

Université de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de
la Vie

Département de Microbiologie
Appliquée et Sciences Alimentaires



M.MB.10/13

جامعة جيجل

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم
التغذية

Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Intitulé

$\frac{2}{2}$

*Les biomolécules produites par les bactéries
aquatiques: pré-identification et recherche des
activités antimicrobiennes.*

Membres du jury:

Présidente: M^{me} BOURZAMA G.

Examinatrice: Dr. OULED HADDAR H.

Encadreur: Dr. IDOUI T.

Réalisé par:

BEZZAG Afaf

KAABOUB Kawtar



Année universitaire: 2012-2013

Sommaire

Introduction	01
Partie I: Revue bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les bactéries marines	
I.1. Les écosystèmes aquatiques en tant qu'habitats microbiens.....	02
I.2. Distribution des bactéries marines	02
I.2.1. Distribution Selon la Profondeur	02
I.2.2. Distribution régionale	02
I.2.3. Distribution Saisonnière	02
I.3. L'adaptation microbienne aux milieux marins.....	03
I.3.1. Conditions nécessitant une adaptation microbienne.....	03
I.3.1.1. Adaptation à la température et la pression	03
I.3.1.2. Adaptation a la concentration saline	03
I.3.2. Mécanismes adaptatifs.....	03
I.3.2.1. Adaptation de la membrane cellulaire	03
I.3.2.2. Production d'exopolymères et biotensioactifs	04
I.3.2.3. La formation du biofilm	04
I.4. Les associations symbiotiques bactéries marines – eucaryotes marins	04
I.4.1. Les bactéries associées aux algues	05
I.4.2. Les bactéries associées aux éponges	05
I.4.3. Les bactéries associées aux coraux	05
I.4.4. Les bactéries associées aux Mollusques	06
I.4.5. Les bactéries associées aux Crustacés	06
I.5. Les principales familles des bactéries marines	06
I.5.1. La famille des <i>Vibrionaceae</i>	06
I.5.2. La famille des <i>Pseudoalteromonadaceae</i>	06
I.5.3. La famille des <i>Alteromonadaceae</i>	07

I.5.4. La famille des <i>Shewanellaceae</i>	07
I.5.5. Le genre des <i>Marinomonas</i>	07
I.5.6. La famille des <i>Bacillaceae</i>	07

Chapitre II : Les produits des bactéries marines et leurs applications

II.1. Les produits naturels extraits à partir des bactéries marines.....	08
II.2. Production des métabolites secondaires à partir des bactéries marines.....	08
II.2.1. Métabolites secondaires antimicrobiens et cytotoxiques et leurs applications.....	08
II.2.1.1. Métabolites secondaires des bactéries marines gram négatives	08
II.2.1.1.1. Métabolites secondaires des <i>Pseudomonadaceae</i>	08
II.2.1.1.2. Métabolites secondaires des <i>Vibrionaceae</i>	09
II.2.1.1.3. Métabolites secondaires d' <i>Alteromonadaceae</i>	10
II.2.1.1.4. Métabolites secondaires des <i>Pseudoalteromonadaceae</i>	10
II.2.1.2. Métabolites secondaires des bactéries marines gram négatives	11
II.2.1.2.1 Métabolites des <i>Bacillaceae</i>	11

Partie II : Etude expérimentale

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel.....	12
II.1.1. Echantillons et prélèvements.....	12
II.1.2. Les souches indicatrices.....	13
II.1.3. Milieux de cultures, enzymes et réactifs.....	13
II.1.4. Appareillage	14
II.2. Méthodes	
II.2.1. Isolement et purification des souches bactériennes marines.....	14
II.2.2. Identification des souches bactériennes marines purifiées.....	15
II.2.2.1. Examen macroscopique	15
II.2.2.2. Coloration de Gram	15
II.2.2.3. Test de la catalase	15
II.2.2.4. Galerie API 20	15

Liste des tableaux

Tableau 01 : Algues marines prélevées pour l'isolement des bactéries marines associées à leurs surfaces	12
Tableau 02 : Souches indicatrices utilisées pour les tests de l'activité antimicrobienne.....	13
Tableau 03 : Tableau récapitulatif des profils biochimiques des différentes souches bactériennes isolées d'eau de mer et d'algues marines.....	22
Tableaux 04 : Résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants des cultures bactériennes.....	24
Tableau 05 : Résultats de l'activité antimicrobienne après traitement thermique et protéolytique.....	26
Tableau 06 : Composés révélés lors de l'analyse par GC-MS de l'extrait d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	27
Tableau 07 : Composés révélés lors de l'analyse par GC-MS de l'extrait de <i>Aeromonas hydrophila</i>	28

Liste des figures

- Figure 01** : Structures chimiques de certains métabolites secondaires des *Pseudomonaceae* ;
(01) : *Pentabromopseudiline*, (02) : *Pyrrrolnitrine*9
- Figure 02**: Structures chimiques de certains métabolites secondaires des *Vibrionaceae* ;
(01) : *Trisindoline*, (02) : *Unnarmicine*, (03) : *Magnesidine A*.....9
- Figure 03** : Structures chimiques de certains métabolites secondaires des *Alteromonadaceae* ;
(01) : *Thiomarinol B*, (02) : *Alteramide A*.....10
- Figure 04** : Structures chimiques de certains métabolites de *Pseudoalteromonadaceae* ;
(01) : *Korormicine*, (02) : *A. MC21-A*.....11
- Figure 05** : Structure chimique du métabolite de *B. amyloliquefaciens* (*Macrolactine A*.....11
- Figure 06** : Carte illustrant le site de prélèvement des échantillons.....12
- Figure 07**: Croissance des bactéries marines sur milieu marine- agar autour des fragments d'algues marines.....19
- Figure 08** : Croissance des bactéries marines isolées sur milieu Marine Agar.....19
- Figure 09** : Colonies de *V. alginoliticus* et *V. parahaemolyticus* isolées et purifiées sur marine agar.....20
- Figure 10** : Creux résultants de l'hydrolyse du milieu de culture Marin- Agar par l'agarase produite par *Vibrio parahaemolyticus*.....20
- Figure 11** : Résultats des tests de l'activité antimicrobienne ; (a) : *Bacillus subtilis*, (b) : *Staphylococcus aureus* (v), (c) : *E. coli*, (d) et (f): *Candida albicans*, (e): *Salmonella sp*,.....24

Liste des abréviations:

ADH : Arginine-Dihydrolase
AMY : Amylase
ARA : Arabinose
CIT : Citrate
GEL : Gelatinase
GLU : Glucose
H₂S : Sulfure d'hydrogène
IND : Indole
INO : Inositol
LDC : Lysine-Décarboxylase
MAN : Mannose
MEL : Maltose
MEVAG : Milieu pour L'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides
ODC : Ornithine-Décarboxylase
RHA : Rhamnose
SAC : Saccharose
SOR : Sorbitole
TDA : Tryptophane Désaminase
URE : Urease
VP : Vogue-Proskauer
V : Vaginale

Introduction

L'écosystème marin est une source de produits naturels de structures uniques qui possèdent des activités pharmacologiques. Ces produits bioactifs sont souvent retrouvés en abondance chez les microorganismes, les algues et chez les invertébrés marins. Les technologies modernes ont ouvert un vaste champ de recherche pour l'extraction de ces composés à partir des sources marines pour le traitement des maladies souvent mortelles. Le nombre de produits naturels isolés des organismes marins augmente sans cesse et dépasse aujourd'hui 18000 composés (Mahalakshmi et al., 2013).

Les bactéries associées aux surfaces des algues et autres organismes marins vivent dans un environnement de haute compétition où l'espace et l'accès aux nutriments sont limités. Dans cet environnement extrême, les bactéries marines produisent des biomolécules dont la structure et la composition particulières leur confèrent des propriétés pour s'adapter aux particularités de ce milieu naturel. Plusieurs de ces composés montrent des activités pharmacologiques et des applications potentielles dans différents secteurs de la santé. Ainsi, le criblage des bactéries marines isolées à partir de la surface des algues et d'invertébrés marins a montré qu'un grand nombre de ces bactéries produit des métabolites antimicrobiens (Boyd et al., 1999). Le premier antibiotique de bactérie marine a été identifié et caractérisé en 1966 (Burkholder et al., 1966).

Les souches bactériennes bioactives appartiennent majoritairement à la famille de *Pseudoalteromonadaceae*, la famille *Actinobacteriaceae* ainsi qu'à la famille des *Vibrionaceae*. Un certain nombre de composés antimicrobiens d'origine marine ont été caractérisés plus en détail, y compris des depsipeptides, des lipopeptides et des glycolipides (Wietz et al., 2011).

Cette étude se place dans un axe de recherche visant à rechercher de nouvelles molécules possédant une éventuelle activité antimicrobienne pour subvenir au besoin pour de nouveaux antibiotiques afin de lutter contre l'augmentation de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. Ce présent travail de recherche va porter sur :

- ✓ L'isolement, la purification et l'identification des bactéries marines à partir d'algues marines et d'eau de mer collectées dans la cote de la commune d'El Aouana (Sud-Ouest de la Wilaya de Jijel).
- ✓ L'évaluation de l'activité antimicrobienne des souches marines isolées contre plusieurs souches potentiellement pathogènes.
- ✓ Et enfin l'extraction, la caractérisation physicochimique et l'analyse qualitative par GC-MS des molécules antimicrobiennes produites par ces bactéries marines.

I.1. Les écosystèmes marins en tant qu'habitats microbiens

Les écosystèmes marins ont donné naissance à la Vie il y a près de 4 milliards d'années. Cet environnement marin est extrêmement complexe et comprend une énorme diversité de formes de vie. Parmi ces formes de vie, les bactéries ont été et sont toujours les formes dominantes (plus de 90% des surfaces biologiques de la mer des Sargasses seraient habitées par des bactéries ; **Fuhrman et al., 1992**). Ces bactéries influencent profondément les grands cycles biogéochimiques du carbone, du soufre et notamment celui de l'azote (**Kettle et Andreae, 2000 ; Kuypers et al., 2003 ; Wingenter et al., 2004 ; Wagner et Biebl, 2006**). Malgré l'omniprésence et le rôle de ces bactéries, elles n'ont été documentées que depuis une trentaine d'années (**Gold, 1996**).

Un exemple frappant du rôle prépondérant de cette « biosphère cachée » (**Kerr, 1997**) reste la découverte, à la fin des années 1970, à plusieurs milliers de mètres sous les océans dans l'obscurité, la plus totale et sans aucun apport de matière organique, de communautés animales d'une incroyable densité associées aux sources hydrothermales (**Lonsdale, 1977**). En effet, ces écosystèmes sont basés sur une production primaire assurée par des bactéries chimiosynthétiques qui vivent libres ou en symbiose avec les organismes et qui sont capables d'exploiter l'énergie chimique contenue dans des composés réduits des fluides hydrothermaux pour assurer la fixation du carbone (**Felbeck et al., 1981**).

Les sites hydrothermaux forment ainsi un exemple spectaculaire de l'importance que peuvent avoir les bactéries, et leurs associations avec les organismes supérieurs, dans les écosystèmes océaniques. Toutefois, on sait aujourd'hui que de telles associations symbiotiques sont en fait très répandues dans le milieu naturel.

I.2. Distribution des bactéries marines

I.2.1. Distribution Selon la Profondeur : Habituellement, les bactéries sont les plus abondantes dans la couche supérieure éclairée, et leur nombre décroît avec la profondeur. La croissance bactérienne dépend du flux de matière organique dissoute provenant du phytoplancton et du zooplancton. Le fait que la production primaire soit limitée à la couche éclairée détermine donc de façon évidente la distribution verticale des bactéries (**Taguchi et platt, 1978**)

I.2.2. Distribution régionale : En général, la distribution des bactéries à l'échelle régionale a été peu étudiée. En gros, l'abondance des bactéries (en cellules par millilitre) dans les lagunes et les estuaires eutrophes (10^7), les zones côtières (10^6) et en haute mer (10^5) sont fonction de l'importance du flux de matière organique dissoute (**Ducklow, 1992**).

I.2.3. Distribution Saisonnière : Dans les eaux tempérées, le cycle annuel de l'abondance des bactéries peut être assez régulier. Généralement, les bactéries sont plus abondantes en Été et moins abondantes en Hiver. La surveillance à long terme du plancton à des stations fixes permet de détecter les variabilités annuelle et décennale (**Li et al., 1995**)

I.3. L'adaptation microbienne aux milieux marins

Les bactéries marines doivent s'adapter aux conditions physiques, chimiques et biologiques présents dans l'environnement océanique, qui se reflète dans leur physiologie et les propriétés

biochimiques. La présence d'une concentration relativement élevée d'ions Na^+ dans l'eau de mer a influencé l'exigence de ces ions par la plupart des bactéries marines (Macleod, 1965). Les Halophiles extrêmes peuvent même avoir des conditions optimales de croissance jusqu'à 10% (p/v) de NaCl (Bowers et al., 2009). Les bactéries marines sont également capables de vivre dans des conditions nutritionnelles relativement faibles et à survivre à de longues périodes de famine (Wai et al., 1999). La diversité des milieux marins a exercé une force motrice sur la sélection de bactéries menant à de nouvelles stratégies d'adaptation et à la synthèse de nouveaux métabolites (Carvalho et Fernandes, 2010).

I.3.1. Conditions nécessitant une adaptation microbienne

I.3.1.1. Adaptation à la température et la pression : L'adaptation à la température, la pression et au pH est un des moyens utilisés par la bactérie pour affronter le milieu environnant. Ainsi, nous constatons l'existence de bactéries thermophiles (*Thermus aquaticus*) pouvant résister à des températures de plus de 100°C ou de bactéries psychrophiles (*Vibrio marinus*) résistant à des températures en dessous de 0 °C (Hamadouche, 2003). L'adaptation de ces bactéries implique de nombreuses modifications de leurs composants qui doivent résister et fonctionner à ces températures (Zoran-Minic, 2006). Par ailleurs, certaines bactéries vivant au fond des océans dites barophiles sont capables de résister à des pressions de plus de 300 bars (Neidhardt et al., 1990). La température est l'un des paramètres les plus importants de cette adaptation, qui détermine ainsi dans quelles conditions une souche bactérienne peut être cultivée au laboratoire (Hamadouche, 2003).

