

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biotechnologies
Spécialité : Biotechnologie et Biothérapie

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Etude *in vitro* des effets thérapeutiques des extraits bruts et fengycines
des deux souches de *Bacillus sp.* T1 et T2.**

Présenté par : MISSAOUI Oumaima
SELLAMI Yanis

Le 20/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Dr. KARA ALI Mounira (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 1 : Dr. ADGROUD Moussa (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 2 : Dr. KHELILI Kaouthar (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous tenons à présenter notre profond respect et notre reconnaissance à notre promotrice **Mme Kara Ali Mounira**, Maitre de Conférences à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour son encadrement fructueux, son suivi au cours de notre travail, pour les précieuses informations, conseils et moyens qu'elle a mis à notre disposition.*

*Nous tenons à remercier profondément nos examinateurs **Mr Adjroud Moussa** et **Mme Khelili Kaouthar** pour avoir acceptés d'examiner ce travail. Nous écouterons attentivement et recevrons toutes remarques éventuelles toujours enrichissantes.*

*On remercie **Mr Kacem Chaouche Noureddine**, chef du département de Biologie Appliquée et directeur du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de L'Activité Microbienne (LaMyBAM) qui nous a acceptés parmi ses étudiants en master.*

Nous adressons nos remerciements à tous le personnel du Laboratoire LaMyBAM pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée lors de la réalisation de ce travail.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils acceptent nos grands et sincères remerciements.

Oumaima et Yanis

Dédicaces

Ce thème est dédié à :

*Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma
Profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long
de mes études, que DIEU les bénisse ;*

- Mes frères et ma sœur

- Mon binôme et à toute sa famille

- Tous mes amis.

Oumaima

En guise de reconnaissance envers mon DIEU le Tout Puissant

*Je dédie ce travail à mon père, ma mère pour leur aide, leur encouragement et leur soutien et à
toutes les personnes qui ont montré de l'intérêt pour mon travail, notamment ma famille et mes
amis.*

Yanis

Table des matières

Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
1-Introduction	1
2-Synthèse bibliographique	
2.1- Genre <i>Bacillus</i>	3
2.1.1-Généralités.....	3
2.1.2- Classification phylogénie des <i>Bacillus</i>	4
2.1.3- Ecologie.....	6
2.1.4- Caractères bactériologiques.....	6
2.1.5- Caractères physiologiques.....	7
2.1.6- Application des <i>Bacillus</i> dans la biotechnologie.....	8
2.2- Molécules bioactives des <i>Bacillus</i>	9
2.2.1- Bactériocines.....	9
2.2.2- Lipopeptides (LPs) : métabolites polyvalents.....	10
2.2.2.1- Généralités.....	10
2.2.2.2- Structure	10
2.2.2.3.- Propriétés des lipopeptides.....	14
2.2.3-Les enzymes thérapeutiques.....	19
2.2.3.1- Alpha-amylases.....	20
2.2.3.2- Protéases.....	20
2.2.3.3- Cellulases.....	20
2.3- Propriétés pharmacologiques du genre <i>Bacillus</i>	21
2.3.1- Activité anticoagulante.....	21
2.3.2- Activité anti-oxydante.....	22
2.3.3- Activité antidiabétique (anti- α - amylase).....	23
2.3.4- Activité antimicrobienne.....	23

2.3.5- Activité enzymatique.....	24
----------------------------------	----

3-Matériel et Méthodes

3.1- Réactivation T1 et T2.....	25
3.2- Vérification de l'aspect morphologique et biochimique des T1 et T2.....	25
3.2.1- Aspect macroscopique.....	25
3.2.2- Aspect microscopique.....	26
3.2.2.1- Observation à l'état frais.....	26
3.2.2.2-Coloration de <i>Gram</i>	26
3.2.2.3- Coloration des spores bactériennes au vert de malachite.....	27
3.2.3- Caractérisation biochimique des T1 et T2.....	27
3.2.3.1- Type respiratoire.....	27
3.2.3.2- Identification par la galerie API 20E	28
3.3- Mise en évidence des activités enzymatiques des deux souches	29
3.3.1-Recherche de l'amylase.....	29
3.3.2 -Recherche de la caséinase.....	29
3.3.3- Recherche de cellulase.....	29
3.4- Extraction de substances bioactives des T1 et T2.....	30
3.4.1- Préparation de la pré-culture.....	30
3.4.2- Préparation des milieux de fermentation et inoculation.....	30
3.4.3- Récupération de l'extrait brut et des fengycines.....	30
3.4.3.1- Extraits brut des deux souches (EBT1 et EBT2).....	30
3.4.3.2- Extrait des fengycines des deux souches (EFT1 et EFT2).....	30
3.5- Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> en vue de leur application dans la biothérapie.....	31
3.5.1- Activité anticoagulante	31
3.5.1.1- Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquettés.....	31

3.5.1.2 - Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène.....	31
3.5.1.3 - Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.....	32
3.5.2- Activité anti-oxydante.....	33
3.5.2.1- Test de piégeage du radical DPPH.....	34
3.5.2.2- Test de piégeage de l'ABTS.....	35
3.5.2.3- Test de l'activité Silvernanoparticle (SNP) (Métal Chélate).....	35
3.5.3- Activité antidiabétique (Anti- Alpha amylase).....	36
3.5.4- Activité antibactérienne.....	37
3.4.5.1- Repiquage des souches bactériennes.....	37
3.4.5.2- Préparation de l'inoculum.....	38
3.4.5.3- Méthode de diffusion sur puits d'agar.....	38
3.4.5.4- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	38
3.5.5- Etude de l'activité synergique.....	39
3.5.6- Activité antifongique	40
3.5.7- Analyse statistique.....	40

4-Résultats et discussion

4.1- Vérification de l'aspect morphologique et biochimique des T1 et T2.....	41
4.1.1- Aspect macroscopique.....	41
4.1.2- Aspect microscopique.....	42
4.1.2.1- Observation à l'état frais.....	42
4.1.2.2- Coloration de <i>Gram</i>	42
4.1.2.3- Coloration des endospores bactériennes au vert de malachite.....	43
4.1.3-Tests biochimiques.....	43
4.1.3.1-Type respiratoire	43
4.1.3.2-Galerie API 20 E.....	44
4.2- Mise en évidence des activités enzymatiques des deux souches.....	45

4.3-Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i>	48
4.3.1-Evaluation de l'activité anticoagulante	48
4.3.1.1-Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	48
4.3.1.2-Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	49
4.3.2-Activité anti-oxydante.....	50
4.3.2.1-Test de piégeage du radical DPPH.....	50
4.3.2.2-Test de piégeage de l'ABTS.....	51
4.3.2.3-Test de l'activité Silvernanoparticle (SNP).....	53
4.3.3-Activité anti-diabétique (anti- alpha amylase).....	54
4.3.4-Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	56
4.3.4.1- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	57
4.3.5- Activité synergique	59
4.3.6-Activité antifongique.....	61
5-Conclusion et perspectives.....	64
Références bibliographiques.....	66
Annexes	
Abstract	
ملخص	

Liste des figures

Figure 1 :	Observation microscopique d'une souche de <i>Bacillus.sp</i>	4
Figure 2 :	Cycle de germination, de croissance et de sporulation d'une bactérie sporulée typique.....	4
Figure 3 :	Classification des <i>Bacillus</i>	5
Figure 4 :	Coloration de gram de ; A : <i>Bacillus subtilis</i> et B : <i>Bacillus cereus</i>	7
Figure 5 :	Structure détaillée de la surfactine, de la fengycine et de l'iturine.....	14
Figure 6 :	Représentation schématique du lien entre les propriétés physicochimiques des lipopeptides produits par <i>Bacillus sp.</i> et leurs propriétés biologiques.	19
Figure 7 :	La cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène.....	22
Figure 8 :	Procédure de la coloration de Gram.....	26
Figure 9 :	Détermination du type respiratoire.....	28
Figure 10 :	Aspect de la galerie API 20 E avant l'inoculation par les souches sélectionnées.....	28
Figure 11 :	Extraction des substances bioactives des T1 et T2, (A) : la fermentation ; (B) : l'extraits brut ; (C) : l'extraits de fengycines.....	30
Figure 12 :	Pool plasmatique déplaquettés des 4 volontaires sains après centrifugation.....	31
Figure 13 :	L'appareil «C2000-1/2/4 Semi-Auto Coagulation Analyzer » appliqué pour mesurer le temps (TCK) et (TQ).....	33
Figure 14 :	Préparation des dilutions de différents extraits (EBT1/ EBT2/ EFT1/EFT2).....	33
Figure 15 :	Réduction du DPPH• par un antioxydant.....	34
Figure 16 :	Réduction des ions Ag ⁺	35
Figure 17 :	Schéma de la plaque de l'activité inhibitrice de l'alpha amylase.....	37
Figure 18 :	Préparation de l'inoculum bactérien.....	38
Figure 19 :	Aspect macroscopique des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2.....	41
Figure 20 :	Aspect microscopique à l'état frais des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2.....	42
Figure 21 :	Coloration de <i>Gram</i> des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2.....	42
Figure 22 :	Coloration des endospores des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2 au vert de malachite.....	43
Figure 23 :	Type respiratoire des souches bactériennes	43
Figure 24 :	Test biochimique en utilisant la galerie API 20E ; A : T1 et B : T2.....	44
Figure 25 :	Indices enzymatiques des souches T1 et T2 testées après 5 jours d'incubation.....	47
Figure 26 :	Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	48
Figure 27 :	Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.....	49
Figure 28 :	Activité anti-oxydante de l'ABTS du standard.....	52
Figure 29 :	Activité anti-oxydante de l'ABTS des extraits bruts.....	53
Figure 30 :	Pourcentage d'inhibition de l'alpha –amylase par les extraits (EFT1/EFT2) et le standard (Acarbose).....	55

Figure 31 :	Effet antagoniste d'EFT1 sur les bactéries pathogènes ; (A) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; (B) : <i>Streptocoque coagulase négative</i> ; (C) : <i>Klebsiella sp</i>	56
Figure 32 :	Microplaques de la synergie de deux combinaisons ; A : (EFT1 + Gectapen) et B : (EFT1+Amoxypen).....	59
Figure 33 :	Secteurs représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de <i>F.solani</i> ; <i>Alternaria sp</i> ; <i>Aspergillus sp</i> ; <i>F.culmorum</i> en confrontation directe avec les antagonistes T1 et T2.....	61

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Classification des <i>Bacillus</i>	5
Tableau 2 :	Diversité structurale des surfactines, iturines et fengycines produites par les <i>Bacillus</i>	13
Tableau 3 :	Concentration micellaire critique (CMC) et tension superficielle à la concentration micellaire critique (γ_{CMC}) des principaux lipopeptides produits par <i>Bacillus</i> sp.	16
Tableau 4 :	Activité antibiotique de certaines souches <i>Bacillus</i>	24
Tableau 5 :	Description de l'aspect des colonies des souches bactériennes T1 et T2 cultivées sur milieu (LB).....	41
Tableau 6 :	Illustration du profil biochimique des souches T1 et T2 par la galerie API 20 E.....	45
Tableau 7 :	Zones d'hydrolyses des souches T1 et T2 testées après 5 jours incubation.....	46
Tableau 8 :	Le pourcentage d'inhibition (%) du DPPH par les extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2).....	51
Tableau 9 :	Le pourcentage d'inhibition (%) de l'ABTS par les extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2).....	52
Tableau 10 :	Activité des extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2) sur les ions chélates..	53
Tableau 11 :	Pourcentage d'inhibition de l'alpha-amylase par les extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2).....	54
Tableau 12 :	Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne.....	57
Tableau 13 :	Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques et de l'EFT1 contre les bactéries pathogènes (<i>Klebsiella</i> sp, <i>Streptocoque coagulase négative</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	58
Tableau 14 :	La synergie entre les antibiotiques (Amoxypen et Gectapen) et l'extrait (EFT1).....	60
Tableau 15 :	Test de confrontation directe contre <i>Fisarium.solani</i> ; <i>Alternaria</i> sp. ; <i>Aspergillus</i> sp. ; <i>Fisarium. culmorum</i> par les deux souches bactériennes T1 et T2.....	62

Liste des abréviations

ATP :	Adénosine triphosphate
CAC :	Concentration critique d'agrégation
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
KDa :	Kilodalton
OH :	Radical hydroxyl
PL :	Phospholipides plaquettaires
ROS :	Espèces réactives oxygénées
RiPP :	peptides produits par le ribosome et modifiés après la traduction
LPs :	Lipopéptides
API 20 E :	Appareil et procédés d'identification 20 entérobactéries.
GN :	Gélose nutritive
LB :	Luria Bertani
PDA :	Potato Dextrose Agar
ABTS :	acide 2,2'-azinobis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
DPPH :	2,2-Diphényl-1-Picryl-Hydrazil
SNP :	Silvernanoparticle
µl :	Microlitre
EB :	Extrait brut
EF :	Extrait fengycine
BHA :	Butylhydroxyanisole
BHT :	Butylhydroxytoluène
TCK :	Concentration inhibitrice fractionnaire
TQ :	Temps de céphaline-Kaolin
FIC :	Test de coagulation de Quick

Introduction

1- Introduction

Le genre *Bacillus* se compose d'un grand nombre de bactéries *Gram* positives diverses, en forme de bâtonnets, souvent groupées en chaînettes ou séparées, aérobies ou anaérobies facultatives, formant des spores et très souvent mobiles. Il apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique que phénotypique, notamment au niveau respiratoire et métabolique, ainsi que dans sa distribution dans l'environnement (Claus et Berkeley., 1986 ; Gordon *et al.*, 1973). Ce sont des microorganismes ubiquitaires vivant dans le sol, l'eau (Ivanova *et al.*, 1998 ; Siefert *et al.*, 2000), l'air, les plantes et dans certains aliments fermentés (Ahaotu *et al.*, 2013 ; Ouaba *et al.*, 2008a).

En raison de leur capacité à produire des endospores, elles peuvent coloniser différentes niches écologiques et survivent dans plusieurs milieux différents. Les endospores peuvent survivre à des températures, pH et pressions osmotiques extrêmes, en plus de résister à la radiation et à la dessiccation. Ces bactéries représentent donc d'excellents candidats pour la formulation, l'entreposage et la commercialisation d'agents de lutte biologique (Shafi *et al.*, 2017).

Les bactéries du genre *Bacillus* sont incluses dans le groupe des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) en raison de leur capacité à solubiliser le phosphore et le potassium, ainsi qu'à produire des phytohormones et des sidérophores (Fan *et al.*, 2018) .

De plus, le genre *Bacillus* est de plus en plus étudié pour la biosynthèse de nombreuses biomolécules intéressantes comme les lipopéptides (les sufactines, les iturines, les fengycines) et autres molécules ayant une grande biodiversité structurale et fonctionnelle, ce qui rend ces molécules très intéressantes dans de nombreux domaines, notamment, en biothérapie. Il est à noter que, la plupart des espèces du groupe *Bacillus* sont non pathogènes à l'homme (GRAS, General recognized As Safe, en Anglais) (Parry *et al.*, 1983).

L'objectif principal de ce travail est la recherche *in vitro* des activités biologiques de différents extraits de deux souches bactériennes (T1 et T2) du genre *Bacillus* et leur exploitation dans la prévention et le traitement des nombreuses maladies.

Pour ce faire, plusieurs étapes s'avèrent nécessaires :

-Une synthèse bibliographique relative au genre *Bacillus* : généralités, classification, caractéristiques, ainsi que son application dans la biotechnologie grâce aux substances bioactives et leurs propriétés pharmacologiques a été élaborée.

-La partie matériel et méthodes est consacrée aux différentes approches illustrant, la réactivation et la vérification de l'aspect morphologique et biochimique des deux souches T1 et T2, mise en évidence des activités enzymatiques, extraction de substances bioactives et l'évaluation de

différentes activités biologiques à savoir : l'activité anticoagulante, activité anti-oxydante, activité antidiabétique, activité antibactérienne, activité synergique et l'activité antifongique.

-La partie résultats et discussion est portée sur la comparaison entre les recherches précédentes et celle obtenue dans la présente étude. Finalement, le mémoire se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives futures sur le thème étudié.

*Revue
bibliographique*

2- Revue bibliographique

2.1- Genre *Bacillus*

2.1.1- Généralités

Les *Bacillus* sont parmi les bactéries telluriques les plus communs et les plus prédominants, ils représentent 95% de la flore isolée et appartiennent au phylum des *Firmicutes*, ont été découvert pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn.

Le genre *Bacillus* englobe une variété d'espèces phénotypiquement hétérogènes comprend au moins 36 espèces, qui sont des bacilles unicellulaires à Gram positif, et catalase positif, oxydase négatif, mobiles sauf *Bacillus anthracis* (figure 01). Elles sont aérobies ou anaérobies facultatives et tirent leur énergie de la respiration ou la fermentation. En conditions défavorables les *Bacillus* sporulent et donnent des endospores qui sont très résistantes et désignent les formes au repos des bactéries dans le milieu extérieur et peuvent suivre deux cycles cellulaires distincts, ils sont capables de quitter leur cycle végétatif pour entrer en sporulation (figure 02). Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires, peuvent être conservés longtemps dans un endroit frais et sec (Carballido-Lopez et Formstone., 2007 ; Madigan et Martink., 2007).

La plupart des espèces de *Bacillus* ont été isolées d'espaces terrestres et aquatiques, notamment des sédiments marins, des lacs salés, des sols de terres agricoles du compost, et même des déserts. Il existe aussi des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles (Chen *et al.*, 2020 ; Prescott *et al.*, 2010). De plus ont un taux de croissance élevée et un système de synthèse efficace et sécrètent des protéines extracellulaires (Deb *et al.*, 2013). Certains d'entre elles ont des rôles utiles dans la biothérapie comme producteurs de substances antimicrobiennes telles que les antibiotiques, les lipopeptides, les bactériocines et sa production de ces substances antimicrobiennes et sa capacité à sporuler permettent aux *Bacillus* de vivre et de coloniser divers écosystèmes environnementales (Stein., 2005 ; Abriouel *et al.*, 2011).

Parmi les espèces du genre *Bacillus*, certaines provoquent des maladies chez l'homme et l'animal. Ces espèces pathogènes comprennent les *Bacillus licheniformis*, *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Les trois premières espèces affectent les humains et les animaux, tandis que la dernière est pathogène pour les invertébrés (Saxena *et al.*, 2020).

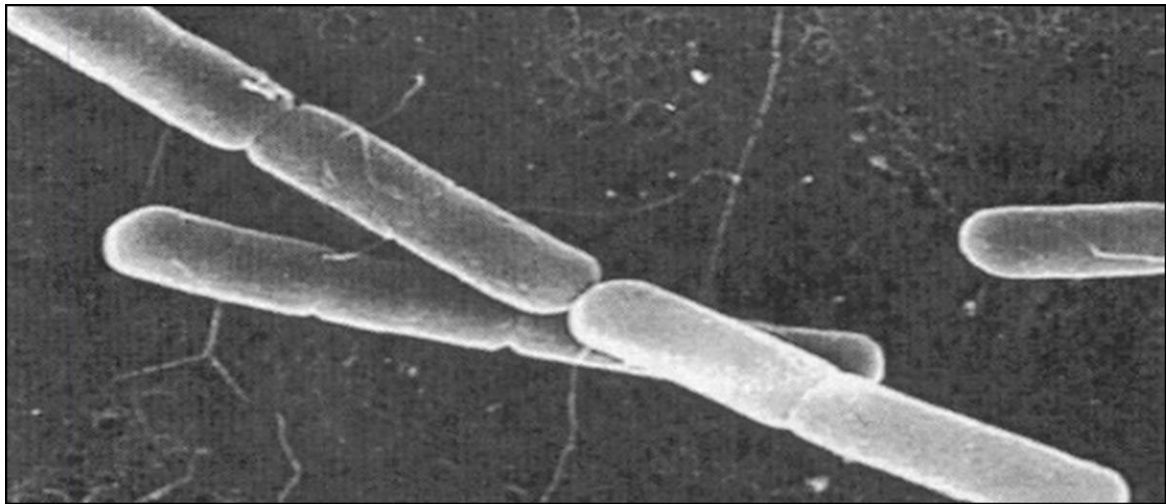


Figure 01 Observation microscopique d'une souche du genre *Bacillus* (Berraho., 2009).

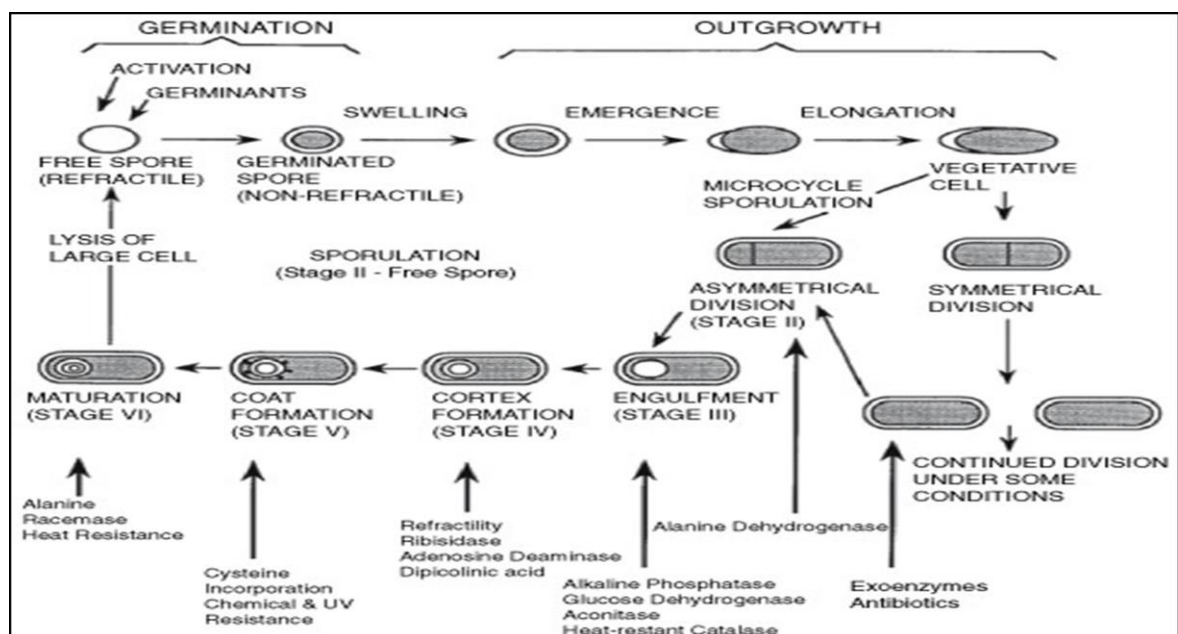


Figure 02 Cycle de germination, de croissance et de sporulation d'une bactérie sporulée typique (Slepecky et Hemphill., 2006).

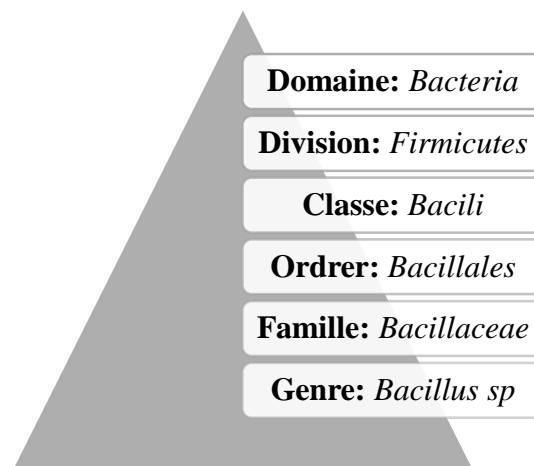
2.1.2- Classification phylogénie des *Bacillus*

L'intérêt que présentent les *Bacillus* pour les secteurs industriel, médical et agricole a suscité plusieurs travaux visant leur identification et classification. Les premières classifications phylogénétiques étaient basées sur les propriétés morphologiques et physiologiques. Puis, l'approche basée sur l'analyse d'une seule copie du gène de l'ARNr 16S a fait son apparition après les années 90. Jusqu'à présent, elle demeure l'une des approches d'identification et de classification la plus utilisée sur la base du gène de l'ARNr 16S, Wang et Sun. (2009) ont séparé les espèces du genre *Bacillus* en neuf groupes phylogénétiques distincts (Tableau 01).

Tableau 01 Classification des *Bacillus* selon Wang et Sun. (2009)

Groupe	Espèce
I	<i>B.pumilus, B.subtilis, B.safensis, B.licheniformis, B. mojavensis, B.altitudinis, B.aerophilus, B.sonorensis</i>
II	<i>B. anthracis, B.cereus, B. thuringiensis, B.megaterium</i>
III	<i>B. bataviensis</i>
IV	<i>B. infernus</i>
V	<i>B. indicus et B.litoralis</i>
VI	<i>B. macyae</i>
VII	<i>B. arsericus, B. berbericus</i>
VIII	<i>B. saliphilus</i>
IX	<i>B. salarius, B. halophilus</i>

Le genre *Bacillus* est à ce jour le genre le plus représenté sur les bases de données génomiques avec plus de 108 séquences du génome complet disponibles dans les bases de données. La hiérarchie taxonomique de *Bacillus* selon Bergey's. (2001) (figure 03) est la suivante :

**Figure 03** Classification des *Bacillus* (Bergey's 2001)

2.1.3- Ecologie

L'habitat principal du genre *Bacillus* est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote et qui partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Pseudomonas* et *Actinomyces*. La haute résistance des spores et la diversité de capacités physiologiques des formes végétatives aux facteurs physicochimiques, notamment en l'absence d'eau et de nutriments, à des températures élevées ou basses, en présence de rayonnement UV ou à un pH défavorable...etc, en font des bactéries très ubiquistes qui leur permet de vivre dans une large variété d'habitats défavorables tels que l'eau de mer, les profondeurs de la mer, les sédiments, les sols acides, basiques et neutres, riches ou pauvres en matière organique, du tube digestif des animaux, des denrées alimentaires périssables et des échantillons cliniques pendant de longues périodes sous des conditions environnementales défavorables (Andrea *et al.*, 2008 ; Garbeva *et al.*, 2003 ; Sansinena., 2019).

Ils font partie du microbiote des plantes et sont saprophytes sur le système racinaire des plantes par la sécrétion des exoenzymes comme les carbohydrases, et les protéases. Ces enzymes permettent la dégradation de cellulose, l'amidon, glucane, pectine, et les protéines. (Seldin *et al.*, 1998).

Les *Bacillus* sont isolés à partir des échantillons environnementaux par le processus de destruction thermique des cellules végétatives ou l'inactivation par l'éthanol puis les spores sont mises à germer. (Priest, 1993).

2.1.4- Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* représentent un groupe hétérogène de bactéries en forme de longs bâtonnets droit ou légèrement incurvés, à Gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, d'une longueur de 0.9 à 10.0 µm. Elles se présentent sous forme de cellules individuelles, ou en paires ou en longues chaînes (figure 04). Les représentants de ce genre peuvent être distingués en trois types : mobiles, péritriches ou polaires (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*) et immobiles (*Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*). Ces bactéries sont aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. (De vos *et al.*, 2009 ; Libudzisz *et al.*, 2009).

Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections, et les dessiccations...etc. Les spores se forment à l'intérieur de la cellule comme enfermées dans un génophore, avec une petite quantité de cytoplasme et de ribosomes avec une gaine multicouche faite de sucres et de protéines saturées de graisses, et entourée d'une membrane cellulaire. L'acide dipicolinique est un composant important

qui confère aux spores une résistance à la chaleur. Les autres facteurs qui facilitent la résistance des spores à des conditions indésirables sont la dormance métabolique profonde, le manque d'ATP et la présence de protéines SASP. Elles sont catalase positive, capables de croître sur des milieux ordinaires comme exemples la gélose nutritive. La morphologie de leurs colonies est très variables entre et aux seins des espèces, et qui a été affecté par la composition du milieu de culture et les conditions d'incubations. Mais malgré cette diversité, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficiles à identifier (De vos *et al.*, 2009 ; Gordon *et al.*, 1973 ; Smith et clark., 1973).

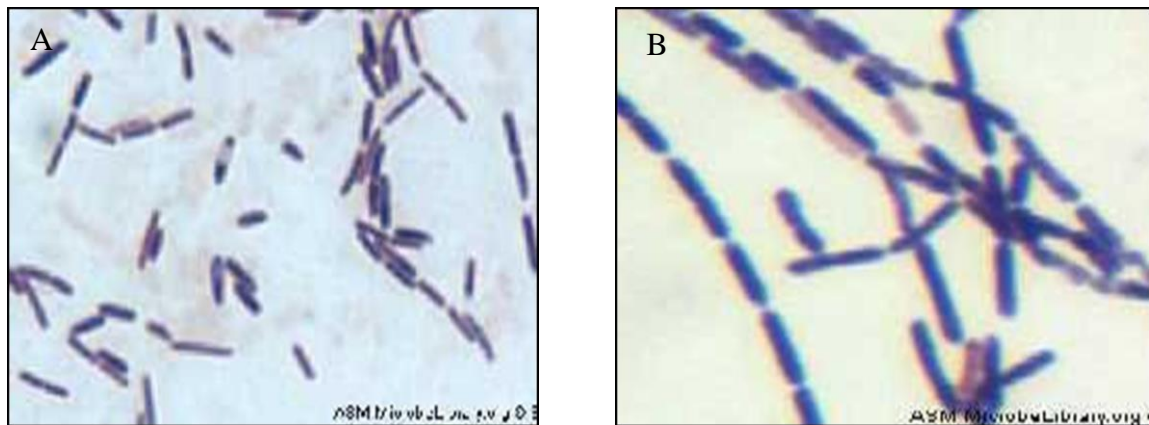


Figure 04 Coloration de gram de ; A : *Bacillus subtilis* et B : *Bacillus cereus* (Smith, 2005).

