

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT
DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire de Fin d'Etudes En vue de l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par: RABOUHI Lamia et BENBRAHIM Rahma

Thème

**Essai de caractérisation d'exoenzymes
produites par une bactérie extrêmophile
du genre *Halorubrum***

Mr BENSALÉM. S

M.C.A

Président UKM Ouargla

Mme ABBAS. A

M.C.A

Examinatrice UKM Ouargla

Mme KHALLEF. S

M.C.A

Encadreur UKM Ouargla

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Avant tout, nous remercions le bon dieu le tout puissant de mener à terme ce présent travail.

*Nous tenons à remercier en premier lieu Madame **KHALLEF.S**, MCA université Kasdi Merbah, qui fut la première à nous faire découvrir la thématique ; et qui a guidé notre mémoire et pour son indéfectible disponibilité et sa grande professionnalité. Elle a mis à notre disposition ses connaissances pour nous permettre d'avancer dans notre recherche, nous avons énormément appris.*

*Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury ; Mer **BENSALÉM.S** MCA université Kasdi Merbah et Mme **ABBAS.A**; MCA université Kasdi Merbah; de nous avoir accordé de leur temps et accepté d'évaluer ce travail.*

*Nos sincères remerciements pour Monsieur **BEN BRAHIM Fouzi**. Le directeur de l'école supérieur normal des enseignants de Ouargla et son équipe pédagogique ; pour avoir mis à notre profit les moyens dont ils disposent ; et spécialement Mr. **Rouabh Kadour** pour sa disponibilité inconditionnelle*

*Nos vifs remerciements s'adressent à l'ensemble du personnel du laboratoire Bioressources Sahariennes (BRS); précisément Mer **Bouzegag**. I pour sa disponibilité.*

*Nous remercions également Madame **Makka Faiza** directrice de la station de surveillance de l'environnement, Ouargla. Pour nous avoir bien accueilli et apporté son aide.*

Dédicaces

Avec un immense plaisir que je dédie ce modeste travail :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon cher père **Mohand**

A ma mère **Samia** pour son amour, ses sacrifices et sa tendresse.

Qu'ils trouvent dans ce travail un témoignage de mon profonds amour et éternelle reconnaissance.

A la mémoire de mon frère Nassim, qui n'est plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis.

J'adresse également à mon soutien moral, intellectuel et source de joie et d'espoir, ma chère sœur **Nassima**. Merci pour les encouragements et l'aide que tu m'as toujours accordé tout au long de ma démarche.

A mes chers Frères **Sofiane & Lamine**, vous m'avez toujours soutenu et encouragée.

A mes adorables nièces **Hiba, Lina, Dania & Lilasse**,

A mes chers amies **Soumia, Sarah, Rawan & Kaouther**

Une pensée très spéciale envers nos collègues et nos amis pour leur soutien moral et leur esprit de groupe, ainsi que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet et qui ont participé à ma réussite.

Et le meilleur pour la fin, à ma copine **Rahma** qui a partagé avec moi des moments de réussite tout au long de mes études universitaires et le chemin de réalisation du mémoire.

Je dédie le fruit de mes 17 ans d'études, que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

« L'amour d'une famille, le centre autour duquel tout gravite et tout brille »

Lamia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail ;

A la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur ; ma mère *Nora*

À mon très cher père *Hakim*, tu as toujours été pour moi un exemple de père respectueux, honnête, grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

À mes chères Sœurs *Insaf* et *Manar* et mes chères tantes et surtout *Roumaïssa*, avec qui j'ai partagée toutes mes peines avant mes joies, et tous mes souvenirs, vous avez toujours été à mes côtés.

À mes chers frères *Abdrahaman* et *Hamza*, merci pour vos encouragements et votre croyance en moi.

A ma sœur, mon amie, et mon binôme, avec qui j'ai partagé tout mon temps, tous mes souvenirs et toutes les difficultés.

A la famille *LABOUHJ*, vous m'avez toujours traité comme votre fille, j'ai eu l'honneur de vous rejoindre

A mes oncles, à mes cousines et cousins que j'aime et à toute ma famille.

A ceux qui ont toujours eu une pensée pour moi

Rahma

Table des matières

Table des matières	I
Liste des abréviations.....	III
Liste des figures	IV
Liste des tableaux.....	V
Introduction.....	1
Chapitre I <i>Synthèse Bibliographique</i>	3
1-Diversité des environnements salins	3
1-1-Environnements thalassohalins	3
1-2-Environnements atalassohalins	3
1-3-Sols salés	4
2-Diversité des extremophiles	4
2-1. Les thermophiles et hyperthermophiles.....	4
2-2. Les psychophyles	5
2-3- Les acidophiles et alcaliphiles.....	5
2-4 Les piézophiles (Barophiles)	6
2-5 Les halophiles :	6
2-6- Les polyextremophiles	8
2-7 Mécanismes d'adaptation des halophiles	10
3- Biotechnologies des halophiles	10
3-1-Production d'enzymes	10
3-1-1 Les protéases	11
3-1-2 Les amylases	11
3-1-3 Les Cellulases.....	12
3-1-4 Les estérases et lécithinases	12
3-1-5 Les nucléases H.....	13
3-2 Les solutés compatibles	13
3-3 Bactériorhodopsine	14
3-4 Fermentation des aliments	14
3-5 Production des biosurfactants	15
3-6 Production des biopolymères	15
3-7 Production de substances antibactériennes.....	16

Liste des abréviations

Br :milieu de culture Brown

pH :potentiel d'Hydrogène

rpm/ min :rotation par minute

Hrr :Halorubrum

SC :Surnageant de Culture

CMC : CarboxyMéthyl Cellulose

Na Cl : Chlorure de sodium

KCl : Chlorure de potassium

H : Heure

ml : millilitre

mm :millimètre

µl :microlitre

v/v :volume /volume

p/v :poids / volume

TCA : acide Trichloracétique

nm : nanomètre

Trs/min : tours par minutes

Liste des figures

Figure 1: Habitats thalassohalins	3
Figure 2: Habitats thalassohalins.	3
Figure 3: Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifié par un code couleur	9
Figure 4: Aspects macroscopique et microscopique pléomorphe de l'isolat <i>Halorubrum litoreum</i> (images DIC).	18
Figure 5: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	24
Figure 6: Schéma résumant de test de sensibilité à une enzyme protéolytique réalisé par la méthode des spots.	25
Figure 7: Aspect macroscopique de la souche <i>Hrr. litoreum</i> JCM13561T réactivée sur milieu solide.....	28
Figure 8: Préculture sur milieu liquide	28
Figure 9: Activités caséolytique observée aux différentes températures.....	29
Figure 10: Activités de la gélatinase observée aux différentes températures	30
Figure 11: Activité amylolytique observée aux différentes températures	31
Figure 12: Activité estérasique observée aux différentes températures.	31
Figure 13: Activité cellulolytique observée aux différentes températures	32
Figure 14: Résultats de l'activité exo enzymatique après traitement thermique	35
Figure 15: Activité caseolytique observée aux différentes teneurs en sel	36
Figure 16: Activité de la gélatinase observée aux différentes teneurs en sel.	37
Figure 17: Activité amylolytique observée aux différentes teneurs en sel.	38
Figure 18: Activité cellulolytique observée aux différentes teneurs en sel	40
Figure 19 : Activité estérasique observée aux différentes teneurs en sel.	40
Figure 20 : Activité caséolytique observée aux différents pH.....	42
Figure 21: Activité de la gelatinase observée aux différents pH.	42
Figure 22: Activité amylolytique observée aux différents pH.....	43
Figure 23: Activité esterasiqie observée aux différents pH.	44
Figure 24: Activité cellulolytique observée aux différents pH.....	44
Figure 25: Résultats du test de sensibilité a la pepsine.....	45

Liste des tableaux

Tableau 1: Conditions extrêmes et microorganismes appropriés.	7
Tableau 2: Différents intervalles des paramètres testés.	22
Tableau 3: Influence de la température sur les activités exozymatiques de l' <i>Halorubrum</i>	29
Tableau 4: Résultats de certaines activités exo enzymatique après traitement thermique .	33
Tableau 5: Influence de la salinité sur les activités exozymatiques de l' <i>Hrr</i>	35
Tableau 6: Influence du pH sur les activités exozymatiques de l' <i>Hrr</i>	41

Introduction

Introduction

Au cours de l'évolution de la terre accompagnée de changements géophysiques et climatiques, un certain nombre d'écosystèmes se sont formés. Ces écosystèmes se différencient par la grande variété des facteurs physicochimiques (pH, température et salinité...) ou biologiques composant notre environnement. Traditionnellement, le pH et la salinité sont considérés comme des extrêmes géochimiques, par opposition la température, la pression et le rayonnement qui sont appelés extrêmes physiques (**Burg,2003 in Pikuta et al.,2007**).

Les écosystèmes qui renferment des paramètres physico-chimiques extrêmes :pH<5 ou >9 ; pression >20 MPa, et température >50 C° ou <10 C°, et des concentrations en sels >3 – 4% NaCl jusqu'à saturation 35% en NaCl conduisant à une spécialisation ou une diminution de la biodiversité sont appelés des environnements extrêmes(**Fardeau et al.,2009**).

Est-il possible qu'une variété d'organismes peut exister dans ces environnements ?

Étant donné que la majeure partie de la surface de la terre >80% est couverte par ces environnements, il n'est pas surprenant qu'une grande diversité d'organismes (par ex des animaux, plantes, insectes champignons et bactéries) soient capables de coloniser, survivre et de proliférer dans ces environnements extrêmes (**Miko,2019**).

Une vie microbienne peut-elle proliférer dans des conditions diverses ?

Au cours des dernières décennies les scientifiques ont été intrigués par les organismes fascinants qui peuplent les environnements extrêmes (**Rampelotte,2013**). La vie microbienne ne se limite pas à des environnements spécifiques. Il est donc devenu clair que les communautés microbiennes existent dans des conditions les plus diverses (**Burg,2003**). Les environnements extrêmes contiennent des conditions auxquelles il est difficile de survivre dans la plupart des formes de vie. Ces conditions comprennent des milieux naturels : déserts, roches hyper arides, fonds océaniques, lacs salés et volcans (**Jorquera,2019**).

Les environnements considérés par l'homme comme extrêmes en termes de température, de pression, de pH et de salinité sont souvent colonisés par des micro-organismes, auxquels

on a donné le nom d'extrémophiles. Ces derniers, bien adaptés à ces conditions physico-chimiques particulières, sont capables d'en retirer l'énergie nécessaire pour leur métabolisme et leur croissance (**universalis.fr**).

Au regard de cette biodiversité microbienne et des conditions spécifiques de leur habitat, ces écosystèmes atypiques nous ouvrent de nouveaux horizons vers la biotechnologie.

En effet ; Ces extrémophiles se distinguent par leur bagage enzymatique précieux. Cela s'explique en partie par la demande limitée d'enzymes tolérantes au sel dans la fabrication actuelle ou les procédés connexes (**Kour et al., 2019**).

Molécules essentielles ; les enzymes commandent des milliers de réactions dans les systèmes vivants. Les micro-organismes sélectionnés dans des environnements extrêmes sont devenus des ressources attrayantes pour explorer de nouvelles « extrêmo-enzymes » qui montrent une résistance à la dénaturation et une stabilité thermique exceptionnelle ; mais également une stabilité inhabituelle contre les conditions de solvants alcalins et organiques ; et sont de ce fait de bons candidats pour des applications industrielles.

La présente étude est une continuité d'un travail entrepris en 2019, qui a dévoilé le potentiel de substances bioactives dont est dotée la souche extrême halophile, *Halorubrum litoreum* JCM13561T ; isolée des dépans salés d'Ouargla, en 2018 par **Khallef et al.**

Nous nous focalisons sur l'aspect exo-enzymatique inouï de cette souche, au pouvoir protéolytique ; amylolytique ; cellulolytique et estérasique ; on se fixant comme objectif, la détermination des intervalles de températures de pH et de salinité, qui conditionnent le fonctionnement de ces haloenzymes.

Scindé en trois chapitres, le premier chapitre dresse une synthèse bibliographique sur les milieux extrêmes et l'extrémophile, abordant l'usage en biotechnologie des haloenzymes. Un deuxième chapitre dresse la méthodologie appliquée pour la détermination de ces hydrolases, et un troisième chapitre qui rapporte les résultats obtenus et perspectives envisagées.

Chapitre I

Synthèse

Bibliographique

1-Diversité des environnements salins

1-1-Environnements thalassohalins

Les environnements thalassohalins (du grec thalasso, la mer) ont une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer, avec des proportions cations et d'anion similaires et une prédominance de NaCl(Ventosa et Arahall, 2009). Ce sont des environnements tenant leur origine de l'évaporation des eaux de mer(Oren, 2002).

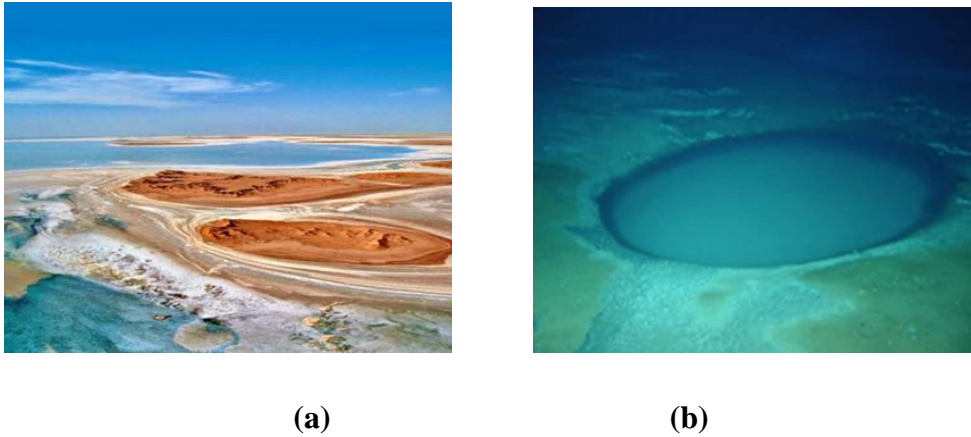


Figure 1: Habitats thalassohalins : Chott Melghir (a) Menasria(2020), Lac de saumure au fond de la Méditerranée Est (b) © Ifermer in Khallef, 2019)

1-2-Environnements atalassohalins

Ce sont des environnements ceux qui proviennent de sources autres que l'eau de mer et contiennent différents rapports d'ions, ces environnements sont dominés par le potassium, de magnésium ou le sodium et sont fréquemment des sources de potasse, de magnésium métal, de soude et même de borax si les eaux étaient riches en bore. Quelques exemples de ceux-ci sont la mer morte, les lacs alcalins de soude d'Égypte par exemple, Wadi Natrun(Litchfield et Gillevet, 2002).

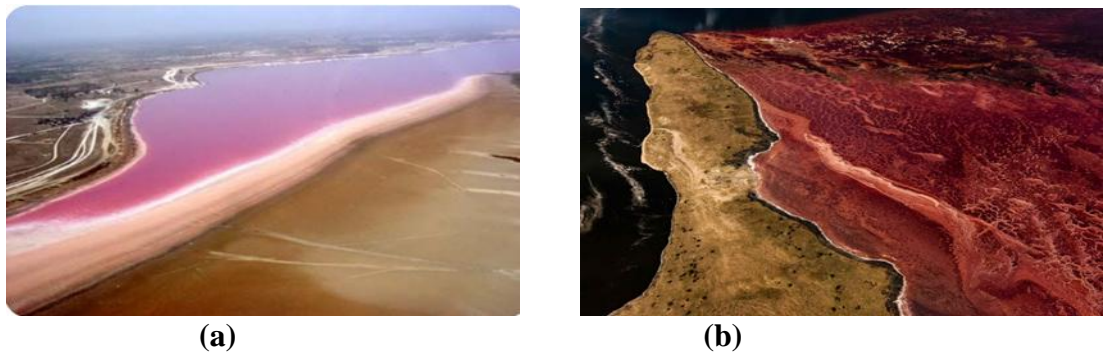


Figure 2: Habitats thalassohalins : Lac rosé au Sénégal (a), Lac Magadi au Kenya(b) (in Khallef, 2019).

1-3-Sols salés

Selon Kaurichev (1980), les sols salés ou sols halomorphes sont caractérisés par une concentration en sels solubles supérieure à 0,2 % (p/v) (Kharroub, 2007).

Ces sols ont une grande extension dans les trois pays du Maghreb. Elle est due aux conditions arides ou semi-arides d'une grande partie de cette région où les possibilités d'évaporation sont considérables et les précipitations pluviales limitées (Aubert, 1975 in Ayad *et al.*, 2011).

2-Diversité des extrémophiles

Les microbiologistes désignent par 'extrémophiles'; les microorganismes qui vivent dans des conditions extrêmes dans lesquelles d'autres formes de vie ne peuvent pas résister. La notion d'extrémophile est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules se développent et fonctionnent de manière optimale dans ces conditions (Alber *et al.*, 2001 in Khallef, 2019).

Les extrémophiles sont classés selon les conditions dans lesquelles ils se développent

2-1.Les thermophiles et hyperthermophiles

Les thermophiles sont des organismes qui se développent mieux à des températures supérieures à 45°C et se retrouvent dans les trois domaines de la vie :bactéries, archées et eucaryotes (Ferrera *et al.*, 2007). Ils habitent les environnements à haute température (Amend *et al.*, 2001) : géothermique terrestre, hydrothermale océanique profonde, pétrolière (Fardeau *et al.*, 2009).

La découverte des bactéries thermophiles est généralement attribuée à Miquel 1888, mais Brewer 1866 les avait déjà décrit *Chlamydobacterales thermophiles* des geysers de Californie. L'étude des microorganismes thermophiles a été déclenchée par la découverte de *Thermus aquaticus*(Brock et Freeze, 1969;Pikuta *et al.*, 2007).

Les thermophiles ont attiré le plus d'attention et sont parmi les plus étudiés, car ils sont considérés comme une source précieuse d'enzymes thermostables(Capasso *et al.*, 2015), la majorité survive au-dessus de 60C° appartiennent aux *Archeae* , qui manquent toujours de paroi cellulaire (Wei-min *et al.*, 2009).Ils peuvent généralement être classés en thermophiles

modérés (optimum de croissance (50-60C°), thermophiles extrêmes (optimum de croissance 60-80C°) et hyperthermophiles qui se distingue souvent des thermophiles autant qu'organismes qui se développent mieux au-dessus 80°C ,optimum de croissance 80C°-110C°)(Gomes et Steiner.,2004).

2-2. Les psychrophiles

La première mention du terme « psychrophile » a été faite par Schmidt-Nielsen en 1902, pour la description de bactéries capables de croître à 0C° (Morita, 1975 in Pikuta *et al.*,2007), On trouve des microorganismes psychrophiles ou psychro tolérants (adapté au froid) dans les environnements à basse températures de la terre y compris les régions polaires, les hautes montagnes, les glaciers, les profondeurs océaniques, les systèmes souterrains peu profonds les grottes.

Ils ont une température optimale de croissance à environ 15C° au moins, une température maximale de croissance à 20C° et une température minimale à 0C° au moins. Ils peuvent être des bactéries ou des archées(Gomes et Steiner.,2004) .

L'espèce halophile *Halorubrum lacusprofundi* a été la première archée détectée de ce genre de milieux extrêmement froid. (Franzmann *et al.*,1988 in Petitjean *et al.*,2013).

2-3- Les acidophiles et alcaliphiles

Des concentrations élevées d'ions hydrogènes (acides) ainsi que des concentrations extrêmement faibles (alcalins) sont toxiques pour la plupart des microorganismes mais pour d'autres organismes ces conditions extrêmes sont considérées comme leur optimum. Ils abritent et tolèrent des extrêmes environnementaux par exemple une variété d'algues, de champignons, de protozoaires et de bactéries peut être isolé des sols acides, des eaux de mine riches en sulfure(Pronk et Johnson,1992).

- Les acidophiles

Les véritables acidophiles sont généralement définis comme les organismes qui se développent de manière optimale à pH de 3 au moins. Le premier véritable acidophile *Acidithiobacillus thiooxidans*, a été décrit en 1922(Wakoman et Joffe1922, in Oren, 2010).Par la suite, des acidophiles lithotrophes ont été trouvés et les espèces hyper

acidophiles du genre *Picrophilus* poussant a des valeurs de pH négatives ont été décrites en 1996(Schleper *et al.*,1996 in Sharma,2016).

Ils se retrouvent généralement dans les environnements à un pH<;4, et sont souvent riche en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...) et metalloïdes. Ils peuvent avoir pour origine des activités volcaniques ;activité auxidative aérobie microbienne (mésophile ou thermophile) (Wei-min *et al.*,2009).

