oxydase positives.

3.5 Criblage des activités enzymatiques des isolats

Les activités estérasiques, gèlatinasiqes, cellulolytiques, lipolytiques, amylolytiques et protéolytiques ont été mises en évidence en utilisant les milieux : GN à base d'eau de mer additionnée à 1% (v/v) de Tween 80, GN à base d'eau de mer additionnée de gélatines, GN à base d'eau de mer additionnée à 0.5% de CMC, GN à base d'eau de mer additionnée au jaune d'œufs, GN à base d'eau de mer à amidon 1% et Géllose au lait respectivement.

3 résultats et discussion

Le bagage enzymatique est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement direct, et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel (Cohen., 2011).

Les résultats du criblage enzymatique sont regroupés dans **Tableau IX** (annexe 7) et représentés dans la figure 25 ci-dessous. Aussi les figures (26 ;27 ;28 ;29) rassemblent quelques figures de certains résultats des activités enzymatiques.

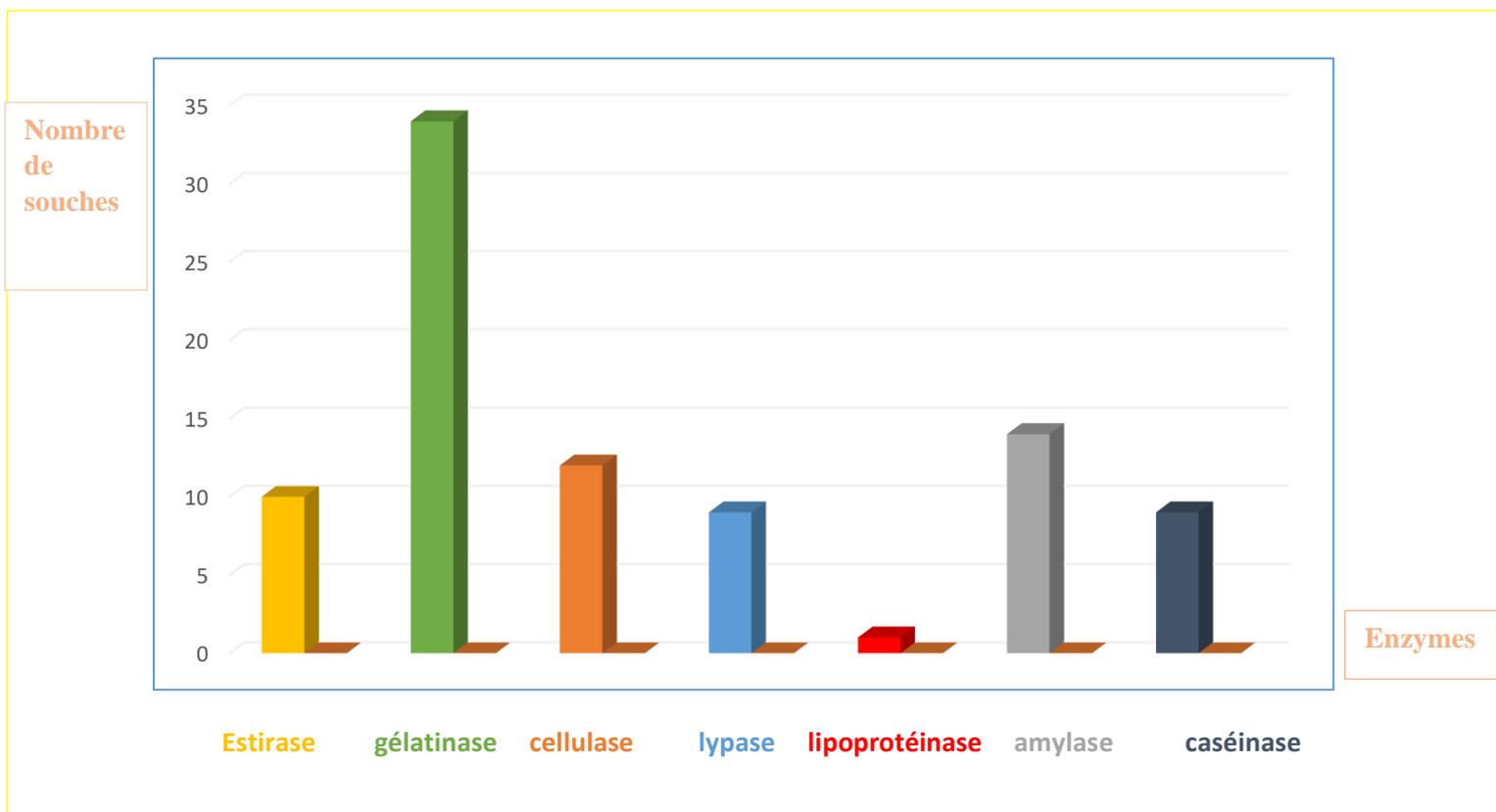


Figure 25 : Résultats des activités enzymatiques recherchées.

3.5.1 Activité estérasique

D'après nos résultats de cultures **Tableau IX**(annexe 7), l'estérase est secrétée par **9 souches / 42** soit **21.4 %** des souches bactériennes. L'hydrolyse de Tween 80 se traduit par un précipité autour du site de dépôt témoin (**figure 26**)

D'après **Patnayak et Sree (2005)**, *Bacillus subtilis* (RRL-8) isolée d'*Aurora globostellata* ; une éponge marine, est dépourvu d'une estérase. D'autre part, **Stephen Jackson et ses collaborateurs (2015)** ont trouvé que chacune des deux espèces : *Maribacter vacoletii* et *Maribacter spongiicola* isolées des éponges marines *Suberites carnosus* et *Leucosolenia sp*

3 résultats et discussion

respectivement, sont capables d'hydrolyser le Tween 80 et sont dotées par conséquent d'une activité estérasique. (**Knobloch., 2019**) a décrit des colonies isolées de *Pelagibaculum spongiae* *sp* qui ne dégradent pas le tween 80.

Les estérases représentent un groupe d'enzymes susceptibles de réagir avec des esters de synthèse (**GOMORI., 1952**). Cette enzyme joue un rôle important dans plusieurs domaines :

- ✓ Dans la production laitière ; afin de transformer les huiles et la matière grasse de faibles valeurs en graisses plus riche ;
- ✓ Dans la fabrication des médicaments chirale ;

Dans les industries de détergents, de l'alimentation, des produits pharmaceutiques et des cosmétiques.

- ✓ Domaines industriels. Le rôle naturel de ces enzymes passe par l'hydrolyse des parois végétales, permettant la production d'acide férulique à partir de déchets agroalimentaires tels que les brasseries et l'industrie sucrière. L'acide férulique est actuellement connu pour ses propriétés intéressantes, notamment en tant qu'antioxydant. En conséquence, plusieurs efforts de recherche ont exploré de nouvelles voies d'utilisation des déchets agroalimentaires pour produire de nouveaux composés à haute valeur ajoutée (**Tapin et al., 2006**).
- ✓ Dans l'industrie papetière, l'utilisation les estérases et d'autres hydrolases comme la xylanase facilite l'extraction de la lignine, d'une part en réduisant la consommation de chlore dans l'étape de blanchiment et d'autre part en obtenant une pâte plus brillante. (**Topacas et al., 2007**). L'estérase peut également être utilisé avec des xylanases et des cellulases pour convertir la cellulose et l'hémicellulose en carburant éthanol (**Topakas et al., 2007**).

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

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

3 résultats et discussion

Nos résultats sont presque élevés par rapport à certains travaux. Par exemple 0.01% des isolats de type actinomycète d'origine (environnement aquatiques) c'est l'équivalent d'une seule souche parmi les 35 souches sécrète l'estérase. De (Bouzigah. N *et al.*, 2017), ont montré leur faible capacité à produire une estérase.

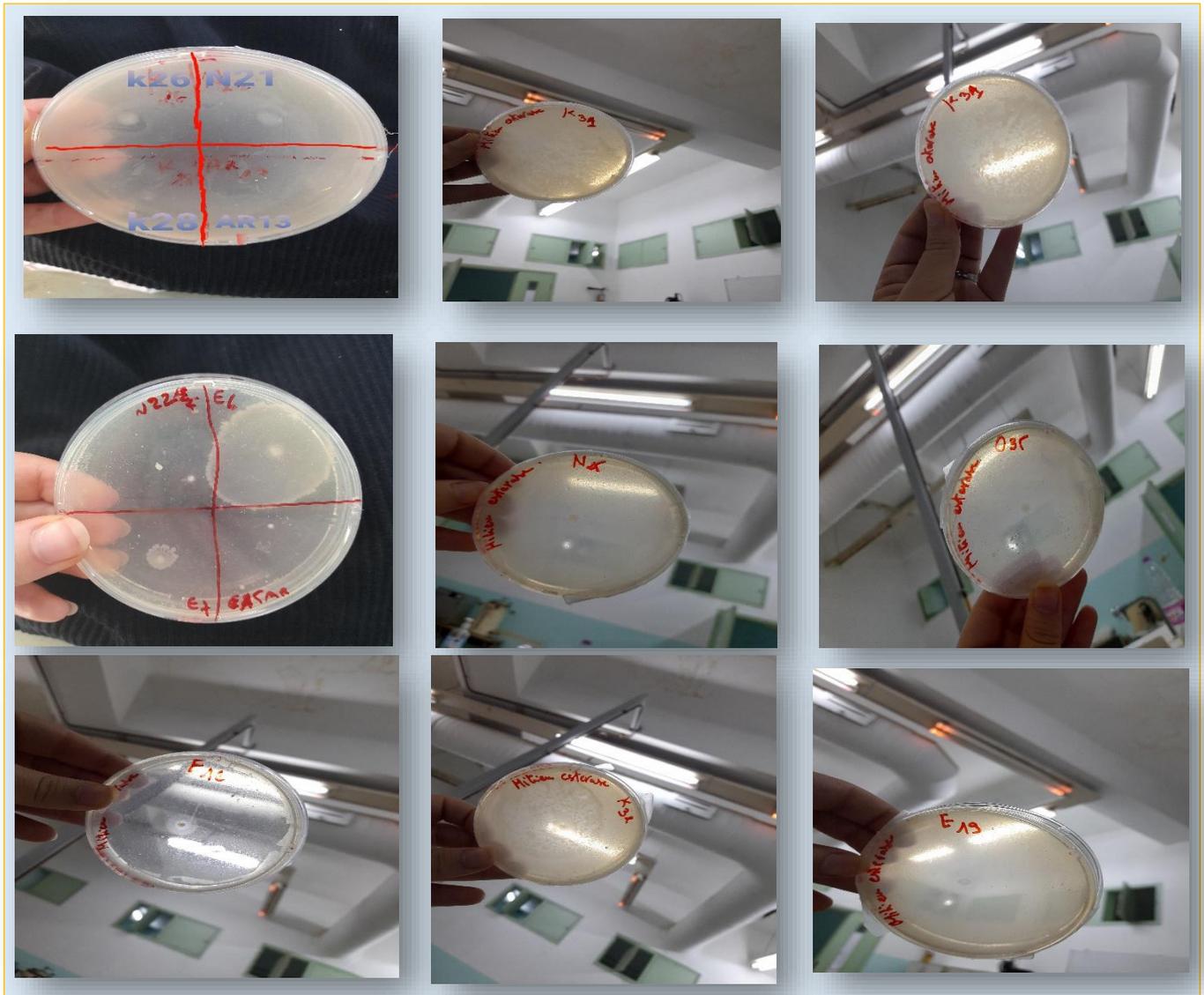


Figure 26 : Zones d'hydrolyse du Tween 80 par les souches bactériennes (E6, E7, O34, O39, AR16, N21, K26, K31 et K32) testées après 24h d'incubation.

3 résultats et discussion

3.5.2 Activité Gèlatinasique

Nos résultats montrent que **34 / 42** (E2, E3, E4, E5, E7, E8, E9, E10, AR11, AR12, AR13, AR15, AR16, AR17, AR18, N20, N21, N22, K26, K28, K29, K30, K31, K32, K33, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41, O42) souches bactériennes (environ **80.95%** de la collection de nos souches) possèdent une gèlatinase. La gèlatinase est de ce fait, l'enzyme la plus répondeuse chez les souches de notre collection.

D'après (Selvin et al., 2004) et (Lee et al., 2006), *Streptomyces sp* isolée de *Dendrilla nigra* ; une éponge marine prélevée de la côte sud-est de l'Inde et *Shewanella irciniae*, isolée à partir de l'éponge *Ircinia dendroides* ; prélevée de la méditerranée expriment des activités gèlatinasiques.

(Lelièvre, 2005) propose l'utilisation de l'enzyme gèlatinase en une nouvelle technique pour traiter les cancers.

3.5.3 Activité cellulolytique

D'après nos résultats, le carboxyméthylcellulose (CMC) est hydrolysé par **12** souches bactériennes / **42** (figure 27) ce qui représente près de **28.5%** de notre collection de souches symbiotiques. Cette hydrolyse se traduit par une zone claire autour des colonies détectées après une étape de révélation.

D'après (Maki et al., 2011), plusieurs souches appartenant aux genres *Bacillus* et *Mycobacterium* produisent une cellulase. La capacité à dégrader la cellulose semble être essentielle. Rappelons que la cellulose est la molécule organique la plus abondante sur terre. Cet homo-polymère est le constituant principal de la paroi cellulaire de nombreux végétaux, notamment des plantes et des arbres qui ont des teneurs variant de **15 % à 99 %**. Les microorganismes non cellulolytiques ont une capacité très limitée à dissoudre ce substrat (Reffas., 2017).

Cette enzyme joue un rôle important dans plusieurs domaines par exemple :

- ✓ D'après (Soumia., 2006) que les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes. Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces.
- ✓ La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle de carbone (Lee et al., 2007).

