

**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département des sciences biologiques**



**Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de**

**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Thème**

**Essai de caractérisation d'exo-enzymes  
produites par une bactérie extremophile du genre  
*Natronorubrum***

**Présenté par : Mr. BOURAS BADIS**

**Soutenu publiquement le : 21.06.2022**

Devant le jury :

M <sup>me</sup> ABBAS A.	M.C.A Présidente	U.K.M. Ouargla
M <sup>me</sup> TELLI A.	M.C.B Examineur	U.K.M.Ouargla
M <sup>me</sup> KHALLF. S	M.C.A Encadreur	U.K.M.Ouargla

**Année Universitaire : 2021/2022**

## Remerciements

*Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme le présent travail.*

*Je tiens à remercier Mme KHALLEF Sakina, Maitre de conférences A à l'université KASDI Merbah -Ouargla, de m'avoir impliqué dans cette thématique; en assurant l'encadrement tous a long de la réalisation de cette étude ; pour son soutien, ses conseils judicieux et sa grande bien vaillance tout au long de l'élaboration de ce travail.*

*Je remercie également :*

*Mme. ABBAS Amel, Maitre de conférences A; l'université KASDI Merbah -Ouargla; d'avoir accepté de présider ce jury; ainsi que Mme. TELLI Alia Maitre de conférences A, l'université KASDI Merbah -Ouargla; d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.*

*Jeremercie également à tous les enseignants et collègues de département de Sciences Biologiques Spécialité Microbiologie appliquée de l'Université KASDI MERBAH-Ouargla.*

*Merci à tous personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

**BADIS**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et  
leurs prières tout au long de mes études,*

*A mes frères pour leur appui et leur encouragement,*

*A mes grands-parents « ALLAH YERHAMHOM »*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours,*

*Et à mes vrais amis.*

## Listes des figures

Figure 1 : Thermophiles extrêmes génétiquement tractables et leurs températures de croissance optimales .....	9
Figure 2 : Les milieux hypersalins : Grand lac salé, la mer Morte .....	11
Figure 3: Arbre phylogénétique à probabilité maximale montrant la position des espèces du genre <i>Natronorubrum</i> . .....	14
Figure 4: Protocole de la recherche des activités exo enzymatiques .....	26
Figure 5: Schéma résumant le test de sensibilité à la pepsine par la méthode de diffusion des puits.....	27
Figure 6 : Aspect macroscopique de la souche réactivée sur milieu solide et préculture sur milieu liquide.....	29
Figure 7: Activité caséolytique observée aux différentes températures .....	31
Figure 8: Activité de la gélatinase observée aux différentes températures .....	31
Figure 9 : Activité amylolytique observée aux différentes températures .....	32
Figure 10 : Activité cellulolytique observée aux différentes températures .....	33
Figure 11 : Activité caséolytique observée aux différentes concentrations de sel.....	34
Figure 12: Activité gélatinase observée aux différentes concentrations de sel.....	35
Figure 13: Activité amylolytique observée aux différentes concentrations de salinité.....	36
Figure 14: Activité cellulolytique observée eaux différentes concentrations de sel.....	38
Figure 15 : Activité caséolytique observée aux différents pH.....	40
Figure 16: Activité amylolytique observée aux différentes pH.....	40
Figure 17 : Activité cellulolytique observée aux différents pH.....	41
Figure 18: Résultats du test à la pepsine.....	41

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1 : Catégories de micro-organismes halophiles.....</b>	<b>12</b>
<b>Tableau 2 : Quelques caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche halophile.....</b>	<b>22</b>
<b>Tableau 3 : Paramètres et intervalles expérimentés.....</b>	<b>24</b>
<b>Tableau 4 : Effets de la température sur les activités exoenzymatiques de l'halobactérie.....</b>	<b>30</b>
<b>Tableau 5: Influence de la salinité sur les activités exoenzymatiques de l'halobactérie ..</b>	<b>33</b>
<b>Tableau 6 : Effet du pH sur les activités exoenzymatique de l'halobactérie.....</b>	<b>39</b>

## **Listes des annexes**

<b>Annexe 1.....</b>	<b>55</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>56</b>
<b>Annexe 3.....</b>	<b>57</b>
<b>Annexe 4.....</b>	<b>58</b>

## Liste des abréviations

- Br : Milieu de culture Brown
- tr/ min : Rotation par minute
- *Nrr*: *Natronorubrum*
- SC: Surnageant de Culture
- CMC : CarboxyMéthyl Cellulose
- TCA : Acide Trichloracétique
- S + p Surnageant de Culture +Pepsine

## Table des matières

<i>Remerciements</i> .....	
<b>Dédicaces</b> .....	
<b>Listes des figures</b> .....	
<b>Liste des tableaux</b> .....	
<b>Listes des annexes</b> .....	
<b>Liste des abréviations</b> .....	
<b>Table des matières</b> .....	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Revue bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1 Les extrêmophiles</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1.1 Les psychrophiles</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.2 Les acidophiles</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.3 Les alcaliphiles</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.4 Les piézophiles</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.5 Les thermophiles</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.6 Les halophiles</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1.6.1 La famille des <i>Halobacteriaceae</i></b> .....	<b>12</b>
<b>I.1.6.1.1 Description du genre <i>Natronorubrum</i></b> .....	<b>13</b>
<b>I.2 Intérêts biotechnologiques des halophiles</b> .....	<b>15</b>
<b>I.3 Différentes classes d'enzymes</b> .....	<b>15</b>
<b>I.4 Intérêts biotechnologiques des exoenzymes microbiennes</b> .....	<b>17</b>
<b>I.4.1 L'industrie agroalimentaire</b> .....	<b>17</b>
<b>I.4.2 Autres applications dans le secteur alimentaire</b> .....	<b>18</b>
<b>I.4.3 Industrie du papier et de la pâte à papier</b> .....	<b>18</b>
<b>I.4.4 Le traitement du cuir et du tissu</b> .....	<b>19</b>
<b>I.4.5 Applications dans les détergents</b> .....	<b>19</b>

I.4.6 L'industrie du textile.....	19
I.4.7 Biocarburant à partir de la biomasse.....	20
I.4.8 Applications enzymatiques dans les secteurs de la pharmacie et médecine .....	20
Chapitre II Matériel et méthodes .....	21
II. Matériel biologique.....	222
II.1 Description de la souche productrice.....	222
II.2 Réactivation de la souche .....	23
II.3 Pré culture .....	23
II.4 Détermination des activités exoenzymatiques produites par <i>Nrr. bangenseA33<sup>T</sup></i> .....	23
II.4.1 Détermination de l'activité protéolytique.....	24
II.4.1.a Hydrolyse de la caséinase.....	24
II.4.1.b Hydrolyse de la gélatine .....	24
II.4.2 Détermination de l'activité amylolytique .....	24
II.4.3 Détermination de l'activité estérasiq ue .....	24
II.4.4 Détermination de l'activité cellulolytique.....	25
II.5 Test de sensibilité aux enzymes protéolytiques .....	27
Préparation de l'enzyme protéolytique.....	27
Chapitre III Résultats et discussion .....	28
III.1 Revivification de la souche .....	29
III.2 Résultats des variations du pouvoir lytique exoenzymatiques de <i>Nrr.BangenseA33<sup>T</sup></i> .....	29
III.2.1 Effet de la température sur les activités exoenzymatiques de l'halobactérie .....	29
III.2.1.1 Variation de l'activité protéolytique.....	31
III.2.1.2 Variation de l'activité de de la gélatinase.....	31
III.2.1.3 Variation de l'activité amylolytique .....	32
III.2.1.4 Variation de l'activité cellulolytique.....	32
III.2.2 Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction de la teneur en sel du milieu.....	33

<b>III.2.2.1</b>	<b>Variation de l'activité protéolytique.....</b>	<b>34</b>
<b>III.2.2.2</b>	<b>Variation de l'activité de la gélatinase.....</b>	<b>35</b>
<b>III.2.2.3</b>	<b>Variation de l'activité amylolytique .....</b>	<b>36</b>
<b>III.2.2.4</b>	<b>Variation de l'activité cellulolytique.....</b>	<b>38</b>
<b>III.2.3</b>	<b>Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction du pH.....</b>	<b>39</b>
<b>III.2.3.1</b>	<b>Variation de l'activité protéolytique.....</b>	<b>40</b>
<b>III.2.3.2</b>	<b>Variation de l'activité amylolytique .....</b>	<b>40</b>
<b>III.2.3.3</b>	<b>Variation de l'activité cellulolytique.....</b>	<b>41</b>
<b>III.2.4</b>	<b>Résultats du test de sensibilité à une enzyme protéolytique.....</b>	<b>41</b>
<b>III.2.5</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>42</b>
	<b>Conclusion .....</b>	<b>46</b>
	<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>47</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>54</b>
	<b>Résumé .....</b>	<b>59</b>



# *Introduction*

Tous les organismes vivants ; des bactéries jusqu'aux êtres humains ; dépendent pour leur existence de catalyseurs biologiques; appelées enzymes ; des micromachines composées de protéines ; capables de réaliser des tâches biochimiques très précises.

La diversité métabolique et physiologique des microorganismes en a fait la source la plus importante des produits naturels biologiquement actifs. Les microorganismes sont des systèmes d'étude gérables; qui fournissent des temps de génération rapides, une flexibilité génétique, et une échelle expérimentale inégalée (**Lee *et al.*, 2016**).

Sous ce profil ; ils furent exploités pour répondre aux besoins et aux désirs des humains, c'est-à-dire pour préserver le lait, les fruits et les légumes, et pour améliorer la qualité de vie avec les boissons, les fromages, le pain, les aliments marinés et le vinaigre qui en résultaient (Schaechter 2009). En raison de leur énorme arsenal enzymatique ; les microorganismes sont aujourd'hui, très prisés dans de nombreux domaines de la biotechnologie; tels que l'industrie alimentaire, la production des détergents, la production pharmaceutique, le traitement du cuir et des tissus et l'industrie du papier (**Brahmachari *et al.*, 2016**).