- Les alcaliphiles

Le terme alcaliphiles est utilisé pour les micro-organismes qui se développent de façon optimale a des valeurs de pH ≥ 9.00 , souvent entre 10 et 12, mais elles se croissent lentement à un ph presque neutre de 6.50 (Gomes et Steiner,2004)

Horikoshi est le premier qui a documenté que le genre *Bacillus*sp.(la souche 221) est capable de sécréter des protéase alcalines (Horikoshi.,1971).

2-4 Les piézophiles (Barophiles)

La distribution des micro-organismes influencé par plusieurs paramètres physiques comme déjà mentionné et la pression est parmi les paramètres clé (Bartlett, 2002)

Le terme piézophiles (en grec piézo= pression et philo=aimer) a été introduite officiellement en 1995 pour d'écrire les micro-organismes barophiles (Gregoire, 2019).

Les premier bactéries barophiles ont été isolée en 1979, elles sont définies comme celles ayant une croissance optimale a des pressions supérieures à 40MPa (mégapascal) (Yayanos *et al.*,1979 in Khallef, 2019).

2-5 Les halophiles :

Un micro-organisme halophile est défini de manière opérationnelle comme un organisme qui montre une croissance considérable a des concentrations de sel supérieures à 100g, ils vivent dans des environnements hypersalins (DasSarma et Arora, 2001).Ils se trouvent dans les trois domaines de la vie :*Archeae*, *Bacteria* et *Eucarya*.

L'ordre des *Halobacteriales* avec une seule famille, les *Halobacteriaceae*, est entièrement constitué d'halophiles, où se trouvent les micro-organismes les plus exigeant et tolérants au sel. Les études les plus approfondies ont été faites sur cette famille, qui peuvent être considérées comme des halophiles par excellence en raison de leur dépendance stricte a des concentrations élevées de sel pour la croissance et la stabilité structurale(Oren,1999).

Le tableau ci-dessous ; résumé les conditions sous lesquelles sévient les différents extrémophiles.

Tableau 1: Conditions extrêmes et microorganismes appropriés (Nas *et al.*, 2013 in Khallef, 2019).

Paramètres environnementaux et types de microorganismes	Description des microorganismes
La salinité	
✓ Halotolérants	Croissance sans sel avec tolérance à des concentrations élevées
Légèrement halotolérant	• Tolérance de 6 à 8% (p/v) de NaCl
Halotolérants modérés	• Tolérance de 18 à 20 % (p/v)
Halotolérants extrêmes	• Tolérance de 0% jusqu'à saturation
✓ Halophiles	Nécessitent le sel pour la croissance
Légerement halophiles	• 2 à 5 % NaCl (0.2-0.85M)
Halophiles modérés	• 5-20% NaCl (0.85-3.4M)
Halophiles extrêmes	• 3-15% NaCl (0.5-2.5M)
	• 20-30% NaCl (3.4-5.1M)
	• 15-30% NaCl (2.5-5.1M)
• $\geq 10\%$ NaCl (1.7M)	
✓ Les non halophiles	Nécessitant moins de 2% de NaCl
La température	
Thermophiles	• Optimum aux alentours de 60°C
Hyperthermophiles	• Optimum entre 80-110°C
Psychrophiles	• Optimum $\leq 15^\circ\text{C}$ pas de croissance $\geq 20^\circ\text{C}$
Psychrotrophes	Croissance à $\leq 15^\circ\text{C}$ optimum à $\geq 18^\circ\text{C}$
Le pH	
Les acidophiles	• Optimum à pH égale à 2
Les alcalophiles	• Croissance à pH 9, optimum entre 10-12
La pression	
Piézophiles	• Supportent des pressions $\geq 40\text{MPa}$

2-6- Les polyextremophiles

Les extrémophiles sont généralement définis un extrême, de nombreux environnements naturels présentent deux ou plusieurs extrêmes (**Harrison, 2013**). Pour citer quelques exemples, de nombreuses sources chaudes sont à la fois acides ou alcalines, et généralement riches en métaux et exposé à de fortes pressions. Il est intéressant de noter qu'un nombre croissant d'espèces et de souches isolées de ces environnements tolèrent de multiples extrêmes. De tels organismes sont connus sous le nom de polyextremophiles et peuvent être trouvés dans les trois domaines de la vie : *Archaea* est le principale groupe a proposé dans les environnements extrêmes. (**Garrett, 2007**). L'un des polyextremophiles les plus intéressants est *Halobacterium salinarum* NRC-1.

***Halobacterium salinarum* NRC-1 : un organisme modèle !**

Halobacterium salinarum NRC-1 est une archée halophiles extrême qui croit de manière optimale à 4,3 de NaCl et capable de croitre entre 2,6 et 5,1M (29,8%) de NaCl. (**Leuko, 2009**).

Ce micro-organisme est métaboliquement polyvalent. En plus de sa capacité métabolique aérobie, il possède des capacités de croissance facultative par respiration anaérobie (**Müller, 2005**). *H. salinarum* peut être trouvé dans des environnements hypersalins partout dans le monde, y compris des installations de production de sel, des inclusions de saumure, des mines de sel, ainsi que des lacs et des étangs naturels (**Baxter, 2005 in Cimerman,2005**).

Outre sa capacité à survivre dans des conditions hypersalins(c'est l'une des rares espèces connues pouvant vivre dans des solutions salines saturées) il a adapté à la dessiccation(**Kottemann, 2005**), aux rayonnements ionisants(**De Veaux, 2007**),aux métaux de transition, aux différentes températures(haute pression, limitation d'oxygène et différents régimes de rayonnement UV(**Baliga, 2004**).

Des expériences menées par (**Stan-Lotter et al.,2003**) ont montré que *H.salinarum* NRC-1 est capable de survivre pendant 6heures d'exposition sous une atmosphère martienne simulée(pression de 6mbar,98% de dioxyde de carbone et une température moyenne de -60C°). Une incroyable robustesse et capacité à survivre et à s'adapter à des contraintes environnementales différentes.

H.salinarum est facile à cultiver et à manipuler en laboratoire, ce qui en a fait un excellent organisme modèle dans le domaine *Archaea* pour l'étude de la génétique et des mécanismes d'évolution adaptative (DasSarma, 2006 in Seckbach, 2013)Le génome de cette souche a été le premier génome halobactérien à être entièrement séquencé (Kennedy, 2000 in Seckbach, 2013).

La figure 3 ;donne une idée globale de la diversité phylogénétique des extremophiles qui peuvent être trouvés dans les trois domaines Archaea, Bacteria et Eukarya ; suivant le profil de résistance qu'ils affichent(Quillaguamán *et al.*, 2010).

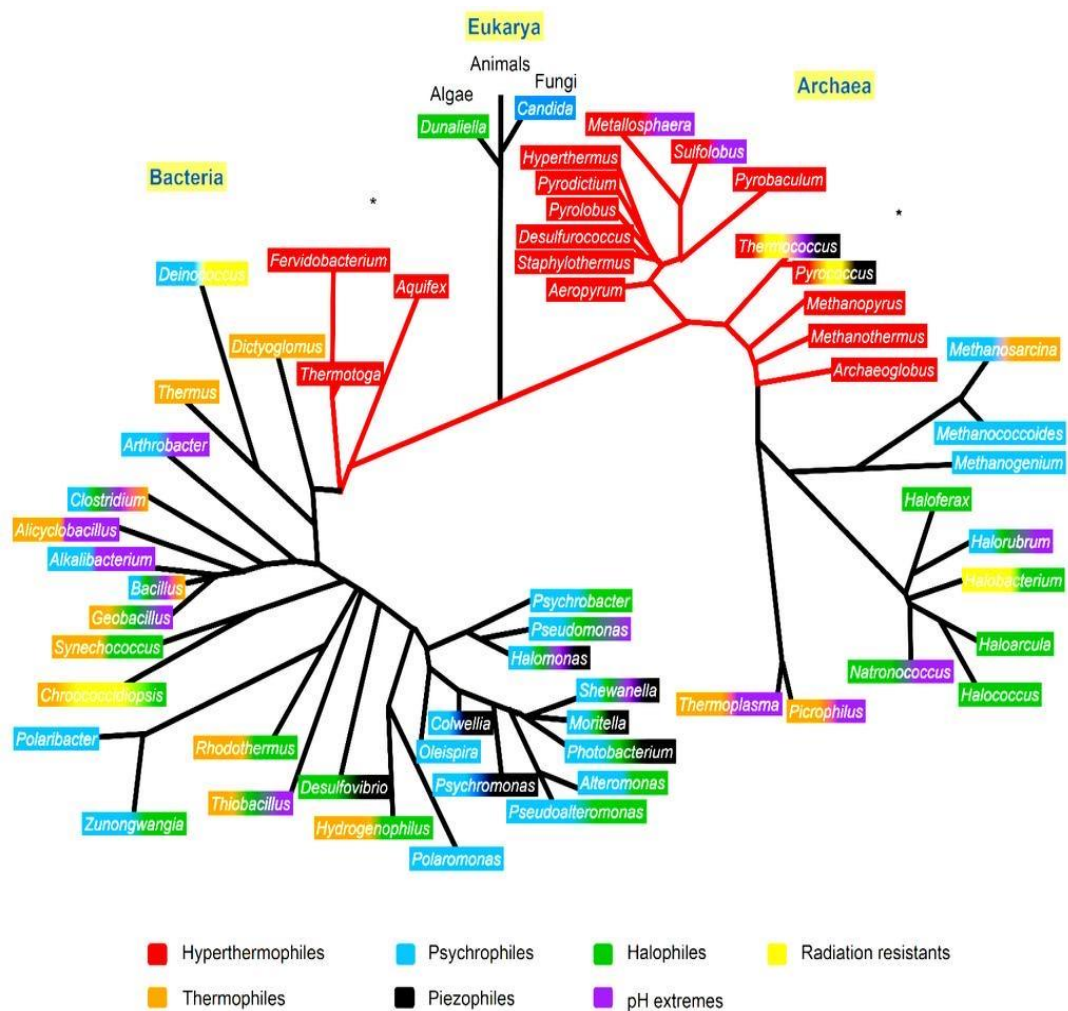


Figure 3: Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifié par un code couleur (Dalmaso *et al.*, 2015 in Djinni, 2017).

2-7 Mécanismes d'adaptation des halophiles

Afin de prévenir la plasmolyse, les cellules des micro-organismes halophiles doivent garantir l'équilibre osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, c'est-à-dire maintenir un environnement intracellulaire au moins isoosmotique avec les sels du milieu extérieur (Oren, 2006). Les halophiles ont développé deux différentes stratégies d'adaptation :

L'accumulation de sels dans le cytoplasme à des concentrations égales à celles du milieu extérieur. Généralement, le KCl est utilisé comme principal sel intracellulaire. Cette stratégie nécessite une adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire, les protéines interagissent avec les ions de chlorure et de sodium pour former des ponts en sel. Cette stratégie est utilisée par deux groupes phylogénétiquement non apparentés : Les Archaea halophiles aérobies (famille *Halobacteriaceae*) et un petit groupe de bactéries halophiles anaérobies.

L'exclusion des sels du cytoplasme et l'accumulation de solutés organiques 'compatibles' (Oren, 2001) ou extrêmolytes qui sont des composés organiques solubles synthétisés par les extrêmophiles pour protéger leurs constituants cellulaires des conditions environnementales. Les archées produisent une grande diversité d'extrêmolytes originaux aux applications nombreuses : stabilisation des enzymes, protection des protéines et des anticorps, protection contre les dommages congélation/ décongélation, etc. Le plus connu est l'ectoïne, produite industriellement à partir des halophiles (Biotechnologie des archées (Querellou, 2010).

Cette stratégie est utilisée par les eucaryotes halophiles et halotolérants ainsi que la plupart des bactéries nécessitant du sel et tolérantes au sel, et aussi par des Archées méthanogènes halophiles.

3- Biotechnologies des halophiles

3-1-Production d'enzymes

Les extrêmophiles sont une source d'enzymes connues sous le nom d'extrêmozymes. Une extrêmozyme est une enzyme, souvent élaborée par les archées et d'autres microbes extrêmophiles, qui peut fonctionner dans des environnements extrêmes (Kour *et al.*, 2019), comme les amylases, les cellulases, les lipases, les estérases, les protéases, les pullulanases et les xylanases (Kamekura et Enache, 2010 in Patil, 2018). Les profils de stabilité et d'activité de ces enzymes sont variés, faisant des enzymes halophiles une denrée précieuse dans l'industrie biotechnologique. Outre la stabilité dans une large gamme de pH et de température, si une enzyme est stable/active en présence de sel, cette nouvelle

caractéristique élargit l'utilité des enzymes hydrolytiques halophiles dans diverses applications en biotechnologie (**Mokashe et al., 2018**).

3-1-1 Les protéases

Les protéases hydrolysent les protéines en libérant des peptides plus petits, selon la nature de leur site catalytique elles sont classées en trois groupes : sérine-, cystéine- ou métallo protéases (**Rambaud et al., 2004**).

Les protéases halotolérantes sont connues comme l'un des groupes importants d'enzymes qui ont été largement utilisées dans diverses industries (**Amid et al., 2017**).

Elles sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, pharmaceutiques et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (**Amoozegar et al., 2007 in Karbalaei-Heidari et al., 2009**).

3-1-2 Les amylases

Les amylases (EC.3.2.1.x) ; sont des macromolécules appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases de la classe des hydrolases qui agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. Elles catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables. Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie actuelle (**Gupta et al., 2003**). Cette classe d'enzymes a constitué en 2007, environ 25 à 33% du marché mondial (**Saxena et al., 2007**).

Les amylases sont largement utilisées dans différentes applications biotechnologiques, à savoir l'industrie alimentaire, où elles sont largement utilisées dans l'industrie du pain et de la boulangerie pour améliorer le volume de la pâte. Elles sont également appliquées dans l'industrie des détergents pour favoriser l'élimination des taches et sont utilisées dans l'industrie du papier et la pulpe pour la modification des amidons pour le papier enduit (**Setati, 2010**).

3-1-3 Les Cellulases

Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons β -osidiques entre les résidus glycosyliques (Lynd *et al.*, 2002).

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman *et al.*, 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha *et al.*, 1994). Les cellulases sont principalement utilisées dans l'industrie textile pour le bioblanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pour ramollir les tissus (Aygan et Arikan, 2008). L'intérêt aux cellulases augmente également dans la production du bioéthanol comme les enzymes qui sont employées pour hydrolyser les matériaux cellulosiques prétraités pour les sucres fermentescibles (Wang *et al.*, 2009). Des cellulases halophiles dérivées de *Bacillus* sp. (Aygan *et al.*, 2008) et de *Salinivibrio* sp. (Wang *et al.*, 2009) ont été caractérisées. Elles sont thermostables et également stables à l'alcalinité et à la salinité ce qui fait d'elles des candidats idéaux pour différentes applications industrielles.

Des cellulases produites par des bactéries halophiles et halotolérantes appartenant aux espèces *Bacillus* sp., *Salinivibrio* sp., *Halomonas* sp. Ont été caractérisées (Yin *et al.*, 2015). Les microorganismes aérobies, thermophiles et cellulolytiques comprennent plusieurs espèces de champignons et quelques espèces de bactéries filamenteuses appartenant à la famille des *Actinomycetaceae*. La plupart des cellulases utilisées à des fins industrielles proviennent de champignons filamenteux tels que *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* et *Phanerochaete*. Parmi les bactéries thermophiles et aérobies, seuls quelques actinomycètes sont activement cellulolytiques, principalement *Thermomonosporacurvata* et *Thermoactinomyces cellulosa* (Kour *et al.*, 2019). Ces enzymes thermostables, halostables et alcalostables, sont des candidats idéaux pour diverses applications industrielles favorables aux industries du textile et de l'alimentation (Setati, 2010, in Yin *et al.*, 2015).

3-1-4 Les estérases et lécithinases

Les estérases (EC 3.1.1.X), catalysent l'hydrolyse des esters dans un acide ou un alcool, et la synthèse des liaisons ester. Les lipases (E.C. 3.1.1.3), sont des hydrolases d'ester carboxylique du groupe d'enzymes estérases, catalysent le clivage et la formation

d'acylglycérols à longue chaîne. Les lipases sont produites par des microorganismes différents, comme les eucaryotes et les procaryotes ; et sont principalement actives contre les substrats insolubles dans l'eau. Leur capacité à effectuer une transformation chimique ou biologique très spécifique les a rendus de plus en plus intéressantes dans les industries alimentaires, détergents, papiers, cosmétiques, synthèse organique, agrochimiques, carburants et pharmaceutiques ainsi que dans la lutte contre la pollution. En gestion environnementale, les lipases adaptées au froid présentent un grand potentiel dans le domaine du traitement des eaux usées. L'activité des enzymes lipolytiques a été signalée chez plusieurs espèces du genre *Bacillus* à savoir: *B. halodurans*, *B. alcalophilus* et *B.licheniformis* isolées à partir d'un lac de soude alcalin kényien (**Calimlioglu et Arga., 2014**). Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les chaînes carbonées courtes (**Raddadi et al., 2015**). Certaines de ces enzymes présentent des activités optimales à des concentrations en NaCl de 30 à 300 g/L, de pH entre 8 et 9 et des températures de 40 à 60°C (**Litchfield, 2011**).L'intérêt biotechnologique de ces enzymes a été mieux étudié chez les bactéries halophiles (**Ozcan et al.,2009 in Litchfiel., 2011**), des espèces appartenant aux genres *Marinobacter*, *Halomonas*, *Chromohalobacter* et *Geomicrobium* se sont révélées être de puissants producteurs de lipases(**Kumar et al., 2012**).

3-1-5Les nucléases H

Nucléase H de *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*, est appliqué dans la production industrielle de 5-acide guanylique (5 -GMP) pour la dégradation de l'ARN. Cette enzyme est active à 12 % de sel et 60° C. (**Mohammadipanah et al., 2015**).

3-2 Les solutés compatibles

Une grande variété de solutés compatibles produites et accumulées dans le cytoplasme des halophiles a été identifiée dans le monde microbien. Les mieux connus sont la glycine bêtaïne, les sucres simples tels que le sucrose et le tréhalose, et différents dérivés d'acides aminés. Certains de ces solutés osmotiques ont trouvé des applications en biotechnologie (**Lentzen et Schwarz., 2006**), telle que l'ectoïne (l'acide1,4,5,6-tétrahydro-2-méthyle-4-pyrimidine carboxylique). Ces molécules ont une forte action stabilisante sur beaucoup d'enzymes labiles in vitro par augmentation de la durée de vie et de l'activité des préparations enzymatiques. Cette fonction sert de base à la production commerciale

d'ectoïne à partir d'*Halomonaselongata* et l'hydroxyectoïne à partir de *Marinococcus* M 52 (Nagata *et al.*, 2007).

L'ectoïne protège également la peau des altérations causées par les rayonnements ultraviolets d'où son incorporation dans les préparations de certaines crèmes à vocation hydratante (Desmarais *et al.*, 1997 in Van den Burg, 2003). Elle est reconnue pour augmenter les défenses immunitaires des cellules de Langerhans (Beyer *et al.*, 2003 in Buenger et Driller, 2004). L'ectoïne empêche également l'agrégation et la neurotoxicité du β -amyloïde d'Alzheimer (Kanapathipillai *et al.*, 2005).

3-3 Bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine rétinienne de 25-kDa. Cette molécule unique, découverte au début des années 70, est produite par *Halobacterium Salinarum* et par quelques autres représentants des *Halobacteriaceae* (Oesterhelt, 1998). Cette protéine est utile dans la fabrication de biopuces pour la nouvelle génération des ordinateurs. La membrane artificielle capable de convertir la lumière du soleil en électricité peut également être une possibilité technologique (Bullock, 2000).

3-4 Fermentation des aliments

La production de certains aliments fermentés traditionnels en Extrême-Orient, tels que la sauce à poissons et la sauce de soja, implique l'activité d'une variété de micro organismes halophiles et/ou fortement halotolérants (Oren, 2002). Dans certains cas, la concentration en sel pendant le procédé de fermentation est suffisamment haute pour le développement des haloarchées. Les fermentations qui impliquent des concentrations salines faibles permettent généralement le développement des espèces de *Halobacillus*, *Lentibacillus*, *Halomonas* et d'autres genres bactériens (Lopetcharat *et al.*, 2001).

La première archée halophile obtenue à partir de la sauce à poissons ressemblait à *Halobacterium Salinarum* (Thongthai et McGenity, 1992), deux nouvelles espèces, *Halococcus thailandensis* et *Natrinema gari*, ont été également décrites (Tapingkae *et al.*, 2008).