2.1.5- Caractères physiologiques

En raison de leur grande diversité génétique, ces bactéries présentent un large éventail de caractéristiques physiologiques et métaboliques et par conséquent, elles peuvent être différenciées en souches psychrophiles, thermophiles, acidophiles, alcalinophiles, ou résistantes au sel et halophiles. Les *Bacillus* peuvent également être classés comme chimioorganotrophes, à l'exception de deux espèces qui sont des chimiolithotrophes facultatifs. De plus, les besoins nutritionnels des souches au sein de l'espèce varient considérablement. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Certaines souches sont prototrophes et ne nécessitent qu'une seule source de carbone organique, tandis que d'autres sont auxotrophes et dépendent du substrat pour les composés organiques importants. La matière organique, quant à elle, est métabolisée par la respiration aérobie, la fermentation ou une combinaison des deux processus. Ils peuvent sécréter des enzymes extracellulaires qui vont dégrader du substrat organique animal ou végétal (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...). Ils produisent des molécules bioactives tels que les antibiotiques et les peptides de signal. A cause de cette variabilité physiologique, nos

connaissances sur la distribution écologique du *Bacillus* sont très insignifiantes (Holt *et al.*, 1994 ; Logan et De vos.,2009).

2.1.6- Application des *Bacillus* dans la biotechnologie

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien présentant un intérêt crucial en biotechnologie. Ces bactéries sont connues pour produire d'importants antibiotiques, probiotiques et enzymes qui ont diverses applications industrielles. On attribue près de 60% de la production commerciale d'enzymes au genre *Bacillus*, avec des revenus annuels de plus de 3 milliards de dollars américains répartis dans la production, entre autres, de textiles, breuvages et détergents (Islam *et al.*, 2017). A titre d'exemple les alpha-amylases produites par les bactéries du genre *Bacillus* sont utilisées pour convertir l'amidon en fructose (un intermédiaire pour la préparation de boissons sucrées) (Cubitto *et al.*, 2004). Les protéases intra et extracellulaires, qui sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires et pharmaceutiques, dans les industries de tannage de cuir et dans la gestion des déchets (Gupta *et al.*, 2002 ; Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009). *B. safensis* est reconnue pour produire les protéases et bien d'autres enzymes comme les lipases et cellulases (Agbaje *et al.*, 2016). Ces bactéries sont aussi utilisées en biorestauration des sols contaminés par des résidus de pesticides, de colorants et d'hydrocarbures polycycliques, en raison de leur production de biosurfactants et d'enzymes qui accélèrent la solubilisation de ces composés (Cubitto *et al.*, 2004). Les *Bacillus* sont également impliquées dans la production de métabolites primaires tels que les vitamines et les ribonucléosides et de métabolites secondaires comme les bactériocines et les biosurfactants. En effet, les biosurfactants produits par le genre *Bacillus*. Sont utilisés dans l'industrie pétrolière, pharmaceutique et alimentaire. Ces biosurfactants peuvent être des glycolipides, des lipopeptides, des lipopolysaccharides et des glycoprotéines (Makkar RS *et al.*, 2011). Parmi ces derniers, les lipopeptides sont les meilleurs comprenant entre autres la surfactine, l'iturine, la fengycine, la lichenysine, la mycosubtiline et bacilomycine (Maier RM., 2003). Les lipopeptides sont connus pour avoir des activités antibactériennes, antivirales, et permettent également de lutter contre les tumeurs (Cameotra *et al.*, 2004). Il a été clairement démontré que les biosurfactants ont des applications thérapeutiques intéressantes, avec notamment la surfactine qui est le lipopeptide le plus étudié (Stein T., 2005). Elle est en particulier attrayante pour plusieurs applications médicales. Ses activités biologiques ont été démontrées comprenant l'inhibition de la fibrine dans la formation des caillots et donc constitue un moyen de lutte contre les maladies cardiovasculaires comme les thromboses, elle a aussi des activités antivirale, anti-inflammatoire et antitumorale (Rodrigues *et al.*, 2006). Il a été rapporté que *B. pumilus* produit aussi la surfactine

(Slivinski *et al.*, 2012), ce qui supposerait que cette bactérie a aussi des propriétés dans les applications thérapeutiques. Certaines souches de *B. pumilus* possèdent des propriétés probiotiques pour l'humain et les animaux et peuvent également éliminer les insectes nuisant aux plantes (Perez *et al.*, 2011). Cette bactérie pourrait servir dans la formulation des biopesticides.

Le *B. safensis* est connue pour produire les nanoparticules ayant des propriétés anticoagulantes, anti-thrombotiques et permettent de lutter contre les candidoses (Agbaje *et al.*, 2016). Ces capacités uniques de *B. safensis* font d'elle un candidat idéal pour diverses applications biotechnologiques (Lateef *et al.*, 2015). Ainsi, elle est applicable en tant que bactérie favorisant la croissance des plantes (Kothari *et al.*, 2013), mais également comme probiotique (Nath *et al.*, 2012). C'est pourquoi les *Bacillus* constituent d'excellents candidats comme agents de lutte biologique, et présentent des bons profils dans la biothérapie.

2.2- Molécules bioactives des *Bacillus*

2.2.1- Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par des ribosomes produits à la fois par des bactéries Gram-positives et Gram-négatives qui inhibent la croissance de souches bactériennes similaires ou étroitement apparentées. Un certain nombre de bactériocines provenant d'une grande variété de bactéries sont découvertes et leurs diverses structures sont décrites. Les bactériocines ont des structures, des modes d'action, des mécanismes de biosynthèse et d'auto-immunité, ainsi qu'une régulation des gènes différents. Ils sont considérés comme des substances naturelles attrayantes à utiliser dans les industries pharmaceutiques et alimentaires pour prévenir la croissance de bactéries pathogènes et l'altération des aliments. Les gènes codant pour les bactériocines, est un ensemble de protéines immunitaires et d'autres protéines auxiliaires, sont organisés en opérons localisés dans le chromosome en anneau, les plasmides ou d'autres éléments génétiques mobiles. Ces grappes de gènes sont généralement inductibles et nécessitent la sécrétion et l'accumulation extracellulaire de peptides pour l'induction (Zimina *et al.*, 2020).

Les bactériocines sont produites sous forme d'un prépeptide non biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production est souvent régulée par un système de *Quorum Sensing*, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne (Dortu et Thonart., 2009).

Ils sont subdivisés en trois classes, les peptides produits par le ribosome et modifiés après la traduction (RiPP), les bactériocines non modifiées et les grandes protéines antimicrobiennes (Zahae et Kuipers, 2016).

2.2.2- Lipopeptides (LPs) : métabolites polyvalents

2.2.2.1- Généralités

Une large gamme de biosurfactants naturels structurellement différents synthétisés par les microorganismes a été identifiée à ce jour, y compris, les lipopeptides, les lipoprotéines, les glycolipides, les polysaccharides et les protéines, ou leurs mélanges (Muthusamy *et al.*, 2008). Les biosurfactants lipopeptidiques (LPs) sont des molécules amphiphiles composés d'une queue lipidique liée à un court oligopeptide linéaire ou cyclique. Ils sont produits par des champignons, dont *Aspergillus*, et divers genres bactériens tels que *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Bacillus*, *Paenibacillus* principalement. Ils forment une famille polyvalente de métabolites secondaires avec un intérêt croissant dans divers applications environnementales, industries alimentaires et pharmaceutiques par leurs propriétés antimicrobiennes, antitumorales, cytotoxiques, immunosuppressives et tensioactives (Wang *et coll.*, 2014). Les (LPs) sont considérés comme des agents de lutte biologique utilisés comme alternative aux pesticides chimiques, qui génèrent de négatifs impacts environnementaux, sélectionnant des ravageurs résistants et contaminant l'environnement (Torres *et al.*, 2017). Il existe un vaste corpus d'information sur la biodiversité de leur structure et de leur propriétés fonctionnelles (Coutte *et al.*, 2017). La synthèse des LPs est effectuée par une voie indépendante du ribosome, en utilisant de grands complexes multienzymatiques (multi-modulaires) appelés synthétases ou «Non Ribosomal Peptides Synthetase (NRPS)» qui sont des enzymes organisées en modules et remarquables par leur masse élevée (5.106 Da). Le principal mode d'action proposé des LPs est constitué à la formation de pores dans les membranes, ce qui entraîne un déséquilibre des flux ioniques transmembranaires et la mort cellulaire (Pirri *et al.*, 2009).

Le genre *Bacillus* est connu comme le producteur le plus populaire et le plus efficace des lipopeptides, et en particulier : les surfactines, les fengycines et les iturines différentes en fonction de leur séquence d'acides aminés (de França *et al.*, 2015).

2.2.2.2- Structure

Les lipopeptides cycliques produits par le genre *Bacillus* sont principalement classés en 03 familles, iturine, fengycine, surfactine, et autres familles secondaires tels que kurstakins (Jacques, 2011) et les locillomycines (Luo *et al.*, 2015a). Le fait qu'ils soient majoritaires, par rapport aux (LPs) linéaires, pourrait s'expliquer par leur plus faible liberté de conformation tridimensionnelle. En effet, la cyclisation de la partie oligopeptidique leur confère une bonne stabilité, condition primordiale pour assurer une activité biologique efficace et considérable (Sieber et Marahiel, 2003).

✓ Famille des iturines

La famille des iturines a été découverte par Delcambe (1950). Son nom est lié à l'Ituri, une région du Congo où le composé a été isolé à partir d'un échantillon du sol. Elle est constituée des six principaux variants, les iturines A et C, les bacillomycines D, F et L et la mycosubtiline. Dans tous les cas, l'heptapeptide cyclique est attaché à une chaîne d'acides gras β -aminés de longueur variable (C₁₄-C₁₇) cela est représenté dans le tableau (02) et la figure (05). Les iturines sont aussi similaires à des surfactines, dont la chaîne d'acides gras est impliquée dans le processus de cyclisation mais, en raison de sa nature β -aminée, une liaison amide se forme avec le groupe C-terminal, donnant une structure macrolactame (Pathak et Keharia., 2014), avec 7 α acides aminés et un seul β -acide aminé gras (Isojai *et al.*, 1982). Tous les antibiotiques ituriniques sont partagés certaines caractéristiques structurelles communes ; le cycle peptidique est caractérisé par une séquence chirale d' α -aminoacides constante des résidus (LDDL₁LDL), avec les trois premiers acides aminés correspondant à un motif conservé (L-Asx₁ D-Tyr₂ D-Asn₃), et les quatre de ces derniers constituant le fragment peptidique sont variables, selon le composé (Théâtre *et al.*, n.d.). La masse moléculaire de ces antibiotiques varie de 1021 à 1099 Da, ce qui correspond à la masse la plus faible parmi les (LPs) (Guez., 2007). Ces lipopeptides sont des agents antifongiques à large spectre et possèdent une activité antimicrobienne réduite (Arrebola *et al.*, 2010).

✓ Famille des surfactines

Un composé exo-cellulaire avec une activité biosurfactante exceptionnelle a été isolé en 1968, par Arima *et al* à partir du surnageant d'une culture de *Bacillus subtilis*. Le composé a été nommé surfactine en raison de son activité exceptionnelle de surface et sa structure a été élucidée comme celle d'un lipopeptide (Kakinuma *et al.*, 1968).

La surfactine est un lipopeptide cyclique relié à une chaîne d'acide gras β – hydroxylée dont la longueur de la chaîne carbonique varie de (C₁₂ – C₁₆). La chaîne peptidique est composée de la séquence d'acides aminés suivante : Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, donnant la configuration LDDL₁LDL (Coutte., 2009), cela est représenté dans le tableau (02) et la ; figure (05). Le type de surfactine peut également varier en fonction de l'ordre des acides aminés et de la taille de la partie lipidique (Korenblum *et al.*, 2012). Elle forme ainsi un cycle de macrolactone, dont la fermeture du cycle est catalysée entre l'acide gras β -hydroxyle et le peptide C-terminal (Raaijmakers *et al.*, 2010). Les acides aminés hydrophobes de la molécule de surfactine sont situés aux positions 2, 3, 4, 6 et 7 tandis que les résidus Glu et Asp sont situés aux positions 1 et 5, respectivement, introduisant deux charges négatives pour la molécule (Seydlová et Svobodová., 2008). Leur séquence d'acides aminés peut présenter des modifications aux positions 2, 4 et 7 (Caulier *et al.*,

2019). Il existe différentes variantes peptidiques : Surfactine A, B et C avec la seule diversité possible au niveau de l'acide aminé n°7 : L-Leu, L-Valou bien L-Ile, respectivement (Price *et al.*, 2007), et différentes variantes lipidiques avec différentes longueur de chaînes d'acide gras variant de C12 à C16, au sein du même isoforme, l'acide gras peut exister sous forme de trois structures différentes : normale, iso ou anteiso (Seydlová et Svobodová., 2008). La surfactine est un biosurfactant puissant ; il exerce une action détergente sur les membranes biologiques (Carrillo *et al.*, 2003) et se distingue par ses exceptionnelles activités biologiques d'innombrables, y compris des propriétés antibactériennes, antivirales, anti-adhésives et anti-inflammatoires...etc. Malgré l'immense potentiel d'applications commerciales, thérapeutiques et environnementales, son utilisation est encore limitée en raison de son coût élevé de production et de récupération (Das et al. 2008).

✓ Famille des fengycines

La troisième famille des lipopeptides a été isolée pour la première fois à partir de souches de *B. subtilis* et de *B. cereus* , puis elle a révélé être des composés identiques (Honma *et al.*, 2012). Plusieurs études ont rapporté sa production à partir d'autres espèces de *Bacillus* (Arguelles-Ben Ayed *et al.*, 2014). Les fengycines ou plipastatines sont des molécules bioactives décapeptidique composés de 10 acides aminés dont 8 sont cyclisés par une liaison lactone (Tyr, Thr, Glu, Ala, Pro, Gln, Tyr et Ile) et reliés à un β -hydroxy acide gras qui peut être saturé ou insaturé, La longueur de leur chaîne d'acide gras peut varier de C14 à C21 atomes de carbone (tableau 02 ; figure 05) (Pathak *et al.*, 2012). À ce jour, une grande hétérogénéité structurelle a été signalée dans la famille des fengycines. Cette biodiversité est générée par des variations à la fois dans la longueur et la ramification du fragment d'acide gras β -hydroxylé et dans la composition de la chaîne d'acides aminés partiellement cyclique. Les fengycines A et B ont été signalées comme les deux principales classes de fengycine, différant par leur sixième acide aminé de la chaîne peptidique, la fengycine A contient Ala en position 6 qui est remplacée par Val dans le cas de la fengycine B (Vanittanakom et Loeffler., 1986). Les fengycines sont des lipopeptides antifongiques, qui agissent à des faibles concentrations, affectant l'intégrité des membranes biologiques d'une manière dépendante du rapport molaire (Patel *et al.*, 2011).

Tableau 02 Diversité structurelle des surfactines, iturines et fengycines produites par les *Bacillus*. (Roongsawang *et al.*, 2011).

Famille	Séquence d'acides aminés	Acide gras (FA)
Surfactines		
Surfactine	FA-β-OH-L-E-L-L-D-L-L-V-L-D-D-L-L-L	C12-C17
Pumilacidine	FA-β-OH-L-E-L-L-D-L-L-L-L-D-D-L-L-L/I	
Lichenysin	FA-β-OH-L-Q-L-L-D-L-L-V-L-D-D-L-L-L/I	
Iturines		
Iturine A	FA-β-NH ₂ -L-N-D-Y-D-N-L-Q-L-P-D-N-L-S	C14-C17
Iturine C		
Bacillomycine L	FA-β-NH ₂ -L-D-D-Y-D-N-L-Q-L-P-D-N-L-S FA-β-NH ₂ -L-N-D-Y-D-N-L-S-L-E-D-S-L-T	
Bacillomycine D	FA-β-NH ₂ -L-N-D-Y-D-N-L-P-L-E-D-S-L-T	
Bacillomycine F	FA-β-NH ₂ -L-N-D-Y-D-N-L-Q-L-P-D-N-L-T	
Mycosubtiline	FA-β-NH ₂ -L-N-D-Y-D-N-L-Q-L-P-D-S-L-N	
Fengycines		
Fengycine A	FA-β-OH-L-E-D-Orn-D-Y-D-T-L-Q-D-A-L-P-L-N-L-Y-L-I	C14-C18
Fengycine B	FA-β-OH-L-E-D-Orn-D-Y-D-T-L-Q-D-V-L-P-L-N-L-Y-L-I	
Plipastatine A/B	L-[Y] ³ ; D-[Y] ⁹	

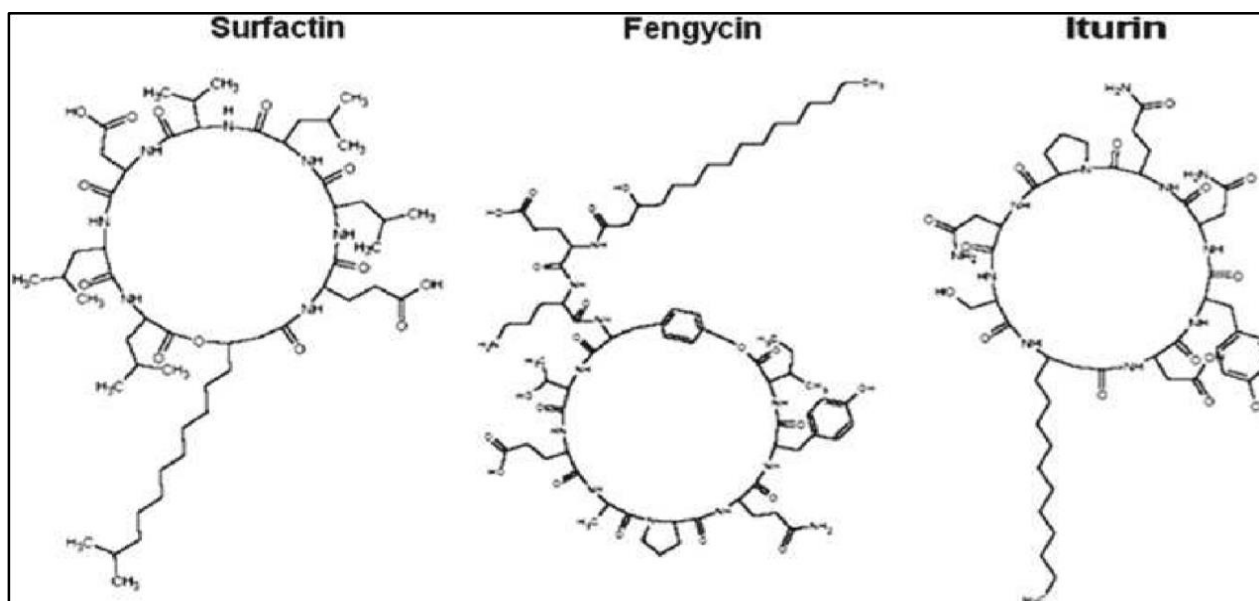


Figure 05 Structure détaillée de la surfactine, de la fengycine et de l'iturine (Jacques., 2011).

2.2.2.3- Propriétés des lipopeptides

Les lipopeptides produits par le genre *Bacillus* de par leur caractère amphiphile et leur nature peptidique présentent un certain nombre de propriétés qui en font leur intérêt. On peut classer ces propriétés en deux catégories : les propriétés physico-chimiques dont les plus importantes sont les propriétés tensioactives et les propriétés biologiques.

2.2.2.3.1- Propriétés physico-chimiques

La structure amphiphile des lipopeptides produits par le genre *Bacillus*, confère des propriétés physico-chimiques intéressantes, dont la réduction de la tension superficielle et la capacité d'auto-assemblage. Certains sont également capables de se lier aux ions. La distribution des fractions hydrophobes et hydrophiles, la présence de charges, ainsi que la forme cyclique ou linéaire de la partie peptidique, le type de fermeture de cycle, et la longueur et la configuration de la partie lipidique affectent fortement ces propriétés (Théâtre *et al.*, n.d.).

Les lipopeptides ont la capacité de réduire la tension superficielle ou interfaciale entre un gaz et un liquide ou entre deux liquides non miscibles, respectivement. Cette caractéristique est en corrélation avec les propriétés moussantes ou émulsifiantes du tensioactif. Les lipopeptides de la famille des surfactines sont les plus actifs pour réduire la tension superficielle (γ) de l'interface air-eau dont la valeur est entre [29 ,56] mN/m (Ishigami *et al.*, 1995). Tandis que les lipopeptides ituriniques présentent globalement un pouvoir de réduction inférieur à celui de la famille des

surfactines, avec des valeurs de γ comprises entre [46, 55] mN/m à l'interface air-eau (Thimon *et al.*, 1992) (tableau 03), Formant les deux un complexe à un rapport molaire surfactine-iturine de (2,3) qui exerce un effet synergique sur la réduction dynamique de la tension superficielle (Razafindralambo *et al.*, 1997). Pour les fengycines, l'activité de surface n'a pas été étudiée de manière approfondie. Un mélange d'homologues de la fengycine A et B a une capacité de réduction de la tension superficielle air-eau entre celles des familles de surfactine et d'iturine (Shakerifard *et al.*, 2009). Ainsi que, le kurstakin a des performances tensioactives comparables à celles de la surfactine (Diallo *et al.*, 2019) et aucune donnée n'est disponible pour la locillomycine et les autres lipopeptides produits par le genre *Bacillus*. De plus, il a également été démontré que certains lipopeptides modifient l'hydrophobicité de surface de leurs bactéries productrices et, par conséquent, affectent l'adhésion bactérienne aux surfaces solides, tels que, L'effet de la surfactine et de l'iturine A sur l'hydrophobicité de surface de *B. subtilis* (Ahimou *et al.*, 2000).

Une autre capacité des lipopeptides à s'auto-assembler dans des milieux aqueux à un seuil de concentration défini appelé concentration critique d'agrégation (CAC). Dans la plupart des cas, l'auto-assemblage est une micelle en forme de sphère dont le (CAC) peut être nommé (CMC) pour la concentration micellaire critique (Carolin *et al.*, 2021). Parmi les trois principales familles de lipopeptides cycliques produits par *B. subtilis*, la fengycine a la valeur de CMC la plus faible, suivie de la surfactine et de l'iturine A (Shakerifard *et al.*, 2009) (tableau 03). L'effet synergique entre la surfactine et l'iturine A observé pour la réduction de la tension superficielle n'a pas été observé pour la propriété d'auto-assemblage (Razafindralambo *et al.*, 1997). Le Kurstakin a une propension plus faible à l'auto-association (Diallo *et al.*, 2019) et aucune donnée n'a été trouvée pour les autres lipopeptides produits par les *Bacillus*. Certains lipopeptides peuvent se lier à des ions, ce qui peut être bénéfique pour la décontamination d'un sol ou d'une eau polluée, par leur présence de charges électrostatiques dans le cycle peptidique, l'encombrement stérique du cation et la taille de la griffe formée par les deux chaînes latérales acides. Comme la surfactine est en effet capable de se lier aux cations divalents, et cette propriété est dépendante du pH (Bonmatin *et al.*, 2003).

En raison de ces propriétés physicochimiques, ces lipopeptides présentent des applications prometteuses, principalement dans le secteur environnemental en tant qu'activateur de récupération d'huile, activateurs xénobiotiques de la biodégradation des hydrocarbures ou en tant que métal récupère du sol ou de l'eau, et dans les domaines pharmaceutiques pour la formulation de microémulsions stables pour l'administration de médicaments (Carolin *et al.*, 2021) (Figure 06).

Tableau 03 Concentration micellaire critique (CMC) et tension superficielle à la concentration micellaire critique (γ_{CMC}) des principaux lipopeptides produits par *Bacillus* sp. à une interface air-eau

Lipopeptides	CMC (μ M)	γ_{CMC} (mN/m)	Référence
Surfactine (mélange d'homologues)	9-220	30-31	(Bonmatin <i>et al.</i> , 2003 ; Grangemard <i>et al.</i> , 2001 ; Thimon <i>et al.</i> , 1992)
Surfactine linéaire C14	374	36-37	(Dufour <i>et al.</i> , 2005)
Surfactine C13	83.6	36.4	(Deleu <i>et al.</i> , 2003 ; Razafindralambo <i>et al.</i> , 2004)
Surfactine C14	65.1	33.5	(Deleu <i>et al.</i> , 2003 ; Razafindralambo <i>et al.</i> , 2004)
Surfactine C15	19.5	31.9	(Deleu <i>et al.</i> , 2003 ; Razafindralambo <i>et al.</i> , 2004)
Lichensisine	22	29	(Bonmatin <i>et al.</i> , 2003 ; Grangemard <i>et al.</i> , 2001)
Pumilaccidine C14	94	56	(De Araujo., 2019)
Iturine A (mélange d'homologues)	43	54.5	(Thimon <i>et al.</i> , 1992)
Iturine A C14	141	45.4	(Razafindralambo., 1986)
Iturine A C15	88	45.6	(Razafindralambo., 1986)
Iturine A C16	79	41.9	(Razafindralambo., 1986)
Iturine A C17	68	38.3	(Razafindralambo., 1986)
Mycosubtiline	37	55	(Thimon <i>et al.</i> , 1992)
Bacillomycine D	170	53	(Thimon <i>et al.</i> , 1992)
Bacillomycine F	27	50.5	(Thimon <i>et al.</i> , 1992)
Iturine C	80	49.6	(Thimon <i>et al.</i> , 1992)
Bacillomycine L	160	46	(Thimon <i>et al.</i> , 1992)
Fengycine (mélange A ,B et homologues)	4.6	43	(Shakerifard <i>et al.</i> , 2009)
Kurstakin	162	33	(Ishigami <i>et al.</i> , 1995)

2.2.2.3.2- Propriétés biologiques

Les lipopeptides de *Bacillus* ciblent en particulier les membranes cellulaires, dans lesquelles ils s'insèrent au travers de leur chaîne d'acide gras. Les mécanismes d'intégration ainsi que les paramètres qui les influencent sont distincts selon la famille de lipopeptides considérée (Gonzalez-Jaramillo *et al.*, 2017). L'intégration des lipopeptides au sein de la membrane microbienne entraîne sa perméabilisation et la formation de pores et de canaux, conduisant à une fuite d'électrolytes. Les effets des lipopeptides sur les cellules et spores fongiques peuvent, selon la concentration, aller de la modification structurelle (morphologie inhabituelle), à la lyse, voire à la dégradation complète des hyphes (Falardeau *et al.*, 2013). Le mode d'action des lipopeptides repose essentiellement sur leur caractère amphiphile (Deleu *et al.*, 2008). Cette propriété est à la base de la plupart de leurs activités biologiques, y compris les activités antimicrobiennes et antivirales, anticancéreuses, anti-inflammatoires et immunomodulatrices et la capacité à induire une résistance systémique chez les plantes (Figure 06) (Théâtre *et al.*, n.d.).

Les iturines

Les Iturines sont fortement hémolytiques et montrent de ce fait une forte action antifongique *in-vitro* sur une large variété de moisissures et champignons mais une action antibactérienne limitée et aucune activité virale. L'effet antifongique est basée sur une perturbation osmotique en raison de la formation de pores conducteurs d'ions (Arrebola *et al.*, 2010), ont observé par microscope optique que les iturines ont la faculté de provoquer le gonflement des spores et leur éclatement chez certaines espèces de champignons, tels que, *Rhizoctonia sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, et *Pyricularia Sp.* (Seunghyun *et al.*, 2013). En plus de leur activité antifongique, il a été démontré qu'ils induisent des réponses de défense chez les plantes (Wu *et al.*, 2018). Elles peuvent donc constituer une alternative très intéressante à l'utilisation des antifongiques chimiques en tant que biofongicides. L'activité antibactérienne des iturines a toujours été décrite comme réduite à quelques souches que sont *M. luteus* et *Sarcinalutea* (Besson *et al.*, 1979). Cependant, très récemment, une activité inhibitrice de l'iturine contre *Salmonella* a été décrite par Huang *et al.*, (2009). Les membranes cytoplasmiques semblent être la première cible de ces lipopeptides qui interagissent avec les lipides membranaires.

Les surfactines

Les surfactines possèdent d'innombrables propriétés biologiques. Elles sont reconnues comme étant des antibiotiques ayant des propriétés antimicrobiennes qui peuvent inhiber le processus de développement des autres bactéries et des propriétés hémolytiques qui se manifestent par la lyse

des cellules bactériennes *Gram+* et *Gram-* et celle des érythrocytes humain *in vitro* (Aleti *et al.*, 2016). En outre, des activités antivirales, antitumorales, hypocholestérolémiantes, antifongiques, antimycoplasmiques et inductrices dans des mécanismes de résistance des plantes contre les pathogènes (Cawoy *et al.*, 2014). Bien que de telles propriétés des surfactines les qualifient pour des applications potentielles en médecine ou en biotechnologie, elle sont été identifiée aussi comme un inhibiteur capables d'inhiber la dénaturation des protéines et la coagulation du sang par le blocage de la formation de caillots de fibrine (Rodrigues *et al.*, 2006). Elles peuvent être utilisées en bio-remédiation pour la dépollution des sols et ont des effets synergiques sur l'activité antifongique de l'iturine A et de la Fengycine (Ongena et Jacques., 2008). Une autre activité intéressante sur le plan environnemental est leur faculté de dégrader les hydrocarbures (Kosaric., 2005). L'halobacilline qui a été isolée récemment d'un *Bacillus* des fonds marins présente une activité cytotoxique modérée contre les cellules cancérigènes humaines (Trischman *et al.*, 1994). Très récemment, un lipopeptide surfactant produit par *B. subtilisnattoa* été testé présentant une activité antimicrobienne contre *Salmonella* Thyphimurium, *Micrococcusluteus* et *Staphylococcus aureus* (Cao *et al.*, 2009). Les surfactines ont également montré une capacité à stériliser *Escherichia coli* et à inactiver les spores de *B. cereus* (Huang *et al.*, 2007).