I.3.1.2. Adaptation a la concentration saline : Les espèces marines sont adaptées à la haute salinité des océans, mais on constate que ces germes ne supportent pas de variations trop importantes du taux de chlorure de sodium auquel elles sont accoutumées. Les bactéries marines sont donc halophiles, mais non halorésistantes (Hamadouche, 2003).

I.3.2. Mécanismes adaptatifs

I.3.2.1. Adaptation de la membrane cellulaire : Production de lipides spécialisés : Le maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire est indispensable pour les cellules bactériennes, car elle agit comme une barrière de perméabilité aux solutés, est responsable de l'entretien de l'état énergétique des cellules, pour la transduction de signal et d'autres processus de transduction d'énergie et la régulation de la pression (Sikkema et al., 1995).

La capacité des bactéries à maintenir les fonctions biologiques dans des conditions de stress résulte des changements dans les protéines, stérols, hopanoïdes et la teneur en caroténoïdes, mais principalement de changements dans la composition lipidique de la membrane. En général, les concentrations de salinité plus élevés entraînent une augmentation de la teneur en phospholipides chargés négativement, au détriment de phospholipides neutres (Carvalho et Fernande, 2010).

Les changements dans la membrane cellulaire qui confèrent un avantage en vertu d'un certain stress peuvent également aider davantage les cellules. Par exemple, les souches qui ont des membranes avec un haut degré de saturation, car elles ont été cultivés dans des conditions de

haute pression seront mieux adaptés à la concurrence pour les éléments nutritifs disponibles sous des conditions de forte salinité.

La couche externe de bactéries gram-négatives est constituée principalement de lipopolysaccharides (LPS), qui sont généralement organisées en trois sous-domaines: une région glycolipide (lipide A), l'oligosaccharide de la matrice, et un polysaccharide appelé polysaccharide O-spécifique (OPS). Les OPS des bactéries marines sont souvent anioniques. Dans ce cas, cela pourrait être vu comme une adaptation à l'environnement marin: les sites négatifs sur le polysaccharide permettent la formation d'interactions ioniques induites par des cations bivalents (Leone et al., 2007).

Chez les psychrophiles, les conditions de froids sont surmontées par incorporation d'acides gras spécifiques pour maintenir la fluidité de la membrane et le transport des substrats et des nutriments à travers la membrane (Carvalho et Fernande, 2010). La réponse d'une souche facultativement barophile à une augmentation de la pression et aussi à basse température comprend une diminution de la quantité d'acides gras saturés et une augmentation des acides gras polyinsaturés (Yano et al, 1997).

Les cellules bactériennes sont également capables de produire des acides gras en tant que composés de défense. Par exemple, *Pseudoalteromonas haloplanktis* produit de l'acide isovalérique (acide 3-méthylbutanoïc) et l'acide 2-méthylbutyrique (2-méthylbutanoïque), qui ont des activités antibactériennes (Hayashida-Soiza et al., 2008).

I.3.2.2. Production d'exopolymères et biotensioactifs : Les exopolysaccharides bactériens, ou plus généralement des substances exopolymériques (EPS), ont plusieurs fonctions, y compris la protection contre la dessiccation, cryoprotection, la stabilisation des enzymes par le pH tampon et les fluctuations de la salinité, de la surface adhérente, stockage d'éléments nutritifs et la séquestration des composés toxiques. Les Polysaccharides représentent en général 40-95% des EPS (Flemming et al., 2001). La majorité des bactéries marines étudiées produisent des hétéropolysaccharides de trois ou quatre monosaccharides différents (par exemple, des pentoses, des hexoses, des sucres aminés ou d'acides uroniques) agencés en groupes de dix ou moins d'unités répétitives (Van der Merwe et al., 2009).

I.3.2.3. La formation du biofilm : Tel que mentionné dans la section précédente, les polymères extracellulaires améliorent l'adaptation et le taux de survie des bactéries dans les milieux marins, en particulier dans des conditions extrêmes. L'EPS modifie le microenvironnement physique et biogéochimique autour de la cellule. La matrice d'un biofilm peut également se lier et de concentrer les ions métalliques, métalloïdes et des molécules, avec la fixation et la libération d'ions métalliques (par exemple, Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+}) en fonction de la composition en EPS, du pH et de la salinité (Carvalho et Fernande, 2010).

I.4. Les associations symbiotiques bactéries marines – eucaryotes marins

Les surfaces de nombreux eucaryotes marins sont couvertes par des micro-organismes qui jouent un rôle important dans la vie de l'organisme hôte. Plusieurs études ont montré que les communautés bactériennes associées aux surfaces peuvent même déterminer le

développement normal et la morphologie de l'hôte (Provasoli et Pintner, 1977 ; Nakanishi et al., 1996 ; Nakanishi et al., 1999 ; Matsuo et al., 2003).

Les surfaces des eucaryotes marins fournissent un habitat unique pour la colonisation des micro-organismes où la concurrence entre les membres de ces communautés et les interactions par voie chimique avec leur hôte sont censées influencer à la fois la diversité et la fonction microbienne. Par exemple, il est estimé que les eucaryotes marins peuvent utiliser leurs bactéries associées à leurs surfaces pour produire des composés bioactifs comme un système de défense contre la concurrence et de protéger l'hôte contre la poursuite de la colonisation (Davies, 1996 ; Gold et Moellering, 1996).

Les études phylogénétiques des bactéries épiphytiques fournissent une perspicacité fascinante dans les communautés bactériennes. Souvent la composition de la communauté des micro-organismes attachés aux surfaces diffère de manière significative de la population bactérienne de l'eau de mer environnante (Enticknap et al., 2006). Pendant leur vie, les eucaryotes marins produisent les divers métabolites, qui fournissent les conditions uniques qui peuvent choisir les meilleurs micro-organismes adaptés (Longford et al., 2007 ; Webster et Bourne, 2007).

I.4.1. Les bactéries associées aux algues : Les études des communautés microbiennes associées aux algues marines ont fourni des connaissances considérables sur les interactions chimiques avec leur hôte et entre les membres de la communauté microbienne.

L'algue rouge *Delisea pulchra* est connue pour son habileté pour se défendre contre la colonisation de sa surface via la production de molécules inhibitrices du quorum sensing ce qui peut influencer sa population bactérienne épiphytique (Maximilien et al., 1998 ; Manefield et al., 1999). Les phylums bactériens les plus connus chez cette algue sont : Proteobactéria suivie de Bactéroïdètes (Egan et al., 2000 ; Holmstrom et al., 2002).

I.4.2. Les bactéries associées aux éponges : Les éponges sont les plus anciens invertébrés multicellulaires, les éponges ont été classés en deux groupes en fonction des niveaux de bactéries qu'elles contiennent: «éponges à grande abondance microbienne" (également appelé « bacteriosponges») et «éponges à faible abondance microbienne». Dans certains cas, les éponges peuvent abriter de grandes quantités de bactéries dans leurs tissus qui peuvent représenter jusqu'à 40% de leur biomasse. Depuis les années 1970, l'association des éponges et des bactéries a été systématiquement étudiée par des méthodes microscopiques et des cultures bactériennes (Chang-Qing Li et al., 2011).

I.4.3. Les bactéries associées aux coraux : Les communautés bactériennes associées au corail sont connues pour être diversifiée et très abondante. Ces communautés dynamiques exploitent un certain nombre d'habitats associés aux coraux, y compris le mucus sur les surfaces des coraux, les niches intracellulaires dans les tissus coralliens les espaces au sein du squelette corallien et l'eau de mer environnante du corail. Chacun de ces habitats sont soupçonnés d'abriter des différentes populations bactériennes. En dépit de la diversité bactérienne élevée, les coraux ont été signalés aux communautés microbiennes spécifiques à l'espèce qui portent des effets bénéfiques, mais leur rôle sur la santé du corail est mal compris. Dans les environnements des

récif coralliens, les bactéries dépendent de composés organiques produits par des organismes autotrophes (Raina et al., 2009).

I.4.4. Les bactéries associées aux Mollusques : Le genre *Vibrio fischeri* phylum γ -Protéobactérie forme une association unique avec le calamar, *Scolopes euprymna*. La bactérie se produit librement dans l'eau de mer et est capable de coloniser l'organe lumière du calmar mineur. En arrivant à haute densité cellulaire, le symbiote émet de la lumière générée par la luciférine / chimiluminescence l'intermédiaire de la luciférase. La lumière émise est utilisée par le calmar comme un camouflage pendant la chasse au clair de lune (Piel, 2008).

I.4.5. Les bactéries associées aux Crustacés : Lindquist et ses collègues (2007) ont signalé une symbiose intéressante entre isopodes *Santia spp* et des bactéries. Les isopodes portent des populations microbiennes episybiotiques dominées par cyanobactéries photosynthétiques préférentiellement exposées aux habitats ensoleillés. La prédation par les poissons est évitée par la production microbienne de leurre avec des structures non encore connues, les isopodes profitent apparemment de deux façons, nutritionnellement et chimiquement, à partir de ces bactéries (Piel, 2008).

I.5. Les principales familles des bactéries marines

I.5.1. La famille des Vibrionaceae : La famille des Vibrionaceae appartient au phylum des γ -Protéobactéries qui comprend six genres: *Vibrio*, *Photobactérie*, *Salinivibrio*, *Grimontia*, *Enterovibrio* et *Aliivibrio*. La famille comprend plus de 115 espèces décrites formellement. Les Vibrios sont des habitants communs des milieux aquatiques, en particulier les océans, et ils sont connus pour vivre librement ou associés comme symbiotes avec des animaux aquatiques, des eaux marines ou estuariennes ou comme des parasites des poissons, crustacés et mollusques. Les Vibrios semblent avoir un rôle clé dans la santé des coraux. Ils peuvent offrir une protection contre les agents pathogènes ou de contribuer à la fixation de l'azote. *Vibrio harveyi*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens* et *V. mytili* sont membres du groupe *Vibrio* (Chimetto et al., 2011). Plusieurs espèces de *Vibrio* affichent un taux de croissance extrêmement élevé, ce qui les rend dominantes, en particulier dans les milieux eutrophiques (Thompson et al., 2003).

I.5.2. La famille des Pseudoalteromonadaceae : Le genre *Pseudoalteromonas*, tel qu'il est actuellement défini, comprend des bactéries hétérotrophes, Gram négatif, aérobie, catalase et oxydase positive, chimiohétérotrophe en forme de bâtonnet, avec des flagelles polaires et sont des habitants communs des milieux marins (eau de mer, algues, invertébrés marins). Malgré les difficultés concernant l'identification des isolats environnementaux, la liste des espèces du genre *Pseudoalteromonas* ne cesse de croître (Ivanova et al., 2002). Tous les membres de ce genre nécessitent des ions Na^+ . Une caractéristique intéressante de *Pseudoalteromonas* est que le genre peut être divisé en deux, espèces pigmentées et non pigmentées.

L'analyse de quelques isolats pigmentés conduit à une conclusion générale est que les espèces de *Pseudoalteromonas* pigmentée possèdent un large éventail de composés extracellulaires bioactifs associés à la sécrétion. Les espèces non pigmentées de *Pseudoalteromonas* ne semblent pas partager la même ampleur de synthèse d'un composé bioactif (Stelzer et al., 2006).

I.5.3. La famille des Alteromonadaceae : A l'origine, le genre *Alteromonas* se composait de quatre espèces de bactéries marines aérobies, Gram négatif non pigmentée avec des flagelles polaires, *Alteromonas macleodii* (l'espèce type du genre), *Alteromonas vaga*, *Alteromonas communis*, et *Alteromonas marinopraesens*. Le nom de la dernière espèce a été changé par *Alteromonas haloplanktis* (Gauthier et al., 1995). Un bon nombre de ces espèces, cependant, ont été progressivement reclassés dans d'autres genres comme *Marinomonas*, *Pseudoalteromonas* et *Shewanella*. Les membres de la famille d'Alteromonadaceae ont une forme de bâtonnet, bactéries mobiles qui ne forment pas d'endospores ou microkystes. Elles sont chimio-organotrophes, ont un métabolisme respiratoire et utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons. Toutes les espèces ont besoin de Na^+ pour la croissance. Toutes les espèces ont été isolées à partir des habitats marins (eaux marines côtières et invertébrés marins) (Martinez-Checa et al., 2005).

I.5.4. La famille des Shewanellaceae : Actuellement, le genre *Shewanella* comprend plus de 20 espèces (*Shewanella algae*, *S. amazonensis*, *S. baltica*, *S. benthica*, *S. colwelliana*, *S. denitrificans*, *S. fidelis*, *S. frigidimarina*, *S. gelidimarina*, *S. hanedai*, *S. japonica*, *S. livingstonensis*, *S. marinintestina*, *S. Massilia*, *S. olleyana*, *S. oneidensis*, *S. pealeana*, *S. putrefaciens*, *S. sairae*, *S. schlegeliana*, *S. violacea*, *S. waksmanii* et *S. woodyi*). Ces espèces sont Gram-négatif, aérobie anaérobie facultatives et, facilement cultivables, principalement associées à des habitats aquatiques. Au cours de la dernière décennie, les bactéries de ce genre ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur rôle important dans la bioremédiation cométabolique des polluants organiques halogènes, l'acidification destructrice du pétrole brut et la réduction d'oxydes de magnésium et de fer et leur capacité à produire de fortes proportions d'acides gras polyinsaturés (AGPI) (Ivanova, 2004).

I.5.5. Le genre des Marinomonas : Le genre *Marinomonas* a été créé par Van Landschoot et De Ley (1983) à la suite du reclassement de deux espèces, *Alteromonas communis* et *Alteromonas vaga*, comme *Marinomonas communis* et *Marinomonas vaga*. Par la suite, le genre a été élargi avec l'ajout de *Marinomonas mediterranea*, *M. primoryensis*, *M. aquimarina*, *M. pontica*, *M. ushuaiensis*, *M. dokdonensis*, *M. polaris*, *M. ostreistagni* et *M. Arctica*. *Lyudmila* (Romanenko et al., 2009).