3-5 Production des biosurfactants

Les biosurfactants peuvent être utilisés dans des applications intéressantes comme émulsifiants, épaississants, etc. Les microorganismes halophiles peuvent produire des liposomes qui sont utilisés comme transporteurs de composés en médecine, cosmétologie et des polyhydroxy alcanates pour générer des polymères biodégradables: spécialement, les polysaccharides halophiles tels que les polysaccharides sulfatés produits à partir d'*Halomonas* sp. (Delgado-García *et al.*, 2015).

3-6 Production des biopolymères

Deux types de biopolymères sont synthétisés naturellement par les bactéries et archées halophiles qui offrent de nombreuses opportunités en termes d'applications biotechnologiques, les polyhydroxy alcanates (PHA) et les exopolysaccharides (EPS). Les PHA ;sont des polyesters biodégradables composés d'acides gras hydroxylés, ils sont synthétisés et stockés sous forme d'inclusions lipidiques intracellulaires et utilisés par la cellule en tant que moyen de réserve et source de carbone et d'énergie (Reddy *et al.*, 2003 in Charlesworth et Burns, 2015)

Les PHA sont produits par différentes bactéries halophiles (*Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Kushneria*, *Marinobacter* et *Planomicrobium*) et archées appartenant aux genres *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus*, et *Halobacterium* (Quillaguamán *et al.*, 2010). Les PHA sont dotés de nombreuses propriétés thermoplastiques et biocompatibles, biorésorbables et biodégradables, ce sont des candidats prometteurs offrant une alternative aux polymères thermoplastiques issus de la pétrochimie (Reddy *et al.*, 2003). Les exopolysaccharides (EPS) sont des glucides de haut poids moléculaires sécrétés dans le milieu et constituent une composante importante des polymères extracellulaires entourant la plupart des cellules bactériennes et d'archées. Ils peuvent être étroitement associés à leur surface sous forme de capsule ou bien être largués dans l'environnement. Ces composés assurent des fonctions biologiques, notamment la prévention de la dessiccation, la protection contre les agressions environnementales, l'adhérence aux surfaces. En outre, l'EPS peut séquestrer les substances nutritives de l'environnement, faciliter la formation de biofilms et empêcher l'accès des agents antimicrobiens (Nwodo *et al.*, 2012). Les principaux producteurs d'EPS parmi les bactéries halophiles, appartiennent aux familles d'*Halomonadaceae* et *Alteromonadaceae*, les

espèces types des genres *Salipiger*, *Palleronia* et la cyanobactérie halophile *Aphanotecehalophytica*. Parmi ces polymères on citera notamment : le mauran, produit par *Halomonasmaura*, les polymères produits par *Halomonaseurihalina*, qui gélifient à pH acide et ont un pouvoir émulsifiant élevé (Quesada *et al.*, 2004, in Poli *et al.*, 2011).

3-7 Production de substances antibactériennes

La production par les halobactéries de substances de type bactériocine, appelées halocines ont été signalé pour la première fois par Rodriguez-Valera *et al.* (1982). Jusqu'à présent, seuls trois halogènes ont été purifiés et caractérisés en détail. Deux d'entre eux, les halocins H4 et H6, sont produits par *Haloferaxmediterranei* ATCC 33500 et *Haloferaxgibbonsii* ATCC 33959, respectivement (Torreblanca *et al.*, 1994).

Ces antibiotiques naturels, jouent le rôle d'inhibition de l'antiporteur Na⁺/H⁺ générant une protection contre l'ischémie myocardique et les lésions de reperfusion. Ces composés peuvent être utilisés comme protecteur du myocarde. Ceux-ci ont un rôle à jouer en tant qu'agents de conservation dans les industries alimentaires et du cuir et dans le contrôle des bactéries infectieuses (Delgado-García *et al.*, 2015).

3-8 Synthèse des pigments caroténoïdes et antioxydants

La coloration rouge et orangée développée dans les environnements hypersalins est causée par des micro-organismes halophiles riches en pigments caroténoïdes, notamment *Dunaliella*, riche en β carotène, les *Haloarchaea* (*Halobacterium Salinarum*, *Halobaculum gomorense*, *Haloferaxmediterranei* et *Haloarculamarismortui*), dont le pigment principal est la bactério ruberine, et certaines bactéries halophiles, telles que *Salinibacter ruber*, riche en salinixanthine. Ces pigments sont fortement demandés en tant qu'agents antioxydants (Jehlička *et al.*, 2013 ; Squillaci *et al.*, 2017); utilisées également comme agents de coloration ou additifs alimentaires. Les caroténoïdes les plus explorés sont le β-carotène, α-bacterioruberine, xanthophylles, lycopen, l'astaxantine, la canthaxanthine et salinixanthine. La plupart des caroténoïdes utilisée est d'origine bactérienne (halophile ou non halophile). La culture de l'algue verte *Dunaliella salina* et *Dunaliellabardawil* pour la production de β carotène est la plus grande réussite de la biotechnologie halophile. Le pigment β-carotène est très demandé comme antioxydant, comme source de provitamine A (rétinol) et comme colorant alimentaire (Oren, 2010).

4- L'ordre des Halobacteriales

L'ordre *Halobacteriales* se compose d'un grand groupe de bactéries aérobies qui vivent et se développent dans des environnements hypersalins. Les membres de cet ordre sont les organismes les plus halophiles connus, prospérant dans des environnements 10 fois plus salés que l'eau de mer; par conséquent, collectivement, ils sont appelés les « halophiles extrêmes ».

Une salinité élevée est toxique pour la plupart des cellules, cependant, les halophiles extrêmes nécessitant au moins 1,5 M de NaCl pour leur croissance et 3,5-4,5 M de NaCl pour une croissance optimale (Grant *et al.*, 2001).

Les halophiles extrêmes sont très divers, existant sous forme de cocci, de bâtonnets, de disques plats (*Halococcus*), de carrés (*Haloferax*), de rectangles (*Halobacterium*) et de triangles (*Haloarcula*) (Grant *et al.*, 2001). Ils sont soit Gram-négatifs, soit Gram-positifs, et certains sont mobiles.

La coloration rouge des lacs sodiques hypersalins est due à l'abondance de pigments caroténoïdes présents dans les membranes cellulaires d'autres *halobactéries* (Oren, 1994 ; in André-Denis, 2006).

Halorubrum litoreum

Le genre *Halorubrum* a été officiellement proposé en 1995 pour accueillir *Halorubrum saccharovororum*, *Halorubrum sodomense*, *Halorubrum trapanicum* NRC 34021 et *Halorubrum lacusprofundi*, qui avaient été précédemment classés dans le genre *Halobacterium* (McGenity et Grant, 1995).

Les cellules de la souche *Halorubrum litoreum* " sont mobiles, en forme de bâtonnet (0,3-0,5 x 2,0-5,0 µm) et Gram-négatives ; peuvent se développer sur une large gamme de salinité (2,0-5,1 M NaCl ; croissance à 3,4 M), et entre 25-55°C (Gutiérrez *et al.*, 2008). Donne des colonies rouges sur milieu gélosé au lait salé. La souche *Halorubrum litoreum* utilise le glucose, le galactose et le saccharose, mais pas le mannose, le fructose ou le lactose, comme sources de carbone pour la croissance. Elle réduit le nitrate en nitrite dans des conditions anaérobies, mais ne peut se développer avec le nitrate dans des conditions

anaérobies (Cui *et al.*,2007).Un tableau regroupant certains caractères de cette souche est porté en annexe 1.

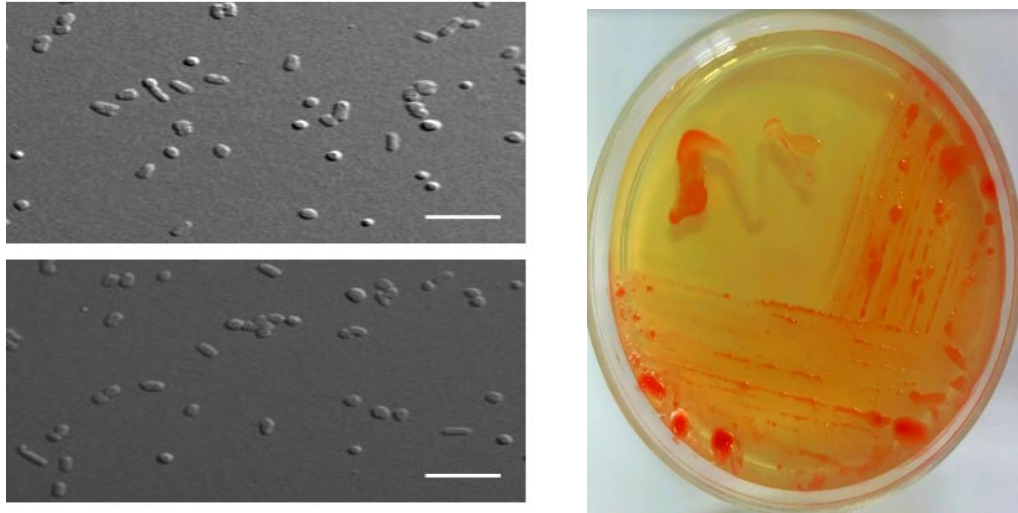


Figure 4: Aspects macroscopique et microscopique pléomorphe de l'isolat *Halorubrum litoreum* (images DIC).(In Khallef, 2019)

Chapitre II
Matériel et
Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du : laboratoire de l'école supérieure normale des enseignants (Ouargla), du laboratoire pédagogique de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV), université kasdi Merbah, du laboratoire de recherche Bioressources Sahariennes (BRS), le centre de recherche et d'analyses Physico-chimiques (CRAPC); ainsi que le laboratoire de la station de surveillance de l'environnement, Ouargla ; sur une période allant de Novembre 2021 à Mai 2022.

Notre étude est une suite de celle menée en 2019, sur une bactérie extrême halophile; qui a révélé la présence d'un potentiel exoenzymatique variée dans son surnageant de culture.

L'objectif du présent travail, est la détermination des intervalles pH; température et salinité des diverses activités catalytiques dont est doté cette halobactérie. L'ensemble du matériel et appareillage utilisé lors de cette recherche est porté en annexe (2).

1-Matériel biologique

Description de la souche

L'halobactérie a été isolée des dépressions salées d'Ouargla, séquencée au niveau du laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) Paris-France par **Khallef *et al.* (2018)**. Il s'agit de l'archaea *Halorubrum litoreum* JCM13561T, identifiée pour la première fois par **Cui *et al.* (2007)**.

2. Méthodes

2.1. Réactivation de la souche

Le milieu de culture Brown (Br) utilisé pour la revivification de la souche halophile répond aux exigences nutritionnelles des micro-organismes halophiles par sa concentration élevée en NaCl, supplémenté de KCl, et d'acides aminés. Ce milieu est préparé et ajusté à pH neutre (7,2) puis autoclavé, sa composition est donnée en annexe (3). La souche purifiée et conservée à 4°C sur gélose inclinée conditionnée en tubes, est incubée 48h à 37°C. Un inoculum de la souche estensemencé par stries à la surface du milieu, qui sera remis 7 jours à l'étuve à 37°C.

2.2. Préculture

50ml du milieu (Br) liquide à 20% de Na Cl (le même milieu ayant servi à leur revivification, sans addition d'agar); sont déposés dans une Erlenmeyer de 250ml; puis inoculés avec le contenu d'une boîte Pétri de la culture de *Hrr.litoreum*. L'incubation est prolongée 7 jours à 37°C, sous une agitation de 150 trs/min (Yang *et al.*, 1992).

3-Détermination des activités exozymatique

La production d'hydrolases est recherchée qualitativement sur milieu (Br) solide modifié par la réduction de la quantité d'extrait de levure à 0,3 g/L (milieu de base) et rajout de polymère test (Oren *et al.*, 1997).

50µl de surnageant de culture (SC), sont déposés à la surface du milieu de culture additionné du polymère test, après séchage des spots, les boîtes sont incubées. Pour chaque substrat testé trois essais sont réalisés. Les variations de la teneur en NaCl des milieux préparés; ainsi que les intervalles des pH et températures expérimentés; sont mentionnés en tableau (3)

Tableau 2: Différents intervalles des paramètres testés.

Facteurs	Intervalles à testés								
	20C°	25C°	30C°	40C°	50C°	60C°	70C°	72C°	75C°
T°C	20C°	25C°	30C°	40C°	50C°	60C°	70C°	72C°	75C°
NaCl%	10%	12%	15%	20%	22.5%	25%	27%	30%	32%
pH	5.00	6.00	6.50	7.20	8.00	9.50	10.50	11.00	/

3.1Détermination de l'activité protéolytique

Hydrolyse de la caséine

Cette recherche suit le protocole indiqué par (Roxana *et al.*, 2009). Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement par la méthode des spots, les boîtes de Pétri sont incubées durant 7 jours. La présence de cette activité est détectée par un halo autour des spots indiquant une hydrolyse de la caséine.

3.2. Hydrolyse de la gélatine

Le (SC) est déposé en spots à la surface du milieu de base supplémenté de 2% (p/v) de gélatine. Après incubation l'hydrolyse est révélée par addition de 1 à 2ml du réactif TCA (10%) en surface afin de mieux observer les zones de lyse, qui indiquent la production d'une gélatinasse (**Kim et Hoppe, 1986**).

3.3. Détermination de l'activité amylolytique

La présence d'une amylase extracellulaire est déterminée par addition de 1% (p/v) d'amidon soluble (**Amoozegar et al., 2007**) au milieu de culture; le produit d'extraction est déposé en spots à la surface e celui-ci. Une fois retirées de l'étuve; les boîtes sont inondées avec une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de spots, inversement, les zones contenant l'amidon se colorent en brun.

3. 4. Détermination de l'activité estérasique

Le milieu additionné de 1% de Tween 80 est préconisé pour la recherche d'estérase (**Gonzalez et al., 1978**). L'ensemencement des souches est effectué par la méthode des spots suivie d'une incubation, l'apparition d'une zone autour des spots ;témoigne de la présence d'une estérase.

3. 5. Détermination de l'activité cellulolytique

La présence d'une cellulase est examinée sur milieu contenant 1% (p/v) de Carboxy Méthyl Cellulose (CMC). Après 7jours d'incubation, les boîtes sont pulvérisées avec une solution de Lugol. L'apparition de zones autour des spots au bout de 10 à 12 minutes indique la présence d'une cellulase.

4. Stabilité thermique des exoenzymes

Pour vérifier la stabilité thermique des exoenzymes produites par notre souche, quelques ml du (SC) sont maintenus 10 min au un bain Marie aux températures 60°C, 70°C , 72°C et 75°C. Après refroidissement, 50µl du (SC) sont déposés à la surface des milieux gélosés contenant les substrats testés précédemment ; suivi d'une incubation de 7 jours à 37°C.

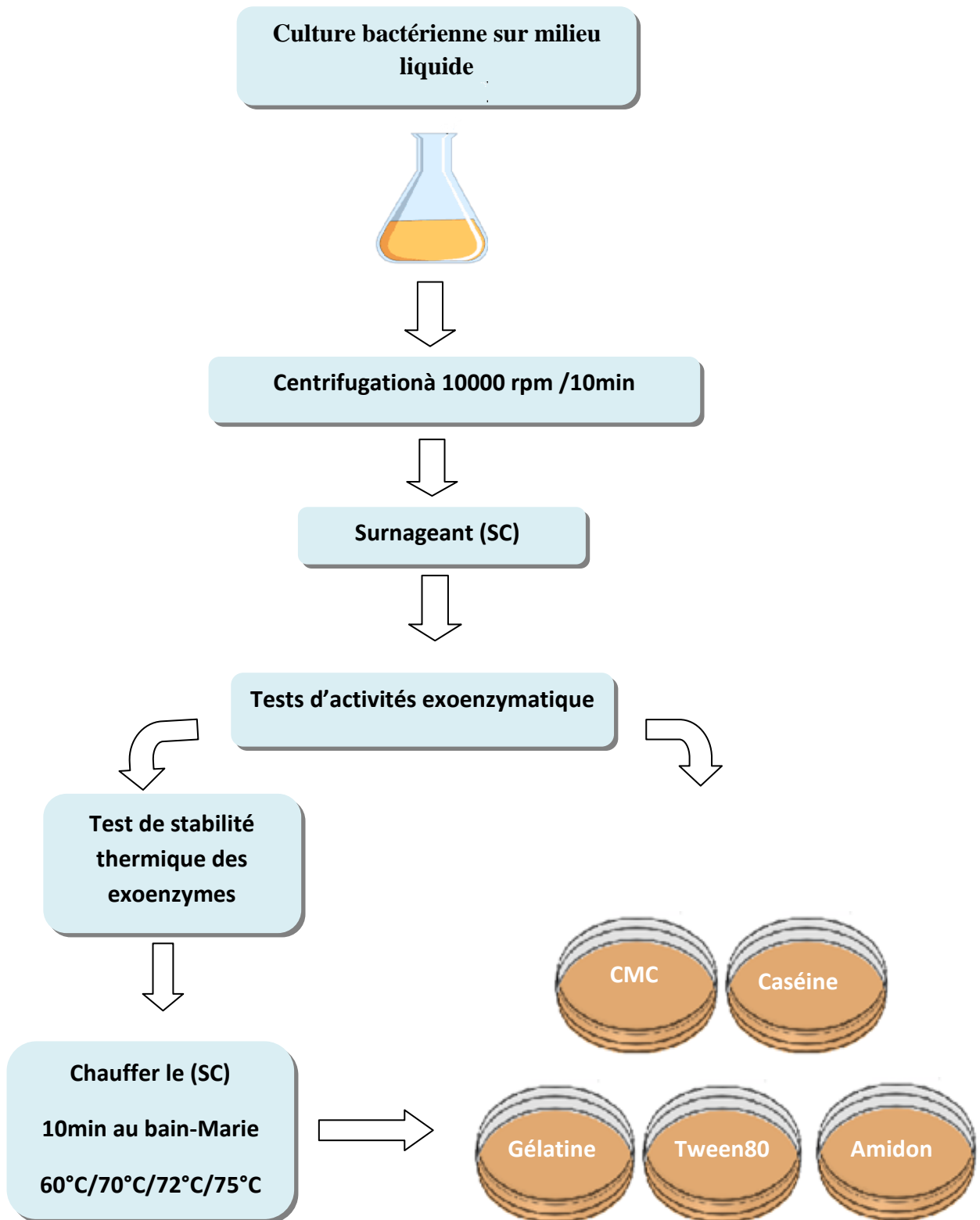


Figure 5: Schéma récapitulatif du protocole expérimental

5- Test de sensibilité à une enzyme protéolytique

La pepsine, enzyme protéolytique utilisée à une concentration de 1mg/ml pour tester la nature des exoenzymes dévoilées par la souche extrême halophile ;car la pepsine a des sites de coupures au niveau des acides aminés neutres (**Florimont, 2012**).

La solution de pepsine est préparée à l'aide d'une solution HCl (0,02M, pH 2) dans laquelle 20 mg de l'enzyme pesée avec une balance de précision sont dissouts dans 10 ml de la solution puis filtrée avec un filtre de 0,22 µm et conservée à +4°C (**Benkerroum et al., 2000**).

Technique

Un mélange de 1ml du (SC) avec 1 ml de la solution pepsine est préparée d'une part; d'autres parts; les milieux (Br) additionnés des différents polymères tests sont coulés et laissé refroidis. Deux spots sont déposés à la surface des milieux solidifiés, l'un chargé de 50ul du (SC); et l'autre du mélange (SC) pepsine comme représenté dans le schéma ci-dessous. Après incubation à 37°C; la lecture est faite par l'apparition de la zone formée autour des puits.