Les extrémophiles sont des organismes vivants qui ont la capacité de croître dans des conditions où les organismes normaux ne sont pas en mesure de survivre. Ces organismes sont toujours attirés vers des conditions telles que des températures extrêmement élevées et basses, un pH acide ou basique extrême, une exposition élevée aux radiations, une salinité élevée, une pression faible ou élevée, une croissance en présence de déchets toxiques, les solvants organiques, les métaux lourds etc. Selon les conditions de croissance, les extrémophiles sont classés en organismes extrémophiles et extremotolerants. La catégorie extremophile comprend les organismes qui ont la capacité de se développer dans une ou plusieurs conditions environnementales extrêmes, tandis qu'extremotolerant comprend les organismes qui se développent normalement dans des conditions optimales, mais qui peuvent également survivre à l'exposition à des conditions environnementales extrêmes (Salwanet *al.*, 2020).

Comme tous les microorganismes ; ces extrémophiles peuvent sécréter des métabolites essentiels à leur croissance et au développement comme les pigments, des alcools, des acides...

En raison de la capacité d'adaptation aux conditions hostiles, telles que les fortes concentrations en sel; les halophiles présentent un groupe intéressant de microorganismes avec leurs biomolécules aux propriétés singulières à savoir les enzymes; qui ont très vite attiré l'attention des biotechnologues (Singh *et al.*, 2018).

Certes; les enzymes ordinaires ou classiques présentent des performances relativement moyennes au regard des contraintes liées aux procédés industriels. En effet, elles ne sont actives que dans des gammes de températures ou de pH très réduites. Elles sont inactivées en présence de solvants, ou de concentrations salines inappropriées. Or les enzymes issues de microorganismes extrémophiles peuvent apporter une solution à ces divers problèmes (Arora&Panosyan, 2019).

De surcroît; les enzymes produites par les microorganismes halophiles et halotolérants sont naturellement stables et fonctionnelles à des concentrations élevées en sel. Leur utilisation dans des applications industrielles ne se limite pas uniquement à cette particularité, car elles sont généralement tolérantes aux températures élevées et stables en présence de solvants organiques, offrant ainsi plusieurs avantages dans des applications biotechnologiques (De Lourdes Moreno *et al.*, 2013).

Isolée de milieux extrêmes d'Ouargla par Khallef *et al.* (2018); l'haloarchée *Natronorubrumbangense* A33<sup>T</sup>; est dotée d'une panoplie d'exoenzymes. L'objectif de ce présent travail est la détermination des plages d'activités lytiques exoenzymatiques de cette haloarchée; sous les conditions opératoires, de température, de pH et de salinité.

Cette étude est scindée en trois parties :

- La première partie présente une synthèse bibliographique relative aux environnements extrêmes et les microflore qui les peuplent ; ainsi qu'un aperçu sur leurs intérêts biotechnologique ;

La deuxième partie indique les différentes méthodes suivies pour la détermination de des intervalles des activités lytiques des exoenzymes de cette souche ; en outre la stabilité des activités lytiques

- La troisième partie expose les résultats obtenus en les comparants à d'autres, et finalement une conclusion qui relate les perspectives du travail réalisé.

# *Chapitre I*

## *Revue bibliographique*

## I.1 Les extrêmophiles

La vie de tous les organismes vivants est contrôlée par divers facteurs biotique et abiotique. Un environnement normal pour un organisme, est défini par une certaine gamme pour chacun de ces différents facteurs qui se situeraient approximativement à des valeurs de température de 4 à 40°C, pH de 5 à 8,5 et a une salinité entre celle de l'eau douce et celle d'eau de mer (0%-3.5%) et une pression inférieure à (20MPa) (**Kristjansson *et al.*, 1995**).

En dehors de la plage normale la diversité des espèces diminue et le stress environnemental augmente là le milieu est inhabituel « extrême » (**Albers *et al.*, 2001**).

Un organisme extrémophile est celui qui peut survivre au moins loin d'un de ces valeurs sans stress et sans vie ralentie (latence) (**Kristjansson *et al.*, 1995**).

Les extrêmophiles sont un groupe d'organismes qui se développent dans un large éventail de conditions environnementales extrêmes. Ces microorganismes sont divers et sont classés en :

- Thermophiles : Organismes nécessitant des températures de croissance optimales de 50 °C ou plus. Dans le cas des hyperthermophiles, l'optimum peut se situer entre 80 °C et 110 °C ;
- Halophiles : Organismes nécessitant au moins 0,2 M (3 % à 30 %) de sel pour leur croissance ;
- Psychrophiles : Organismes nécessitant des températures de croissance optimales de 15 °C ou moins et incapables de croître à plus de 20 °C ;
- Alcaliphiles : Organismes présentant une croissance optimale à un pH supérieur à 10 ;
- Acidophiles : Organismes dont la croissance optimale est égale ou inférieure au pH 2 ;
- Piézophiles ou barophiles : Organismes qui vivent de façon optimale à haute pression hydrostatique (**Salwan *et al.*, 2020**).

Ainsi ; en dépit des conditions environnementales extrêmes qui régissent certains milieux ; ces microorganismes font l'exception et s'y développent. Il serait intéressant de donner un aperçu sur leurs spécificités.

### I.1.1 Les psychrophiles

Les psychrophiles sont des microorganismes adaptés au froid et qui peuvent vivre dans divers environnements : régions arctiques, glaciers pour des températures négatives, océans profonds pour des températures légèrement positives (autour de 4°C); selon la classification la plus courante (**Allen et al., 2002**).

Ce sont des micro-organismes avec une température de croissance optimale de 15 °C ou moins, une température de croissance maximale de 20 °C ou moins et une température de croissance minimale de 0°C ou moins. Plusieurs genres comme *Halomonas*, *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Williamsia*, *Tsukamurella*, sont présents dans des environnements constamment froids comme les océans avec une température moyenne de 5 °C, glace de mer, champs de neige et glaciers et sédiments marins, etc. Les psychrophiles sont incapables de survivre à une température supérieure à 20 °C, ils peuvent être tués par exposition à la température ambiante (**Allen, Pathom-Aree et al., 2002, 2006a, 2006b**).

Les psychrotrophe sont les micro-organismes qui peuvent se développer à 0 °C mais ont une température optimale de 20-40 °C. Ils sont plus susceptibles de se trouver dans des environnements saisonnièrement froids. Les psychrotrophe comme *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, sont plus abondants dans la nature que les psychrophiles. Ils peuvent être isolés des sols et de l'eau dans les climats tempérés (**Damicet et al., 2006**).

### I.1.2 Les acidophiles

Un acidophile est un organisme qui affiche un pH optimal pour la croissance à une valeur significativement < 7. Il n'y a pas d'accord commun sur la limite de pH qui délimite l'acidophilie, mais un guide utile est que les acidophiles extrêmes ont un pH optimal pour une croissance de < 3,0 tels que *Acidithiobacillusferrooxidans* et l'archaea *Thermoplasmaacidophilum*, *Picrophilustorridus*, *Sulfolobustokodaii* et *Ferroplasmaacidarmanus* (**Gerdayer et al., 2007**). Les acidophiles modérés eux ; se développent de manière optimale à un pH de 3 à 5 comme *Thiomonas* spp. et *Acidobacteriaceae*, certains *Alicyclobacillus* spp, *Sulfolobus* spp (**Johnson et al., 1998**).

Certains processus biologiques produisent de l'acidité, comme la fermentation et la nitrification, l'oxydation du soufre élémentaire et des minéraux sulfurés ; peut entraîner la production d'une quantité suffisante d'acide sulfurique pour submerger la capacité tampon de pH des milieux terrestres et aquatiques, et c'est ce processus, qui est responsable de

l'apparition de la plupart des niches extrêmement acides trouvées sur notre planète. De tels sites peuvent se former naturellement : zones volcaniques où le soufre élémentaire (formées par la condensation du sulfure d'hydrogène et du dioxyde de soufre dans les gaz volcaniques) est oxydé par des archées et des bactéries oxydantes du soufre, souvent à des températures élevées. Les niveaux élevés d'acidité qui en résultent entraînent la destruction partielle ou complète des minéraux dans les environs et la formation de vases acides (ex. dans les champs de solfatara du parc national de Yellowstone, dans le Wyoming, à Whakarewarewa, en Nouvelle-Zélande et à Krisuvik, en Islande) (**Johnson et al., 2001**).

### **I.1.3 Les alcaliphiles**

Il y a deux catégories de microorganismes qui peuvent croître à pH élevé. Les microorganismes tolérants aux alcalis ; qui peuvent croître à pH alcalin (pH de 8 à 9), mais leur taux de croissance est plus élevé autour du pH neutre. De nombreuses souches de *Bacillus spp* non alcaliphiles, sont capables de croître à pH 9, mais pas à pH 10, et leur pH de croissance optimal est d'environ pH 7 à 8 (**Priestet al., 1998**).

Les microorganismes alcaliphiles sont définis comme des microorganismes qui peuvent croître à un pH supérieur à 10 et/ou croître de façon égale ou supérieure (en termes d'intensité de croissance ou de vitesse) à un pH supérieur à 9, comparativement à ceux qui croissent à un pH de 7 à 8. Ces microorganismes peuvent être divisés en microorganismes facultatifs alcaliphiles, se développant bien à pH neutre, et alcaliphiles obligatoires, se développant bien à pH supérieur à 8 ex : *Bacillus alcalophilus* (**Thongaramet al., 2003**).

Les micro-organismes alcaliphiles peuvent être isolés à partir de sols de jardin ordinaires (**Horikoshi et al., 1991**), lacs de soude (en Afrique, Europe et Amérique du nord) ou bien des océans, cependant les alcaliphiles ont été isolés non seulement de sols alcalins mais également à partir des sols acides (**Gerdayet al., 2007**).

### **I.1.4 Les piézophiles**

Le terme piézophile (en grec piézo = presser et philo = aimer) a été officiellement introduit en 1995, pour décrire les micro-organismes barophiles (**Yayanoset al., 1995**). Les piézophiles sont généralement définis comme les organismes qui présentent des taux de reproduction optimaux à des pressions >0,1 MPa. Les hyperpiézophiles peuvent être définis comme les organismes qui affichent des taux de croissance optimaux à des pressions >60 MPa. Ils peuvent être classés en fonction de leurs plages de température de croissance (psychro-, méso-, thermo-, hyperthermophiles), ainsi peuvent être des espèces

piézophilestelles que *Colwelliapiezophilabactérie* ( $T_{opt}^{\circ} : 10^{\circ}\text{C}$  ;  $P_{opt} : 60 \text{ MPa}$ ) et l'arche *Paleococcusferrophilus* ( $T_{opt}^{\circ} : 83^{\circ}\text{C}$  ;  $P_{opt} : 30 \text{ MPa}$ ) (Nogiet *al.*,2004 ; Bartlett, Akaiet *al.*, 1992,2000).