Le genre *Marinomonas* comprend des souches bactériennes Gram-négatif distribués dans différents milieux marins. La plupart des espèces reconnues du genre ont été isolées à partir d'échantillons d'eau de mer prélevés en différents lieux géographiques (océan pacifique, mer méditerranée, mer noire...). Certaines ont été isolées à partir des environnements froids, comme les régions subantarctiques (*Marinomonas polaris*). La seule espèce décrite comme étant associée à des organismes supérieurs est *Marinomonas ostreistagni* (Espinosa et al., 2010).

I.5.6. La famille des Bacillaceae : Le genre *Bacillus* est une grande et diverse collection de bactéries aérobie et anaérobie facultatif, en forme de bâtonnet, Gram-positif, formant des endospores. Le genre comprend des bactéries thermophiles et psychrophiles, acidophiles et alcalophiles, d'eau douce et des halophiles qui utilisent un large éventail de sources de carbone pour la croissance hétérotrophe ou autotrophe (Zoe et al., 2009).

I.5.3. La famille des Alteromonadaceae : A l'origine, le genre *Alteromonas* se composait de quatre espèces de bactéries marines aérobies, Gram négatif non pigmentée avec des flagelles polaires, *Alteromonas macleodii* (l'espèce type du genre), *Alteromonas vaga*, *Alteromonas communis*, et *Alteromonas marinopraesens*. Le nom de la dernière espèce a été changé par *Alteromonas haloplanktis* (Gauthier et al., 1995). Un bon nombre de ces espèces, cependant, ont été progressivement reclassés dans d'autres genres comme *Marinomonas*, *Pseudoalteromonas* et *Shewanella*. Les membres de la famille d'Alteromonadaceae ont une forme de bâtonnet, bactéries mobiles qui ne forment pas d'endospores ou microkystes. Elles sont chimio-organotrophes, ont un métabolisme respiratoire et utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons. Toutes les espèces ont besoin de Na⁺ pour la croissance. Toutes les espèces ont été isolées à partir des habitats marins (eaux marines côtières et invertébrés marins) (Martinez-Checa et al., 2005).

I.5.4. La famille des Shewanellaceae : Actuellement, le genre *Shewanella* comprend plus de 20 espèces (*Shewanella algae*, *S. amazonensis*, *S. baltica*, *S. benthica*, *S. colwelliana*, *S. denitrificans*, *S. fidelis*, *S. frigidimarina*, *S. gelidimarina*, *S. hanedai*, *S. japonica*, *S. livingstonensis*, *S. marinintestina*, *S. Massilia*, *S. olleyana*, *S. oneidensis*, *S. pealeana*, *S. putrefaciens*, *S. sairae*, *S. schlegeliana*, *S. violacea*, *S. waksmanii* et *S. woodyi*). Ces espèces sont Gram-négatif, aérobie anaérobie facultatives et, facilement cultivables, principalement associées à des habitats aquatiques. Au cours de la dernière décennie, les bactéries de ce genre ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur rôle important dans la bioremédiation cométabolique des polluants organiques halogènes, l'acidification destructrice du pétrole brut et la réduction d'oxydes de magnésium et de fer et leur capacité à produire de fortes proportions d'acides gras polyinsaturés (AGPI) (Ivanova, 2004).

I.5.5. Le genre des Marinomonas : Le genre *Marinomonas* a été créé par Van Landschoot et De Ley (1983) à la suite du reclassement de deux espèces, *Alteromonas communis* et *Alteromonas vaga*, comme *Marinomonas communis* et *Marinomonas vaga*. Par la suite, le genre a été élargi avec l'ajout de *Marinomonas mediterranea*, *M. primoryensis*, *M. aquimarina*, *M. pontica*, *M. ushuaiensis*, *M. dokdonensis*, *M. polaris*, *M. ostreistagni* et *M. Arctica*. *Lyudmila* (Romanenko et al., 2009).

Le genre *Marinomonas* comprend des souches bactériennes Gram-négatif distribués dans différents milieux marins. La plupart des espèces reconnues du genre ont été isolées à partir d'échantillons d'eau de mer prélevés en différents lieux géographiques (océan pacifique, mer méditerranée, mer noire...). Certaines ont été isolées à partir des environnements froids, comme les régions subantarctiques (*Marinomonas polaris*). La seule espèce décrite comme étant associée à des organismes supérieurs est *Marinomonas ostreistagni* (Espinosa et al., 2010).

I.5.6. La famille des Bacillaceae : Le genre *Bacillus* est une grande et diverse collection de bactéries aérobie et anaérobie facultatif, en forme de bâtonnet, Gram-positif, formant des endospores. Le genre comprend des bactéries thermophiles et psychrophiles, acidophiles et alcalophiles, d'eau douce et des halophiles qui utilisent un large éventail de sources de carbone pour la croissance hétérotrophe ou autotrophe (Zoe et al., 2009).

II.1. Les produits naturels extraits à partir des bactéries marines

Les bactéries marines ont récemment émergées comme une nouvelle source de produits naturels qui sont utilisés pour le développement de nouveaux médicaments ou autres produits d'intérêt commercial (Moore, 1999).

Un grand nombre d'études a montré que les bactéries marines telles que *Streptomyces*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* ou encore *Roseobacter* par exemple sont capables de produire une gamme des molécules biologiquement actives n'existant pas chez les bactéries terrestres, telles que des antibiotiques, toxines et antitoxines, les agents anti tumoraux et antimicrobiens, et en conséquence, elles ont été une matière de recherche d'un grand intérêt pendant beaucoup d'années (Camps, 2011).

Les bactéries marines produisent ces composés chimiques pour leur usage personnel dans un choix de fonctions diverses comprenant la défense, l'offense et la signalisation. L'énorme arsenal chimique évolué dans ces buts est la matière première pour beaucoup de produits pharmaceutiques et biotechnologiques (Mousumi et al., 2007).

II.2. Production des métabolites secondaires à partir des bactéries marines

La notion de métabolites secondaires est très large allant de la biosynthèse d'antibiotiques, de vitamines, de précurseurs de vitamines et d'antibiotiques, alcools et acides organiques de bas poids moléculaire, stérols, pigments, etc (Guezennec et Debitus, 2005).

II.2.1. Métabolites secondaires antimicrobiens et cytotoxiques et leurs applications

II.2.1.1. Métabolites secondaires des bactéries marines gram négatives : Les bactéries gram négatif sont omniprésentes dans les environnements marins. Elles sont plus abondantes par rapport aux bactéries gram positif et sont mieux étudiées du point de vue taxonomique, écologique, et phylogénétique (Murphy et al., 2012).

II.2.1.1.1. Métabolites secondaires des Pseudomonadaceae : C'est à partir de la souche marine *Pseudomonas bromoutlis* que le premier produit microbien naturel, Pentabromopseudiline, a été identifié en 1966. Cet antibiotique comprend un cadre inhabituel possédant un petit squelette carboné. Tandis que la majorité de sa masse moléculaire est dérivée du Brome. Le Pentabromopseudiline a été connu pour avoir une activité biologique, mais c'est jusqu'en 2009 que le mécanisme d'action spécifique a été identifié. Il a montré un potentiel d'inhibition de la myosine, une protéine de transport qui facilite le transport d'autre protéine tel que la tubuline. Les applications thérapeutiques des inhibiteurs sélectifs de myosine comprennent le traitement du cancer, l'insuffisance cardiaque et le paludisme (Murphy et al., 2012).

Pseudomonas stutzeri (CMG 1030) a montré une activité inhibitrice prononcée contre plusieurs bactéries pathogènes. L'extrait d'acétate d'éthyle a donné un nouvel métabolite antibactérien nommé Zafrin. Le criblage du Zafrin a indiqué une activité contre un groupe important de micro-organismes cliniques et environnementaux. Le Zafrin ne cible pas la paroi cellulaire bactérienne et son motif de lyse ressemble à celui des composés tels que la nisine et le Triton X-100, qui perturbent la membrane cellulaire (Debbab et al., 2010).

La Pyrrolnitrine (figure 01), un chloropyrrol a été isolé à partir de *Pseudomonas pyrocinia*. Elle possède une action contre les membres du genre *Trychophyton* et de nombreux champignons du sol phytopathogènes comme *Rhizoctonia solani* et *Fusarium sambucinum* et contre les agents pathogènes fongiques foliaires tels que *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* et *Pyrenophora tritici repentis*. Ce composé a été commercialisé au Japon sous le nom de PYRO-ACE pour le traitement d'infections dermatologiques superficielles. Sa sensibilité à la lumière empêchait l'utilisation de pyrrolnitrine (figure 01) en tant que fongicide (Weissman et Muller, 2010).

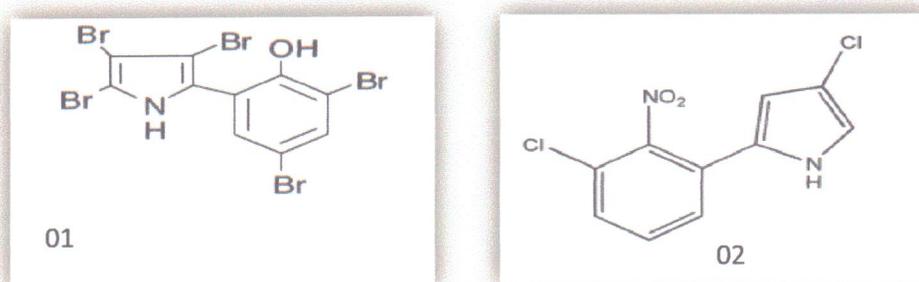


Figure 01 : Structures chimiques de certains métabolites secondaires des *Pseudomonaceae* ; (01): Pentabromopseudiline, (02): Pyrrolnitrine. (Murphy et al., 2012 ; Weissman et Muller ,2010)

II.2.1.1.2. Métabolites secondaires des Vibrionaceae : Une espèce non décrite de *Vibrio* a été isolée à partir de l'éponge, *Hyrtios altum*. Cette bactérie produit un indole inhabituel, trisindoline (figure 02). De même, une structure similaire bis-indole a été isolée à partir de cette souche et a montré une activité antibactérienne contre un certain nombre de bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) (Murphy et al., 2012).

Un depsipeptide cyclique antibactérien unnarmicine A (figure 02) a été isolé à partir de cultures d'une bactérie du genre *Photobacterium*, de la famille des Vibrionaceae. L'Unnarmicine A présentait une activité inhibitrice envers quelques souches α -Protéobactéries du genre *Pseudovibrio*. L'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives (*Bacillus subtilis*) et microalgues (*Prorocentrum micans*) a été découverte en association avec le métabolite magnésidin A contenant du magnésium (figure 02) (Murphy et al., 2012).

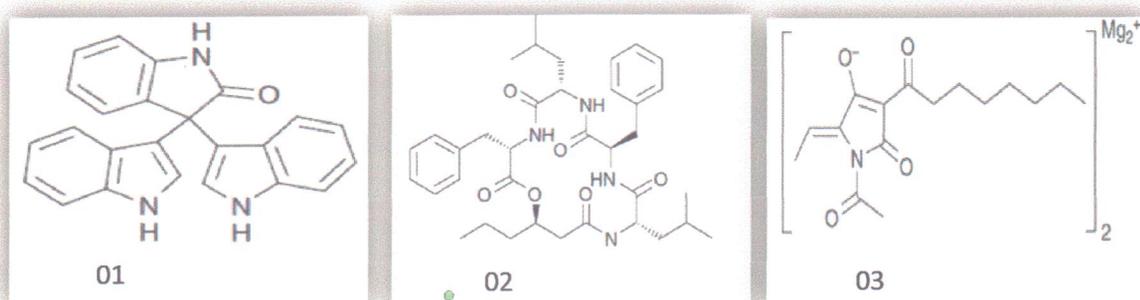


Figure 02: Structures chimiques de certains métabolites secondaires des *Vibrionaceae* ; (01) : Trisindoline, (02) : Unnarmicine, (03) : Magnésidine A. (Murphy et al., 2012).

Vibrio marinus a été isolé à partir de la mer Baltique avec une action antivirale contre de nombreux entérovirus. *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* et *Photobactérie leiognathi* ont été trouvés à produire de la L-asparaginase. Cette enzyme a montré des essais cliniques pour des traitements antitumoraux, antileucémiques et une forte activité contre *E. coli*, *Citrobacter freundii* (Mousumi et al., 2007).

II.2.1.1.3. Métabolites secondaires d'Alteromonadaceae : Une autre souche associée aux éponges, une espèce non encore décrite du genre *Alteromonas*, a été montrée pour produire le lactame alteramide macrocyclique A. Cette bactérie a été isolée à partir d'un échantillon de l'éponge *Halichondria okadai* recueillies à Kanagawa, au Japon, et la cytotoxicité du métabolite concerne un certain nombre de lignées cellulaires de cancer (Shigemori et al., 1992).

Une espèce d'*Alteromonas* supplémentaire qui n'a pas encore été identifiée complètement taxonomiquement est *Alteromonas cf. rava*. isolée de l'eau de mer, cette bactérie produit le thiomarinol B (figure 03), qui affiche une activité antibactérienne contre diverses bactéries gram négatives et gram positives. Ce métabolite est une structure hybride de deux classes d'antibiotiques déjà connus : les acides pseudomoniques et les pyrrothines (Tresa et al., 2010).

Le genre *Alteromonas* a été trouvé communément associé avec les éponges marines qui produisent du macrolactame et des composés d'esters d'amides ayant des propriétés cytotoxiques et antimicrobiennes. L'alcaloïde tétracyclique alteramide A a montré une activité cytotoxique contre la leucémie P-388, lymphome L-1210 et des cellules carcinome KB de l'épiderme (Tresa et al., 2010).