3 résultats et discussion

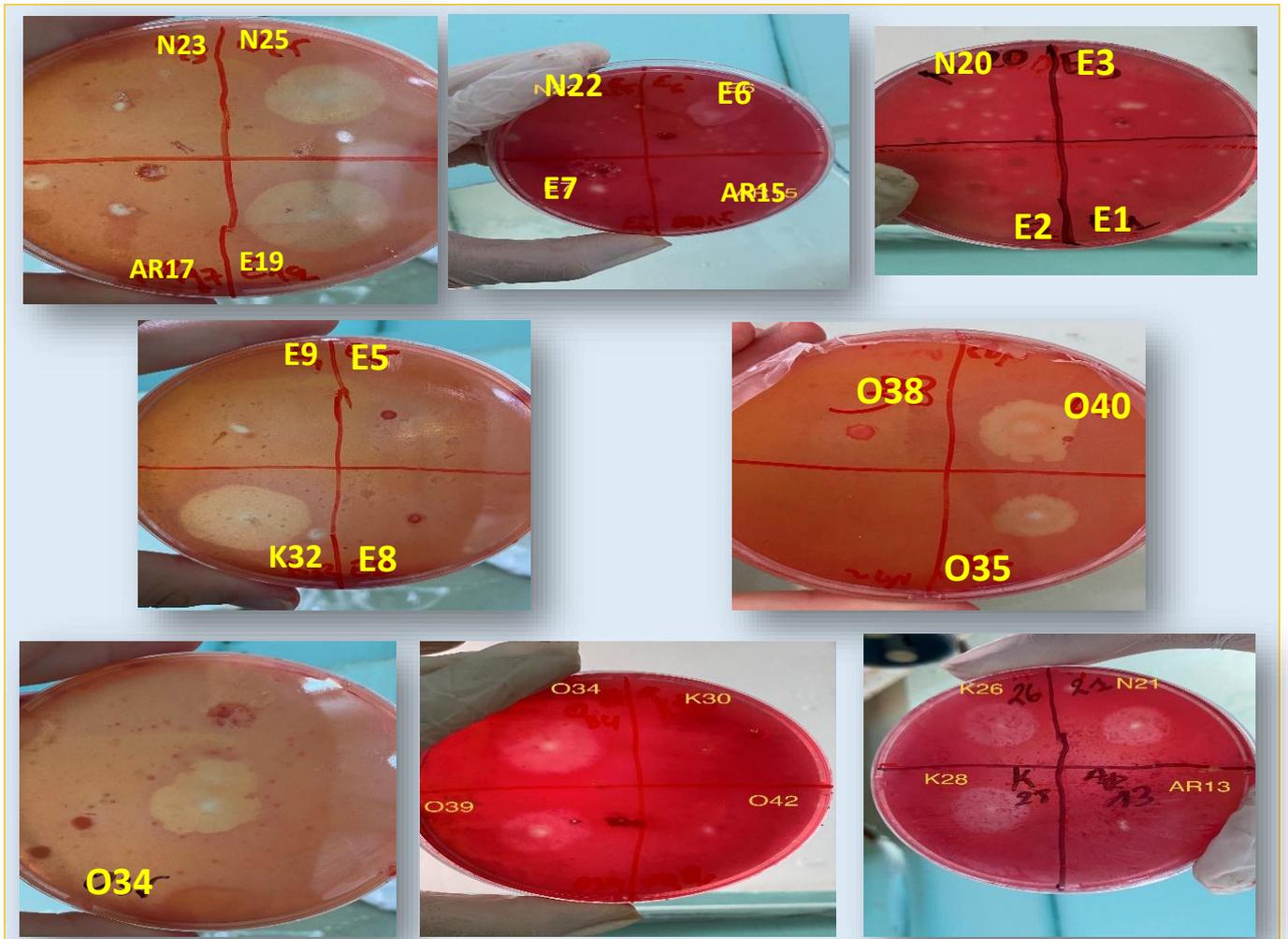


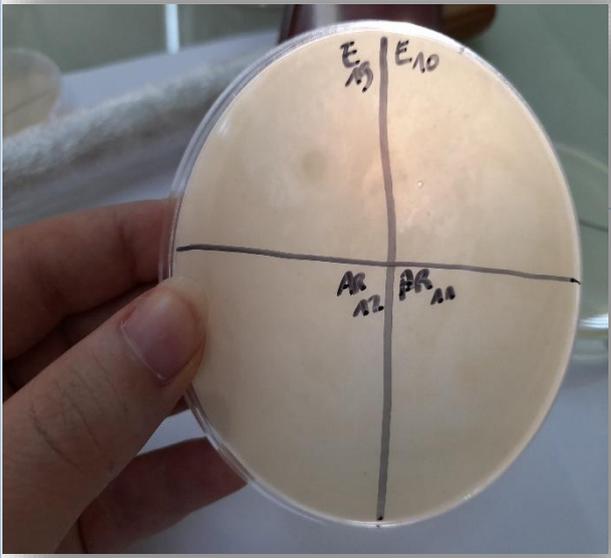
Figure 27 : Zones d'hydrolyses de la cellulose des souches bactériennes (E6, E19, N21, N25, K26, K28, K32, O34, O35, O36, O39 et O40) testées après **48h** d'incubation.

3 résultats et discussion

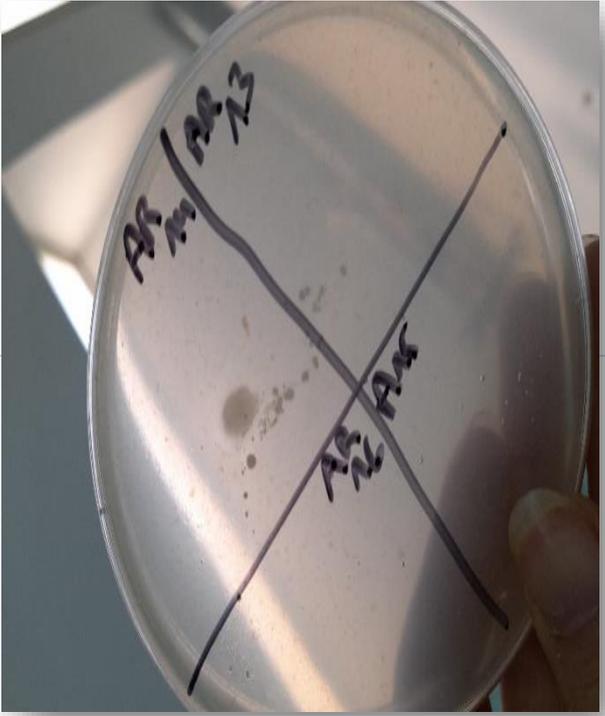
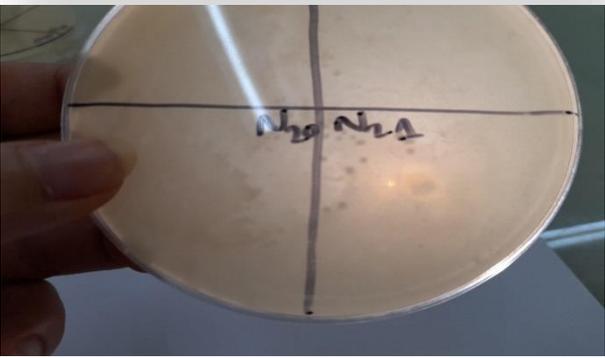
3.5.4 Activité lipolytique

Selon les résultats obtenus (**Tableau VI**) ci-après ; **10** souches bactériennes sur **42** soit **23.8%** de la collection bactérienne, possèdent des activités lipolytiques. Il s'agit des souches E6.E7.E8.E19.AR12.N21.N22.K32.O42 qui produisent toutes une lipase à des niveaux différents (avec une meilleure activité enregistrée pour la souche **N22**) et de la souche **AR14** ; productrice d'une lipoprotéinase.

Tableau VI: Les résultats d'activité lipolytique chez nos souches bactériennes.

La souche	Enzyme	D(diamètre)	Figure représentatif
E6	Lipase	3mm	
E7	Lipase	3mm	
E8	Lipase	1mm	
E19	Lipase	4mm	
AR12	Lipase	2mm	

3 résultats et discussion

AR14	Lipoprotéinase	5mm	
N21	Lipase	1mm	
N22	Lipase	5mm	
K32	Lipase	4mm	

3 résultats et discussion

O42	Lipase	1mm	
-----	--------	-----	--

D'après **Gopi Mohan et ses collaborateurs (2016)**, certaines bactéries isolées des éponges marines possèdent une lipase capable d'hydrolyser les triglycérides. Il s'agit de *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* SE3(T) et *Bacillus sp* isolées des éponges *Pione mastifica* et *Siphonochalina* (ATCC14580 (T)). *Siphonella* collectés dans la région d'Obhur au nord de la mer Rouge, Djeddah,

Dans l'étude de (**Fehmida et al., 2018**), les chercheurs ont mis en évidence une activité lipolytique chez *Vibrio caribii* ATCC BAA-2122(T) et *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* SE3(T) isolées des éponges *Pione mastifica* et *Siphonochalina siphonella* respectivement prélevées en Arabie Saoudite en 2018, dans la région d'Obhur au nord de la mer Rouge, Djeddah.

Les lipases présentes diverses applications :

- Des détergents : en éliminant les taches de graisse (**Nerurkar et al., 2013; Parra et al., 2008; Zhang et al., 2012**)
- Boulangerie : amélioration de la saveur, prolongation de la durée de conservation, amélioration de la texture et du caractère moelleux des produits de boulangerie (**Aravindan et al., 2007; Hasan et al., 2006**)
- Production de biodiesel : Modification chimique des huiles végétales pour obtenir des composés compatibles avec la plupart des moteurs (**Faried et al., 2017; Smitha et al., 2014**)
- En bioremédiation, les lipases sont utilisées lors du traitement de sols contaminés par des hydrocarbures (**Kim et al., 2002**).
- Les lipases sont également couramment utilisées en tannerie. Avant le tannage, les peaux sont lavées dans des bains alcalins (pH 8-13) en présence de lipases de façon à pouvoir éliminer les graisses sous cutanées. L'utilisation de lipases permet de diminuer

3 résultats et discussion

la quantité de surfactant et de détergent à utiliser dans les bains de lavage, ce qui contribue à l'obtention de peaux plus souples et plus élastiques (**Rhom, 1992**).

- Dans l'industrie des cosmétiques et de la parfumerie, les lipases sont utilisées dans la synthèse d'arômes soit par réactions de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7-octadien-1-ol qui présente un arôme de rose (**Pandey et al., 1999**) ou soit par estérification directe.

3.5.5 Activité amylolytique

Selon les résultats obtenus **14** souches bactériennes sur **42** soit 33.33% de la collection bactérienne, possèdent une activité amylolytique capable d'hydrolyser l'amidon. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour des colonies (**Figure 28**).

D'après (**Shanmughapriya. S et al., 2009**) 27 % des souches hétérotrophes isolées de l'éponge marine *F. cavernosa* présentaient des zones claires autour des colonies, dont la souche MMD047 qui présentait une grande zone claire (>**30 mm**) autour de la colonie. De notre part, la souche la plus performante qu'on a pu isoler dans notre expérience, présente un dixième de cette activité.

D'après (**Satyanarayana et al., 2005**) de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont connues par leur capacité à produire des α -amylases thermostables. Celles-ci comprennent des α -amylases de *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Stearothermophilus*, et *B. thermoamyloliquefaciens*.

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

Utilisées dans des processus d'industries de détergents et d'hydrolyse d'amidon (**Karan et al., 2012**).

3 résultats et discussion

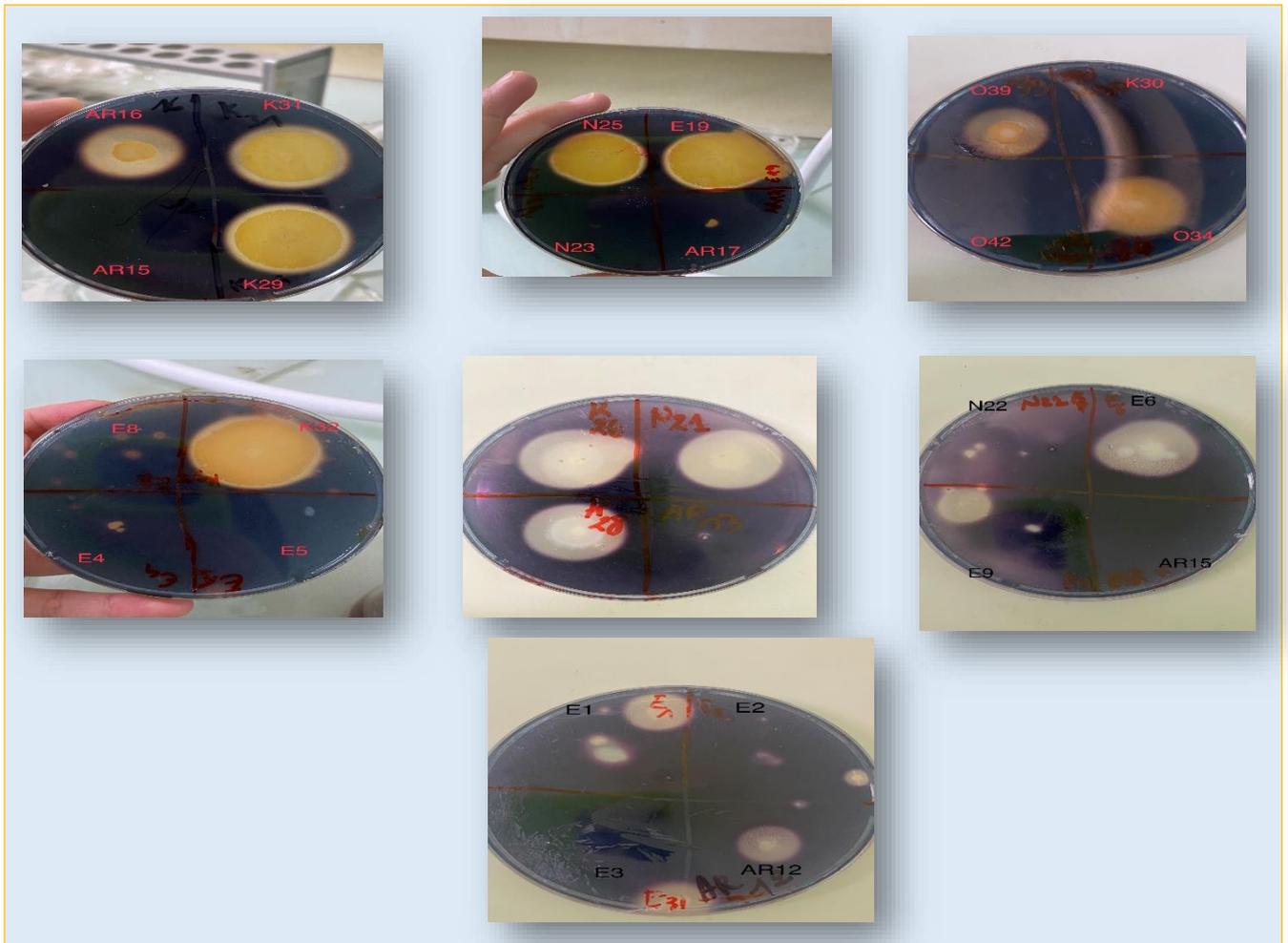


Figure 28 : Zones d'hydrolyses de l'amidon par les souches bactériennes testées (AR16.O39. O34.K31. K26.E6. AR12.O40. K28.N25. E19.N21. K29) après 48h d'incubation.

