

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Centre Universitaire Salhi Ahmed de Naâma



Institut des Sciences et Technologies

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

## Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

**Master Académique en Sciences biologiques**

**Spécialité « Microbiologie Appliquée »**

Thème

**Détermination de l'activité antimicrobienne des bactéries  
sporulées isolées de la région de Naama**

Par : M<sup>elle</sup> BRAHIMI Radja

M<sup>elle</sup> MAATI Zahra

Soutenue le : 26 Juin 2019

Devant le jury:

<b>Président</b>	MAA Mr. MAHDAD Moustafa Yassine	C.U Salhi Ahmed Naama
<b>Encadreur</b>	MCB Mme. BOUALI Waffa	C.U Salhi Ahmed Naama
<b>Examineur 1</b>	MCA Mr. AMROUCHE Abdel Ilah	C.U Salhi Ahmed Naama
<b>Examinatrice 2</b>	MCA Mme. LAGHA Nouria	C.U Salhi Ahmed Naama

Année Universitaire 2018/2019

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ  
فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ ۚ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

-29- البقرة



## **Remerciement**

*Dans ces quelques lignes, nous remercions toutes les personnes qui de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ce travail.*

*Nous exprimons toute notre profonde gratitude à Madame **BOUALI Waffa**, notre directrice de mémoire, pour sa patience, son suivi permanent de ce travail et ses remarques, conseils précieux et encouragements, durant les différentes étapes de réalisation de notre mémoire.*

*Nos sincères remerciements à Monsieur **MAHDAD Moustafa Yassine** qui nous a fait un grand honneur de présider le jury de cette mémoire.*

*Nous sommes extrêmement reconnaissantes envers Monsieur **AMROUCHE Abdel Ilah** et Madame **LAGHA Nouria** de nous faire bénéficier de leur expertise en acceptant de juger notre travail.*

*Nous remercions Messieurs **SEDDIKI Sidi Mohammed El Habib** et **GHERIB Mohammed** pour leurs aides, soutiens et conseils.*

*Nous adressons enfin nos remerciements aux ingénieurs des laboratoires biochimie et microbiologie du centre universitaire de Naama, pour leurs aides.*

## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect,  
reconnaissance et de remerciement :*

*À mes très chers parents, qui ont été toujours pour moi*

*À mes frères*

*À ma nièce Ibtissem ; et À mon neveu Mohammed*

*À toute ma famille, Brahimi et Rahmouni*

*À ma très chère sœur Halima*

*À ma chère collègue Zahra, qui m'a accompagnée durant ce travail*

*À toutes les papillons*

*À tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce modeste travail*

***Radja***

## ***Dédicace***

*Je dédie ce travail :*

*À ma mère FATIMA pour son amour, son encouragement et son inquiétude pour mon avenir  
avec toute ma gratitude et mon amour.*

*À mon père BOUDJEMAA qui est toujours la source de ma force de part et d'autre  
Je sais que se travail est minime devant leurs amours et leurs sacrifice alors que je  
l'accompagne avec tout les pas que j'ai marché durant ce travail, on espérant que ça serait  
juste un peut plus lourd*

*À mes sœurs et mes frères qu'Allah les garde et leurs enfants*

*A ma tante Khadidja*

*Surtout à mes nièces et neveux, j'espère qu'ils vont trouver toujours les traces de mon  
amour entre ces mots*

*À toi Ajushi*

*Qu'ALLAH te protège, que votre chemin soit plein succès et bonheur*

*À Radja*

*À toutes les papillons*

*Merci pour le partage de chaque beau et mauvais moment et surtout pour les moments de la  
folie*

*À toutes les bactéries que j'ai brûlées*

*À tous les verbes 'conjugués' durant ce travail*

*À toutes les personnes qui mon fait confiance ; c'était mon source d'énergie positive qui m'a  
accompagnée intimement, **également** à toutes les personnes qui m'ont pas fait confiance ;  
c'est une source d'énergie négative, qu'il fallait bruler pour mouvoir. En tout cas le monde  
a besoin toujours de s'auto-équilibrer.*

**ZAHRA**

## الملخص :

الاستعمال المفرط و غير الحكيم للمضادات الحيوية ضاعف ظاهرة مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية، نتج عن ذلك البحث المتواصل عن مواد فعالة طبيعية جديدة.

تعرف بيكتيريا باسيلوس بقدرتها على إنتاج المضادات الحيوية، هذه الأخيرة تم اكتشافها بواسطة الانتقاء. هدف هذه الدراسة هو انتقاء السلالات المنتجة للمضادات الحيوية من بين سبع سلالات باسيلوس سريوس معزولة من تربة الريزوسفير من أربع مناطق في ولاية النعامة، و دراسة نشاطها على مجموعة من الكائنات الحية المرجعية.

أربع سلالات من بين السلالات المدروسة بطريقتي اسطوانة الأغار و طريقة القرص أظهرت نشاط ضد البكتيريا موجبة الغرام من خلال تحري الوقت و الوسط الغذائي الأمثل للسلالة 1 تبين أن أعلى نشاط كان بعد 48 ساعة في الوسط المغذي السائل . تم استخلاص الجزيئات الخلوية الداخلية و الخارجية البيبتيدية و الغير بيبتيدية ، و تجربة نشاطها على البيكتيريا التي أظهرت حساسية للسلالة 1 . وجدنا أن الجزيء المسؤول عن النشاط المضاد هو الجزيئات الخلوية الخارجية المستخلصة بالأسيتون . تجربة البروتيناز ك تؤكد الطبيعة البيبتيدية لهذه الجزيئة التي تتميز أيضا بمقاومة الحرارة حتى 85 درجة مئوية بالنسبة الى سطا فيلو كوكوس أوريوس .

الكلمات المفتاحية : باسيلوس سيريوس ، جزيء فعال ، بيبتى ، انتقاء ، تربة، النعامة .

## **Résumé:**

*L'utilisation excessive et massive des antibiotiques a augmenté le phénomène de l'antibiorésistance. Face à ce problème une approche consiste à rechercher de nouveaux composés naturels bioactifs.*

*Le genre **Bacillus** est connu pour sa capacité de produire une large gamme de substances antimicrobiennes, qui ont été découverte traditionnellement par criblage.*

*Le but de la présente étude est le criblage de sept souches de groupe **Bacillus cereus** obtenues à partir de quatre sols rhizosphériques, pour leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis d'une gamme de microorganismes de références, par la méthode du cylindre d'agar et la méthode des disques.*

*Quatre souches ont montré une activité antibactérienne contre des bactéries pathogènes à Gram -positif. L'optimisation de temps et de milieu de culture de la souche 1 a montré un effet inhibiteur maximal après 48h d'incubation dans le bouillon nutritif. Les composés intracellulaire, extracellulaire peptidique et non peptidique ont été extraits séparément puis testés pour leurs effet antimicrobiens contre les bactéries pathogènes sensibles par la méthode des puits. La molécule bioactive est la partie extracellulaire peptidique précipitée par l'acétone. Le test de protéinase k confirme la nature protéique de cette molécule bioactive, cette dernière résiste jusqu'à 85°C vis-à-vis *S.aureus*.*

**Mots clés : *Bacillus cereus, métabolites bioactives, peptide, criblage, sol, Naama.***

## ***Abstract:***

*The overuse and the misuse of antibiotics have raised the phenomenon of antibioresistance. Resulting a continuous research for new natural bioactive compound. Members of the genus Bacillus are known to produce a wide arsenal of antimicrobial substances.*

*The aim of the present study is the screening of seven Bacillus cereus strains previously isolated from four rhizosphere soil sample of Naama province for their antimicrobial activity against a collection of reference microorganisms, by agar and disc methods.*

*Four strains showed antibacterial activity against Gram-positive bacteria. The optimization of time course and culture media of strain 1 revealed a maximum inhibitor effect after 48h of incubation in nutrient broth. Intracellular, extracellular peptidic and no peptidic compound was extracted separately than tested for their antibacterial activity against sensitive pathogens by well diffusion assay. The bioactive molecule was the extracellular peptidic compound precipitated by acetone. The treatment with proteinase k confirm the peptidic nature of the bioactive molecule, which was able to resist until 85°C against S.aureus.*

***Keywords : Bacillus cereus, bioactive molecule, peptide, screening, soil, Naama.***

## *Liste des abréviations*

- ATCC** : Collection de Culture de Type Américain  
**HPLC** : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance  
**NRPS** : Peptides Bioactifs non Ribosomaux  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince  
**BLIS** : Substance Inhibitrice Ressemblant au bactériocine  
**CLSI** : Institut de normalisation clinique et de laboratoire  
**MALDI TOF**: Désorption-ionisation laser assistée par matrice temps de vol  
**Aq** : Aqueuse  
**Or** : Organique  
**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** : dichlorométhane  
**C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>** : Acétate d'éthyle  
**D** : Acide aspartique  
**W** : Tryptophane  
**T** : Thréonine  
**S** : Sérine  
**L** : Leucine  
**s.l** : *sensu lato*  
**s. s** : *sensu stricto*  
**t/m** : Tour par minute  
**v/v** : volume volume

## Listes des figures

<b>Figure 1</b> : Les différentes formes de <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579).....	4
<b>Figure 2</b> : Colonies de <i>Bacillus cereus</i> sur gélose nutritive.....	4
<b>Figure 3</b> : Représentation des cycles de vie de <i>B. cereus</i> (Mols et Abee, 2011).....	5
<b>Figure 4</b> :Structure de sous classe 1.1 (Abriouel <i>et al.</i> , 2011).....	9
<b>Figure 5</b> :Structure de sous classe 1.2 (Abriouel <i>et al.</i> , 2011).....	9
<b>Figure 6</b> : Structure de sous classe I.3 (Abriouel <i>et al.</i> , 2011).....	10
<b>Figure 7</b> : Structure de sous classe I.4 (Abriouel <i>et al.</i> , 2011).....	10
<b>Figure 8</b> : Souches test A : <i>B cereus</i> , B: <i>S aureus</i> , C : <i>S thyphemurium</i> , D: <i>E coli</i> , E: <i>B. subtilis</i> , F : <i>Candida albicans</i> .....	15
<b>Figure 9</b> : Coloration de Gram d'une souche étudiée (souche 3).....	21
<b>Figure 10</b> : Résultats de criblage primaire vis-à-vis <i>S. aureus</i> (SA), <i>B. cereus</i> (BC) et <i>B. subtilis</i> (BS) sur le TSA ; A : Souche 1, B: souche 3, C : Souche 5, D : Souche 10.....	25
<b>Figure 11</b> : Activité de souche 1 contre <i>S. aureus</i> (BN).....	26
<b>Figure 12</b> : Activité de souche 1 contre <i>B. cereus</i> (BN).....	27
<b>Figure 13</b> : Extraits organique de la souche 1. A : Peptidique ; B :Dichlo Or ; C :Dichloro Or ;D :Intra ; E : Dichloro Aq ; F : Dichloro Aq. ....	28
<b>Figure 14</b> : Résultats de la partie organique (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) (6) et peptidique(8) .....	29
<b>Figure15</b> : Résultats d'activité de la partie peptidique et intracellulaire (souche 1).....	29
<b>Figure 16</b> : Traitement par protéinase K .....	31
<b>Figure 17</b> : Effet de la température sur la partie peptidique.....	31
<b>Figure 18</b> : Séparation de la partie peptidique (à gauche) et l'extrait intracellulaire (à droite).....	32

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification de groupe <i>B. cereus</i> <i>S.l</i> .....	7
<b>Tableau 2</b> : Sites des prélèvements des souches étudiées .....	14
<b>Tableau 3</b> : Résultats de test catalase.....	21
<b>Tableau 4</b> : Résultats de coloration de Gram.....	21
<b>Tableau 5</b> : Résultats de MALDI-TOF.....	22
<b>Tableau 6</b> : Résultat de criblage primaire sur milieu solide TSA.....	24
<b>Tableau 7</b> : Résultats de criblage primaire sur le BN.....	25
<b>Tableau 8</b> : Résultats d'activité des extraits obtenus.....	30
<b>Tableau 9</b> : Effet de la température sur la partie peptidique.....	32

## Table des matières:

المخلص	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
<b>Introduction Générale</b> .....	1
<b>Partie 1 : Revue bibliographique</b> .....	2
<b>I. Diversité microbiennes de sol</b> .....	2
<b>II. Groupe <i>Bacillus cereus</i></b> .....	3
<b>II.1 Historique</b> .....	3
<b>II.2 Caractéristiques</b> .....	4
<b>II.2.1 Caractères morphologiques</b> .....	4
<b>II.2.2 Caractère biochimiques</b> .....	5
<b>II.3 Cycle de vie</b> .....	5
<b>II.4 Classification</b> .....	6
<b>III. Métabolites bioactives</b> .....	8
<b>III.1 Bactériocines</b> .....	9
<b>III.1 Classe I : Peptide modifié post-traductionnellement</b> .....	9
<b>III.1 Classe II : Peptide non modifié</b> .....	10
<b>III.1 Classe III : Protéine de masse moléculaire élevée</b> .....	11
<b>III.2 Substances inhibiteurs rassemblant aux bactériocines</b> .....	11
<b>III.3 Peptides bioactifs non ribosomiaux (Peptides NRPS)</b> .....	11
<b>III.4 Métabolites bioactives non peptidiques</b> .....	11
<b>IV. Méthodes de screening des métabolites secondaires</b> .....	12
<b>IV.1 Screening primaire</b> .....	12
<b>IV.1.1 Technique des cylindres d'agar</b> .....	12
<b>IV.1.2 Technique de diffusion des disques</b> .....	12
<b>IV.1.3 Technique des puits</b> .....	12
<b>IV.2 Screening secondaire</b> .....	12
<b>IV.2.1 Technique des disques en papier</b> .....	13
<b>IV.2.2 Technique des puits</b> .....	13
<b>IV.3 Caractérisation des composés bioactifs</b> .....	13