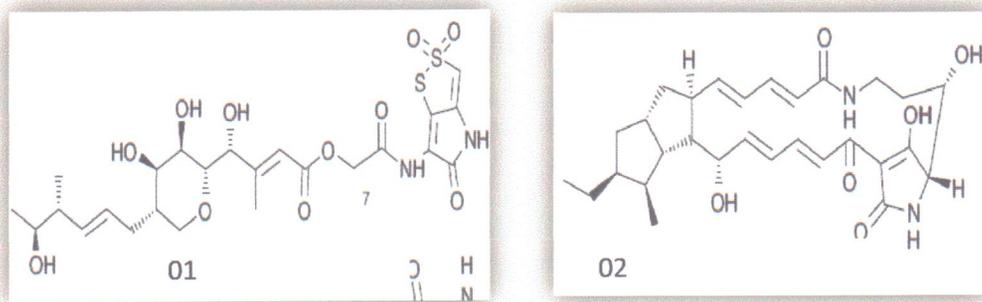


Figure 03 : Structures chimiques de certains métabolites secondaires des *Alteromonadaceae* ; (01) : *Thiomarinol B*, (02) : *Alteramide A*. (Shigemori et al., 1992)

II.2.1.1.4. Métabolites secondaires des Pseudoalteromonadaceae : Au sein de la famille de *Pseudoalteromonadaceae* se trouve le genre *Pseudoalteromonas* qui est la source d'un grand nombre de produits naturels marins. Parmi eux se trouve un dérivé bromé, la Korormicine, isolé à partir d'une souche de *Pseudoalteromonas* recueillie à la surface d'une espèce de l'algue non décrite *Halimeda* de la mer Palauan. La korormicine, métabolite original, a inhibé la translocation Na^+ - NADH-quinone réductase, un processus de translocation d'ion Na^+ qui est répondu chez les bactéries Gram négatif. Cette propriété a permis d'utiliser les korrmicine comme un antibiotique contre les souches bactériennes nécessitant une pompe à sodium (Yoshikawa et al., 1998).

Pseudoalteromonas phenolica sp. Nov. O-BC30T a été rapporté pour produire un antibiotique bactéricide "MC21-A" contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). MC21-A a montré une activité antibactérienne comparable à celle de la vancomycine. Cette substance a également été active contre *Enterococcus serolicida*, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, mais a été moins active contre *Streptococcus* sp. (Mousumi et al., 2007).

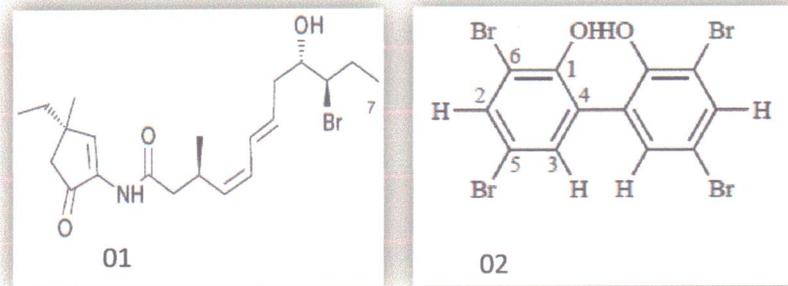


Figure 04 : Structures chimiques de certains métabolites de *Pseudoalteromonadaceae* ; (01) : Korormicine, (02) : A. MC21-A(1998 ; Mousumi et al., 2007)

II.2.1.2. Métabolites secondaires des bactéries marines gram négatives

II.2.1.2.1 Métabolites des Bacillaceae : Une nouvelle lactone de 24 maillons (macrolactine A), qui représente une nouvelle classe de macrolides a été isolé à partir d'une bactérie non décrite isolée des sédiments des fonds marins (plus tard isolé d'une souche marine de *Bacillus amyloliquefaciens*). Le macrolactine présente une activité antibactérienne considérable et également une activité antivirale contre *Herpes simplex*. À ce jour, il ya eu au moins 18 macrolactines isolées, et presque tous ont été produites par des souches de *Bacillus* marins (*B. marinus*, *B. subtilis*, *B. polyfermenticus*, *B. amyloliquefaciens* et *Bacillus* spp.) (Luet al., 2008). De nouveaux antibiotiques, YM-266183 et YM-266184, ont été retrouvés dans le bouillon de culture de *Bacillus cereus* QN03323, qui a été isolé à partir de *Halichondria japonica*. Ils ont montré une activité antibactérienne puissante contre les staphylocoques et les entérocoques, y compris des souches multi résistantes, alors qu'ils étaient inactifs contre des bactéries Gram négatif. La souche bactérienne marine *Bacillus pumilus* AAS3 isolé de l'éponge de la Méditerranée *Acanthella acuta*, a produit un diglucosyl-glycérolipide, GGL11. Les Études Antitumorales ont montré que la promotion de la diglucosyl-glycérol GG11 inhibe fortement la croissance des cellules tumorales lignes HM02 et Hep G2 (Tresa et al., 2010).

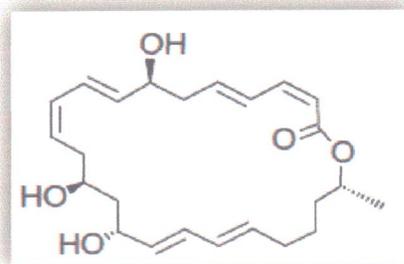


Figure 05 : Structure chimique du métabolite de *B. amyloliquefaciens* (Macrolactine A). Tresa et al., 2010

II.1. Matériel

II.1.1. Echantillons et site de prélèvement

Des échantillons d'eau et de macroalgues (tableau 01) ont été collectés durant le mois de mai dans la côte de la commune d'El Aouana à l'Ouest de la Wilaya de Jijel. Le prélèvement d'échantillons a été effectué par des plongeurs appartenant à l'unité de la protection civile de la Wilaya de Jijel à différentes profondeurs (surface, 6 m, 23 m, 40 m). Les échantillons ont été placés dans des flacons hermétiques stériles contenant de l'eau de mer environnante et transportés sous froid jusqu'au laboratoire. La carte ci dessous illustre le site de prélèvement des échantillons.



Figure 06 : Carte illustrant le site de prélèvement des échantillons
(<https://maps.google.dz/maps>) version 2012.

Tableau 01 : Algues marines prélevées pour l'isolement des bactéries marines associées à leurs surfaces (www.lesalguesdelamediterranee.com)

Les algues vertes	Les algues brunes	Les algues rouges	Les plantes à fleurs
<i>Ulva lactuca</i>	<i>Padina pavonica</i>	<i>Jania rubens</i>	<i>Posidonia oceanica</i>
	<i>Colpomenia sinuosa</i>	<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	

II.1.2. Les souches indicatrices

Les souches indicatrices utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne des souches marines ont été cultivées sur gélose nutritive. Ces souches et leurs origines sont présentées dans le tableau 02.

Tableau 02 : Souches indicatrices utilisées pour les tests de l'activité antimicrobienne.

La souche	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29523	American type culture collection
<i>Escherichia coli</i>	ATCC29522	American type culture collection
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	American type culture collection
<i>Klebssiella oxytoca</i>	–	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Taher
<i>Salmonella sp.</i>	–	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Taher
<i>Bacillus subtilis</i>	–	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Bejaia
<i>Listéria monocytogenes</i>	–	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Bejaia
<i>Escherichia coli</i>	–	Prélèvement vaginal (clinique)
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	Prélèvement vaginal (clinique)
<i>Candida albicans</i>	–	Prélèvement vaginal (clinique)

II.1.3. Milieux de cultures, enzymes et réactifs

Les souches bactériennes marines ont été principalement cultivées sur milieux Zobell [Marine Agar (MA) et Marine Broth (MB)]. Le bouillon MB, dont le pH a été ajusté à 7.4 en utilisant le NaOH et le HCl, se compose de : Peptone (5g), extrait de levure (1g), KH₂ PO₄ (0.1g), eau de

mer filtrée et stérilisé (quantité suffisante pour un litre). Ce milieu de culture a été filtré et stérilisé à l'autoclave (121°C pendant 20 min). Le milieu gélosé (MA) se différencie du milieu (MB) par l'ajout de 15 g d'agar bactériologique (Zobell, 1941).

Les tests de l'activité antimicrobienne ont été réalisés sur gélose Muller Hinton (institut Pasteur, Algérie).

L'identification des souches marines isolées a été effectuée à l'aide de galeries API® 20 E™ (Biomatériaux SA, France).

Le tampon phosphate salé (PBS) a été utilisé comme solvant pour les extraits de purification et pour la récupération de molécules intracellulaires après la lyse des bactéries.

La subtilisine utilisée dans cette étude a été obtenue à partir de *Bacillus subtilis* (Merck, France).

L'acétate d'éthyle grade HPLC (Sigma Aldrich) a été utilisé pour l'extraction des molécules actives à partir des surnageants de cultures.

II.1.4. Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Autoclave (SHI AVX electronic);
- Bain à agitateur ;
- Bain – Marie (GERHARDT);
- Balance (DENYER);
- Centrifugeuse (Bioblock Scientific centrifugeuse 55702);
- Rota-vapeur;
- Four Pasteur (Controls);
- Microscope optique (OLYMPUS);
- Microscope avec appareil photo (OLYMPUS);
- pH mètre (microprocessor);
- Réfrigérateur (Condor Hisense);
- Vortex électrique (Minishaker IKA).

II.2. Méthodes

Le présent travail propose d'étudier le pouvoir antimicrobien des molécules produites par les bactéries marines. Ceci s'inscrit dans une problématique visant à rechercher de nouvelles molécules bioactives possédant une activité antimicrobienne qui pourrait être par la suite une matière première pour la production de nouveaux médicaments.

Les souches bactériennes marines présentes dans les différents échantillons (eau de mer et macroalgues) ont été isolées, purifiées et identifiées, puis testées pour leurs activités antimicrobiennes. Les molécules des souches marines ayant présenté une forte activité vis-à-vis des souches indicatrices lors des tests de l'activité antimicrobienne ont fait l'objet d'une

extraction puis d'une analyse qualitative par CG-MS afin de contribuer à la pré-élucidation de leurs structures chimiques.

II.2.1. Isolement et purification des souches bactériennes marines

Les souches bactériennes utilisées au cours de ce travail ont été isolées de l'eau ou des macroalgues. Deux techniques d'isolement ont été utilisées (Penesyanyan, *et al.*, 2009) :

- La première consiste en l'étalement sur milieu MA de 100 ul d'eau ou de 10 ul de broyat de macroalgues broyées dans de l'eau de mer stérile ;
- La deuxième consiste à découper des morceaux d'environ 1 cm² sur la surface des thalles des macroalgues et à les déposer directement sur des boîtes de Petri contenant du milieu MA.

Les colonies prélevées au hasard après 5 jours d'incubations à 27° C, ont été ensuite purifiées par repiquage alterné sur milieu MA et en bouillon MB. Chaque souche a fait l'objet d'un examen macroscopique, d'une coloration de Gram, d'un test de la catalase et de l'oxydase ainsi d'une identification par API® 20 E™ (Biomatériaux, France). Vingt huit colonies de bactéries ont été sélectionnées à partir du milieu MA pour les tests préliminaires de l'activité antimicrobienne (décrits dans le paragraphe II.2.5).

II.2.2. Identification des souches bactériennes marines purifiées

II.2.2.1. Examen macroscopique : Un examen macroscopique a été effectué sur les boîtes MA après incubation, ainsi l'aspect des colonies (forme, taille, opacité, consistance, couleur et/ou pigment) a été décrit pour chaque type de colonies isolées.

II.2.2.2. Coloration de Gram : Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boîte MA et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon puis laissée refroidir à l'air libre. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet de gentiane pendant 1 min avant d'être rincée au lugol. Recouverte avec du lugol pendant 1 min, la préparation a ensuite été rincée à l'eau distillée pendant environ 5 secondes. La lame ainsi rincée, a été soumise à une décoloration à l'éthanol pendant environ 15 secondes, jusqu'à ce que l'étalement ait pris une couleur gris-bleu puis rincée à l'eau distillée pendant environ 5 s avant d'être colorée à la fushine pendant 1 min, rincée à nouveau à l'eau distillée puis séchée. Les lames ont été observées au microscope (objectif 100/ grossissement × 1000)

II.2.2.3. Test de la catalase : Pour la réalisation de ce test, chaque culture bactérienne à tester a été émulsionnée avec de l'eau oxygénée sur une lame propre, la présence d'une catalase se traduit par l'apparition de bulles d'oxygène.

II.2.2.4. Galerie API 20 : Les souches bactériennes marines initialement isolées ont été identifiées en utilisant une galerie API® 20 E™. Les bactéries à tester présentes dans le MB ont été inoculées dans chaque tube de la galerie contenant un substrat différent sur lequel elles allaient réagir.

Les colonies des souches à identifier ont été isolées à partir des boîtes contenant le milieu MA et suspendues dans 5 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention d'une absorbance à 600 nm égale à 0.45 (égale à 2 Mc Farland). Après homogénéisation, l'inoculum bactérien a été réparti dans les cupules de la galerie à l'aide d'une pipette stérile. Pour éviter la formation de bulles d'air aux fonds des tubes, la pointe de la pipette a été posée sur le côté de la cupule en inclinant légèrement la boîte de la galerie vers l'avant.

Pour les tests ADH, ODC, LDC, H₂S, et urée, une anaérobiose a été créée en remplissant les cupules des tubes avec de l'huile de vaseline stérile. Les galeries ont été incubées à 30 °C pendant 48 heures. Les profils biochimiques obtenus ont été analysés à l'aide d'un logiciel d'identification (bioeluard).

II.2.3. Cryoconservation des souches marines isolées

Toutes les souches bactériennes marines étudiées ici ont été conservées à -20°C dans un mélange final liquide de milieu de culture MB et de glycérol 30%.

II.2.4. Test de tolérance au sel

Les tests de tolérance au sel ont été réalisés sur toutes les souches de bactéries marines isolées. L'évaluation de la tolérance au sel a été effectuée par culture des souches sur du milieu MA gélosé renfermant des teneurs croissantes en NaCl : 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% (Dupray, 1986).