3.5.6 Activité protéolytique

La recherche d'une activité protéolytique, chez la collection de souches bactériennes symbiotiques, sur un milieu Gélose au lait à base d'eau de mer a montré que **9** souches sont capables d'hydrolyser le lait écrémé. Il s'agit des souches : **E1. E2. E3. E6. AR11.AR15. N20.K33. O37** (figure 29).

Les souches sont dotées, d'une caséinase. Elles représentent environ **21.4%** de l'ensemble de nos souches bactériennes. L'enzyme est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies.

De nombreuses bactéries produisent des protéases capables de dégrader les protéines. Les genres les plus connues sont, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*, *streptomyces sp*, *clostridium sp*, *Bacillus sp* comme *Bacillus horikoshii* possédant une protéase alcaline (Joo et al. 2002).

3 résultats et discussion

Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 60% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents ou dans la synthèse des peptides (**Dharumadurai et al., 2016**).

Près de 65 % des protéases industrielles sont isolées à partir de sources microbiennes marines, et elles peuvent résister de manière significative à une large gamme de solvants organiques à des températures élevées (**Barzkar et al., 2018**).

Les protéases sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour attendrir la viande, la synthèse des peptides, la préparation des aliments pour nourrissons et le brassage, elles sont également employées comme additifs dans l'industrie des détergents, dans divers secteurs pharmaceutiques et médicaux, dans les textiles et dans l'industrie du cuir pour le déhousseage des peaux et cuirs (**Jana et al., 2020**).

Elles sont aussi utilisées dans le domaine alimentaire, l'industrie fromagère, les détergents, l'industrie de soie, domaine de la pharmacologie, production de médicaments et dans l'agriculture (**El-Safey et al., 2004**).

3 résultats et discussion

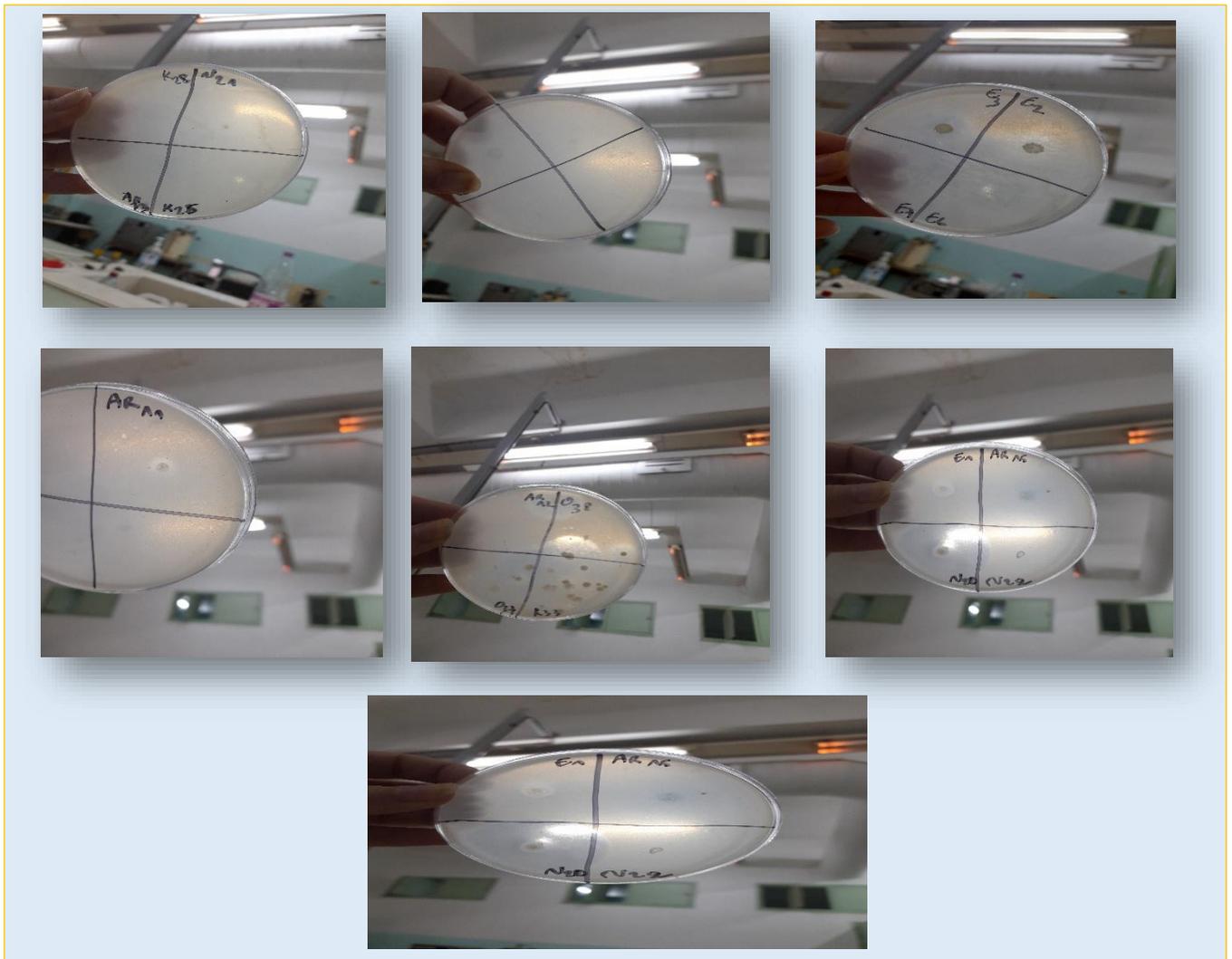


Figure 29 : Zones de l'hydrolyse de la caséinase par les souches bactériennes testées (E1. E2. E3. E6. AR11.AR15. N20.K33.O37) après 72h d'incubation.

Dans la dernière étape de l'activité enzymatique, nous mettons en lumière les bactéries les plus importantes qui ont une bonne activité enzymatique.

Où nous avons remarqué qu'il y a 3 bactéries (**E6/N20/K32**) appartenant à notre groupe qui ont **5** activités enzymatiques différentes et à des degrés divers.

Suivi par 3 bactéries différentes (**O39/K26/O34**), mais avec seulement **4** activités enzymatiques.

En dernier lieu, il y a aussi 3 bactéries (**N23/N24/K27**) qui n'ont malheureusement aucune activité enzymatique.

3 résultats et discussion

Nous concluons donc que nous avons une variété d'activités bactériennes.

- ❖ La souche **K32**, c'est la souche qui a un diamètre d'hydrolyse le plus élevé par rapport aux autres et le diamètre estimé est d'environ **5,5cm** dans l'activité estérasique et même son diamètre d'hydrolyse dans l'activité cellulolytique d'environ **2cm**, et dans l'activité amylolytique d'environ **2.9 cm** et même dans l'activité lipolytique son **D=4mm**.

Cette bactérie (**K32**) est considérée comme supérieure dans notre groupe en termes d'activités enzymatiques par rapport aux autres isolats.

3.6 Criblage des activités antimicrobiennes

Les souches bactériennes marines testées *in vitro* afin d'évaluer leurs activités antimicrobiennes ont montrés des comportements différents vis à vis de différentes souches pathogènes. Les résultats sont présentés dans la **figure n°30 et 31** ci-dessous et **Tableau X** (annexe 8).

3.6.1 Résultat de la recherche des activités antibactériennes

Les résultats de la recherche des éventuelles activités antibactériennes sont présentés dans la figure ci-dessous :

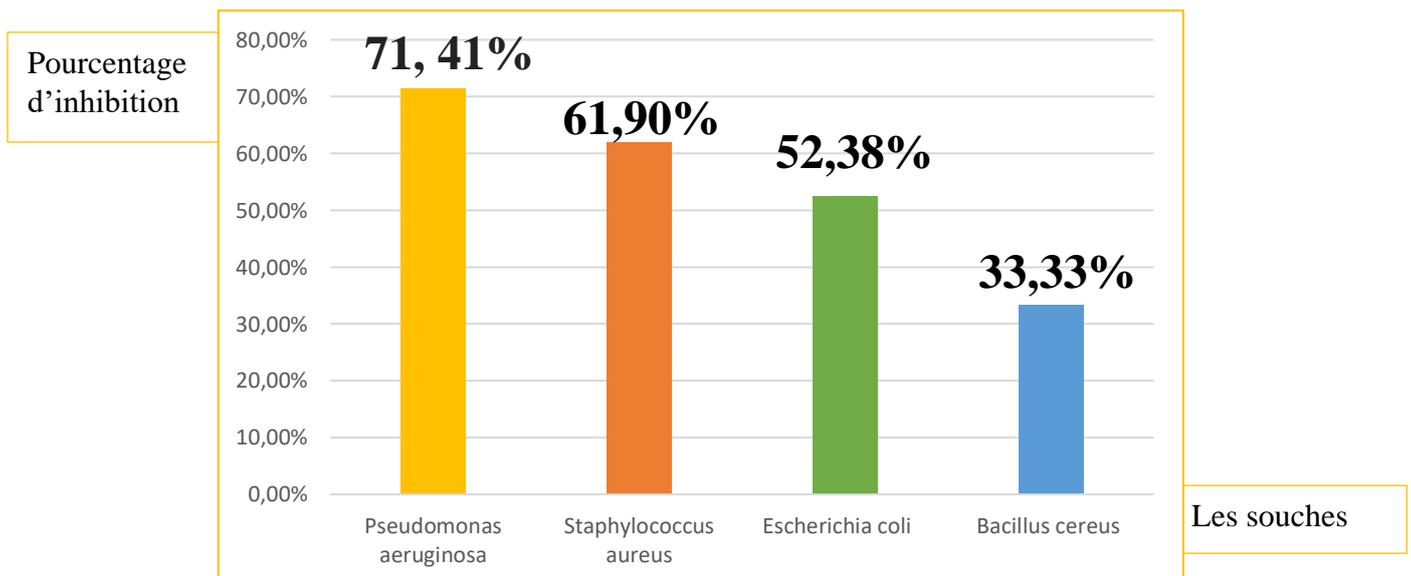


Figure 30: Résultat des activités antimicrobiennes marquées par les souches testées contre les souches bactériennes pathogènes.

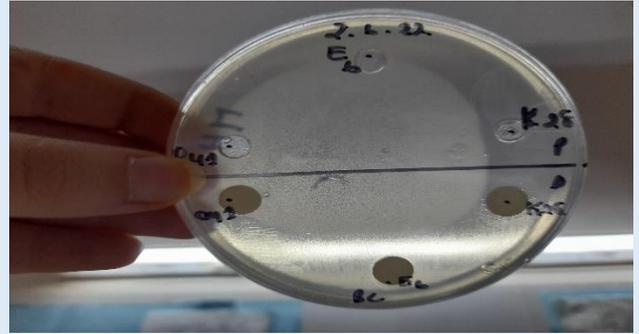
71,41% (E7, AR11, N20, N23, N25, K26, K28, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41) des bactéries symbiotiques marines ont présentées une activité antibactérienne contre

3 résultats et discussion

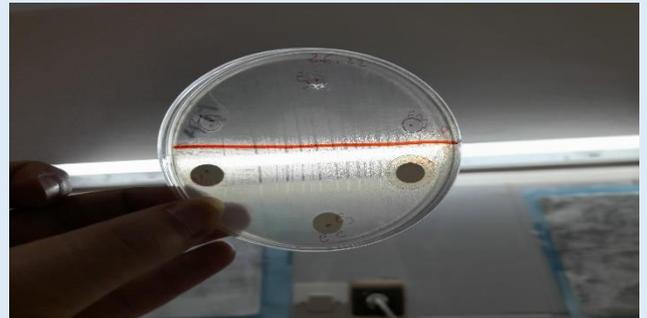
Pseudomonas aeruginosa. Par ailleurs, **61,90%** (E1, E7, AR11, N25, K26, K33, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40 et O41) des souches inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus* et près de **52,38%** (E1, E2, AR11, K28, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, et O41) inhibent celle d'*E.coli*. Enfin, **33,33%** (E1, E2, AR11, N23, K28, O34, O35, O36, O38, O39, O40 et O41) uniquement de nos souches ont une activité contre *Bacillus cereus*.

Le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un vrai enjeu de santé publique. L'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques menacent aussi bien les pays développés que les pays en développement à une vitesse effrayante (**Ouedraogo et al., 2017**). Selon l'OMS, l'antibiorésistance pourrait causer, à l'horizon **2050**, plus de **10 millions** décès par an et en devenir ainsi la première cause de mortalité (**Goel et al., 2021**). Les bactéries deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques disponibles alors que très peu d'antibiotiques sont découverts pour remplacer ceux que l'on perd.