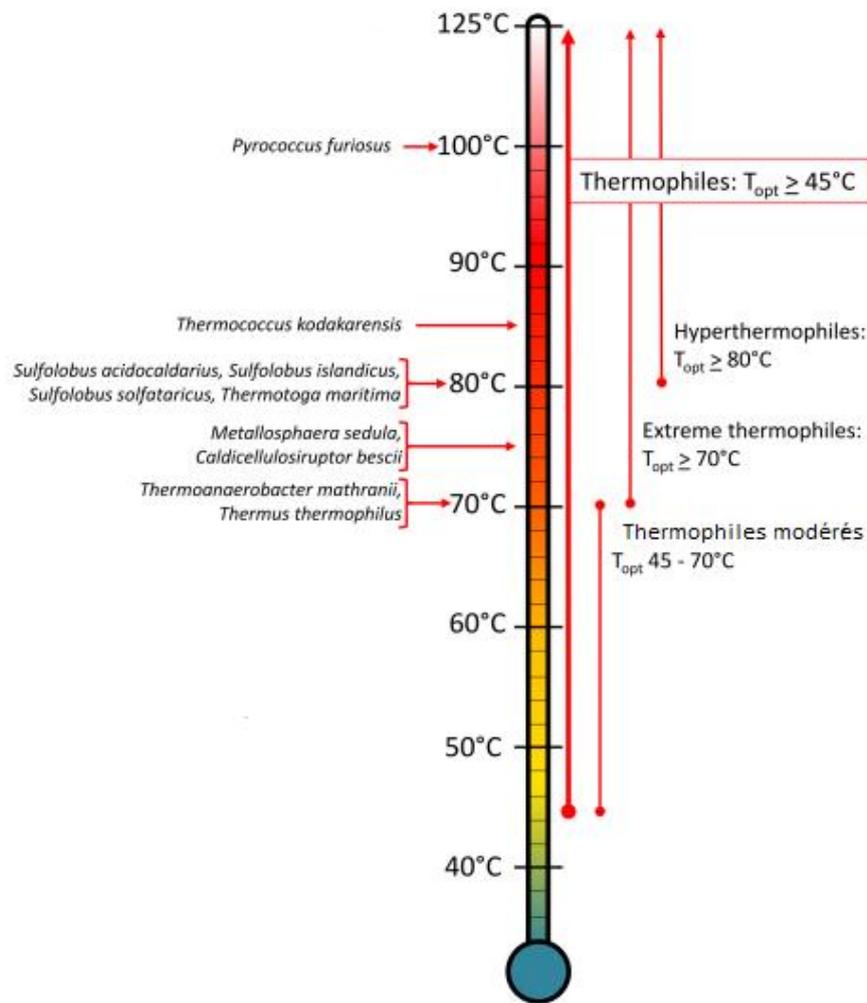
### I.1.5 Les thermophiles

La température, en tant que facteur environnemental, limite tous les micro-organismes vivants. Contrairement aux limites supérieures de température, les limites inférieures de température pour la croissance des micro-organismes ne sont pas bien définies (N. J. Russell *et al.*,1990).

De façon générale, les micro-organismes qui « aiment » la chaleur sont connus sous le nom de thermophiles. Le terme signifie différentes plages de température pour différents groupes de microorganismes.

Les bactéries et les archées peuvent être classées selon leur température de croissance optimale, comme suit : mésophiles entre ( $20\text{--}45^{\circ}\text{C}$ ); thermophiles ( $45\text{--}80^{\circ}\text{C}$ ) et hyper thermophiles ( $>80^{\circ}\text{C}$ ). Classement repris de façon explicite par la figure 1 (Stetter,Cavicchioliet *al.*, 1996, 2000).

Tout organisme ayant une température optimale supérieure à  $45^{\circ}\text{C}$  est classé comme thermophile, mais cette gamme est extrêmement large. Par conséquent, les thermophiles ont été subdivisés en thermophiles modérés qui se développent de manière optimale entre 45 et  $70^{\circ}\text{C}$ , thermophiles extrêmes qui se développent de manière optimale à  $70^{\circ}\text{C}$  et plus, et hyperthermophiles qui se développent de manière optimale à  $80^{\circ}\text{C}$  et plus (Zeldeset *al.*, 2015).



**Figure 1** : Thermophiles extrêmes génétiquement tractables et leurs températures de croissance optimales (Zeldeset *al.*, 2015).

Compte tenu de la contrainte des températures élevées comme une exigence environnementale, les thermophiles sont toujours en mesure d'exploiter un éventail diversifié d'habitats sur Terre.

- a) **Les environnements non anthropiques** : comme les sources chaudes, les geysers, les solfatares, sont concentrés dans les régions volcaniques actives à travers le monde (Waring, 1965). La zone du parc national Yellowstone en Amérique du Nord, contient la plus grande concentration de caractéristiques géothermiques sur Terre et a été le site des premières études de la vie à haute température, datant de 1897, comme mentionné par (Reysenbach et Shock, 2002).
- b) **Les milieux thermiques marins**: peuvent se trouver sur les plages, tels que, Hot Water Beach (Nouvelle-Zélande), Pozzuol (Italie) ou Savusavu (îles Fidji) (Waring *et*

*al.*,1965); ou sous un abîme 2,500 m d'eau, ou encore, aux sources hydrothermales en eau profonde (*Corliss et al.*, 1979). L'évacuation de l'eau peut dépasser 300 °C, dans les événements d'eau profonde, elle se refroidit rapidement en se mélangeant aux eaux froides profondes ; types d'habitat préférés des hyperthermophiles et des psychrophiles (*Cary, Kelley et al.*, 1998, 2002).

- c) **Les milieux thermiques souterrains** : comprennent les réservoirs de pétrole et les lacs et aquifères chauffés géothermiquement. L'activité dans les environnements souterrains varie selon la disponibilité des éléments nutritifs, de l'eau et de l'énergie en fonction de la profondeur et des matériaux sources (*Gold*, 1992).

### **I.1.6 Les halophiles**

Environ 70% de la surface de la planète Terre est recouverte d'eau de mer : un environnement salé qui contient environ 35g de sels dissous totaux par litre, dont 78% de NaCl. Bien que de nombreux micro-organismes soient incapables de résister à la salinité de l'eau de mer, le milieu marin ne peut être considéré comme "extrême", les mers sont peuplées par une énorme diversité de micro-organismes et de macroorganismes, au moins aussi divers que le monde des organismes d'eau douce.

Il existe des milieux avec des concentrations de sel beaucoup plus élevées que celles trouvées dans la mer. Lorsque les concentrations de sel augmentent, la diversité biologique diminue, et à des concentrations d'environ 150 à 200g/litre, les macroorganismes ne survivent plus. Néanmoins des micro-organismes très tolérants au sel et souvent même très exigeants en sel jusqu'aux plus fortes concentrations ; ont été isolés à partir des saumures saturées de NaCl dont les concentrations dépassent 300 g/litre.

Les archéobactéries halophiles et les algues unicellulaires eucaryotes vivent dans la mer Morte, dans le Grand lac salé, dans les étangs de cristallisation salée et dans d'autres environnements saturés de sel, et elles atteignent souvent de fortes densités dans de tels environnements.



**Figure 2** : Les milieux hypersalins, a. Grand lac salé, b. La mer Morte  
(www.istockphoto.com)

Les concentrations minimales, optimales et maximales de sel dépendent souvent de la composition du milieu et de la température de croissance. Kushner *et al.* (1978), ont distingué différentes catégories (Tableau 1) : Halophiles extrêmes (croissance optimale dans les milieux contenant du sel de 2,5 à 5,2 M) tels que *Salinibacter*, *Halomonas*, *Salicola* (Salwanet *al.*, 2020), halophiles extrêmes limites (croissance optimale dans les milieux contenant du sel de 1,5 à 4 M), halophiles modérés (croissance optimale dans les milieux contenant du sel de 0,5 à 2,5 M) et micro-organismes halotolérants qui ne montrent pas de besoin absolu de sel pour la croissance, mais qui poussent bien jusqu'à des concentrations de sel très élevées (considérés comme extrêmement halotolérant si la plage de croissance dépasse 2,5 M de sel) ex : *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum* (Salwanet *al.*, 2020).

Ces définitions et des définitions similaires se sont révélées utiles dans la classification des microorganismes en fonction de leur relation avec le sel (Orenet *al.*, 2002).

**Tableau 1** Catégories de micro-organismes halophiles (**Kushner, 1985; Hediét *al.*, 2009; in Khallef, 2019**)

Categories	Gamme (M)	Optimum	Gamme (%NaCl)	Optimum
Non Halophile	0 – 1,0	<0,2	0 - 6%	<1%
Halotolérant	0 - >1,0	<0,2	0 - >6%	<1%
Faiblement halophile	0,2 – 2,0	0,2 – 0,5	1 - 12%	1 - 3%
Halophile modéré	0,4 – 3,5	0,5 – 2,0	2,5 - 20%	3 - 11,5%
Halophile extreme "Borderline"	1,4 – 4,0	2,0 – 3,0	8 - 23%	11,5 – 17,5%
Halophile extreme	2,0 – 5,2	>3,0	11,5 – 30 %	>17,5%

Pour vivre à de fortes concentrations de sel, les organismes halophiles et halotolérants doivent maintenir un cytoplasme osmotiquement isotonique avec le milieu extérieur. Deux stratégies différentes ont été utilisées pour atteindre cet équilibre osmotique :

- La première option, chez les bactéries halophiles qui suivent la stratégie de « Salt out » accumulent des concentrations intracellulaires élevées de solutés compatibles, qui jouent un rôle important dans l'haloadaptation (**Da Costa, Welshet *al.*, 1998, 2000**).
- La deuxième stratégie « Salt in » consiste à maintenir des concentrations ioniques intracellulaires élevées, où  $K^+$  est le cation dominant au lieu de  $Na^+$  et l'adaptation de l'ensemble de la machinerie intracellulaire pour fonctionner en présence de sel élevé. Cette option est observée chez les archées halophiles aérobies de la famille des *Halobacteriaceae* (**Dennis et Schimmin 1997**).

#### **I.1.6.1 La famille des *Halobacteriaceae***

Tous les halophiles Archaea (aussi appelé Haloarchaea) appartiennent au règne *Euryarchaeota* et ont été classés dans un seul ordre *Halobacteriales* ; famille *Halobacteriaceae* (**DasSarmaet *al.*, 2009**).