Les fengycines

Le mécanisme d'action des fengycines est moins bien connu par rapport aux autres lipopeptides. Cette famille est spécifiquement active contre les champignons filamenteux et inhibe les fonctions des enzymes, la phospholipase A2 et l'aromatase, modifiant la structure et la perméabilité de la membrane cellulaire (Patel *et al.*, 2011). Les effets de la fengycine sur les membranes biologiques dépendent de la concentration, mais finalement des concentrations élevées perturbent complètement les membranes (Deleu *et al.*, 2005). Les fengycines sont des éliciteurs de la défense des plantes et se sont révélées efficaces contre de nombreux champignons, notamment *Magnaporthe grisea*, *Plasmodiophora brassicae*, *Botryosphaeria dothidea* *C. gloeosporioides* (Kim PI et Kim YH., 2010) et un certain nombre d'autres champignons. La capacité de diverses souches des *Bacillus* à contrôler les maladies fongiques, foliaires et post-récolte a été attribuée principalement aux iturines et aux fengycines (Arrebola *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces lipopeptides pourraient donc être utiles dans le traitement de certaines maladies neurologiques et on a montré récemment que les fengycines diminuent la prolifération cellulaire dans diverses lignées de cellules cancéreuses, y compris la lignée cellulaire de cancer du poumon humain 95 D *in vitro* et *in vivo* (cellules 95D xénogreffées chez des souris) (Yin *et al.*, 2013).

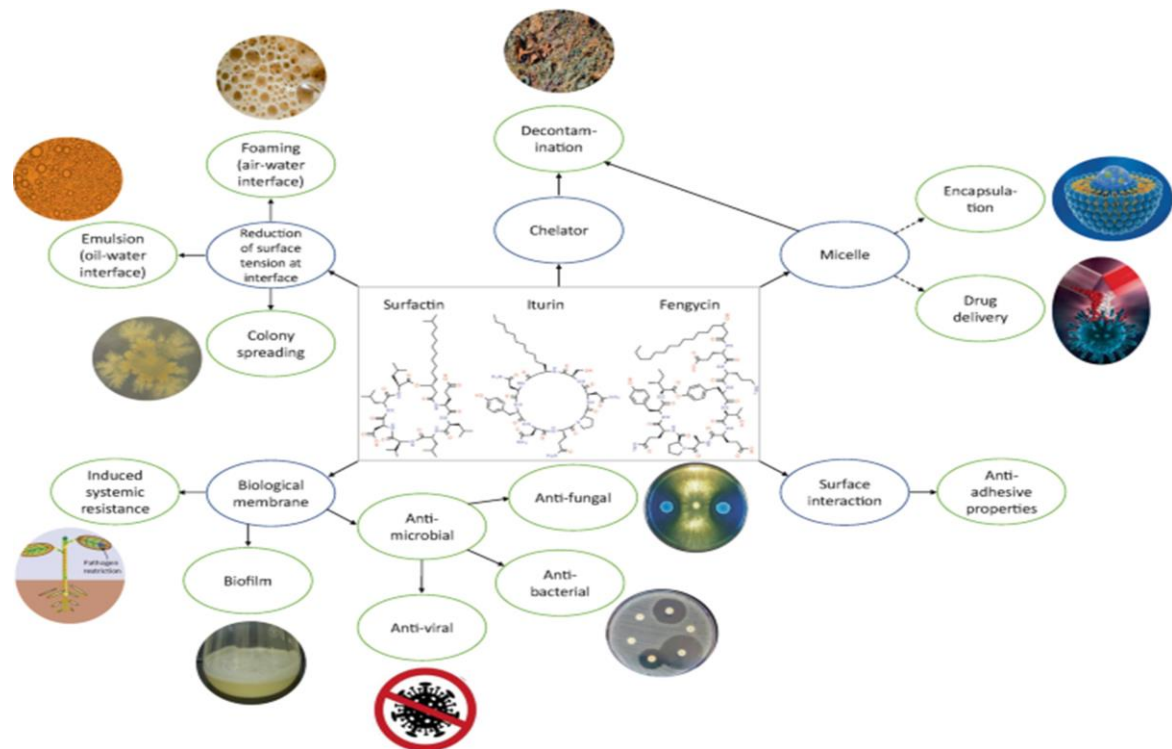


Figure 06 Représentation schématique du lien entre les propriétés physicochimiques (en bleu) des lipopeptides produits par *Bacillus* sp. Et leurs propriétés biologiques (en vert). Les lignes pointillées représentent une application biologique potentielle (Théâtre *et al.*, n.d.)

2.2.3-Les enzymes thérapeutiques

Les enzymes microbiennes sont des produits biopharmaceutiques employées dans le secteur de la santé en tant qu'agents thérapeutiques et diagnostiques pour lutter contre les troubles humains. Divers états pathologiques sont connus pour être associés à une activité enzymatique diminuée ou à une déficience de celle-ci. Les enzymes offrent des avantages tels qu'une grande spécificité de substrat et affinité, catalyse efficace avec une toxicité réduite et des effets secondaires minimes. La catalyse enzymatique permet la conversion simultanée de plusieurs cibles, y compris des promédicaments en produits souhaités, permettant l'administration de plus petites quantités de thérapeutiques. Elles sont économiques, cohérentes et pratiques à isoler avec des rendements élevés sur un milieu peu coûteux dans une période de temps plus courte (Li., 2018 ; Yari *et al.*, 2017). Les microorganismes du genre *Bacillus* possèdent de bons systèmes d'exportation de protéines et peuvent produire certaines enzymes extracellulaires thérapeutiques type amylases, cellulase, lipase, xylanases ou protéases...etc. à des concentrations de l'ordre de 20 à 25 g/L (Schallmeyer *et al.*, 2004). Ces performances placent ces microorganismes parmi les plus importants producteurs d'enzymes industrielles.

2.2.3.1- Alpha-amylases

Les alpha-amylases sont des endoenzymes dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60KDa, capables de dégrader l'amidon en monosaccharides. Elles sont produites par un large spectre bactérien tel les *Bacillus. Subtilis B. cereus et B. megaterium* (Verma *et al.*, 2011 ; Feillet., 2000).Elles trouvent des applications très diverses dans les secteurs de la détergence, de l'alimentaire, des bioénergies, de l'industrie du papier, des colles, ou encore de l'industrie pharmaceutique comme, la takadiastase d'*Aspergillus oryzae* qui est utilisée comme aide digestive dans le traitement de la dyspepsie résultant d'une dégradation incomplète de l'amidon. Les amylases ou diastases fongiques sont utilisées commercialement dans diverses aides digestives tels que les comprimés Unizyme®, Pepmax®, Zymtase®, Pepfiz®... etc.(Vachher *et al.*, 2021).

2.2.3.2- Protéases

Les protéases sont des enzymes protéolytiques hydrolysent les liaisons peptidiques dans les protéines et les peptides (Gurumallesh *et al.*, 2019). Elles sont produites par de nombreuses microbes tel que le genre *Bacillus qui* est probablement la source bactérienne la plus importante de protéases et est capable de produire des rendements élevés d'enzymes protéolytiques neutres et alcalines avec des propriétés remarquables, telles qu'une résistance élevée aux températures extrêmes, au pH, aux solvants organiques et aux agents oxydants et toxiques (Contesini *et al.*, 2018). Les protéases de *Bacillus* ont des applications potentielles dans les industries agricoles et pharmaceutiques, en particulier dans la thérapie thrombolytique et le traitement des maladies neurodégénératives et contre des maladies mortelles, telles que le cancer et le SIDA (Razzaq *et al.*, 2019).

Ces protéases microbiennes sont préférées aux protéases végétales et animales en raison de la présence de toutes les caractéristiques souhaitées pour les applications industrielles (Sathishkumar *et al.*, 2015).

2.2.3.3- Cellulases

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de la dégradation de la cellulose dans la nature en sucres simples. Elles sont produites principalement par des microorganismes (bactéries et champignons) (Lynd *et al.*, 2002). Parmi les bactéries, les espèces de *Bacillus* peuvent produire plusieurs enzymes extracellulaires hydrolysant des polysaccharides, y compris la cellulase (Ladeira *et al.*, 2015). Ces enzymes ont des applications potentielles en biothérapie, tels que, la dégradation des parois cellulaires des organismes pathogènes comme le porosite *Acanthamoeba* qui provoque la kératite (cécité) des yeux et aussi pour traiter la maladie de bézoard qui est une

matière végétale non digestible (par exemple, la cellulose) chez les patients présentant une digestion altérée et une motilité gastrique réduite (Rinaudo., 2006).

2.3- Propriétés pharmacologiques du genre *Bacillus*

Durant les dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude des bactéries du genre *Bacillus* et leur application en biothérapie notamment sur les effets pharmaco-biologiques dus aux substances bioactives de ce genre :

2.3.1- Activité anticoagulante

Dans les conditions physiologiques normales, la coagulation est activée lors d'une brèche vasculaire, pour consolider l'agrégat plaquettaire a fin de colmater la brèche et arrêter le saignement du sang (hémorragies) (Revel et Doghmi, 2004). Elle est définie par la mise en œuvre d'une cascade enzymatique faisant intervenir les facteurs de la coagulation, le facteur tissulaire, des ions calciques et des phospholipides, à l'origine de la formation du caillot hémostatique, Ce caillot fibrineux est le résultat de transformation du fibrinogène en fibrine non soluble sous l'action de la thrombine. La formation de la thrombine peut se faire selon deux voies, extrinsèque ou exogène, intrinsèque ou endogène, toutes deux aboutissant à l'activation du facteur X, Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V, les phospholipides plaquettaires (PL) et par l'intermédiaire aussi de calcium le complexe prothrombinase, qui catalyse la transformation de prothrombine en thrombine (Marutsuka *et al.* , 2005) (figure 07).

La perturbation de la coagulation développe la maladie de la thrombose, à deux types : artérielle et veineuse différentes entre elles dans les facteurs de risque, les mécanismes physiopathologiques et les manifestations cliniques (Lacut *et al.*, 2008). Le traitement de cette maladie se fait par trois classes d'agents pharmacologiques antithrombotiques utilisables, les antiagrégants, les anticoagulants et les fibrinolytiques (Aubry et Halna du Fretay., 2010). De nombreux anticoagulants agissants à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes, deux classes des anticoagulants classiques (les héparines et les antis vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants (Helft et Leger., 2009).

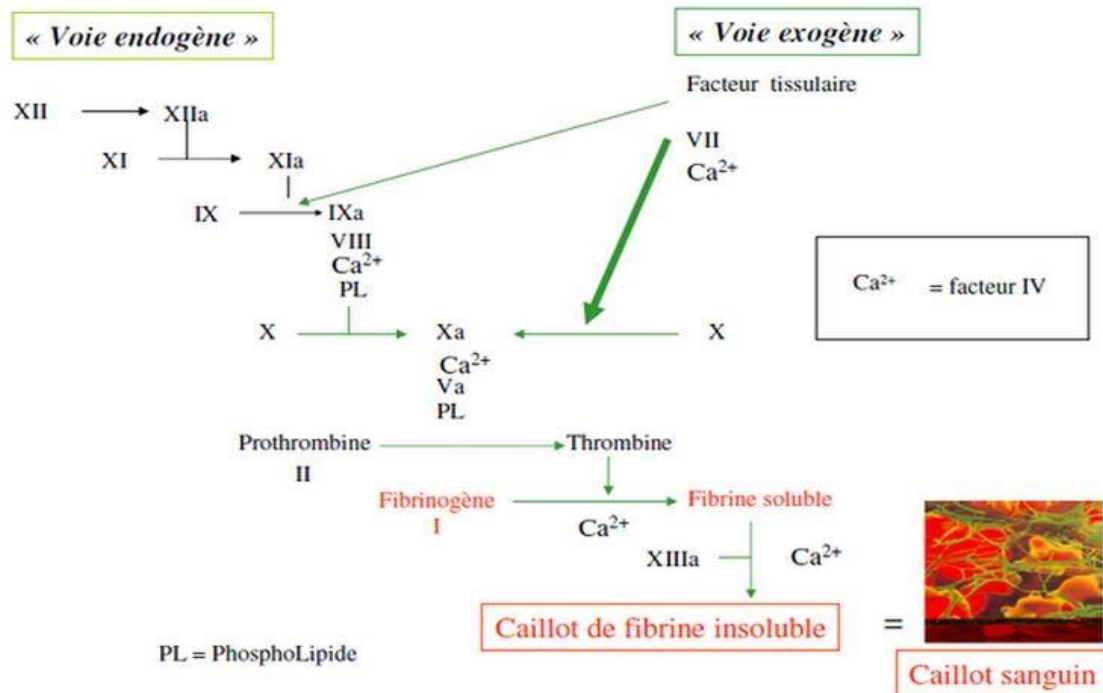


Figure 07 La cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène (Vogler et Siedlecki., 2009 ; Gentry., 2004)

2.3.2- Activité antioxydante

De nouveaux produits antioxydants sont de plus en plus recherchés par les industries pharmaceutiques et alimentaires à cause de leur effet bénéfique contre le développement de cancer, le vieillissement, de même que le rancissement des aliments. En effet, les espèces réactives oxygénées (ROS) tels que les radicaux libres de l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyl (OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peuvent causer de l'inflammation, de la mutagenèse et être la cause de cancer, de la maladie d'Alzheimer, de maladies cardiovasculaires, d'accidents cérébrovasculaires, d'arthrite rhumatoïde ou de cataractes, lorsque leur génération est incontrôlée et crée un stress oxydant. Les radicaux libres sont générés par le métabolisme ou par des facteurs externes tels que des médiateurs de la carcinogenèse, de l'inflammation, ou d'ischémie et sont éliminés grâce à des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Wang *et al.*, 2008).

De plus, les antioxydants sont des molécules qui peuvent se lier aux radicaux libres et donc inhiber leurs effets au niveau des structures biologiques. À l'heure actuelle, la plupart des antioxydants disponibles sont synthétiques, tels que l'hydroxyanisolebutylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT), mais ceux-ci présentent certains effets toxiques et cancérigènes limitant leur usage. Par conséquent, l'usage d'antioxydants naturels est souhaitable (Wang *et al.*, 2009).

2.3.3- Activité antidiabétique (anti- α - amylase)

L'enzyme α -amylase a été reconnue comme une cible thérapeutique pour la modulation de l'hyperglycémie postprandiale. L'inhibition de l' α -amylase conduit à une réduction de l'hydrolyse de l'amidon qui montre des effets bénéfiques sur le contrôle glycémique chez les patients diabétiques (Lebovitz, 1997). Les inhibiteurs synthétiques de l' α -amylase ou d'autres enzymes métabolisant les glucides tels que l'Acarbose, le Miglitol et le Voglibose provoquent des graves effets indésirables tels que l'obésité, troubles et lésions du tractus gastro-intestinal. Pour cela, il est nécessaire de rechercher des inhibiteurs de ressources naturelles afin de développer de nouveaux composés antidiabétiques avec des effets indésirables minimales (Camilla *et al.*, 2019). Il est intéressant que certaines plantes et micro-organismes produisent les inhibiteurs d'amylase qui sont des protéines carbohydrates dont la taille de 32 acides aminés avec 3 liaisons disulfures a plus de 19 kDa, régulent l'activité d'amylase endogène (Breuer, 2003). On a rapporté que l'inhibition des α -amylases induit la tolérance des carbohydrates, la satiété et la perte de poids, et pour prolonger le vide gastrique. Ils ont donc un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'obésité et du diabète non-insulin (Gerrard *et al.*, 2000).

2.3.4- Activité antimicrobienne

Le genre *Bacillus* et certaines de ses espèces portent une place importante dans l'histoire de la bactériologie (Bouhairi., 2017). Grâce à leur pouvoir antagoniste et leur capacité à produire un grand nombre d'antibiotiques et de métabolites antifongiques à intérêt médical. Elles font partie des rhizobactéries les plus utilisées dans la lutte biologique (Handelsman *et al.*, 2009).

De nombreux *Bacillus* spp. comme *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* et *Bacillus mycoides* sont connus comme très producteurs efficaces de molécules antibiotiques (Tableau 04), ceux-ci incluent la bacillomycine, la mycobacilline, la fongistatine, iturine, phengicine, plipastatine, surfactine et bacilizine (Whipps, 2001).

Tableau 04 Activité antibiotique de certaines souches *Bacillus* (Maksimov et Khairullin., 2016).

Espèce ou souche de <i>Bacillus</i>		ATB ou Antifongique	La maladie ou le pathogène sensible
<i>Bacillus</i> sp.		Polymyxine, Circuline, Colistine...etc.	-Bactéries pathogènes ; G(+) G(-) -Champignons pathogènes ; <i>Alternariasolani</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , ...etc.
<i>B. Subtilis</i>	CPA-8	Fengycine	- La pourriture brune du pêcher.
	ATCC 6633	Rhizotocine	-Antifongique et nématocides.
<i>B.brevis</i> et <i>B. polymyxa</i> .		Gramicidine S et Polymyxine B.	-Inhibent les spores de <i>B. cinerea</i> et activent contre Moisissuregrise (<i>botrytis</i>) de fraise.

2.3.5- Activité enzymatique

Les espèces du *Bacillus* sont connues comme source producteurs d'enzymes utilisée par les sociétés de biotechnologie. Rendant ce microorganisme multifonctionnel utile à l'intérieur ou à l'extérieur d'un hôte (Azevedo *et al.* , 1993). parmi ces enzymes exogènes qui peuvent aider à dégrader les facteurs antinutritionnels complexes dans l'alimentation des volailles et à améliorer l'absorption des nutriments, la cellulase, l' α -amylase, β -glucanase, α -galactosidase, β -mannanase, xylanase, protéase, lipase, kératinase et phytase (Choi *et al.*, 2001). Néanmoins, il est important de mentionner que toutes les bactéries *Bacillus* ne synthétisent pas le même type d'enzymes et nécessitent donc la sélection et la caractérisation d'isolats adéquats en fonction des substrats cibles spécifiques dans l'alimentation.

Matériel et Méthodes

3- Matériel et Méthodes

L'objectif principal du présent travail porte sur la recherche *in vitro* des activités biologiques de deux souches bactériennes du genre *Bacillus* et leur application dans la biothérapie. Les deux souches de *Bacillus* (codées T1 T2) ont été fournies par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de L'Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Ces deux souches sont connues par leur capacité de produire des substances bioactives possédant une application dans le domaine de l'Agriculture.

La partie expérimentale du présent travail a été effectuée dans plusieurs lieux de stage, à savoir :

- Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine.
- Laboratoire d'analyse médicale, Clinique Boukerrou de Constantine.
- Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de L'Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1.

3.1- Réactivation T1 et T2

Les souches bactérienne T1 et T2 ont été réactivées sur milieu solide Luria Bertani (LB) (Annexe 1) et incubées pendant 24h à 30°C. Après la période d'incubation les souches bactériennes sont utilisées pour le complément du travail.

3.2- Vérification de l'aspect morphologique et biochimique des T1 et T2

Afin de vérifier et confirmer la pureté des T1 et T2, des tests morphologiques en l'occurrence ; l'aspect macroscopique et microscopique ainsi que, quelques tests biochimiques comme le type respiratoire et la galerie API 20E ont été effectués.

3.2.1- Aspect macroscopique

L'étude macroscopique a été réalisée dans le but d'assurer la pureté des T1 et T2, en tenant compte de la forme des colonies (rondes, irrégulières,...etc.), la taille par la mesure du diamètre (pinctiformes ou non pinctiformes), la couleur des colonies, l'élévation (convexe, concave, plate), l'opacité (opaque, translucide ou transparente), la surface (lisse, rugueuse, brillante, transparente), l'odeur (Présence ou absence) et la consistance (les colonies crémeuses dessèches et muqueuses).

3.2.2- Aspect microscopique

3.2.2.1- Observation à l'état frais

Cette technique permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie. Il est souvent possible de visualiser si, les cellules sont mobiles ou non. La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, apporter un prélèvement bactérien de la colonie à observer et la dissocier dans la goutte d'eau physiologique, ensuite recouvrir la lame par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air, l'observation a été réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) puis à immersion (X100) (Singleton, 2005).

3.2.2.2-Coloration de Gram

La coloration de Gram est un aspect important et essentiel pour l'identification d'une bactérie isolée et la vérification de la pureté de l'isolat. A partir d'une colonie de 24h, un frottis a été fixé à la chaleur puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, ensuite, il a été éliminé par l'ajout du Lugol pendant une minute. Le frottis a été ensuite décoloré avec de l'éthanol jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes. Ensuite, le frottis a été soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine. Après un bref rinçage, le frottis a été séché puis examiné, consécutivement, à l'objectif 40X et à immersion 100 X (figure 08) (Singleton, 2005).

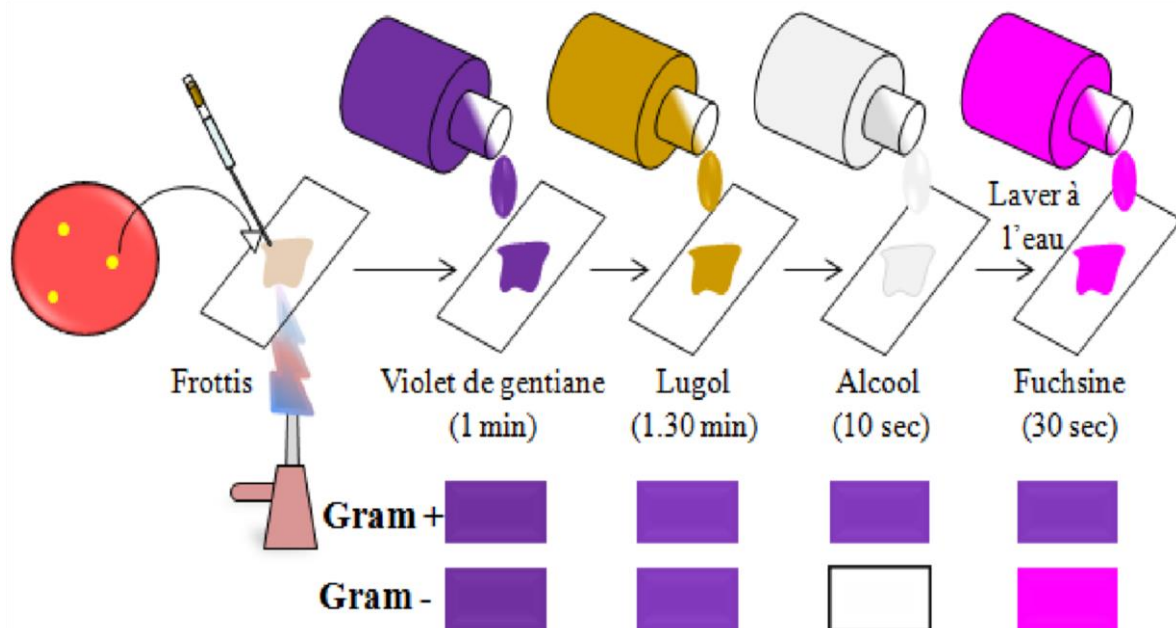


Figure 08 Procédure de la coloration de Gram

3.2.2.3- Coloration des spores bactériennes au vert de malachite

Une endospore est une structure dormante intracellulaire particulière qui protège la bactérie contre des conditions environnementales défavorable. Bien que, en général, les bactéries ne produisent pas d'endospores, il existe néanmoins, quelques genres de bactéries à Gram positif qui sporulent. Les endospores ne peuvent être colorées par les méthodes habituelles car les colorants pénètrent difficilement à travers la paroi sporale. Par exemple, traitées à la coloration de Gram, les bactéries sporulées se colorent mais l'endospore demeure transparente. Le procédé de coloration le plus courant pour les endospores est la coloration de Schaeffer-fulton. D'abord, le frottis fixé à la chaleur a été recouvert par le vert de Malachite, colorant primaire, puis chauffé jusqu'à évaporation pendant environ 5 minutes, la chaleur favorise la pénétration du colorant à travers la paroi de l'endospore. La préparation a été ensuite lavée à l'eau pendant environ 30 secondes. Pour colorer les constituants bactériens qui ne sont pas des endospores, le frotti a été traité par la safranine qui est un contre colorant. Si le frottis est correctement préparé, les endospores apparaîtront en vert à l'intérieur des cellules bactériennes colorées en rouge ou rose (Tortora *et al.*, 2003).

3.2.3- Caractérisation biochimique des T1 et T2

3.2.3.1- Type respiratoire

Le type respiratoire est mis en évidence par ensemencement des souches bactériennes dans des tubes à essais contenant le milieu liquide LB. Une colonie pure de chaque bactérie a été prélevée et ensemencée, séparément, dans deux tubes à essai contenant 9 ml du milieu LB préalablement stérilisé. Après incubation pendant 24h jours à 30° C, le résultat se traduit par une poussée bactérienne selon les quatre cas suivants :

- Bactérie aérobie strict : croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose.
- Bactérie anaérobie strict : croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose.
- Bactérie aéro-anaérobie facultatif : croissance sur toute la hauteur de la gélose.
- Bactérie micro-aérophile : croissance dans un cylindre de gélose d'environ 0,5 Cm de hauteur et situé à environ 1 à 2 Cm de la surface (figure 09).

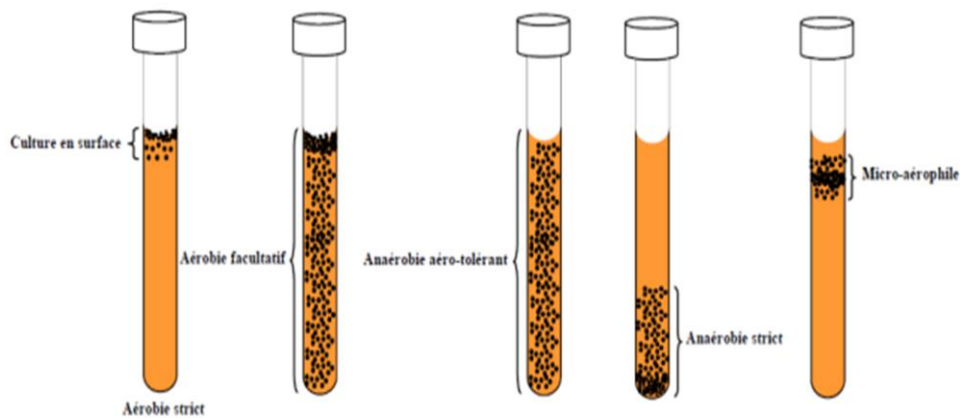


Figure 09 Détermination du type respiratoire (Prescott, 2002).

3.2.3.2- Identification par la galerie API 20E

La mise en évidence des tests biochimiques tels que ; la recherche de la β -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC), de l'arginine dihydrolase (ADH), production d' H_2S , utilisation du citrate, production d'indole, réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres a été effectuée par l'utilisation de la galerie API 20E. La galerie API 20E (Figure 10), comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes ont été inoculés avec 0.1 ml de la suspension bactérienne de T1 et T2 séparément, ensuite, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. La lecture et l'interprétation des résultats obtenus sont effectuées à l'aide d'un tableau de lecture des Galeries API20 (Annexe 4) (Joffin et Leyral, 2006).

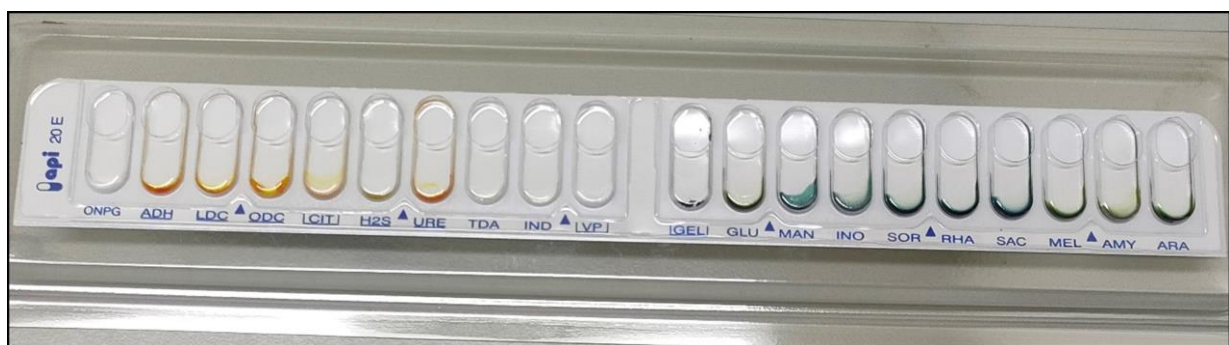


Figure 10 Aspect de la galerie API 20 E avant l'inoculation par les souches sélectionnées

3.3- Mise en évidence des Activités enzymatiques des deux souches

Afin de mettre en évidence les capacités hydrolytiques extracellulaires des souches étudiées (T1, T2), plusieurs enzymes possédant des applications thérapeutique ont été recherchées tel que l'amylase, protéase, cellulase (voir la partie revue bibliographique).

3.3.1-Recherche de l'amylase

L'activité amylolytique a été réalisée en cultivant les souches à tester sur une gélose nutritive solide contenant 1% d'amidon (Annexe 1). Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne à 30°C pendant 1 à 5 jours, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (De Vos *et al.*, 2009).

3.3.2 -Recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant de lait écrémé (Annexe 1). Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité protéolytique est détectée par un halo clair autour de la colonie bactérienne indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (De Vos *et al.*, 2009).

3.3.3- Recherche de cellulase

Des cylindres de gélose, contenant le microorganisme réactivé, ont été découpés stérilement et déposés à la surface du milieu carboxyméthylcellulose agar (CMC) (Annexe 1). Après incubation pendant 5 jours à 30°C, la révélation des cellulases est effectuée par inondation des boîtes de Pétri par 15 ml d'une solution de rouge Congo (1g/l) qui se fixe, préférentiellement, sur les polymères de cellulose. La réaction de fixation dure 30 min, suivie d'un lavage avec environ 20 ml d'une solution de NaCl (1M) pendant 5min. L'activité cellulolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de l'enzyme qui dégrade la cellulose (Oikawa *et al.*, 1998 ; Korish, 2003).