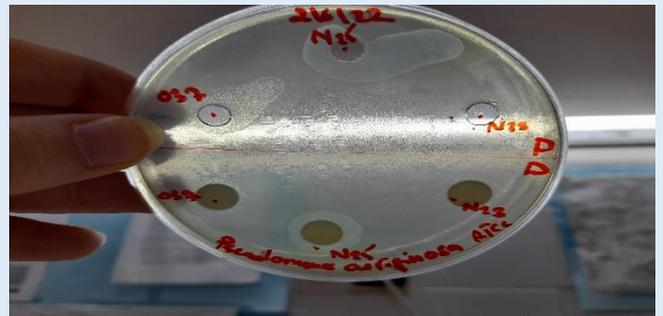
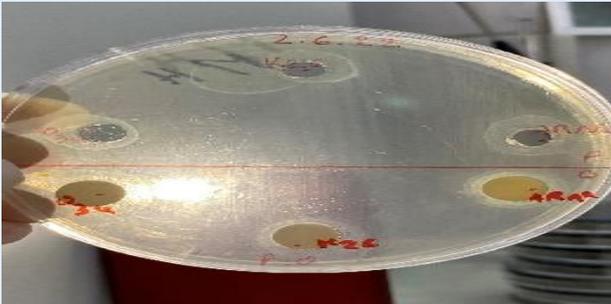
3 résultats et discussion



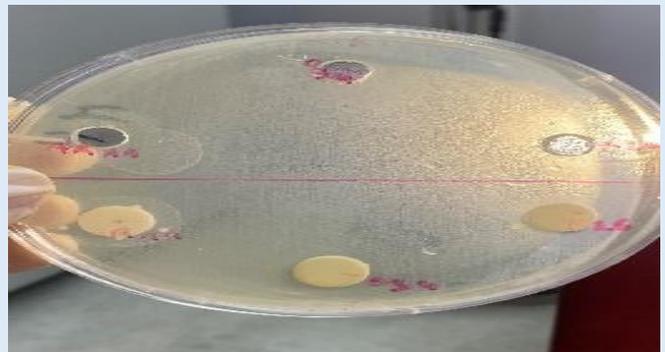
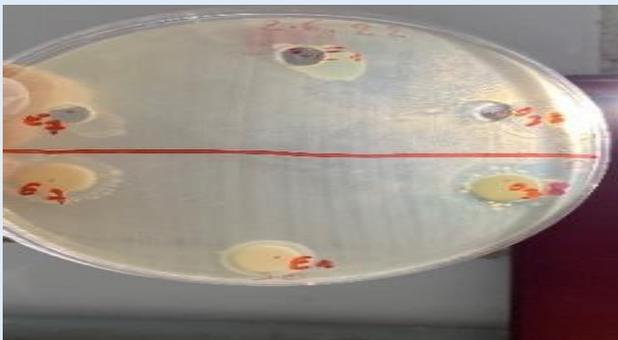
A droit (E7. E1. O33), à gauche (O41.E2. K28) contre *Bacillus cereus*



A droit (O38.E1.E7) ,à gauche (E3 .E2.N25) contre *Escherichia coli* (ATCC8739)



A droit (O34.K26 .AR11),à gauche (O35.O36.O39) contre *pseudomonas aeruginosa*



A droit (E7. E1. O38) ,à gauche (AR11.O34.K26) contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 19095)

Figure 31 : Résultats de l'activité antibactérienne chez la collection de nos souches

3 résultats et discussion

Dans leurs études **BALANSA** et ses collaborateurs (2020) ont trouvé que l'extrait brut d'*Agelas sp.* (Éponges marines), a montré une activité antibactérienne à large spectre. La plus forte activité a été enregistrée contre la bactérie Gram-positif *S. aureus* avec une zone d'inhibition de **25,3 mm**, cinq fois le diamètre de la meilleure zone d'inhibition obtenue dans nos expériences contre cette bactérie. Cependant dans notre essai nous avons affronté bactérie contre bactérie contrairement à l'expérience des chercheurs dans laquelle nous avons incriminé l'effet de substances biochimiques divers aussi que celui d'un consortium microbien constituant la flore symbiotique de l'éponge exerçant en synergie.

(**PIRON 2021.**), a trouvé chez l'extrait de *Verongula rigida* (éponge marine) une activité antimicrobienne contre *Bacillus sp.* Cela corrobore avec nos résultats, où nous recensons parmi nos souches symbiotiques de l'éponge *Spongia officinalis* les souches **E1** et **E2** qui montrent une activité contre *Bacillus cereus*. D'autre part nos résultats viennent confirmer les affirmations de certains chercheurs qui expliquent que les activités antibactériennes de certaines espèces marines sont, en réalité, inhérentes à l'activité antibactérienne de à l'activité des espèces microbiennes symbiotiques qu'elles abritent.

É.M. Bianco et ces collaborateurs (2013) a testé 5 espèces d'algues. 4 des 5 espèces ont montré une certaine activité contre *S. aureus* et 3 espèces ont montré une activité contre *P. aeruginosa*. Dans notre expérience la souche AR11, symbiotique de l'algue rouge « *Asparagopsis taxiformis* » exerce une activité antibactérienne vis-à-vis des mêmes espèces bactériennes test : *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Rodrigues et ses co-auteurs (2004) ont trouvé une activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa* uniquement chez une seule espèce parmi 9 éponges et 2 algues à savoir : **Sigmatocia carnosa**, une éponge marine. Rappelons ici que près de trois quarts de nos souches soit **71,43 %** ont une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous n'avons tenu compte que des résultats obtenus par la méthode des disques car nous avons notés des incohérences en ce qui concerne les résultats de la technique des puits. Ces dernières pourront être dues à des erreurs de manipulation. Bien que nous ayons noté dans la littérature scientifique que certains auteurs ont obtenu des résultats différents en testant les mêmes souches par la méthode des disques et celle des puits.

Abadna et ces collaborateurs (2012), ont étudié l'activité antibactérienne par plusieurs techniques contre trois espèces ; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. *Staphylococcus aureus* a été considérée comme non sensible selon les résultats de

3 résultats et discussion

la méthode des disques contrairement aux résultats de la méthode des puits ou sa sensibilité était bien établie.

71,43% (soit 15 souches : E1, E2, E7, AR11, N23, N25, N26, K28, O34, O35, O36, O38, O39 et O40) de nos souches ont une activité à large spectre contre des souches pathogènes à Gram+ et à Gram- à la fois.

3.6.2 Résultat de la recherche des activités antifongiques

Comme nous pouvons le constater selon la figure ci-dessus, aucune activité antifongique n'a pu être enregistrée contre *Candida albicans*. Par ailleurs, **33,33 %** des souches symbiotiques (E3, E6, E7, N22, N23, O37, O41) montrent une activité antifongique à l'égard d'*Aspergillus Niger*.

D'autres travaux, comme celui de **Rodrigues** et ses collaborateurs (2004) ont décrit deux activités antifongiques exercées par *Chrotella australiensis* et *Sigmatocia carnosa*, deux éponges marines, contre *Candida albicans*. Les mêmes auteurs ont aussi noté les activités antifongiques de *Sigmatocia carnosa*, *Chrotella australiensis* et *Cladophora prolifera* (une algue marine verte) contre *Aspergillus niger*.

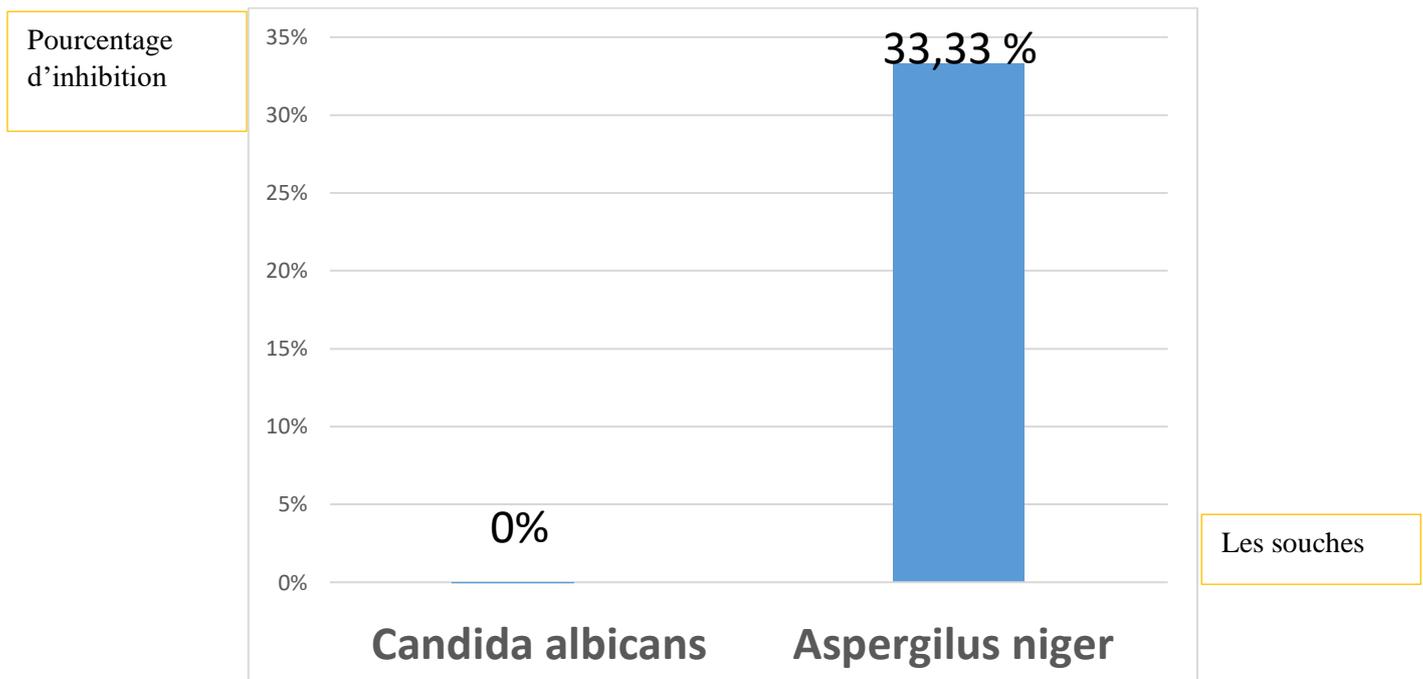
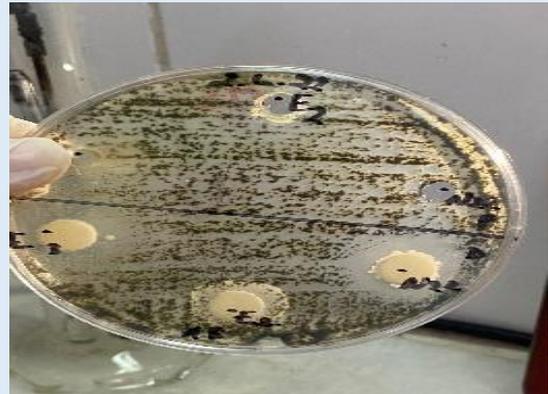


Figure 32 : Résultats de l'activité antifongique chez la collection de nos souches

3 résultats et discussion



A droit (E7. O37.O41), à gauche (E3.E2.N22) contre *Aspergillus Niger*

Figure 33 : Résultats de l'activité antifongique chez la collection de nos souches

Les souches bactériennes ayant à la fois des activités enzymatiques et antimicrobiennes intéressantes sont présentées par ordre dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII : Les souches isolées à des activité enzymatiques et antimicrobiennes intéressantes.

bactérie	activités antimicrobiennes	activités enzymatiques	TOTAL
O39	3	5	8
N20	1	6	7
O34	3	4	7
AR11	4	2	6
K26	1	5	6
O38	4	2	6
O40	3	3	6
K28	3	2	5
O35	3	2	5
O36	3	2	5
O37	2	3	5
O41	3	2	5
E1	3	1	4
E2	2	1	3
E7	1	2	3
N25	2	1	3
E3	1	1	2
N22	1	1	2
K33	1	1	3

3 résultats et discussion

Nous pouvons dire que les souches (O39. N20.O43. AR11. K26. O38. O40. K28. O35. O36. O37. O41) ont une richesse enzymatique et antimicrobienne considérable et méritent d'être le sujet d'études ultérieures.

3.7 L'origine de la coloration bactérienne

A cause de la présence de plusieurs couleurs et leurs changements selon l'angle d'observation ou d'illumination, ce n'est pas le phénomène de pigmentation et non plus de fluorescence ou bioluminescence car à l'obscurité, il n'y avait pas d'émission. Dans la (**Figure 22**) Nous avons observé une émission de lumière de différentes couleurs quand nous utilisons une source de lumière intense à la direction ce certaines boîtes Pétri. L'expérience de la pièce noire nous a permis d'éliminer les phénomènes de fluorescence et de bioluminescence car aucune lumière n'a été émise dans la pièce. De plus et en raison de la présence de plusieurs couleurs et leurs changements selon l'angle d'observation ou d'illumination, nous pouvons conclure qu'il s'agit d'un phénomène d'iridescence.

La lumière a été orientée à un angle de **60°** par rapport à la boîte de Pétri. D'après nos résultats, plus de la moitié de nos souches symbiotiques marines sont des souches iridescentes. Environ **57,14 %** des souches sont iridescentes **figure 34**. Nous avons noté que **100%** des souches provenant du coquillage sont iridescentes, alors que **77.77%** des souches provenant de l'oursin, **54.45%** des souches isolées à partir de l'éponges, **66.66%** symbiotiques à l'étoile de mer et **25%** seulement des souches symbiotiques à l'algue rouges sont iridescentes.

Dans **la figure 34**, l'aspect de l'irisation vert / bleu est dominant mais d'autres couleurs comme le rouge et le jaune aux bords des colonies sont également observés.

3 résultats et discussion

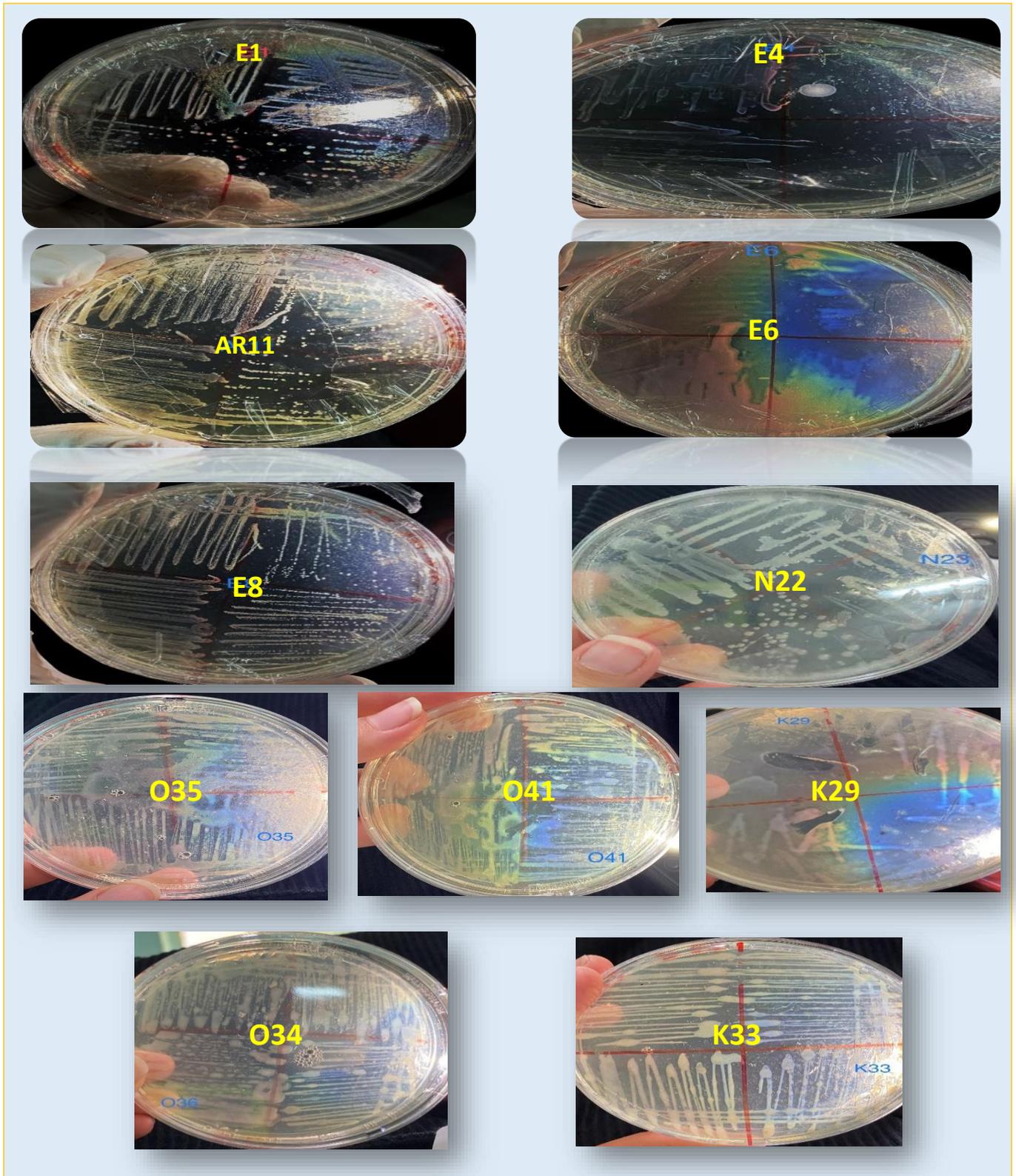


Figure 34 : Résultats macroscopiques des souches bactériennes iridescentes

(E1. E4. AR14.E6. E8. N22.N22. O35.O41. K26.O36. K33) ordonné de gauche vers droit.