## **Partie 2 : Travail expérimental**

<b>Chapitre 1 : matériel et méthodes</b> .....	15
Objectif de travail .....	15
<b>I. Matériels</b> .....	15
<b>I.1 Matériels biologiques</b> .....	15
<b>I.1.1 Souches sporulées productrices</b> .....	15
<b>I.1.1.1 Site de prélèvement</b> .....	15
<b>I.1.1.2 Souches tests</b> .....	15
<b>I.2 Matériels non biologique</b> : .....	16
<b>I.2.1 Solvants d'extraction</b> .....	16
<b>I.2.2 Milieux de cultures</b> .....	16
<b>II. Méthodes</b> .....	17
<b>II.1 Tests de confirmation</b> .....	17
<b>II.1.1 Test catalase</b> .....	17
<b>II.1.2 Coloration de Gram</b> .....	17
<b>II.1.3 Test Bruker MALDI biotyper</b> .....	17
<b>II.2 Revivification des souches productrices</b> .....	17
<b>II.3 Criblage primaire : optimisation des paramètres de production</b> .....	18
<b>II.3.1 Technique de cylindre d'agar</b> .....	18
<b>II.3.2 Technique de diffusion des disques</b> .....	18
<b>II.4 Criblage secondaire</b> .....	19
<b>II.4.1 Partie extracellulaire</b> .....	19
<b>II.4.1.1 Peptidique</b> .....	19
<b>II.4.1.2 Non peptidique et d'autres molécules</b> .....	19
<b>II.4.2 Partie intracellulaire</b> .....	20
<b>II.5 Test d'induction</b> .....	20
<b>II.6 Traitement par protéinase K</b> .....	20
<b>II.7 Stabilité de la partie active vis-à-vis la température</b> .....	21
<b>II.8 Chromatographie sur couche mince</b> .....	21
<b>III. Analyse statistique</b> .....	21
<b>Chapitre 2 : Résultats et discussion</b> .....	22
<b>1. Résultats de confirmation des souches</b> .....	22
<b>1.1 Test catalase</b> .....	22
<b>1.2 Coloration de Gram</b> .....	22

1.3 Résultats de MALDI-TOF.....	23
2. Détermination de l'activité antimicrobienne (criblage primaire).....	23
2.1 Technique de cylindre d'agar.....	24
2.2 Technique de diffusion des disques.....	26
3. Criblage secondaire.....	28
3.1 Résultats d'extraction .....	28
3.2 Résultats d'activité des extraits obtenus.....	29
4. Test d'induction .....	31
5. Résultats du Traitement par la protéinase K.....	32
6. Résultats de changement de température .....	32
7. Résultats de la séparation par CCM.....	33
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	35
<b>Références bibliographiques</b> .....	36
<b>Annexes</b> .....	43

## **Introduction**

L'antibiothérapie est le moyen de défense contre les infections microbiennes mais dans ces dernières années la résistance vis-à-vis les antibiotiques a vécu une augmentation grâce à l'apparition des souches résistantes, d'où la nécessité de rechercher des nouvelles molécules antimicrobiennes afin de combattre ces microorganismes pathogènes, le premier pas pour cette découverte est le screening des microorganismes (bactéries et champignons) producteurs de composés inhibiteurs (**Imada et al., 2007**).

Les microorganismes sont capables de synthétiser différentes métabolites bioactives pour inhiber ou arrêter la croissance des autres espèces sélectivement (**Namita, 2016**). Ils sont de nature variée et diversifiée ; on distingue les antibiotiques, les bactériocines, les peptides NRPS (Non Ribosomal Peptides Synthetase) et autres (**Taale, 2016**).

Environ 75% d'antibiotiques médicaux commercialisés ont été obtenus à partir des bactéries isolées du sol (**Mellouli et al., 2003**), cette niche écologique est exploitée intensivement en raison de la biodiversité microbienne et la présence des producteurs de ces substances.

Parmi les habitats les plus abondants du sol les bactéries du genre *Bacillus* y compris le groupe *Bacillus cereus*, connu de sa capacité à sporuler. Les membres de ce genre sont considérés comme des bons producteurs de substances antimicrobiennes (**Abriouel et al., 2011**).

La présente étude a pour but de détecter l'activité antimicrobienne d'isolats sporulés à partir de sol rhizosphérique de la région de Naama.

Le mémoire est structuré en trois parties, une partie concernant la synthèse bibliographique, elle comporte une étude de la biodiversité du sol, ensuite une description du groupe *Bacillus cereus* et des informations sur les molécules bioactives et le screening. La deuxième partie comporte le travail expérimental, puis la troisième partie résultats obtenus et la discussion. Enfin la conclusion finale et les perspectives de ce travail.

## **I. Diversité microbiennes de sol :**

Le sol est l'un des principaux réservoirs de diversité biologique sur notre planète (**Swift et al ., 1998**) . Il héberge en effet une grande diversité d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) dont la plupart sont responsables de processus de biotransformation et de transfert des éléments ou des composés.

Cette diversité biologique est associée à une importante diversité fonctionnelle et à une grande complexité des interactions écologiques. Ainsi de nombreux processus se déroulent dans le sol sont assurés par des organismes très variés (bactéries, champignons, protozoaires, racines et faune).

Les microorganismes du sol sont nombreux et diversifiés, on estime environ 30000 bactéries, 1500000 champignons, 60000 algues et 10000 protozoaires, ils représentent une biomasse de 1% à 4% de la masse de carbone organique du sol et de 75 % à 90% de la biomasse vivante, cette proportion étant généralement plus grande pour les sols sous prairie que pour les sols cultivés (**Raoul, 2013**). Les organismes du sol affectent la productivité végétale, que ce soit de manière directe ou indirecte (modifications des cycles du carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites et pathogènes).

La distribution dans le temps et dans l'espace des processus biologiques n'est ni aléatoire, ni homogène. Les activités des organismes du sol sont concentrées dans des sites généralement associés à la disponibilité en substrats carbonés. C'est ainsi que les habitats microbiens sont associés aux fractions organiques, aux agrégats, à la litière en décomposition, au sol influencé par les vers de terre et au contact étroit des racines (rhizosphère) (**Lynch, 1990**).

De nombreux services écosystémiques sont produits par des processus et des interactions dans le sol (**Coleman et al., 2004**) . Parmi les services écologiques, sociaux et économiques identifiés, le sol est considéré comme un réservoir de biodiversité, il assure l'épuration des eaux de surface, le recyclage des éléments minéraux (fertilité du sol) et le stockage du carbone (comme puits de CO<sub>2</sub> atmosphérique) qui est lié aux changements climatiques et à la productivité des plantes (**Pimentel et al., 1997**)

Les communautés microbiennes telluriques sont considérées comme une «boîte noire» fonctionnelle dont l'intensité est en relation avec des facteurs abiotiques(**Gignoux et al.,2001**) tels que le pH qui est considéré parmi les facteurs qui influent sur la composition des communautés bactériennes et de la diversité, d'autres facteurs peuvent agir sur la structure des communautés comme la disponibilité des nutriments, la solubilité des métaux (**Muller et al., 2002**), le contenu en carbone (**Asuming et al ., 2008**) et en azote (**Fierer et al., 2007**), l'humidité des sols, la salinité (**Rajendhran et Gunasekaran, 2008**), les variations climatiques (**Lauber et al., 2009**) ,et la température(certains organismes étant plus thermophiles que d'autres (**Raoul, 2013**)).

En plus des facteurs abiotiques, la présence des plantes favorisent une augmentation de l'humidité du sol, de la biomasse et de la respiration microbienne (**Singh et al., 2009**), elle agit sur la croissance des communautés bactériennes des sols ,et influe sur les propriétés abiotiques du sol.

Dans le sol, les *Bacillus* représentent une grande fraction de la communauté microbienne et la majorité des bactéries Gram-positif de différents types de sols, partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Pseudomonas* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, ils présentent une diversité de capacités physiologiques qui leur permet de vivre dans une large variété d'habitats tels que l'eau de mer, les profondeurs de la mer, les sédiments (**Andrea et al., 2008, Garbeva et al., 2003**)

Certaines bactéries, sont capables de résister dans des conditions défavorables par la production des endospores. La sporulation est un processus qui conduit à la formation d'une forme de résistance caractérisée par une morphologie unique et remarquable, parmi ces bactéries on trouve le genre *Bacillus*, *Clostridium* (bâtonnets) ou *Sporosarcina* (coques). En 1876, Robert Koch et Ferdinand Cohn publient la première description morphologique des endospores de *B. anthracis* et *B. subtilis* (**Eichenberger, 2007**).

## **II. Groupe *Bacillus cereus* :**

### **II.1 Historique :**

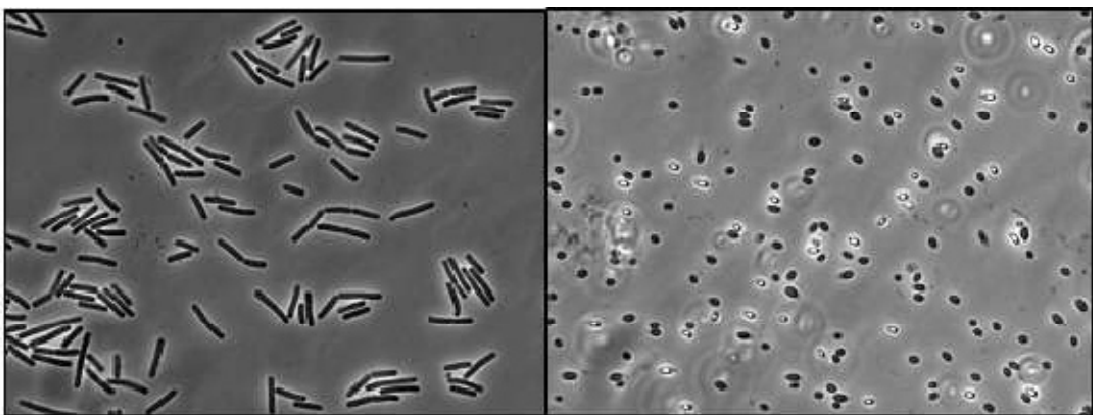
*Bacillus cereus* était isolée pour la première fois au Royaume Uni par **Frankland** en 1887 à partir de l'air d'une étable, cette souche est caractérisée comme souche type de *Bacillus cereus* et dénommée ATCC 14579 (**Stenfors and Granum, 2001**)

## II.2 Caractéristiques :

### II.2.1 Caractères morphologiques :

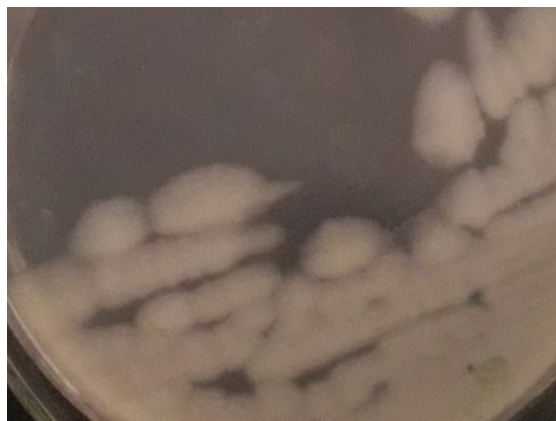
Les *Bacillus cereus sensu lato* sont des bactéries en forme bâtonnet, de type Gram-positif, sporulées, anaérobies facultatifs qui sont omniprésente dans les sols, les milieux marins, les légumes, tractus intestinal des invertébrés, et peau humaine (**Bottone, 2010**, **Arslan et al., 2014**)

Elles possèdent des capacités physiologiques qui les permettent de survivre dans une large gamme d'habitats extrêmes. Elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérantes ou halophiles (**Awais et al., 2007**).



**Figure 1** : Les différentes formes de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) : cellules végétatives à gauche et spores dormantes (corps réfringent) ou spores en germination (corps opaque) à droite sous microscopie optique (**Laouami , 2012**)

Les colonies cultivées sur gélose ont une apparence très variable et facilement reconnaissable: Elles sont caractéristiquement large (2–7 mm de diamètre) avec une forme qui varie de circulaire à irrégulière, entières à ondulées, crénelées ou des bords fimbriés; elles sont généralement mat ou granulaire (**Stenfors and Granum, 2001**).



**Figure 2** : Colonies de *Bacillus cereus* sur gélose nutritive.

Sont généralement blanchâtres à crème, mais certaines souches peuvent produire un pigment brun rosé ou un pigment fluorescent vert jaunâtre.