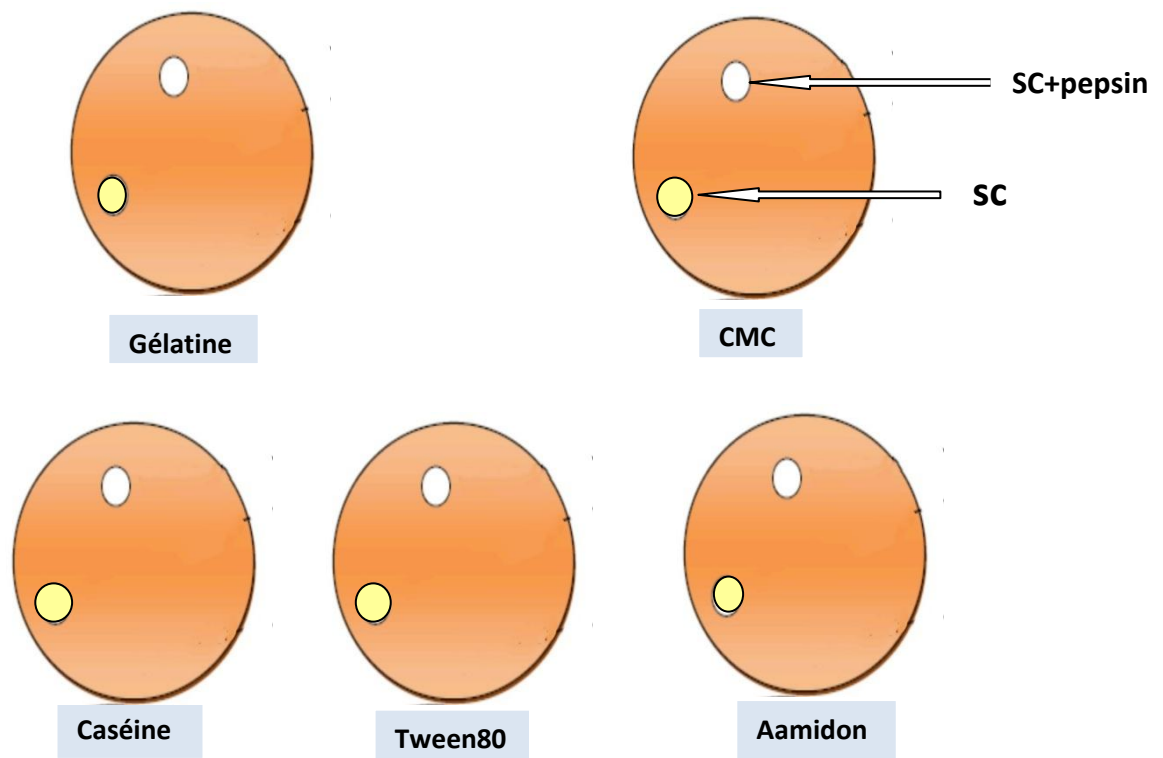


Figure 6: Schéma résumant le test de sensibilité à une enzyme protéolytique réalisé par la méthode des spots

Chapitre III
Résultats et
discussion

1. Revivification de la souche

Au terme de 7 jours d'incubation à 37°C sur milieu solide à 15% de NaCl ; l'halo bactérie donne des colonies bien pigmentées en rouge comme l'illustre la figure ci-dessous.

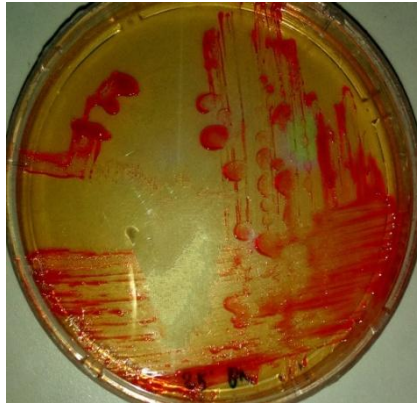


Figure 7: Aspect macroscopique de la souche *Hrr. litoreum* JCM13561T réactivée sur milieu solide

2. Préculture

Le milieu (Br) liquide prend la couleur de la souche rouge ; après 7 jours d'incubation à 37°C sous agitation, signe d'une bonne croissance de l'isolat.



Figure 8: Préculture sur milieu liquide

3. Résultats de la variation des activités lytiques de *Hrr. litoreum*

La méthode des spots appliquée sur milieu (Br) supplémenté par différents substrats, donne des résultats positifs, justifiés par la présence d'un halo observé à l'œil nu ou après l'ajout d'un révélateur spécifique. Tributaires des facteurs physico chimiques (pH, T°) et teneur en sel du milieu ; les activités exo enzymatiques observées chez la souche d'*Hrr.*

Se voient intensifiées ou au contraire minimisées. Nous présentons successivement les différents résultats obtenus.

3.1.Variation des activités exoenzymatiques en fonction de la température

Tableau 3: Influence de la température sur les activités exoenzymatiques de l'*Halorubrum*

T°C testées Substrats	20°C	25°C	30°C	40°C	50°C
Caséine	---	+++	+++	+++	+++
Gélatine	---	---	+++	+++	+++
Amidon	---	+++	+++	+++	+++
*Tween 80	---	---	+++	+++	---
CMC	+++	+++	+++	+++	+++

(+++): Résultat positif (trois répétitions)

(---): Résultat négatif (trois répétitions)

*: Limite Observée à 45°C.

- Variation de l'activité caséolytique

L'activité de la caséinase est relevée entre 25°C à 50°C, avec des zones de lyse fortement pigmentées en rouge précisément à 40°C (Fig.9), température retenue optimale pour cette exo enzyme.

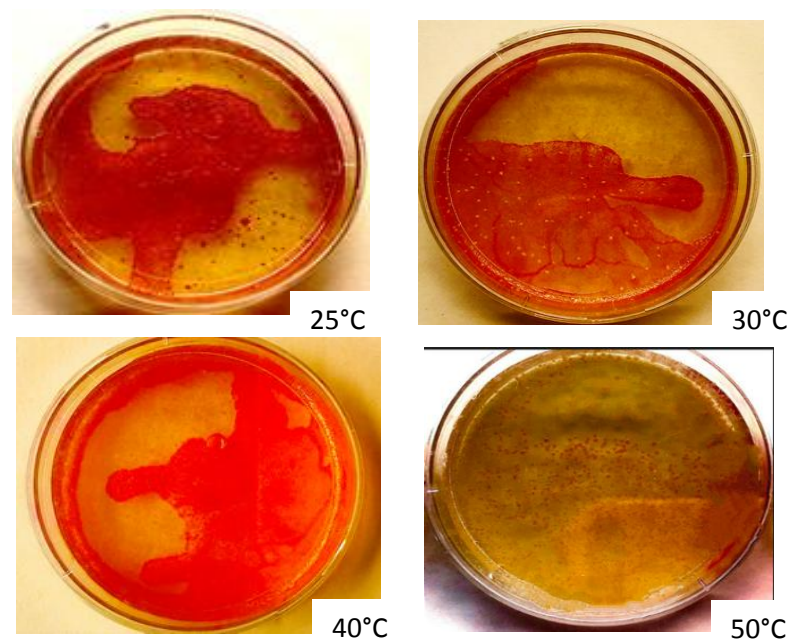


Figure 9: Activités caséolytique observée aux différentes températures

-Variation de l'activité de la gélatinase

Un début d'activité sur milieu à la gélatine s'observe à 30°C (Fig.10); persistante à 50°C; ce qui reflète la capacité de la gélatinase à demeurer active en thermophilie.

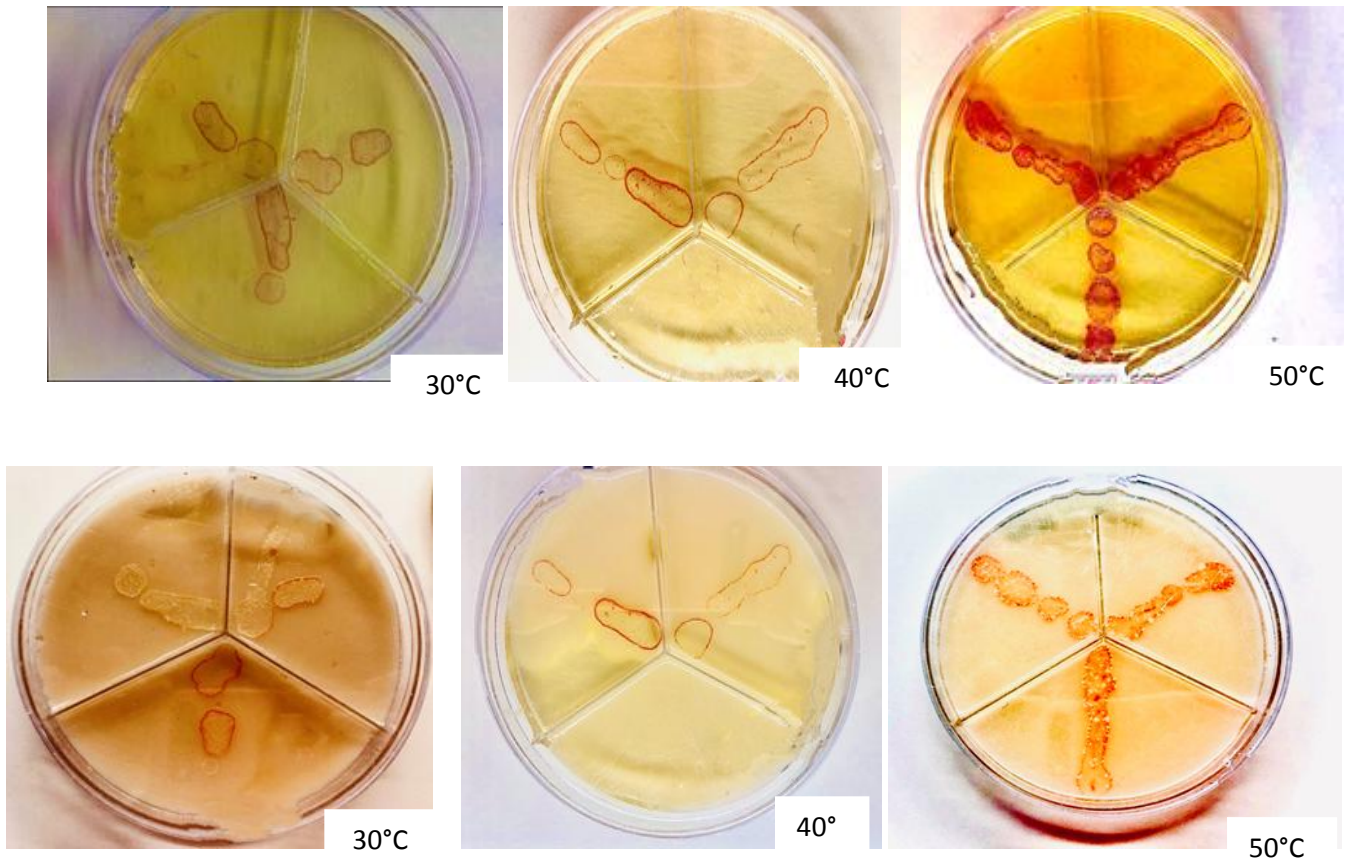


Figure 10: Activités de la gélatinase observée aux différentes températures

-Variation de l'activité amylolytique

Une dégradation de l'amylase est à peine perçue sur milieu incubé à 25°C; cette capacité à dégrader l'amidon s'observe jusqu' à 50°C (Fig.11) et tout comme pour la caséinase s'intensifie à 40°C.

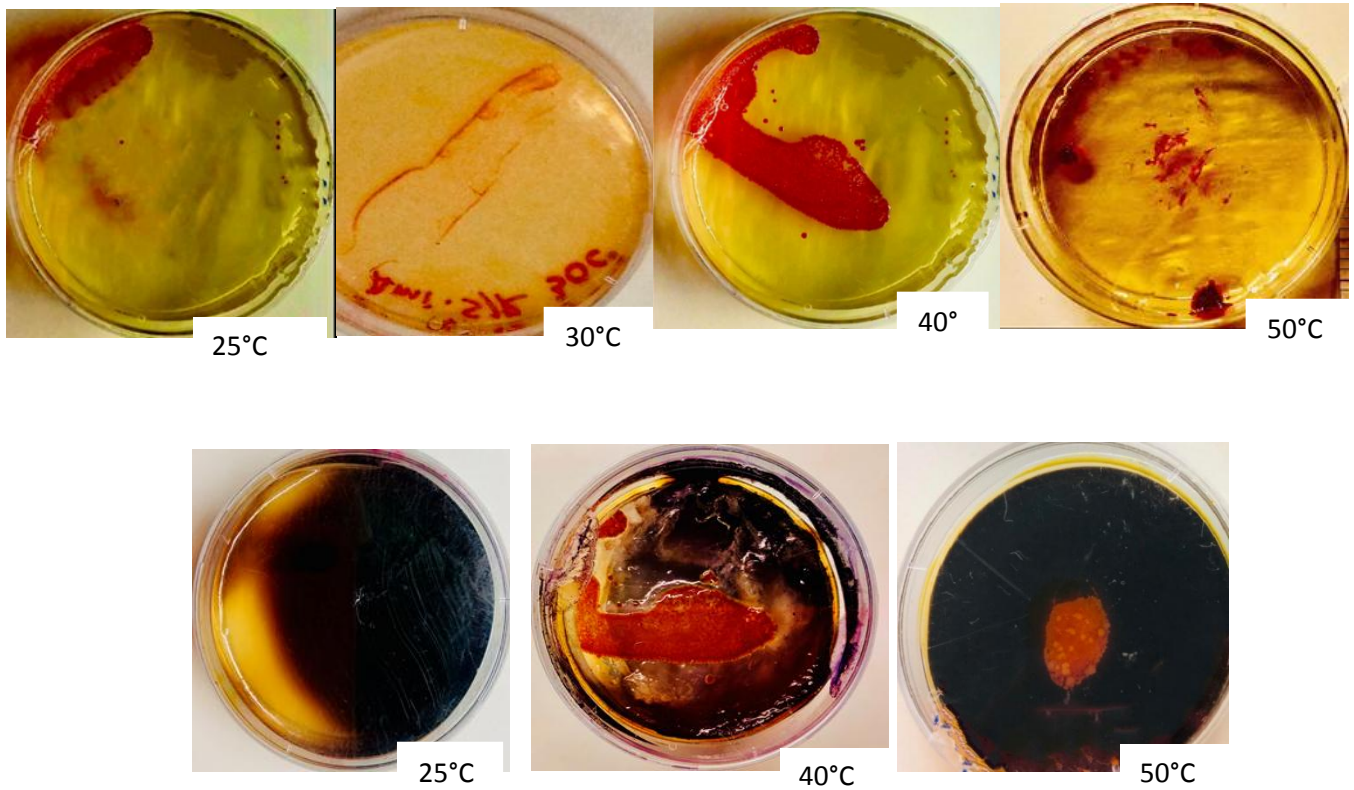


Figure 11: Activité amylolytique observée aux différentes températures (avant et après addition du revelateur)

Variation de l'activité estérasique

Le seuil inférieur pour l'activité de l'estérase est perçu à 30°C (Fig.12); le même seuil retenu pour la gélatinase. Cette activité est maximale à 40°C et se dissipe au-delà de 45°C, avec dépigmentation à la surface du milieu.

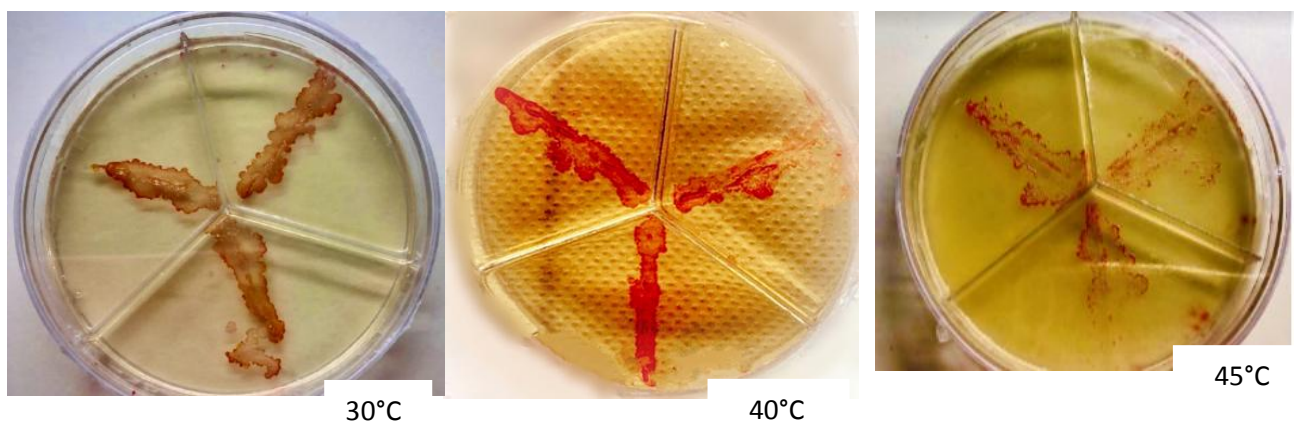
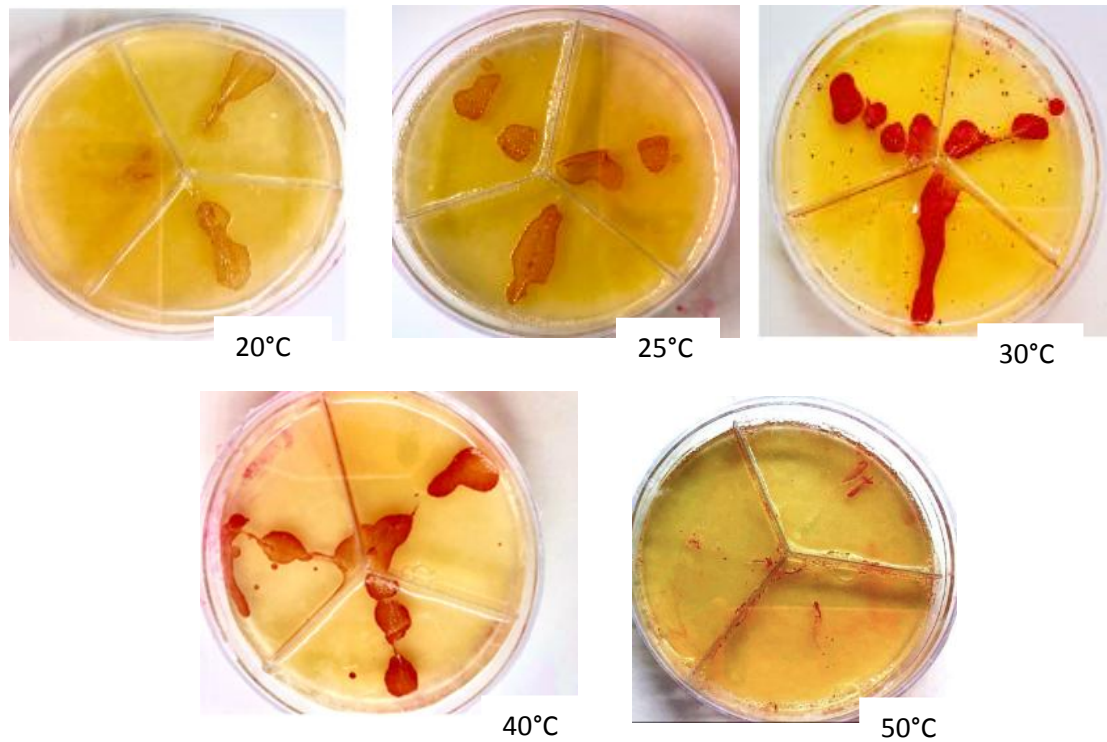


Figure 12: Activité estérasique observée aux différentes températures.

- Variation de l'activité cellulolytique

L'halo archée est dotée d'une cellulase qui se manifeste dans toute la gamme des températures expérimentées (20°C-50°C) ; avec une activité maximale entre 30°C-40°C ;(Fig. 13) ; un profil très recherché en biotechnologie.