L'évaluation de ces activités enzymatiques a été réalisée par le calcul de l'indice enzymatique (IE) selon la formule suivante :

$$\text{Indice Enzymatique (IE)} = \frac{\text{diamètre de la zone d'hydrolyse}}{\text{diamètre de la colonie}}$$

Dont (IE) \geq 1 ; est signifié la présence de l'enzyme.

3.4- Extraction de substances bioactives des T1 et T2

Afin d'extraire les substances bioactives des T1 et T2, contenant dans l'extrait brut ou bien celles qui sont concentrées dans l'acétonitrile pour récupérer les fengycines, un test de fermentation a été illustré dans les sections qui suivent (figure 11) :

3.4.1- Préparation de la pré-culture

La pré-culture a été préparée par inoculation de 5 colonies pures des T1 et T2 dans des fioles de 250 ml contenant 100 ml du milieu LB liquide. Les fioles ont été incubées à 30°C sous agitation de 180 rpm pendant 24h.

3.4.2- Préparation des milieux de fermentation et inoculation

Des fioles de 250 ml contenant 150 ml de milieu Opt (Annexe 1) ont été inoculées par 15 ml de de la pré-culture de chaque souche, puis les fioles ont été incubées à 30°C sous agitation de 180 rpm pendant 72h.

3.4.3- Récupération de l'extrait brut et des fengycines

3.4.3.1- Extraits brut des deux souches (EBT1 et EBT2)

Après la période de la fermentation les cultures ont été centrifugées à 6.000 rpm pendant 40 min afin d'éliminer les cellules et récupérer les surnageants de chaque souches. Le surnageant a été conservé dans le frigo à 4°C.

3.4.3.2- Extrait des fengycines des deux souches (EFT1 et EFT2)

Afin de récupérer les fengycines, le surnageant obtenu précédemment, a été concentré en ajustant le pH des surnageants à 2 et ce, par addition d'une solution de HCl (6N), jusqu'à l'apparition d'un précipité blanc. Le mélange obtenu est centrifugé autre fois à 6.000 rpm pendant 40 min et les précipités ont été collectés, puis suspendus dans 25 ml de l'acétonitrile (ACN 80%).

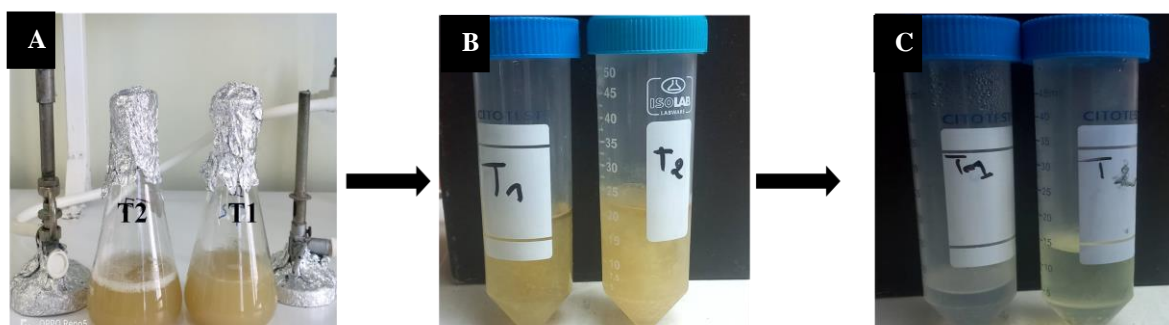


Figure 11 Extraction des substances bioactives des T1 et T2, (A) : la fermentation ; (B) : l'extrait brut ; (C) : l'extrait de fengycines

3.5- Evaluation des activités biologiques *in vitro* en vue de leur application dans la biothérapie

3.5.1- Activité anticoagulante

L'activité anti-coagulante des extraits de fengycine des deux souches (EFT1 / EFT2) a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie exogène et endogène de la coagulation, et ceci sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de 2 tests globales et chronométriques, le Temps de Quick (TQ) ou nommé également Taux de Prothrombine (TP), et le Temps de Céphaline Kaolin (TCK).

3.5.1.1- Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquettés

Le pool plasmatique déplaquettés est un mélange de plasma déplaquettés des (04) volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables.

Le sang de chaque volontaire a été prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur en solution anti-coagulante de citrate de sodium (3,2 %) et à raison de 1 volume pour 3 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le mélange standard a été préparé donc par le prélèvement de 1 ml de chaque plasma pauvre en plaquettes des (04) volontaires sains (figure 12).

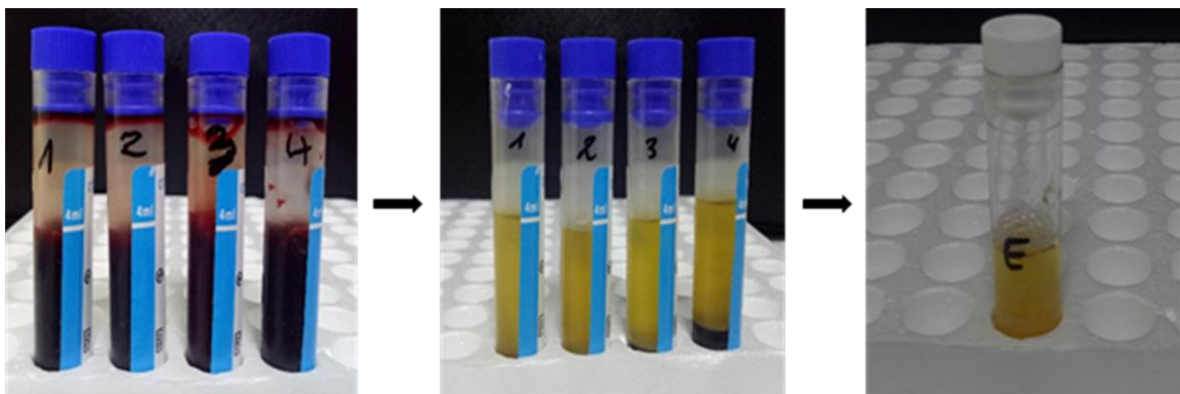


Figure 12 Pool plasmatique déplaquettés des 4 volontaires sains après centrifugation

3.5.1.2 - Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène

L'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène de la coagulation a été évaluée en utilisant un test de coagulation de Quick (TQ) ou le temps de prothrombine (TP), qui permet une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (Caquet, 2004).

Ce test consiste à mesurer automatiquement par l'appareil «C2000-1/2/4 Semi-Auto Coagulation Analyzer » le temps de coagulation (TQ) à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence

d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine). Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré par cette appareil. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que les extraits EFT1 / EFT2 exercent un effet anticoagulant vis à vis de cette voie de coagulation. Pour ce faire, 10 µl de chaque extrait (EFT1 / EFT2) préparé dans l'acétonitrile ont été additionné à 90 µl du plasma standard dans la cuvette, le mélange a été incubé à 37 °C durant 2min. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 µl de thromboplastine. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré automatiquement par l'appareil juste après l'ajout de thromboplastine (figure 13).

3.5.1.3 - Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le test du temps de céphaline-Kaolin (TCK), un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de la voie endogène de la coagulation (Caquet, 2004).

Ce test consiste à mesurer automatiquement par l'appareil « C2000-1/2/4 Semi-Auto Coagulation Analyzer » le temps de coagulation (TCK) à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette et en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été mesuré par cette appareil. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que les extraits EFT1 / EFT2 exercent un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation. Pour ce faire, 10 µl de chaque extrait (EFT1 / EFT2) préparé dans l'acétonitrile ont été additionné à 90 µl du plasma pauvre en plaquettes plus 100 µl d'une solution de céphaline Kaolin (TCK) dans une cuvette qui est ensuite incubé à 37 °C durant 3 min. Après l'incubation, la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 µl d'une solution aqueuse de CaCl₂ (0,025 M). Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré automatiquement par l'appareil juste après l'ajout de CaCl₂ (figure 13).

Un médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI dissout dans l'acétonitrile a été utilisé comme contrôle positif et le même solvant acétonitrile a été utilisé comme contrôle négatif.



Figure 13 L'appareil «C2000-1/2/4 Semi-Auto Coagulation Analyzer » appliqué pour mesurer le temps (TCK) et (TQ)

3.5.2- Activité anti-oxydante

Dans ce travail, trois tests différents sont utilisés pour évaluer les propriétés anti-oxydantes des extraits (EBT1/ EBT2/ EFT1/EFT2) ; le test de piégeage du radical DPPH (2,2-Diphényl-1-Picryl-Hydrazil), le test de l'ABTS, et l'activité phenanthroline-Silver nanoparticle assay (SNP).

Une quantité de 4 milligrammes d'extrait a été dissoute dans 1 ml du solvant acétonitrile pour les extraits de fengycine (EFT1/EFT2) et méthanol pour les extraits brute (EBT1/ EBT2) (solution mère de 4000ppm). Ensuite une série de dilution de la solution mère dans le solvant (acétonitrile ou méthanol) a été préparée à différentes concentrations (4 ; 2 ; 1 ; 0,5 ; 0.25 ; 0.125 et 0.0625 mg/ml) (figure 14).

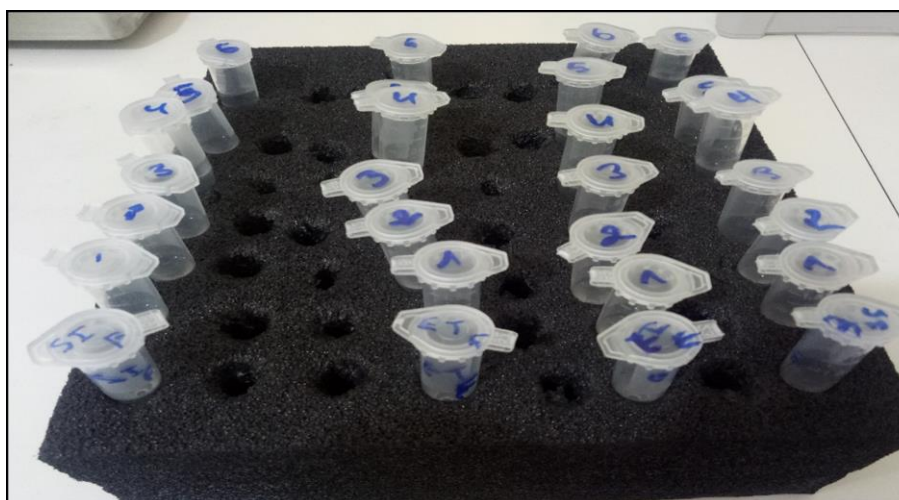


Figure 14 Préparation des dilutions de différents extraits (EBT1/ EBT2/ EFT1/EFT2)

de l'extrait testé (Molyneux, 2004) et permettra aussi, la caractérisation du pouvoir antioxydant de l'extrait. Une faible valeur de l'IC50 indique une forte activité antioxydante (Saffidine, 2015).

3.5.2.2- Test de piégeage de l'ABTS

La technique de l'ABTS (acide 2,2'-azinobis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), implique la production directe de chromophore bleu/vert par la réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium. L'absorption de l'ABTS est maximale aux deux longueurs d'onde (645 nm et 734 nm). L'activité anti-oxydante en utilisant la technique ABTS a été déterminée par la méthode de Re R *et al.* (1999). En effet, 160 µl de la solution de l'ABTS⁺ (Annexe 2) ont été ajoutés à 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations. Le control négatif est préparé en parallèle, en mélangeant 40µl du solvant (méthanol ou acetonitrile) avec 160µl de l'ABTS⁺. Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la microplaque a été insérée dans le lecteur de microplaques pour mesurer l'absorbance à 734 nm. Les absorbances obtenues ont été comparées avec celles du trolox et l'acide ascorbique, qui sont utilisés comme des standards antioxydants. L'activité ABTS⁺ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition ABTS}^+ = [(A_B - A_E) / A_B]$$

A_B : est l'absorbance du control négatif / **A_E** : est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

3.5.2.3- Test de l'activité Silvernanoparticle (SNP) (Métal Chélate)

Cette méthode est basée sur la réduction des ions d'argent (Ag⁺) par un agent antioxydant en nanoparticules sphériques Ag⁰ (Figure 16) montrant une absorption maximale à 423 nm. La couleur de la suspension stable a été contrôlée en faisant varier la concentration de citrate trisodique, de nitrate d'argent et de graines d'argent (Ozyurek M *et al.*, 2012).

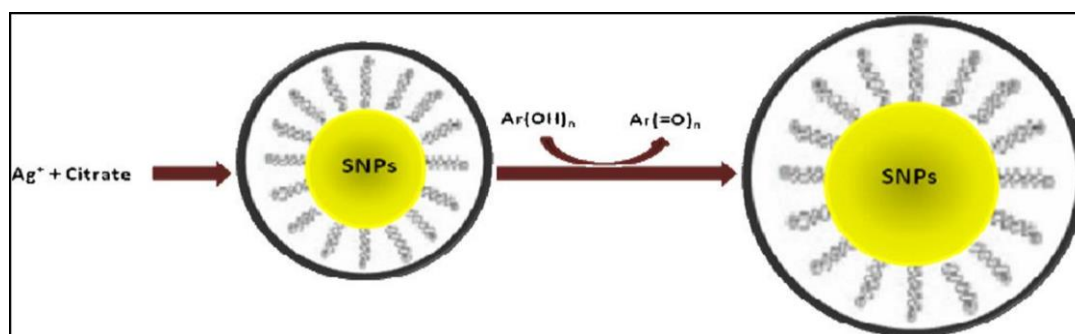


Figure 16 Réduction des ions Ag⁺ (Ozyurek M *et al.*, 2012).

L'activité Silvernanoparticle a été déterminée selon la méthode d'Ozyurek M *et al.* (2012).

Un volume de 20µl de chaque dilution a été transféré dans une microplaque à 96 puits. Ensuite une quantité de 130 µL de solution SNP (Annexe 2) et 50 µl H₂O ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à une température (25°C), l'absorbance est lue à 423nm dans le lecteur de microplaque. Le Trolox a été utilisé comme standard (contrôle positif) et le solvant utilisé (Acétonitrile/ méthanol) comme contrôle négatif.

3.5.3- Activité antidiabétique (Anti- Alpha amylase)

Le principe est basée sur l'utilisation du iode / iodure de potassium (IKI), qui est l'indicateur de fonctionnement pour déterminer la quantité d'amidon hydrolysé. La présence d'un inhibiteur de l'α- amylase provoque la diminution de l'hydrolyse de l'amidon en maltose ou glucose et par conséquent il provoque la diminution de la longueur d'onde initiale fixée à 630 nm.

L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase a été déterminée Selon Zengin G. *et al.* (2014). Pour ce faire, la microplaque (96 puits), a été divisée en 5 sections (Ac, Ae, As1, As2, Ab) et ce pour les deux extraits de fengycines (EFT1/EFT2) et les deux extraits bruts (EBT1/EBT2) séparément, dont ; Ac : 25 µl solvant + 50 µl Tampon, Ae : 25 µl solvant + 50 µl Enzyme, As1 : 25 µl extrait (1) + 50 µl Enzyme, As2 : 25 extrait (2) + 50 µl Enzyme, Ab : 25 µl Extrait (1) ou (2) + 50 µl Tampon, ensuite la microplaque a été incubée à une température de 37°C pendant 10 min d'incubation. Après cette période, 50 µl d'amidon ont été ajoutés dans les 4 sections (Ac, Ae, AS1,AS2), Alors que, 50 µl du tampon a été ajouté uniquement dans la 5^{ème} section (Ab), suivi d'une incubation à une température de 37°C pendant 20 min. Après cette période, 25 µl HCl et 100 µl IKI ont été ajoutés dans les 4 sections (Ac, Ae, AS1, AS2). De plus, 25 µl HCl et 100 µl IKI ont été additionnés dans (Ab). L'acarbose a été utilisé comme standard. La lecture est faite à 630 nm dans le lecteur de microplaques.

L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase a été expliquée dans le schéma suivant (figure 17) :

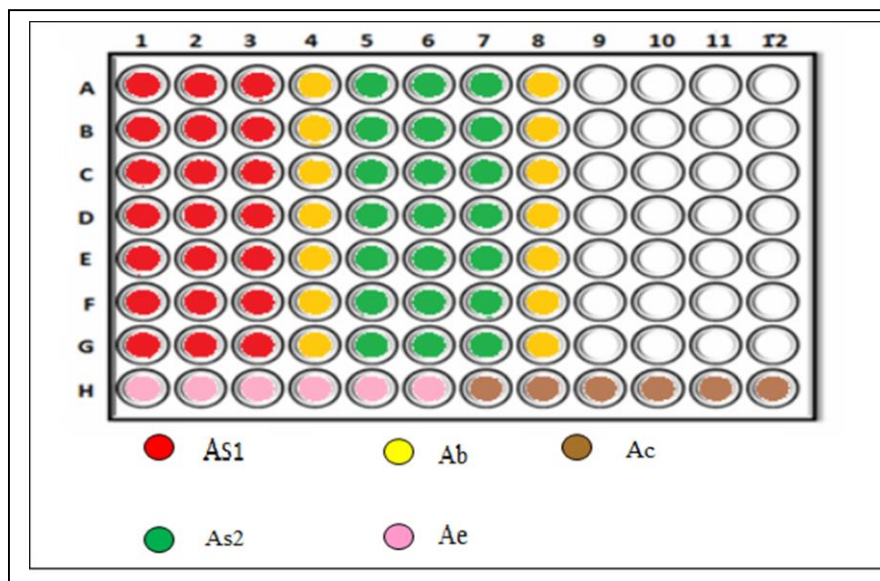


Figure 17 Schéma de la plaque de l'activité inhibitrice de l'alpha amylase

Le pourcentage d'inhibition a été calculé par l'équation suivante :

$$\%INH = 1 - [(Ac - Ae) - (As - Ab) / (Ac - Ae)]$$

Ac=Absorbance [Amidon + IKI + HCl + Vol de solvant d'extrait + Vol tampon Enzyme]

Ae=Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI + HCL+ Vol de solvant d'extrait]

As=Absorbance [Enzyme + Extrait + Amidon + IKI + HCl]

Ab=Absorbance [Extrait + IKI + 125µl de tampon]

3.5.4- Activité antibactérienne

Dans cette partie, la recherche des composés antibactériens synthétisés par les souches bactériennes du *Bacillus* T1, T2 est nécessaire et ce, dans le but de confirmer les différentes propriétés thérapeutiques. La technique de diffusion sur gélose en adaptant la Méthode de diffusion sur puits d'agar. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait (EFT1) a été déterminée en tenant compte les souches bactériennes pathogènes montrant un effet positif.

3.4.5.1- Repiquage des souches bactériennes

Les souches bactériennes pathogènes (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) ont été repiquées par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton (Annexe 2), puis incubées à 30 °C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

3.4.5.2- Préparation de l'inoculum

L'inoculum des bactéries pathogènes a été préparé dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir de culture pure de 24 h. La densité a été ajustée à 0.5 Mack Ferland (DO= 0.08 à 0.10 lue à 625nm) (Figure 18).

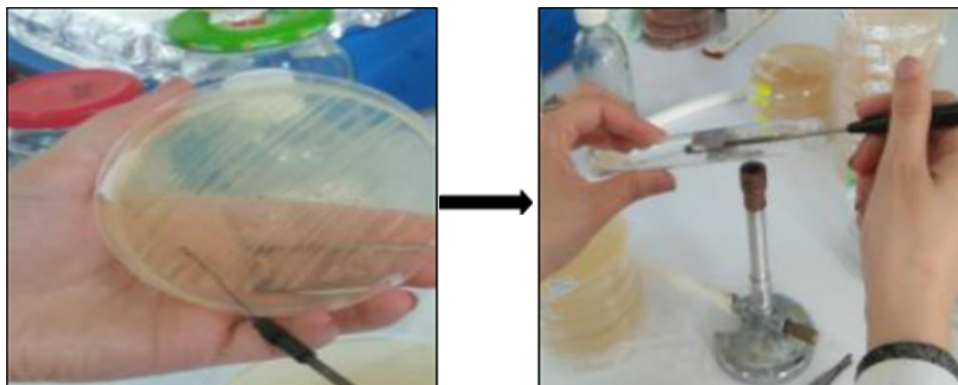


Figure 18 Préparation de l'inoculum bactérien

3.4.5.3- Méthode de diffusion sur puits d'agar

Dans cette technique, les boîtes ont étéensemencées par étalement avec l'inoculum microbien testé. Ensuite, des puits ont été percées de manière aseptique avec un perce-bouchon stérile, ensuite, 25µl des extraits (EBT1 / EBT2 / EFT1 / EFT2) ont été introduits dans les puits. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 24 heures. Le résultat est considéré positif s'il y a une zone claire autour des puits signifiant l'inhibition de la croissance des souches pathogènes (Jourdan *et al.*, 2008).

3.4.5.4- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus petite concentration nécessaire en composés actifs pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Denis *et al.*, 2011). La CMI a été déterminée en utilisant la technique de micro-dilution et le bouillon nutritif comme milieu de culture.

3.4.5.4.1- Préparation des dilutions

Une quantité de 200 mg d'extrait (EFT1) a été dissoute dans 1 ml du solvant acétonitrile (solution mère). Ensuite une série de dilution de la solution mère a été préparée à différentes concentrations (200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12.5 ; 6.25 mg/ml). Le control positif a été préparé en utilisant deux antibiotiques (Gectapen et Amoxypen), en respectant les mêmes concentrations de l'extrait (EFT1).

3.4.5.4.2-Préparation de l'inoculum bactérien et la microplaque de 96 puits

L'inoculum bactérien des trois bactéries pathogènes a été préparé dans 10 ml du bouillon nutritif stérile (10ml). La densité a été ajustée à (0.1). La lecture est effectuée en utilisant un spectrophotomètre (SHIMADZU UV- 1280), et une longueur d'onde réglé à 600nm.

Pour ce faire, 100 µl de bouillon nutritif ont été répartis dans tous les puits de la microplaque, en ajoutant sur chaque puits un volume de 50 µl des différentes concentrations d'extrait (EFT1). De plus, 100 µl de la suspension bactérienne pathogène des trois bactéries (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) ont été additionnées séparément dans les puits. Le control négatif a été préparé, en ajoutant le milieu, la suspension de la bactérie pathogène et le solvant (acétonitrile) (témoin de culture Tc). Le contrôle positif a été préparé de la même manière, sauf que l'échantillon a été substitué par l'antibiotique A et G. Après, les microplaques ont été incubées à température 30 min pendant 24h. La lecture de la microplaque a été effectuée visuellement en observant le trouble formé dans chaque puits.

3.5.5- Etude de l'activité synergique

La méthode de Palaniappan et Holey. (2010) a été utilisée pour déterminer l'inhibition interactive entre les antibiotiques et les extraits naturels possédant une activité antimicrobienne.

Pour ce faire, un volume de 100 µl du bouillon nutritif a été introduit sur les puits de la microplaque, ensuite, 25 µl de l'extrait (EFT1) et 25 µl de l'antibiotique (A ou G) ont été ajoutés en tenant compte, les mêmes concentrations utilisée dans la préparation de la CMI (200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12.5 ; 6.25 mg/ml), De plus, 100 µl de la suspension bactérienne pathogène des trois bactéries (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) ont été additionnées séparément dans les puits. Le control négatif a été préparé de la même manière, sauf que l'échantillon a été substitué par le solvant (25µl acétonitrile). Après, les microplaques ont été incubées à température 30°C pendant 24h. La lecture de la microplaque a été effectuée visuellement. Les effets de combinaisons ont été évalués en calculant l'indice FIC (Fractional Inhibitory Concentration) de différentes combinaisons en utilisant la formule suivante :

$$\text{Indice FIC} = \text{FIC}_{\text{extrait}} + \text{FIC}_{\text{antibiotique}}$$

Dont ;

FIC de l'extrait (EFT1) = CMI de l'extrait dans la combinaison / CMI de l'extrait seul

FIC de l'antibiotique = CMI de l'antibiotique dans la combinaison / CMI de l'antibiotique seul.

Selon Palaniappan et Holey. (2010), Les résultats obtenus ont été interprétés comme suivant :

- La synergie a été définie comme un indice $FIC \leq 0,5$
- Un $FIC \geq 4.0$ est défini comme un effet antagonisme entre les deux agents (Extrait et antibiotique).
- L'effet indifférence est indiqué entre 1,0 et 4,0
- L'effet est additive entre 0,5 et 1.0

3.5.6- Activité antifongique

L'activité antifongique a été appliquée en premier lieu, en utilisant les quatre extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2). Comme ces derniers ne donnent pas un résultat significatif, de ce fait l'activité antifongique a été testée, en utilisant la cellule bactérienne (T1 et T2) elle-même et par la méthode de confrontation directe. Cette méthode permet de cribler les deux souches de *Bacillus sp.* capables de synthétiser des métabolites inhibant la croissance des champignons tests (Silva *et al.*, 2016).

Dans le but de réaliser cette activité, quatre souches fongiques pathogènes (*Fisarium.solani* ; *Alternaria sp.*; *Aspergillus sp.* ; *Fisarium. culmorum*) ont été inoculées par piqure centrale sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Pomme de terre Dextrose Agar (PDA) (Annexe 1) et incubées pendant 7 jours à 28°C. Après cette période des disques de 5 mm de diamètre ont été préparés à partir de ces cultures fongiques, et déposés à nouveau sur une autre boîte de Pétri contenant préalablement le milieu PDA. Ensuite, une colonie de chaque bactérie (T1 et T2) a été déposée à proximité de l'agent pathogène (distance entre le champignon et la bactérie antagoniste est 3 cm). Les boîtes ont été incubées pendant 7 jours à 28 °C. Un témoin négatif a été réalisé pour chaque champignon pathogène.

L'évaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule suivante :

$$PGI\% = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

R1 : Distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge du témoin.

R2 : Distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de pétri traitée.

3.5.7- Analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple sauf pour l'étude de l'activité antibactérienne, antifongique et enzymatique. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm (déviation standard (n=3)).

Résultats et discussion

4-Résultats et discussion

La présente étude a pour but d'étudier l'effet thérapeutique de différents extraits de deux souches bactériennes du genre *Bacillus*. En effet, sept activités biologiques ont été mise en évidence à savoir ; l'activité enzymatique, l'activité anticoagulante, l'activité anti-oxydante, l'activité antidiabétique, l'activité antibactérienne, l'activité synergique et l'activité antifongique.

4.1- Vérification de l'aspect morphologique et biochimique des T1 et T2

4.1.1- Aspect macroscopique

L'observation macroscopique après incubation à 30°C pendant 24h, a montrée l'apparition des colonies distinctes visible à l'œil nu présentant les critères morphologiques spécifiques du genre *Bacillus* (tableau 05 ; figure 19).

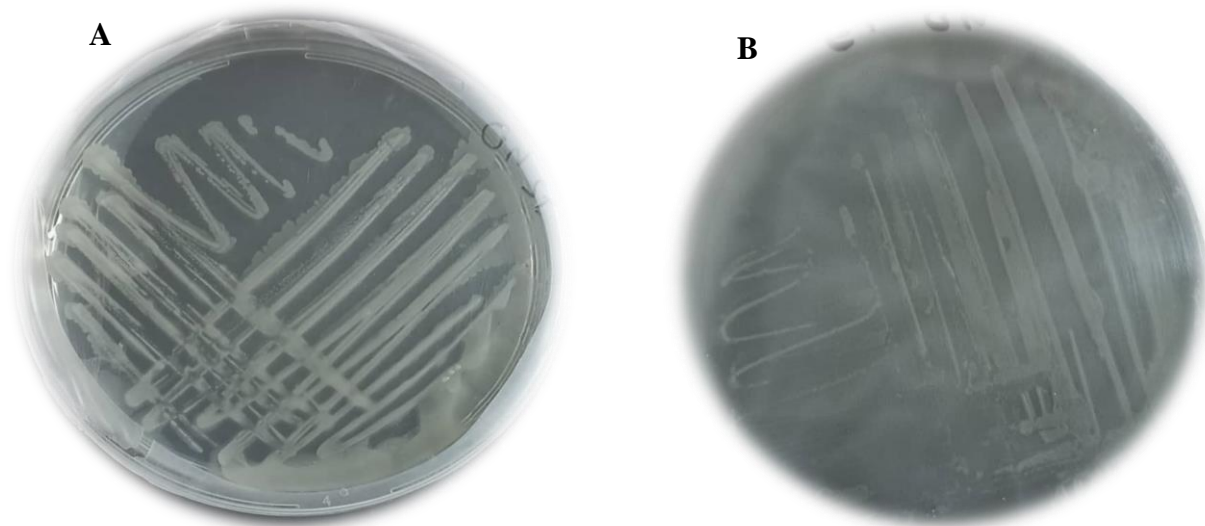


Figure 19 Aspect macroscopique des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2

Tableau 05 Description de l'aspect des colonies des souches bactériennes T1 et T2 cultivées sur milieu (LB).

Souches	Forme	Taille	Opacité	Surface	Consistance	Elévation	Couleur	Contour
T1	Ronde	1mm	Opaque	Brillante	Sèche	Plate	Blanche	Régulier
T2	Ronde	1mm	Opaque	Lisse	Crémeuse	Plate	Crème	Régulier

4.1.2- Aspect microscopique

4.1.2.1- Observation à l'état frais

Après, l'observation des souches bactériennes sous microscope au grossissement x100, ces dernières apparaissent sous forme des bâtonnets mobiles (Figure 20).