La famille des *Halobacteriaceae* regroupe les halophiles par excellence. Ils constituent la principale composante de la biomasse microbienne dans des environnements comme la mer Morte, les lacs de soude hypersaline, les étangs de cristallisation salée et les mines de potasse.

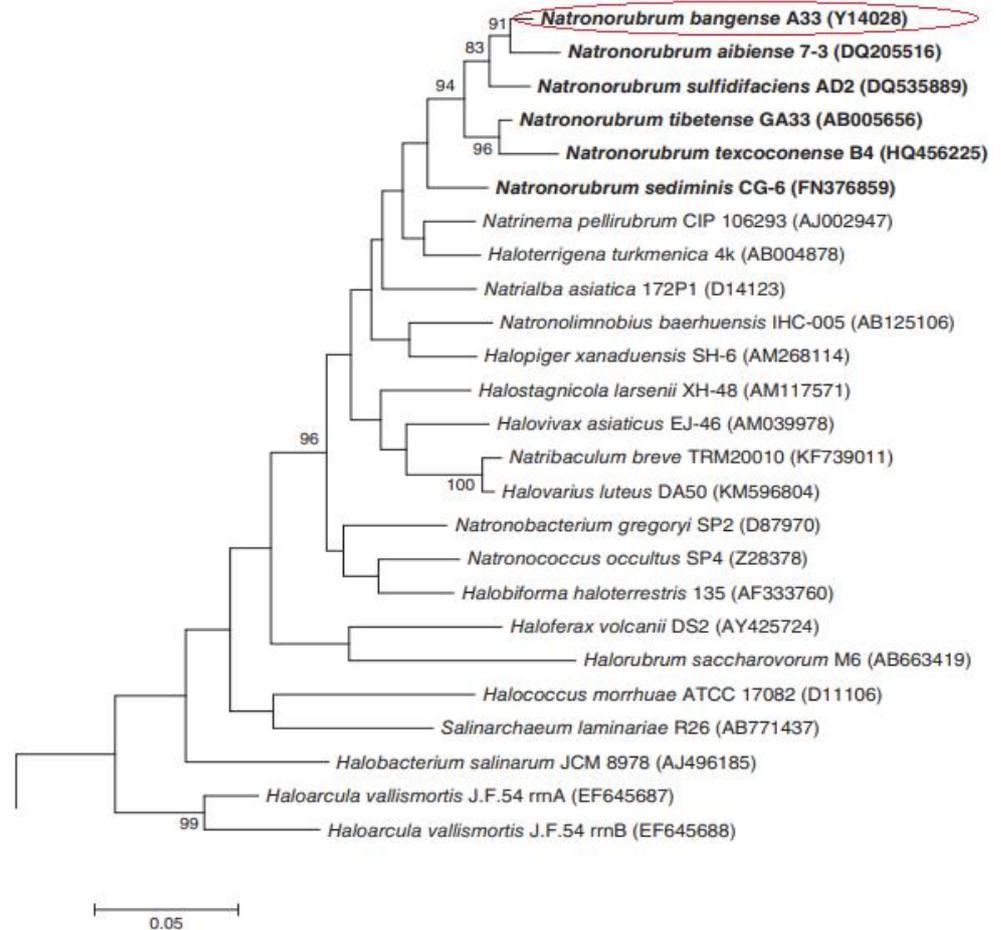
Les genres typiques (Fig.3) représentant cette famille; incluent *Halorubrum*, *Halogeometricum*, *Haloferax*, *Halosimplex* et aussi les *alkaliphiles* *Natronococcus* et *Natronomonas*, *Natronorubrum* (Streset *al.*, 2007).

Ces genres bactériens se caractérisent par des colonies de couleur rouge, rose, orange mauve et très rarement incolores. Cette coloration est due à la présence de la bactériorubine (pigment caroténoïde qui joue le rôle de protecteur contre les rayons solaires) et de la bactériorhodopsine qui participe à la synthèse d'ATP et au transport actif (Zemmouriet *al.*, 2017).

#### **I.1.6.1.1 Description du genre *Natronorubrum***

Na.tro.no.ru'brum. N.L. n. natron (dérivé arbitrairement de l'arabe n. natrun ou natron) soda, sodium carbonate ; N.L. pref. Natrono-, relatif à la soude ; L. neut. adj. rubrum, rouge ; N.L. neut. n. *Natronorubrum*, le rouge de soude (Orenet *al.*, 2015).

Ce genre se compose de cellules pléomorphes (triangulaires, carrées, discales et autres formes polygonales) ou en forme Bacille, Gram-négatif. Les colonies sont pigmentées rouge ou rose en raison de bactériorubérines. Des isolats de *Natronorubrum* (Fig.3) ont été obtenus dans des lacs alcalins du monde entier. Ce sont des hétérotrophes strictement aérobies. L'activité de la catalase est présente, et la plupart des espèces sont oxydases positives. La croissance nécessite au moins 1,7 à 2,1 M de NaCl ; les cellules sont lysées dans l'eau distillée. La croissance optimale est observée à 2,6 à 3,8 M de NaCl et à 37 à 47 C. La plupart des espèces sont alcaliphiles et leur pH varie de 8,0 à 11, avec un optimum de 9,0 à 9,5. Les milieux complexes sont nécessaires à leur croissance ; qui est stimulée par différents sucres, acides organiques et acides aminés. Les lipides polaires sont des dérivés C<sub>20</sub>C<sub>25</sub> du phosphatidylglycérol et de l'ester méthylique du phosphatidylglycérol phosphate (Orenet *al.*, 2015). L'espèce type est *Natronorubrum bangense* A33<sup>t</sup>.



**Figure 3:** Arbre phylogénétique à probabilité maximale montrant la position des espèces du genre *Natronorubrum* (Orenet *al.*, 2015).

### L'espèce *Natronorubrum bangense*

*Natronorubrum bangense* : Gram-, non mobile, les cellules sont extrêmement pléomorphes et plates. Oxydase et de catalase positives. La croissance anaérobie en présence de nitrate est impossible et le nitrate n'est pas réduit en nitrite. La croissance est observée à 2,1 à 4,3 M de NaCl et à un pH de 8,0 à 11,0. La croissance optimale est atteinte à 3,8 M de NaCl, à 45°C et à un pH de 9,5. La souche type a été isolée du lac de sel alcalin de 'Bange' au Tibet. Teneur en ADN G+C (mol%) : 59,9 (T° de fusion); 60,4 ; 60,24 (séquence génomique) (Orenet *al.*, 2015).

## I.2 Intérêts biotechnologiques des halophiles

Les microorganismes halophiles et halotolérants sont impliqués dans plusieurs applications industrielles telles que la production d'éctoïne utilisée pour la protection de la membrane cellulaire, protection de la peau anti-vieillesse. Diverses espèces produisent l'éctoïne telles que : *Halomonas elongata*, *Halomonas salina* (Salwanet *al.*, 2020).

La production des antibiotiques peptidiques potentiellement intéressants appelés halocines, qui inhibent les haloarchées phylogénétiquement liées ; produites par des souches telles que *Haloferax mediterranei*R4 (Litchfield, 2011).

Bactérorhodopsine une protéine lumière-dépendante ; utilisée comme pompe à protons sécrétée par les Haloarchaea comme *Halobacterium halobium* (Oren, 2010).

Sources d'enzymes comme les amylases, les cellulases, les estérases, les kératinases, les lipases, les pectinases, les peroxydases, les protéases et les xylanases (Salwanet *al.*, 2020).

Avant d'aborder le volet intérêt biotechnologique des enzymes; il est primordial de faire un bref rappel des classes d'enzymes la plus importantes au niveau industriel.

## I.3 Différentes classes d'enzymes

### ➤ Les protéases

Selon le Comité de la nomenclature de l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire, les protéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) (114a). Les protéases sont classées sur la base de trois critères principaux : (i) type de réaction catalysée, (ii) nature chimique du site catalytique, et (iii) relation évolutive par rapport à la structure (Barette *al.*, 1994).

Les protéases sont subdivisées en deux grands groupes :

- a) **Les exopeptidases** agissent seulement près des extrémités des chaînes de polypeptide. Selon leur site d'action au terminus N ou C, ils sont classés comme amino- et carboxypeptidases, respectivement.

Dans ce groupe existent :

- Les aminopeptidases (EC.3.4.11).
- Les carboxypeptidases (EC.3.4.16–3.4.18).

b) **Les endopeptidases** (EC3.4.21–3.4.34) sont caractérisées par leur action préférentielle aux liaisons peptidiques dans les régions intérieures de la chaîne de polypeptide loin des terminus N et C. La présence du groupe des acides aminés libres ou des carboxyles a une influence négative sur l'activité enzymatique. Les endopeptidases sont divisées en quatre sous-groupes en fonction de leur mécanisme catalytique (**Rawlings et al., 1993**) :

- Sérine protéase (EC.3.4.21).
- Protéases aspartiques (EC.3.4.23).
- Cystéine protéase (EC.3.4.22).
- Métalloprotéases (EC.3.4.24).

Au moins 29 espèces *Bacillus* produisent des protéases sont utilisées dans l'industrie tels que *Bacillus licheniformis*, alcalophile *Bacillus sp*, and *Aspergillus sp* (**Brahmachari et al., 2016**).

#### ➤ **Les cellulases**

La cellulase catalyse la décomposition du polysaccharide cellulosique en décomposant simplement les liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques. Selon la nomenclature des enzymes de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire, les cellulases bactériennes sont regroupées dans la (EC 3.2.1.4) et sont incluses dans quatorze familles d'hydrolases glycosiles (GH) (**Menendez et al., 2015**).

La cellulase se compose de trois enzymes :  $\beta$ -glucosidase, endo-1,4- $\beta$  D-glucanase (endoglucanase) et exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (exoglucanase). Ces trois enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de la cellulose par l'action synergétique pour l'hydrolyse accomplie et efficace de la cellulose (**Patel et al., 2019**).

Enzymes inductibles; les cellulases sont synthétisées par une grande diversité de micro-organismes parmi eux, les genres *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma*, et *Aspergillus* (**Brahmachari et al., 2016**).

#### ➤ **Les amylases**

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon pour donner divers produits, y compris les dextrines et les polymères progressivement plus petits composés d'unités de glucose (**Windish et al., 1965**).