3 résultats et discussion

D'après (CURJ.,2019) L'iridescence bactérienne, telle que décrite chez les bactéries marines de la famille des *Flavobacteriaceae*, résulte de cristaux photoniques formés par des populations de cellules périodiquement ordonnées dans les biofilms.

Et aussi d'après (CURJ., 2019) L'irisation bactérienne a également été liée à la motilité glissante, qui est une forme de mouvement utilisée par les bactéries pour se déplacer sur une surface sans structure propulsive. Des études antérieures décrivaient et caractérisaient l'irisation chez les membres des genres *Flavobacteria* et *Cellulophaga* l'irisation chez le genre *Tenacibaculum* n'avait pas été bien décrite (CURJ., 2019)

Selon Kientz (2016), l'irisation procaryote a été décrite de manière ambiguë ou négligée dans la littérature. Chez les bactéries, l'irisation n'a pas été observée à l'échelle individuelle mais n'a été visualisée que dans des colonies bactériennes ou des suspensions cellulaires concentrées dans les premières œuvres, des irisations arc-en-ciel diffuses (observées sous transillumination) ont été rapportées notamment dans des souches d'*Haemophilus influenza*, cependant, leurs mécanismes sous-jacents n'ont pas été décrits. En plus de cela, l'irisation métallique de certains isolats et souches mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* s'est avérée corrélée à l'accumulation de molécules de **4-hydroxy-2-alkylquinoline** mais encore une fois, le mécanisme n'a pas été dévoilé.

4 Conclusion

4 Conclusion

4 Conclusion

Les micro-organismes constituent un gisement prometteur de molécules d'intérêt pour de nombreux secteurs d'activité tels que la santé, la pharmacie, la parapharmacie, la cosmétologie, l'agroalimentaire, la chimie et les énergies renouvelables d'un grand intérêt comme source prometteuse de produits chimiquement intéressants et de métabolites secondaires bioactifs

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

Nous avons pu isoler 42 souches, toutes criblées pour des éventuelles activités enzymatiques : gélatinase, cellulase, amylase, estérase, ...etc. Alors que 21 souches seulement ont été testées pour leur pouvoir antibactérien et / ou antifongique.

Les résultats ont montré que toutes les souches possèdent une ou plusieurs enzymes.

En effet, 80,95 % des souches possèdent une gélatinase. Près de 28.5 % ont une cellulase et 25 % ont une amylase, alors que 21.4 % des souches uniquement sont dotées d'une estérase. Les 23.8 % des activités Lipolytiques sont réparties en 21.42 % d'activités lipasiques, et 2.38 % d'activités Lipoprotéolytique. Enfin, 21 % seulement des souches présentent une activité protéolytique.

Nous avons pu aussi mettre en évidence, chez notre collection de souches, des activités antibactériennes et une activité antifongique à l'égard d'*Aspergillus niger*

15souches (**E7 ; AR11 ; N20 ; N23 ; N25 ; K26 ; K28 ; O34 ; O35 ; O36 ; O37 ; O38 ; O39 ; O40 ; O41**) soit **71.33%** des souches inhibent *Pseudomonas aeruginosa*, **13** souches (**E1 ; E7 ; AR11 ; N25 ; K26 ; K33 ; O34 ; O35 ; O36 ; O37 ; O38 ; O39 ; O40**), soit **61.40%** des souches sont actives contre *Staphylococcus aureus* et **11** souches (**E1 ; E2 ; AR11 ; K28 ; O34 ; O35 ; O36 ; O38 ; O39 ; O40 ; O41**) environ **52.38%** contre *E.coli* . *Bacillus cereus* s'est avéré sensible à seulement **7** souches (**E1 ; E2 ; AR11 ; N23 ; K28 ; O38 ; O39**), soit **33.33%** des souches symbiotiques.

Au moment où **7** souches (**E3 ; E6 ; E7 ; N22 ; N23 ; O37 ; O41**), soit **33,33 %** des souches présentaient un antagonisme vis-à-vis d'*Aspergillus niger*, aucune souche n'a été capable d'inhiber la croissance de *C. albicans*.

4 Conclusion

Nos observations durant cette étude nous ont permis aussi de mettre en évidence un phénomène d'iridescence chez **24** souches soit **57,14 %** des souches symbiotiques isolées. A nos connaissances, c'est la première étude algérienne qui décrit des bactéries iridescentes. L'iridescence chez les procaryotes est décrite de façon très modeste dans la littérature scientifique et mérite d'être investiguée davantage.

Les souches (**O39. N20.O43. AR11. K26. O38. O40. K28. O35. O36. O37. O41**) ont une richesse génétique considérable et méritent d'être le sujet d'études ultérieures.

En perspectives ; nous proposons que ce travail soit complété par :

- ✓ Une caractérisation plus poussée des souches isolées en utilisant des techniques de biologie moléculaire.
- ✓ La détermination des mécanismes catalytiques, des domaines fonctionnels ainsi que des conditions de production optimales des enzymes mis en évidence dans notre travail.
- ✓ La caractérisation des souches criblées pour leur capacité à produire des enzymes stables dans des conditions extrêmes, qui seront intéressants pour des applications industrielles.
- ✓ La recherche de la capacité de nos souches à produire d'autres enzymes.

La production, la purification et la caractérisation des molécules antimicrobiennes mises en évidence

5 Références bibliographiques

5 Référence Bibliographiques

- A., Achour, M., & Chaoui, A. (1996). LA MALADIE GÉLATINEUSE DU PÉRITOINE A
- AUZENDE, 1978 – histoire tertiaire de la Méditerranée occidentale (Texte imprimé) / Jean Marie Auzende / (S.1.) : (s.n.) , 1978.
- A.S. Ouedraogo et al., « Emergence and spread of antibiotic resistance in West Africa : contributing factors and threat assessment », *Médecine et Santé Tropicales* 27, no 2 (mai 2017): 147-54, <https://doi.org/10.1684/mst.2017.0678>.
- Adrien Villain, « Étude génomique des interactions diatomées-bactéries », <http://www.theses.fr> (thesis, Aix-Marseille, 2018), <http://www.theses.fr/2018AIXM0202>.
- Adrien Villain, « Étude génomique des interactions diatomées-bactéries », <http://www.theses.fr> (thesis, Aix-Marseille, 2018), <http://www.theses.fr/2018AIXM0202>.
- A. Carricajo et al., « Comparative Evaluation of Five Chromogenic Media for Detection, Enumeration and Identification of Urinary Tract Pathogens », *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18, no 11 (2 décembre 1999): 0796-0803, <https://doi.org/10.1007/s100960050403>.
- *Bactérie symbiotique : Définition et explications*. (s. d.). AquaPortail. Consulté 19 mai 2022, à l'adresse <https://www.aquaportail.com/definition-9959-bacterie-symbiotique.html>
- Balouiri, Mounyr, Moulay Sadiki, et Saad Koraichi Ibsouda. 2016. « Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review ». *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): 71-79 .
- Barnhart Concise Dictionary of Etymology. HarperCollins. Published 1988. Accessed June 8, 2022. <https://www.harpercollins.com/products/barnhart-concise-dictionary-of-etymology>-robert-k-barnhart Ershov S, Kolchin K, Myszkowski K. Solution of an

5 Références bibliographiques

Inverse Problem in Rendering Metallic and Pearlescent Appearance. Published online January 1, 2004.

- Barzkar N, Sohail M. An overview on marine cellulolytic enzymes and their potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(16):6873-6892.
doi:10.1007/s00253-020-10692-y
- Bayed, A., F. Quiniou, A. Benrha, et M. Guillou. (2005). The *Paracentrotus lividus* populations from the northern Moroccan Atlantic coast: growth, reproduction and health condition. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85, 999-1007.
- BENHAIZIA Y. 96.
- Berraho E. (2009). Cours de Microbiologie Générale. Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, B.P. 1014, Rabat
- Berthier. *Photonique Des Morphos.*; 2010. Accessed June 8, 2022. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-2-287-09408-8>
- Besteiro, C. et V. Urgorri. (1988). *Inventario dos Equinodermos de Galicia (Echinodermata)*.
- Bianco, É.M., et al. Antimicrobial (including antimolluscs), antioxidant and anticholinesterase activities of Brazilian and Spanish marine organisms – evaluation of extracts and pure compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.018>
- BIGELOW. No Title. 2016.
- Bloa, S. L. (s. d.). *Mode de reconnaissance hôte symbionte en milieux extrêmes : Cas du modèle symbiotique *Rimicaris exoculata**. 282.
- Bonin, DR et Hawkes, Michael W MW, « Systematics and life histories of New Zealand Bonnemaisoniaceae (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): I. The genus *Asparagopsis*. », *New Zealand Journal of Botany*, no 25, 1987, p. 577-590
- Bottjer, D. J., E. H. Davidson, K. J. Peterson, et R. A. Cameron. (2006). *Paleogenomics*
- Bouchet, P. (2013). *Indothais lacera* (né en 1778). Dans : *MolluscaBase* (2017). Consulté via : *Registre mondial des espèces marines* sur <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=714477>.

5 Références bibliographiques

- Boudouresque, Charles Francois et Verlaque, Marc, « Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes », *Marine Pollution Bulletin*, no 44, 2002, p. 32-38
- Boulenguez J. Caractérisation et modélisation de structures photoniques multi-échelles dans les bio-organismes, une espèce caractéristique des Morphidés : *Morpho rhetenor*. phdthesis.Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2009. Accessed June 8, 2022. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00422928>
- Bouzigha .N,Bouchiba .S.(2017).diversité métabolique et physiologique de quelque souche actinomycète (œuvre de master,university des frères,mentouri constantine.80
- Bragger J.M., Daniel R.M., Coolbear T., Morgan H.W. (1989).Very stable enzymes from extremely thermophilic archae bacteria and eubacteria. *Appl. Microbiol. And Biotech.*, 31:556561.
- Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey : Transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 218-230. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2262>
- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin
- Chakraborty S, Khopade A, Biao R, et al. Characterization and stability studies on surfactant,detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9.*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;68(1):52-58.doi:10.1016/j.molcatb.2010.09.009
- Chanalia P, Gandhi D, Jodha D, Singh J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Reviews and Research in Medical Microbiology*.2011;22(4):96-101. doi:10.1097/MRM.0b013e3283494749
- Chiraz AG, Zeng X. Elaboration d'un protocole de caractérisation des matériaux goniochromes. Published online April 6, 2018. Accessed June 8, 2022.<https://www.pist.tn/record/10157?ln=fr>
- Collins, Jane, Arianna Broggiato, et Thomas Vanagt. 2018. « Blue Biotechnology ».
- Cornelis P, Matthijs S. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol*. 2002;4(12):787-798.doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00369.x
- CURJ, A. (2019, août 27). Culture Conditions Influence Iridescence in Marine Microbes. *CURJ*. <https://curj.caltech.edu/2019/08/27/culture-conditions-influence-iridescence-in-marine-microbes/>

5 Références bibliographiques

- Chen Zhang et Se-Kwon Kim, « Application of Marine Microbial Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries », in *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 65 (Elsevier, 2012), 423-35, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00028-7>.
- COHEN. G.N., 2011. *Microbial Biochemistry*. Edition Springer Dordrecht Heidelberg London, NewYork. (Collection Springer Science+Business Media B.V) ISBN 978-90-481-9436-0. pp 163, 164
- De Jesus Raposo MF, De Morais RMSC, De Morais AMMB. Health applications of bioactivecompounds from marine microalgae. *Life Sci* 2013;93:479–86.
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., The
- Delile AR 1813 *Florae Aegyptiacae illustratio* In France (Commission d'Egypte), Description de l'Egypte ou recueil des observations et des recherches qui ont été faites en Egypte pendant l'expédition de l'armée française (1798 – 1801), Histoire naturelle 2 p. 49 – 82, 145 – 320 + atlas, pl. 1 62 [Google Scholar]
- DHARUMADURAI. D., JIANG. Y., 2016. Actinobacteria - Enzymes and Phytohormones from Micromonospora. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. Édition BoD – Books on Demand. Croatia, ISBN: 9789535122487, p 298
- Dijoux L., Viard F. et Payri C., « The more we search, the more we find: Discovery of a new lineage and a new species complex in the genus *Asparagopsis* », *Plos One*, juillet 2014
- Dirigée par Mirjam Czjzek et Pi Nyvall Collén
- Doucet SM, Meadows MG. Iridescence: a functional perspective. *J R Soc Interface*.2009;6(Suppl 2):S115-S132. doi:10.1098/rsif.2008.0395.focus
- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>
- DOUGUÉDROIT A. (1997) - Le climat du bassin méditerranéen. In : *Le climat, l'eau et les hommes*, ouvrage en l'honneur de Jean MOUNIER, Presses Universitaires de Rennes, p. 251-280.