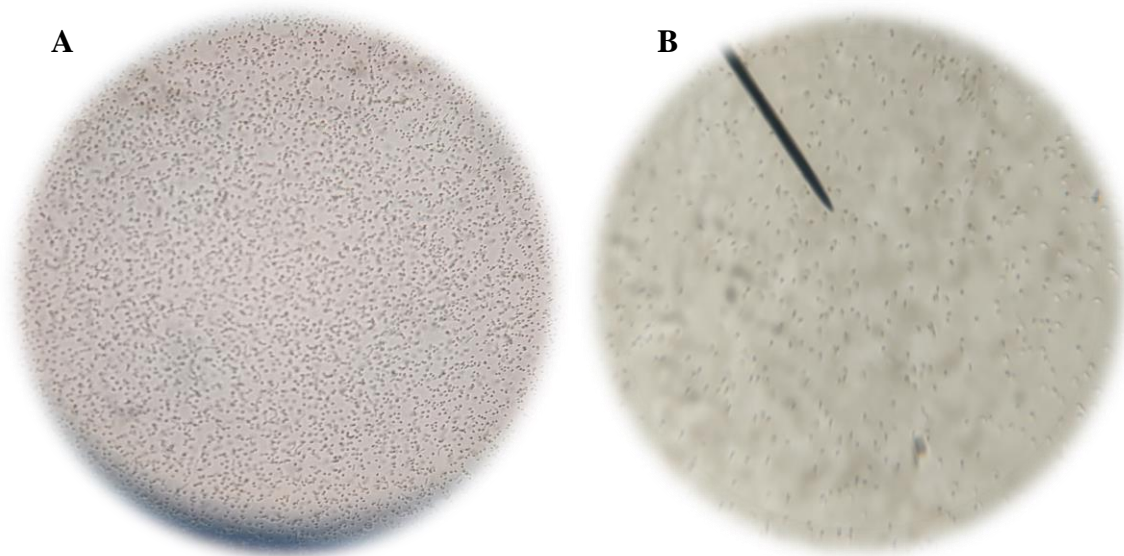


Figure 20 Aspect microscopique à l'état frais des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2 (G x 100).

4.1.2.2- Coloration de *Gram*

Après coloration de *Gram*, les souches bactériennes apparaissent en couleur violette et de forme de bacille, ce qui confirme qu'elles sont Gram+ (figure 21).

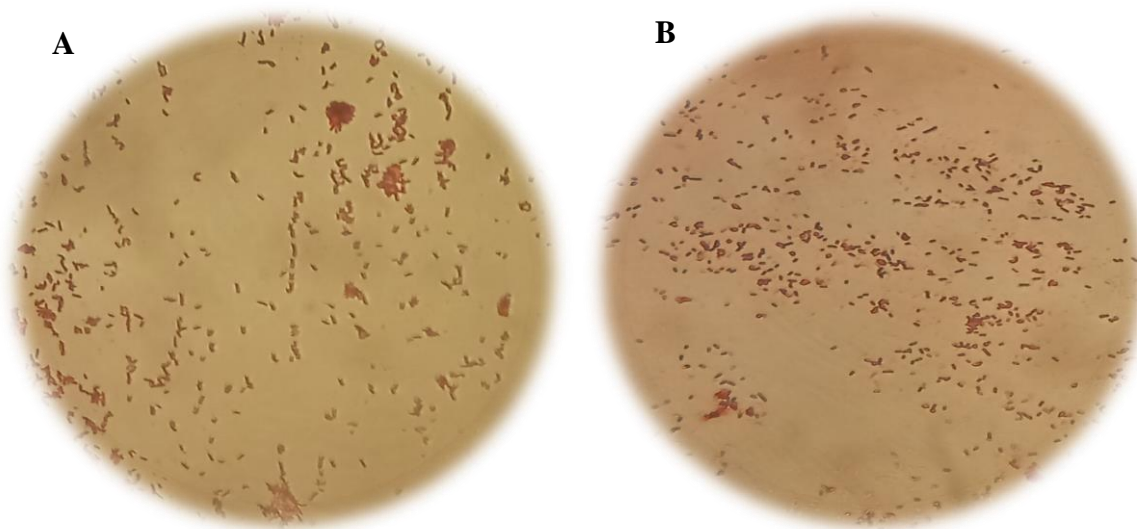


Figure 21 Coloration de *Gram* des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2 (Gx100).

4.1.2.3- Coloration des endospores bactériennes au vert de malachite

Après la coloration au vert de malachite, les cellules végétatives sont rouge brunâtre à rose. Les endospores apparaissent en vert (Figure 22).

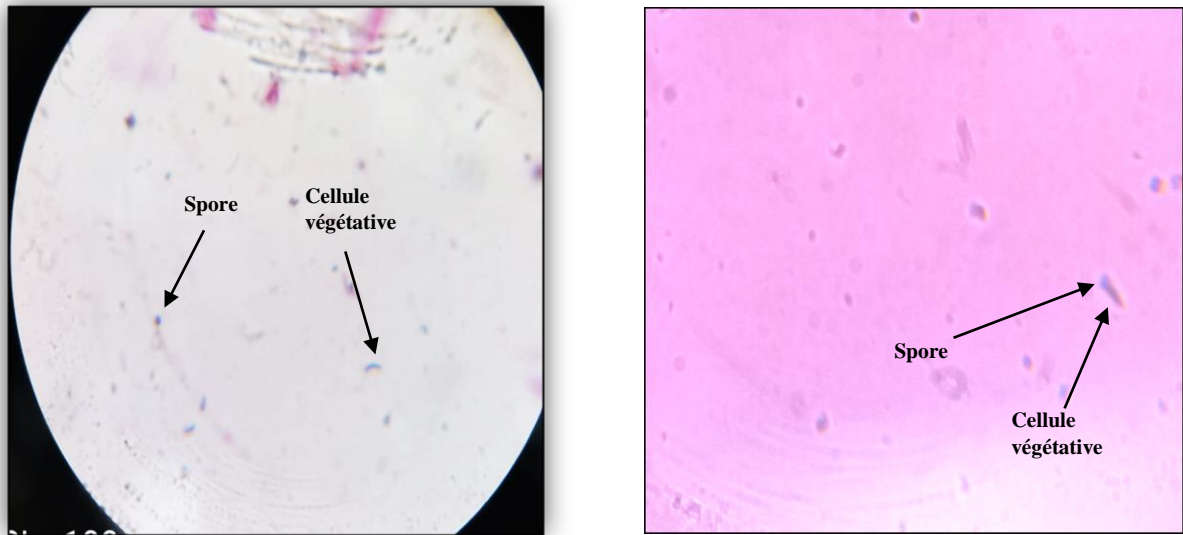


Figure 22 Coloration des endospores des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2 au vert de malachite (G x100).

La coloration des spores par le vert de malachite confirme que, les souches bactériennes sporulent, de ce fait, cet aspect confirme que les souches en questions appartenant au genre *Bacillus*

4.1.3-Tests biochimiques

4.1.3.1-Type respiratoire

Le type respiratoire des deux souches T1 et T2 a été réalisé par la culture de ces dernières sur milieu (LB) liquide. Les deux souches ont pu se développer tout au long du milieu (figure 23). Ce résultat montre que les souches bactériennes testées sont aérobies anaérobies facultatives.

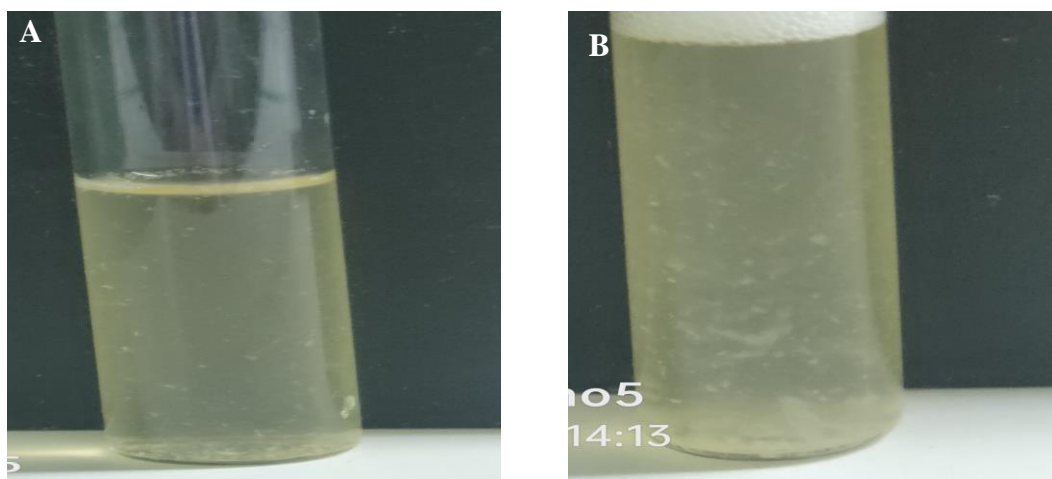


Figure 23 Type respiratoire des souches bactériennes ; A : T1 et B : T2

4.1.3.2-Galerie API 20E

Les autres tests biochimiques ont été réalisés en utilisant la plaque API 20E. Ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification. Des travaux précédents ont montré que la meilleure reproductibilité des différents tests est plutôt réalisée avec des plaques API qu'avec les tests classiques.

Après la période d'incubation, le résultat de la galerie API 20E est illustré sur la figure (24) et le tableau 06.

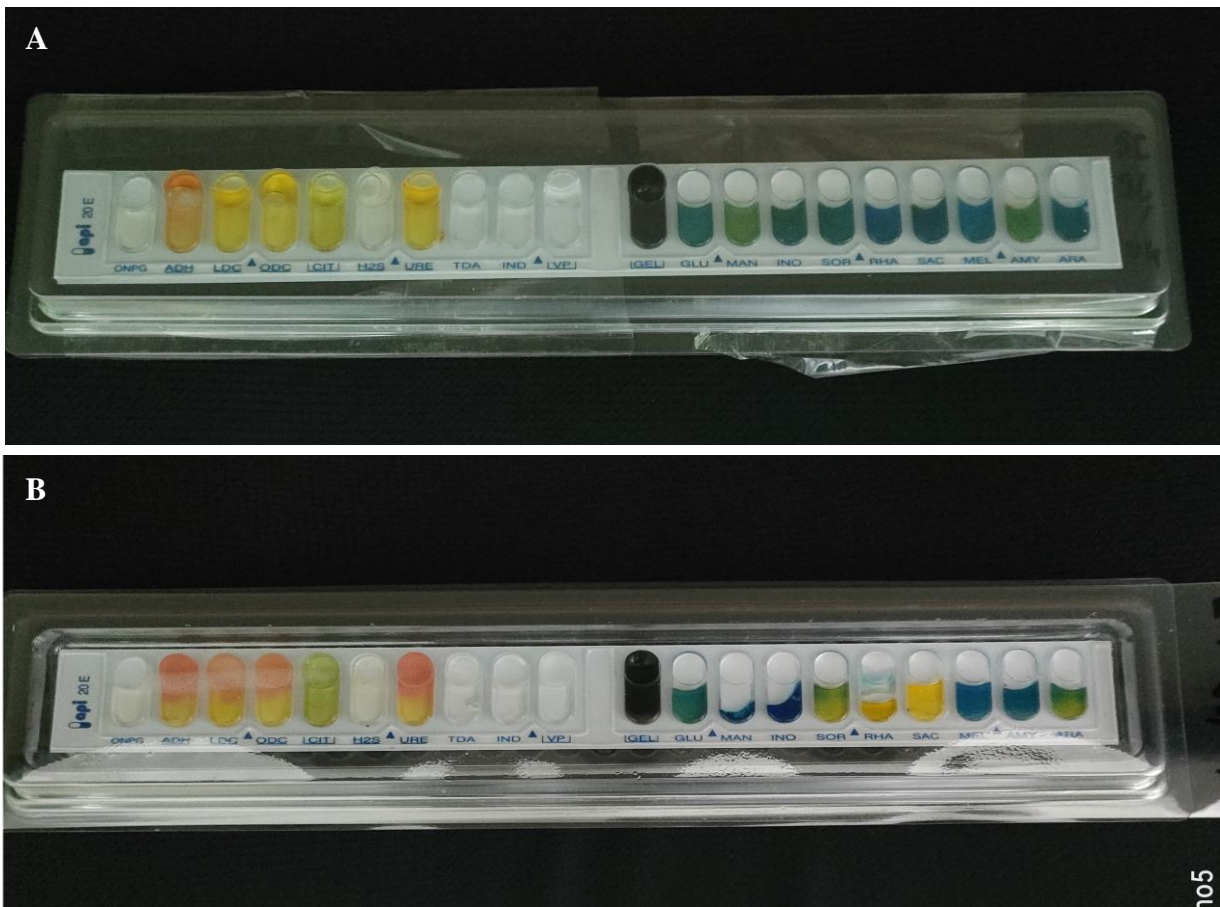


Figure 24 Test biochimique en utilisant la galerie API 20E ; A : T1 et B : T2

Tableau 06 Illustration du profil biochimique des souches T1 et T2 par la galerie API 20E

N°	Tests	T1	T2
1	ONPG : 2-nitrophényl- BD-galactopyranoside	-*	-*
2	ADH : L-arginine	***	***
3	LDC : L-lysine	-*	***
4	ODC : L-ornithine	-*	***
5	CIT : Trisodium citrate	-*	-*
6	H ₂ S : Sodium thioisulfate	-*	-*
7	URE : Urée	-*	***
8	TDA : L-tryptophane	-*	-*
9	IND : L-tryptophane	-*	-*
10	VP : Sodium pyruvate	-*	-*
11	GEL :Gélatine (ongine bovine)	***	***
12	GLU : D-glucose	***	***
13	MAN : D-mannitol	-*	-*
14	INO : Inositol	-*	-*
15	SOR : D-sorbitol	-*	***
16	RHA : L-rhamnose	-*	***
17	SAC : D-saccharose	-*	***
18	MEL : D-melibiose	-*	-*
19	AMY : Amygdaline	-*	-*
20	ARA : L-arabinose	***	-*

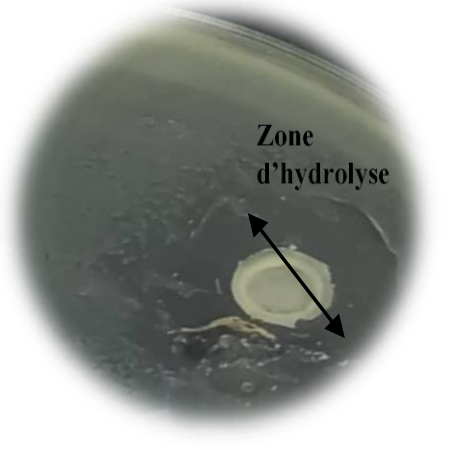

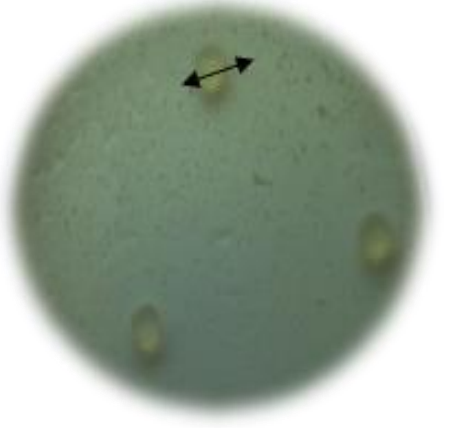
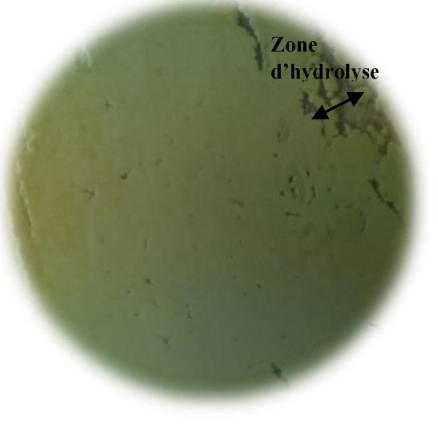
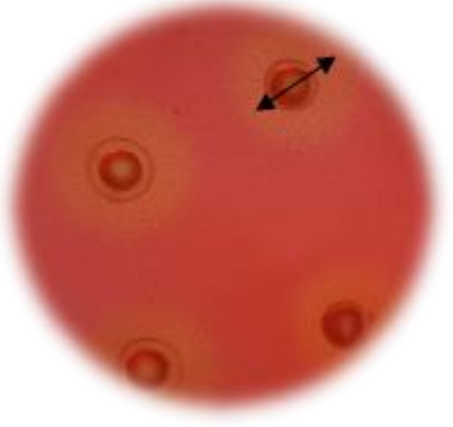
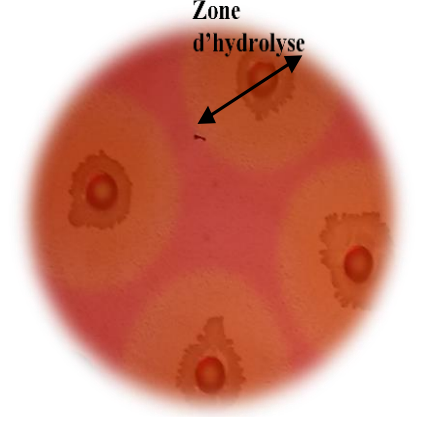
*test négatif, ** test positif

L'analyse des résultats obtenus (tests morphologiques et biochimiques) a confirmé que les deux souches bactériennes appartiennent au genre *Bacillus*.

4.2- Mise en évidence des activités enzymatiques des deux souches

Les résultats de la révélation des différents tests enzymatiques réalisés dans le présent travail pour les deux souches bactériennes (T1et T2) sont présentés dans le tableau (07). L'analyse de ces résultats a montré des zones d'hydrolyse de différents diamètres autour des colonies.

Tableau 07 Zones d'hydrolyses des souches T1 et T2 testées après 5 jours incubation

Les souches bactériennes Les enzymes	T1	T2
Amylase		
Caséinase		
cellulase		

Les indices enzymatique ont donnés des valeurs différentes et ce, suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat utilisé (figure 25). En effet, la souche T1 a la capacité de produire l'enzyme cellulase (IE=2), l'enzyme amylase (IE=2.6) et l'enzyme caseinase (IE=1.5). Alors que la souche T2 a montrée des indices enzymatiques égaux à (IE=2.8) pour la cellulase, (IE=3) pour l'amylase, et (IE=2) pour l'enzyme casiénase.

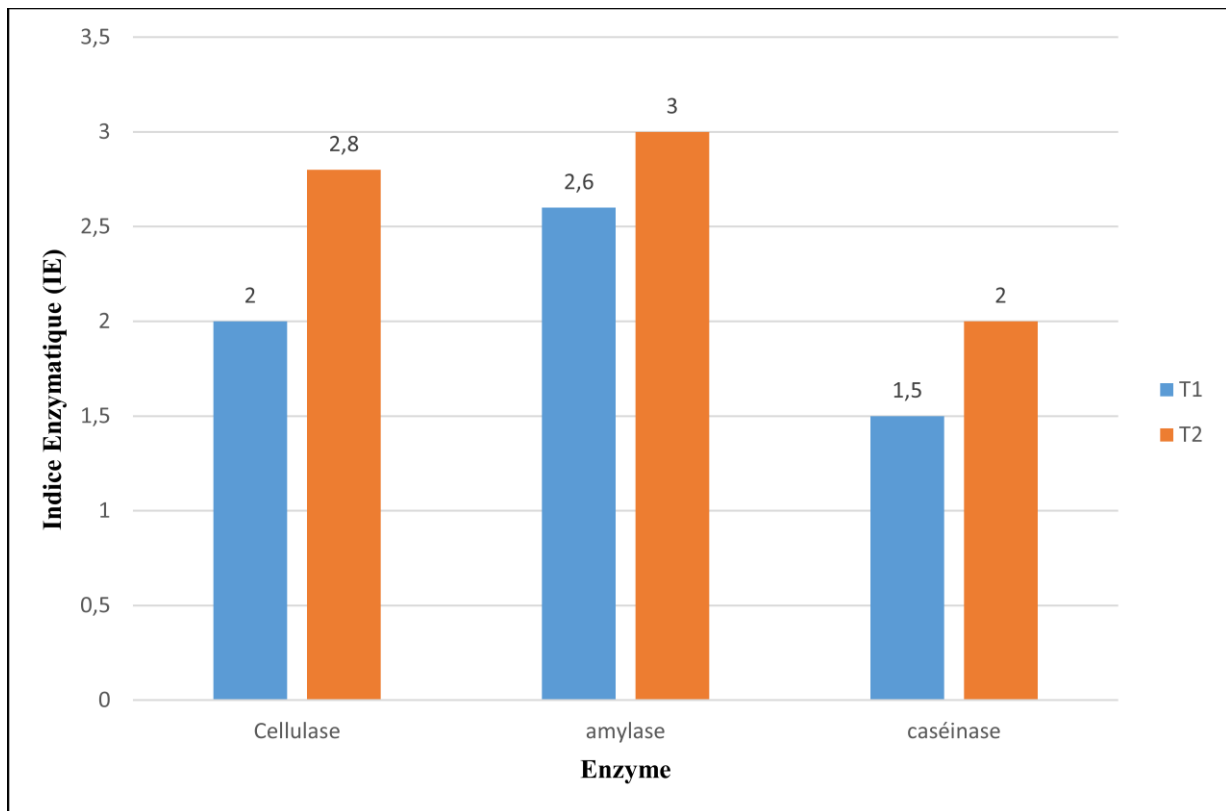


Figure 25 Indices enzymatiques des souches T1 et T2 testées après 5 jours d'incubation.

L'exploration des activités enzymatiques des microorganismes s'avère indispensable, car ils sont connus comme étant des producteurs d'une panoplie diversifiée des substances bioactives comme les enzymes et les antibiotiques à intérêt industriel pharmacologique. En effet, les enzymes jouent un rôle très importants dans la biotechnologie, car ils dégradent la paroi cellulaire des agents pathogènes bactéries ou champignons tel que ; la cellulase, la protéase, amylase (Farace *et al.*, 2015).

Ces enzymes sont connus dans divers domaine, notamment, elles sont utilisées en biothérapie comme suit : les amylases pour traiter la dyspepsie résultant d'une dégradation incomplète de l'amidon (Vachher *et al.*, 2021), les protéases sont utilisées dans la thérapie thrombolytique et le traitement des maladies neurodégénératives et contre des maladies mortelles, telles que le cancer et le SIDA (Rawlings *et al.*, 2004 ; ; Razzaq *et al.*, 2019), les cellulases pour traiter la maladie de

bézoard qui est une matière végétale non digestible chez les patients présentant une digestion altérée et une motilité gastrique réduite (Rinaudo., 2006).

4.3-Evaluation des activités biologiques *in vitro*

4.3.1-Evaluation de l'activité anticoagulante

Le pouvoir anticoagulant des extraits de fengycine EFT1 et EFT2 a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie exogène et la voie endogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TQ et le TCK respectivement. Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé (Tlili., 2015).

4.3.1.1-Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante du EFT1 et EFT2 vis-à-vis de la voie exogène a été réalisée à l'aide du test de temps de Quick (TQ), qui explore la voie extrinsèque (VII) et la voie commune (X, V, II, fibrinogène) de la coagulation sanguine où le facteur tissulaire (thromboplastine) est le déclencheur de cette voie (Manallah., 2012). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (26).

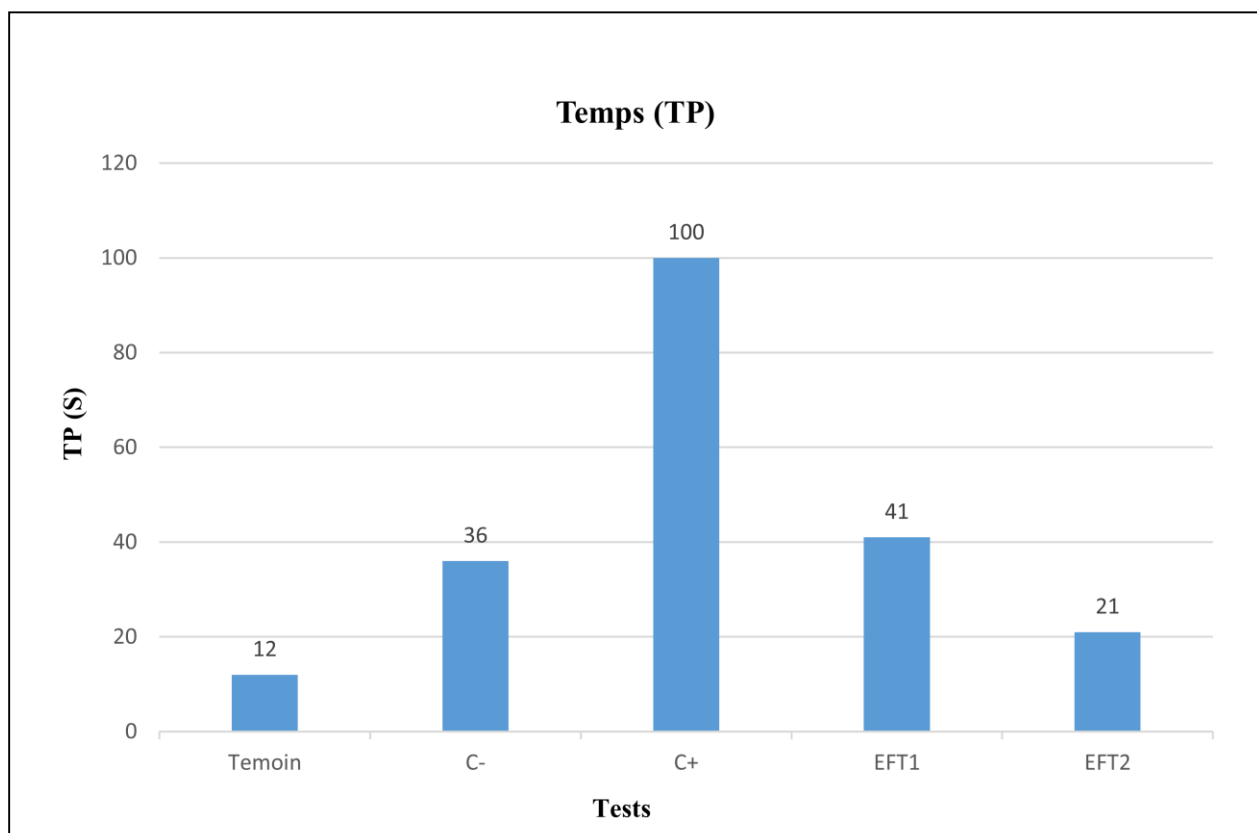


Figure 26 Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.

La figure (32) présente les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène, notons que l'activité anticoagulante de TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés (Caquet R., 2004). L'extrait de l'EFT1 a donné un TQ égale à 41s, cette valeur est largement prolongée par rapport au control négatif (36s) et du témoin (12s). Donc, l'extrait testé (EFT1) a une activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène.

Ainsi que, l'EFT2 a présenté un TQ égale à 21s, ce qui montre qu'il est plus grand que du témoin (12s). Donc, l'extrait testé (EFT2) a une activité anticoagulante modérante vis-à-vis de la voie exogène.

4.3.1.2-Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante des deux extraits (EFT1 et EFT2) vis-à-vis de la voie endogène a été réalisée à l'aide du test de Temps de céphaline Kaolin (TCK). Cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif *in vivo*). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquence l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (Lemaoui., 2011). Les résultats sont présentés dans la figure (27).

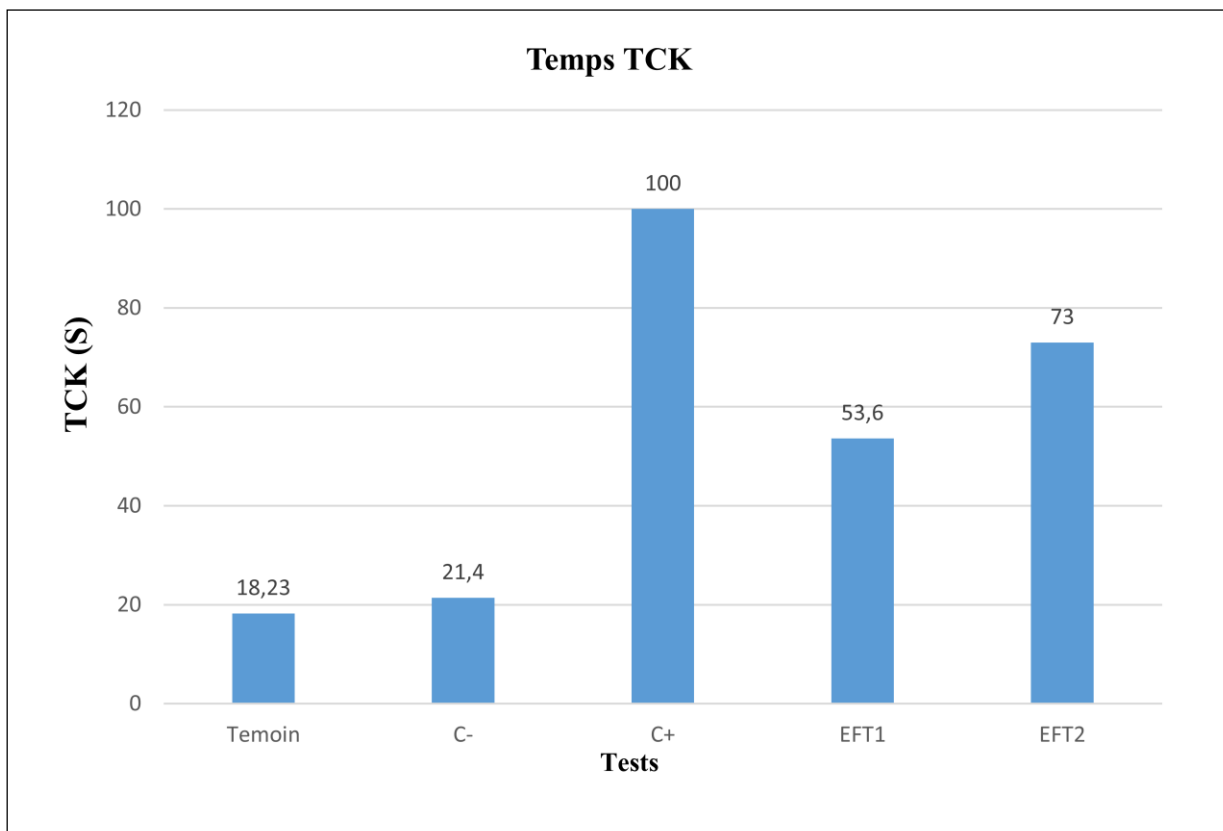


Figure 27 Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

Les résultats obtenus ont donné une valeur égale à 53.6 s pour le TCK de l'EFT1 par rapport à celui du control négatif (26,7s) et du témoin (18.23 s). Cela laisse suggérer que l'extrait testé a une bonne activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène. De plus, l'EFT2, a présenté une valeur de TCK égale à 73 s plus grand que celui du control négatif et du témoin, ce qui lui permet une forte activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.