Après addition du revelateur

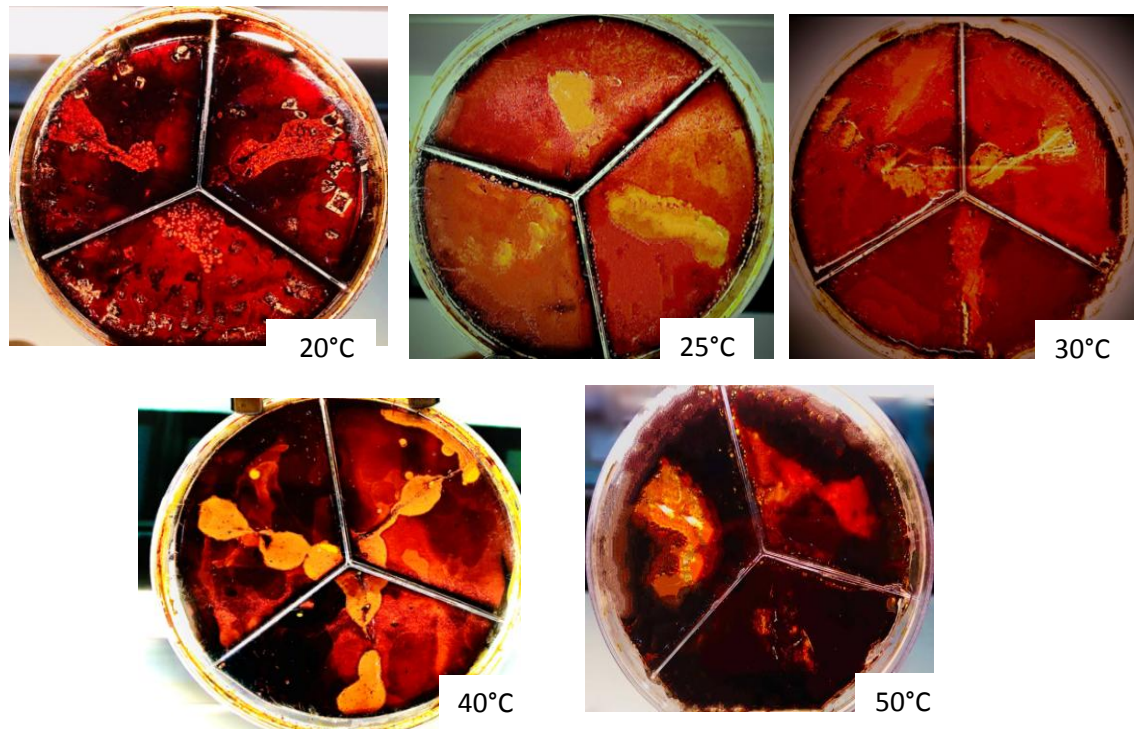


Figure 13: Activité cellulolytique observée aux différentes températures

3.2. Résultats du test de stabilité thermique

Au vu de l'aspect thermo tolérant à thermorésistant que certaines exoenzymes ont affiché, il était intéressant de voir leurs limites maximales en soumettant le (SC) à un chauffage de Les résultats sont mentionnées sur le tableau ci-dessous.

Tableau 4: Résultats de certaines activités exo enzymatique après traitement thermique

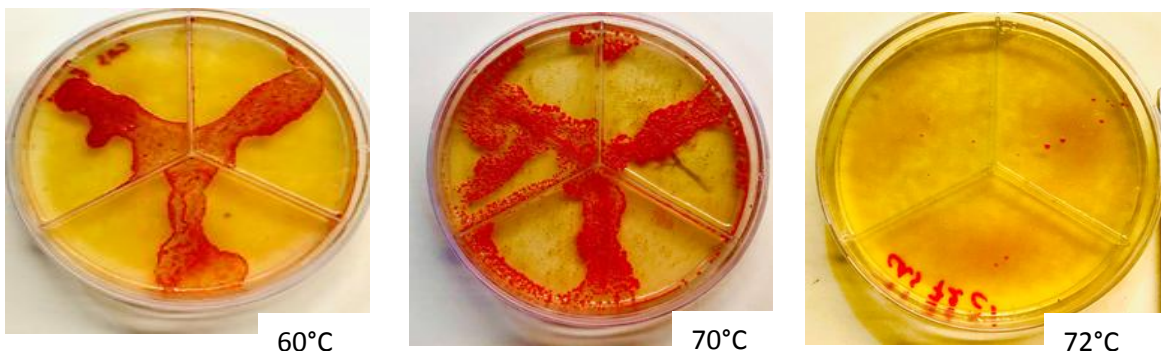
Température appliquée	60°C	70°C	72°C
Caséine	+++	+++	+++
Gélatine	+++	---	---
Amidon	+++	+++	---
CMC	+++	+++	---

(+++): Résultats positifs pour les trois répétitions

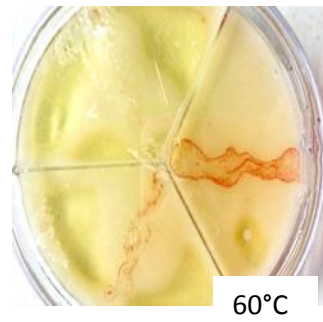
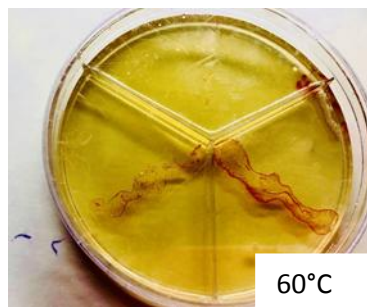
(---): Résultats négatifs pour les trois répétitions

70°C; semble être la limite maximale de stabilité à la chaleur aussi bien pour l'amylase que pour la cellulase; par opposition la gélatinase dont le pouvoir lytique ne s'observe plus au-delà de 60°C ; ou encore la caséinase qui perdure active à 72°C (Fig.14). Avec cette panoplie d'haloenzymes thermorésistantes ; cette souche est exceptionnellement.

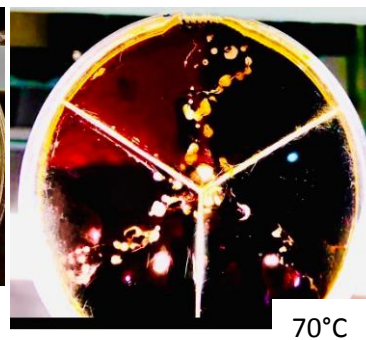
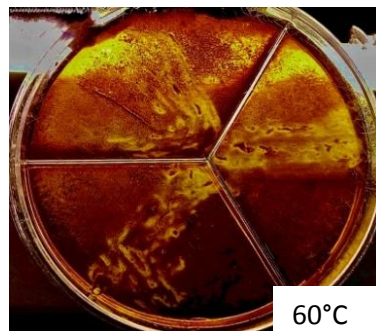
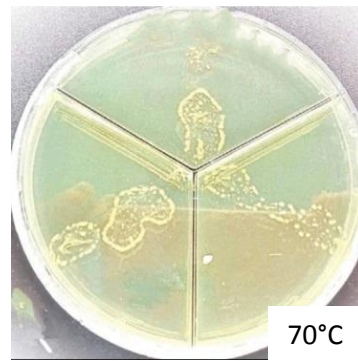
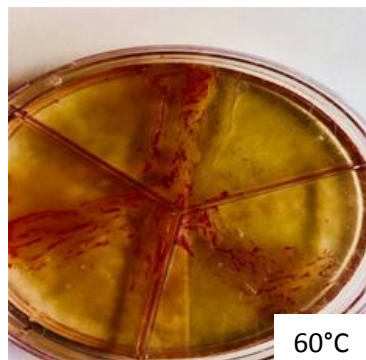
Milieux à la caséine



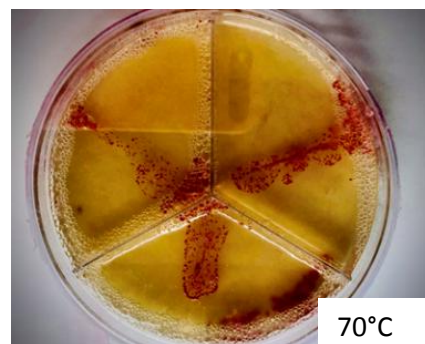
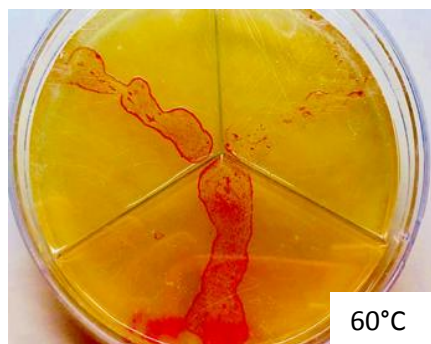
Milieux à la gélatine



Milieux à l'amidon



Milieux à la CMC



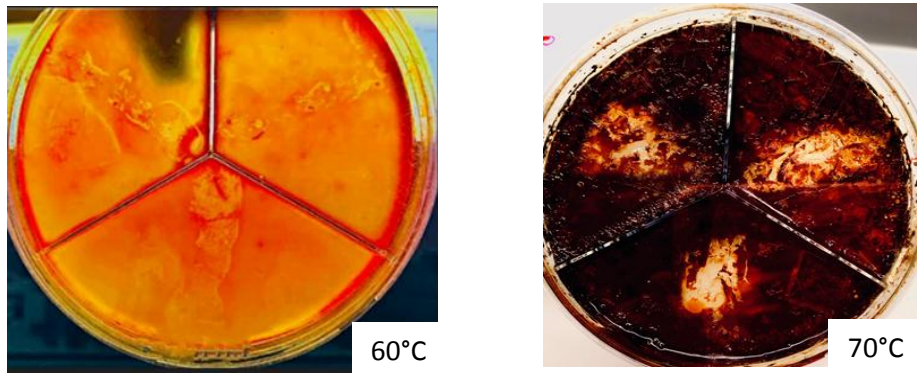


Figure 14: Résultats de l'activité exo enzymatique après traitements thermique

4. Variation des activités exoenzymatiques en fonction de la salinité du milieu

Tableau 5: Influence de la salinité sur les activités exozymatiques de l'*Hrr*.

NaCl%	10%	12%	15%	20%	22.5%	25%	27.5%	30%	32%
Caséine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gélatine	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
Amidon	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
Tween 80	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	---
CMC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(+++): présence d'un halo pour les trois répétitions (résultat positif)

(---): absence d'un halo pour les trois répétitions (résultat négatif).

Les résultats portés sur le tableau ci-dessus; nous renseignent sur la capacité de ces haloenzymes à rester fonctionnelles au dépit des concentrations croissantes du milieu en sel.

-Variation de l'activité caséolytique

La caséinase est l'une des protéines microbiennes les plus répondues et les plus demandées en industrie. Celle de l'halobactérie montre un pouvoir dégradant absolument spectaculaire sur les l'ensemble des milieux supplémentés en sel (**Fig.15**).

En effet ;le seuil minimal de caséolyse est observé à 10% (avec dépigmentation) ; c'est en fait la concentration minimale en sel requise pour la croissance des halophiles extrêmes. L'optimum observé au alentours de 20% à 25% de NaCl et seuil limite à 32%. La figure 15;révèle une caséolyse intense aux concentrations croissantes en sel ; marquant son étroite dépendance du sel.

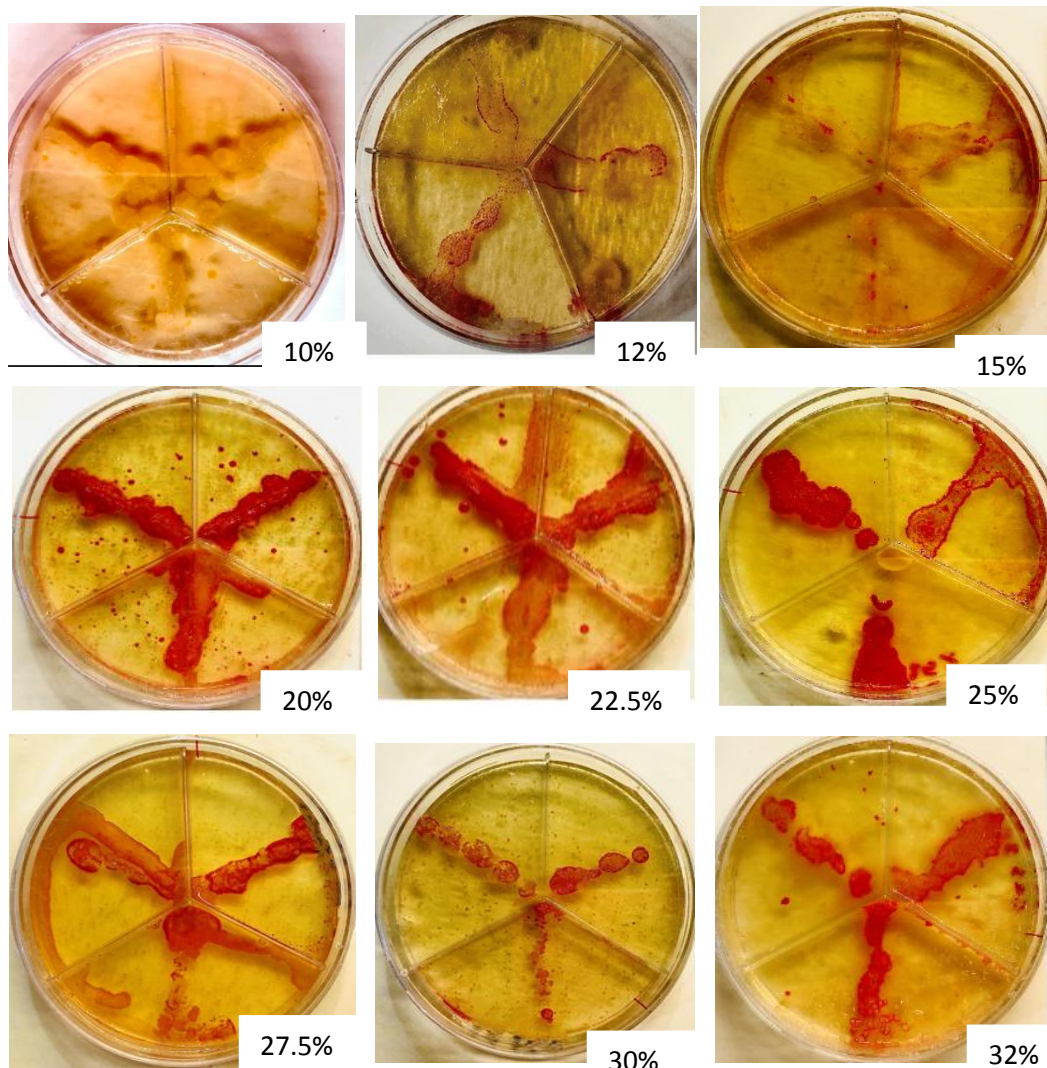
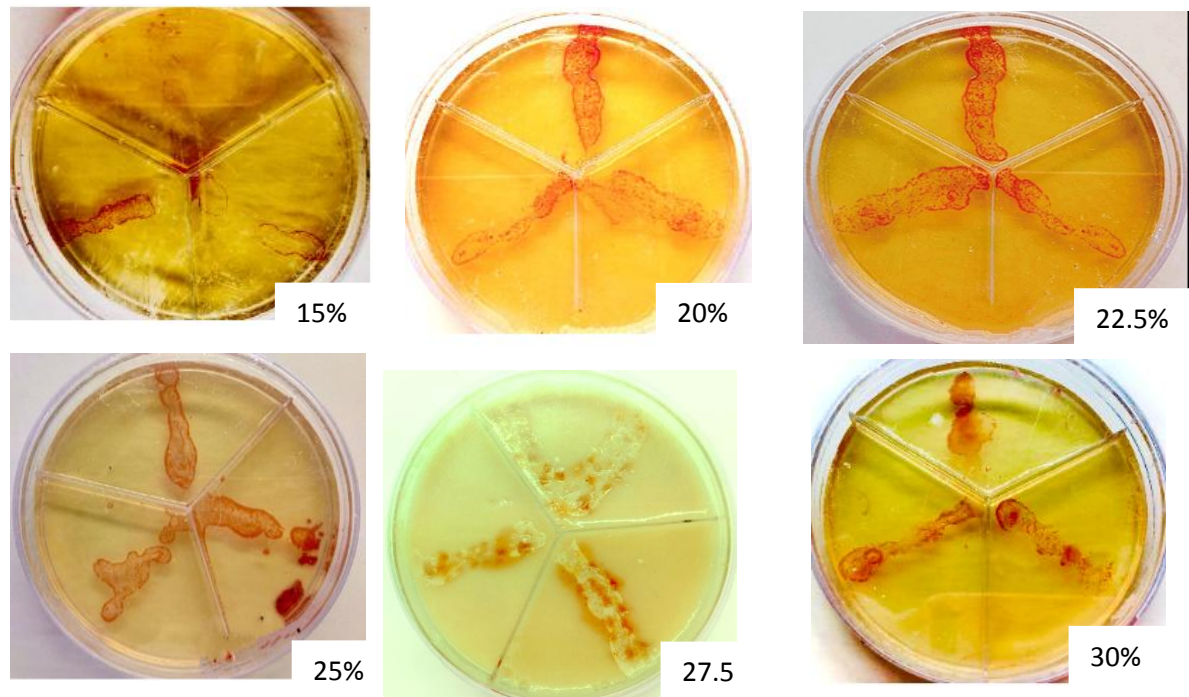


Figure 15: Activité caseolytique observée aux différentes teneurs en sel

-Variation de l'activité de gélatine

Tout aussi présente que la caséinase ; la gélatinase se manifeste sur des milieux supplémentés au minimum avec 15% de NaCl et persiste sur milieux saturés (30%); son optimum observé à 22.5- 27.5%.



Après addition du révélateur

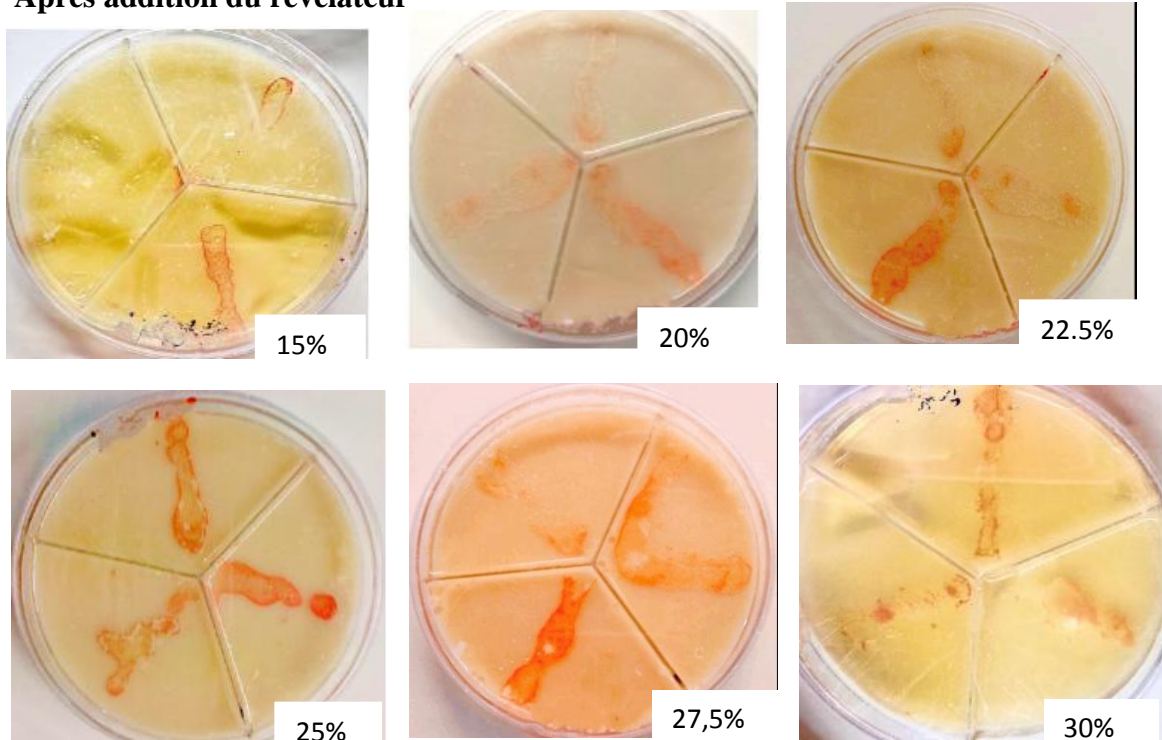


Figure 16: Activité de la gélatinase observée aux différentes teneurs en sel.

-Variation de l'activité amylolytique

Intense ; l'activité amylolytique est vérifiée sur milieux de 10% à 30% de NaCl (Fig.17). On note une dépigmentation sur les milieux 10-12% de NaCl; des concentrations qui ne permettent visiblement pas une activité intense; comme celle relevée sur les milieux chargés en sel. L'addition du révélateur laisse apparaître les zones de lyse de

l'amidon clairs (autour des spots) ; comparés au reste du milieu contenant l'amidon ; qui reste sombre.