Température minimale pour la croissance est habituellement de 10 à 20 ° C et le maximum de 40 à 45 ° C, avec l'optimum environ 37 ° C. De plus en plus de souches psychrotolérantes à 6 ° C ont été isolés (Stenfors and Granum, 2001)

## II.2.2 Caractère biochimiques

- ✓ Catalase positive, oxydase négative.
- ✓ La réaction du jaune d'oeuf est positive.
- ✓ Voges – Proskauer-positif.
- ✓ Le citrate est utilisé comme source de carbone.
- ✓ Le nitrate est réduit par la plupart des souches.
- ✓ Résistant au lysozyme. (Stenfors et Granum, 2001)

## II.3 Cycle de vie

*Bacillus cereus* peuvent coloniser divers réservoirs, on peut les trouver dans le sol sous forme symbiotique ou phatogène sous forme des spores ensuite elles entament le processus de multiplication et de germination (Margulis et al., 1998, Jensen et al., 2003) en plus *B. cereus* est capable de germer, de se multiplier et par la suite de sporuler dans le sol présentant un mode saprophyte (Vilain et al., 2006).

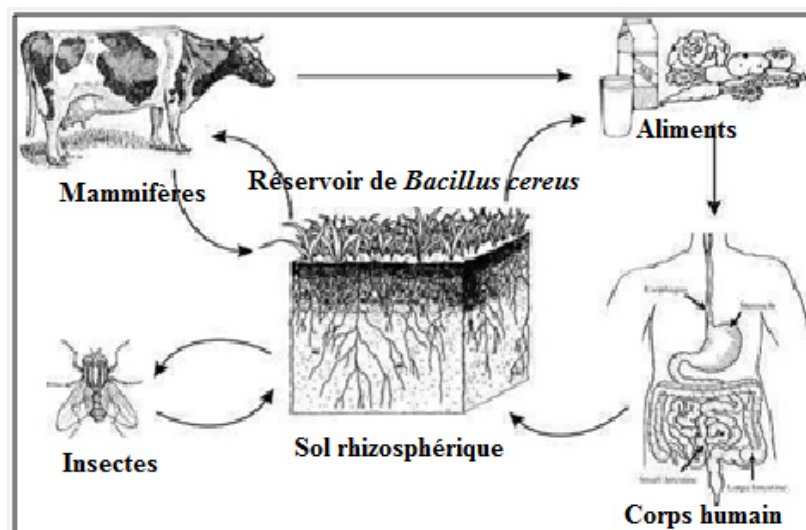


Figure 3 : Représentation de cycle de vie de *B. cereus* (Mols et Abee, 2011)

## II.4 Classification :

*Bacillus cereus s.l* est un groupe bactérien diversifié sur le plan écologique qui comprend un nombre important d'espèces. On trouve *B.anthraxis* qui est responsable de l'anthrax, *B.cereus s.s* qui est capable de provoquer une intoxication alimentaire et *B.thuringiensis* (utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles) sont les plus bien connues. Les autres espèces présentent des rhizoïdes (*B.mycoïdes* et *B.pseudomycoïdes* (**Nakamura, 1998**)), une thermotolérance et une cytotoxicité (*B.cytotoxicus* (**Guinebretière et al., 2013**)), une psychrotolérance et une aptitude à altérer les aliments (*B.weihenstephanensis* (**Lechner et al., 1998**) et *B.wiedmannii*(**Miller et al., 2016**) ) et leur utilité en tant que probiotique dans l'alimentation animale (*B.toyonensis* (**Jiménez, 2013**)). En plus, plusieurs nouvelles espèces ont également été décrites récemment (*B. bingmayongensis* (**Liu et al., 2014**), *B.gaemokensis* (**Jung et al., 2010**) et *B. manliponensis* (**Jung et al., 2011**)).

Afin de comprendre la diversité fantastique de *B. cereus s. l* et sa capacité concomitante à occuper diverses niches environnementales et à présenter divers phénotypes, il est essentiel de caractériser avec précision la diversité génomique au sein du groupe et de générer de solides hypothèses phylogénétiques sur les relations évolutives entre les membres du groupe. Dans ce contexte Monsieur **Bazinet (2017)** a utilisé 498 génomes de *Bacillus cereus s. l* publiés pour rétablir le pan-génomes et la phylogénie de ce groupe, ces résultats étaient comparés avec les systèmes de classification de sept groupe et trois clade. Cette étude suggère répartition en neuf clusters.

**Tableau 1 :** Classification de groupe *B cereus s. l* (Bazin, 2017) avec modifications.

Clade	Groupe	Cluster	Taxon	
1	III	9	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. thurgiensis</i>	
		7	<i>B. cereus</i> <i>B. thurgiensis</i>	
		3	<i>B. cereus</i> <i>B. thurgiensis</i>	
	II		<i>B. wiedmanii</i> <i>B. cereus</i>	
		2	<i>B. thurgiensis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. weihenstephanensis</i>	
		4	<i>B. cereus</i> <i>B. thurgiensis</i> <i>B. toyonensis</i>	
3	V	3	<i>B. cereus</i>	
		2	<i>B. mycoides</i> <i>B. cereus</i> <i>B. weihenstephanensis</i>	
1	I	1	<i>B. mycoides</i> <i>B. thurgiensis</i> <i>B. pseudomycoides</i> <i>B. cereus</i> <i>B. bingmayongensis</i> <i>B. gaemokensis</i>	
		VII	6	<i>B. cytotoxicus</i>
			5	<i>B. manliponensis</i>

### III. Métabolites bioactives

Les métabolites bioactives sont des substances antibactériennes naturelles d'origine biologique élaborées par les bactéries. Ces molécules bioactives sont variées et diversifiées ; on distingue les bactériocines, les peptides NRPS (Non Ribosomal Peptides Synthetase), les antibiotiques et autres. Les molécules bioactives diffèrent les unes des autres sur leur mode de synthèse et leur spectre d'activité (**Taale, 2016**).

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont considérées comme une source importante de métabolites bioactives, caractérisés par une structure chimique diverse (**Stein, 2005**), ils sont dirigés contre les microorganismes compétitifs, donnant un avantage à leur producteurs dans leurs environnement (**Abriouel et al., 2011**), et intervenant dans le phénomène d'antibiose (**Cherif, 2014**).

Le genre *Bacillus* produit des substances antimicrobiennes dont la plupart sont de nature peptidique telles que la bacitracine, la gramicidine, la subtiline, etc... (**Fariha et al., 2009**) ; La majorité de ces substances agissent sur les bactéries à Gram- positif, cependant la polymyxine, la colistine et la ciarculine réagissent contre les bactéries à Gram -négatif et la bacillomycine, la mycobacilline, et la fungistatine agissent sur les champignons et les levures (**Syed et al., 2009**).

Près de 167 substances antimicrobiennes sont produites par le genre *Bacillus* dont 66 sont isolées de *Bacillus subtilis*, 23 à partir de *Bacillus brevis* et le reste à partir des autres espèces.

Les principaux antibiotiques produits par des espèces de ce genre sont : la polymyxine, la difficidine, la subtiline, la mycobacilline, la bacitracine par *B. subtilis* ; la gramicidine et la tyrothricine par *B. brevis* ; la cerexine et la zwittermicine par *B. cereus* ; la circuline par *B. circulans* ; la laterosporine par *B. laterosporus* ; la bacitracine par *B. licheniformis* ; la polymyxine et la colistine par *B. polymyxa* ; et la pumuline par *B. pumilus* (**Awais et al., 2010**).

Selon la voie de synthèse, les substances bioactives produites par le genre *Bacillus* sont soit des peptides ribosomaux produits durant la phase active de la croissance ou non ribosomaux produits après la cessation de la croissance bactérienne (**Tamehiro et al., 2002**).

### III.1 Bactériocines

Une classification des bactériocines produites par le genre *Bacillus* a été proposée par **Abriouel *et al* en 2011**, en se basant sur la classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques, ils sont divisés en trois grandes classes :

#### III.1 Classe I : Peptide modifié post-traductionnellement

Regroupe les peptides ayant subis les différents types de modifications post-traductionnelles. Cette classe est subdivisée en quatre sous-classes, dont les trois premiers sont caractérisés par une modification typique de Lanthibiotique (Ex : formation de lanthionine).

**III.1.1 Sous classe I.1 :** Ressemble à la lanthibiotique A, peptide de structure linéaire cationique, formant des pores.

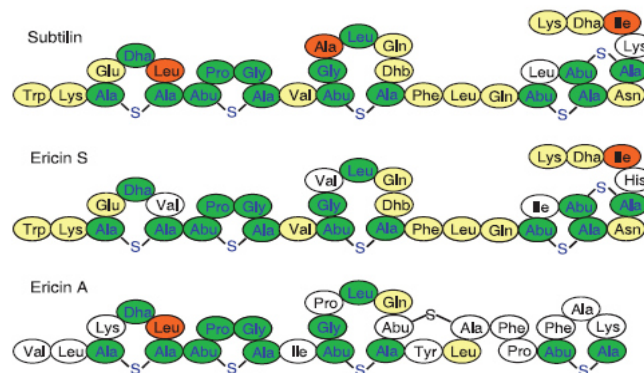


Figure 4 : Structure de sous classe 1.1 (Abriouel *et al.*, 2011)

**III.1.2 Sous classe I.2 :** Ressemble à la lanthibiotique B, peptide de structure globulaire, non cationique, qui inhibe les enzymes.

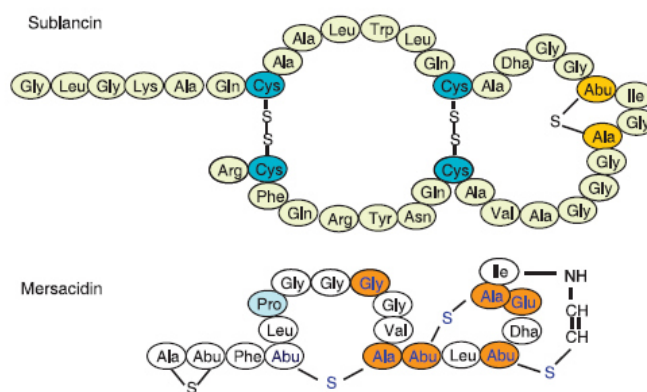


Figure 5 : Structure de sous classe 1.2 (Abriouel *et al.*, 2011)



**III.2.1 Sous classe II.1 :** Peptide rassemblant à la pediocine ; caractérisé par un motif conservé d'acides aminés YGNGVXC à leur partie N-terminale.

**III.2.2 Sous classe II.2 :** Peptide rassemblant à la thuricine ; porte un motif DWTXWSXL à leur partie N-terminale.

**III.2.3 Sous classe II.3 :** Autre peptide linéaire ; ces peptides ont été classés appart, car leurs séquence d'acide aminé ne porte aucune similarité ni entre eux, ni avec les autre sous-classes.

### **III.1 Classe III : Protéine de masse moléculaire élevée**

Englobe les protéines de masse moléculaire supérieure à 30kDa, ils sont caractérisés aussi par une activité phospholipase.

### **III.2 Substances inhibiteurs ressemblant aux bactériocines(BLIS)**

Englobe les peptides et les protéines ayant une activité antimicrobienne qui sont mal caractérisée au niveau génétique, et au niveau de leurs séquence d'acides aminés (**Abriouel et al., 2011 , Barruzi et al ., 2011**).

### **III.3 Peptides bioactifs non ribosomaux (Peptides NRPS)**

Leur synthèse se fait par des grands complexes multienzymatiques NRPS (Non-ribosomal peptide synthetase) organisés en modules. Cette organisation leur permet de produire des peptides par voie non-ribosomale (**Taale, 2016**). Ces enzymes sont organisés en opérons, induits en réponse au stress nutritionnel. Les peptides NRPS peuvent être regroupés en trois familles surfactine, iturine et fengycine (**Tapi et al., 2010**). Qui sont des lipopeptides avec une chaîne d'acide gras lipophile, et un noyau peptidique hydrophile. La surfactine et l'iturine sont des composés lipopeptides cycliques (**Hamdache et al., 2013**).

### **III.4 Métabolites bioactives non peptidiques**

Les *Bacillus* produisent aussi des antibiotiques non peptidiques de structures chimiques variées. Plusieurs souches produisent l'amicoumacine, une classe de composé responsable de l'effet antagoniste contre *S. aureus* et *Helicobacter pylori*. D'autres antibiotiques sont

représentés par les macrolactines ayant un effet antiviral, et une activité antimicrobienne contre *S. aureus* (**Baruzzi et al., 2011**).

#### **IV. Méthodes de screening des métabolites secondaires**

La préparation des extraits biologiques nécessite l'optimisation des conditions de croissance, les méthodes d'extraction et les protocoles de la purification (**Higgs et al., 2001**).

La technique de criblage dépend de microorganisme producteur, le germe cible et la méthode utilisée pour une meilleur production d'échantillons biologique.