Alors que les deux extraits de fengycines (EFT1) et (EFT2) ont une forte activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.

Peu de travaux ont été menés sur le pouvoir anticoagulant des lipopeptides (comme les fengycines et les sufactines). Lim *et al.* (2005) ont montré que la pré-incubation d'un plasma riche en plaquettes avec la surfactine de BC1212 entraîne une inhibition de l'agrégation plaquettaire d'une manière dose-dépendante et améliorent le fonctionnement de l'endothélium, la couche cellulaire et assurent le bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risques d'athérosclérose. Dans le même contexte, Cameotra et Makkar. (2004) ont rapporté que les lipopeptides sont doués d'une activité anticoagulante par inhibition de la formation de caillot de fibrine, ce qui protège contre le risque de formation de thrombus veineux. Ben Ayed *et al.* (2015) ont montré que les lipopeptides de *B. mojavensis* A21 possèdent une activité anticoagulante, sur la voie intrinsèque de la formation des caillots de sang.

4.3.2-Activité anti-oxydante

4.3.2.1-Test de piégeage du radical DPPH

Les résultats de l'activité anti-radicalaire au DPPH sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que, les valeurs de la concentration d'inhibition de 50 % (tableau 08). Les standards utilisés étaient le trolox et l'acide ascorbique. Les valeurs inférieures à IC50 indiquent l'efficacité de l'extrait et donc le pouvoir antioxydant plus fort.

Tableau 08 Le pourcentage d'inhibition (%) du DPPH par les extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2)

Extraits	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400µg/ml	800µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
EFT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EFT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Standard	0.781 25 µg/ml	1.5625 µg/ml	3.125 µg/ml	6.25 µg/ml	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	IC₅₀ (µg/ml)
Trolox	6.42± 0.91	13.33±2.1 4	30.19±0.6 7	61.48±2.9 8	87.16±0.2 8	88.46±0.1 1	87.72±0.4 7	5.12±0.2 1
Ascorbic acid	0.31± 1.02	12.90±0.2 8	29.69±0.3 9	76.67±0.3 7	84.94±0.8 4	87.78±0.4 9	86.36±0.2 1	4.39±0.0 1

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3) (NA= non active)

L'analyse des résultats du Test de piégeage du radical DPPH obtenus, ont montrés, que les quatre extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2) ne possèdent pas une activité anti-oxydante, et ne sont pas capables de piéger le radical libre DPPH.

4.3.2.2-Test de piégeage de l'ABTS

L'activité anti-oxydante des différents extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2) en utilisant le test de piégeage de l'ABTS a montrée la capacité de ces extraits à inhiber le radical ABTS•+, (comparativement à un antioxydant de référence (le trolox ou l'acide ascorbique). Les résultats obtenus de l'activité inhibitrice du radical ABTS sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que, les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (Tableau 09, figure 28 et 29).

Tableau 09 Le pourcentage d'inhibition (%) de l'ABTS par les extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2).

Extraits	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400µg/ml	800µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
EFT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EFT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,85±1,18	>800
EBT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5,16±2,38	>800
standard	0.7812 5 µg/ml	1.5625 µg/ml	3.125 µg/ml	6.25 µg/ml	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	IC₅₀ (µg/ml)
Trolox	14.74± 0.37	26.15±0.6 5	51.70±1.5 1	89.72±0.6 7	92.89±0.1 9	92.89±0.1 9	91.84±1.1 9	3.21±0.0 6
Ascorbic acid	13.43± 0.82	28.76±0.6 7	52.94±0.9 4	93.21±0.1 1	93.08±0.1 9	92.40±0.8 8	92.96±0.1 1	3.04±0.0 5

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3) (NA= non active)

L'analyse des résultats obtenus ont montrés que les deux extraits de fengycines (EFT1 /EFT2) ne possèdent pas une activité anti-oxydante par contre, les extraits brut (EBT1/ EBT2) ont donné une faible activité anti-oxydante estimée à 5.16 % et 2.85% respectivement, avec une concentration égale 800µg/ml. Donc les extraits brut (EBT1/ EBT2) sont capables de piéger le radical cation ABTS•+. Ce qui prouve qu'ils possèdent une activité anti-oxydante.

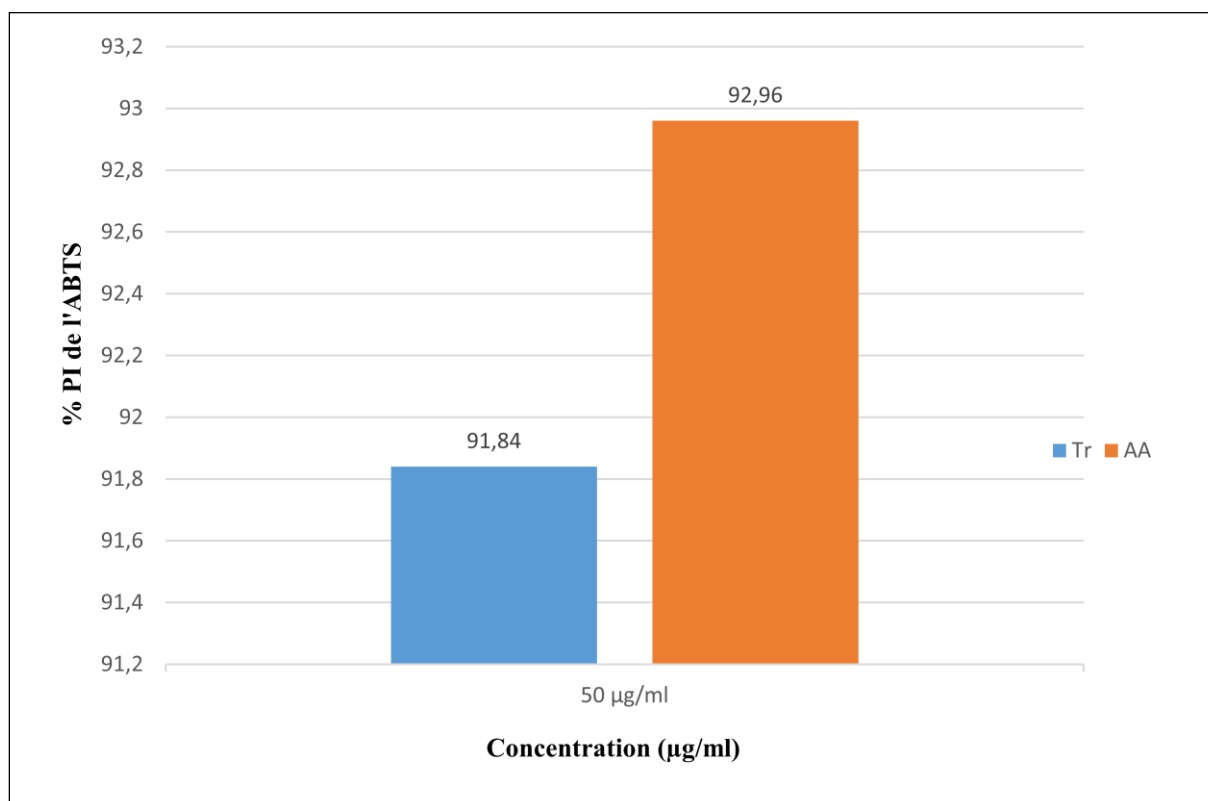


Figure 28 Activité anti-oxydante de l'ABTS du standard (Trolox et acide ascorbique)

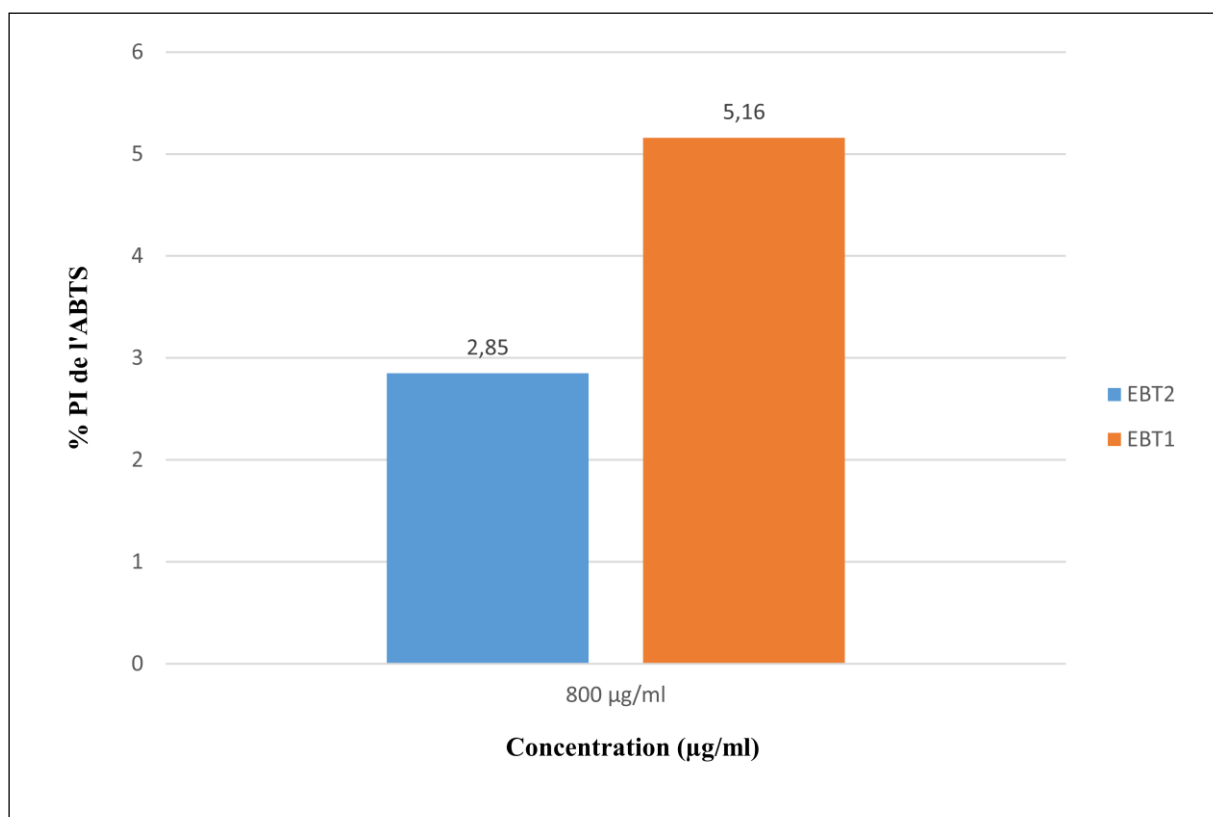


Figure 29 Activité anti-oxydante de l'ABTS des extraits bruts (EBT1 ; EBT2)

4.3.2.3-Test de l'activité Silvernanoparticle (SNP)

Le calcul de la capacité des extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2) à la chélation des métaux a été évalué par rapport aux valeurs de la concentration d'inhibition du standard. Les résultats obtenus de la capacité des extraits à chélater les ions ferreux sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que, les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (tableau 10).

Tableau 10 Activité des extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2) sur les ions chélates

Extraits	6.25µg/ml	12.5µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	A _{0,5} (µg/ml)
EFT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EFT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
standard	1.5625µg/ml	3.125µg/ml	6.25µg/ml	12.5µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	A_{0,5} (µg/ml)
AC ascorbiq	0.24±0.00	0.32±0.01	0.45±0.01	0.75±0.01	1.22±0.02	1.90±0.03	2.35±0.01	7.14±0.05
trolox	0.17±0.00	0.20±0.01	0.23±0.00	0.30±0.01	0.43±0.01	0.64±0.03	1.04±0.01	34.17±1.23

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3) (NA= non active)

L'analyse de résultats obtenus a montré que les quatre extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2) ne possèdent pas une activité anti-oxydante.

Des études précédentes ont démontré l'effet anti oxydant des bactéries lactiques, à savoir l'effet de la souche *L. brevis* P68 isolée des cornichons (Arasu *et al.*, 2015) et les souches *L. curvatus* SR6, *L. paracasei* SR10-1 avec des taux d'inhibition de 55% et de 63.89% de la peroxydation lipidique respectivement (Zhang *et al.*, 2017).

Selon Ser *et al.* (2016). Rajan *et al.* (2012) Janardhan *et al.* (2014). Dholakiya *et al.* (2017), des autres études ont montrées que, les actinobactéries ont une activité anti-oxydante plus forte.

4.3.3-Activité anti-diabétique (anti- alpha amylase)

Dans cette partie, l'enzyme digestive, l' α -amylase, a été utilisée afin d'évaluer l'activité antidiabétique *in vitro* des extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2). Les capacités inhibitrices des extraits testés de l' α -amylase ont été évaluées par rapport au standard (acarbose) et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (11) et la figure (30).

Tableau 11 Pourcentage d'inhibition de l'alpha-amylase par les extraits (EBT1/EBT2/EFT1/EFT2).

Extraits	% d'inhibition							IC ₅₀ (µg/ml)
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	
EBT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EFT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,78±1,33	>400
EFT2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,76±1,93	>400
Standard	62,5 µg	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	IC₅₀ (µg/ml)
Acarbose	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± S.D (n=3) (NA= non active)

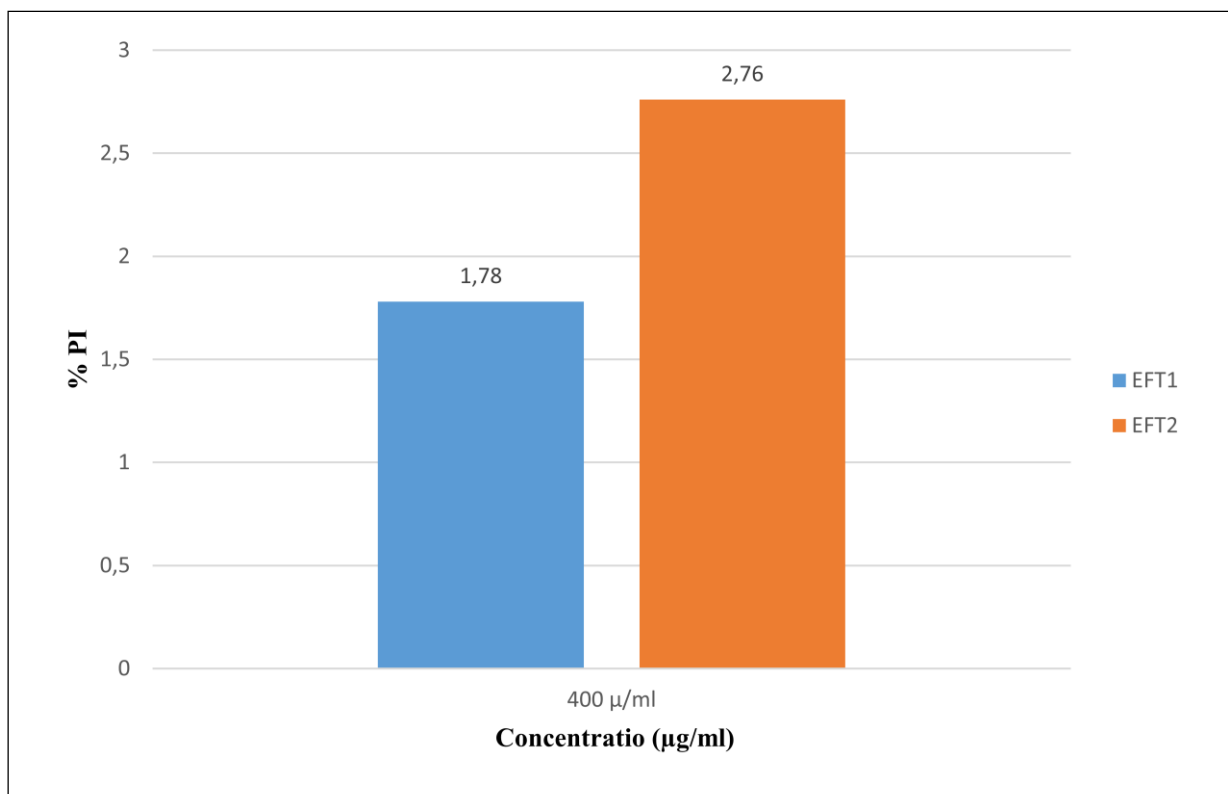
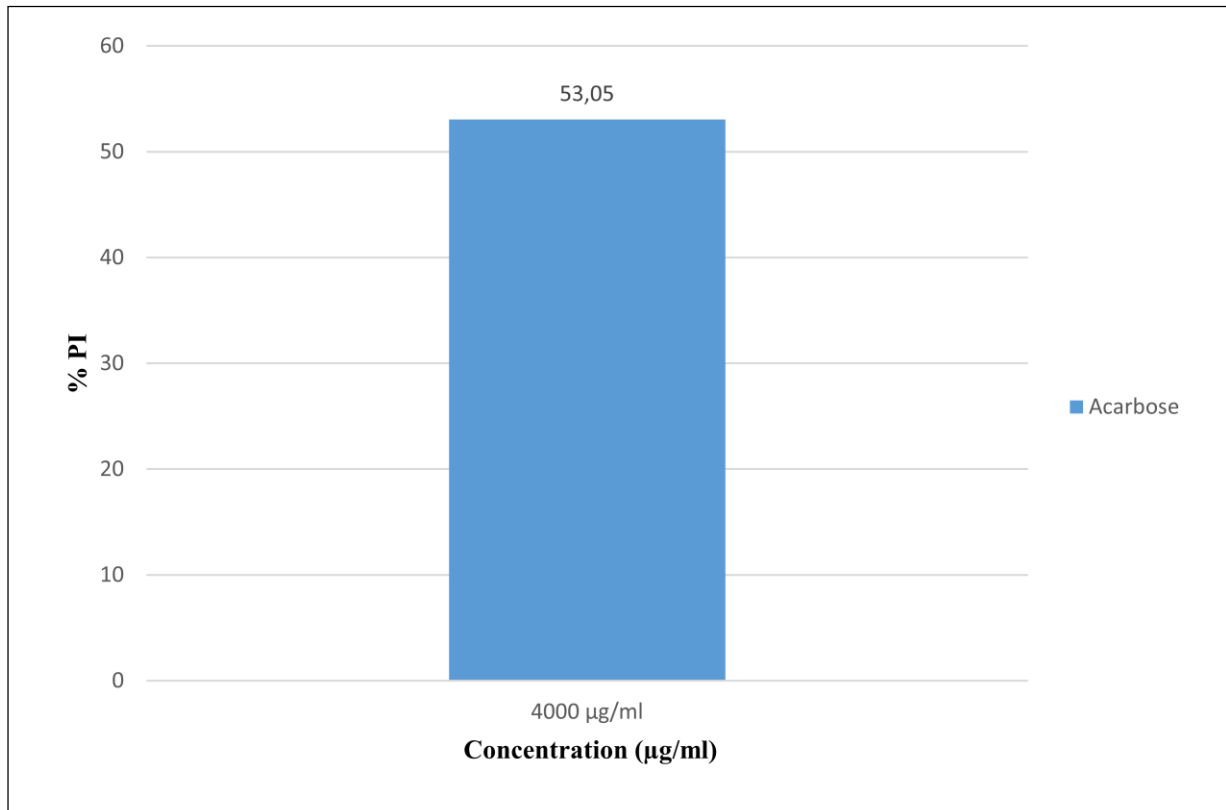


Figure 30 Pourcentage d'inhibition de l'alpha -amylase par les extraits (EFT1/EFT2) et le standard (Acarbose)

D'après les résultats obtenus, Il ressort que, les extraits de fengycines (EFT1 et EFT2) ont un pouvoir inhibiteur de l' α -amylase avec un pourcentage d'inhibition de 1.78 % et 2.76 % respectivement à une concentration égale à 400 μ g/ml.

De nombreuses études ont démontré que les activités inhibitrices de l' α -amylase des probiotiques peuvent être bénéfiques pour la régulation glycémique (Gazza *et al.*, 2016 ; Panwar *et al.*, 2014). Les probiotiques atténuent le DT2 en régulant le métabolisme du glucose et en améliorant la sensibilité à l'insuline par plusieurs mécanismes, y compris la production de métabolites, tels que les SCFA (Morrison et Preston., 2016 ; Herrema et Niess., 2020). Les bactéries LAB produisent des composants bioactifs capables d'inhiber l'activité de l' α -amylase (Zeng *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2014).

L'activité anticoagulante, activité anti-oxydante et activité antidiabétique de l'extrait fengycine obtenu à partir de ces deux bactéries ont été utilisée pour la première fois dans le présent travail. En revanche peu de travaux ont été publiés dans la littérature.

4.3.4-Evaluation de l'activité antimicrobienne

Le pouvoir antibactérien *in vitro* d'EBT1 / EBT2 / EFT1 / EFT2 en utilisant la méthode de diffusion des puits sur un milieu gélosé solide (LB) a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait vis-à-vis de trois bactéries pathogènes (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 30°C. Les résultats positifs obtenus du test effectué sont représentés dans le tableau (12) et la figure (31).

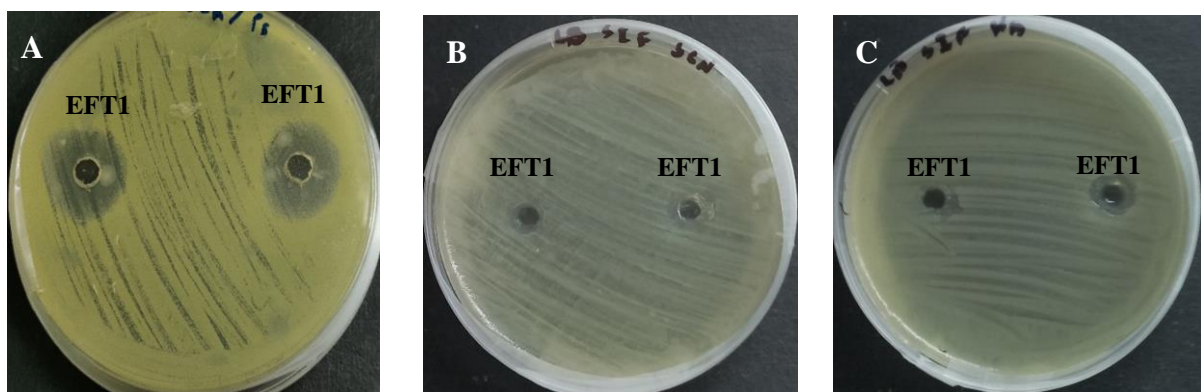


Figure 31 Effet antagoniste d'EFT1 sur les bactéries pathogènes ; (A) : *Pseudomonas aeruginosa* ; (B) : *Streptocoque coagulase négative* ; (C) : *Klebsiella sp*.

Tableau 12 Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne.

Bactérie pathogène	Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne (mm)
<i>Streptocoque coagulase négative</i>	14 mm
<i>Klebsiella sp.</i>	15 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23 mm

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne de l'extrait (EFT1) produit par la souche T1 du genre *Bacillus* ont montré que, cet extrait (EFT1) a une légère activité dans les deux cas de bactéries pathogènes, *Streptocoque coagulase négative* et *Klebsiella sp.* (14 mm ; 15 mm) respectivement, et un meilleur effet (23 mm) contre *Pseudomonas aeruginosa*.

La recherche de nouveaux agents antimicrobiens augmente considérablement en raison de la résistance des micro-organismes pathogènes aux médicaments antimicrobiens déjà présents. Les *Bacillus* ont le pouvoir antagoniste et la capacité à produire un grand nombre d'antibiotiques et de métabolites antifongiques à intérêt médical tels que les bactériocines les lipopeptides (l'iturine, surfactine, fengycine)...etc. (Handelsman *et al.*, 2009 ; Whipps., 2001).

Selon Huang *et al.* (2007), la surfactine et la fengycine produites par la souche *B. subtilis* fmbj inactivent efficacement les endospores de *B. cereus* .en endommageant principalement la structure de surface de ces spores. Ainsi que, il a été rapporté que les surfactines isolées de la souche H3 de *B. velezensis* étaient actives contre *P.aeruginosa*, *St.aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Mycobacterium* (Liu *et al.*, 2010).

Récemment, une étude menée par Lv *et al.* (2020) a également signalé que, Le surnageant de fermentation de *B. amyloliquefaciens* C-1 contient un mélange contenant de la surfactine et de la fengycine, qui inactivent la croissance de *Clostridium difficile* (bactérie pouvant infecter l'intestin et provoquer des diarrhées).

4.3.4.1- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

L'efficacité de l'extrait (EFT1) sur les trois souches bactériennes pathogènes sensibles (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) a été déterminée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI), en utilisant la technique de micro-dilution et le

bouillon nutritif comme milieu de culture. Le control positif a été préparé en utilisant deux antibiotiques (Gectapen et Amoxyphen), Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau (13).

Tableau 13 Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques et de l'EFT1 contre les bactéries pathogènes (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*)

Souches bactériennes	Antibiotiques et l'extrait	Concentration (µg/ml)					
		40000 µg/ml	20000 µg/ml	10000 µg/ml	5000 µg/ml	2500 µg/ml	1250 µg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EFT1	+**	-*	-*	-*	-*	-*
	Amoxyphen	+**	+**	-*	-*	-*	-*
	Gectapen	+**	-*	-*	-*	-*	-*
<i>Klebsiella sp.</i>	EFT1	+**	+**	-*	-*	-*	-*
	Amoxyphen	+**	+**	-*	-*	-*	-*
	Gectapen	+**	-*	-*	-*	-*	-*
<i>Streptocoque coagulase négative</i>	EFT1	+**	-*	-*	-*	-*	-*
	Amoxyphen	+**	+**	-*	-*	-*	-*
	Gectapen	+**	-*	-*	-*	-*	-*

*test négatif ** test positif

Après, l'analyse des résultats obtenus, l'extrait (EFT1) a une valeur de CMI de l'ordre de 40000 µg/ml contre les deux bactéries pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptocoque coagulase négative*) et une valeur de 20000 µg/ml contre la bactérie (*Klebsiella sp.*), tandis que l'antibiotique Amoxyphen a une valeur de CMI égale à (20000 µg/ml) contre les trois bactéries pathogènes, par contre l'antibiotique Gectapen qui possède un CMI de 40000 µg/ml contre ces trois bactéries.

Alors que, l'extrait (EFT1) a présenté le même effet antibactérien avec l'antibiotique Amoxyphen contre la souche bactérienne (*Klebsiella sp*) à une valeur de CMI égale à (20000 µg/ml) plus petit que celui de l'antibiotique Gectapen (40000 µg/ml). En effet, l'antibiotique Amoxyphen a inhibé la croissance bactérienne des deux souches bactériennes (*Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) avec la valeur de CMI (20000 µg/ml) qui est plus grand que celui de

l'antibiotique Gectapen et l'extrait (EFT1) qui ont une valeur de CMI égale à (40000 µg/ml) contre la croissance de ces deux bactéries.

4.3.5- Activité synergique

Des combinaisons entre l'extrait (EFT1) et les antibiotiques de (Amoxypen et Gectapen) ont été testées sur les trois souches bactériennes pathogènes (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) pour rechercher une synergie qui a été évaluée par l'indice FIC (concentration inhibitrice fractionnaire). L'effet antibactérien de l'association de l'EFT1 aux antibiotiques est présenté dans la figure (32) et le tableau (14).

Les résultats obtenus ont montrés que, les deux combinaisons (EFT1+Amoxypen) et (EFT1 + Gectapen) ont le même effet antimicrobien contre les trois bactéries pathogènes dont la valeur de CMI est égale à (2000 µg /ml).