5 Références bibliographiques

- Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire , Recherche de bactéries et levures-moisissures. Edition Lavoisier .P :113 ,114.
- ECORYS, (2014). Study in support of Impact Assessment work on BlueBiotechnology, FWC MARE/2012706 – SC C1/2013/03 – 13 June 2014
- EL-SAFEY. E., ABDUL-RAHOUF. U.M., 2004. Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, 1 (1): 1-30.
- Emiliano A. Biotecnologia na obtenção de ativos e excipientes cosméticos by Aidiane Emiliano. Published 2012. <https://prezi.com/4rjez531t9c7/biotecnologia-na-obtencao-de-ativos-e-excipientes-cosmeticos/>
- Esselmann, M. T., & Liu, P. V. (1961). LECITHINASE PRODUCTION BY GRAMNEGATIVE BACTERIA. *Journal of Bacteriology*, 81(6), 939-945. <https://doi.org/10.1128/jb.81.6.939-945.1961>
- Ely Rodrigues, Supriya Tilvi, et C.G. Naik, « Antimicrobial activity of marine organisms collected of the coast of South East India », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309 (1 septembre 2004): 121-27, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.010>.
- Éverson Miguel Bianco et al., « Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast », *Molecules* 18, no 5 (mai 2013): 5761-78, <https://doi.org/10.3390/molecules18055761>.
- EL-SAFEY. E., ABDUL-RAHOUF. U.M., 2004. Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, 1 (1): 1-30.
- Firmicute. Springer. New York. Volume Three. 63-67.
- Fariha Hasan, Aamer Ali Shah, et Abdul Hameed, « Industrial Applications of Microbial Lipases », *Enzyme and Microbial Technology* 39, n° 2 (26 juin 2006): 235-51, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>.
- Genta, M. L., Heluane, H. (2001). Biochemical identification of most frequently encountered bacteria that cause food spoilage. In: Spencerb, J. F. T., Ragout de Spencer, A. L. *Food Microbiology Protocols*. Humana Press Inc., Totowa NJ.
- Gianguzza P. et Bonaviri C. 2013. Arbacia. In *Sea Urchins: Biology and Ecology*, chap

5 Références bibliographiques

- Gordonr E., Haynesw C., Pang c.H.N. (1973). The Genus Bacillus (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC: United States Department of Agriculture.
- Gruson H. Origin and functions of iridescent colours in hummingbirds. Published online 2019:283.
- Guezennec, J., Chalkadiakis, E., Lerat, E., Lerat, L. (2014). Bactéries marines et Biotechnologie.
- Guillerme JB, Couteau C, Coiffard L. Applications for Marine Resources in Cosmetics. *Cosmetics*. 2017;4(3):35. doi:10.3390/cosmetics4030035
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 2003;38(11):1599-1616. doi:10.1016/S0032-9592(03)00053-0
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases : A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int*. 2013;2013:329121. doi:10.1155/2013/329121
- Halary, S. (2009). *Etude des symbioses de mytilidés des écosystèmes marins profonds à base chimiosynthétique par des techniques de FISH, de microscopie et de traitement d'images* [These de doctorat, Paris 6]. <https://www.theses.fr/2009PA066057>
- Hartmann EM, Durighello E, Pible O, et al. Proteomics meets blue biotechnology: A wealth of novelties and opportunities. *Marine Genomics*. 2014;17:35-42. doi:10.1016/j.margen.2014.04.003
- Hastings JW, Potrikusv CJ, Gupta SC, Kurfürst M, Makemson JC. Biochemistry and Physiology of Bioluminescent Bacteria. In: *Advances in Microbial Physiology*. Vol 26. Elsevier; 1985:235-291. doi:10.1016/S0065-2911(08)60398-7
- Hobbs, Joanne K., Andrew G. Hettle, Chelsea Vickers, et Alisdair B. Boraston. 2018. « Biochemical Reconstruction of a Metabolic Pathway from a Marine Bacterium Reveals Its Mechanism of Pectin Depolymerization ». *Applied and Environmental Microbiology* 85(1): e02114-18.
- Holmiae (Stockholm).
- <https://wwz.ifremer.fr/Expertise/Eau-Biodiversite/Biodiversite-Marine> <https://doi.org/10.3917/re1.086.0036>

5 Références bibliographiques

- http://speciesidentification.org/species.php?species_group=sponges&menuentry=soorten&id=412&tab=synoniemen
- <https://theconversation.com/les-eponges-une-ecologie-complexe-au-fond-des-mers-63611>
- <https://www.cbd.int/doc/world/dz/dz-nr-05-fr.pdf>
- <https://www.futura-sciences.com/planete/definitions/zoologie-eponge-6492/>
- <https://www.mareis.fr/le-buccin-buccinum-undatum/>
- <https://www.molluscabase.org/index.php>
- [Hue, A. \(s. d.\). Applications médicales de la cellulose. 34.](#)
- <http://www.loceanalabouche.com/pages/newsletters/news-2017/mars-2017/2-mars/la-vie-sur-terre-est-nee-dans-les-oceans-il-y-a-au-moins-3-77-milliards-d-annees.html>
- [https://dspace.univ-guelma.dz/jspui/bitstream/123456789/5654/1/M570.250 BIO OK.pdf](https://dspace.univ-guelma.dz/jspui/bitstream/123456789/5654/1/M570.250%20BIO%20OK.pdf)
- Ita Widowati et al., « Antibacterial and antioxidant properties of the red alga *Gracilaria verrucosa* from the North coast of Java, Semarang, Indonesia », *International Journal of Latest Research in Science and Technology* 3 (1 janvier 2014): 179-85.
- Jacque Harris. (2018, mai 4). Gelatin Test.<https://www.youtube.com/watch?v=XTh4FcW32Ck>
- Jahromi ST, Barzkar N. Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(16):6847-6863. doi:10.1007/s00253-018-9156-5
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry.* 2005;40(9):2931-2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026
- Jimenez PC, Wilke DV, Costa-Lotufo LV. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics.* 2018;73. doi:10.6061/clinics/2018/e482s
- Joffin JN. and Leyral G. (2006). *Microbiologie Technique Tome 1 "Dictionnaire des techniques"*. CRDP AQUITAINE. Bordeaux. 189-250.
- Julie PIRON, « ETUDE GENETIQUE ET MOLECULAIRE D'EPONGES MARINES DE LA MARTINIQUE » (THESE DE DOCTORAT, Université des Antilles, Ecole Doctorale 589 – Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, s. d.).

5 Références bibliographiques

- KARAN. R et al., 2012. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Journal of biomed central*, 8 (4), 153–157
- Kientz B. Etude de l'iridescence d'une bactérie marine, *Cellulophaga lytica* : caractérisation physico-optique, microbiologique et écologique. phdthesis. Université de La Rochelle; 2012. Accessed May 28, 2022. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01570861>
- Kientz, B., Luke, S., Vukusic, P., Péteri, R., Beaudry, C., Renault, T., Simon, D., Mignot, T., & Rosenfeld, E. (2016). A unique self-organization of bacterial sub-communities creates iridescence in *Cellulophaga lytica* colony biofilms. *Scientific Reports*, 6(1), 19906. <https://doi.org/10.1038/srep19906>
- Kientz, Betty. 2012. « Etude de l'iridescence d'une bactérie marine, *Cellulophaga lytica* : caractérisation physico-optique, microbiologique et écologique ». phdthesis. Université de La Rochelle. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01570861> (28 mai 2022).
- Kim S. & Svetashev V., 2002. Application of *Yarrowia lipolytica* for oil bioremediation and monitoring of its activity using phospholipid fatty acid analysis. In: *Proc. 3rd Yarrowia lipolytica international meeting: cell biology and biotechnology of a nonconventional yeast, 20 July 2002, University of Technology, Dresden, Germany*. Dresden, Germany: University of Technology.
- La vie marine. (s. d.). Consulté 22 juin 2022, à l'adresse http://stringfixer.com/fr/Marine_organism
- La vie sur Terre est née dans les océans il y a au moins 3,77 milliards d'années. (s. d.). Consulté 9 septembre 2022, à l'adresse
- Larpent J. P. & Larpent G. M. (1990). *Mémento technique de microbiologie*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 471 p.
- LES BIOTECHNOLOGIES BLEUES : L'INSOUPÇON- NABLE POTENTIEL DE L'INVISIBLE. - PDF Téléchargement Gratuit. (s. d.). <https://docplayer.fr/77549401-Les-biotechnologies-bleues-l-insoupcon-nable-potentiel-de-l-invisible.html>.
- LECLAIRE L., 1972 – La sédimentation holocène sur le versant méridional du bassin algéro-baléares (précontinent algérien). *Mèm. Mus. Natn. Nat.*, Paris ;C,24,391p.
- LECLAIRE. L. 1968 – Contribution à l'étude des sédiments marins non consolidés. Les bases d'une nouvelle classification, *Ibid.*, t.66 : 563-565.
- LEE. Y et al., 2007. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloqueliciens* DL-3. *Journal of bioresource technology*, 98 (2), 288-297.

5 Références bibliographiques

- Li Y, Lopez P, Durand P, Ouazzani J, Badet B, Badet-Denisot MA. An enzyme-coupled assay for amidotransferase activity of glucosamine-6-phosphate synthase. *Analytical Biochemistry*. 2007;370(2):142-146. doi:10.1016/j.ab.2007.07.031
- Linnaeus C. 1758. *Systema naturae. Regnum animale: Editio decima*. Laurentius Salvius,
- Liu, L., Zheng, Y.-Y., Shao, C.-L., & Wang, C.-Y. (2019). Metabolites from marine invertebrates and their symbiotic microorganisms: Molecular diversity discovery, mining, and application. *Marine Life Science & Technology*, 1(1), 60-94. <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00021-2>
- Loreto P. Parra et al., « Cloning and Fusion Expression of a Cold-Active Lipase from Marine Antarctic Origin », *Enzyme and Microbial Technology* 42, n° 4 (4 mars 2008): 371-77, <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2007.11.003>.
- Mason CW. Structural Colors in Insects. III. *J Phys Chem*. 1927;31(12):1856-1872. doi:10.1021/j150282a008
- Michelet, P. (2017). La biodiversité des milieux aquatiques continentaux en France métropolitaine : État des lieux et menaces. *Annales des Mines - Responsabilité et environnement*, 86(2), 36-39. Biodiversité Marine. (s. d.). Ifremer. Consulté 5 septembre 2022, à l'adresse.
- Milott, C., 1999-Circulation in western Mediterranean Sea . *Journal of Marine*
- Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement , 2014. 5^{ème} rapport national sur la mise en œuvre de la convention sur la diversité biologique au niveau national : 128p.
- Muffler K, Sana B, Mukherjee J, Ulber R. Marine Enzymes – Production & Applications. In: Kim SK, ed. *Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg; 2015: 413-429. doi:10.1007/978-3-642-53971-8_14
- Murray PM, Moane S, Collins C et al. Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. *New Biotechnol* 2013; 30:839–50.
- Mayer, N. (s. d.). Définition | Biotechnologie bleue—Biotechnologie marine | Futura Planète. Futura. Consulté 9 septembre 2022, à l'adresse <https://www.futura-sciences.com/planete/definitions/ocean-biotechnologie-bleue-15590/>
- Madhura Nerurkar et al., « Application of Lipase from Marine Bacteria *Bacillus Sonorensis* as an Additive in Detergent Formulation », *Journal of Surfactants and Detergents* 16, n° 3 (2013): 435-43, <https://doi.org/10.1007/s11743-012-1434-0>.

5 Références bibliographiques

- M. Faried et al., « Biodiesel Production from Microalgae: Processes, Technologies and Recent Advancements », *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79 (1 novembre 2017): 893-913, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>.
- MAKI. M.L et al., 2011. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Journal of Biochemistry and molecular biology*, 2 (2), 146–154
- Navvabi A, Razzaghi M, Fernandes P, Karami L, Homaei A. Novel lipases discovered specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. *Process Biochemistry*. 2018 ;70:61-70. doi: 10.1016/j.procbio.2018.04.018
- Nichols SW, Schuh RT, de la Torre-Bueno JR, Tulloch GS, eds. *The Torre-Bueno Glossary of Entomology*. Rev ed. New York Entomological Society; 1989.
- Nicolas Maillet, « Comparaison de novo de données de séquençage issues de très grands échantillons métagénomiques : application sur le projet Tara Oceans » (phdthesis, Université Rennes 1, 2013), <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00941922>.
- Nikky Goel et al., « Antimicrobial Resistance in Biofilms: Exploring Marine Actinobacteria as a Potential Source of Antibiotics and Biofilm Inhibitors », *Biotechnology Reports* 30 (1 juin 2021): e00613, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00613>.
- of Echinoderms. *Science* 314, 956-960
- on the west coast of Ireland. *Marine Biology* 104, 275-289. Moulin, L., A. I. Catarino, T. Claessens, et P. Dubois. (2011). Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). *Marine Pollution Bulletin* 62, 48-54.
- Ouanes, A. et al. 2013. « Apport du milieu chromogène CHROMagar® Candida dans le diagnostic mycologique des levures ». *Journal de Mycologie Médicale* 23(4): 237-41.
- Ouanes, A., Kouais, A., Marouen, S., Sahnoun, M., Jemli, B., & Gargouri, S. (2013). Apport du milieu chromogène CHROMagar® Candida dans le diagnostic mycologique des levures. *Journal de Mycologie Médicale*, 23(4), 237-241. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.07.058>