II.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne des souches marines isolées

Vingt huit colonies de bactéries ont été sélectionnées à partir du milieu MA pour les tests de l'activité antimicrobienne. Ces derniers ont été effectués par la méthode des disques sur milieu solide, afin d'examiner le pouvoir antibactérien et antifongique des molécules produites par les bactéries marines contre des souches indicatrices (voir tableau 02). Ces tests ont été réalisés sur milieu Muller Hinton (MH). Des colonies pures des souches indicatrices ont été suspendues dans de l'eau physiologique stérile de façon à obtenir une concentration bactérienne de 10⁸ UFC/ml. L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage.

Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 25 µl de chaque souche bactérienne marine isolée et ont été déposés par la suite sur la gélose MH préalablement ensemencée par des cultures pures de souches indicatrices. Les boîtes ont été incubées à température ambiante pendant 30 minutes, ensuite dans une étuve à 27 °C. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés après 18 heures d'incubation. Des contrôles positifs ont été réalisés avec des disques d'antibiotiques (Camps, 2011).

Les souches bactériennes marines ayant présentées une forte activité antimicrobienne ont été identifiées puis testées encore pour l'activité de leurs surnageants. Ces souches ont été cultivées dans des erlen Meyers contenant 100 ml du milieu MB additionné de 30% de glucose à température ambiante sous agitation laminaire pendant 5 à 6 jours (interruption la nuit). 9 ml de chaque culture bactérienne ont été ensuite centrifugés à 4000 rpm pendant 20 minutes. Les

surnageants de ces cultures ont été récupérés et testés pour leurs activités vis-à-vis des souches indicatrices selon la méthode des disques sur milieu solide décrite précédemment en II.2.5.

Afin de tester une éventuelle activité antimicrobienne des molécules liées à la paroi cellulaires et celles du contenu intracellulaire des isolats bactériens, 9 ml de chaque culture bactérienne ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 20 minutes. Les culots bactériens ont été récupérés et lavés avec de l'eau physiologique stérile et re-centrifugés à la même vitesse pendant 5 minutes. Les culots ainsi lavés ont été traités avec 500 μ l de la solution lytique (1% SDS ; 0.2 NaOH). Après 5 minutes d'incubation en présence de cette solution, les cellules bactériennes lésées ont été précipitées par centrifugation à 4000 rpm pendant 20 minutes. Les surnageants ainsi récupérés et additionnés de 2 ml de PBS ont été testés pour l'activité antimicrobienne de leurs molécules selon la même technique décrite précédemment en II.2.5.

II.2.6. Caractérisation physicochimique des molécules antimicrobiennes des souches productrices

Les molécules produites par les souches marines, ayant une activité antimicrobiennes ont été testées pour leur stabilité à la chaleur et leur susceptibilité à la dénaturation par les enzymes.

II.2.6.1. Stabilité à la chaleur

Pour vérifier la stabilité des molécules antimicrobiennes produites par les bactéries marines, un test à la chaleur a été appliqué. Des aliquotes de 0.5 ml du surnageant de chaque souche ont été exposés à divers traitements thermiques : 50°C, 70°C et 100 °C pendant 60 minutes. Vingt cinq microlitres de chaque surnageant traité ont été utilisés pour le test de l'activité antimicrobienne déterminée par la méthode des disques. *Staphylococcus aureus* a été utilisé comme souche indicatrice.

II.2.6.2. Susceptibilité à la dénaturation par les enzymes

Les surnageants des cultures bactériennes productrices des molécules antimicrobiennes ont été incubés pendant 2 heures à 37 °C avec une solution à 1 mg/ml de subtilisine (Merck) et de α -amylase (Merck) dans 5 ml tris-HCl, pH 8. Après incubation, les enzymes ont été inactivées par un choc thermique (5 minute à 100° C). L'activité antimicrobienne a été évaluée sur milieu solide par la méthode des disques, en utilisant *Staphylococcus* comme souche indicatrice.

II.2.7. Extraction des molécules antimicrobiennes

Les molécules antimicrobiennes des souches marines sélectionnées pour l'activité antimicrobienne de leurs surnageants et initialement cultivées dans 100 ml de MB ont été extraites avec un volume égal d'acétate d'éthyle grade HPLC dans des ampoules à décanter pendant 30 minutes. La phase organique a été transférée dans des ballons d'extraction et le solvant d'extraction a été évaporé sous vide. L'extrait obtenu a été stocké à -20°C jusqu'aux prochaines analyses (Boyd et al., 2009).

II.2.8. Analyse qualitative des molécules antibactériennes par GC-MS

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer équipé d'une colonne capillaire (SE30 25 m/ 0.32mm / 0.25 μ m) (Shimadzu QP2010). L'hélium était utilisé comme gaz vecteur avec un flux de 1ml/min. Les conditions opératoires sont les suivantes (Jhonson et al., 2012):

- Programmation de températures de 80 à 310°C à 10°C/min ;
- La température de l'injection était de 280°C ;
- Injection en mode split.

Les extraits des molécules antimicrobiennes ont été traités avec l'acide acétique anhydropyridine (1 :1, V/V) à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être analysés par GC-MS.

III.1. Isolement et purification

Au cours de cette étude, nous avons procédé à l'isolement de bactéries marines à partir d'échantillons d'eau de mer et d'algues. On observe bien sur la figure 07, le développement d'un tapis bactérien entourant les fragments d'algues et cela signifie que les surfaces des algues abritent des communautés de bactéries diverses et leurs procurent tous les éléments nécessaires à leurs survie et croissance. Ces propos ont été confirmés par **Boyd et al. (1999)** qui ont arrivé à isoler 280 bactéries épiphytiques de plusieurs rangs d'algues marines.



Figure 07: Croissance des bactéries marines sur milieu marine- agar autour des fragments d'algues marines.

Les colonies prélevées à partir des tapis qui entourent les fragments d'algues ont été ensuite purifiées par repiquage alterné sur milieu MA, jusqu'à l'obtention de cultures pures (figure 08). Vingt huit colonies de bactéries ont été sélectionnées à partir du milieu MA pour les tests préliminaires de l'activité antimicrobienne.

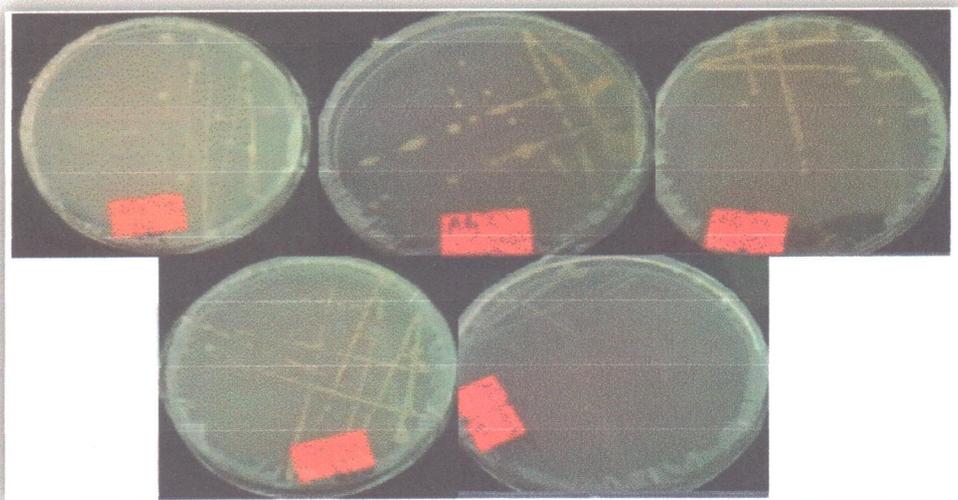


Figure 08 : Colonies pures des bactéries marines isolées sur milieu Marine Agar.

III.2. Identification des bactéries marines isolées à partir d'eau de mer et d'algues marines

Les souches ayant provoqué l'inhibition des souches indicatrices, faisaient l'objet des tests de la coloration de Gram, de la catalase et de la galerie API20. A partir de ces derniers, nous avons pu identifier 5 souches différentes. Les résultats sont présentés dans le tableau 03.

III.2.1 Examen macroscopique

Toutes les colonies observées sur gélose MA, étaient grandes, blanchâtres et d'aspect gluant laissant à penser à une éventuelle production d'exopolysaccharides par ces bactéries. La couleur des colonies de *Vibrio alginoliticus* et *Vibro parahaemolyticus* viraient au jaune et au rouge respectivement après cinq jours d'incubation à 27°C, ce qui pourrait être un signe de la production et de l'accumulation de métabolites secondaires qui auraient conféré une telle couleur.

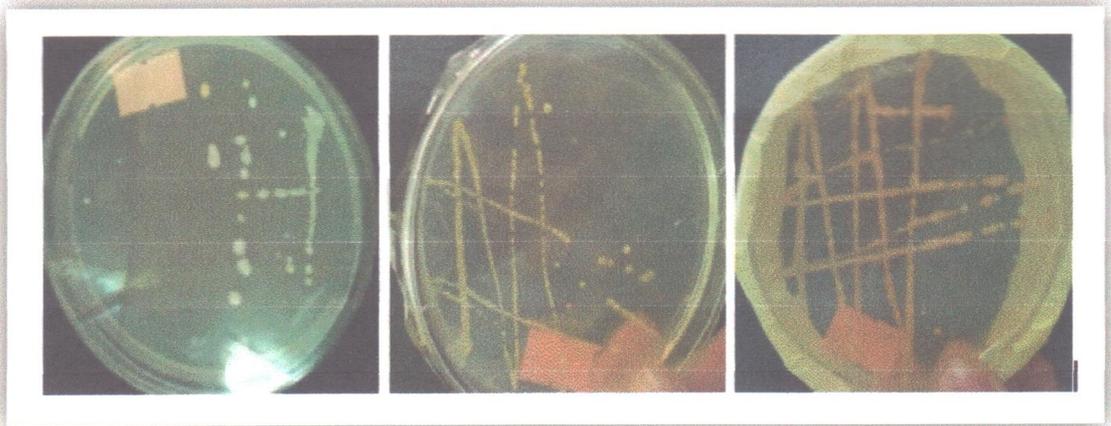


Figure 09 : Colonies de V. alginoliticus et V. parahaemolyticus isolées et purifiées sur marine agar

Après plusieurs jours d'incubation des boîtes contenant les fragments d'algues, nous avons remarqué la formation des creux sur le milieu de culture où c'est développé le tapis bactériens. Ce creux est le résultat probable de l'hydrolyse de l'agar par l'enzyme agarase produite par les souches marines isolées (figure 10).



Figure 10 : Creux résultants de l'hydrolyse du milieu de culture Marin- Agar par l'agarase produite par Vibrio parahaemolyticus.

III.2.2. Coloration de Gram

Le test de la coloration de Gram révèle que toutes les bactéries marines isolées étaient à Gram négatif. Les formes de ces bactéries varient entre la forme coccobacille et bacille incurvé en virgule. Ces résultats paraissent en parfait accord avec l'étude bibliographique que nous avons menée au début de ce travail qui révèle l'abondance des bactéries à Gram négatif dans les environnements marins (à l'exception de *Bacillus*).

Ainsi, la paroi des bactéries Gram négatif est constituée principalement de lipopolysaccharides (LPS), l'oligosaccharide de la matrice, et un polysaccharide appelé polysaccharide O-spécifique (OPS). Les OPS des bactéries marines sont souvent anioniques. Dans ce cas, cela pourrait être vu comme une adaptation à l'environnement marin : les sites négatifs sur les polysaccharides permettent la formation d'interactions ioniques induites par des cations bivalents (Leone et al., 2007).

III.2.3. Résultats de la galerie API20

L'emploi de la galerie API 20 pour l'identification de bactéries hétérotrophes marines est jugé satisfaisant par Dupray E., 1986, tout au moins en utilisant un milieu de salinité moyenne (1,4 %) et de pH neutre. Dans une autre étude consacrée à l'influence de la composition du milieu utilisé sur les réactions biochimiques en galerie API 20.

Les résultats de l'examen des profils biochimiques (galerie API20), la catalase et la coloration de Gram sont récapitulés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Tableau récapitulatif des profils biochimiques des différentes souches bactériennes isolées d'eau de mer et d'algues marines.

	Bm ₁	Bm ₂	Bm ₃	Bm ₄	Bm ₅	Bm ₆	Bm ₇	Bm ₈
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	+	-	-	-	+	-	+
ADH	-	+	-	+	+	-	-	+
LDC	+	+	+	+	-	-	-	+
ODC	+	-	-	+	-	-	-	+
CIT	-	+	+	+	-	-	-	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	-	-	+	-	-	-	+
IND	+	+	+	+	-	-	-	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	-	-	+
MAN	+	+	+	+	+	-	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	-	-	-	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	+
AMY	-	+	+	-	-	-	-	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-
Souche identifiée	<i>Vibrio alginoliticus</i>	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>

Bm : Bactérie marine, (+) : positif, (-) : négatif

Certaines de nos souches présentent quelques caractères communs, disons d'orientation diagnostique. Ce sont des bactéries à Gram négatif, bacilles incurvés en virgule, aérobies-anaérobies facultatifs, catalase positive (à l'exception de *Vibrio alginolyticus*) et mobiles. Ces caractères de base nous ont fait placer ces souches dans la famille des Vibrionaceae : trois souches appartiennent au genre *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*) et 2 au genre *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophyla* et *Aeromonas salmonicida*).

III.3. Test de tolérance au sel

Les bactéries, objet de cette étude ont été isolées du milieu marin. Il est donc intéressant d'observer leur croissance en présence de différentes concentrations de NaCl. Les résultats trouvés après avoir testé les souches sur gélosé nutritive enrichie en NaCl à différentes concentrations (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%) montrent que la totalité des 5 souches peut croître sur ce milieu, cela témoigne que les isolats sont d'origine marine. Selon Erwan Lozach (2001), la salinité de l'eau de mer est voisine de 3.5%, ce qui constitue un milieu parfait pour la croissance des bactéries marines et cela confirme parfaitement l'origine de nos bactéries. Les bactéries halophiles ont un besoin absolu de fortes concentrations en sel pour vivre, ces bactéries s'adaptent parfaitement à leur milieu par plusieurs mécanismes.