Les amylases peuvent être divisées en deux catégories, les endo-amylases et les exo-amylases.

- a. Les endoamylases : catalysent l'hydrolyse de manière aléatoire à l'intérieur de la molécule d'amidon. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de différentes longueurs de chaîne.
- b. Les exoamylases : Hydrolysent à partir de l'extrémité non réductrice, résultant successivement en produits à extrémité courte.

Les enzymes de ce groupe ont été purifiées et caractérisées à partir d'un large éventail de micro-organismes, y compris les *archaea* tels que *Sulfolobus*, les procaryotes tels que *Bacillus* (Pandey *et al.*, 2000).

#### ➤ Les estérases et lipases

Les estérases (EC 3.1.1.X) constituent un groupe diversifié d'hydrolases qui catalysent le clivage et la formation de liaisons ester.

Deux grandes classes d'hydrolases sont de la plus haute importance :

Les « vrais » estérases (EC 3.1.1.1, hydrolases d'esters carboxyliques) et les lipases (EC 3.1.1.3, hydrolases de triacylglycérol) (Bornscheuer *et al.*, 2002).

Ces enzymes ont des applications dans les industries des détergents, des aliments pour animaux, des produits pharmaceutiques, des textiles, du cuir, des pâtes et papiers (Salwan *et al.*, 2020). Les microorganismes produisant les estérases et les lipases utilisées dans l'industrie sont *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Burkholderiamultivorans*, *Bacillus alcalophilus* (Brahmachari *et al.*, 2016).

### I.4 Intérêts biotechnologiques des exoenzymes microbiennes

#### I.4.1 L'industrie agroalimentaire

- a. **Amidonnerie** : L'utilisation d'enzymes de dégradation de l'amidon a été la première application à grande échelle d'enzymes microbiennes dans l'industrie alimentaire. Deux enzymes principales effectuent la conversion de l'amidon en glucose : l'alpha-amylase (comme celle de *B. subtilis* et *B. licheniformis*) et la glucoamylase (Pandey *et al.*, 1995, 2000).

- b. **Secteur de la boulangerie** : Des protéases sont ajoutées au cours du processus de fermentation ; telle que la protéase de *Bacillus subtilis* est utilisée pour solubiliser les protéines des suppléments d'orge (**Thakuret et al., 2018**).

Des cellulases de *Humicolainisolens*, *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger* ont été utilisés pour réduire le fourrage grossier dans la pâte (**Chandrasekaran et al., 2012**).

Les alpha-amylases ont été le plus souvent étudiées en lien avec l'amélioration de la qualité du pain et l'augmentation de la durée de conservation. Une amylase maltogène thermostable de *Bacillus stearothermophilus* est utilisée dans l'industrie de la boulangerie (**Van Der Maarelet et al., 2002**).

- c. **Industrie laitière** : Les protéases aspartiques acides sont utilisées comme enzymes de coagulation du lait dans la fabrication du fromage en raison de leur capacité caractéristique à coaguler les protéines du lait pour former des cahiers avec la libération associée de lactosérum.

Les lipases agissent sur les matières grasses du lait par hydrolyse ou synthèse de nouveaux esters, qui donneront les saveurs caractéristiques aux fromages (**Battistottiet et al., 1993**).

#### **I.4.2 Autres applications dans le secteur alimentaire**

Les pectinases et les amylases sont utilisées dans la clarification du jus (**Younet et al., 2004**). L'une des nouvelles applications de l' $\alpha$ -amylase dans l'industrie a été de ralentir le rassissement des produits cuits, à l'origine de la réduction de la durée de vie de ces produits.

La lipase halophile LipBL de *Marinobacter lipolyticus* SM19 a été utilisée pour hydrolyser l'huile d'olive et de poisson, ce qui a permis d'enrichir l'acide eicosapentanoïque (EPA), un acide gras oméga-3 à haute valeur nutritionnelle (**Perez et al., 2011**).

#### **I.4.3 Industrie du papier et de la pâte à papier**

L'utilisation de la cellulase offre de nombreux avantages par rapport à la xylanase, comme l'amélioration du score de luminosité final et l'amélioration de la décoloration de la pâte kraft de résineux. Principalement, les cellulases fongiques en particulier *Aspergillus niger* et *Trichoderma reesei* sont utilisés (**García et al., 2002**).

Afin d'améliorer la blancheur du papier et réduire les taches d'encre persistantes ; l'usage de la lipase de *Pseudomonas sp* est de coutume (**Kawamoriet al.,1993**).

L' $\alpha$ -amylase de *Bacillus subtilis* est largement utilisée dans l'industrie des pâtes et papiers. Comme pour les textiles, le calibrage du papier est effectué pour protéger le papier contre les dommages mécaniques pendant le traitement. Il améliore également la qualité du papier fini ; sa rigidité et sa résistance. (**Tollanet al., 1996**).

#### **I.4.4 Le traitement du cuir et du tissu**

La plupart des études de désherbage utilisant la protéase extracellulaire ont été rapportées à partir de *Bacillus*, plus spécifiquement à partir de *B. subtilis* S14 (**Khambhaty 2020**).

#### **I.4.5 Applications dans les détergents**

L'industrie des détergents utilise environ 25 à 30 % du total des enzymes industrielles. Environ la moitié des détergents disponibles sur le marché contiennent des enzymes dans leurs formulations.

Les  $\alpha$ -amylases sont utilisées dans les détergents à lessive en poudre depuis 1975 (**Kottwitzet al., 1994**).

Des exemples d'amylases utilisées dans l'industrie des détergents proviennent de *Bacillus* ou d'*Aspergillus* (**Souzaet al.,2010**).

Diverses protéases ont été signalées chez *Acinetobactersp*, *Bacillus cereus*, *Colwelliasp.*, *Curtobacteriumluteum*, *Exiguobacteriumundae Su-1* et *Stenotrophomonasp*. Pour l'industrie des détergents (**Salwanet al., 2018**).

L'industrie des détergents fait appel aux estérases et lipases aux caractéristiques spécifiques, pouvant dissoudre les graisses par hydrolyse (**Kulkarniet al.,2002**).

#### **I.4.6 L'industrie du textile**

Les cellulases fongiques de *Trichodermareesei* sont les enzymes principalement appliquées dans l'industrie du textile. En outre, les actinomycètes des genres *Streptomyces* et *Thermobifida* et d'autres genres de bactéries, comme *Pseudomonas* et *Sphingomonas*, sont quelques-unes des sources d'enzymes à utiliser pour la décoloration et la dégradation des teintures textiles (**McMullanet al.,2001**).

#### **I.4.7 Biocarburant à partir de la biomasse**

Le terme biodiesel ou biocarburant désigne les esters méthyliques et éthyliques des acides gras monoalkyles, qui sont analogues à ceux dérivés du pétrole et utilisés comme carburant. Le biodiesel est obtenu par transestérification d'huiles végétales avec de l'alcool éthylique ou méthylique, dans des conditions physiques de pH et de température élevés. Pour réduire les déchets de réaction chimique de transestérification et l'énergie du processus, plusieurs lipases (psychrophiles, mésophiles et thermophiles) ont été testées sur des huiles végétales dans ce but. A titre d'exemple le *Fusariumsolani* NFCCL 4084 ; produit une lipase halophile pour la production de biodiesel (Luo, Chandraet al 2006, 2020).

#### **I.4.8 Applications enzymatiques dans les secteurs de la pharmacie et médecine**

Avec l'avènement de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre des applications des enzymes s'est étendu à de nombreux autres domaines, tels que la chimie clinique, médicinale et analytique.

En médecine ; l'application de la cellulase pour la dégradation des parois cellulaires des organismes pathogènes (Rinaudoet al., 2006).

Une lipase thermostable a la capacité de catalyser dans la bioénergie, la trans estérification de l'huile de palme aux MPF également résistant aux solvants organiques obtenus à partir d'*Acinetobacterbaylyi*(Chandra et al 2020).

Il a également été observé que certaines protéases peuvent avoir un impact négatif sur certaines tumeurs et peuvent donc avoir une valeur thérapeutique. On a observé que la nécrose tumorale et la solubilisation étaient induites par micro-injection de tumeurs solides avec les protéases de *Serratiamarcescens*.

La protéase extracellulaire, la streptokinase, produite par l'espèce hémolytique *Streptococcus*, qui a la capacité de dissoudre rapidement les caillots, est utilisée pour traiter le blocage aigu des artères (OP Ward et al.,2011).

*Chapitre II*

*Matériel et méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire l'école normale supérieure Ouargla, du laboratoire de recherche Bioressources Sahariennes et du centre de recherche et d'analyse physico-chimique (CRAPC).

Notre étude est une suite de celle menée en 2019, sur une archea halophile ; qui a mis l'accent sur la présence d'un potentiel exo enzymatique variée dans le surnageant de culture de la souche en question. L'objectif du présent travail est la détermination des intervalles pH ; température et salinité des activités catalytiques dont est doté cette Haloarchaea. L'ensemble du matériel et appareillage utilisé lors de cette recherche est porté en annexe 1.

## II. Matériel biologique

### II.1. Description de la souche productrice

La souche utilisée dans notre étude a été isolée des dépressions salées d'Ouargla, séquencées au niveau du laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) Paris-France par Khallef *et al.* (2019). Il s'agit de *Natronorubrum bangenseA33T*; appartenant de à la famille des *Halobacteriaceae*. Le genre *Natronorubrum* a été établi par Xu *et al.* (1999), le tableau ci-dessous, rapporte quelques propriétés de l'isolat.

**Tableau 2 :** Quelques caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche halophile (Khallef, 2019)

Caractéristiques	<i>Natronorubrum bangenseA33T</i>
Morphologie	Bacille
Gram	-
Mobilité	-
Pigmentation	Orange
Na Cl intervalle (%) (p /v)	10-25
Na Cl optimale (%) (p /v)	22.5
Intervalle T°C	20-45
Température Optimale °C	45
Intervalle pH	7-9.5
pH Optimale	9

## II.2 Réactivation de la souche

Le milieu de culture Brown (Br) est utilisé pour la revivification de la souche ; ce milieu répond aux exigences nutritionnelles des micro-organismes halophiles par sa concentration 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 2.

La souche purifiée conservée à 4°C, est incubée 48h à 37°C. Un inoculum de la souche est ensemencé par stries à la surface du milieu, qui sera remis 7 jours à l'étuve à 37°C.