##### **IV.1 Screening primaire**

Le screening primaire permet de détecter *in vitro* et sur milieu gélosé l'effet antagoniste des microorganismes sélectionnés vis-à-vis des germes tests, il est rapide, sensible et raisonnable. Il peut être réalisé par plusieurs techniques (**Nas, 2013**)

###### **IV.1.1 Technique des cylindres d'agar:**

Elle consiste à prélever des cylindres d'agar à partir de la culture du microorganisme d'intérêt et les placer sur milieu géloséensemencé par le microorganisme test. L'observation d'une zone d'inhibition autour les cylindres indique la production des substances responsable de l'effet inhibiteur (**Eccleston et al., 2008**).

###### **IV.1.2 Technique de diffusion des disques**

Son principe est de déposer un volume de surnagent d'une culture bactérienne sur des disques de papier wattman (**Khanna et al., 2011**) ensuite les placer sur un milieu géloséensemencé préalablement par la souche test.

###### **IV.1.3 Technique des puits**

Elle consiste à former des puits de 6 mm de diamètre sur un milieu géloséensemencé par la souche test puis les remplir avec un volume de surnagent d'une culture bactérienne productrice (**Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008**).

##### **IV.2 Screening secondaire**

Etape qui suit le screening primaire, les microorganismes qui ont donnés une activité inhibitrice sont retenus pour récupérer les substances bioactives à partir d'une culture liquide de germe producteur. Le filtrat ou le surnageant peuvent être analyser directement ou après extraction, par des solvants organiques par plusieurs techniques (**Khanna et al., 2011**).

#### **IV.2.1 Technique des disques en papier :**

Elle consiste à déposer Sur un milieu gélosé préalablement ensemencé par le germe test des disques stériles en papier filtre imbibés par un volume définie de l'extrait organique du germe sélectionné (Nas ,2013).

#### **IV.2.2 Technique des puits**

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

#### **IV.3 Caractérisation des composés bioactifs**

Plusieurs techniques ont été utilisées pour isoler et purifier une biomolécule parmi elles la centrifugation, la filtration, l'extraction par des solvants, la chromatographie sur couche mince (CCM), l'électrophorèse et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Nas ,2013).

**But de travail :**

L'objectif majeur de notre travail est la détermination de l'activité antimicrobienne des souches sporulées isolées de la région de Naama vis-à-vis des souches tests (pathogènes) ensuite l'extraction des molécules bioactives et la détection de la fraction responsable de l'activité.

**I. Matériel**

**I.1 Matériel biologiques**

**I.1.1 Souches sporulées productrices**

Les souches étudiées ont été isolées à partir du sol rhizosphérique de quatre régions différentes :Abdelmoula, Mekmen Ben Amar, Mécheria, Ain sefra lors des travaux menés par Mme **Bouali en 2017**.

**I.1.1.1 Site de prélèvement**

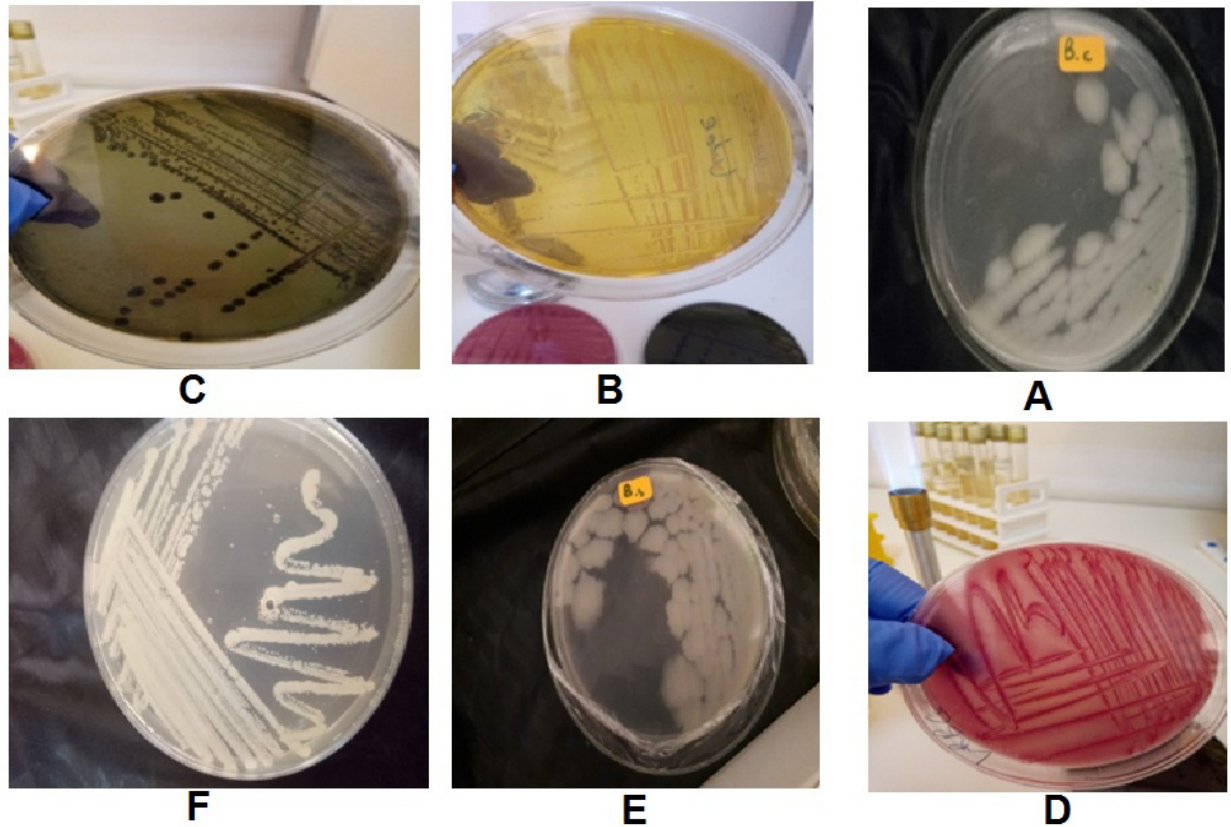
**Tableau 2 :** Sites des prélèvements des souches productrices étudiées (**Bouali, 2017**)

<b>Souche</b>	<b>Origine</b>
<b>1</b>	<b>Mekmen Ben Amar</b>
<b>2</b>	<b>Ain Sefra</b>
<b>3</b>	<b>Ain Sefra</b>
<b>5</b>	<b>Abdelmoula</b>
<b>6</b>	<b>Ain Sefra</b>
<b>9</b>	<b>Mecheria</b>
<b>10</b>	<b>Ain Sefra</b>

**I.1.2 Souches tests**

Les activités antibactériennes ont été testées contre cinq bactéries: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Typhemurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 .

L'activité antifongique est testée contre *Candida Albicans* ATCC 26760.



**Figure 8:** Souches test A: *B. cereus* ATCC 11778, B: *S. aureus* ATCC 6538, C: *S. typhimurium* ATCC 14028, D: *E. coli* ATCC 25922, E: *B. subtilis* ATCC 6633, F: *C. albicans* ATCC 26760.

## I.2 Matériel non biologique :

### I.2.1 Milieux de cultures

Pour assurer la croissance des souches productrices et tests on a utilisé le Bouillon Nutritive (BN), Gélose Nutritive(GN), Trypto caseine Soja Agar (TSA) et la gélose Sabouraud.

Pour tester l'activité antimicrobienne on a utilisé le Mueller Hinton (MH).

### I.2.2 Solvants d'extraction

Les deux solvants organiques le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle en plus d'acétone sont utilisés à l'étape d'extraction de molécule bioactive.

## **II. Méthodes**

### **II.1 Tests de confirmation :**

Les souches étudiées appartiennent au groupe *Bacillus cereus* s.l ont été confirmées par le test catalase, la coloration de Gram et le test Bruker MALDI biotyper.

#### **II.1.1 Test catalase :**

Il s'agit de la recherche de l'enzyme responsable de l'élimination de peroxyde d'hydrogène, son principe est d'ajouter une colonie à une goutte d'eau oxygénée, si l'enzyme est présent, des bulles gazeuses sont dégagées (**Health Protection Agency, 2011b**).

#### **II.1.2 Coloration de Gram :**

Observation d'un frottis fixé pour déterminer le type de paroi, la forme de cellule et le mode de regroupement.

#### **II.1.3 Test Bruker MALDI biotyper :**

Cette technique est réalisée en laboratoire turque (Department of Genetic and Bioengineering, Faculty of Engineering and Architecture, Yeditepe University, Istanbul, Turkey).

La technologie MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight) en microbiologie peut identifier les microorganismes jusqu'au niveau de l'espèce. Son principe est l'ionisation des protéines bactériennes par un rayon laser et la formation des spectres.

A partir d'une base de données de spectres, le logiciel associe recherche la correspondance à l'espèce de la bactérie selon un indice de fiabilité entre les deux spectres. Le MALDI-TOF ne donne pas des informations sur le sérotype et la pathogénicité de l'espèce. (**Marie et al., 2013**)

## **II.2 Revivification des souches productrices**

Les souches productrices conservées sous forme sporulées selon la technique de **Mazas et al (1995)**, ont été revifiées sur le milieu gélose nutritive (GN) et le milieu d'enrichissement Trypto casein Soy Agar (TSA) par ensemencement en stries puis incubé pendant 24h à 30°C.

## **II.3 Criblage primaire : optimisation des paramètres de production**

Un criblage primaire a été réalisé afin de révéler l'activité antimicrobienne des souches productrices. Cette activité a été testée par deux techniques : de cylindres d'agar et de diffusion des disques

### **II.3.1 Technique de cylindre d'agar**

Une suspension bactérienne des souches productrices de 0.5 McFarland standardisée dans l'eau physiologique estensemencée par écouvillonnage sur le milieu TSA puis incubée à 30 °C pendant différentes périodes 24 h, 48 h et 72h. Après l'incubation des cylindres d'agar (**Eccleston et al., 2008**) de 6 mm de diamètre ont été prélevés à partir de chaque boîte à l'aide de l'extrémité plate d'une pipette Pasteur stérile puis les déposés sur la gélose Muller Hintonensemencée par écouvillonnage par les bactéries tests standardisées à 0.5 McFarland dans l'eau physiologique puis incubées à 37 °C pendant 24h (**CLSI, 2010**).

### **II.3.2 Technique de diffusion des disques**

Une suspension bactérienne productrice estensemencée dans un BN puis incubée à différents temps 24 h, 48 h et 72h à 30° C. Les tubes ont été centrifugés 30 minutes à 4000 t/m pour avoir un surnageant libre de cellules bactériennes. 5ul de surnageant à été déposé sur des disques de papier Wattman (**Khanna et al., 2011**) stériles de 6mm de diamètre ensuite les disques ont été déposés sur les boîtes de Pétri contenant une gélose Muller-Hinton préalablementensemencée par les bactéries tests. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés par suite (**Hosny et al., 2011**).

La levure *C. albicans* ATCC 26760 a été utilisée. L'inoculum de la levure avait une densité optique entre 0.12-0.15 à une longueur d'onde de 530 nm. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur gélose Sabouraud. Les deux techniques des cylindres d'agar et de diffusion des disques ont été réalisées de la même façon que celle décrite pour les bactéries, puis incubées à 30 °C pendant 24h.

## **II.4 Criblage secondaire**

Une pré-culture a été réalisée en inoculant 60 ml du bouillon nutritif avec une culture bactérienne productrice pendant 24 heures à 30°C, ensuite ce volume a été transféré dans 240 ml du milieu de production et incubé à 30°C durant 48 heures (temps optimale pour la production). Une centrifugation a été réalisée (4000 t/m pendant 30 minutes) (**Bhatta et kapadnis, 2010**) avec quelques modifications.

Le surnageant obtenu est divisée en 2 pour l'extraction de la partie extracellulaire peptidique et la partie extracellulaire non peptidique (et d'autres molécules), le culot obtenu est utilisé pour l'extraction de la partie intracellulaire.

### **II.4.1 Partie extracellulaire**

#### **II.4.1.1 Peptidique :**

150 ml de surnageant bactérien (II.4) a été mélangé avec un double volume d'acétone froid puis congelé, après une nuit le mélange est centrifugé à 4000 t/m pendant 30 minutes pour récupérer le culot. Une fois séché à 45°C, le culot a été repris dans l'eau distillé stérile (8,5mg /ml) (**Ewelina et al., 2010**).

L'activité antimicrobienne des composés peptidiques précipités par l'acétone vis-à-vis des souches sensible a été testée par la méthode des puits (**Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008**), 20µl de la solution a été déposé dans des puits de 6mm de diamètre sur gélose Mueller-Hinton les bactéries test dont l'inoculum était préparé de la même façon que celui de l'antibiogramme réalisé par la technique du **CLSI en 2010**.

#### **II.4.1.2 Non peptidique et d'autres molécules**

150 ml de surnageant bactérien (II.4) a été mélangé avec l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane séparément avec une ration de 1:1(v/v). Après deux heures de décantation à température ambiante, les solutions organiques ont été séparées, une deuxième et une troisième extraction avec les mêmes solvants a été faite. L'ensemble des trois phases organiques (non peptidique) ont été évaporés à sec sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait sec a été ensuite repris avec un mélange de l'eau distillée stérile et l'isopropanol (v/v). La partie aqueuse (D'autres molécules) est séchée à une température de 45° C puis racler et récupérer dans un eppendorf ensuite repris avec 1 ml d'eau distillée.