D'après Olsen (1994), les bactéries halophiles peuvent être considérées comme celles qui ont un besoin en NaCl pour leur développement. Elles ne se multiplient pas dans un milieu sans NaCl et, en fonction de la concentration optimale, on peut les qualifier de bactéries halophiles faibles, modérées ou extrêmes. Les bactéries halophiles faibles vivent dans des milieux contenant 1 à 6-7 % de NaCl avec une concentration optimale proche de celle de l'eau de mer (2-3%). Les vraies bactéries marines sont des halophiles faibles. Elles sont très diverses et se rencontrent dans les différents groupes bactériens. Ce qui mène à dire que nos souches sont des bactéries halophiles faibles.

III.4. Etude de l'activité antimicrobienne

Vingt huit souches bactériennes marines ont été isolées à partir d'algues marines et d'eau de mer. Ces souches ont été testées pour leur activité antimicrobienne vis-à-vis des souches indicatrices (tableau 02) par la méthode des disques (diffusion).

L'activité a été évaluée par la formation de zones claires autour des disques. Parmi les 28 souches testées, seulement 08 possédaient une activité antimicrobienne et provoquaient une inhibition prononcée des souches indicatrices (diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm). Ces souches présentaient un large spectre d'activité puisque elles sont capables d'inhiber la plupart des souches indicatrices utilisées. Parmi ces dernières, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* étaient les plus sensibles puisque leur croissance était inhibée par la plupart de nos souches marines (figure 11).

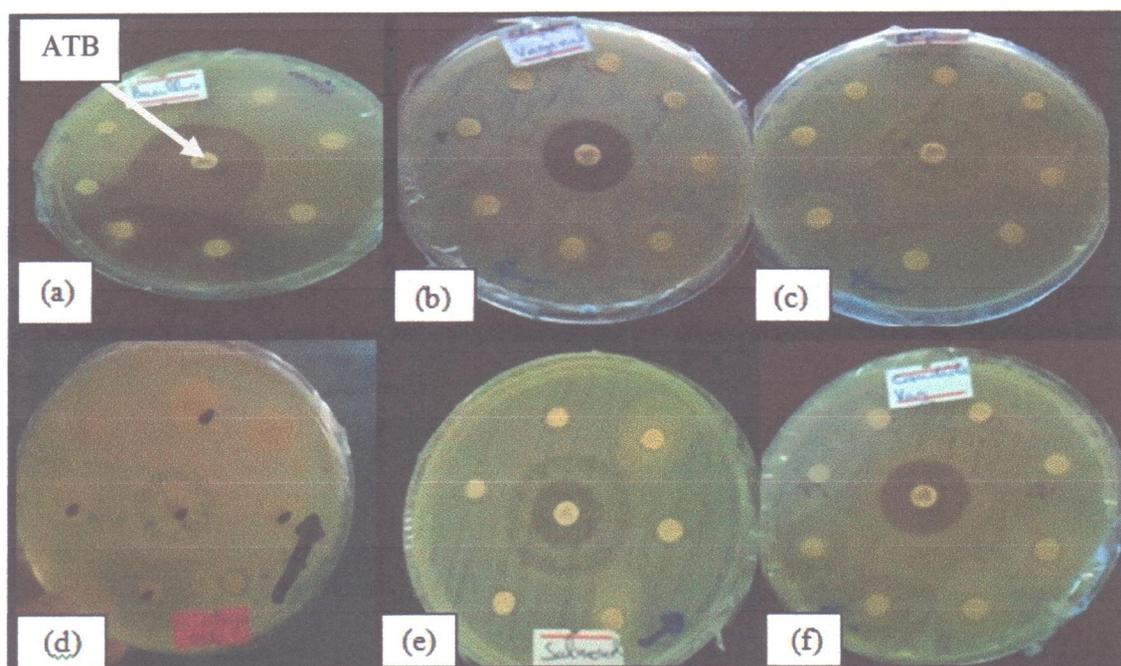


Figure 11 : Résultats des tests de l'activité antimicrobienne ; (a) : *Bacillus subtilis*, (b) : *Staphylococcus aureus* (v), (c) : *E. coli*, (d) et (f): *Candida albicans*, (e): *Salmonella* sp,

Les 5 souches identifiées à partir de la sous sélection des 09 bactéries possédant une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches indicatrices ont été inoculée en milieu liquide marine. Après 5 jour de culture à 25°C sous agitation laminaire, le surnageant (CFS) d'un aliquote de 9 ml de chaque culture de souche à été récupéré et testé pour son activité antimicrobienne par la méthode des disques sur milieu solide. Les résultats sont présentés dans le tableau 04.

Tableaux 04 : Résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants des cultures bactériennes

B. M S. I	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>E. coli</i>	31 mm	20 mm	12 mm	23 mm	12 mm
<i>P. aeruginosa</i>	22 mm	24 mm	12 mm	19 mm	20 mm
<i>Salmonella</i> sp.	11 mm	25 mm	12 mm	14 mm	14 mm
<i>B. subtilis</i>	15 mm	25 mm	13 mm	15 mm	10 mm
<i>C. albicans</i>	20 mm	16 mm	11 mm	19 mm	12 mm
<i>E. coli</i> (v)	23 mm	15 mm	12 mm	17 mm	13 mm
<i>S. aureus</i> (v)	23 mm	11 mm	13 mm	16 mm	14 mm

BM : bactéries marines ; SI : souches indicatrices

L'activité antimicrobienne des surnageants indique la présence de molécules bioactives qui sont libérées par les bactéries productrices dans le milieu environnant. Les surnageants des souches n'ayant pas présenté une activité antimicrobienne révèlent que les molécules bioactives sont probablement liées à la paroi cellulaire de ces souches, chose qui a été confirmée par la suite. Ainsi, toutes les suspensions obtenues après lyse cellulaire de ces souches identifiées provoquaient une inhibition de la plupart des souches indicatrices.

Toutes les souches ayant engendré l'inhibition des souches indicatrices appartiennent à la famille des **Vibrionnaceae** : trois souches font partie du genre *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*) et deux du genre *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas salmonicida*).

D'après plusieurs auteurs, les espèces de la famille des **Vibrionnaceae** produisent des molécules antimicrobiennes qui contribuent à leur abondance au sein des environnements marins (Long et al., 2005 ; Gram et al., 2010 ; Hibbixg et al., 2010).

Par ailleurs, Long et Azam (2001) ont étudié les interactions antagonistes entre les bactéries pélagiques et ont trouvé que les **Vibrionnaceae** produisent une large gamme de produits antimicrobiens. Cependant, aucun de ces composés n'a été isolé et caractérisé. Wietz et ses collaborateurs (2011) rapportent que la production élevée de molécules antimicrobiennes par les *Vibrio* marins révèle l'importance écologique de cette activité antagoniste.

Malgré son abondance dans l'environnement marin et la flexibilité de son génome, la famille des **Vibrionnaceae** reste inexplorée pour sa production de métabolites secondaires. Ainsi, seulement, 93 composés ont été isolés de cette famille de bactéries. La majorité de ces composés ont été isolés uniquement de 3 espèces : *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* et *V. vulnificus*.

Comme nous l'avons déjà mentionné, nous avons isolé 3 espèces de *Vibrio* : *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis* et *vibrio parahaemolyticus*. Ces 3 espèces ont présenté une activité antimicrobienne vis à vis des souches indicatrices utilisées (tableau 02), ce qui laisse penser au pouvoir biosynthétique de molécules antimicrobiennes que possèdent ces bactéries.

Certains chercheurs ont pu isoler ces trois espèces à partir d'organismes marins. Ainsi, Haygood et al. (1993) ont pu isoler le *Vibrio fluvialis* à partir du plancton marin. Noguchi et ses collaborateurs ont également parvenu à isoler une espèce de *V. alginolyticus* à partir des intestins des poissons. Aucune étude précédente n'a rapporté un pouvoir antimicrobien pour ces 2 espèces. Cependant des chercheurs ont pu y isoler plusieurs molécules bioactives. Il s'agit de la flavibactine et du Bis [3-(2,3-dihydroxy-benzoylamino)-propyl] amine produits par *V. fluvialis* qui possède une activité sidérophore (Haygood et al., 1993 ; Yamamoto et al., 1993) et de la tetrodotoxine, un bloqueur des canaux de sodium produit par *V. alginolyticus* (Lee et al., 2000). *V. parahaemolyticus* a été aussi isolé à partir de l'environnement marin, celui ci produit 2 indoles possédant une activité antibactérienne : la turbomicine et le 2,2 Di - (3-indolyl)-3è indolone (Bell et al., 1994 ; Veluri et al., 2003). Notre étude apporte donc de nouvelles données concernant le pouvoir biosynthétique de molécules bioactives des Vibrios.

L'identification biochimique a également révélée deux autres souches bactériennes de la même famille mais du genre différent. Ces espèces sont *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas salmonicida*. Les *Aeromonas* sont des bactéries omniprésentes dans divers écosystèmes aquatiques, tels que l'eau de mer, eau douce, les estuaires et les eaux côtières. Ils sont soit mésophiles ou psychrophiles, bacilles à Gram négatif non mobiles ou mobiles. Les *Aeromonas* identifiés comme des membres de la microflore intestinale dans les poissons et autres animaux aquatiques (amphibiens, reptiles) peuvent causer diverses maladies dans des conditions de stress environnementaux. Les espèces *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas*

caviae, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria* et *Aeromonas bestiarum* ont été décrits comme des agents pathogènes des poissons. La plus part des études qui ont été portées sur ce genre concernaient souvent leurs facteurs de virulence, y compris les hémolysines, entérotoxines cytotonique et cytotoxiques, des protéases, lipases et leukocidins (Szewczuk *et al.*, 2013).

Jayseelen et ces collaborateurs (2012) ont pu biosynthétiser des nanoparticules d'oxyde de zinc en utilisant *Aeromonas hydrophyla* comme souche productrice

III.5. Caractérisation physicochimique des molécules antimicrobiennes

L'effet du traitement thermique et d'une enzyme protéolytique (substiline 1g/ml) sur l'activité antimicrobienne des molécules présents dans les CFS ou libérées après lyse cellulaire des souches marines isolées a été évaluée (tableau 05).

Aucune perte de l'activité antimicrobienne n'a été enregistrée après traitement avec la subtilisine. Cette activité reste également conservée après traitement thermique à 50, 75 et 100°C pendant 60 minutes suggérant une haute stabilité des molécules antimicrobiennes à la chaleur. Ces résultats excluent la nature protéique des molécules antimicrobiennes produites.

Tableau 05 : Résultats de l'activité antimicrobienne après traitement thermique et protéolytique

	Température 50 °C		Température 100°C		Protéase	
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
Bm₁	13 mm	16 mm	14 mm	12 mm	8 mm	9 mm
Bm₂	12 mm	15 mm	19 mm	19 mm	12 mm	7 mm
Bm₃	21 mm	20 mm	16 mm	14 mm	19 mm	10 mm
Bm₄	18 mm	15 mm	12 mm	12 mm	11 mm	13 mm
Bm₅	10mm	10mm	8 mm	9 mm	8mm	10mm
Bm₆	13mm	9mm	15 mm	15 mm	7mm	7mm
Bm₇	12 mm	15 mm	20 mm	17 mm	12 mm	12 mm
Bm₈	15 mm	20 mm	12mm	10mm	10 mm	8 mm

Des études antérieures portant sur l'étude et l'élucidation des structures chimiques des molécules produites par *V. mediterranei* ont montré que cette dernière produit un depsipeptide avec des propriétés antibactériennes, antifongiques et antimalariques (Hill *et al.*, 2011). Ce dernier ne semble pas être produit par nos souches puisqu'elles ont gardé leurs activités antimicrobiennes après traitement thermique et protéolytique.

III.6. Résultats de l'analyse qualitative par GC-MS

L'analyse par GC-MS des extraits de nos souches marines montre la présence de 14 pics pour l'extrait de *Aeromonas hydrophyla* et 17 pics pour l'extrait de *V. alginolyticus*. Ces composés sont illustrés par les figures 12 et 13 et groupés dans les tableaux 06 et 07, respectivement.

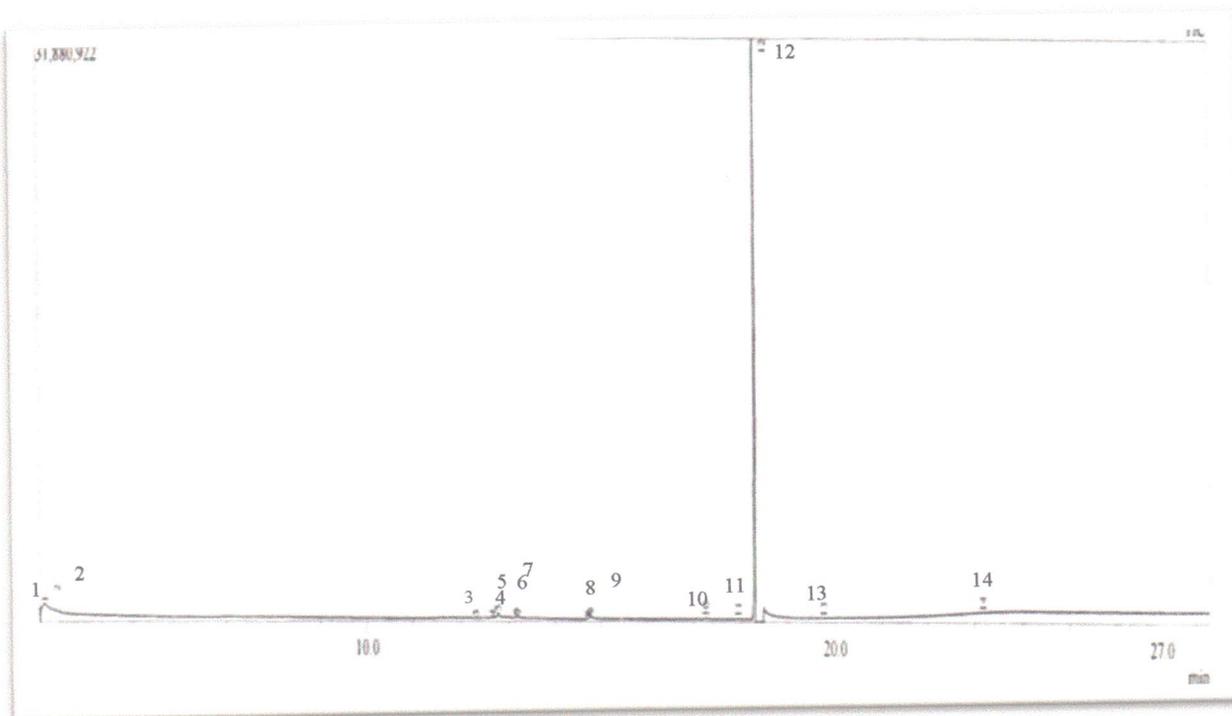


Figure 12 : Chromatogramme de l'extrait d'*Aeromonas hydrophila*.