## II.3 Pré culture

50ml du milieu (Br) liquide à 20% de NaCl (le même milieu ayant servi à leur revivification, sans addition d'agar) sont inoculés avec le contenu d'une boîte Pétri de la culture de la *Nrr.bangenses* A33<sup>T</sup> ; le tout introduit dans une Erlenmeyer de 250ml. L'incubation durera 7 jours à 37°C, sous une agitation de 150 trs/min (Yang *et al.*, 1992). La recherche des hydrolases se fera dans le surnageant de culture (SC) récupéré. L'annexe 3 regroupe toutes ces étapes.

## II.4 Détermination des activités exoenzymatiques produites par *Nrr. bangense*A33<sup>T</sup>

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

Un volume de 5µl du surnageant de culture (SC), sont déposés en spots, à la surface des boîtes, après séchage. Trois essais sont réalisés pour chaque substrat testé. Pour tous les tests effectués; les milieux seront incubés 7 jours. La teneur en NaCl des milieux préparés ; ainsi que les pH et températures d'incubation, suivront les intervalles mentionnés sur le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Paramètres et intervalles expérimentés

Paramètre	Variation des paramètres étudiés												
Salinité %	10	12	15	20	22.5	25	27.5	30	32.5				
pH	5	5.5	6	6.5	7	8	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12
Température °C	20	22.5	25	30	35	40	45	50	55	57	60	65	70

## II.4.1 Détermination de l'activité protéolytique

### II.4.1.a Hydrolyse de la caséine

Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de caséine. Ensemence par la méthode des spots et porté l'étuve; la présence de cette activité est détectée par un halo autour des spots indiquant une hydrolyse de la caséine (**Roxana et al., 2009**).

### II.4.1.b Hydrolyse de la gélatine

Le produit d'extraction (SC), est déposé en spots sur le 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 claires, qui indiquent la production d'une gélatinase (**Kim et Hoppe, 1986**).

## II.4.2 Détermination de l'activité amylolytique

La présence d'une amylase extracellulaire est déterminée par addition de 1% (p/v) d'amidon soluble. Le (SC) est déposé en spots à la surface du milieu. 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 (**Amoozegar et al., 2003**).

## II.4.3 Détermination de l'activité estérasique

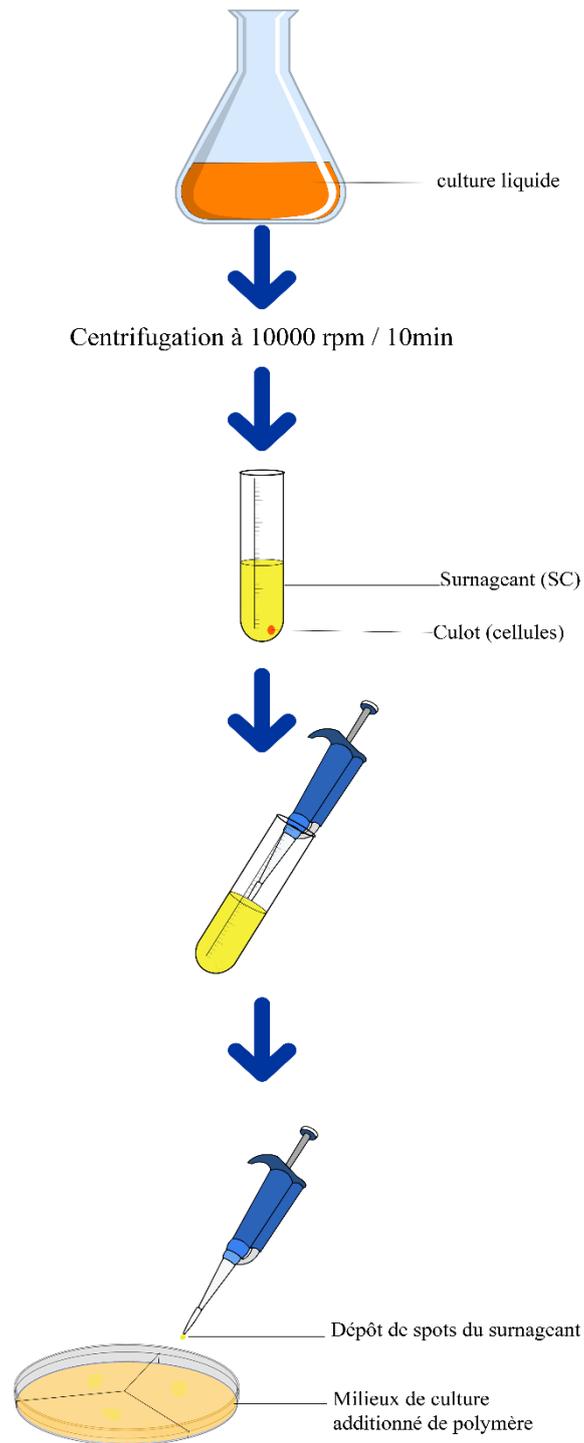
Le milieu additionné de 1% de Tween 80 est préconisé pour la recherche d'estérase (**Gonzalez et al., 1978**). Le produit de l'extraction (SC) est déposé en spots à la surface du milieu, le développement d'un halo autour des spots renseigne de la présence d'une activité estérasique.

#### **II.4.4 Détermination de l'activité cellulolytique**

La présence d'une cellulase est examinée sur milieu contenant 1% (p/v) de Carboxyle Méthyl Cellulose (CMC); suivant le mode opératoire appliqué précédemment. Après incubation les boîtes sont pulvérisées avec une solution de Lugol. L'apparition de zones claires autour des spots au bout de 10 à 12 minutes indique un résultat positif.

La figure 4, résume l'ensemble des étapes entreprises pour cette recherche

La culture sur milieux liquide de la souche *Nrr* pendant 7 jours sous agitation 150 trs/ min



- Test effectué pour chaque substrat (amidon, caséine, gélatine et CMC)

**Figure 4:** Protocole de la recherche des activités exo enzymatiques

## II.5 Test de sensibilité aux enzymes protéolytiques

La trypsine et la pepsine, deux enzymes protéolytiques utilisées à une concentration de 1mg/ml pour tester la nature des exoenzymes dévoilées par la souche extrême halophile.

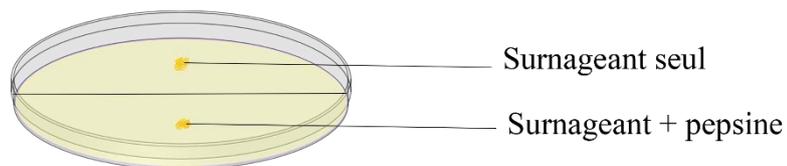
La trypsine et la pepsine ont des sites de coupures différents ; la première coupe la chaîne d'acides aminés au niveau d'un acide aminé basique (Lysine et arginine) et la deuxième coupe au niveau des acides aminés aromatiques (**Florimont, 2012**). Le test a été réalisé avec la pepsine uniquement.

### ▪ Préparation de l'enzyme protéolytique

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 un volume de 10 ml de la solution ; puis filtrée avec un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  et conservée à +4°C (**Benkerroumetal., 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 solidifier. Déposer à la surface des milieux; un spot de 50ul du (SC); et une autre du mélange (SC+pepsine) comme représenté dans le schéma ci-dessous. Après incubation à 37°C ; la lecture est faite par la mesure de la dimension de la zone formée autour des puits.



- Test effectué pour chaque substrat (amidon, caséine, gélatine et CMC)

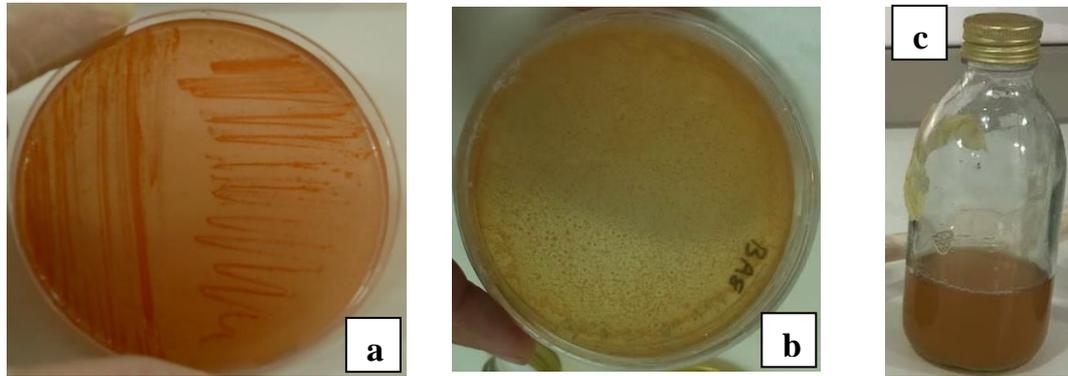
**Figure 5:** Schéma résumant le test de sensibilité à la pepsine par la méthode de diffusion des puits

## *Chapitre III*

### *Résultats et discussion*

### III.1 Revivification de la souche

La souche réactivée puis revivifiée sur milieu solide à 20% de NaCl; donne des colonies orange à contour régulier (Fig. a & b). Quant au le milieu (Br) liquide soumis à une incubation de 7 jours à 37°C sous agitation; il laisse apparaître une coloration en orange (Fig. c), témoignant d'une bonne croissance de l'isolat.