L'activité antimicrobienne de ces composés a été réalisée dans les mêmes conditions que citées dans la section précédente.

#### **II.4.2 Partie intracellulaire**

1 ml d'acétone est ajouté au culot contenu dans les tubes et placés dans l'ultrason pour la destruction des cellules à une température de 45°C pendant 40 minutes ensuite centrifugés à 4000 t/m pendant 30minites, le surnagent obtenu est sécher à 45°C (**Ewelina et al., 2010**).

#### **II.5 Test d'induction**

La souche productrice de 24h a été inoculée avec une culture de 24 heures de la souche test pendant 48h à une température de 30°C. Les extractions des différentes parties intracellulaires et extracellulaires ont été réalisées avec les mêmes conditions citées dans les sections précédentes. L'objectif de ce test est de comparer le taux de production antimicrobienne par la souche productrice lorsqu'elle se trouve en contact avec d'autres espèces bactériennes. (**Aissaoui , 2019**).

L'activité antimicrobienne de ces composés a été réalisée dans les mêmes conditions que citées dans la section précédente

#### **II .6 Traitement par protéinase K**

(Cette technique est réalisée dans le même laboratoire en turque, Yeditepe University).

La protéinase K est une sérine protéase qui présente une très grande spécificité de clivage. Il coupe les liaisons peptidiques adjacentes au groupe carboxylique des acides aminés aliphatiques et aromatiques, et utile pour la digestion générale des protéines dans des échantillons biologiques (**Petrotchenko et al., 2012**)

Un mg de protéinase K est mélangé avec 1 ml de surnagaent bactérien, le mélange est incubé à 37° C pendant une heure, ensuite l'enzyme est désactivé par incubation à 100° C pendant 3 minutes. Un volume de 150 µl est déposé dans les puits dans un milieu gélosé ensemencé par la souche test. L'absence d'une zone autour des puits indique que la nature des métabolites est peptidique.

### **II.7 Stabilité de la partie active vis-à-vis la température :**

L'effet de la température sur la partie active a été réalisé selon la méthode de **Chalasanani *et al.*, 2015** avec certaines modifications. La solution de la fraction peptidique (3,62mg /ml) a été chauffée pendant 30 min à 55, 65, 75, 85 et 95 °C puis testé vis-à-vis les souches sensibles.

### **II.8 Chromatographie sur couche mince :**

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique qui repose sur le phénomène d'adsorption ; la migration d'échantillons biologique à une vitesse qui dépend de la nature de substance et du solvant. Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leurs séparation est relativement facile sur la plaque, si ne sont par visible nous devons utiliser UV ou des révélateurs chimiques (**Hainque *et al.*, 2008**).

5µl de solution peptidique et intracellulaire (solution aqueuse 8,5 mg/ml) a été déposée sur une plaque à gel de silice de 3cm X 8 cm, séparée par un mélange méthanol : eau : chloroforme (2.5 :5 :1.25 v/v) puis révélée par la ninhydrine (0,2 g dissout dans 100 ml d'éthanol) (**Bhatta et Kapadnis, 2010**).

### **III. Analyse statistique :**

L'analyse statistique a été effectuée par le logiciel GenStat. Le seuil de signification est de 5%.

## 1. Résultats de confirmation des souches

Les souches bactériennes étudiées sont de groupe *Bacillus cereus*, catalase positif et Gram positif

### 1.1 Test catalase

Tableau 3: Résultats de test catalase

Souche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 1.2 Coloration de Gram

Tableau 4 : Résultats de coloration de Gram

Souche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

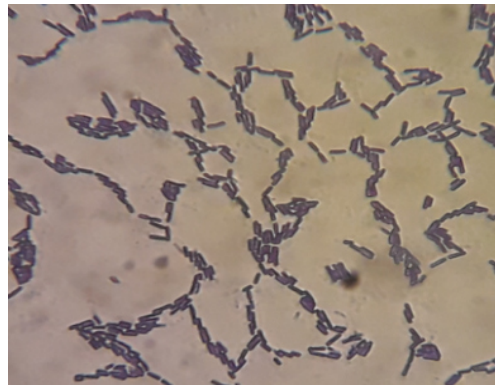


Figure 9 : Coloration de Gram d'une souche étudiée (3).

1.3 Résultats de MALDI-TOF

Tableau 5: Résultats de MALDI-TOF

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
D1 (+++)(A)	1 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.13	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.09
D2 (+)(B)	2 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.81	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.79
D3 (+++)(A)	3 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.40	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.29
D4 (+++)(A)	4 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.34	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.26
D5 (+)(B)	5 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.93	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.85
D6 (+++)(A)	6 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.27	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.25
D7 (+)(B)	7 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.84	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.80
D8 (+)(B)	8 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.83	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1.81
D9 (-)(C)	9 (standard)	no peaks found	0.00	no peaks found	0.00
D10 (+++)(A)	10 (standard)	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.23	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.16

Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycoides, thuringiensis and weihenstephanensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.

## **1. Détermination de l'activité antimicrobienne (criblage primaire)**

Le criblage est une technique de recherche des nouvelles molécules bioactives. Les progrès technologiques et les nouvelles méthodes de dépistage devraient permettre la détection de composés précédemment non identifiés (**Kurtböke, 2012**). Les métabolites secondaires microbiens peuvent être des sources potentielles de nouvelles molécules pour l'industrie pharmaceutique (**Newman et Cragg, 2012, Nguyen et Kim, 2015**).

L'activité antimicrobienne des souches sporulées a été détectée selon deux techniques : la technique de cylindre d'agar et la technique de diffusion des disques.

D'après les résultats de criblage primaire les quatre souches sporulées 1,3 ,5 et 10 ont donné une activité vis-à-vis deux souches à Gram-positif *S. aureus* et *B. cereus* par la technique de diffusion des disques et trois souches à Gram-positif *S. aureus*, *B. cereus* et *B. subtilis* par la technique des cylindres.

### **2.1 Technique des cylindres d'agar**

Le test sur le milieu solide (TSA) a été réalisé par la technique de cylindre d'agar, cette technique est largement utilisée pour réaliser un screening primaire des effets inhibiteurs de plusieurs germes (**Tabbene et al., 2010, Khanna et al., 2011**), elle nous a permis de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur des souches étudiées après trois temps d'incubation, envers certains germes test utilisés.

Tableau 6: Résultat de criblage primaire sur un milieu solide TSA.

Souches test	Souches productrices	1		2		3		5		6		9		10	
	Temps	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
<i>S. typhemurium</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>		11	11.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>				-	-	-	-	10	10.5	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>		10	11.5	-	-	8.5	9	8.5	9	-	-	-	-	7	7
<i>C. albicans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Remarque : chaque valeur est la moyenne de deux répétitions.

Le test d'activité antimicrobienne dans le milieu solide TSA révèle que la **souche 1** possède le spectre d'activité le plus intéressant parmi les isolats testés par l'inhibition de deux bactéries Gram-positif incluant *S. aureus* et *Bacillus cereus*, suivi de **souche 5** qui a inhibé deux souches tests appartenant à la même niche écologique, alors que les **souches 3** et **10** possèdent l'activité la plus étroite par l'inhibition de *B. cereus* uniquement.

Les autres souches productrices (2, 6 et 9) appartenant au même groupe n'ont aucune activité antimicrobienne contre les souches test utilisées dans notre travail. Cette différence entre l'activité antimicrobienne des souches productrices étudiées est peut être liée à la diversité écologique représentée par les différents sites de prélèvement (Bouali, 2017), dont l'adaptation à la variation des conditions physico-chimiques, et les pathogènes cohabitant la même niche écologique peut affecter la production de métabolites bioactives par la corrélation des gènes particuliers cités par Hamdache *et al*, 2013.

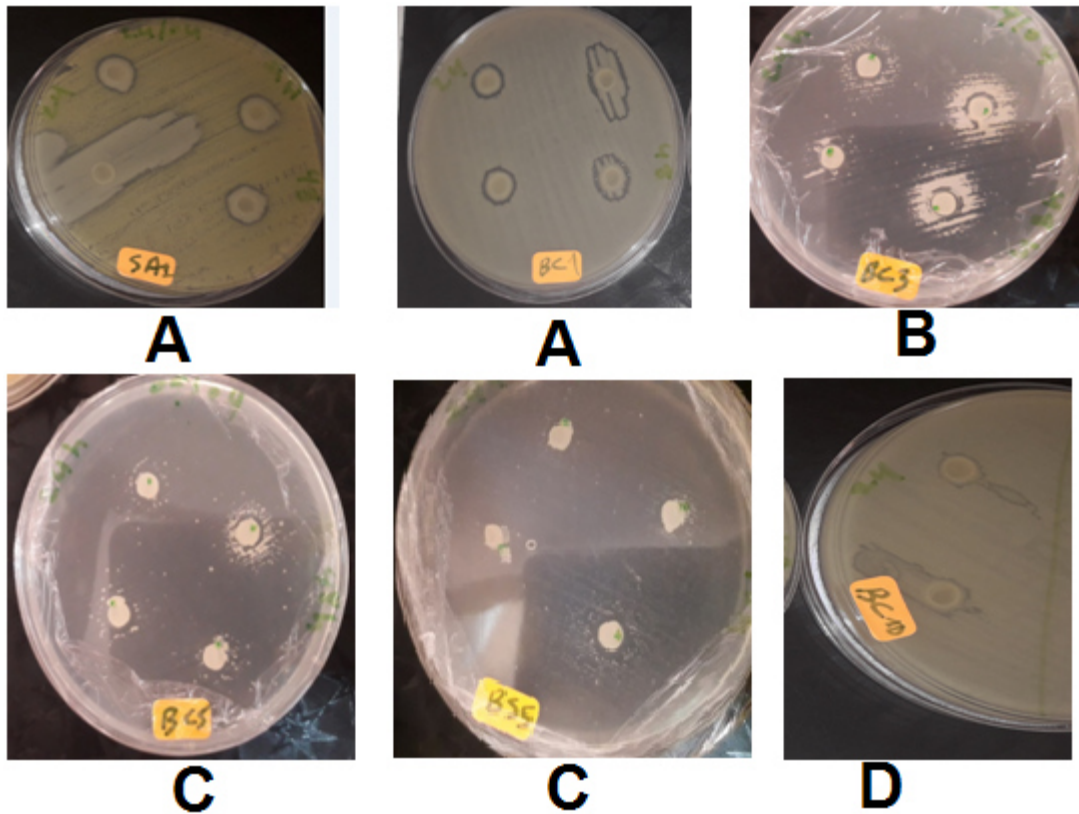


Figure 10 : Résultats de criblage primaire vis-à-vis *S. aureus* (SA), *B. cereus* (BC) et *B. subtilis* (BS) sur le TSA ; A : Souche 1, B : souche 3, C : Souche 5, D : Souche 10 .

## 2.2 Technique de diffusion des disques

Tableau 7 : Résultats de criblage primaire sur le BN

Souches tests	Souche productrice	1		
		Temps	24	48
<i>S. typhemurium</i>		-	-	-
<i>S. aureus</i>		15.66	19.33	16.33
<i>E. coli</i>		-	-	-
<i>B. subtilis</i>		-	-	-
<i>B. cereus</i>		10	9	10
<i>C. albicans</i>		-	-	-

Remarque : chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

La souche 1 isolée de Mekmen Ben Amar a donné une activité vis-à-vis deux souches à Gram- positif *S. aureus* et *B. cereus*, l'inhibition maximale de *S. aureus* est de 19,33 observée après 48h (LSD= 1.148). La *P* valeur du facteur temps est de 0.65.

L'inhibition de *B. cereus* n'a pas varié avec le temps, c'est peut être due à la faible sensibilité de la souche test aux substances produites par la souche 1, c'est-à-dire une variation de concentration ne montre aucune différence. Contrairement aux bactéries à Gram-positif, aucune activité n'a été observée contre les bactéries à Gram- négatif .Des études réalisées par **Morikawa et al, 1992** , **Eltem et Ucar 1998** indiquent que les métabolites produites par les espèces du genre *Bacillus* sont plus efficaces contres les bactéries à Gram-positif que les bactéries à Gram-négatif et les champignons.

La souche 1 n'a pas pu inhiber *E. coli*, *S. typhemurium* , *B. subtilis* et la levure *C. albicans*. Ce résultat négatif peut être probablement dû à la résistance de ces dernières aux substances produites par la souche 1, ou bien à l'absence de récepteurs spécifiques aux substances bioactives produites par cette souche. Une autre hypothèse possible est que la quantité de ces substances synthétisées par notre isolat n'est pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, à savoir la concentration minimale inhibitrice de chaque microorganisme test utilisé.

D'un autre point de vue, les microorganismes tests peuvent produire des substances inhibitrices de l'action des molécules antimicrobiennes de la souche 1 même si sont produites en quantité suffisante. Il est important de signaler qu'une production importante des composés antimicrobiens par certaines espèces microbiennes est associée à un rôle écologique en jouant une action défensive au sein d'une communauté microbienne établie (**El-Banna, 2015**).