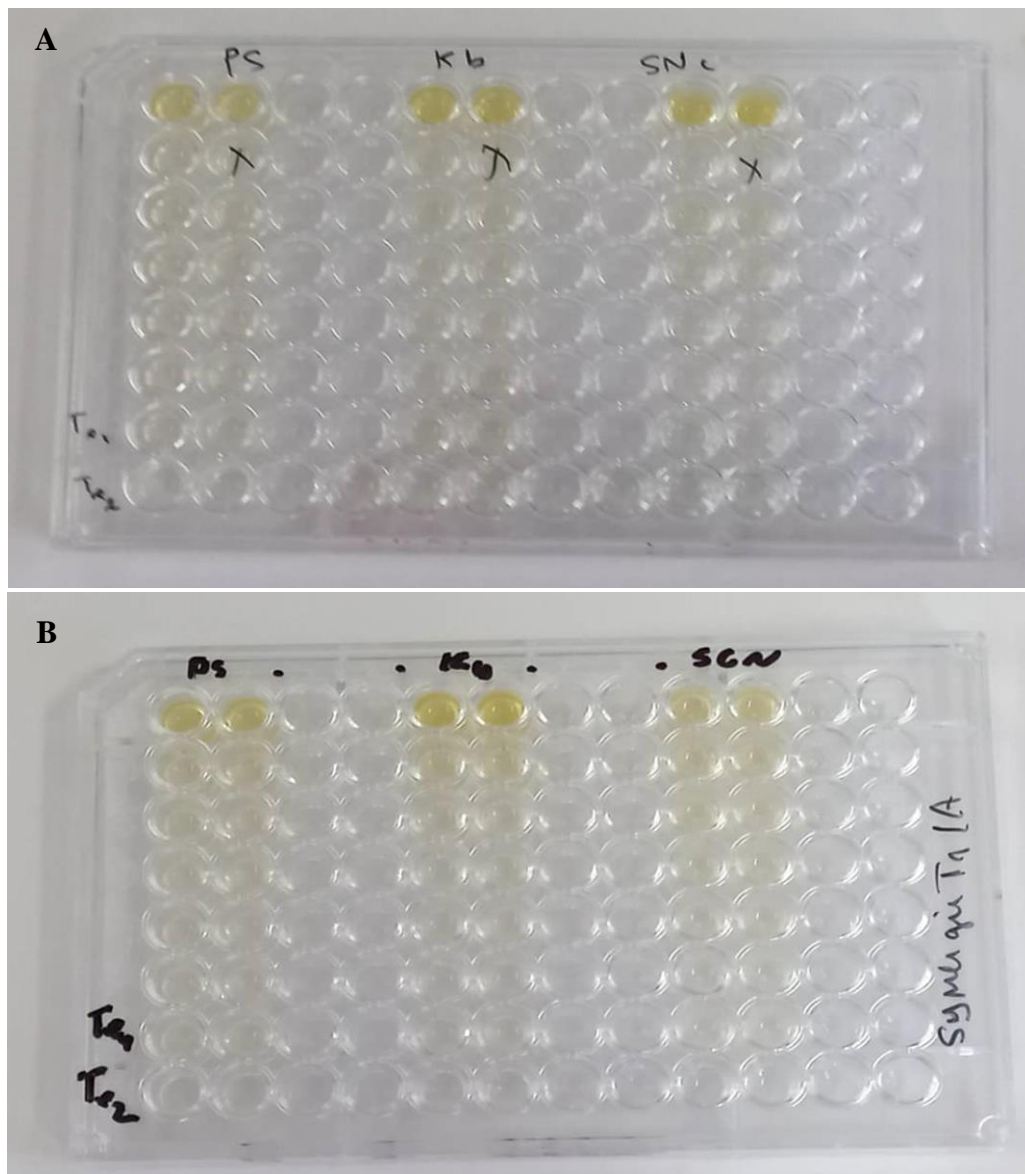


Figure 32 Microplaques de la synergie de deux combinaisons ; A : (EFT1 + Gectapen) et B :(EFT1+Amoxypen)

Tableau 14 La synergie entre les antibiotiques (Amoxypen et Gectapen) et l'extrait (EFT1)

Souches bactériennes	Extrait + antibiotique	Concentration (µg/ml)						FIC
		2000 µg /ml	1000 µg /ml	500 µg /ml	250 µg /ml	125 µg /ml	62.5 µg /ml	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EFT1+ Amoxypen	***	-*	-*	-*	-*	-*	0.15
	EFT1 + Gectapen	***	-*	-*	-*	-*	-*	0.1
<i>Klebsiella sp.</i>	EFT1+ Amoxypen	***	-*	-*	-*	-*	-*	0.2
	EFT1 + Gectapen	***	-*	-*	-*	-*	-*	0.15
<i>Streptocoque coagulase négative</i>	EFT1+ Amoxypen	***	-*	-*	-*	-*	-*	0.15
	EFT1 + Gectapen	***	-*	-*	-*	-*	-*	0.1

*test négatif ** test positif

Selon le tableau ci-dessus, les deux combinaisons (EFT1+Amoxypen) et (EFT1 + Gectapen) ont généralement montré des effets antibactériens synergiques ($FIC \leq 0,5$) contre les trois bactéries pathogènes (*Klebsiella sp.*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*). Alors que, l'extrait (EFT1) a un effet synergique avec les deux médicaments (Gectapen et Amoxypen) contre ces trois bactéries pathogènes.

Kumar *et al.* (2013).ont déclaré que la combinaison de deux médicaments dans une formulation thérapeutique est une tentative de prévenir le développement de la résistance aux médicaments et d'élargir leur spectre antimicrobien, réduisant ainsi les effets toxiques possibles. De plus, les composés lipopeptidiques produits par les espèces de *Bacillus* ont été montrés un effet synergique dans l'inhibition de la croissance de champignons pathogènes *in vitro* (Touré *et al.* 2004 ; Romero *et al.* 2007 ; Kim *et al.* 2010). Par exemple, la combinaison de lipopeptides de bacillomycine D et de fengycine, produite par la souche FZB42 de *B. amyloliquefaciens*, a montré un effet synergique contre une souche de *Fusarium oxysporum* (Koumoutsi *et al.* 2004). Par

conséquent, dans le but d'améliorer l'efficacité antimicrobienne de la bacillomycine D et de réduire ses effets toxiques, elle a été utilisée dans l'activité synergique avec le médicament conventionnel amphotéricine B. ce qui donne un effet synergique clair obtenu contre les souches de *C. albicans*. (FIC de 0,24 à 0,28) et contre d'autres espèces de *Candida* englobant *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis* et *C. glabrata* (FIC de 0,27 à 0,37) (Shin et Pyun 2004 ; Elefanti *et al* 2013).

4.3.6-Activité antifongique

Dans le présent travail, le test antifongique a été réalisé, en utilisant la méthode de confrontation directe. Les résultats du test ont montré qu'au bout de sept jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste *Bacillus*, alors que les isolats de champignons pathogènes n'occupent qu'une, surface variant de 6 à 20 mm de diamètre, ce qui correspond à une inhibition de croissance mycélienne supérieure à 38 % (tableau 15) Le témoin des souches cultivé seul, occupe une surface variant de 55 à 60 mm de diamètre. Les données obtenues sont exprimées comme des pourcentages de réduction d'expansion du mycélium en présence et en absence des bactéries à activité antifongique (figure 33).

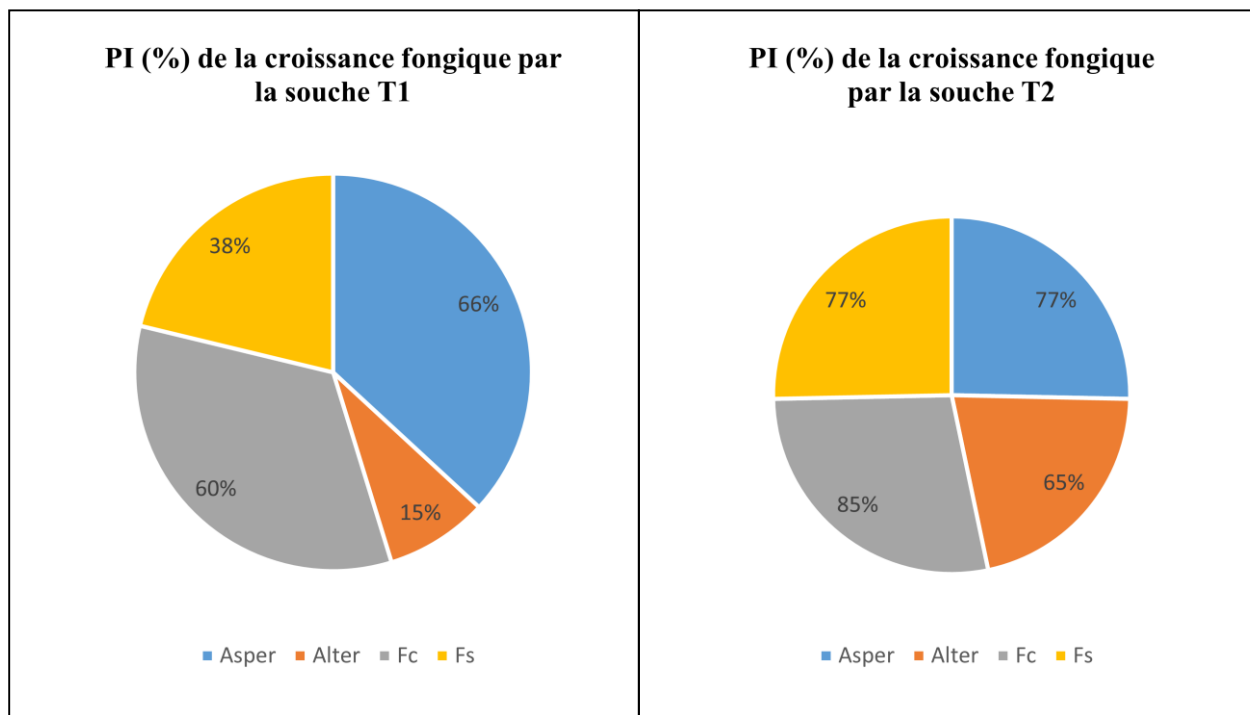
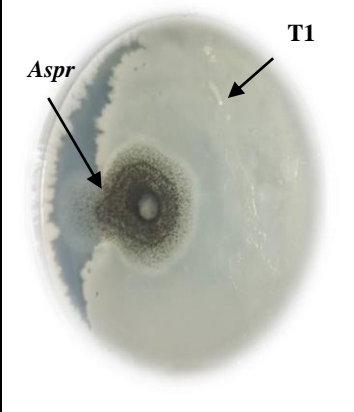
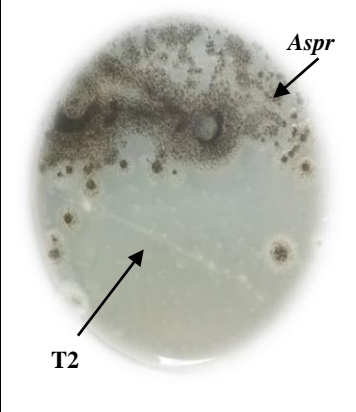
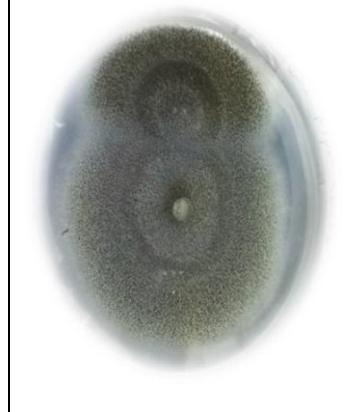

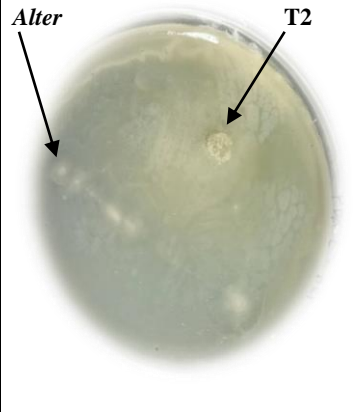

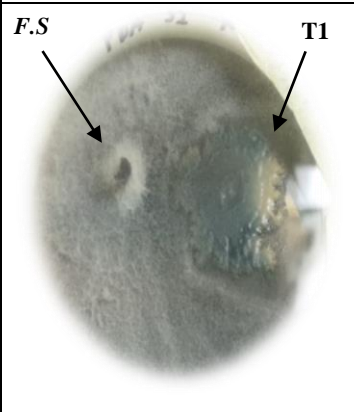
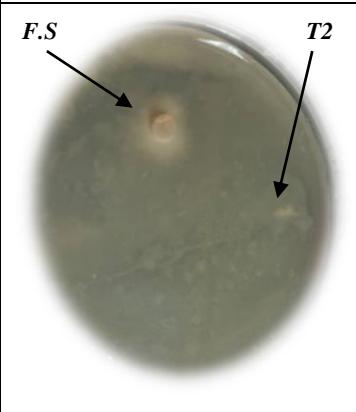

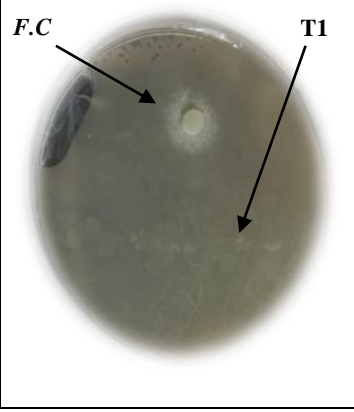
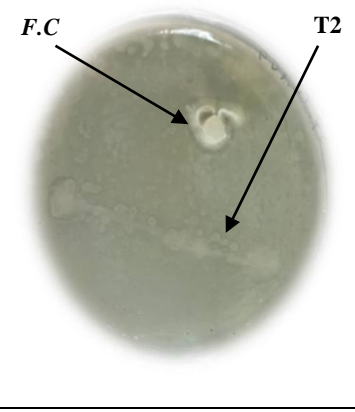



Figure 33 Secteurs représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de *F.solani* ; *Alternaria sp* ; *Aspergillus sp* ; *F.culmorum* en confrontation directe avec les antagonistes T1 et T2.

Tableau 15 Test de confrontation directe contre *Fisarium.solani* ; *Alternaria sp.* ; *Aspergillus sp.* ; *Fisarium. culmorum* par les deux souches bactériennes T1 et T2

Souches	T1	T2	Témoin
champignons			
<i>Aspergillus. Sp</i>			
<i>Alternaria sp</i>			
<i>F.Solani</i>			
<i>F. Culmorum</i>			

D'après l'analyse des résultats obtenus, les deux souches bactériennes étudiées (T1 et T2), présentent différents niveaux d'antagonisme vis-à-vis des quatre champignons testés, En effet, la souche T1 a la capacité d'inhiber la croissance de l'*Aspergillus sp.* à (66%), *F.solani* à (38%), *F.culmorum* à (60%) et l'*Alternaria sp.* à (15%). Alors que la souche T2 a montrée des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique égaux a (77 %) pour l'*Aspergillus sp.* , (77 %) pour *F.solani* , (85 %) pour *F.culmorum* , et (65 %) pour l'*Alternaria sp.* Cela montre que, le pouvoir antifongique de la souche T2 plus grand que celui de la souche T1 contre ces champignons pathogènes.

Les lipopeptides de *Bacillus* exercent un large éventail d'activités antifongiques par le changements morphologiques des champignons tels que des gonflements des hyphes, une modification de l'organisation des mitochondries, une diminution du pH intracellulaire, des activités des estérases et des mitochondries et une diminution de l'hydrophobicité des hyphes (González-jaramillo *et al.*, 2017 , Hansen *et al.*, 2000). En bref, l'iturine inhibe nettement la croissance des champignons nématophages, des champignons colorant le bois, *Aspergillus flavus* , *Penicillium roqueforti* et *Colletotrichum demiatium* (Moynes *et al.*, 2001 ; Velmurugan *et al.*, 2002) tandis que la fengycine inhibe le *Fusarium graminearum* , *Botrytis cinerea* et *Podosphaera fusca* (Wang *et al.*, 2007 ; Romero *et al.*, 2007).

Conclusion

5- Conclusion et perspectives

Le genre *Bacillus* produit une source remarquable des substances bioactives. Leur grande diversité structurale et leurs propriétés physico-chimiques a fait qu'ils présentent une grande variété d'activités biologiques leur permettant d'avoir des applications dans différents domaines. En effet, des recherches scientifiques sont mises en point pour la découverte des agents naturels microbiens à effet thérapeutiques. Dans ce contexte, la présente étude porte sur la recherche *in vitro* des activités biologiques de deux souches bactériennes du genre *Bacillus*, en vue de leur application en biothérapie et traitement des maladies humaines. Pour arriver à cet objectif, plusieurs étapes ont été suivies.

La vérification morphologique et biochimique des deux souches bactériennes a montré que ces dernières sont mobiles, sous forme bâtonnet à Gram positif, possédant des endospores et sont aéro-anaérobies facultatifs. Leurs tests API 20E sont semblables à ceux du genre *Bacillus*. Il a été conclu de cette partie que les deux souches appartiennent au genre *Bacillus*.

La mise en évidence de l'activité enzymatique a montré que les deux souches ont la capacité de produire des enzymes biopharmaceutiques extracellulaires (l'amylase, la protéase, la cellulase).

L'évaluation de l'activité anticoagulante des extraits de fengycines (EFT1, EFT2) vis-à-vis de deux voies de la coagulation a été démontrée que leur effet est plus important sur la voie endogène que la voie exogène, il a été conclu que ces extraits ont un excellent pouvoir anticoagulant. De ce fait, ils peuvent être utilisés comme des anticoagulants naturels contre les complications des maladies thrombotiques en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose par le blocage de la formation des caillots de fibrine.

En revanche, l'évaluation de l'activité anti-oxydante par le piégeage des radicaux libres (ABTS+) a présenté une faible activité anti-oxydante des deux extraits bruts (EBT1/EBT2).

L'activité anti-alpha amylase de l'extrait fengycines, a montré un pouvoir inhibiteur de l' α -amylase. Il a été conclu de cette partie que, les fengycines possèdent une activité anti-diabétique réduisant la dégradation de l'amidon et diminuant l'absorption du glucose, ce qui provoque l'augmentation de la glycémie postprandiale. De ce fait, les fengycines peuvent être utilisés comme des composés hypoglycémiant.

Il est à noter que, l'activité anticoagulante, l'activité anti-oxydante et l'activité antidiabétique de l'extrait fengycines de deux bactéries ont été développées pour la première fois dans le présent travail.

L'évaluation de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode des puits vis-à-vis les souches pathogènes (*Klebsiella sp*, *Streptocoque coagulase négative*, *Pseudomonas aeruginosa*) a montré une zone d'inhibition variant entre 14 à 23 mm.

Il a été conclu de cette partie que l'extrait de fengycine de la souche T1, possède un pouvoir inhibiteur vis-à-vis les trois souches bactériennes testées.

L'activité synergique, a montré que, l'extrait (EFT1) a un effet synergique avec les deux médicaments (Gectapen et Amoxypen) $FIC \leq 0.5$.

La confrontation directe a montré que les souches bactériennes (T1 et T2) ont pu inhiber les champignons pathogènes tests (*Aspergillus sp*, *F. solani*, *F. culmorum*, *Alternaria sp.*) d'une façon variable avec une occupation de surface variant entre 6 à 20 mm de diamètre.

Enfin, Au terme de ce travail, il a été conclu que les bactéries du genre *Bacillus* peuvent constituer un réservoir des substances bioactives, qui jouent un rôle important dans de différents domaines notamment, la biotechnologie et la biothérapie.

L'ensemble des résultats obtenus au fil de cette étude reste préliminaire et représente qu'une première étape dans la recherche de substances bioactive, donc de nombreuses perspectives expérimentales écoulent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires plusieurs points à savoir :

- Séparation et isolement de différents constituants de ces extraits afin d'identifier les molécules responsables des propriétés biologiques.
- Optimisation du milieu de fermentation pour l'obtention d'un meilleur rendement en substances bioactives.
- L'étude approfondie et complémentaires *in vivo* des activités étudiées (antidiabétique, anticoagulante), ainsi que, l'étude des autres activités biologiques tel que, l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique.
- Etude de la cyto-toxicité des extraits, notamment, les fengycines, sur des lignes cellulaires afin de déterminer les concentrations requises non néfastes pour l'humain.

*Références
bibliographiques*

1. Abriouel, H., Franz, C.M., Ben Omar, N. and Galvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35(1): 201-232.
2. Agbaje, L., Sunday A. O., Suliat, O. M., 2016. Anticandida, anti-coagulant and thrombolytic activities of biosynthesized silver nanoparticles using cell-free extract of *Bacillus safensis* LAU 13. *Process Biochemistry*.
3. Ahaotu, A., Anyogu, O.H., Njoku, N.N., Odu, J.P., Sutherland, et Ouoba, L.I.I., 2013. Molecular identification and safety of *Bacillus* species involved in the fermentation of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla* Benth) for production of Ugba. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 95-104.
4. Ahimou F, Jacques P, Deleu M (2000). Effets de la surfactine et de l'iturine A sur *Bacillus subtilis* l'hydrophobicité de surface *Enzyme Microb Technol* 27:749–754.
5. Aigu avec sus-décalage ST. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* ; 59: 335–343.
6. Aleti, G., Lehner, S., Bacher, M., Compant, S., Nikolic, B., Plesko, M., & Brader, G. (2016). Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environmental microbiology*, 18(8), 2634-2645.
7. 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 :8 doi:10.1186/1746-1448-4-8.
8. Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 comme source d'antibiotiques puissants et d'autres métabolites secondaires pour le contrôle biologique des agents pathogènes des plantes. *Fait sur la cellule microbienne* 8 : 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>.
9. Arrebola, E., Jacobs, R. & Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 108: 386-395.
10. Aubry P, Halna du Fretay X. (2010). Traitements antithrombotiques du syndrome coronarien
11. Azevedo EC, Rios EM, Fukushima K, Campos-Takaki GM.(1993). Production de bacitracine par une nouvelle souche de *Bacillus subtilis* . *Appl Biochem Biotech* ; 42 : 1–7.10.1007/BF02788897.
12. Ben Ayed H, Hmidet N, Béchet M, Chollet M, Chataigné G, Leclère V, Jacques P, Nasri M (2014). Identification et caractéristiques biochimiques des lipopeptides de *Bacillus*

mojavensis A21. Process Biochem 49: 1699–1707. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.001>.

13. Ben Ayed H., Nasri R., Jemil N., Ben Amor I., Gargouri J., Hmidet N., Nasri M. (2015). Acute and subchronic oral toxicity profiles of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21 and evaluation of their *in vitro* anticoagulant activity. *Chem Biol Interact* ; 236 : 1-6.
14. Bergey, D.P., 2001. *Bergey's Taxonomic Outline. Bergey's Manual of systematic bacteriology, second edition*. http://141.150.157/bergey_soutline/tankyout.htm. Biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537-547. Biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds.
15. Berraho EB., 2009 *Cours de microbiologie générale*.
16. Besson, F., F. Peypoux., G. Michel., (1979). Interaction between bacterial membranes and peptidolipids : lysis of *Micrococcus Luteus* protoplasts by derivatives of derivatives of peptidolipidic antibiotics from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 552-562.
17. Blois M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617(181):1119-1200.
18. Bonmatin JM, Laprevote O, Peypoux F (2003). Diversité parmi les lipopeptides cycliques microbiens : iturines et surfactines. Relations activité-structure pour concevoir de nouveaux agents bioactifs. *Comb Chem High Throughput Screen* 6:541–556. <https://doi.org/10.2174/138620703106298716>.
19. Bouhairi, S. (2017). *Bacillus subtilis* : caractères et applications. Thèse de doctorat. Université Mohammed v-rabat. 134p.
20. Breuer, H.W. (2003). Review of acarbose therapeutic strategies in the long-term treatment and in the prevention of type 2 diabetes. *Int J CIM Pharmacol Ther*, Volume 41, pp 421-440.
21. Cameotra, S.S. et Makkar, R.S., 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol*; 7:262–6. DOI: 10.1016/j.mib.2004.04.006.
22. Camilla, B., Martin, M., Kasper, L. & Jens, M. (2019). Trends in antidiabetic drug utilization and expenditure in Denmark: A 22-year nationwide study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 22(2):167-172.

23. Cao, X-H., Liao, Z-Y., Wang, C-L., Yang, W-Y., Lu, M-F., (2009). Evaluation of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus natto* tk-1 as a Potential Source of Anti-adhesive, Antimicrobial and Antitumor Activities. *Brazilian JMicrobiol* 40,473-379.
24. Caquet R. (2004). 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9ème Ed), Masson (Paris). pp :388-389.
25. Carballido-Lopez R and Formstone A. (2007). Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.*10: 611-6.
26. Carolin CF, Kumar PS, Ngueagni PT (2021). Une revue des nouveaux aspects du biosurfactant lipopeptidique : types, production, propriétés et son application dans le processus de bioremédiation. *J Hazard Mater* 407:124827. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124827>.
27. Carrillo C, Teruel JA, Aranda FJ, Ortiz A (2003). Mécanisme moléculaire de la perméabilisation membranaire par l'antibiotique peptidique surfactine. *Biochim Biophys Acta* 1611: 91–97 .
28. Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front. Microbiol.*, 10, 302. doi:10.3389/fmicb.2019.00302.
29. Chen P, Zhang Q, Dang H, Liu X, Tian F, Zhao J, Chen Y, Zhang H, Chen W.(2014) Dépistage d'un nouveau probiotique potentiel basé sur les propriétés probiotiques et l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase. *Contrôle alimentaire.* ; 35 : 65–72.
30. Chen, P., Wang, D., Ren, Q., Wu, J., Jiang, Y., Wu, Z., Pan, Y., Zhong, Y., Guan, Y., Chen, K., Zhang, G., 2020. *Bacillus aerolatus* sp. nov., a novel member of the genus *Bacillus*, isolated from bioaerosols in a school playground. *Arch. Microbiol.* 202, 2373–2378. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01955-3>.
31. Choi YM, Suh HJ, Kim JM. (2001). Purification et propriétés de la phytase extracellulaire de *Bacillus* spp. KHU-10 . *J Protein Chem* ;20 :287–92.10.1023/A:1010945416862.
32. Claus, D. et Berkeley, R. C. W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. Vol 2: 1105 -1139.

33. Contesini, F. J., Melo, R. R., and Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 321–334. doi:10.1080/07388551.2017.1354354.
34. Coutte, F., Leclere, V., Bechet, M., Guez, J.S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P. and Jacques, P. (2009) Effect of *pps* disruption and constitutive expression of *surfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *J. Appl. Microbiol.* 109, 480–491.
35. Coutte F., Lecouturier D., Dimitrov K., Guez J. S., Delvigne F., Dhulster P., et al. (2017). Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. *Biotechnol. J.* 12 1–10.
36. Cubitto, M. A., Moran, A. C., Commendatore, M., Chiarello, M. N., Baldini, M. D., and Sineriz, F. (2004). Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation* 15, 281-287.
37. Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, et al. (2013) Production et caractérisation partielle de l'enzyme amylase extracellulaire de *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus* 2 : 154. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-154> doi : 10.1186/2193-1801-2-154.
38. Deleu M, Bouffioux O, Razafindralambo H, Paquot M, Hbid C, Thonart P, Jacques P, Brasseur R (2003). Interaction de la surfactine avec les membranes : une approche computationnelle. *Langmuir* 19:3377–3385.
39. Deleu M., Paquot M., Nylander T. (2005). Interaction de la fengycine avec les monocouches lipidiques à l'interface air-eau-implications pour l'effet de la fengycine sur les membranes biologiques. *J. Coll. InterfaceSci*;283 :358–365. doi : 10.1016/j.jcis.2004.09.036.
40. Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.*, 94 (7), 2667-2679. doi:10.1529/biophysj.107.114090.
41. Denis, F., E. Bingen, C. Martin, M.C. Ploy and R. Quentin. (2011). *Bacteriologie Medicale*. 2nd Edn., Elsevier Masson, Paris, ISBN: 9782294725944, Pages: 640.
42. De Araujo LLGC, Sodré LGP, Brasil LR, Domingos DF, de Oliveira VM, da Cruz GF (2019). Récupération microbienne améliorée du pétrole à l'aide d'un biosurfactant produit

par *Bacillus safensis* isolé du microbiote de mangrove - partie I caractérisation du biosurfactant et test de déplacement d'huile. *J Petrol Sci Eng* 180:950–957. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.06.031>.

43. de Franca, I.W.L., Lima, A.P., Lemos, J.A.M., Lemos, C.G.F., Melo, V.M.M., de Sant'ana, H.B., Gonçalves, L.R.B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255, 10-15.
44. 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*, 2nd ed., The *Firmicute*. Springer. New York. Volume 3. 63-67.
45. Dholakiya R. N., Kumar R., Mishra A., Mody K. H., & Jha B. (2017). Antibacterial and antioxidant activities of novel actinobacteria strain isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. *Front. Microbiol.* 8. 2420.
46. Diallo MM, Vural C, Şahar U, Ozdemir G (2019). Les molécules de Kurstakin facilitent l'assimilation du carburant diesel par la souche 2SA d'*Acinetobacter haemolyticus* par la surexpression des gènes d'alcane hydroxylase souche 2SA par la surexpression des gènes d'alcane hydroxylase. *Environ Technol.*
47. Dortu C., et Thonart P. (2009) Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13: 143–154.
48. Dufour S, Deleu M, Nott K, Wathelet B, Thonart P, Paquot M (2005). Activité hémolytique de nouveaux analogues linéaires de surfactine en relation avec leurs propriétés physico-chimiques. *Biochim Biophys Acta* 1726 : 8795.
49. Elefanti A, Mouton JW, Verweij PE, et al. (2013). Amphotericin B- and voriconazole–echinocandin combinations against *Aspergillus* spp: effect of serum on inhibitory and fungicidal interactions. *Antimicrob Agents Chemother* ;57:4656–63.
50. Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., Avis, T. J. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J. Chem. Ecol.*, 39 (7), 869-878. doi:10.1007/s10886-013-0319-7.

51. Fan B, Wang C, Song X, et al. (2018) *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front Microbiol* 9: 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>.
52. Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clement, C., Barka, E. A., Jacquard, C., and Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology* 16, 177-87.
53. Feillet .P. (2000). Le grain de blé composition et utilisation : Les enzymes amylolytiques. Edition Quae Amazon France.124-125p.
54. Garveba P., Van Veen I.A. and Van Elsas J.D., (2003). Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*; 45:302- 31. DOI: 10.1007/s00248-002-2034-8
55. Gazza L, Gazzelloni G, Taddei F, Latini A, Muccilli V, Alfieri M, Conti S, Redaelli R, Pogna NE.(2016). Les inhibiteurs de l'alpha-amylase/trypsine liés à l'amidon dans Avena. *Mol Genet Genom Med.* ; 291 :2043–2054. doi : 10.1007/s00438-016-1238-4.
56. Gerrard, J.A., Prince, M.J. and Abell, A.D. (2000). Kinetic Characterisation of EneDiol-Based Inhibitors of α -Amylase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 10, No14, pp 1575-
57. Gonzalez-Jaramillo, L. M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Villegas-Escobar, V., Ortiz, A. (2017). Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 156, 114-122. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.021.
58. Gordon, R. E., Hayens, W. C et Pang, C. H. N., 1973. The genus *Bacillus*. In *Bacillus* Edited by Colin R. Harwood. New -York & London: Plenum Press. p: 293 -320.
59. Grangemard I, Wallach J, Maget-Dana R, Peypoux F (2001). Lichenysine : un chélateur de cations plus efficace que la surfactine. *Appl Biochem Biotechnol* 90:199–210. <https://doi.org/10.1385/ABAB:90:3:199>
60. Guez, J. S., Chenikher, S., Cassar, J. P., & Jacques, P. (2007). Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *Journal of biotechnology*, 131(1), 67-75.

61. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15–32. DOI 10.1007/s00253-002-0975-y.
62. Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., and Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *Int. J. Biol. Macromol.* 128, 254–267. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081.
63. Handeisman, J., Raffel, S., Mester, E. H. et Wunderlich, L. et Grau, C.R. (2009). Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied of Environment of Microbiology*. Vol-56 (7): 13-718Pp.
64. Helft G, Leger P. (2009). Que retenir de la littérature récente concernant les antithrombotiques
65. What's new on antithrombotics ? *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* ;58: 230–235.
66. Herrema H, Niess JH. (2020). Métabolites microbiens intestinaux dans le métabolisme humain et le diabète de type 2. *Diétéologie* ; 63 : 253–2547.
67. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley., & S.T. Williams. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. pp: 518-537. 9th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore.
68. Honma M, Tanaka K, Konno K, Tsuge K, Okuno T, Hashimoto M (2012). Résiliation de la confusion structurelle entre la plipastatine A1 et la fengycine IX. *Bioorg Med Chem* 20:3793–3798. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.040>.
69. Huang, X., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Zhao, H., Yang, S., (2007). Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(2), 454–461.
70. Huang, X., Gao, X., Zheng, L., Hao, G., (2009). Optimization of Sterilization of *Salmonella enteritidis* in Meat by Surfactin and Iturin Using a Response Surface Method. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 15, 61-67.
71. Ishigami Y, Osman M, Nakahara H, Sano Y, Ishiguro R, Matsumoto M (1995). Importance de la formation de feuilletés bêta pour la micellisation et l'adsorption en surface de la surfactine. *Colloïdes Surf B Biointerfaces* 4:341–348.

72. Islam, M. T., Rahman, M. M., Pandey, P., Jha, C. K., and Aeron, A. (2017). *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer International Publishing, New York, NY. 416 pages.
73. Isojai, S. C., Araújo, A. L., & Silva, A. (1982). Inverse characterization of vegetable fibre-reinforced composites exposed to environmental degradation. *Composite Structures*, 189, 529-544.
74. Ivanova, E.P., Nicolau, D.V., Yumoto, N., Taguchi, T., Okamoto, K., Tatsu Y., Yoshikawa, S., 1998. Impact of the conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marine bacteria. *Mar Biol*, 130, 545–551.
75. Jacques, P. (2011). Surfactins and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. G.Sobero'n_Chá'vez (ed.), *Biosurfactants, Microbiology Monographs* 20, DOI.10.1007/978-3-642-14490-5_3.
76. Janardhan A., Kumar A. P., Viswanath B., Saigopal D. V. R., Narasimha G. (2014). Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties. *Biotechnol. Res. Int.*
77. Joffin J. N. and Leyrol G. (2006). *Microbiologie technique*. Tomel. Dictionnaire des techniques 4^{ème} édition. Boreaux : CRDP d'aquitaine. ISBN., 363 :2-86617.
78. Jourdan E., Ongena M., Thonart P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes.
79. Kakinuma, A., Ouchida, A., Shima, T., Sugino, H., Isono, M., Tamura, G., & Arima, K. (1968). Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33(11), 1669-1671.
80. Karbalaeei-Heidari, H.R., Amoozegar, M.A., Ziaee A.A. (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Ind Microbiol Biotechnol* 36, 21-27.
81. Kim PI, Ryu J., Kim YH, Chi YT. (2010). Production de lipopeptides biosurfactants iturine A, fengycine et surfactine à partir de *Bacillus subtilis* CMB32 pour le contrôle de *Colletotrichum gloeosporides* . *J. Microbiol. Biotechnol.*; 20 :138–145.
82. Korenblum, E., Souza, D. B., Penna, M., & Seldin, L. (2012). Molecular analysis of the bacterial communities in crude oil samples from two Brazilian offshore petroleum platforms. *International journal of microbiology*.

83. Korish M. (2003). Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Thèse de doctorat d'état, university Mainz , Egypt ,131p.
84. Kosaric N., Vardar-Sukan F. (2005). "Biosurfactants Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics," in *Surfactant Science Series* Kosaric N, Vardar-Sukan F. (Boca Raton, FL: CRC Press), 389.
85. Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, et al.(2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* 2004;186:1084–96.
86. Kothari, V.V., Kothari, R.K., Kothari, C.R., Bhatt, V.D., Nathani, N.M., Koringa, P.G., Joshi, C.G. & Vyas, B.R.M., 2013. Genomic sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert area of Gujarat, India. *Genome A* 1: e00671-13 doi: 10.1128/genomeA.00671-13.
87. Kumar SN, Nambisan B, Mohandas C, et al.(2013). In vitro synergistic activity of diketopiperazines alone and in combination with amphotericin B or clotrimazole against *Candida albicans*. *Folia Microbiol* ;58:475–82.
88. Lacut K, Deluc A, Le Moigne E, Mottier D. (2008). Existe-t-il un lien entre la maladie artérielle athéromateuse et la maladie veineuse thromboembolique ;14(1) : 32-36.
89. Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B., & Leal Martins, M. L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus sp*: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2), 110-115.
90. Lateef, A., Adelere, I.A., et Gueguim-Kana, E.B., 2015. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia*, 70, 411-419. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0062>.
91. Lebovitz H.E. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metabol Clin North Am* ; 26: 539-551.

92. Lemaoui. A. (2011). Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigellasativa.L.* Algérienne. Magister en biochimie.Université Ferhat Abbas – Sétif. 1. 23. 24. 62.
93. Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z (2009) *Mikrobiologia techniczna* . PWN, wyd.1.
94. Lim JH., Park BK., Kim MS., Hwang MH., Rhee MH., Park SC., Yun H.(2005) The antithrombotic activity of surfactins. *J Veterinary Sci* ;6 : 353-5.
95. Li, M. (2018). Thérapie de remplacement enzymatique : une revue et son rôle dans le traitement des maladies de surcharge lysosomale Pédiatre Ann. , 47, p. e191 - e197.
96. Logan NA, De Vos P (2009) Bacille. Dans : *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. George M. Garrity (red.) et al. John Wiley & Sons, Inc. : 41.
97. Luo C, Liu X, Zhou H, Wang X, Chen Z (2015). Non-ribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *B. subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Appl Environ Microbiol* .81:422–431.
98. Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
99. Madigan M., Martinko J. (2007). *Biologie des microorganismes*, (11th edition) Pearson education. France.
100. Maier, R.M., 2003. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Adv Appl Microbiol*.52, 101–21.
101. Makkar, R.S, Cameotra, S.S, Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. 1: 5.
102. Maksimov IV., Khairullin RM. (2016).The role of *Bacillus bacterium* in formation of plant defense: Mechanism and reaction. *The Handbook of Microbial Bioresources*; Gupta, VK, Sharma, GD, Tuohy, MG, Gaur, R., Eds ; 56-80.
103. Manallah A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea L.* Mémoire de Magister. Option biochimie appliquée. Université Farhet Abbes-Sétif-Algérie. 1.15.20.29.30.77. 86 p.

104. Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., Ongena, M. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact.* 27:87-100.
105. Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Yamashita, A., Asada, Y. (2005). Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 12: 1-8.
106. Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical DiPhenylPicrylHydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology.* 26(2). 211 P.
107. Morrison DJ, Preston T. (2016). Formation d'acides gras à chaîne courte par le microbiote intestinal et leur impact sur le métabolisme humain. *Microbes intestinaux.* ; 7 : 189–200.
108. Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK & Sivachidambaram P. (2008). Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci* 94: 736–747.
109. Nath, A., Ghosh, S., Chowdhury, R. et Bhattacharjee, C. 2012. Can whey-based *Bacillus safensis* JUCHE 1 become a food supplement? Growth kinetics, probiotic activity, sensitivity to natural and synthetic antibiotics and synergy with prebiotics and natural antioxidants. ICRASE 2012, Hyderabad, Andhra Pradesh, India, 30-31 October 2012. DOI : 10.1128/genomeA.00642-14.
110. Ongena M & Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16:115–125.
111. Ouoba, L.I.I., Parkouda, C., Diawara, B., Scotti, C. and VARNram, A.H. 2008a. Identification of *Bacillus* spp from Bikalga, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization. *J Appl Microbiol*, 104, 122–131.
112. Ozyurek M ; Gungor N ; Baki S ; Guclu K ; Apak R. (2012). Development of Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols, *Analytical Chemistry.*
113. Palaniappan, k and Holley, RA. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol* 140: 164-168.
114. Panwar H, Calderwood D, Grant IR, Grover S, Green BD. (2014). *Les souches de Lactobacillus* isolées des matières fécales des nourrissons possèdent une puissante activité

- inhibitrice contre les alpha- et bêta-glucosidases intestinales suggérant un potentiel antidiabétique. *Eur J Nutr.* ; 53 :1465–74.
115. Parry, J. M., Turnbull, P. C. B. et Gibson, J. R., 1983. A Color atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Atlases, 19. London: Wolfe Medical Publications.
116. Patel, U. B., Taylor, F., Blomqvist, L., George, C., Evans, H., Tekkis, P., ... & Brown, G. (2011). Magnetic resonance imaging–detected tumor response for locally advanced rectal cancer predicts survival outcomes: MERCURY experience. *Journal of Clinical Oncology*, 29(28), 3753-3760.
117. Pathak, K. V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S. S., Balaram, P. (2012). Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *JASM*, 23, 1716-1728. doi:10.1007/s13361-012-0437-4.
118. Pathak, K. V., Keharia, H. (2014). Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 biotech.*, 4, 283-295. doi:10.1007/s13205-013-0151-3.
119. Perez-Garcia, A., Romero, D., et de Vicente, A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>.
120. Pirri G, Giuliani A, Nicoletto SF, Pizzuto L & Rinaldi AC. (2009). Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. *Cent Eur J Biol* 4: 258–273.
121. Prescott L. M. (2002). VIII Ecology and symbiosis. In *Microbiology*. Fifth edition. De Boeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, 1014.
122. Prescott., Harly and Kelin. (2010). *Microbiologie*, (2th edn) De Boeck-wesmael. Bruxelles.
123. Priest G. (1993). *Biotechnology, biological fundamentals volume 1*, second edition, 367-400.

124. Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>.
125. Rajan P. C., Priya A. M., Jayapradha D., & Devi, S. S. (2012). Isolation and characterization of marine actinomycetes from West Coast of India for its antioxidant activity and cytotoxicity. *Int J Pharma Bio Arch.* 3. 641.
126. Razafindralambo H, Popineau Y, Deleu M, Hbid C, Jacques P, Thonart P, Paquot M (1997). Propriétés tensioactives des mélanges surfactine/iturine A produits par *Bacillus subtilis*. *Langmuir* 13:6026–6031.
127. Razafindralambo H, Thonart P, Paquot M (2004). Tensions superficielles dynamiques et d'équilibre des solutions aqueuses de surfactine. *J Tensioactif Deterg* 7:41–46. <https://doi.org/10.1007/s11743-004-0286-x>.
128. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., et al. (2019). Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110.
129. Revel, T.D et Doghmi, K. (2004). Physiologie de l'hémostase. EMC-Dentisterie, 1: 71-81.
130. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice E. C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
131. Rinaudo M. Chitine et chitosane.(2006) : Propriétés et applications. *Progrès en science des polymères* ;31:603-632.
132. Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob Chemother* 57, 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl024>.
133. Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al(2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *Mol Plant.*
134. Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M. (2011). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.*, 12 (1), 141-172. doi:10.3390/ijms12010141.

135. Saffidine K. (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamuscaeruleus L.* et de *Plantago major L.* Mémoire de Doctorat. Option microbiologie. Université Ferhat Abbas-Sétif-Algérie. 92 p.
136. Sansinena E (2019) *Bacillus spp.* : En tant que bactérie favorisant la croissance des plantes. W: Singh H, Keswani C, Reddy M, Sansinena E, García-Estrada C *Métabolites secondaires des micro-organismes Rhizo favorisant la croissance des plantes* . Springer, Singapour.
137. Sathishkumar R., Ananthan G., Arun J. (2015). Production, purification et caractérisation de la protéase alcaline par *Bacillus subtilis* GA CAS8 associé aux ascidies à partir de déchets agricoles . *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4 , 214–220. 10.1016/j.bcab.2014.12.003.
138. Saxena AK, Kumar M, Chakdar H, et al. (2020) Espèces de *Bacillus* dans le sol en tant que ressource naturelle pour la santé et la nutrition des plantes. *J Appl Microbiol* 128 : 1583-1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506> doi : 10.1111/jam.14506.
139. Seldin, L., A. Soares Rosado, DW. da Cruz, A. Nobrega, JDE. van Elsas et M. Paiva (1998). Comparison of Paenibacillus azotofixans strains isolated from rhizoplane, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3860–3868
140. Ser H. L., Tan L. T. H., PalanisamyU. D., Abd Malek S. N., Yin W. F., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2016). *Streptomyces antioxidans* sp. nov. a novel mangrove soil actinobacterium with antioxidative and neuroprotective potentials. *Front. Microbiol.* 7. 899.
141. Seydlová G, Svobodová J (2008) Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine* 3: 123-133.
142. Shafi, J., Tian, H., and Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-14.
143. Shakerifard P, Gancel F, Jacques P, Faille C (2009). Effet de différents lipopeptides de *Bacillus subtilis* sur l'hydrophobicité de surface et l'adhésion des spores de *Bacillus cereus* 98/4 à l'acier inoxydable et au téflon. *Encrassement biologique* 25 : 533–541.
144. Shin S, Pyun MS. (2004). Anti-*Candida* effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytother Res* ;18:827–30.

145. Sieber, S. A., & Marahiel, M. A. (2003). Learning from Nature's Drug Factories: Nonribosomal Synthesis of Macrocyclic Peptides. *Journal of bacteriology*, 185(24), 7036-7043.
146. Siefert, J.L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L.K., Slepecky, R.A., Paul, J.H., Moore, E.R., Fox, G.E., and Jurtshuk, Jr.P. 2000. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Curr. Microbiol.* 41, 84-88.
147. Silva MCS., Polonio JC., Quecine MC., Almeida TT., Bogas AC., Pamphile JA., Azevedo JL. (2016). Endophytic cultivable bacterial community obtained from *the Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbial pathogenesis* ; 98, 16-22.
148. Singleton P, (2005). Bactériologie pour la médecine. La biologie et la Biotechnologie. Ed. Dunod. Paris. 541 p.
149. Slepecky, R.A., Hemphill, H.E., 2006. The Genus *Bacillus*—Nonmedical, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer US, New York, NY, pp. 530–562. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_16.
150. Slivinski, C. T., Mallmanna, E., de Araújo, J. M., Mitchella, D. A., Krieger, N., 2012. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, 47, 1848–1855. DOI : 10.1016/j.procbio.2012.06.014.
151. Smith NR, Clark FE (1973) Un regroupement proposé des bacilles mésophiles, aérobies et sporulés. *Soil Sci Soc Am Proc* 2 : 255.
152. Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 56, 845–57.
153. Théâtre, A., Hoste, A.C.R., Rigolet, A., Benneceur, I., Bechet, M., Ongena, M., Deleu, M., Jacques, P., n.d. *Bacillus sp.*: A Remarkable Source of Bioactive Lipopeptides, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–57. https://doi.org/10.1007/10_2021_182.

154. Thimon L, Peypoux F, Marget-Dana R, Michel G (1992). Propriétés tensioactives des lipopeptides antifongiques produits par *Bacillus subtilis*. *J Am Oil Chem Soc* 69: 92–93.
155. Tlili ML. (2015). Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de magister en biologie biochimie et analyse de bioproduits. Université KasdiMerbah – Ouargla. 27.82 p.
156. Torrès, O. (2017). *La santé du dirigeant: de la souffrance patronale à l'entrepreneuriat salutaire*. De Boeck Supérieur.
157. Tortora. G..J ; B.R. Funk ; C.L. Case. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Pp. 945.
158. Touré Y, Ongena M, Jacques P, et al.(2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol*;96:1151–60.
159. Trischman, J.A., Jensen, P.R., Fenical, W., (1994). Halobacillin: a cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. *Tetrahedron Lett* 35:5571–5574.
160. Vachher, M., Sen, A., Kapila, R., Nigam, A. (2021). Microbial therapeutic enzymes: A promising area of biopharmaceuticals. *Curr. Res. Biotechnol.* 3, 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.05.006>.
161. Vanittanakom N, Loeffler W (1986) Fengycine - un nouvel antibiotique lipopeptidique antifongique produit par *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiot (Tokyo)* XXXIX:888–901. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>.
162. Verma .V., Avasthi .M.S., Gupta .A.R., Singh .M. and Kushwaha .A. (2011). Amylase production & purification from bacteria isolated from a waste potato dumpsite in district Farrukhabad u.p state India. *European Journal of Experimental Biology*.1 (3):107-113.
163. Vogler, A.E., Siedlecki, A.C.(2009). Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*, 30: 1857-1869.

164. Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Li, Z., (2008). Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules* 42, 127-132.
165. Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Zhang, J., Li, P., (2009). Synthesized phosphorylated and aminated derives of fucoidan and their potential antioxydant activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules* 44, 170-174.
166. Wang P, Zhang C, Guo M, Guo S, Zhu Y, Zheng J, *et al.* (2014). Complete genome sequence of *Bacillusthuringiensis* YBT-1518, a typical strain with high toxicity to nematodes. *J Biotechnol.* 171:1–2.
167. Wang, W. et Sun, M. 2009. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16S rDNA sequences. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 505-521.
168. Whipps JM. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl_1) ; 487-511.
169. Wu, W. Q., Wang, Q., Fang, Y., Shao, Y., Tang, S., Deng, Y., ... & Huang, J. (2018). Molecular doping enabled scalable blading of efficient hole-transport-layer-free perovskite solar cells. *Nature communications*, 9(1), 1-8.
170. Yari, M., Ghoshoon, MB., Vakili, B., Ghasemi, Y. (2017). Enzymes thérapeutiques : applications et approches pour l'amélioration pharmacologique. *Courant. Pharm. Biotechnol.* 18 , p. 531 – 540.
171. Yin, E., Zhou, Z., Jiang, J., Chen, F., Liu, Y., & Hu, D. (2013). A novel hybrid BCI speller based on the incorporation of SSVEP into the P300 paradigm. *Journal of neural engineering*, 10(2), 026012.
172. Zengin G., Cengiz S., Abdurrahman A., Ramazan C., Olcay C. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53 :244–251.

173. Zeng Z, Luo J, Zuo F, Zhang Y, Ma H. (2016). Dépistage de nouvelles souches probiotiques potentielles de *Lactobacillus* basées sur une dipeptidyl peptidase IV élevée et un inhibiteur de l' α -glucosidase. *Aliments fonctionnels J*; 20 : 486–495.
174. Zhao, X., Kuipers, O.P., 2016. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics* 17, 882. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3224-y>.
175. Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M., Noskova, S., 2020. Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics* 9, 553. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553>.

Abstract

Bacillus genus bacteria are known for their ability to produce a wide variety of active biomolecules of therapeutic interest. In the present work, the crude extract (EB) as well as the fengycin extract (EF) of the two strains *Bacillus* sp T1 and T2 were tested for their anticoagulant effects ; antioxidant; antidiabetic and antimicrobial. The membership of these two strains in the genus *Bacillus* was indeed confirmed by all the microscopic observation tests of the vegetative cells and spores as well as the biochemical tests (API gallery). The T1 and T1 strains have shown their ability to produce the extracellular enzymes amylase, protease, and cellulase. The EBs of T1 and T2 showed weak antioxidant (ABTS trapping test) and anticoagulant effects in comparison to their EFs which showed a strong anticoagulant effect and even more important for the endogenous pathway which reaches TCK values of 53.6s and 73s for T1 and T2, respectively. The T1 and T2 EFs showed a hypoglycemic effect with α -amylase inhibition percentages of 1.78 and 2.76, respectively. The positive results of the antibacterial test appeared in the case of the extract (EFT1) against *coagulase negative Streptococcus*, *Klebsiella sp* and *Pseudomonas aeruginosa*, where the zones of inhibition reached 14, 15, and 23mm ; respectively, with different minimum inhibitory concentrations (MIC) for each bacterium. This extract had a synergistic effect ($FIC \leq 0.5$) with the two drugs (Gectapen and Amoxypen), against the three reference pathogenic bacteria. The bacterial strains (T1 and T2) were able to inhibit the test pathogenic fungi *Aspergillus sp*, *F.solani*, *F.culmorum*, *Alternariasp* in a variable way with a surface occupation varying between 6 to 20 mm in diameter.

Keywords : *Bacillus*, fengycin, biomolecules, of therapeutic interest, anticoagulant, antioxidant, antidiabetic, antimicrobial, enzyme, synergistic effect.

الملخص

تُعرف بكتيريا *Bacillus* genus بقدرتها على إنتاج مجموعة متنوعة من الجزيئات الحيوية النشطة ذات الأهمية العلاجية في العمل الحالي، تم اختبار المستخلص الخام (EB) وكذلك مستخلص الفينغيسين (EF) من السلالتين *Bacillus sp* T2 T1 لتأثيرهما المضاد للتخثر. مضادات الأكسدة. مضادات السكر ومضادات الميكروبات. تم بالفعل تأكيد عضوية هاتين السلالتين في جنس *Bacillus* من خلال جميع اختبارات الملاحظة المجهرية للخلايا والأبواغ النباتية وكذلك الاختبارات الكيميائية الحيوية (معروض API) أظهرت سلالات T1 و T2 قدرتها على إنتاج الإنزيمات خارج الخلية الأميليز والبروتياز والسليولاز. أظهرت EB-T1 و T2 تأثيرًا ضعيفًا لمضادات الأكسدة اختبار محاصرة (ABTS) وتأثيرًا مضادًا للتخثر مقارنةً بـ EF التي أظهرت تأثيرًا قويًا مضادًا للتخثر والأهم من ذلك بالنسبة للمسار الداخلي الذي يصل إلى قيم TCK من 53.6 ثانية و 73 ثانية لـ T1 و T2 على التوالي. أظهر كل من T1 و T2 تأثير خافض لسكر الدم بنسب تثبيط لـ α -amylase 1.78 و 2.76 على التوالي. ظهرت النتائج الإيجابية للاختبار المضاد للبكتيريا في حالة المستخلص (EFT1) ضد *Streptocoque coagulase* ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella sp* ، *negative* ، بتركيزات مثبتة دنيا مختلفة (MIC) لكل بكتيريا. كان لهذا المستخلص تأثير تآزري (FIC 0.5) مع العقارين Gectapen و Amoxyphen ، ضد البكتيريا المسببة للأمراض المرجعية الثلاثة. كانت السلالات البكتيرية T1 و T2 قادرة على تثبيط الاختبار الممرض للفطريات *Aspergillus sp* ، *F.solani* ، *F.culmorum* ، *Alternaria sp* بطريقة متغيرة مع مساحة سطح تتراوح بين 6 إلى 20 مم في القطر.

الكلمات الرئيسية: *Bacillus* ، fengycin ، الجزيئات الحيوية، ذات الفائدة العلاجية، مضادات التخثر، مضادات الأكسدة، مضاد لمرض السكر، مضاد للميكروبات، إنزيم، تأثير تآزري.

Annexe

Annexe 01 : Composition et préparation des milieux de culture et des solutions utilisés

Gélose nutritive (GN)

Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	5g
Extrait de levure	2g
Agar–agar	15g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C $7 \pm 0,2$.

La préparation du bouillon nutritif est la même, sauf qu'il n'ya pas l'ajout de l'agar.

Gélose Mueller-Hinton (MHA)

Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Extrait de viande	2g
Amidon de maïs	1,5g
Agar–agar	17g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C $7,3 \pm 0,2$

Milieu Luria-Bertani (LB)

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Glucose	1g
Agar	17g

Le pH est de 7. Autoclaver à 121°C pendant 15min

La préparation de LB liquide est la même, sauf qu'il n'ya pas l'ajout de l'agar.

Milieu CMC

CMC	10g
Nitrate de sodium (NaNO ₃)	1.2 g
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	3g
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	6g
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ .H ₂ O)	0.2g
Chlorure de calcium (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0.05g
Sulfate de manganèse (MnSO ₄ .7H ₂ O)	0.01g
Sulfate de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0.001g
Agar	15g

Le pH est de 7. Autoclaver à 121°C pendant 15min

Milieu caséinase (gélose au lait)

Peptone	5g
Extrait de levure	2.5g
Extrait de viande	1g
Lait	1000 ml
Agar	15g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7 ± 0,2

Milieu PDA (gélose Potato Dextrose Agar)

Pommes de terre (bouilli et filtrée)	300g
Eau du robinet	300 ml
Peptone	1g
Extrais de levure	2g
Glucose	20g
Agar–agar	20g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C 7 ± 0,2

Milieu Sabouraud dextrose agar

Peptone Mycologique	10g
Dextrose (glucose)	40g
Agar-agar	15g
Chloramphenicol	2.4g
Cycloheximide	0.05g
Eau distillée (qsp)	1000ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C $5,6 \pm 0,2$

Milieu optimal (opt)

Peptone	30g
Saccharose	20g
Extrait de levure	7g
KH ₂ PO ₄	1,9g
CuSO ₄	0,001mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,005mg
NaMoO ₄	0,004mg
KI	0,002mg
MnSO ₄ .H ₂ O	3,6mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,45g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,014mg
H ₃ BO ₃	0,01mg
Acide citrique	10mg

Le pH est de 7. Autoclaver à 121°C pendant 15min

Milieu de base additionné d'1% d'amidon soluble

Une gélose nutritive solide avec l'amidon comme seule source d'énergie (additionnée à raison de 1%) dans 1L de milieu de culture.

Annexe 02 : Réactif

Réactif utilisé pour l'activité anticoagulante

- Thromboplastine
- Céphaline kaolin
- Ca Cl₂

Réactif utilisé pour le test de DPPH radical libre

- Méthanol
- DPPH

Réactif utilisé pour le test de silvernanoparticle (SNP)

- Réactif SNP (Silver nitrate + Trisodium citrate)

Réactif utilisé pour le test d'ABTS

- ABTS

Réactif utilisé pour l'activité -amylase

- Solution IKI
- Tampon phosphate (PH 6)
- H Cl (1M)

Annexe 03 : Colorants

- Violet de gentiane
- Fuchsine
- Lugol
- Vert de malachit
- Rouge de congo

Annexe 04 : Tableaux de lecture APi20E

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- βD-galactopyranoside	β-galactosidase (OrthoNitroPhényl- βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L -arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /rouge
LDC	L -lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
ODC	L-ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
CIT	Trisodium citate	Utilisation du CITrate	Vert pale-jaune	Bleu-vert-bleu
H ₂ S	Sodium thioisulfate	Production d' H ₂ S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	Orange /rouge
TDA	L-tryptophane	TriptophaneDésAminase	Jaune	TDA immédiat Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'INDole	Incolore-vert pale –jaune	JAMES immédiat Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	Incolore – rose pale	VP1+VP2/10min Rose -rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
GLU	D-glucose	Fermentation -oxydation (GLUcose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation -oxydation (MANnitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
INO	Inositol	Fermentation -oxydation (INOsitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SOR	D-sorbitol	Fermentation -oxydation (SORbitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
RHA	L-rhamnose	Fermentation -oxydation (RHAmnose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SAC	D-saccharose	Fermentation -oxydation (SACcharose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MEL	D-melibiose	Fermentation -oxydation (MELibiose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
AMY	Amygdaline	Fermentation -oxydation (AMYgdaline)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
ARA	L-arabinose	Fermentation -oxydation (ARAbinose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
OX	Voir notice du test oxydase	Cytochrome oxydase	Voir notice du test oxydase	

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : MISSAOUI Oumaima
SELLAMI Yanis

Etude *in vitro* des effets thérapeutiques des extraits bruts et fengycines des deux souches de *Bacillus sp.* T1 et T2.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Biothérapie

Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour leur capacité à produire une grande diversité de biomolécules actives à intérêt thérapeutique. Dans le présent travail, l'extrait brut (EB) ainsi que l'extrait fengycines (EF) des deux souches *Bacillus sp.* T1 et T2 ont été testés pour leurs effets anticoagulant ; antioxydant ; antidiabétique et antimicrobien. L'appartenance de ces deux souches au genre *Bacillus* a bien été confirmée par l'ensemble des tests d'observation microscopique des cellules végétatives et des spores ainsi que les tests biochimiques (galerie API). Les souches T1 et T1 ont montré leur capacité à produire les enzymes extracellulaires amylase, protéase, et cellulase. Les EB de T1 et T2 ont montré des effets antioxydant (Test de piégeage de l'ABTS) faible et anticoagulant en comparaison à leurs EF qui ont manifesté un effet anticoagulant fort et encore plus important pour la voie endogène qui atteint des valeurs de TCK de 53.6s et 73s pour T1 et T2, respectivement. Les EF de T1 et T2 a montré un effet hypoglycémiant avec des pourcentages d'inhibition d'a-amylase de 1.78 et 2.76, respectivement. Les résultats positifs du test antibactérien ont apparu dans le cas de l'extrait (EFT1) contre *Streptocoque coagulase négative*, *Klebsiella sp* et *Pseudomonas aeruginosa*, où les zones d'inhibition ont atteint les 14, 15, et 23mm ; respectivement, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) différents pour chaque bactérie. Cet extrait avait un effet synergique ($FIC \leq 0,5$) avec les deux médicaments (Gectapen et Amoxypen), contre les trois bactéries pathogènes de référence. Les souches bactériennes (T1 et T2) ont pu inhiber les champignons pathogènes tests *Aspergillus sp*, *F.solani*, *F.culmorum*, *Alternariasp* d'une façon variable avec une occupation de surface variant entre 6 à 20 mm de diamètre.

Mots-clés : *Bacillus*, fengycines, biomolécules, intérêt thérapeutique, anticoagulant, antioxydant, antidiabétique, antimicrobien, enzyme, effet synergique.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de L'Activité Microbienne (LaMyBAM) (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Dr. KARA ALI Mounira. (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Dr. ADGROUD Moussa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Dr. KHELILI Kaouthar (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).