**Figure 6:** Aspect macroscopique de la souche réactivée sur milieu solide (a+b) et préculture sur milieu (Br) liquide(c)

### III.2 Résultats des variations du pouvoir lytique exoenzymatiques de *Nrr.BangenseA33<sup>T</sup>*

#### III.2.1 Effet de la température sur les activités exoenzymatiques de l'halobactérie

La méthode des spots appliquée avec l'isolat sur milieu (Br) supplémenté par différents substrats, révèle que seul le surnageant (SC) de la souche test laisse apparaître des résultats positifs, justifiés par la présence d'un halo observé à l'œil nu ou après l'ajout d'un révélateur spécifique. La souche montre un large éventail d'activités exo enzymatiques reporté sur le tableau

**Tableau 4** :Effets de la température sur les activités exoenzymatiques de l’halobactérie

Température	20	22	25	30	35	40	45	50	55	57	60	70
<b>Caséine</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Gélatine</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Amidon</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Tween 80</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CMC</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Présence de zone de lyse: Résultat positif (+)

Absence de zone de lyse : Résultat négatif (-)

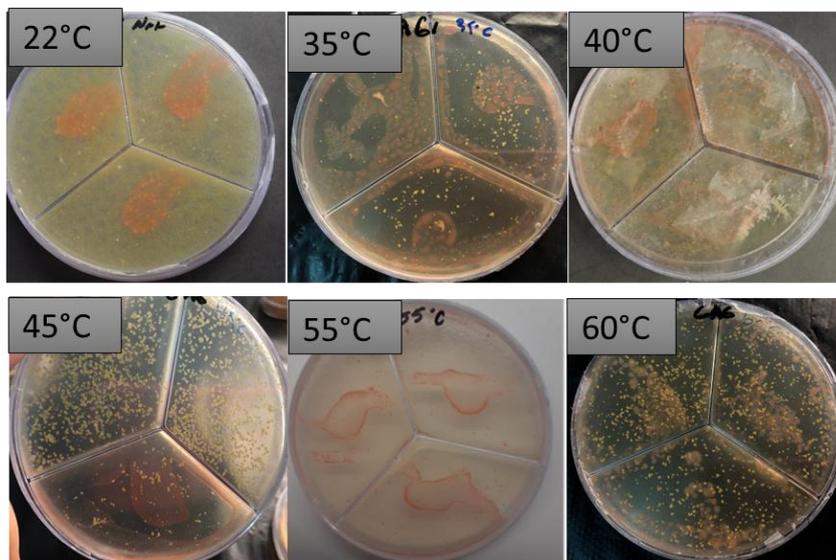
(+++): Résultat positif (trois répétitions)

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

La dégradation des différents polymères s'effectue sur une gamme de température de 22°C-50°C et exceptionnellement à 60°C; néanmoins aucune activité estérasique n'est observée.

### III.2.1.1 Variation de l'activité protéolytique

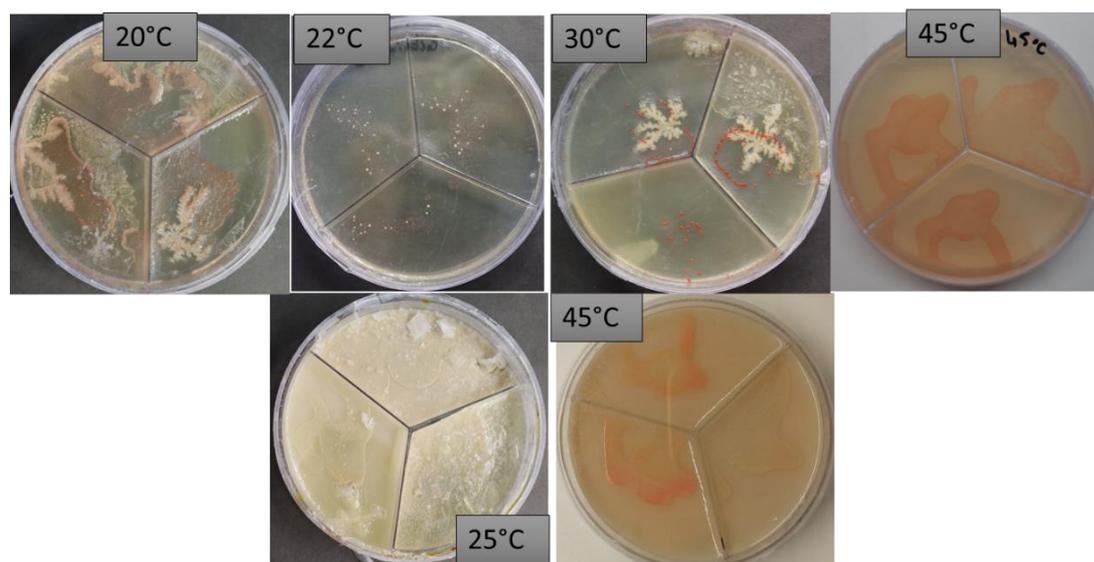
La caséinase est active sous des températures allant de 25-55°C; avec des halos bien pigmentés; l'optimum observé entre 40-45°C.



**Figure 7:** Activité caséolytique observée aux différentes températures

### III.2.1.2 Variation de l'activité de de la gélatinase

La gélatinase affiche pratiquement le même profil que la caséinase (Fig.9); non observée sous les 25°C avec limite supérieure à 50°C.

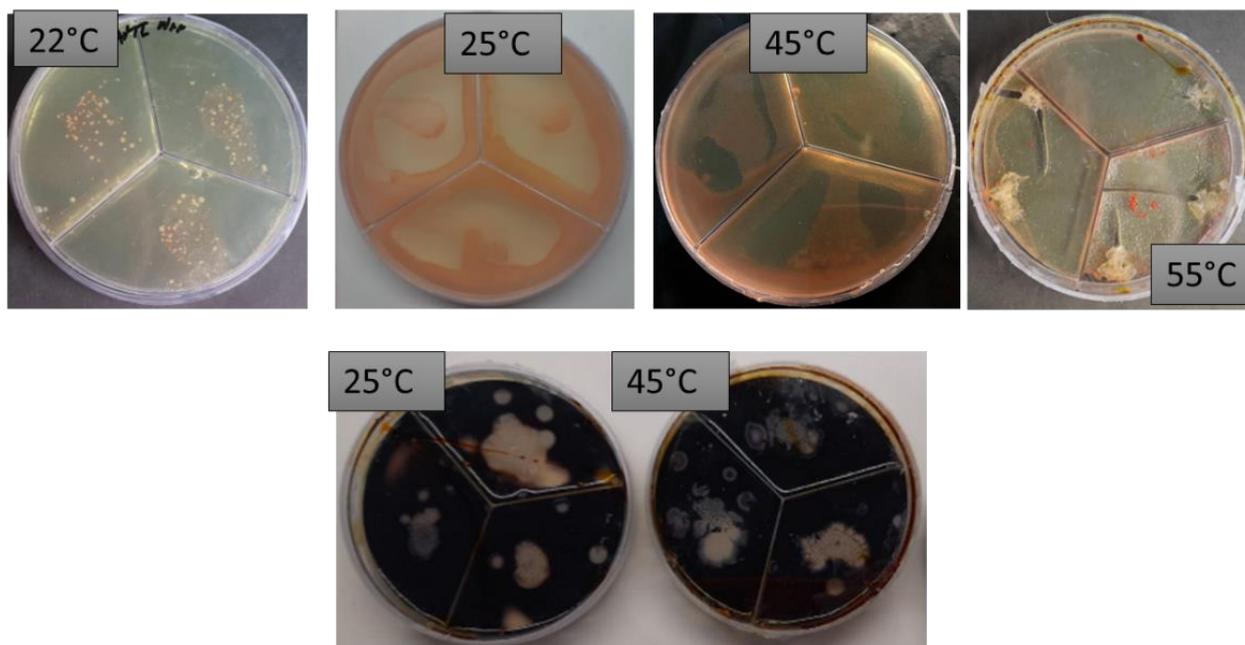


**Figure 8:** Activité de la gélatinase observée aux différentes températures

(Avant et après addition de TCA)

### III.2.1.3 Variation de l'activité amylolytique

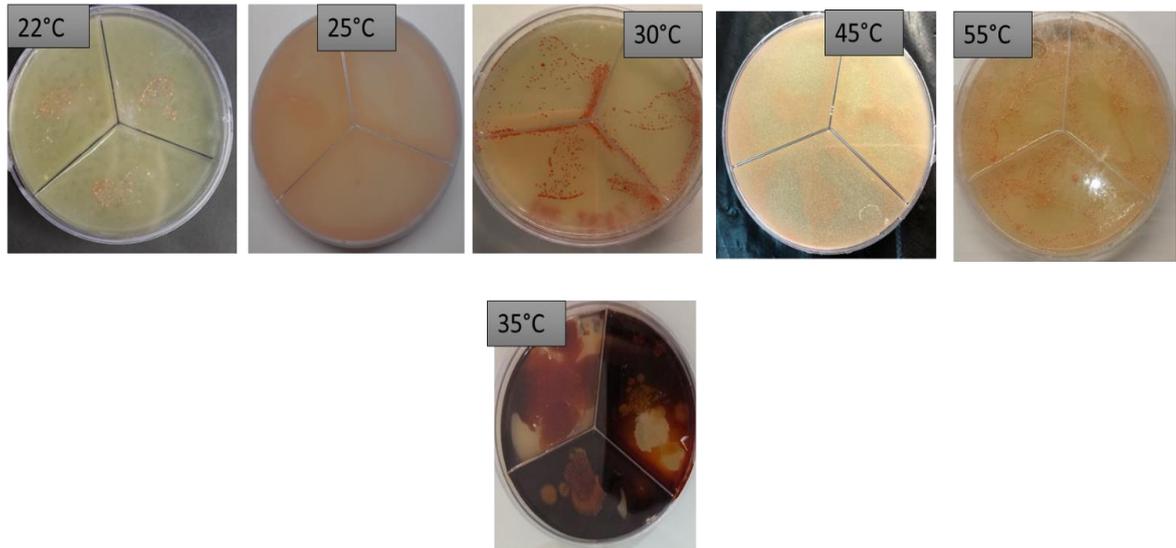
L'intervalle température permettant à l'amylase d'être active; se situe entre 25-50°C avec le même optimum retenu pour les autres hydrolases; 40-45°C.



**Figure 9:** Activité amylolytique observée aux différentes températures  
(Avant et après addition du Lugol)

### III.2.1.4 Variation de l'activité cellulolytique

Observée sur milieu à la CMC; la cellulase débute son activité à 25°C et ne s'observe plus au-delà de 55°C; elle est maximale entre 40-45°C.