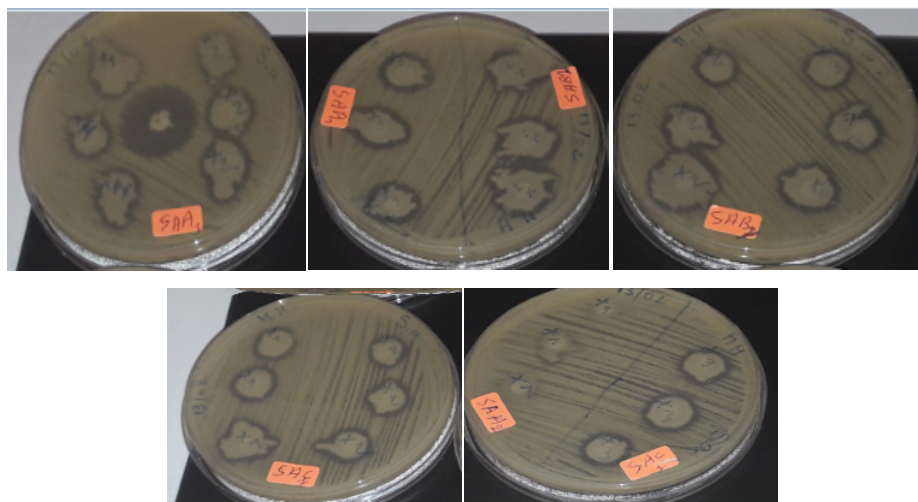
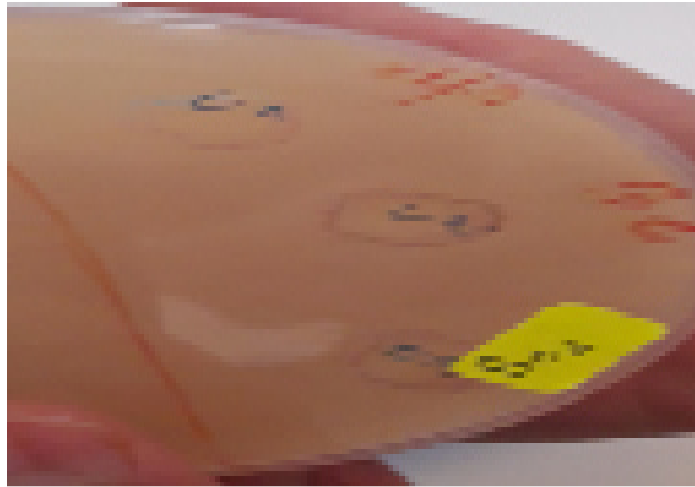


Figure 11 : Activité de la souche 1 contre *S. aureus* (BN) .



**Figure 12 :** Activité de la souche 1 contre *B. cereus* (BN) .

Les résultats montrent que les diamètres d'inhibition dans les deux milieux BN et TSA varie entre (13,50) à (11) respectivement. Cette différence entre les milieux montre que le milieu liquide BN possède plus d'activité que le milieu solide TSA.

La production microbienne de métabolites secondaires, particulièrement les composés antimicrobiens qui sont en relation avec le métabolisme primaire de la souche productrice ; il serve de précurseur pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs.

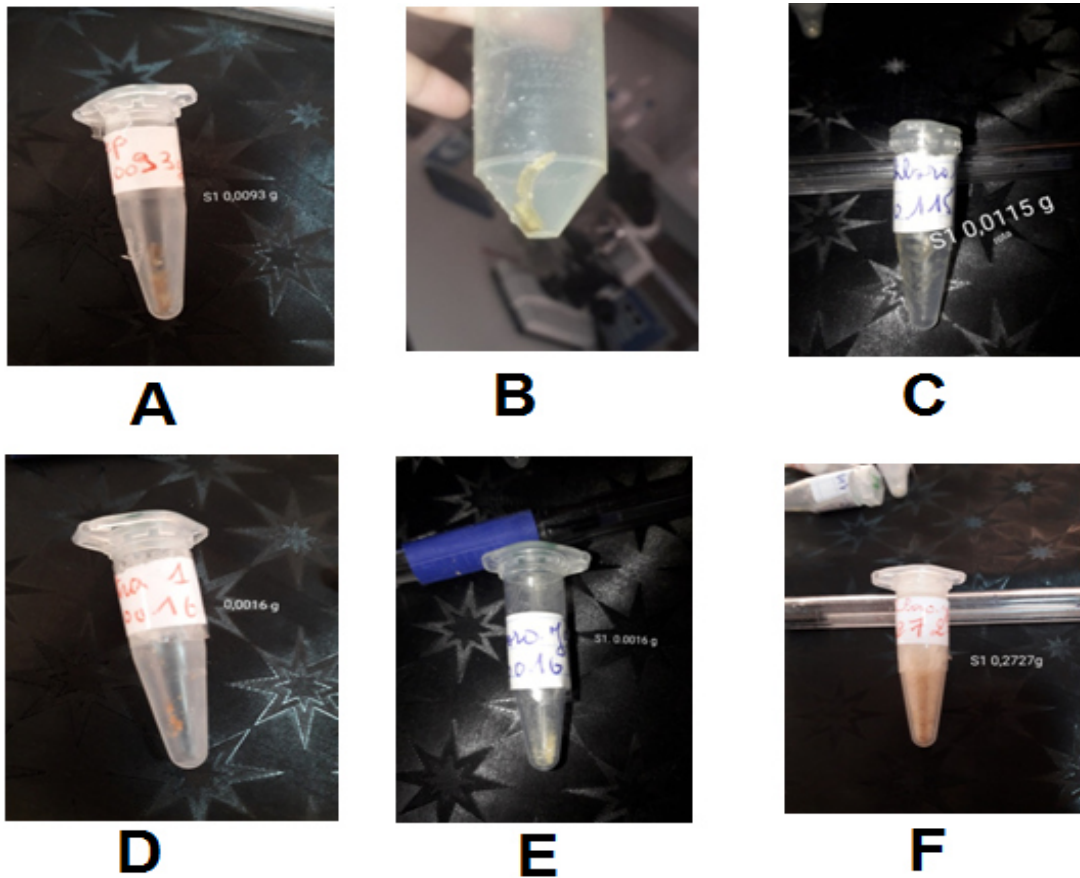
La composition du milieu de culture influe la biosynthèse de métabolites secondaires essentiellement les substances antimicrobiennes, ainsi que la quantité de ces substances (Sánchez et Demain , 2002).

## **2. Criblage secondaire**

### **3.1 Résultats d'extraction :**

Une fois l'activité antimicrobienne a été confirmée, la recherche est dirigée vers l'extraction de la molécule bioactive à partir de la souche 1 par l'utilisation de deux solvants organiques le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle en plus d'acétone pour la précipitation des protéines.

Des extraits organiques obtenus sont déposés dans des éppindorfs et pesés pour réaliser l'activité



**Figure 13 :** Extraits organique de la souche 1. A : Peptidique ; B :D ichlo Or ; C :Dichloro Or ; D : Intra ; E : Dichloro Aq ; F : Dichloro Aq .

### 3.2 Résultats d'activité des extraits obtenus :

Les extraits obtenus dissous dans l'eau distillée sont testés contre les souches sensibles sur le milieu MH par la méthode de puits.

Les extraits organiques de l'acétate d'éthyle en plus de la partie organique de dichlorométhane n'ont pas donné une activité.

L'extrait de la partie aqueuse de dichlorométhane a donné une activité vis-à-vis *S. aureus* ATCC 6538 avec un diamètre de 7 mm et contre *E.coli* ATCC 10536 avec un diamètre de 10 mm.

L'activité de la partie peptidique est observée contre *S.aureus* avec un diamètre de 11mm (Figure14).

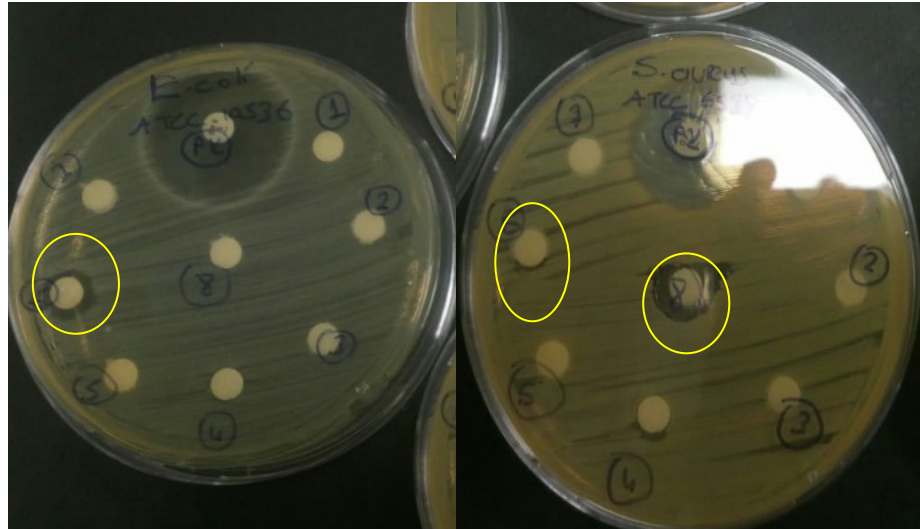


Figure 14 : Résultats de la partie organique (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (6) et peptidique(8) (Bouali, 2019).

Des zones d'inhibition sont observées autour des puits pour la partie peptidique contre *S. aureus* ATCC 6538 et *B. cereus* ATCC 11778 avec un diamètre de (11,5) et (9,5) respectivement, ces résultats montrent que *S. aureus* est plus sensible que *B. cereus*.

L'eau distillée et le dichlorométhane ont été utilisés comme témoins, leurs résultats contre les souches sensibles sont négatifs.

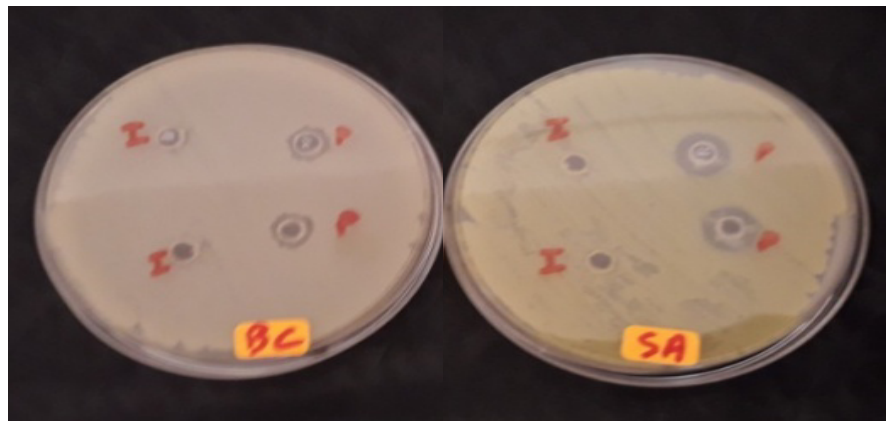


Figure15 : Résultats d'activité de la partie peptidique et intracellulaire (souche 1) .

Ces résultats ont été comparés par les résultats rapportés par **El-banna et Qaddoumi ,2015** qui ont utilisé la souche *B. cereus* NBS isolé à partir d'Alba'qa Jordan, 15,8 mm et 15mm vis-à-vis *S. aureus* et *B. cereus* respectivement et aucune activité contre *E. coli*. Contrairement à notre composé, le composé actif a inhibé *C. albicans* (14 mm).

Tableau 8 : Résultats d'activité des extraits obtenus

Extrait	Intra	Extracellulaire					
		Peptidique		Non peptidique			
				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Or	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> aq	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> Or	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> Aq
Souche test							
<i>S. aureus</i>	-	11.5	11*	-	7*	-	-
<i>B. cereus</i>	-	9.5	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli 10536*</i>	-	-	-	-	10*	-	-

\*: Réalisé dans un laboratoire turque (Department of Genetic and Bioengineering, Faculty of Engineering and Architecture, Yeditepe University ,Istanbul, Turkey.)

Or : phase organique

Aq : phase aqueuse

CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> :Dichlorométhane

C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>: Acétate d'éthyle

#### 4. Test d'induction

Toutes les parties organiques extraites n'ont pas donné une activité vis-à-vis *S. aureus* se qui indique que la souche productrice 1 ne produit pas la molécule inhibitrices lorsqu'elle est en contact avec la souche test *S. aureus*.

Les résultats de test d'induction de *Bacillus licheniformis* isolée à partir de hamam d'bagh (Aissaoui, 2019) sont similaires à notre résultat. Différent des bactéries probiotiques suivantes *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* LA et *Enterococcus faecium* L3 qui ont données des spectres plus larges suite à la co-culture avec la souche inductrice *Lactococcus lactis subsp. lactis* LMG 9450 (Kos et al, 2011).

L'induction par la co-culture n'affecte pas toutes les souches productrices, mais elle existe chez certains types de communautés microbiennes au moyen du quorum sensing. Parmi les quelles une souche du même genre *Bacillus subtilis* rapporté en 2018 par Piewngam et al, La production de fengicine de nature lipopetidique par cette souche élimine *S. aureus* par l'inhibition de quorum sensing. Cette réponse peut être un mécanisme de défense qui a évolué pour dissuader ou tuer un concurrent potentiel (Pathak et al., 2013).