5 Références bibliographiques

- Oleg G. Borzykh et Lubov V. Zvereva, « Fungal Assemblages Associated with Commercial Bivalve Species in Coastal Waters of the Sea of Japan, Russia », *Botanica Marina* 61, n° 4 (1 août 2018): 355-63, <https://doi.org/10.1515/bot-2017-0088>
- Pagney, P., 1994-*Les climats de la terre*, 2ème édition, Masson-Colin, 150 P.
- par une approche biochimique et structurale Par Maria Matard-Mann
- *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat
- Park SH, Lee CR, Hong SK. Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(7):2815-2832. doi:10.1007/s00253-020-10412-6
- Pijper. Diffraction in biological structures. doi:10.10520/AJA20785135_2540
- Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):403-425. doi:10.1080/14756366.2016.1256882
- Prabha SP, Nagappan S, Rathna R, Viveka R, Nakkeeran E. Blue biotechnology: a vision for future marine biorefineries. In: *Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts*. Elsevier; 2020:463-480. doi:10.1016/B978-0-12-818996-2.00021-1
- *Présentation des bactéries—Infections*. (s. d.). Manuels MSD pour le grand public. Consulté 21 mai 2022, à l'adresse <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-bacteriennes-pr%C3%A9sentation/pr%C3%A9sentation-des-bacteries>
- Présentée et soutenue publiquement le 07/12/2017
- Price, JH, John, DM et Lawson, GM, « Seaweeds of the western coast of tropical Africa and adjacent islands: a critical assessment IV. Rhodophyta (Florideae) 1. Genera A–F. », *Bulletin of the British Museum of Natural History Botany Series*, no 15, 1986, p. 1-122
- PROPOS D'UN CAS. 4.
- Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65:635–4.
- Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol*. 20 (5): 200-206

5 Références bibliographiques

- Patnayak, S., & Sree, A. (2005). Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. *Letters in Applied Microbiology*, 40(5), 358-363.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01671.x>
- Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*. 31:135-52.
- *Qu'est ce qu'une bactérie ?* (s. d.). Consulté 21 mai 2022, à l'adresse <https://www.antibi-responsable.fr/bacteries/classification>
- Querellou J. Marine biotechnology. Introduction to Marine Genomics. . Dordrecht: Springer,2010, 287–313.
- Rasmussen RS, Morrissey MT. Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol 52. Academic Press; 2007:237-292. doi:10.1016/S10434526(06)52005-4
- Reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiologia* 519, 61-72.
- Rhom, 1992. German Patent: DE-4119889.
- Saida LAOUAR Chef de Bureau des Sites et Paysages Naturels Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Environnement et du Tourisme (MATET), Algérie
- Riyanti et al., « Selection of Sponge-Associated Bacteria with High Potential for the Production of Antibacterial Compounds », *Scientific Reports* 10, n° 1 (12 novembre 2020): 19614, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76256-2>
- REFFAS. F.Z.I, 2017. Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase. Thèse de doctorat en Microbiologie moléculaire et proteomics. Université Djilali Liabes - Sid Bel Abbes, pp 33-37
- Sánchez-España, A. I., I. Martínez-Pita, et F. J. García. (2004). Gonadal growth and
- Shankar R, Upadhyay PK, Kumar M. Protease Enzymes: Highlights on Potential of Proteases as Therapeutic Agents. *Int J Pept Res Ther*. 2021;27(2):1281-1296. doi:10.1007/s10989-021-10167-2
- Sharma S, Kanwar S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:625258. doi:10.1155/2014/625258
- Sierra G. (1957). A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23:15–22

5 Références bibliographiques

- Silva, PC, Basson, PW et Moe, RL, Catalogue of the Benthic Marine Algae of the Indian Ocean, Berkeley and Los Angeles, California, University of California Press, 1996, 1280 p.
- Singh J, Kundu D, Das M, Banerjee R. Chapter 24 - Enzymatic Processing of Juice From Fruits/Vegetables: An Emerging Trend and Cutting Edge Research in Food Biotechnology. In: Kuddus M, ed. Enzymes in Food Biotechnology. Academic Press; 2019:419-432. doi:10.1016/B978-0-12-813280-7.00024-4
- [Soumia, B. \(s. d.\). Mr BOULAHROUF A. Mme MERAIHI Z. Mme MECHAKRA A. Mr](#)
- Station Biologique de Roscoff- UMR8227 LBI2M / Equipe Glycobiologie Marine Recherche et caractérisation de nouvelles enzymes de bactéries marines actives sur les polysaccharides algaux
- *Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie—Structure.* (S. d.). 11.
- *Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie—Structure.* (s. d.). 11.
- Symbiose et parasitisme. (2016, juin 30). *Encyclopédie de l'environnement.* <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/systemes-symbiotiques-parasites/>
- Systems, 20 :423-442.
- Szklarzewicz, T., & Michalik, A. (2017). Transovarial Transmission of Symbionts in Insects. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 63, 43-67. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_3
- Stephen Knobloch, *Host-Microbe Symbiosis in the Marine Sponge Halichondria Panicea* (University of Iceland, School of Engineering and Natural Sciences, Faculty of Life and Environmental Sciences, 2019), <https://opnvisindi.is/handle/20.500.11815/1145>.
- S.L. Smitha, N.S. Correya, et Rosamma Philip, « Marine fungi as potential source of enzymes and antibiotics », *International Journal of Research in Marine Sciences* 3 (1 janvier 2014): 5-10
- Sougata Jana et al., « Applications of Marine Proteases », in *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, éd. par Se-Kwon Kim, 1^{re} éd. (Wiley, 2020), 1427-41, <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch60>.
- Satyanarayana T., Raghukumar Ch., Roswall T. and Shivaji S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *current Science* 89:1

5 Références bibliographiques

- Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Gandhimathi, R., Baskar, T. B., Manilal, A., & Sujith, S. (2009). Erratum to : Optimization, production, and partial characterization of an alkalophilic amylase produced by sponge associated marine bacterium Halobacterium salinarum MMD047. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(6), 871-871. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-1003-1>
- Tanabe H, Kobayashi Y, Akamatsu I. Pretreatment of Pectic wastewater from orange canning by softrot *Erwinia corotovor*a. *Journal of Fermentation Technology*. 1986;64(3):265-268. doi:10.1016/03856380(86)90110-X
- Tankeshwar A. (2013). Catalase test: principle, uses, procedure and results. *Biochemical Tests for Gram Negative Bacteria*. <http://www.microbeonline.com>.
- Tapin S., Sigoillot J.C., Asther M., Petit-Conil M. Feruloyl Esterase Utilization for Simultaneous Processing of Nonwood Plants into Phenolic Compounds and Pulp Fibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 3697-3703.
- Thèse de doctorat de Biologie
- THibaut, T.Y., 2001. Etude fonctionnelle, contrôle et modélisation de l'invasion d'une algue introduite en Méditerranée.
- Topakas E., Vafiadi C., Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry* 42 (2007) 497-509.
- Université Pierre et Marie Curie Ecole doctorale Complexité du Vivant – ED515
- Venil, Chidambaram Kulandaisamy, Zainul Akmar Zakaria, et Wan Azlina Ahmad. 2013. « Bacterial Pigments and Their Applications ». *Process Biochemistry* 48(7): 1065-79 .
- Vivó-Sesé, I., et M. D. Pla. 2007. « 8.7 – Bioactive Ingredients in Cosmetics ».
- Wang L. Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 2004;150(10):3383-3391. doi:10.1099/mic.0.27162-0
- XOPLAKI E. (2002) - Climate variability over the Mediterranean. Thèse de Doctorat de l'Université de Berne (Suisse), 193 p.
- Yadav PK, Singh VK, Yadav S, Yadav KDS, Yadav D. In silico analysis of pectin lyase and pectinase sequences. *Biochemistry Moscow*. 2009;74(9):1049-1055. doi:10.1134/S0006297909090144

5 Références bibliographiques

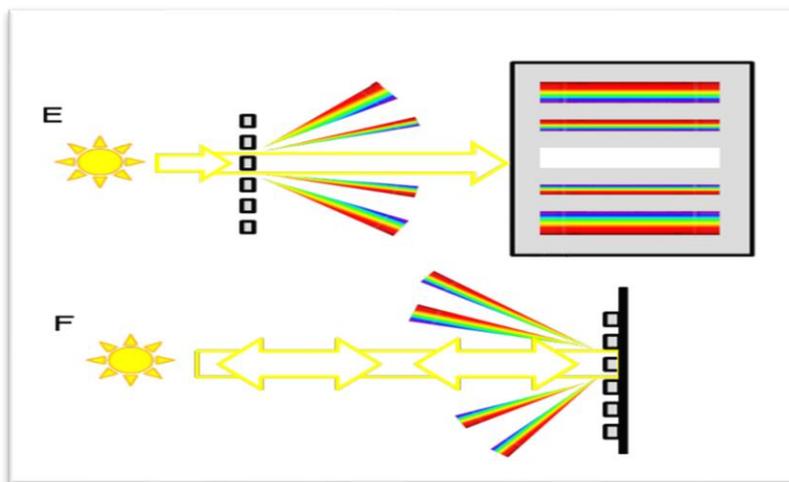
- Yun J, Rothrock RJ, Canoll P, Bruce JN. Convection-Enhanced Delivery for Targeted Delivery of Antiglioma Agents: The Translational Experience. *Journal of Drug Delivery*. 2013;2013:e107573. doi:10.1155/2013/107573
- Yves Lelièvre, « Élaboration de vecteurs d'ADN, substrats de gélatinases » (Theses, Paris 6, 2005), <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-03568281>.
- Zeraidi, N., Chahtane, A., Lakhdar, A., Khabouz, S., Berrada, R., Rhrab, B., Fadli, A., Kharbach,
- Zhang C, Kim SK. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *MarDrugs*. 2010;8(6):1920-1934. doi:10.3390/md8061920
- Zhang C, Kim SK. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *MarDrugs*. 2010;8(6):1920-1934. doi:10.3390/md8061920

6 Annexes

6 Annexes

Annexe 1 :

La lumière qui apparaît sur un autre écran (placé derrière le premier) est colorée, des franges irisées sont visibles de part et d'autre de la tache centrale (Kientz .,2012).



Annexe 2 : Matériels non biologiques

L'appareillage utilise est celui retrouve habituellement dans un laboratoire de microbiologie : Verrerie, balance, bec bunsen, pH mètre, agitateur magnétique, étuve, autoclave, réfrigérateur, pipette pasteur, boites de Pétri, vortex, microscope photonique (OPTIKA) ; flacons ; les tubes ; micropipette, l'Anse ; disques vierges.

Annexe 3 : Composition des milieux de culture :

*Préparation de bouillon nutritif (BN) :

Extrait de levure	1,50g/L
Extrait de viande.....	1,50 g/L
Peptone.....	5,00 g/L
Eau de mer.....	1000mL

6 Annexes

PH : $7,4 \pm 0,2$ à 25°C

*Préparation de gélose nutritive (GN) :

Agar	20g
Peptone.....	5 g
Extrait de viande.....	1,5g
Extrait de levure.....	1,5g
Eau de mer.....	1000mL

PH : $7,4 \pm 0,2$ à 25°C

*Milieu gélose viande-foie (pour le test biochimique des bactérie)

Extrait de viande.....	10g
Peptone	20g
Extrait de levure.....	10g
Glucose.....	0.5g
Agar.....	15g
Eau de mer	1000ml

pH= 7,6

*Préparation de Muller Hinton(MH) :

Extrait de viande.....	2 g
Peptone.....	17,5 g
Agar.....	17g
Amidon.....	1,5 g
Eau de mer	1000mL

pH : $7,3 \pm 0,1$ à 25°C

*Préparation de milieu Sabouraud(MS) :

Peptone.....	10 g
--------------	------

6 Annexes

Glucose.....40g

Agar.....15 g

Eau distillée.....1000mL

pH :5,6

Annexe 4 : Milieux pour les tests enzymatiques

* Milieu gélose à amidon 1%(MA)

Gélose nutritive à base d'eau de mer1000ml

Amidon10g

* Gélose nutritive à 1 % (v/v) de tween 80(ME)

Gélose nutritive à base d'eau de mer1000 ml

Tween (80)10 ml

*Milieu gélatinasiq

Gélatine.....150g

Gélose nutritive.....1000ml

* Milieu gélosé à 0 ,5% de CMC(M.CMC)

Gélose nutritive à base d'eau de mer.....1000ml

CMC.....5g

*Milieu lypolytique (ML)

Jaune d'œuf.....2ml

Eau distillé.....18ml

Gélose nutritive à base d'eau de mer180ml

Additionnée 2ml de jaune d'œuf avec eau distillé mélangée doucement ensuit verser le tube dans le flacon de GN et mélangé aussi doucement.

* Milieu gélosé au lait écrémé

6 Annexes

Lait écrémé	50ml
Agar.....	10g
Eau de mer.....	1000ml

Annexe 5 : les indicateurs colorés

*Rouge Congo à 0.1%

Rouge Congo.....	0.1g
Eau distillé	100ml

- Dissoudre 0.1g de Rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml.

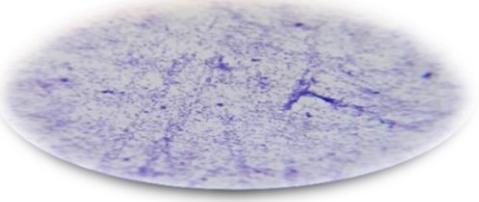
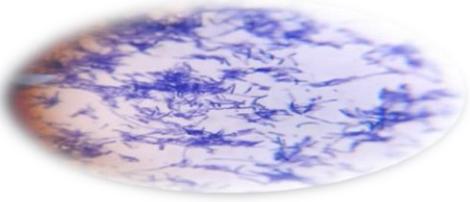
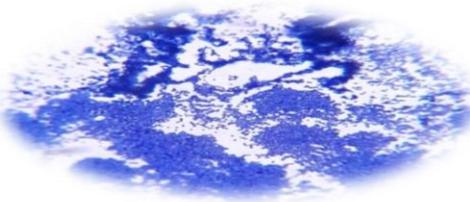
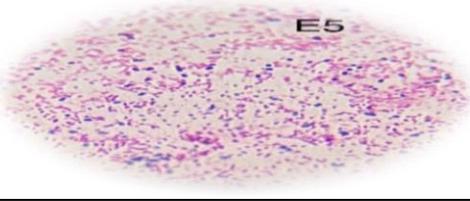
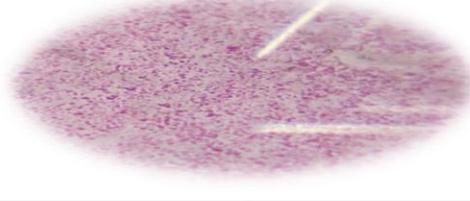
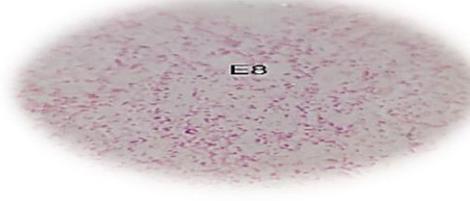
* Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M