Tableau 06 : Composés révélés lors de l'analyse par GC-MS de l'extrait d'*Aeromonas hydrophila*

Pick	Hauteur (%)	Nom
1	2,77	Propanoic acid, chloro-2-hydroxy-
2	1,11	Ketene
3	0,09	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl)ester
3	0,06	Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-
5	0,82	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dien-2,8-dione
6	0,22	Hexadecanoic acid, methyl ester
7	0,28	Dibutyl phthalate
8	0,07	6-Heptenoic acid, 4-methylene-5-methyl-, methyl ester
9	0,42	7-Octadecenoic acid, methylester
10	0,21	2-(7-Hydroxymethyl-3,11-dimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl) [1,4]benzoquinone
11	0,17	Isosorbide Dinitrate
12	93,66	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl)ester
13	0,06	Decane, 1,1'-oxybis-
14	0,07	Ethanone, 1-[4-(2-phenylethenyl)phenyl]

Le pic n°4 de l'extrait de la même souche correspond au pyrrolo [1,2_a] pyrazine-1,4-dione. Ce composé fait partie de la même famille des pyrrolidinediones produite par *Vibrio*.spp et possédant une activité antimicrobienne (Oclarit et al., 1994 ; Wietz et al., 2010). Les autres composés antimicrobiens produits par les espèces de la famille des vibrionnaceae ont été caractérisés comme étant des nitromaleimides (Al-Zereini, 2010 (Yao et al., 2010) des phénazines (Sato, 1995), des prodiginines (Gerber, 1983), des diphenyl ethers (Elyakov et al., 1991 ; Sionov et al., 2005), et des indoles (Bell et al., 1994 ; Veluri et al., 2003).

Nous signalons l'absence totale des composés de nature peptidique tel que l'unarmicine (un depsipeptide isolé de quelques espèces de la famille des Vibrionnaceae) (Oku et al., 2008). Ceci paraît en parfait accord avec les résultats de l'activité antimicrobienne obtenus après traitement des surnageants de cultures avec la subtilisine. Ainsi, nous n'avons enregistré aucune perte de l'activité antimicrobienne de ces souches.

Selon plusieurs auteurs, plusieurs composés sont des artéfacts générés des procédés de l'extraction et de la dérivatisation des molécules bioactives (Laatsh, 2006 ; Veluri et al., 2003 Shaaban et al., 2002). Ainsi, l'analyse de tous les extraits montre la présence des phtalates, rencontrés généralement dans les plastiques, ces phtalates pourraient probablement provenir des tubes de conservation des extraits. La pyridine et l'acide acétique présents aussi dans les chromatogrammes des 4 extraits analysés proviennent des solvants utilisés pour la dérivatisation des molécules présentes dans chaque extrait.

Enfin, pour pouvoir attribuer l'activité antimicrobienne que nous avons observée à l'un de ces pics, nous devrions passer par la purification de ces composés et l'évaluation de l'activité de chacun d'eux séparément.

Conclusion

Cette étude avait pour objectif, la purification et l'identification des bactéries marines isolées à partir d'algues marines et d'eau de mer collectées dans la cote de la commune d'El Aouana au Sud Ouest de la Wilaya de Jijel. Nous avons pu isoler cinq espèces de bactéries marines assignées à la famille des *Vibrionaceae* : trois souches appartiennent au genre *Vibrio* (*Vibrio alginoliticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*) et deux au genre *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophyla* et *Aeromonas salmonicida*).

Ces souches ont été testées pour leurs activités antimicrobiennes contre des souches indicatrices et ont présenté un spectre d'action relativement large contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp, *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* (v) et *S. aureus* (v).

Les molécules responsables de cette activité ont été extraites par l'acétate d'éthyle à partir des surnageants des cultures bactériennes et ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse. Les résultats ont montré la présence de plusieurs composés appartenant à plusieurs familles chimiques dont les alcanes, les alcènes, les esters, les alcools et les acides carboxyliques.

Enfin l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue que la première étape dans la recherche de sources naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seraient nécessaires. Ainsi, il serait donc intéressant de mener d'autres études sur les fractions des extraits naturels démontrant l'activité antimicrobienne *in vitro* en vue d'identifier l'espèce chimique ou le composé responsable de cette activité. Ces études devraient être confirmées par un suivi *in vivo*.

Références bibliographiques

- Al-Zereini W., Yao C.B.F.F., Laatsch H., Anke H., 2010.** Aqabamycins A–G: Novel nitromaleimides from a marine *Vibrio* species: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities, *J. Antibiot.*, **63**: 297–301.
- Bell R., Carmeli S., SarN., Vibrindole A., 1994.** A metabolite of the marine bacterium, *Vibrioparahaemolyticus*, isolated from the toxic mucus of the boxfish *Ostracion cubicus*, *J. Nat. Prod.*, **57**: 1587–1590.
- Bowers K., Mesbah N., Wiegel J., 2009.** Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physicochemical boundary for life?, *Saline Syst.*, **5**:9.
- Boyd K.G., Adams D.R., Burgess J.G., 1999.** Antibacterial and Repellent Activities of Marine Bacteria Associated with Algal Surfaces, *Biofoul.*, **14**(3): 227-236.
- Burkholder P.R., Fisher P., Leitz R.M., 1996.** Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium, *Appl Microbiol.*, **14**: 649-653.
- Camps M., 2011.** Bio-essais anti-adhésion sur bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtement antifouling, thèse de doctorat en biologie marine, université du Sud Toulon Var, France.
- de Carvalho C.C.R., Fernandes P., 2010.** Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environment, *Mar. Drugs.*, **8**: 705-727.
- Chang-Qing L., Wen-Chao L., Ping Z., Jin-Ling Y., Ke-Di C., 2011.** Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Gelliodescarnosa* Collected from the Hainan Island Coastal Waters of the South China Sea, *Microbiol. Ecol.*, **62**: 800-812.
- Chimetto L.A., Cleenwerck I., Alves N. Jr, Silva B. S., Brocchi M., Willems A, De Vos P., Thompson F.L., 2011.** *Vibrio communis* sp. nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgiadilatata*, *Palythoacaribaeorum*, *Palythoavariabilis* and *Litopenaeus vannamei*, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **61**: 362–368.
- Davies J., 1996.** Medicine – bacteria on the rampage, *Nature*, **383**: 219–220.
- Debbab A., Aly A. H., Lin W. H., Proksch P., 2010.** Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi, *Microbiol. Biotech.*, **3**(5): 544–563.
- Ducklow, H. W., 1992.** Factors regulating bottom-up control of bacteria biomass in open ocean plankton communities. *Archiv für Hydrobiologie Beihefte Ergebnisse der Limnologie* **37**: 207-217.
- Dupray E., 1986.** Hétérogénéité phénotypique et pouvoir pathogène de *Vibrionaceae* isolées des zones littorales bretonnes, thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, université de Paris-sud, France.

Egan S., Thomas T., Holmstrom C., Kjelleberg S., 2000. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*, *Environ. Microbiol.*, **2**: 343–347.

Elyakov G.B., Kuznetsova T., Mikhailov V.V., Maltsev I.I., Voinov V.G., Fedoreyev S.A. 1991. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea*, *Experientia*, **47**: 632–633.

Enticknap J.J., Kelly M., Peraud O., Hill R.T., 2006. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 3724–3732.

Espinosa E., Marco-Noales E., Gomez D., Lucas-Elo P., Ordax M., Garcias-Bonet N., Duarte C.M., Sanchez-Amat A., 2010. Taxonomic study of *Marinomonas* strains isolated from the seagrass *Posidonia oceanica*, with descriptions of *Marinomonas balearica* sp. nov. and *Marinomonas pollencensis* sp. Nov., *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **60**: 93–98.

Felbeck H., Childress J.J., Somero G.N., 1981. Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats, *Nat.*, **293**: 291.

Flemming H.C., Wingende J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: structural and ecological aspects, *Water. Sci. Technol.*, **43**: 1–8.

Fuhrman J. A., McCallum K., Davis A., 1992. A Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nat.*, **356**: 148–149.

Gauthier G., Gauthier M., Christen R., 1995. Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **45**: 755–761.

Gerber N.N., 1983. Cycloprodigiosin from *Beneckeia gazogenes*, *Tetrahedron Lett.*, **24**: 2797–2798.

Gold H.S., Moellering R.C., 1996. Drug therapy – antimicrobial drug resistance, *N. Engl. J. Med.*, **335**: 1445–1453.

Gomes A.G., 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms, *An. Acad. Bras. Cienc.*, **74(1)**: 151–170.

Gram L., Melchiorson J., Bruhn J.B., 2010. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms, *Mar. Biotechnol.*, **12**: 439–451.

Guezennec J., Debitus C., 2005. Les ressources marines de la Polynésie française : applications en matière de biotechnologie, IRD éditions.

Hamadouche N., 2003. Interactions des bactéries marines responsables de la formation des biofilms avec des matériaux biospécifiques, thèse de doctorat des sciences de l'ingénierie, Université Paris XIII, France.

Hayashida-Soiza G., Uchida. A., Mori N., Kuwahara Y., Ishida Y., 2008. Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain, *J. Appl. Microbiol.*, **105**: 1672–1677.

Haygood M.G., Holt P.D., Butler A., 1993. Aerobactin production by a planktonic marine *Vibrio* sp, *Limnol. Oceanogr.*, **38**: 1091–1097.

Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B. 2010. Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**: 15–25.

Holmstrom C., Egan S., Franks A., McCloy S., Kjelleberg S., 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species, *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **41**: 47–58.

Ivanova E. P., Flavier S., Christen R., 2004. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov., *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **54** : 1773–1788.

Ivanova E. P., Shevchenko L. S., Sawabe T., Lysenko A. M., Svetashev V.I., Gorshkova N. M., Satomi M., Christen R., Mikhailov V.V., 2002. *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an Australian sponge, and reclassification of [*Pseudoalteromonas aurantia*] NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra* sp. nov., *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **52**: 263–271.

Jayaseelan C., Rahuman A.A., Kirthi A.V., Marimuthu S., Santhoshkumar T., Bagavan A., Gaurav K., Karthik L., Rao K.V., 2012. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi, *Micro. Environ.*, **27(4)**: 367-73.

Kerr R.A., 1997. Geomicrobiology: Life goes to extremes in the deep earth and elsewhere?, *Sci.*, **276**: 703-704.

Kettle A.J., Andreae M.O., 2000. Flux of dimethylsulfide from the oceans: a comparison of updated data sets and flux models, *J. Geophys. Res.* **26**: 26793–26808.

Kuypers M.M., Sliemers A.O., Lavik G., Schmid M., Jorgensen B.B., Kuenen, J.G., Sinninghe Damste J.S., Strous M., Jetten M.S., 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea, *Nature* **422**: 608-611.

Laurienzo P., 2011. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview, *Mar. Drugs.*, **8**: 2435-2465.

Lee M.J., Jeong D.Y., Kim W.S., Kim H.D., Kim C.H., Park W.W., Park Y.H., Kim K.S., Kim H.M., Kim D.S., 2000. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiates*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1698–1701.

Leone S., Silipo A., Nazarenko E.L., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A., 2007. Molecular structure of endotoxins from gram-negative marine bacteria, *Mar. Drugs.*, **5**: 85–112.

Li W.K.W., Jellett J.F., Dickie P.M., 1995. DNA distributions in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO, *Limno. Oceano.*, **40**: 1485-1495.

Long R.A., Rowley D.C., Zamora E., Liu J.Y., Bartlett D.H., Azam F., 2005. Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholera*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 8531–8536.

Long R.A., Azam F., 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 4975–4983.

Longfor S.R., Tujula N.A., Crocetti G.R., Holmes A.J., Holmstrom C., Kjelleberg S., Steinberg P.D., Taylor M.W., 2007. Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes, *Aquat. Microb. Ecol.*, **48**: 217–229.

Lonsdale P., 1977. Deep-Tow observations at mounds abyssal hydrothermal field, Galapagos rift. *Ear. Pla. Sci. Lett.*, **36(1)**: 92-110.

Lozach E., 2001. Le sel et les microorganismes, Thèse doctorat vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de maison Alfort, France.

Macleod R.A., 1965. Question of existence of specific marine bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **29**: 9–23.

Mahalakshmi L.K., DrMythili.M., Dr. VijayaLakshmi T., DrRadhakrishnareddy, 2013. Screening and isolation of marine bacteria with biological activity from oil contaminated sea water, *IJRRPAS.*, **3(1)**: 1-44.

Manefield M., de Nys R., Kumar N., Read R., Givskov M., Steinberg P., Kjelleberg S.A., 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein, *Microbiol.*, **145**: 283–291.