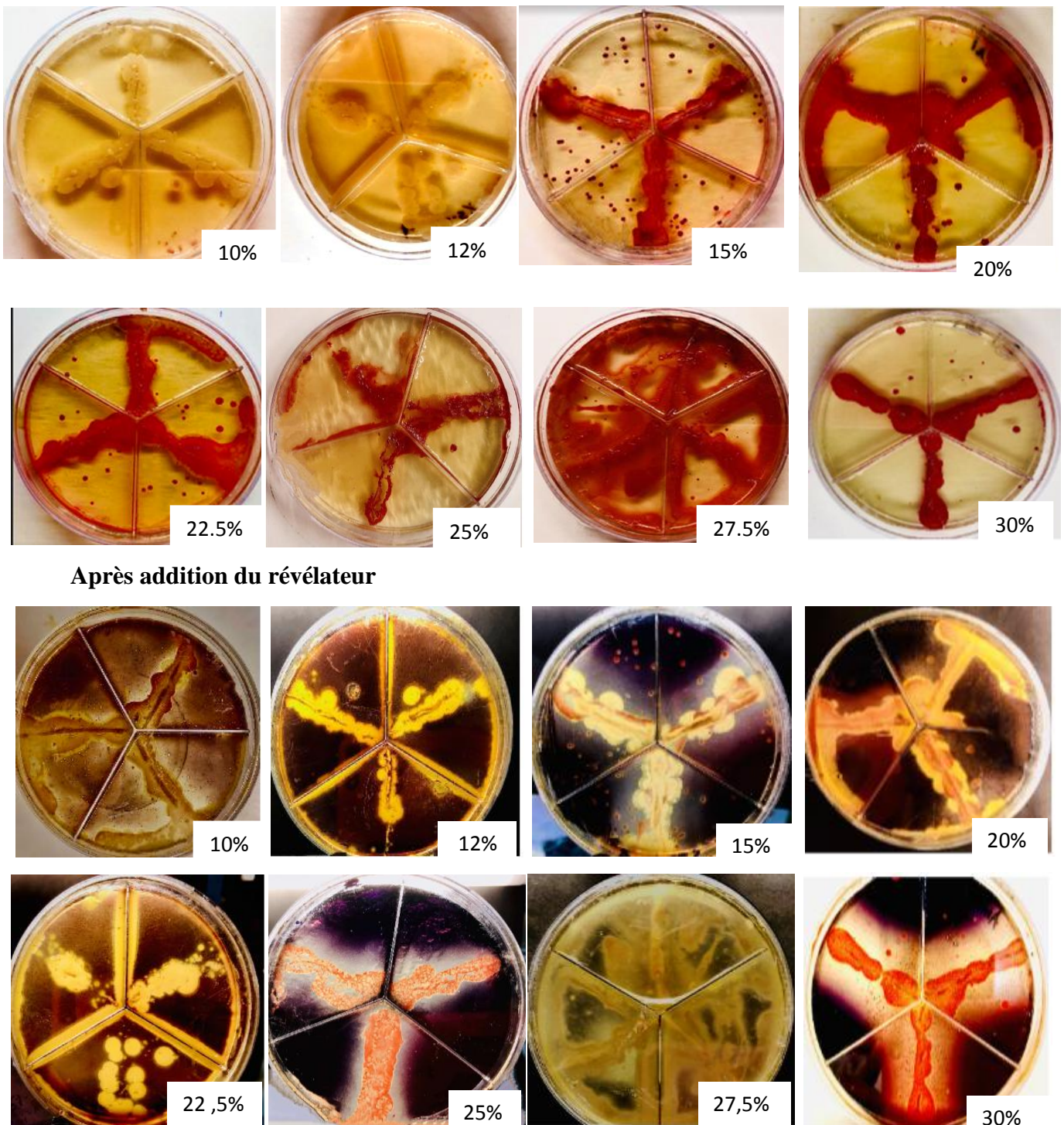
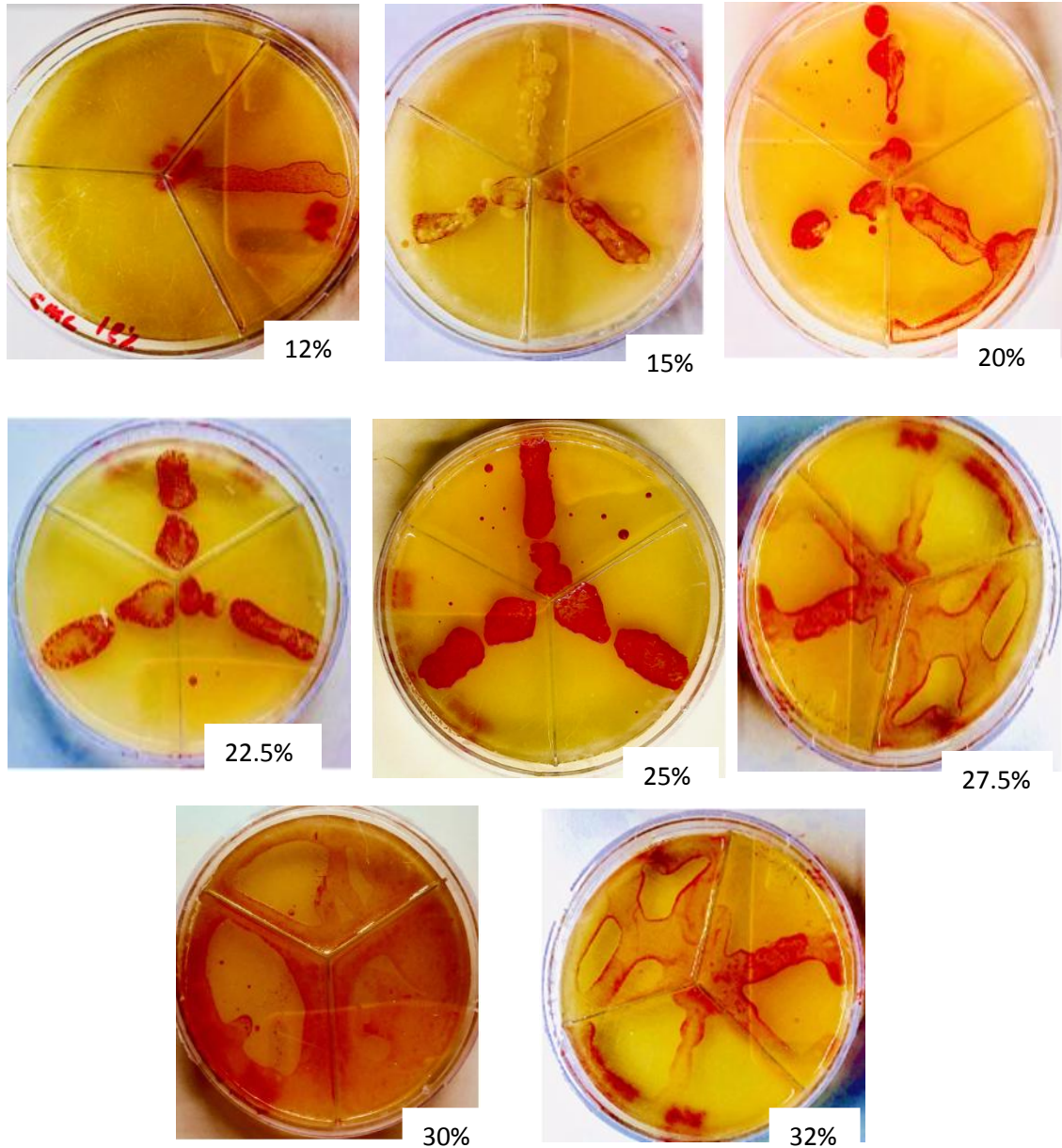


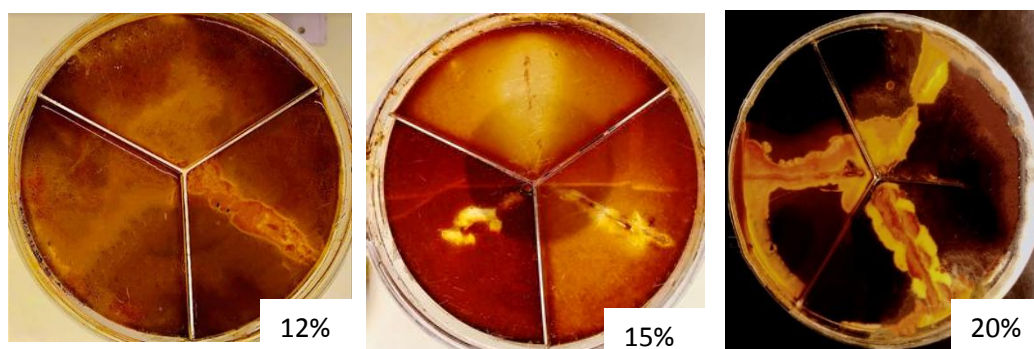
Figure 17: Activité amylolytique observée aux différentes teneurs en sel.

-Variation de l'activité cellulolytique

A l'instar de la caséinase; la cellulase reste active au dépit des concentrations de plus en plus élevées de sel; notant une limite maximale inouïe à 320g de sel/l.



Après addition du révélateur



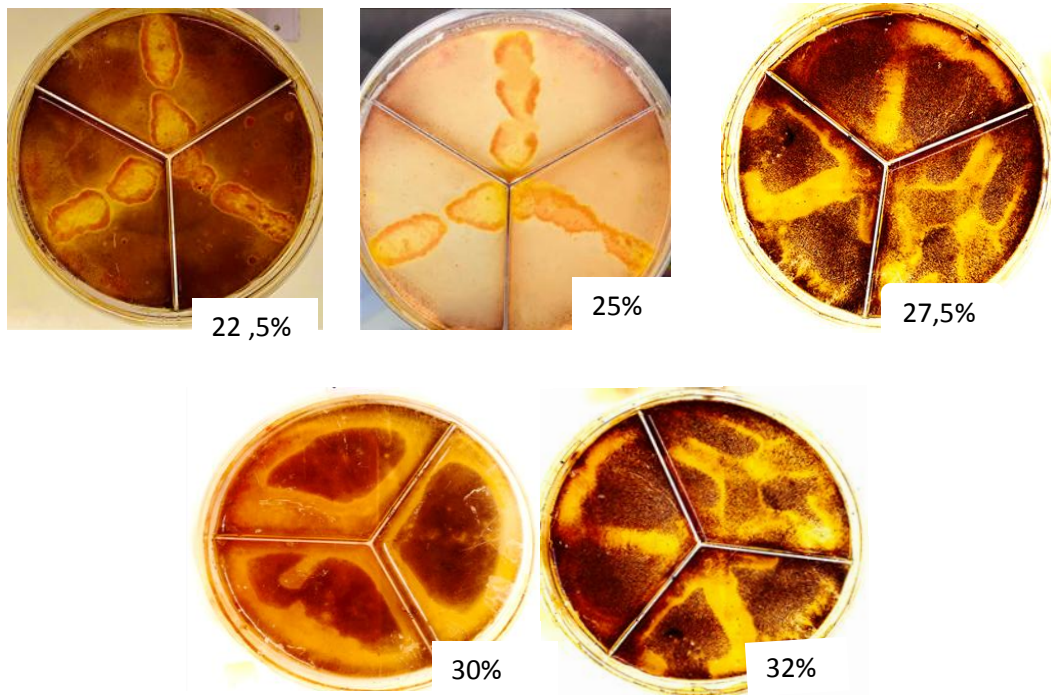


Figure 18: Activité cellulolytique observée aux différentes teneurs en sel

-Variation de l'activité estérasique

Bien que présente ; l'activité estérasique est la plus restreinte comparée l'éventail lytique des exo enzymes précédemment abordées (Fig.19). En effet; sous le seuil de 20% et au-delà de 25% de NaCl; celle-ci n'est plus observée.

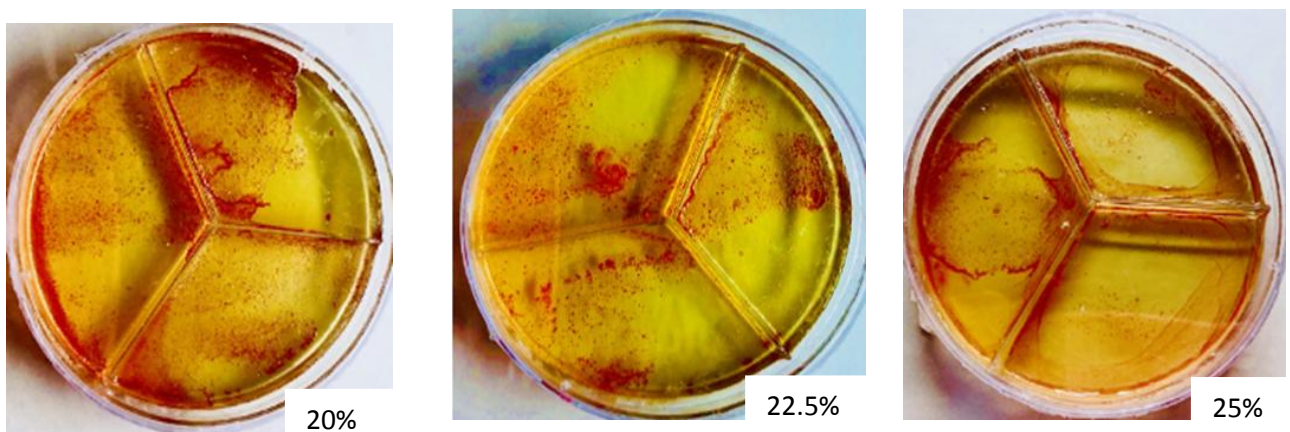


Figure 19 : Activité estérasique observée aux différentes teneurs en sel.

5. Variation des activités exoenzymatiques en fonction du pH

Le pH est un des facteurs influents et limitant dans le déroulement des réactions enzymatiques. La détermination de l'intervalle pH est fort intéressant ; cependant sa réalisation sur milieu solide a présenté quelques inconvénients.

Au vu des résultats obtenus ; l'ensemble des activités lytiques ne s'observe pas au pH inférieur à 7.20; mais poursuivent sur milieux jusqu'aux pH alcalins ; ce qui est exceptionnel et expliquerait le fait que cette souche a pu être isolée de milieux dont les pH tendent vers l'alcalinité.

Tableau 6: Influence du pH sur les activités exozymatiques de l'*Hrr*.

pH	5.00	5.50	6.00	7.20	8.00	9.00	10.00	10.50
Caséine	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++
Gélatine	---	---	---	+++	+++	+++	+--	+++
Amidon	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++
Tween 80	---	---	---	+++	+++	+++	+++	---
CMC	---	---	---	+++	+++	+++	+++	---

(+++): présence d'un halo pour les trois répétitions (résultat positif)

(---): absence d'un halo pour les trois répétitions (résultat négatif)

- Variation de l'activité caséolytique

Observée aux pH alcalins; avec une limite inférieure à 7.2 la caseolyse; perd peu à peu du terrain aux valeurs de pH plus élevées.

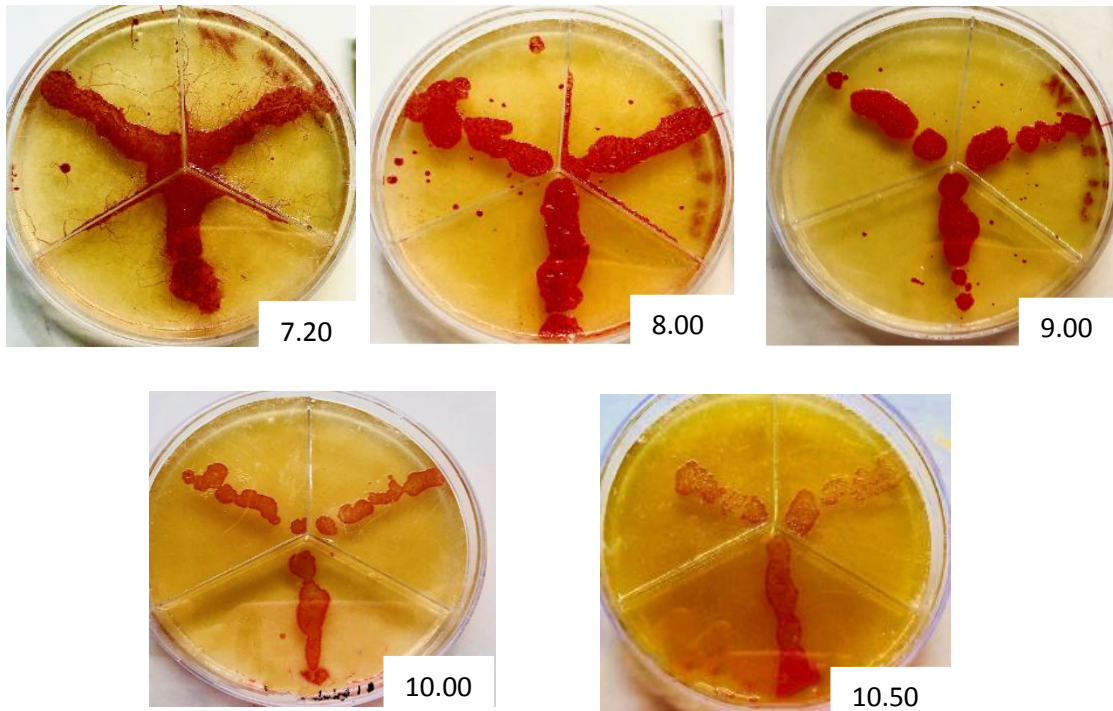


Figure 20 : Activité caséolytique observée aux différents pH

- Variation de l'activité de la gélatinase

La figure ci-dessus; montre la capacité de la gélatinase à persister active jusqu'aux pH alcalins; avec un pH optimal entre 8 et 9.

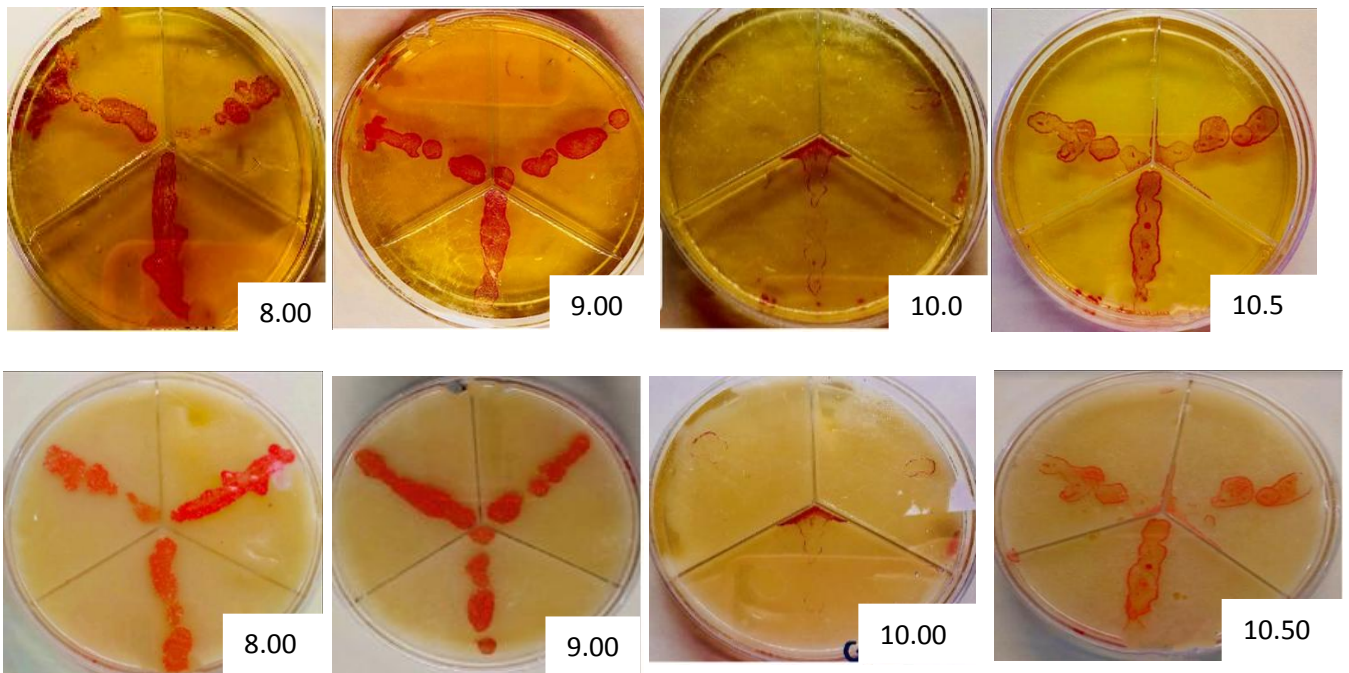
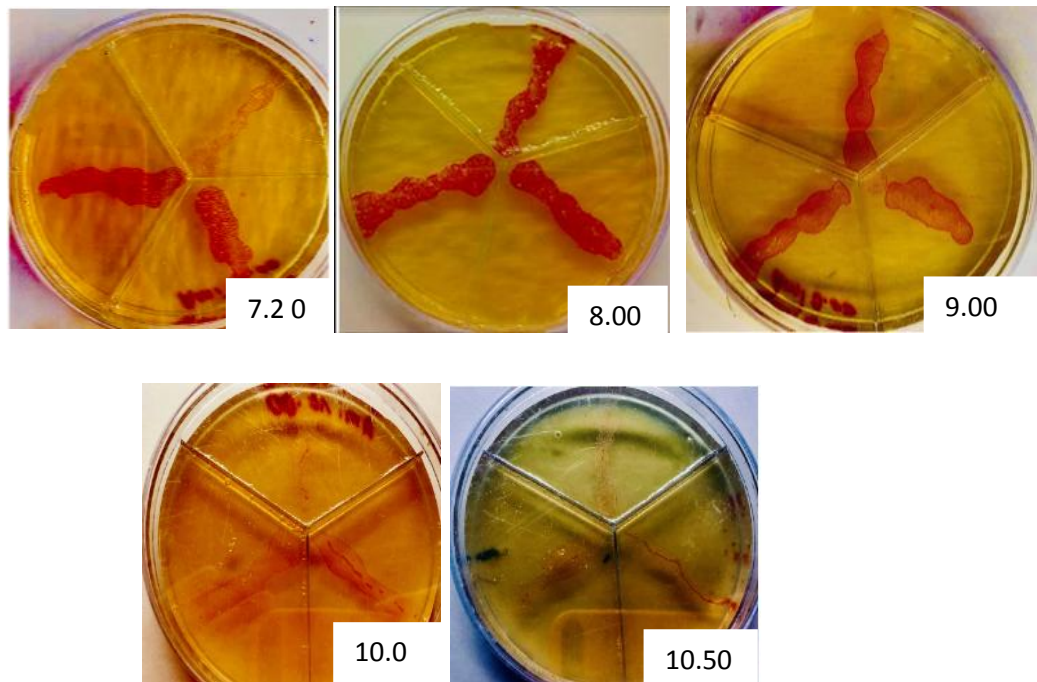


Figure 21: Activité de la gelatinase observée aux différents pH.