### 5. Résultats du Traitement par la protéinase K

Après le traitement par la protéinase K, la partie bioactive a perdu l'activité contre les souches sensibles *S. aureus* ATCC et *E. coli* ATCC 10536, se qui confirme que la nature des molécules est **peptidique**. Les travaux de **Fariha *et al* en 2009** montrent que la plupart des substances antimicrobiennes produites par le genre *Bacillus* sont de nature peptidique.



Figure 16 : Traitement par protéinase K (Bouali, 2019)

### 6. Résultats de changement de température :

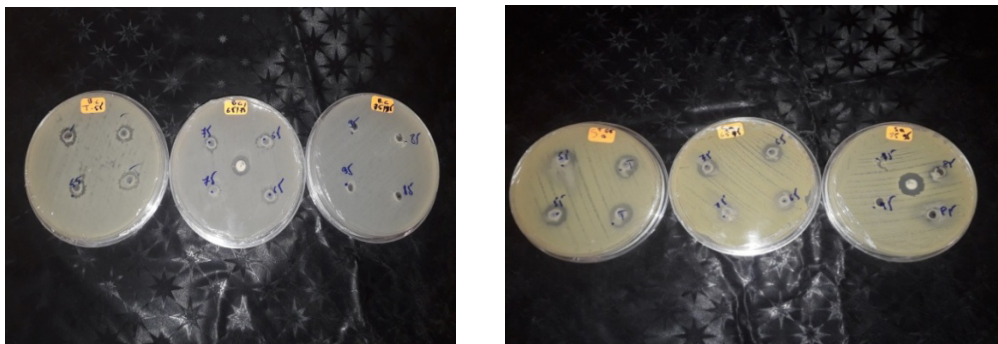


Figure 17 : Effet de la température sur la partie peptidique .

Tableau 9 : Effet de la température sur la partie peptidique

Température	Témoin	55	65	75	85	95
<i>S. aureus</i>	13	12.25	11.75	11.5	9	-
%	100%	96%	90%	88%	69%	00%
<i>B. cereus</i>	11	10	9.75	9	-	-
%	100%	90%	88%	81%	00%	00%

Remarque : chaque valeur est la moyenne de deux répétitions

Après 30 min de traitement thermique d'échantillon peptidique (3.72 mg/ml) l'inhibition de *S. aureus* a diminué jusqu'à 69% à 85°C, puis perdu complètement à 95°C. Pour *B. cereus* l'inhibition a diminué jusqu'à 81% à 75°C, puis perdu complètement à 85°C. La P valeur de l'effet de facteur température du résultat obtenu inférieur à 0.001, avec un LSD= 0.4160.

Cette différence peut être liée à la sensibilité différente des deux souches sensibles, comme il peut être dû à cause de la présence de deux peptides différents. Le composé peptidique produit par la souche 1 est moins stable vis-à-vis la variation de température que le composé rapporté par **Bhatta et Kapadnis en 2010** produit par *Bacillus subtilis* KBB, son activité n'a pas été affectée jusqu'à 90°C, mais perdue à l'autoclavage.

## 7. Résultats de la séparation par CCM



Figure 18 : séparation de la partie peptidique (à gauche) et l'extrait intracellulaire (à droite).

Plusieurs travaux consultés ont mentionné que la chromatographie sur couche mince est appliquée dans la plupart des cas de purification de métabolites secondaires (**Gibbons and Gray, 1998**).

Les deux extraits contiennent des acides aminés et/ou des protéines du moment où la ninhydrine réagit avec les acides aminés libres ou liés. Cependant il y'a des différences concernant les propriétés chimiques telle que la solubilité. L'extrait intracellulaire est plus soluble dans le système éluant et migre mieux que l'extrait peptidique.

## **Conclusion :**

Au cours des années les microorganismes ont développé des mécanismes de résistance aux antibiotiques, ce qui impose aux chercheurs de trouver des nouvelles substances à effet antimicrobien. Le genre *Bacillus* est connu par sa capacité de produire ces substances, qui sont essentiellement des composés peptidiques. L'objectif principal de ce travail était de mettre en évidence le potentiel antimicrobien des *Bacillus cereus* isolé de la région de Naama.

Après le criblage primaire de sept souches nous avons trouvé quatre souches parmi sept ont un effet antimicrobien contre des bactéries à Gram-positif dont Trois souches (1, 3 et 10) ont une forte similarité avec des souches de *Bacillus cereus* s. s dans la base des données de Bruker MALDI biotyper, la souche 5 aussi avait une ressemblance avec *Bacillus cereus* s.s mais avec une faible confiance d'identification.

La souche 1 avait un spectre plus intéressant en comparant par les autres isolats par l'inhibition de *S. aureus* et *B. cereus*. L'étude de l'effet de temps et de milieu ont montré qu'après 48h d'incubation dans le bouillon nutritif, la souche 1 a donné une inhibition maximale vis-à-vis *S. aureus*. Ces deux paramètres ont été utilisés pour le screening secondaire.

Le criblage secondaire de la souche 1, a révélé la nature protéique de la molécule responsable de l'activité antimicrobienne, le traitement par protéinase K confirme sa nature protéique, la molécule n'a pas perdu l'activité jusqu'à 85°C vis-à-vis *S. aureus*.

Le métabolisme bactérien est lié fortement avec la composition de milieu de culture, et les conditions de culture. Afin d'obtenir un rendement plus important ses facteurs doivent être étudiés plus précisément, pour la conception d'un milieu de fermentation adéquat pour une production maximale.

Les résultats obtenus doivent être complétés par des analyses de chimie analytique telle que HPLC et RMN pour la caractérisation de la molécule bioactives.

**A**

- **Abriouel H., Charles M.A.P., Franz., Ben Omar N., Antonio G.A., 2011.** Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.*35: 201–232.
- **Aissaoui N., 2019.** Identification et caractérisations des *Bacillus* thermophiles isolés à partir de la source hydrothermale Dbagh, producteurs de composés antimicrobiens et de prodrogue de nature phénolique. Docteur en Biologie. Université de Tlemcen, 179p.
- **Andrea M.S., Boyd A.M., Henrik S., Jorg F., Kenneth N.T., Terry J.M., 2008.** Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *BioMed.Central.* 4:8p.
- **Arslan S., Eyi A., Kucuksari R., 2014.** Toxigenic genes, spoilage potential and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. *Anaerobe.* 25:42–6.
- **Asuming B.S., Gantner S., Adiku S.G., Archer G., Edusei V., Tiedje J.M., 2008.** Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments. *Soil Biol Biochem.* 40: 2811-2818.
- **Awais M., Aamer A.S., Abdul H., Fariha H., 2007.** Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *bacillus sp.* *Pak. J. Bot.* 39(4): 1303-1312.
- **Awais M., Pervez A., Yaqub A., Shah M.M., 2010.** Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel. *Pakistan J. Zool.* vol. 42(3) : 267-275.

**B**

- **Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L., 2011.** Antimicrobial compounds produced by *Bacillus spp* and applications in Food.
- **Bazinet A.I., 2017.** Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Bazinet bmc evolutionary biology.* 17:176p.
- **Bhatta D.R., and Kapadnis B.P., 2010.** Production, optimization and characterization of bioactive compound against *Salmonella* from *Bacillus subtilis* KBB isolated from Nepal. *Scientific Word.*Vol. 8: 19-29.
- **Bottone E.J., 2010.** *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews.* 23(2): 382-398.
- **Bouali W., 2017.** Contribution à l'élaboration d'un soucier bactérien et caractérisation de la flore *Bacillus cereus* dans le Sud -Ouest Algérien. Docteur en Biologie. UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID – TLEMEN, 149p.

**C**

- **Chalasan A.G, Dhanarajan G., Nema S., Sen R., and Roy U., 2015.** An Antimicrobial Metabolite from *Bacillus sp*: Significant Activity Against Pathogenic Bacteria Including Multidrug Resistant Clinical Strains. *Frontiers in Microbiology*. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 6: 1-10.
- **Cherif H., 2014.** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus sp* et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- **CLSI, 2010.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, USA, Wayne, PA.
- **Coleman D.C., Whitman W.B., 2004.** Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia*. 49: 479-497.

**E**

- **Eccleston G.P., Brooks P.R., Kurtboke D.I., 2008.** The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia, *Marine Drugs*. 6:243-261.
- **Eichenberger P., 2007.** Genomics and cellular biology of endospore formation. In *Bacillus: Cellular and molecular biology*. P. Graumann. Wymondham, UK, caister academi press. 319- 350.
- **Eltem R., Ucar F., 1998.** The determination of antimicrobial activity spectrum of 23 *Bacillus* strains isolated from Denizli-Acigol (Bitter Lake) which is soda lake (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). *J. KUKEM*. 21: 57-64.
- **EL Banna N., Qaddoumi S.S., 2015.** Antimicrobial activity of *Bacillus cereus*: Isolation, identification and the affect of carbon and nitrogen source on its antagonistic activity. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* .Vol. 8(2):7-13.
- **Ewelina et al., 2010.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 85:1521–1531.

**F**

- **Fariha H., Samiullah K., Aamer A.S., Abdul H., 2009.** Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus*. *SAF1 Pak. J. Bot*. 41(3): 1499-1510.
- **Fierer N., Bradford M.A., & Jackson R.B. (2007).** Toward an ecological classification of soil, bacteria. *Ecology*. 88: 1354-1364.

**G**

- **Garbeva P., Van Veen J.A., van Elsas J.D., 2003.** Predominant *Bacillus* spp. In agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE, *Microbiol. Ecol.* 45:302–316.
- **Gibbons S., and Gray A. I., 1998.** Isolation by planar chromatography. In Natural Products Isolation, ed. Cannell R. J. P. *Humana press*, Totowa, New Jersey. 209–245.
- **Gignoux J., House J., Hall D., Masse D., Nacro H.B., Abbadie L., 2001.** Design and test of a generic cohort model of soil organic matter decomposition: the somko model. *Global ecol. Biogeography.* 10:639-660.
- **Guinebretière M.H., Auger S., Galleron N., Contzen M., Desarrau B., De Buyser M.I., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P.E., Lereclus D., De vos P., Nguyen C., Sorokin A., 2013.** *Bacillus cytotoxicus* sp. Nov., is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int j syst evol microbiol.* UY. 363(1):31–40.

**H**

- **Hainque B., Bandin B., Lefebvre P., 2008.** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Chapitre 15: Chromatographie planaire. Flammarion.
- **Hamdache A., Azarken R., Lamarti A., Aleu J., Collado G., 2013.** Comparative genome analysis of *Bacillus* spp and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. *Phytochem Rev.* 12:685–716.
- **Health Protection Agency, 2011b.** *Oxidase* Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.2.
- **Higgs R.E., Zahn J.A., Gygi J.D., Hilton M.D., 2001.** Rapid methods to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology.* 67:371-376.
- **Hosny M.S., Sheir D.H., Eldewany A.I., 2011.** Production of antimicrobial agent from marine bacteria isolated from Mediterranean. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 5(5):121-128.

**I**

- **Imada C., Koseki N., Kamata M., Kobayashi T., Hamada S.N., 2007.** Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica.* 21: 27-31.

**J**

- **Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J., 2003.** The hidden life styles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental microbiology*. 5: 631-640.
- **Jiménez G., Urdiain M., Cifuentes A., López-López A., Blanch A.R., Tamames J., Kampfer P., Kolsto A.B., Ramón D., Martínez J.F., Codoner F.M., Rosselló-móra R., 2013.** Description of *Bacillus toyonensis* sp. Nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of anic calculations. *Syst appl microbiol*. 36(6):383–91.
- **Jung M.Y., Paek W.K., Park I.S., Han J.R., Sin Y., Paek J., Rhee M.S., Kim H., Song H.S., Chang Y.H., 2010.** *Bacillus gaemokensis* sp. Nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the yellow sea. *J microbiol*. 48(6):867–71.
- **Jung M.Y., Kim J.S., Paek W.K., Lim J., Lee H., Kim P.I., Ma J.Y., Kim W., Chang Y.H., 2011.** *Bacillus manliponensis* sp. Nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J microbiol*. 49(6): 1027–32.

**K**

- **Khanna M., Solanki R., Lal R., 2011.** Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. Vol. 2, Issue 3: 357-375.
- **Kos B., Beganović J., Jurašić L., Švađumović M., Pavunc A.L., Uroić K., Šušković J., 2011.** Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. 61 (4): 273-282.
- **Kurtböke D.I., 2012.** Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93 (5):1843-1852.

**L**

- **Laouami S., 2012.** Metabolisme et toxinogenese de *Bacillus cereus* : roles de l'enzyme fermentaire ldha et du regulateur redox rex. Docteur de l'universite d'avignon et des pays de vaucluse. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 166p.
- **Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N., 2009.** Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. *Appl Environ Microbiol*. 75(15):5111-5120.
- **Lertcanawanichakul M., Sawangnop S., 2008.** A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak. J. Sci. Tech*. 5(2): 161-171.