Martinez-Checa F., Bejar V., Llamas I., del Moral A., Quesada E., 2005. *Alteromonas hispanica* sp. nov., a polyunsaturated fatty-acid-producing, halophilic bacterium isolated from Fuente de Piedra, southern Spain, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **55**: 2385–2390.

Matsuo Y., Suzuki M., Kasai H., Shizuri Y., Harayama S., 2003. Isolation and phylogenetic characterization of bacteria capable of inducing differentiation in the green alga *Monostroma oxyspermum*, *Environ. Microbiol.*, **5**: 25–35.

Maximilien R., de Nys R., Holmstrom C., Gram L., Givskov M., Crass K., Kjelleberg S., Steinberg P.D., 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*, *Aquat. Microb. Ecol.*, **15**: 233–246.

Moore B.S., 1999. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms (Part A), *Roy. Soc. Chem.*, **22**: 580 – 593.

Mousumi D., Paul A.K., Bisen P.S., 2007. Natural Bioactive Compounds and Biotechnological of Marine Bacteria, *Cur. Pharma. Biotech.*, **8**: 253-260.

Murphy B.T., Jensen P.R., and Fenical William, 2012. The Chemistry of Marine Bacteria, edition Springer Science.

Nakanishi K., Nishijima M., Nishimura M., Kuwano K., Saga N., 1996. Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (Chlorophyta) grown under axenic conditions, *J. Phycol.*, **32**: 479–482.

Nakanishi K., Nishijima M., Nomoto A.M., Yamazaki A., Saga N., 1999. Requisite morphologic interaction for attachment between *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and symbiotic bacteria, *Mar. Biotechnol.*, **1**: 107–111.

Oclarit J.M., Okada H., Ohta S., Kaminura K., Yamaoka Y., Iizuka T., Miyashiro S., Ikegami S., 1994. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium, *Microbios*, **78**: 7–16.

Oku N., Kawabata K., Adachi K., Katsuta A., Shizuri Y., 2008. Unnarmicins A and C, new antibacterial depsipeptides produced by marine bacterium *Photobacterium* sp., *J. Antibiot.*, **61**: 11–17.

Olsen G.J., Woese C.R. et Overbeek R., 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology, *J. Bact.*, **176**: 1-6.

Piel J., 2008. Metabolites from symbiotic bacteria, *Roy. Soc. Chem.*, **26**: 338-362.

Provasoli L., Pintner I.J., 1977. Effect of media and inoculum on morphology of *Ulva lactuca*, *J. Phycol.*, **13**: 56–56.

Provasoli L., Pintner I. J., 1980. Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **16**: 196–201.

Raina J. B., Tapiolas D., Willis B. L., Bourne D.G., 2009. Coral-Associated Bacteria and Their Role in the Biogeochemical Cycling of Sulfur, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**: 3492-3501.

Romanenko L. A., Tanaka N., Frolova G. M., 2009. *Marinomonas arenicola* sp. nov., isolated from marine sediment, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **59**: 2834–2838.

Senni K., Pereira J., Gueniche F., Delbarre-Ladrat C., Siquin C., Ratiskol J., Godeau G., Fischer A-M., Helley D., Collic-Jouault S., 2011. Marine Polysaccharides: A Source of Bioactive Molecules for Cell Therapy and Tissue Engineering, *Mar. Drugs*, **9**: 1664-1681.

Shigemori H., Bae M.A., Yazawa K., Sasaki T., Kobayashi J., 1992. Alteramide A, a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*, *J. Org. Chem.*, **57**: 4317–4320.

Sikkema J., Debont J.A.M., Poolman B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.*, **59**: 201–222.

Sionov E., Roth D., Sandovsky-Losica H., Kashman Y., Rudi A., Chill L., Berdicevsky I., Segal E., 2005. Antifungal effect and possible mode of activity of a compound from the marine sponge *Dysidea herbacea*, *J. Infect.*, **50**: 453–460

Stelzer S., Egan S., Larsen M.R., Bartlett D.H., Kjelleberg S., 2006. Unravelling the role of the ToxR-like transcriptional regulator WmpR in the marine antifouling bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*, *Microbiol.*, **152**: 1385–1394

Taguchi T., Platt T., 1978. Size distribution and chemical composition of particulate matter in Bedford Basin, 1973 and 1974. Fisheries & Marine Service Data Report No. 56, Canada, p 1-370.

Takahashi, A., Nakamura, H., Kameyama T., Kurasawa S., Naganawa H., Okami Y., Takeuchi T., Umezawa H., Bisucaberin, 1987. A new siderophore, sensitizing tumor-cells to macrophage-mediated cytotoxicity. 2. Physicochemical properties and structure determination, *J. Antibiot.*, **40**: 1671–1676.

Takeuchi T., Umezawa H., Bisucaberin, 1987. A new siderophore, sensitizing tumor-cells to macrophage-mediated cytotoxicity. 2. Physicochemical properties and structure determination, *J. Antibiot.*, **40**: 1671–1676.

Thompson F. L., Li Y., Gomez-Gil B., Thompson C. C., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Rupp G. S., Pereira A., De Bem M. M., Sorgeloos P., Swings J., 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**: 245–252.

Tresa Remya A.T., Devanand P.K., Ponnappakkam A. L., 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association, *Mar. Drugs.*, **8**: 1417-1468.

Van der Merwe P., Lannuzel D., Nichols C.A.M., Meiner K., Hei P., Norman L., Thomas D.N., Bowie.A.R., 2009. Biogeochemical observations during the winter-spring transition in East Antarctic sea ice: evidence of iron and exopolysaccharide controls, *Mar. Chem.*, **115**: 163–175.

Veluri R., Oka I., Wagner-Döbler I., Laatsch H., 2003. New indole alkaloids from the North Sea bacterium *Vibrio parahaemolyticus*, *J. Nat. Prod.*, **66**: 1520–1523.

Wai S.N., Mizunoe Y., Yoshida S., 1999. How *Vibrio cholerae* survive during starvation, *Microbiol. Lett.*, **180**: 123–131.

Wagner I.D., Biebl H., 2006. Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 255–280.

Webster N.S., Bourne D., 2007. Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alyonium antarcticum*, *Microbiol. Ecol.*, **59**: 81–94.

Weissman K.J., Muller Rolf, 2010, Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action, *Roy. Soc. Chem.*, **27**: 1276–1295.

Wietz M., Mansson M., Gram L., 2011. Chitin stimulates production of the antibiotic andrimid in a *Vibrio coralliilyticus* strain, *Envir. Microbiol. Rep.*, **8**: 2946-2960.

Wingenter O.W., Haase K.B., Strutton P., Friederich G., Meinardi S., 2004. Changing concentrations of CO, CH₄, C₅H₈, CH₃Br, CH₃I, and dimethyl sulfide during the Southern Ocean iron enrichment experiments, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**: 8537–8541.

Yamamoto S., Okujo N., Fujita Y., Saito M., Yoshida T., Shinoda S., 1993. Structures of two polyamine containing catecholatesiderophores from *Vibrio fluvialis*, *J. Biochem.*, **113**: 538–544.

Yano Y., Nakayama A., Yoshid. K., 1997. Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals, *Appl. Envir. Microbiol.*, **63**: 2572–2577.

Yao C.B.F.F., Al Zereini W., Fotso S., Anke H., Laatsch H.A., 2010. A–G: Novel nitro maleimides from a marine *Vibrio* species: II. Structure elucidation, *J. Antibiot.*, **63**: 303–308.

Youchikawa S., Tatsu Y., Okamoto K., Taguchi T., Yumoto N., Nicolau V., Ivanova P.E., 1998. Impact of conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marines bacteria, *mar. boil.*, **130**: 545-551

Zobelle E., 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes, *J. Mar. Res.*, **4**: 42-75.

Zoe E., Brimble W and M. A., 2009. Molecules derived from the extremes of life, *Nat. Prod. Rep.*, **26** : 44–71.

Annexe

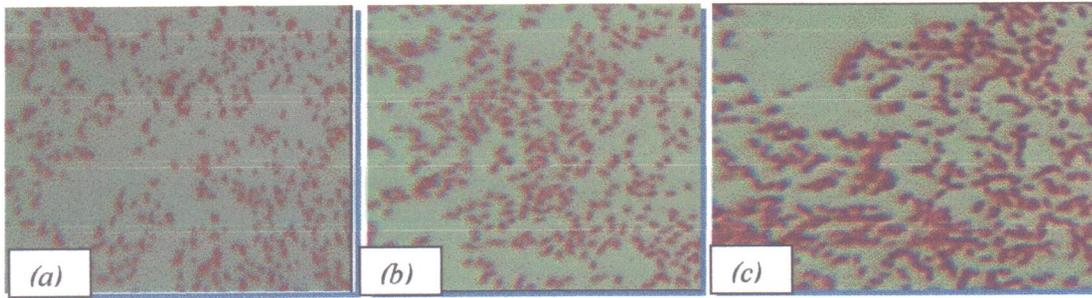


Figure 01: observations microscopique de la coloration de gram des bactéries marines isolées objectif (X 100) ; (a) *Vibrio parahemolyticus*; (b) *Vibrio fluvialis*; (c) : *Vibrio alginoliticus* .



Figure 02 : résultat de l'API 20 ;(1) (*Aeromonas hydrophyla*),(2) *Vibrio alginoliticus*,(3) *Aeromonas hydrophyla*,(4) *Aeromonas hydrophyla*,(5) *Vibrio parahemolyticus* ,(6) *Aeromonas salmonicida*,(7) *Aeromonas hydrophyla*,(8) *Vibrio fluvialis*.

Encadré par : Dr. Idoui T.

Examinatrice: Dr. Ouled Haddar H.

Réalisé par : Kaaboub Kawtar et Bezzag Afaf

Présidente: M^{me} Bourzama G.

Intitulée : Les biomolécules produites par les bactéries aquatiques : pré-identification et recherche des activités antimicrobiennes.

Soutenance le 01/07/2013

Résumé

L'environnement marin abrite des bactéries avec des traits antagonistes, et les microorganismes marins sont une source potentielle de nouveaux composés antimicrobiens. Les bactéries marines antagonistes ont été isolées des surfaces et des eaux profondes, mais la majorité proviennent des surfaces biotiques telles que les éponges, le zooplancton et les macroalgues. Cette étude avait pour objectif l'isolement, la purification et l'identification des bactéries marines isolées à partir d'algues marines et d'eau de mer collectées dans la commune d'El Aouana au Sud-Ouest de la Wilaya de Jijel. Nous avons pu isoler cinq espèces de bactéries marines assignées à la famille des **Vibrionaceae** : trois souches appartiennent au genre *Vibrio* (*Vibrio alginoliticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*) et deux au genre *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophyla* et *Aeromonas salmonicida*). Ces souches ont été testées pour leur activité antimicrobienne contre des souches indicatrices. Les molécules responsables de cette activité ont été extraites par l'acétate d'éthyle à partir des surnageants des cultures bactériennes et ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse. Les résultats montrent la présence de plusieurs composés appartenant à plusieurs familles chimiques dont les alcanes, les alcènes, les esters, les alcools et les acides carboxyliques. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier la structure chimique des molécules responsables de cette activité antimicrobienne.

Mots clé : bactéries marines, algues marines, activité antimicrobienne, molécules bioactives, souches indicatrices.

Abstract

The marine environment harbors bacteria with antagonistic traits, and marine microorganisms are a potential source of novel antimicrobials. Antagonistic marine bacteria have been isolated from surface and deep waters, but the majority originated from biotic surfaces such as sponges, zooplankton and macroalgae. The objective of this study is the isolation, purification and identification of isolated seaweed marine bacteria and seawater collected from the coast of the municipality of El Aouana South West of the Wilaya of JIJEL. We have isolated five species of marine bacteria assigned to the family **Vibrionaceae**: three strains belong to the genus *Vibrio* (*Vibrio alginoliticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*) and two to *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophyla* and *Aeromonas salmonicida*). These strains were tested for their antimicrobial activities against the indicator strains. The molecules responsible for this activity were extracted with ethyl acetate from the supernatants of bacterial cultures and were analyzed by following the gas chromatography coupled with mass spectrometry, the results showed the presence of several compounds belonging to several chemical families of alkanes, alkenes, esters, alcohols and carboxylic acids. Additional studies are needed to identify the chemical structure of the molecules responsible for the antimicrobial activity.

Key words: marine bacteria, marine alga, antimicrobial activity, bioactive molecules, indicator strains.

المخلص

تأوي البيئة البحرية البكتيريا ذات الصفات المضادة للبكتيريا، تعتبر الكائنات الدقيقة مصدر محتمل للعديد من المركبات المضادة للبكتيريا ولقد تم عزل هذه البكتيريا من العديد من الكائنات الحية و من أعماق البحار. الهدف من هذه الدراسة هو عزل، تنقية و تحديد نوع البكتيريا المعزولة من الطحالب البحرية التي تم جمعها من ساحل بلدية العوانة التي تقع جنوب غرب ولاية جيجل. ولقد تمكنا من عزل خمسة أنواع من البكتيريا البحرية و التي تنتمي الى عائلة **Vibrionaceae** ثلاث سلالات تنتمي الى النوع (*Vibrio alginoliticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*) و سلالتين الى النوع (*Aeromonas hydrophyla* et *Aeromonas salmonicida*) *Aeromonas*.

تم إختبار هذه السلالات لأنشطتها المضادة للجراثيم ضد عدة سلالات بكتيرية ممرضة و قد قدمت نشاط واسعاً. الجزيئات المسؤولة عن هذا النشاط تم إستخلاصها بواسطة خلاص الإيثيل وتم تحليلها عن طريق CG-SM ولقد تم الحصول على عدة مركبات تنتمي الى عائلات كيميائية مختلفة من بينها الألكانات، الألسنات، الأسترات و الأحماض الكربوكسيلية. هناك حاجة لدراسات إضافية لتحديد البنية الكيميائية للجزيئات المسؤولة عن النشاط المضاد للميكروبات. **الكلمات المفتاحية:** البكتيريا البحرية، الطحالب البحرية، النشاط ضد البكتيري، الجزيئات الحيوية، السلالات المؤشرة.