Chlorure de sodium.....	58,44g
Eau distillée.....	1000ml

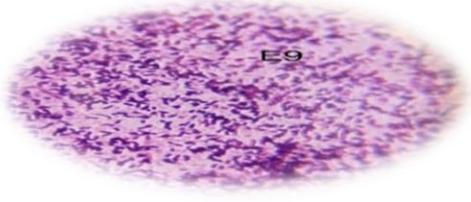
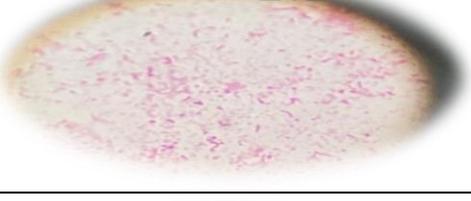
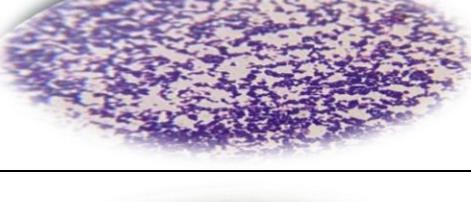
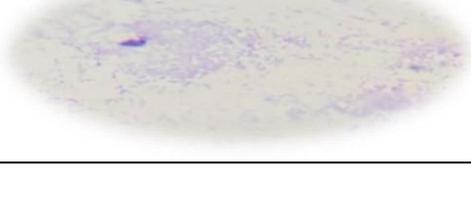
6 Annexes

Annexe 6 :

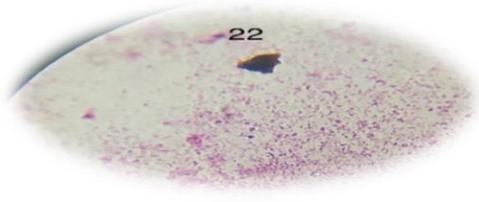
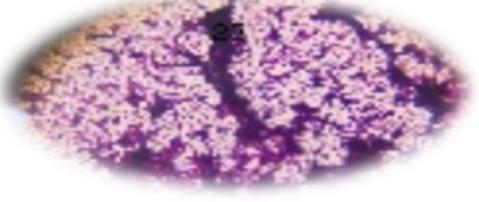
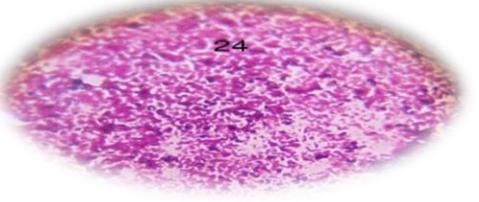
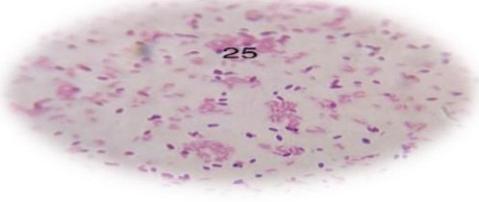
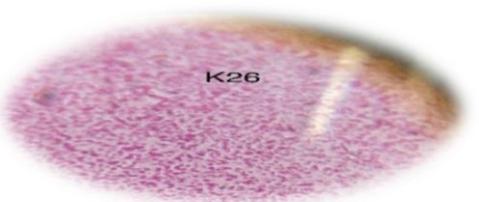
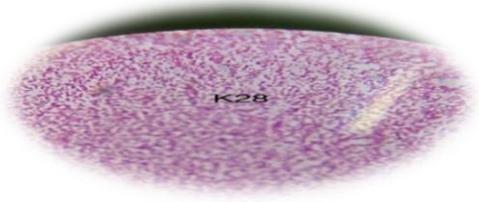
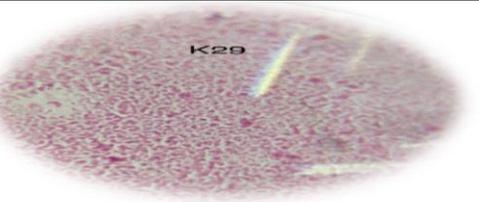
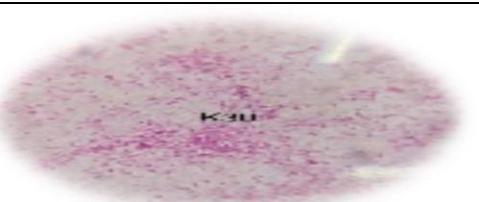
Tableau VIII : Représente l'aspect microscopique de coloration de gram

L'identification des souches	Forme de souche	L'observation gram microscopique
E1	Bacille gram positive	
E2	Bacille gram positive	
E3	Cocci gram positive	
E5	Cocci gram négative	
E7	Cocci gram négative	
E8	Coccobacille gram négative	

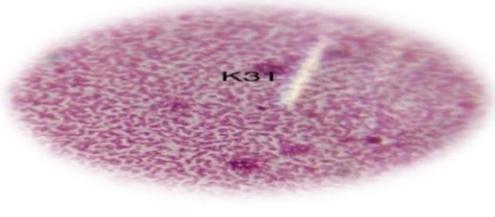
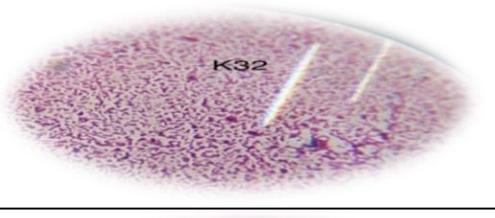
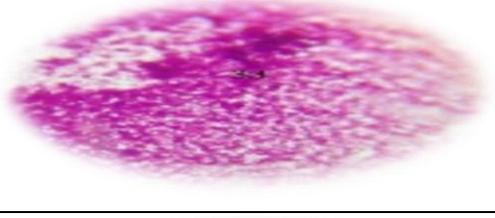
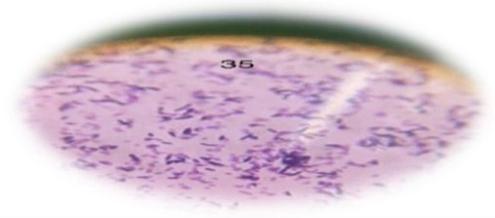
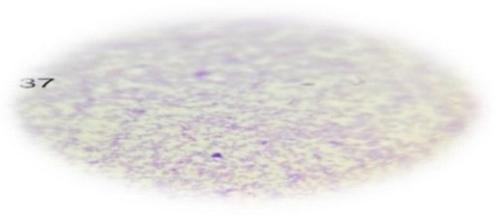
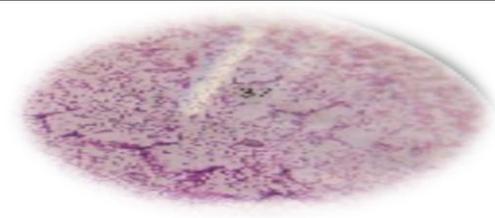
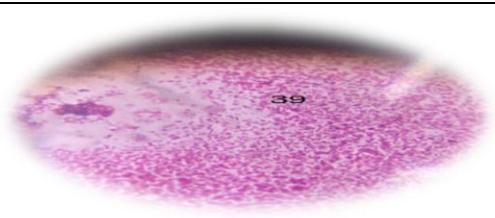
6 Annexes

E9	Bacille gram positive	
E10	Coccobacille gram positive	
E19	Bacille gram positive	
AR12	Bacille gram négative	
AR14	Bacille gram négative	
AR15	Coccobacille gram positive	
AR16	Cocci gram positive	
AR17	Cocci gram positive	

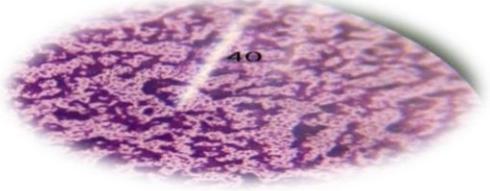
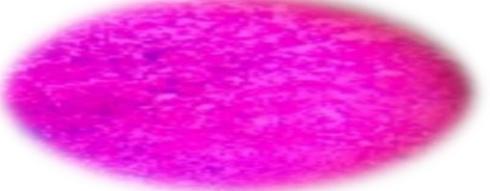
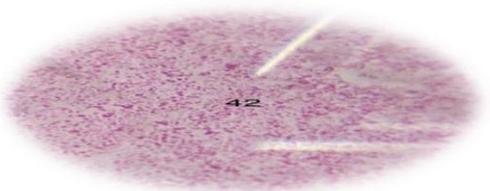
6 Annexes

N22	Bacille gram negative	
N23	Coccobacille gram positive	
N24	Cocci gram négative	
N25	Bacille gram négative	
K26	Bacille gram négative	
K28	Cocci gram positive	
K29	Coccobacille gram négative	
K30	Bacille gram négative	

6 Annexes

K31	Bacille gram négative	 Microscopic view of K31 showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear pink (stained with safranin) against a purple background.
K32	Bacille gram positive	 Microscopic view of K32 showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple (stained with crystal violet) against a pink background.
K33	Cocci gram négative	 Microscopic view of K33 showing Gram-negative cocci. The bacteria appear pink (stained with safranin) against a purple background.
O34	Bacille gram positive	 Microscopic view of O34 showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple (stained with crystal violet) against a pink background.
O35	Bacille gram positive	 Microscopic view of O35 showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple (stained with crystal violet) against a pink background.
O37	Bacille gram positive	 Microscopic view of O37 showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple (stained with crystal violet) against a pink background.
O38	Bacille gram positive	 Microscopic view of O38 showing Gram-positive bacilli. The bacteria appear purple (stained with crystal violet) against a pink background.
O39	Bacille gram négative	 Microscopic view of O39 showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear pink (stained with safranin) against a purple background.

6 Annexes

O40	Bacille gram positive	 Micrograph showing Gram-positive bacilli, appearing as purple-stained rod-shaped bacteria. A yellow pointer indicates a specific rod. The number 40 is visible in the center.
O41	Cocci gram négative	 Micrograph showing Gram-negative cocci, appearing as pink-stained spherical bacteria.
O42	Cocci gram négative	 Micrograph showing Gram-negative cocci, appearing as pink-stained spherical bacteria. A yellow pointer indicates a specific rod. The number 42 is visible in the center.

6 Annexes

Annexe 7 :

Tableau IX : Les résultats des activité enzymatiques.

La souche bactériennes	Activité estirasiq	Activité Gèlatinasique	Activité cellulolytique	Activité lypolytique	Activité amylolytique	Activité protéolytique
E1	-	-	-	-	--	+ D=2mm
E2	-	+	-	-	-	+ D=3mm
E3	-	+	-	-	-	+D=3mm
E4	-	+	-	-	-	-
E5	-	+	-	-	-	-
E6	+ D=4cm	-	+ D=1cm	+	+ D=1.2cm	+ D=1.5cm
E7	+ D=1cm	+	-	+	-	-
E8	-	+	-	+	-	-
E9	-	+	-	-	-	-
E10	-	+	-	-	-	-
E19	-	-	+ D=2cm	+	+ D=3cm	-
AR11	-	+	-	-	-	+ D=1mm
AR12	-	+	-	+	+ D=1cm	-
AR13	+	+	-	-	-	-
AR14	-	-	-	+	-	-
AR15	-	+	-	-	-	+ D=1mm
AR16	+ D=1mm	+	-	-	+ D=1.4cm	-
AR17	-	+	-	-	-	-
AR18	-	+	-	-	-	-
N20	-	+	-	-	-	+ D=1.5cm
N21	+ D=0.5mm	+	+ D=1.4cm	+	+ D=2.2cm	-
N22	-	+	-	+	-	-
N23	-	-	-	-	-	-
N24	-	-	-	-	-	-
N25	-	-	+ D=1.5cm	-	+ D=2.7cm	-
K26	+ D=1cm	+	+ D=1.6cm	-	+ D=2cm	-
K27	-	-	-	-	-	-
K28	-	+	+ D=1.4cm	-	+ D=2cm	-
K29	-	+	-	-	+ D=2.1cm	-
K30	-	+	-	-	-	-
K31	+ D=6cm	+	-	-	+ D=2.3cm	-
K32	+ D=5.5cm	+	+ D=2cm	+	+ D=2.9cm	-
K33	-	+	-	-	-	+ D=2mm
O34	+ D=0.5mm	+	+ D=1.6cm	-	+ D=2.1cm	-
O35	-	+	+ D=1.6cm	-	-	-
O36	-	+	+ D=1.2cm	-	-	-
O37	-	+	-	-	-	+ D=1cm
O38	-	+	-	-	-	-
O39	+ D=1cm	+	+ D=1.1cm	-	+ D=2.1cm	-
O40		+	+ D=1.2cm	-	+ D=3cm	-
O41	-	+	-	-	-	-
O42	-	+	-	+	-	-

6 Annexes

Annexe 8 :

Tableau X : Résultats des activité antimicrobiennes des souches isolées vis à vis des souches pathogènes de références

Souche	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
E1	-	1mm	1mm	1mm	-	-
E2	-	-	4mm	3mm	-	-
E3	-	-	-	-	-	3mm
E6	-	-	-	-	-	6mm
E7	3mm	3mm	-	-	-	4mm
AR11	3mm	3mm	1mm	4mm	-	-
N20	1mm	-	-	-	-	-
N22	-	-	-	-	-	5mm
N23	1mm	-	-	2mm	-	3mm
N25	2mm	3mm	-	-	-	-
K26	2mm	2mm	-	-	-	-
K28	1mm	-	3mm	3mm	-	-
K33	-	1mm	-	-	-	-
O34	3mm	3mm	3mm	-	-	-
O35	2mm	4mm	1mm	-	-	-
O36	2mm	4mm	2mm	-	-	-
O37	1mm	4mm		-	-	2mm
O38	2mm	2mm	2mm	1mm	-	-
O39	2mm	5mm	2mm	2mm	-	-
O40	2mm	3mm	3mm	-	-	-
O41	2mm	-	3mm	-	-	4mm

- : Absence de l'activité antimicrobienne des souches bactériennes.

6 Annexes

Annexe 9 :

Tableau XI : Les abréviations utilisées sur nos collections des souches bactériennes isolées

Espèces	<i>Spongia officinalis</i> (éponge)	<i>Asparagopsis taxiformis</i> (algue rouge)	<i>Echinaster sepositus</i> (Eoiledemer)	<i>Indothaïs lacera</i> (Coquillage)	<i>Arbacia lixula</i> (oursin)
Souches	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E19	AR11, AR12, AR13, AR14, AR15, AR16, AR17, AR18,	N20, N21, N22, N23, N24, N25,	K26, K27, K28, K29, K30, K31, K32, K33	O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41, O42