-Variation de l'activité amylolytique

Une dégradation de l'amidon qui a lieu à des pH variant de 7.2 à 10.5; est illustrée sur la figure qui suit.



Après addition du révélateur

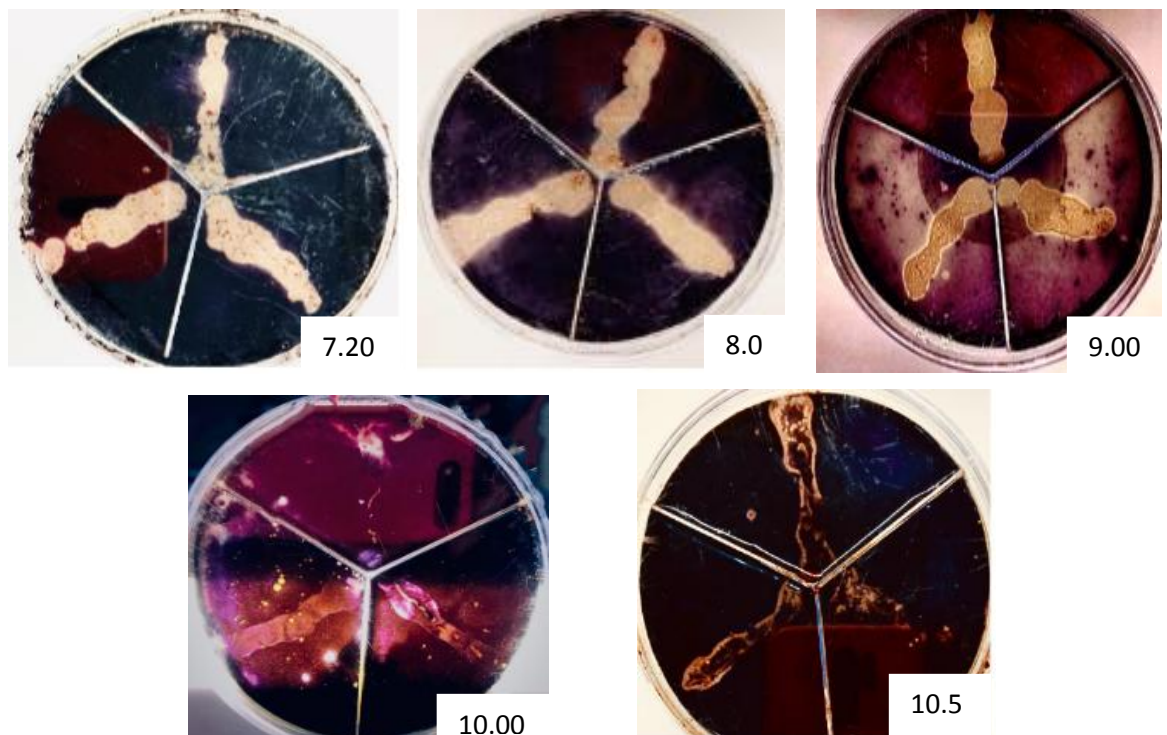


Figure 22: Activité amylolytique observée aux différents pH.

-Variation de l'activité estérasique

La souche étudiée peut dégrader le tween 80; sur un intervalle de pH qui s'étend de la neutralité jusqu'à pH 10.

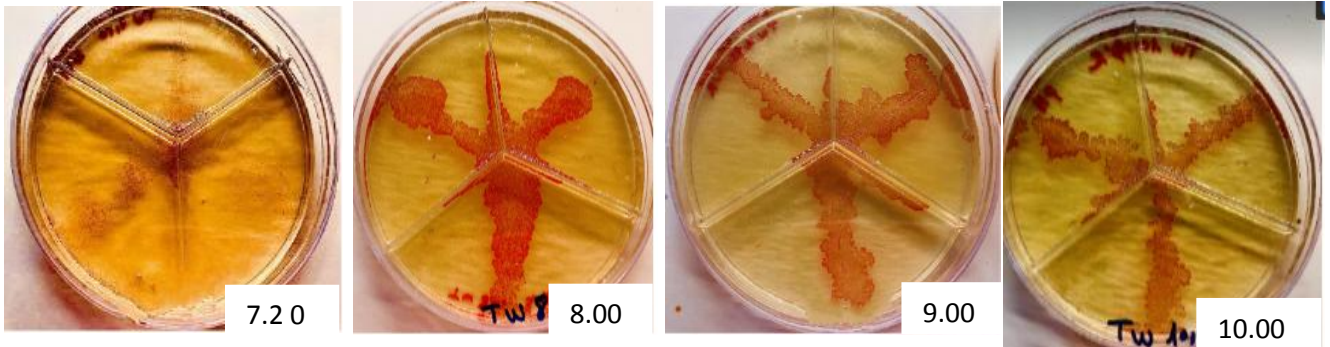
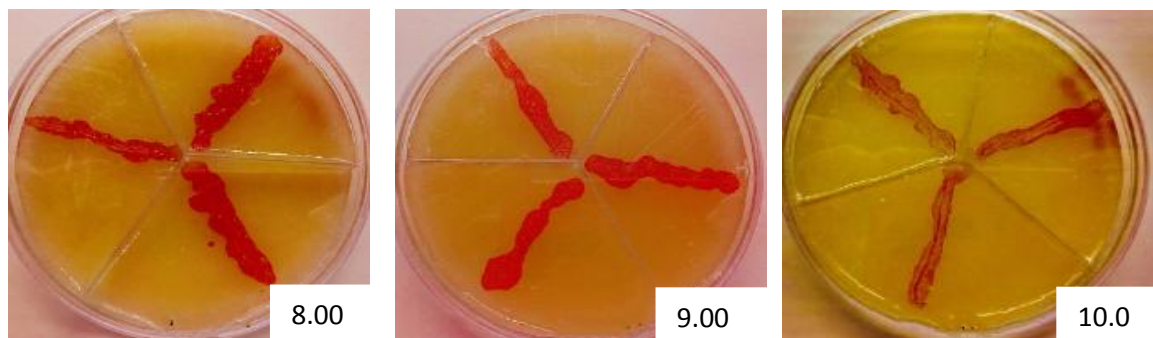


Figure 23: Activité estérasique observée aux différents pH.

-Variation de l'activité cellulolytique

Après addition du révélateur ; les zones de lyse de la cellulose sont mises en évidence, cette exoenzyme se manifeste sur milieux aux pH alcalins (Fig.25) ; ce qui est remarquable vu le profil neutrophile de l'halo archée.



Après addition du révélateur



Figure 24: Activité cellulolytique observée aux différents pH

6. Test de sensibilité a une enzyme protéolytique

La présence d'une zone de lyse autour des spots (SC+Pepsine) sur l'ensemble des milieux supplémentés des différents polymères (Fig.25) signifie la persistance de l'activité lytique de chacune de ces exoenzymes. Ceci peut être expliqué par le fait que la pepsine n'est pas placée dans son milieu réactionnel ; vu la teneur des milieux en sel requis pour l'activité des haloenzymes.

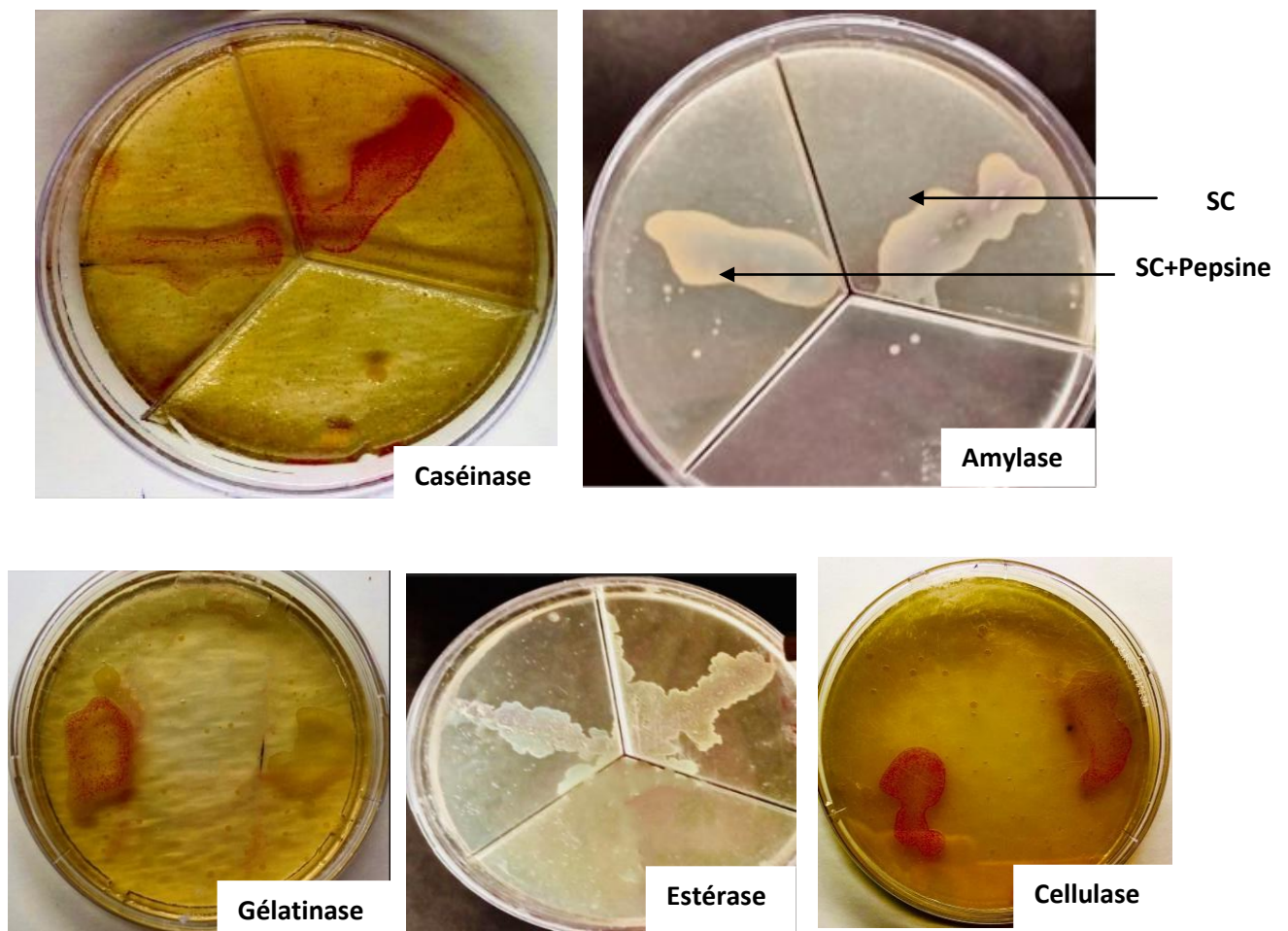


Figure 25: Résultats du test de sensibilité a la pepsine

7. Discussion

L'étude menée sur la souche extrême halophile *Hrr. litoreum JCM13561T* avait pour objectif la détermination des intervalles conditionnant ses activités hydrolytiques; en terme de température, de pH et de salinité. Comme première étape; la réactivation de notre souche sur milieu solide a donné des colonies pigmentées en rouge; lesquelles ont déteint sur la couleur du milieu liquide de (Br).

Exemple type de microorganismes colonisant des niches écologiques particulières; l'adaptabilité de cette bactérie extrême halophile aux conditions de température, de pH et de salinité; a une relation avec sa capacité à produire des enzymes extracellulaires. Ceci implique des mécanismes métaboliques plus développés, comparativement aux microorganismes qui en sont dépourvus (**Cohen, 2011 in Khallef, 2019**). Il est bien admis que les enzymes des halo-extrémophiles assurent les mêmes fonctions de catalyse enzymatique que leurs homologues non-extrêmes, mais dans des conditions de vie extrêmes (**Karan et al., 2012**).

Nous dressons ici le profil enzymatique de *Hrr. litoreum JCM13561T*; qui montre un pouvoir dégradant allant contre la caséine, la gélatine, la cellulose, l'amidon et le tween 80; l'aspect quantitatif de cette activité lytique n'étant pas inscrit dans cette approche.

En terme d'intervalle d'activité exoenzymatique ; nos résultats rapportent une caséinase thermorésistante à 72°C; avec un optimum à 40°C. Cette activité s'effectue sur un large spectre salin allant de 10 à 32% de NaCl; un optimum entre 20 et 25% et un pH allant de 7.2 à 9.

Une gélatinase active entre 15 et 30% de NaCl; avec un optimum à 22.5% et pH entre 7.2 - 10. 50. Cette exoenzyme tolère un maximum de température à 60°C avec un optimum à 50°C.

Une amylase qui reste opérationnelle entre 10 à 30% de NaCl; avec un optimum à 22.5%. Thermostable à 70°C; l'optimum est retenu à 40°C sur un intervalle de pH allant de 7.2 à 10.5.

La cellulase dresse le même profil salin que l'amylase; cependant l'optimum est à 25%; avec une température optimale entre 30°C à 40°C.

Une estérase active stable à 70°C; avec un optimum observé à 40°C. Son intervalle est moins étendu comparé aux autres exoenzymes. La dégradation du tween 80 s'opère sur milieu entre 10 et 25% de NaCl; à peine visible à pH 7.2; elle s'étend jusqu'à pH 10.

Ce potentiel enzymatique diversifié ; halophile et thermorésistant; qui caractérise notre souche; a été relaté par quelques travaux menés sur la même thématique.

En effet; des études de caractérisation des bactéries halotolérantes et halophiles ont montré que leurs enzymes sont souvent stables et restent actives à des températures au-dessus de 50°C, sur un large intervalle de pH et aux fortes salinités (jusqu'à 30% p/v) (**Prakash et al., 2009 in Khallef, 2019**).

Ainsi ; la diversité des halophiles extrêmes capables de produire différents enzymes hydrolytiques (amylase, protéase, lipase et DNase) dans les habitats hypersalins du sud de l'Espagne a été appréhendé. Un total de 43 halophiles extrêmes montrant des activités hydrolytiques ont été isolés et caractérisés. La plupart des producteurs d'hydrolase attribués à la famille *Halobacteriaceae*, appartenant aux genres *Halorubrum* (22 souches), *Haloarcula* (neuf souches) et *Halobacterium* (neuf souches), et trois isolats ont été caractérisés comme des bactéries extrêmement halophiles. La souche IC10 *Salicola* extrêmement halophile, présentant des activités de lipase et de protéase dans des conditions de croissance optimales de 15 à 20 % (p/v) de NaCl, pH 8,0 et 37 °C (**Morino et al., 2008 ; in khallef, 2019**)

En passant en revue certains résultats d'études; il en ressort qu'en 2014 ; **Neagu et al.** Soulignaient que sur neuf souches halo archéennes étudiées, seules deux montraient la capacité à produire une amylase extracellulaire, deux autres libérer une estérase ; mais aucune ne pouvait hydrolyser la caséine et la CMC.

En 2007; des travaux sur des lacs hypersalins et des stations de salaison en Turquie, ont rapporté 37 souches d'archaea extrêmes halophiles, révélant des activités élevées de protéase, de lipase, de DNase et d'amylase, ainsi qu'une activité cellulosique chez 57% des isolats (**Birbir et al., in Khallef, 2019**).

Sur la même lancée; 11 souches de bactéries halotolérantes testées pour leur capacité à produire plusieurs hydrolases extracellulaires ; toutes s'avèrent capables d'hydrolyser la

gélatine; 6 d'entre elles avaient une cellulase; 3 hydrolysaient le Tween 80 alors qu'une seule souche produisait une amylase (Neagu *et al.*, 2014).

Le profil caséolytique apparaît dans une autre étude du même auteur ;ou 8 haloarcheae avaient montré leur capacité à libérer des protéases à une concentration en NaCl (6-26%); avec des pH variables. Une souche à pH optimal 7.2; deux souches à pH optimal 8; 4 souches à pH 10 et une souche qui poursuivait son activité à pH 12. Sept de ces protéases restaient fonctionnelles à 60°C.

Des résultats comparables aux nôtres, rapportent des α amylases produites par 5 souches d'haloarcheae ; actives à une teneur en NaCl entre 15% et 29%; des pH optimaux de 6.5 à 8.7 et des températures entre 50-55°C (Amoozegar *et al.*, 2017).

En 2010; Camacho *et al.* décrivaient une souche ; *Halobacterium sp.* NRC-1 produisant une estérase extrêmement halophile et thermophile; dont les activités optimales s'observaient à 29% de NaCl et persistait à 80°C.

Cinq souches d'archées halophiles (provenant de différents environnements hypersalins en Turquie) libérant des lipases et estérases dépendantes du sel et tolérantes à la température ;ont été décrites. L'activité estérasique la plus élevée chez ces souches fut obtenue à un pH de 8 à 8,5, à des températures comprises entre 60– 65°C et 17.5%-26.3% de NaCl(Ozcan *et al.*, 2009), ce qui rejoint nos résultats ; concernant l'estérase produite par notre souche.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Notre étude est une continuité des recherches précédentes visant à explorer le potentiel enzymatique de souches extrêmes halophiles, précisément l'espèce *Halorubrum litoreum* JCM13561T; isolée d'Ouargla.

Les hydrolases exoenzymatiques de la souche en question agissent sur différents substrats : amidon, gélatine, caséine, CMC et tween 80. Il était intéressant d'explorer de près l'effet des trois principaux facteurs température ; pH et salinité; sur ces activités lytiques.

Les résultats auxquels nous sommes parvenus s'alignent aux données bibliographiques qui soulignent que les exo enzymes d'halophiles extrêmes; ont une stabilité thermique et demeurent actives sur un large intervalle de pH.

L'activité sous des teneurs élevées en sel est le caractère commun chez toutes ces hydrolases dont l'optimum est observé entre 20-25% de NaCl; agissant également sous un large intervalle de pH (7.2-10). Les températures élevées étant un allier et non un obstacle pour le déroulement de ces réactions ; avec une caseinase; une amylase et une cellulase stables à 70°C. La présence d'activités hydrolytiques extracellulaires combinées peut offrir un potentiel à appliquer comme une alternative économique à certaines biotechnologies actuelles.

Sont des candidats idéaux pour diverses applications industrielles

Vu la spécificité physiologique et métabolique de cette archée, certains tests n'étaient pas très pertinents ; telle que la détermination des pH en milieu solide et le test de digestion enzymatique. Cette spécificité est à prendre en considération également pour la prolongation des délais d'incubation, lors de l'application de certains protocoles.

Notre étude est un pas de plus dans la caractérisation de ces exoenzymes. En raison de l'indisponibilité de techniques de pointe, certaines manipulations ont été entravées et restent en perspectives; telles que la purification et la caractérisation de ces molécules bioactives notamment leur nature chimique.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Amend, J. P and Andrey V Plyasunov. (2001). Carbohydrates in thermophile metabolism: calculation of the standard molal thermodynamic properties of aqueous pentoses and hexoses at elevated temperatures and pressures

Amend, J. P and Everett L. Shock. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria

Amid, A., Abd Samad, N.S., Dzun Noraini Jimat, Nurul Aqilah Ab Shukor. (2017). Isolation and identification of halophilic bacteria producing halotolerant protease.