- **Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Prüss B.M., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E., Stewart G.S., Scherer S., 1998.** *Bacillus weihenstephanensis* sp. Nov., is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int j syst evol microbiol.* 48(4):1373–82.
- **Liu B., Liu G.H., Hu G.P., Cetin S., Lin N.Q., Tang J.Y., Tang W.Q., Lin Y.Z., 2014.** *Bacillus bingmayongensis* sp. Nov., isolated from the pit soil of emperor qin's terra-cotta warriors in china. *Anton leeuw.* 105(3):501–10.
- **Lynch J.M., 1990.** *The Rhizosphere.* Ed: John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

### M

- **Margulis L., Jorgensen J.Z., Dolan S., Kolchinsky R., Rainey F.A., Lo S.C., 1998.** The arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America.* 95: 1236-1241.
- **Marie et al., 2013.** MALDI-TOF MS comme outil d'identification de pathogènes alimentaires [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.biomerieux.com/fr/spectrometrie-de-masse-maldi-tof>. 135-41 (26 mai 2019).
- **Mazas M., Gonzalez I., Lopez M., GONZÁLEZ J., SARMIENTO R., 1995.** Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International journal of food science & technology.* 30(1): 71-78.
- **Mellouli L., Ameer-Medhi R., Sioud S., Salem M., Bejar S., 2003.** Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res. Microbiol.* 154: 345-352.
- **Miller R.A., Beno S.M., Kent D.J., Carroll L.M., Martin N.H., Boor K.J., Kovac J., 2016.** *Bacillus wiedmannii* sp. Nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int j syst evol microbiol.* 66(11):4744–53.
- **Mols M., and Abee T., 2011.** *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology.* 13: 2835-2843.
- **Morikawa M., Ito M., Imanaka T., 1992.** Isolation of a new surfactin producer, *Bacillus pumilis* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 255–261.
- **Muller A.K., Westergaard K., Christensen S., Sorensen S.J., 2002.** The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microb Ecol.* 44: 49-58.

### N

- **Nakamura L.K., 1998.** *Bacillus pseudomycooides* sp. Nov., int j syst evol microbiol. 48(3):1031–5.
- **NAS F., 2013.** Étude de molécules antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrémophile B1 isolée d'une sebkha d'EL Goléa (Algérie). Magister en Microbiologie Appliquée. Université de Tlemcen, 175p.
- **Namita S., Rajneesh J., Shweta., Anita D., Suryakant P., Pallavi T., 2016.** Statistical optimization of bioactive metabolite production from *Bacillus cereus* NSD 10072 by using low cost substrate.
- **Newman D.J., Cragg G.M., 2012.** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products. 75(3): 311-335.
- **Nguyen T.M., Kim J., 2015.** Antifungal and antibacterial activities of *Streptomyces polymachus* sp. Nov., isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 65(8): 2385-2390.

### P

- **Pathak R., Kumar R., and Gautam H.K., 2013.** Cross-species induction and enhancement of antimicrobial properties in response to gamma irradiation in *Exiguobacterium* sp. HKG 126. *Indian Journal of Microbiology*. 53(2):130-136.
- **Petrochenko E.B., Evgeniy V., Jason J., Darryl B., Mark Berjanskii., Bow P., David S., and Christoph H., 2012.** Use of Proteinase K Nonspecific Digestion for Selective and Comprehensive Identification of Interpeptide Cross-links. Application to Prion Proteins. 11(7)
- **Piewngam P., Zheng Y., Thuan H., Nguyen., Seth W., Dickey., Hwang-Soo J., Amer E., Villaruz., Kyle A., Glose ., 2018.** Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *NATURE* .VOL. 562:532-537.
- **Pimentel D.C., Wilson C., Mccullum C., Hunag R., Dwen P., Flack J., Tran Q., Saltman T., Cliff F., 1997 .** Economic and environmental benefits of biodiversity. *Biosci*. 47:747-757.

### R

- **Rajendhran J., and Gunasekaran P., 2008.** Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol Adv*. 26: 576-590.
- **Raoul C., 2013.** Le sol. Univers Agricole. Editions France Agricole. 2<sup>ème</sup> édition.

### S

- **Sánchez S., Demain A., 2002.** Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzymes Microbiology Technology*. 31:895-906.

- **Singh B.K., Dawson L.A., McDonald C.A., Buckland S.M., 2009.** Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *App. Soil Ecol.* 41: 239-248.
- **Stein T., 2005.** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* .56(4): 845–857.
- **Stenfors L.P., Granum P.E., 2001.** Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol.* 197: 223–228.
- **Swift M.J., Andrén I., Brussaard M., Briones M., Couteaux k., Ekschmitt A., Kjoller P., Loiseau P., 1998.** Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. *global change biol.* 4:729-743.
- **Syed A.M., Safia A., Abdul H., 2009.** Antibiotic production by thermophilic *Bacillus* specie SAT-4. *Pak. J. Pharm. Sci.* Vol. 22, No. 3:339-345.

### T

- **Taale E, 2016.** Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. *Biologie moléculaire.* Université Ouaga I Pr Joseph KI ZERBO, 150p.
- **Tapi A., Chollet-Imbert M., Scherens B., Jacques P., 2010.** New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction.
- **Tabbene O., Karkouch I., Elkahoui S., Cosette P., Mangoni M.L., Jouenne T., Limam F., 2010.** A new antibacterial and antioxidant S07-2 compound produced by *Bacillus subtilis* B38, *FEMS Microbiol.* 303: 176–182.
- **Tamehiro N., Okamoto H.Y., Okamoto S., Ubukata M., Hamada M., Naganawa H., Ochi K., 2002.** Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 46:315-320.

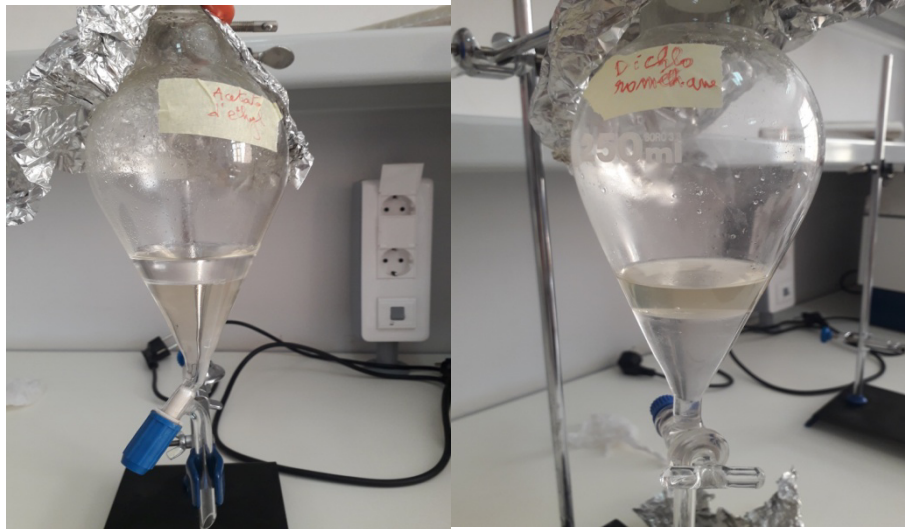
### V

- **Vilain S., Luo Y., Hildreth M.B., Brozel V.S., 2006.** Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and environmental microbiology.* 72: 4970- 4977.





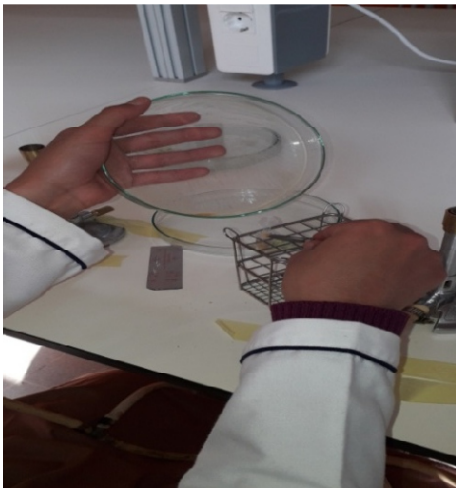
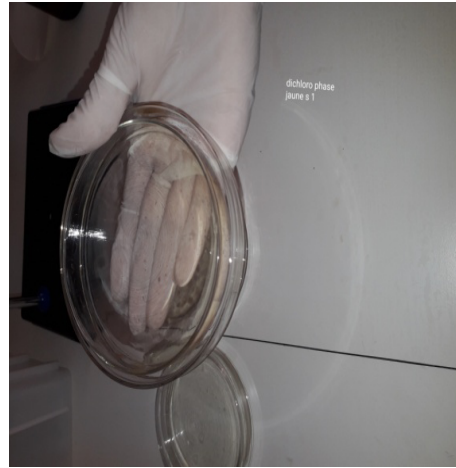
Annexe 1 :



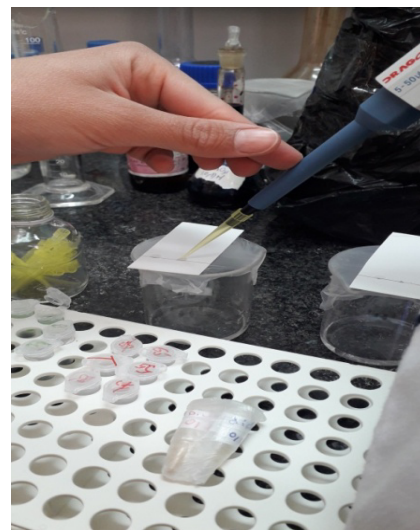
Décantation de la partie extracellulaire



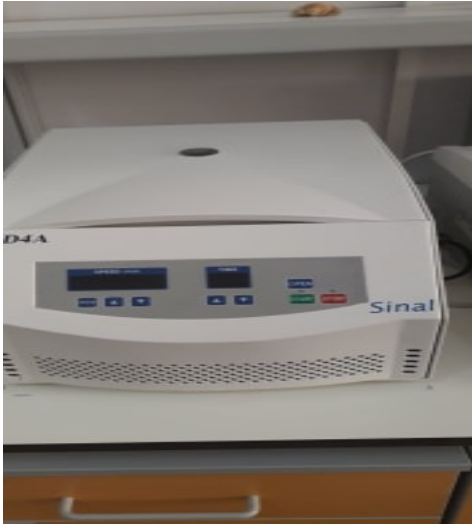
Précipitation et séchage des protéines



**Extraction de la partie non peptidique et autres molécules**



Séparation de la partie peptidique et intracellulaire par la CCM



Centrifugeuse



Cuve à ultrason



Evaporateur  
Rotatif

**Annexe 2 : Préparation de quelques milieux de culture.**

Gélose Mueller-Hinton :

- Infusion de viande de boeuf .....300 g
- Hydrolysate de caséine... .....17,5 g
- Amidon.....01,5 g
- Gélose .....17 g
- Eau distillée ..... 1000 ml

pH =7,4

Gélose nutritive :

- Peptone .....15 g
- Extrait de viande.....10 g
- Extrait de levure.....02 g
- Chlorure de sodium.....05 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée ..... 1000 ml

pH =6,8-7,4

Gélose trypto-caséine soja

- Tryptone ..... 15,0 g
- Peptone papaïnique de soja ..... 5,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Agar agar bactériologique ..... 15,0 g
- Eau distillée.....1000 ml

pH : 7,3 ± 0,2

## Annexe 3 : analyses statistiques.

## Effet de facteur temps :

Variate: zone\_d\_inhibition

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
temps	2	5.7778	2.8889	3.47	0.065
souche_test	1	249.3889	249.3889	299.27	<.001
temps.souche_test	2	19.1111	9.5556	11.47	0.002
Residual	12	10.0000	0.8333		
Total	17	284.2778			

\*\*\*\*\* Tables of means \*\*\*\*\*

Variate: zone\_d\_inhibition

Grand mean 13.39

temps	24.00	48.00	72.00
	12.83	14.17	13.17

souche_test	Bacillus c	S aureus
	9.67	17.11

temps	souche_test	Bacillus c	S aureus
24.00		10.00	15.67
48.00		9.00	19.33
72.00		10.00	16.33

\*\*\* Least significant differences of means (5% level) \*\*\*

Table	temps	souche_test	temps souche_test
rep.	6	9	3
d.f.	12	12	12
l.s.d.	1.148	0.938	1.624

## Effet du facteur température :

\*\*\*\*\* Analysis of variance \*\*\*\*\*

Variate: zone\_d\_inhibition

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
temperature	5	114.22222	22.84444	274.13	<.001
s_test	2	62.76389	31.38194	376.58	<.001
temperature.s_test	10	15.81944	1.58194	18.98	<.001
Residual	18	1.50000	0.08333		
Total	35	194.30556			

\*\*\*\*\* Tables of means \*\*\*\*\*

Variate: zone\_d\_inhibition

Grand mean 9.604

temperature	45.00	55.00	65.00	75.00	85.00	95.00
	12.000	11.125	10.750	10.250	7.500	6.000

s_test Bacillus c	S aureus
8.625	10.583

temperature	s_test Bacillus c	S aureus
45.00	11.000	13.000
55.00	10.000	12.250
65.00	9.750	11.750
75.00	9.000	11.500
85.00	6.000	9.000
95.00	6.000	6.000

\*\*\* Least significant differences of means (5% level) \*\*\*

Table	temperature	s_test	temperature
			s_test
rep.	4	12	2
d.f.	12	12	12
l.s.d.	0.4160	0.2402	0.5883