Amoozegar, M. A., Fatemi Z.A., Karbalaie-Heidari H.R., Razavi M.R. (2007). Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol Res* 162: 369-377. **In** Production optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. Ed. **Karbalaie-Heidari et al., (2009)**

Albers, S., Vossenbergh, J., Driessen, A. and Konings, W. (2001). Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles* ;5 : 285-294. **IN.**

Aubert, G. (1975). Les sols sodiques en Afrique du Nord. Annales de l'Institut National Agronomique. Alger, Algérie VI: 185-195 . **In** IScreening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien. Ed **AYAD R.**

Aygan, A., Arikan B. (2008). A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake

Aygan, A., Arikan B., Korkmaz H., Dinçer S., Çolak Ö. (2008). Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz J Microbiol* 39 : 547-553.

B

Baliga, N. S., S. J. Bjork, R. Bonneau, M. Pan, C. Iloanusi, M. C. H. Kottmann, L. Hood, J. DiRuggiero. (2004). Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1. *Genome Res,*

Baxter, B. K., Litchfield C. D., Sowers K., J. D. Griffith, P. A. DasSarma, S. DasSarma. (2005). Microbial diversity of Great Salt Lake. In *Adaptation to Life at High Salt*. Ed N. Gunde-Cimerman, A. Oren, A. Plemenitas. (2005)

Beldman, G., Marjo F SEARLE-VAN LEEUWEN., Frank M ROMBOOTS., Fons GJ VORAGEN. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride* Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases

Benkerroum ,N., Oubel,H. Zahar, M., Dlia, S. and A. Filali-Maltouf. (2000). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben

Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. and Mertoglu, B. (2004). Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 613-621. IN *Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla (Algérie)*. Ed. **KHALLEF. S**

Burg Bertus van den. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes:213 IN

C

Calimlioglu, B., Kazim Yalcin Arga. (2014). Proteins from halophilic bacteria: purification and their applications

Camacho, RM., Mateos-Díaz JC, Diaz-Montaña DM, Gonz_alez- Reynoso O, Córdoba J. (2010). Carboxyl ester hydrolases production and growth of a halophilic archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *Extremophiles*; 14:99–106.

Capasso Clemente et Claudiu T. supuran. (2015). Carbonic Anhydrases from Extremophiles and their Biotechnological Applications.

Cojoc, R., S. Merciu, G. Popescu, L. Dumitru, M. Kamekura, M. (2009). Enache, Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, *Rom. Biotechnol. Lett.* 14 4658–4664.

Craig, L.M., R Eric Collins., Richard Y Morita. (2017). Psychrophiles and psychrotrophes

D

Dalmaso et al. (2015). In Cours de microorganismes des milieux extrêmes.Ed. **Djinni.I.** PP14

DasSarma, S., B. R. Berquist, J. A. Coker, P. DasSarma, J. A. Müller. (2006). Post-genomics of the model haloarchaeon *Halobacterium sp.* NRC-1. Saline Systems. In Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments.**Seckbach.**

DasSarma,S ., Priya Arora. (2001). Halophiles

Davis, J. S., Mario Giordano. (1995). Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks

Desmarais, D., P E. Jablonski, N .S Fedarko, M. F Roberts. (1997). Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea. In. Extremophiles as a source for novel enzymes.Ed. **Van Den Burg, B** :213

Downie, A.W. et Cruickshank.J., (1928) The resistance of *Streptococcus Faecalis* to acid and alkaline media

E

Eichler, J. (2001). Biotechnological uses of archaeal extrêmozymes

Essen, L-O R., Siegert, Wolf D Lehmann, Dieter Oesterhelt. (1998). Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex

F

Fardeau, M.L., Patrick Grégoire., Patricia C. Bonin., K.Dubourg. (2009). Les micro-organismes de l'extrême

Ferrera I., Anna-louise Reysenbach., (2007). Thermophiles

Franzmann, P.D., N. Springer, W. Ludwig, E. Conway De Macario, and M. Rohde. (1992). —A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides Burtonii Sp.* Nov. Systematic and Applied Microbiology. In Phylogénie et evolution des Archaea, une approche phylogénétique.Ed. **Céline Petitjean.**

G

Garrett, R. A., H. P. Klenk. (2007). Archaea: Evolution, Physiology, and Molecular Biology. Hoboken, USA, Wiley-Blackwell

Ghanem, A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds

Gill G. Geesey and Richard Y. Morita. (1975). Some physiological effects of near-maximum growth temperatures on an obligately psychrophilic marine bacterium

Gomes, J et Walter Steiner. (2004). The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes, 223-225

Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978). *Halobacterium vallismortis* sp. nov. Anamylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol*24: 710–715.

Grant. (2004). In **Bousbia N. (2021).** Potentialités biotechnologiques des microorganismes halophiles isolés à partir d’environnements hypersalins.

Gregoire Michoud. (2019). Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii*, un piézophile extrême par une approche multi -"omics"

Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003). Microbial α -amylase : abiotechnological perspective. *Process Biochem* 38 : 1599-1616

Gutiérrez, MC., AM Castillo, E Pagaling, S Heaphy, M Kamekura, Y Xue, Y Ma, DA Cowan, BE Jones, WD Grant, A Ventosa. (2008). *Halorubrum kocurii* sp. nov., an archaeon isolated from a saline lake *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58 (9), 2031-2035,

H

Harrison, J. P., N.Gheeraert, D. Tsigelnitskiy, C. S. Cockell. (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiol*, 21, 204–212.

Horikoshi K. (1971). Hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d’environnements hypersalins de l’Est algérien. Production of alkaline enzymes by halophilic microorganisms 01407-1414

J

Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W. and Owenson G. G. (1998). Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles*. In A comparative GC–MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkhah of Oran. Ed. **F. Nas.**

K

Kamekura, M. and M. Enache. (2018). in Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria. In the biotechnology sector. Ed. **Patil, U ., Narendra Mokashe, Bhushan Chaudhari. (2018).**

Kanapathipillai, M., Georg Lentzen, Michael Sierks. (2005). Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid.

Karan,R. Melinda D Capes & Shiladitya DasSarma. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity

Khallef S. (2019). Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides d'Ouargla (Algérie). Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou Algérie.

Khallef, S.Lestini, R, Myllykallio, H., Houali K (2018). Isolation and identification of two extremely halophilic archaea from sebkhas in the Algerian Sahara. Cellular and Molecular Biology. Interdisciplinary Journal of Molecular Biology, Biochemistry and Physiology

Kim, S.J., and Hoppe, H.G. (1986). Microbial extracellular enzyme detection on agars plats by means of methylum-belliferyl-substrates. In : GERBA Deuxième Colloque International de Bacteriologie Marine, Actes de Colloque. REMER, Brest. 175-181.

Kottemann, M., A. Kish, C. Iloanusi, S. Bjork, J. DiRuggiero. (2005). Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium sp.* strain NCR-1 to desiccation and gamma irradiation. Extremophiles.

Kour,D., Rana, K.L., Kaur,T., Singh,B., Chauhan, V.S., Kumar, A.,& Gupta, V.K.(2019). Extremophiles for hydrolytic enzymes productions; biodiversity and potential biotechnological applications. Bioprocessing for biomolecules production,321-372.

Kumar.D., Lalit Kumar, Sushil Nagar, Chand Raina, Rajinder Parshad, Vijay Kumar Gupta. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus sp.* strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions

L

Lentzen, G., Thomas Schwarz. (2006). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications

Leuko, S., M. J. Raftery, B. P. Burns, M. R. Walter, B. A. Neilan. (2009). Global protein-level responses of *Halobacterium salinarum* NRC-1 to prolonged changes in external sodium chloride concentrations. J Proteome Res,

Litchfield, C.D. (2011), Potential for industrial products from the halophilic Archaea

Litchfield, C.D and PM Gillevet. (2002). Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment.

Lopetcharat, K., Yeung J Choi, Jae W Park, Mark A Daeschel. (2001). Fish sauce products and manufacturing

Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W.H., Pretorius I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol and Molecul Biol Rev* 66 (3) : 506-577.

M

Ma, Y., Erwin A. Galinski, William D. Grant, Aharon Oren. (2010). Halophiles: Life in Saline Environments

Mcgenity.T.J., Gemmell. R.T., Grant.W.D.,et Stan-Lotter. H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environmental Microbiology*, 243-250

Meek, S. and Lipman. Charles B., (1922) The relation of the reaction and of salt content of the medium on nitrifying bacteria

Menasria, T. (2020). Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien. Thèse de doctorat, Université de Batna Hadj Lakhdar Algérie.

Miko A. Jorquera., Steffen P. Graether and fumito Maruyama. (2019). Bioprospecting and biotechnology of Extremophiles

Mohammadipanah F, Javad Hamed, Mona Dehghani, (2015) Halophilic bacteria: potentials and applications in biotechnology

Mokashe, N., Bhushan Chaudhari, Ulhas Patil., (2018). Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector ;05-15

Moreno, M. L., Garcia M.T, Ventosa. A & Mellado. E (2008). Characterization of *Salicola sp.* IC10, a lipase- and protease producing extreme halophile

Müller J. A., S. DasSarma. (2005). Genomic analysis of anaerobic respiration in the archaeon *Halobacterium sp.* strain NRC-1: dimethyl sulfoxide and trimethylamine N-oxide as terminal electron acceptors. *J Bacteriol*,

N

Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y., & Masataka Tsuda. (2007). Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis

Neagu S, Enache M et Cojoc R. (2014). Extra cellular hydrolytic activities of halophilic microorganisms isolated from Balta Albă Salt Lake. *Romanian Biotechnological Letters*

Ng WV, S. P. Kennedy, G. G. Mahairas, et al.2000. Genome sequence of Halobacterium species NRC1.in Joseph Seckbach and Pabulo Henrique Rampelotto (2006). Polyextremophiles Life Under Multiple Forms of Stress

Nilforoushan F, F Masson, Ph Vernant, C Vigny, J Martinod, M Abbassi, H Nankali, D Hatzfeld, R Bayer, F Tavakoli, A Ashtiani, E Doerflinger, M Daignières, P Collard, J Chéry. (2003). GPS network monitors the Arabia-Eurasia collision deformation in Iran.

O

Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environnements, phylogeny, physiology and applications; 56-63.

Oren A., Ventosa A., Grant W. D. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol* 47 : 233-238.

Ozcan B, Ozyilmaz G, Cokmus C, Caliskan M. (2009). Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *J Ind MicrobiolBiotechnol*;36: 105–110. in **Litchfiel., 2011**

P

Pikuta, E.V., and Richard B. Hoover. (2007). Microbial Extremophiles and the Limits of Life: 183-203

Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G. and Sreeramulu,K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant,thermostable, and alkali-stable a-amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *ProcessBiochemical*, 44, 210-215.**IN Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla (Algérie).Ed. KHALLEF. S**

Pronk J.T & Johnson D. Barrie. (1992). Oxidation and Reduction of Iron by Acidophilic Bacteria

Q

Quillaguamán,J., Héctor Guzmán, Doan Van-Thuoc& Rajni Hatti-Kaul .(2010). Synthesis and production of polyhydroxyalcanoates by halophiles: current potential and future prospects

R

Raddadi,N., Ameer Cherif, Daniele Daffonchio, Mohamed Neifar, Fabio Fava. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extrêmolytes

Rampelotte, P.H (2013). Extrémophiles and Extreme Environnements : 483-485

Ravi Durvasula et D.V SubbaRao. (2018). Extrémophiles; Nature's Amazing Adaptors, 1-18.

Reddy C.S.K., R. Ghai., Rashmi., V. CKalia. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. IN. *Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in Archaea*. Ed. James C. Charlesworth and Brendan P. Burns

Roxana C, Simona M, Gabriella A P, Lucia D, Masahiro K and Mădălin E. (2009).

Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters Vol. 14, No. 5, 2009*, pp. 4658-4664.

S

Saha ,B.C., Freer, S.N., Bothast, R.J. (1994). Production, Purification, and Properties of a Thermostable β -Glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*

Sharma, A. D Parashar, T Satyanarayana. (2016). **Acidophilic microbes: biology and applications - Biotechnology of Extremophiles**

Saxena K.R., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. (2007). A highly and thermostable alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technol* 98:260–265.

Sánchez-Porro.c., S. Martín, E. Mellado, A. Ventosa. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, *J. Appl. Microbiol.*

94 295–300.

Setati M.E. (2009). Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol* 9 (11): 1555-1560.

Stan-Lotter H., Radax C., Gruber C., et al. (2003). Astrobiology with haloarchaea from Permo-Triassic rock salt. *Int J Astrobiol*

V

Ventosa, A., Arahall, D. R. (2009). Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity; 247-262

Veaux, L. C., J. A. Müller, J. Smith, J. Petrisko, D. P. Wells, S. DasSarma. (2007). Extremely radiation resistant mutants of a halophilic archaeon with increased single-stranded DNA-binding protein (RPA) gene expression. *Radiat Res*,

W

Wang C-Y., Ng C-C., Tzeng W-S., Shyu Y-T. (2009). *Marinobacter szutsaonensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2605–2609.

Wei-min ZENG., Rubing ZHANG.;Pei-lei HU.,Guan-zhou QIU.,Guo-hua GU.;Hong-bo ZHOU., (2009); Isolation and identification of moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing bacterium and its bioleaching characterization; 222-227

Wright,A.D.G. (2006). Phylogenetic relationships within the order Halobacteriales inferred from 16S rRNA gene sequences

Y

Yang R., Johnson C.M. et Ray B. (1992). Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 58(10) :3355-3359.

Yan Zeng, Dong Zeng, Yan Zhang, Xueqin Ni, Yurui Tang, Hui Zhu, Hesong Wang, Zhongqiong Y in, Kangcheng Pan, Bo Jing. (2015). Characterization of the cellulolytic bacteria communities along the gastrointestinal tract of Chinese Mongolian sheep by using PCR-DGGE and real-time PCR analysis

Yayanos A. A., Dietz A. S. and Van BoxtelR. (1979). Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristic. Science, 205:808-810 IN

Z

Zhou, J., Yong-Hong Wang, Ju Chu, Ling-Zhi Luo, Ying-Ping Zhuang, Si-Liang Zhang. (2009). Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments

Annexes

Annexe 1:

Tableau: Caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche *Halorubrum litoreum* JCM 13561T (Khallef, 2019)

Caractéristiques	JCM 13561T
Morphologie	Bacilles
Gram	-
Mobilité	+
Pigmentation	Rouge
NaCl intervalle(%)(p/v)	10>29
NaCl optimale(%)(p/v)	20%
Intervalle T°C	20-45
Températures Optimale °C	40°C
Intervalle pH	6.0-9.5
pH optimale	7.5

Annexe 02:

Matériels utilisés

1)Appareillage

- Autoclave
- Bain marie
- Centrifugeuse 10000rpm
- Etuve
- Four Pasteur
- Vortex
- Plaques chauffantes agitatrices
- Balance
- pH mètre
- Becs benzène
- Réfrigérateur

2)Instruments

- Portoirs de tubes
- Tubes à essai
- Boites Petri
- Erlenmayer
- Béchers
- Pipette graduée
- Eprouvette graduée
- Flacons
- Pipettes Pasteur
- Micropipette
- Embouts jaunes
- Spatule
- Scalpels
- Coupelle
- Filtre de 0.22 μm

3)Réactifs utilisés

- Lugol
- Réactif TCA 10%

Annexe 03:**Milieux de culture Milieu Brown :**

• Na Cl.....	250g
• K Cl.....	2g
• Mg SO4.....	20g
• Citrate Tri-Sodique.....	3g
• Extrait de levure	5g
• Agar.....	20g
• Eau distillé	1000ml

pH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

Milieu pour la recherche de protéase :

• Milieu Br	100ml
• Lait écrémé stérile	10ml

N. B : La stérilisation des deux préparations se fait séparément, et au moment de la manipulation ils sont mélangés.

• Milieu Br	100ml
• Caséine.....	1g

pH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

Milieu pour la recherche de gélatinase :

• Milieu Br.....	100ml
•Gélatine.....	0,8g

pH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

Milieu pour la recherche de l'amylase :

• Milieu Br.....	100ml
• Amidon	1g

pH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

Milieu pour la recherche d'estérase :

Milieu Br.....	100ml
Tween 80.....	1ml pH= 7,2,

Autoclavé à 121°C / 20 min.

Milieu pour la recherche de cellulase :

Milieu Br100ml

CMC.....1g

pH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min

La composition de la solution Tris- H Cl:

• Na Cl.....200g

• K Cl.....4g

• Mg SO₄ 7H₂O.....36g• Ca Cl₂ H₂O.....1g

• Tris.....4g

• Eau distillé.....1000ml

La composition de la solution TCA:

TCA.....163,39g

Eau distillé stérile.....1L

La solution de pepsine :**Pour 10 ml de la solution**

HCl.....0.02M/pH=2

Pepsine.....20mg

Conservé à +4 °C

Annexe 04 :



Agitateur incubateur, LABWIT ZWYR-200D



WTW pH-mètre portable pH 315i.



Mini Vortex Mixer-3500rpm,VELP SCIENTIFICA TX4 Digital IR

Résumé :

Les environnements halophiles extrêmes abritent en particulier les archées qui ont développés des stratégies d'adaptation pour y survivre, l'une de ses stratégies est la production d'exo enzymes.

Le but de cette étude est de suivre de prêt l'effet des trois principaux facteurs : température ; pH et salinité ; sur les activités lytiques exo enzymatique de l'archée extrême halophile *Halorubrum litoreum*

Les résultats montrent que l'ensemble des hydrolases dont est doté cette souche à savoir: caseinase; gélatinase; amylase; cellulase et estérase; est active dans une large gamme de salinité (10 à 32% de NaCl), avec des optimaux observés entre 20-25%, agissant sous un intervalle de pH (7.2 à 10). Ces exo enzymes montrent une stabilité sur des plages de températures (20°C à 50°C) ; avec une persistance de l'activité caséolytique ; amylolytique et cellulolytique à 70°C.

Cet arsenal d'activités hydrolytiques extracellulaires combinées peut offrir un potentiel à appliquer en biotechnologie

Les mots clés : *Halorubrum litoreum* ,exoenzymes ,extrême halophile, archée, biotechnologie.

Summary:

Extreme halophilic environments are particularly home to archaea which have developed adaptation strategies to survive there, one of its strategies is the production of exoenzymes.

The purpose of this study is to closely monitor the effect of the three main factors: temperature; pH and salinity; on the exo-enzymatic lytic activities of the extreme halophile archaea *Halorubrum litoreum*

The results show that all of the hydrolases with which this strain is endowed, namely: caseinase; gelatinase; amylase; cellulase and esterase; is active in a wide salinity range (10 to 32% NaCl), with observed optimums between 20-25%, acting under a pH range (7.2 to 10). These exoenzymes show stability over temperature ranges (20°C to 50°C); with persistence of caseolytic activity; amylolytic and cellulolytic at 70°C.

This arsenal of combined extracellular hydrolytic activities may offer potential for application in biotechnology

Key words: *Halorubrum litoreum*, exoenzymes, extreme halophile, archaea, biotechnology

ملخص:

تعد البيئات شديدة الملوحة بشكل خاص موطنًا للعنايق التي طورت استراتيجيات للتكيف مع هذه الظروف القاسية ، وإحدى استراتيجياتها هي إنتاج الإنزيمات الخارجية.

الغرض من هذه الدراسة هو مراقبة تأثير العوامل الرئيسية الثلاثة : درجة الحرارة. درجة الحموضة والملوحة. حول الأنشطة التحليلية الإنزيمية الخارجية للعتيقة الملحية الشديدة

بينت النتائج أن جميع الإنزيمات المائية التي تمتلكها هذه السلالة ، وهي: إنزيم الكازيناز ؛ الجيلاتيناز . الأميلاز . السيلولازوالإستراز . نشط في نطاق ملوحة واسع (10 إلى 32٪ كلوريد الصوديوم) ، مع ملاحظة قصوى بين 20-25٪ ، يعمل تحت نطاق الأس الهيدروجيني (7.2 إلى 10). تظهر هذه الإنزيمات عند 70 cellulolytic و amylolytic الخارجية ثابتًا على نطاقات درجات الحرارة (20 درجة مئوية إلى 50 درجة مئوية) ؛ مع استمرار نشاط الحالة. درجة مئوية.

قد توفر هذه المجموعة من أنشطة التحليل المائي خارج الخلية إمكانية للتطبيق في التكنولوجيا الحيوية

الكلمات المفتاحية: *Halorubrum litoreum*، الإنزيمات الخارجية ، فائقة الملوحة، العنايق، التكنولوجيا الحيوية.