**Figure 10:** Activité cellulolytique observée aux différentes températures

(Avant et après addition du Lugol)

### III.2.2 Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction de la teneur en sel du milieu

**Tableau 4:** Influence de la salinité sur les activités exoenzymatiques de l'halobactérie

Substrat Salinité %	Caséine	Gélatine	Amidon	CMC
10%	+++	+++	+++	+++
12%	+++	+++	+++	+++
15%	+++	+++	+++	+++
20%	+++	+++	+++	+++
22.5%	+++	+++	+++	+++
25%	+++	+++	+++	+++
27.5%	+++	- - -	+++	+++
30%	+++	- - -	+++	+++
32.5%	+++	- - -	+++	+++

Présence de zone de lyse: Résultat positif (+)

Absence de zone de lyse : Résultat négatif (-)

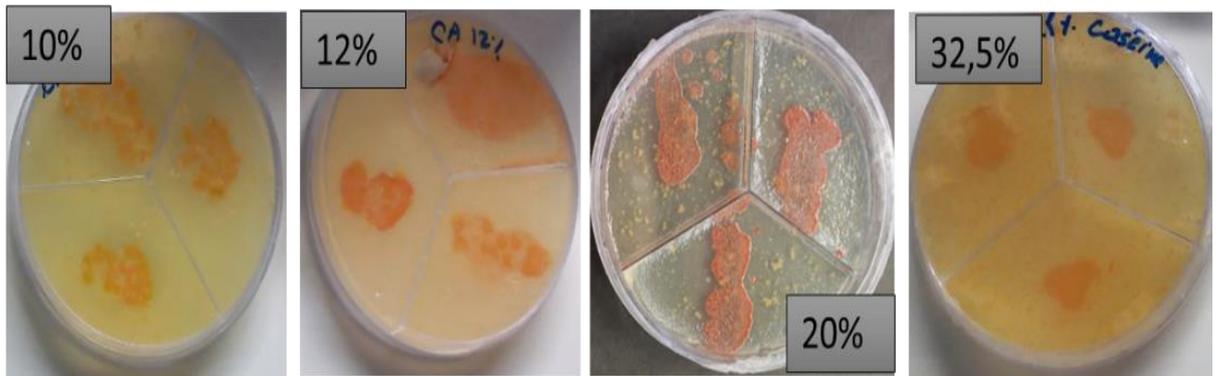
(+++): Résultat positif (trois répétitions)

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

Les résultats consignés sur le tableau ci-dessus; montrent que l'ensemble des hydrolyses de l'archée; sont opérationnelles sur une large plage de salinité; allant de 10-30% de NaCl et même au-delà.

### III.2.2.1 Variation de l'activité protéolytique

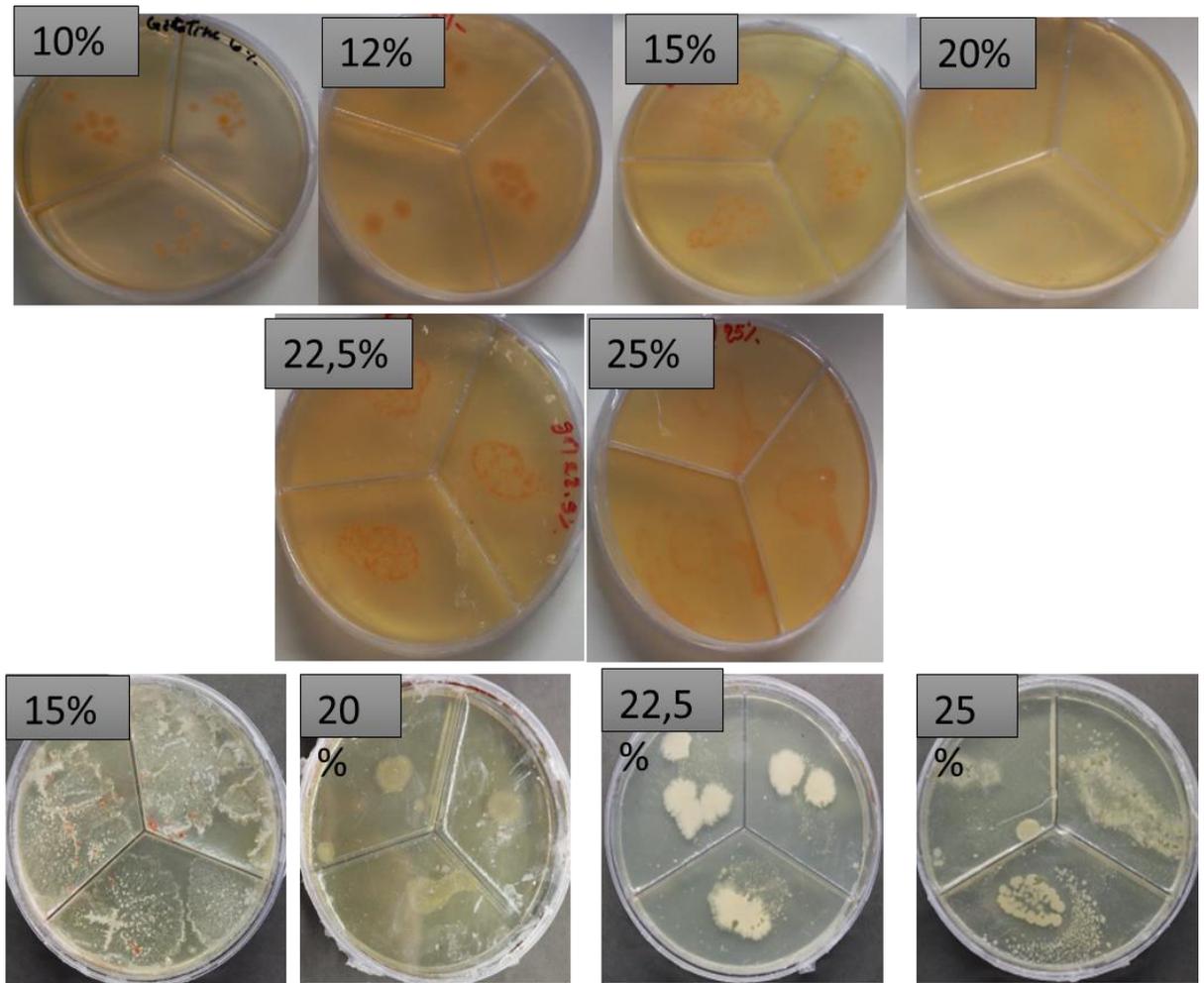
Exceptionnelle; la caséinase de l'archée exige un minimum de 10% de NaCl; maximale sur milieu à 22.5% (Fig.12) et n'est pas du tout désactivée à 32.5% de NaCl; concentration qualifiée de saturante.



**Figure 11** :Activité caséolytique observée aux différentes concentrations de sel

### III.2.2.2 Variation de l'activité de la gélatinase

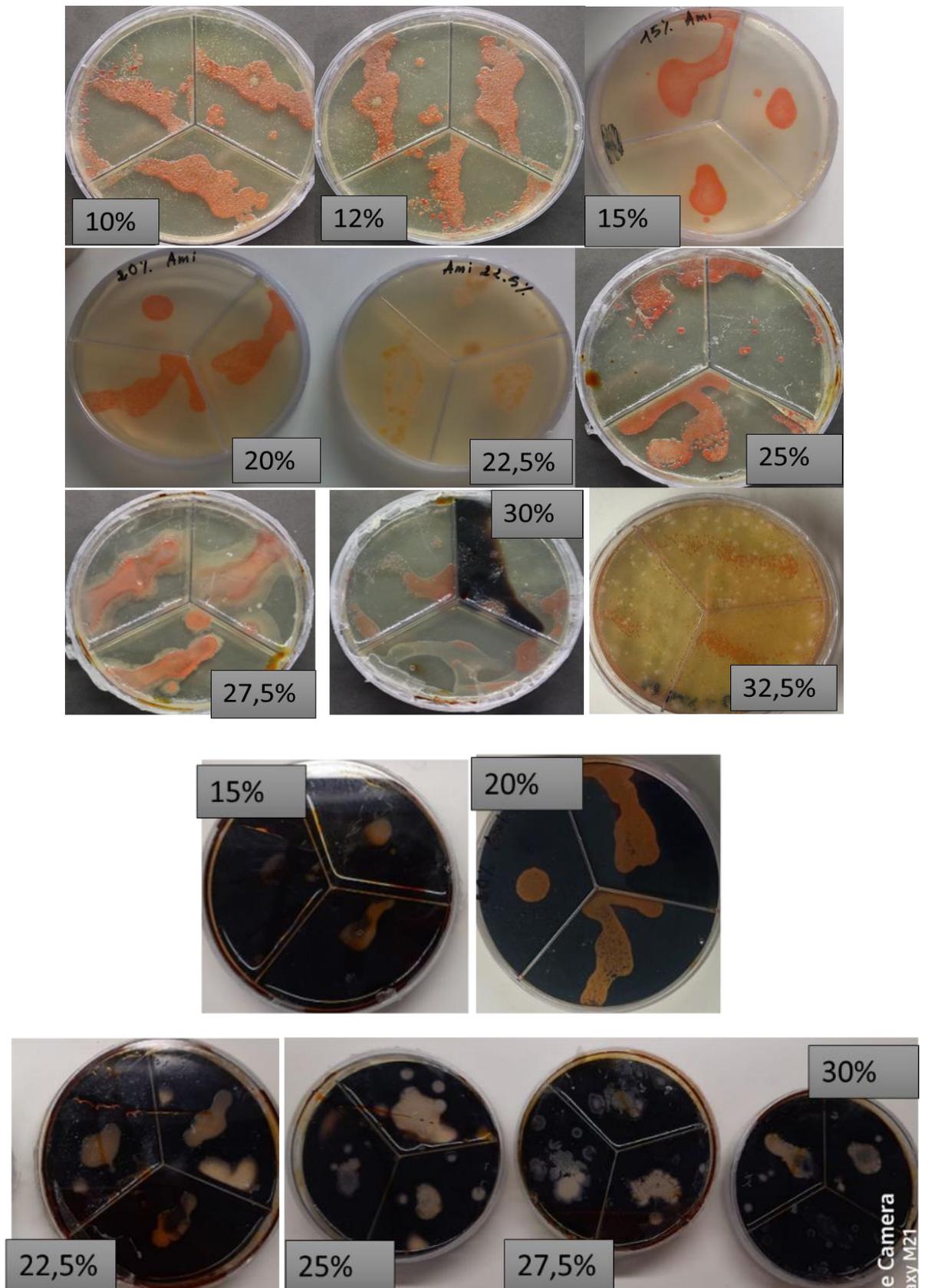
La gélatinase est présente et maximale à 22.5% de NaCl; son activité s'observe sur un intervalle de 10-25%NaCl; au-delà duquel elle est inhibée.



**Figure 12:** Activité gélatinase observée aux différentes concentrations de sel  
(Avant et après addition de TCA)

### III.2.2.3 Variation de l'activité amylolytique

A l'instar de la caséinase; l'activité amylolytique est persistante avec d'impressionnantes zones de lyse; depuis les basses teneurs en sel jusqu'à 32.5% de NaCl; concentration maximale expérimentée. Ce spectre salin s'aligne au profil de cette archée halophile par excellence.

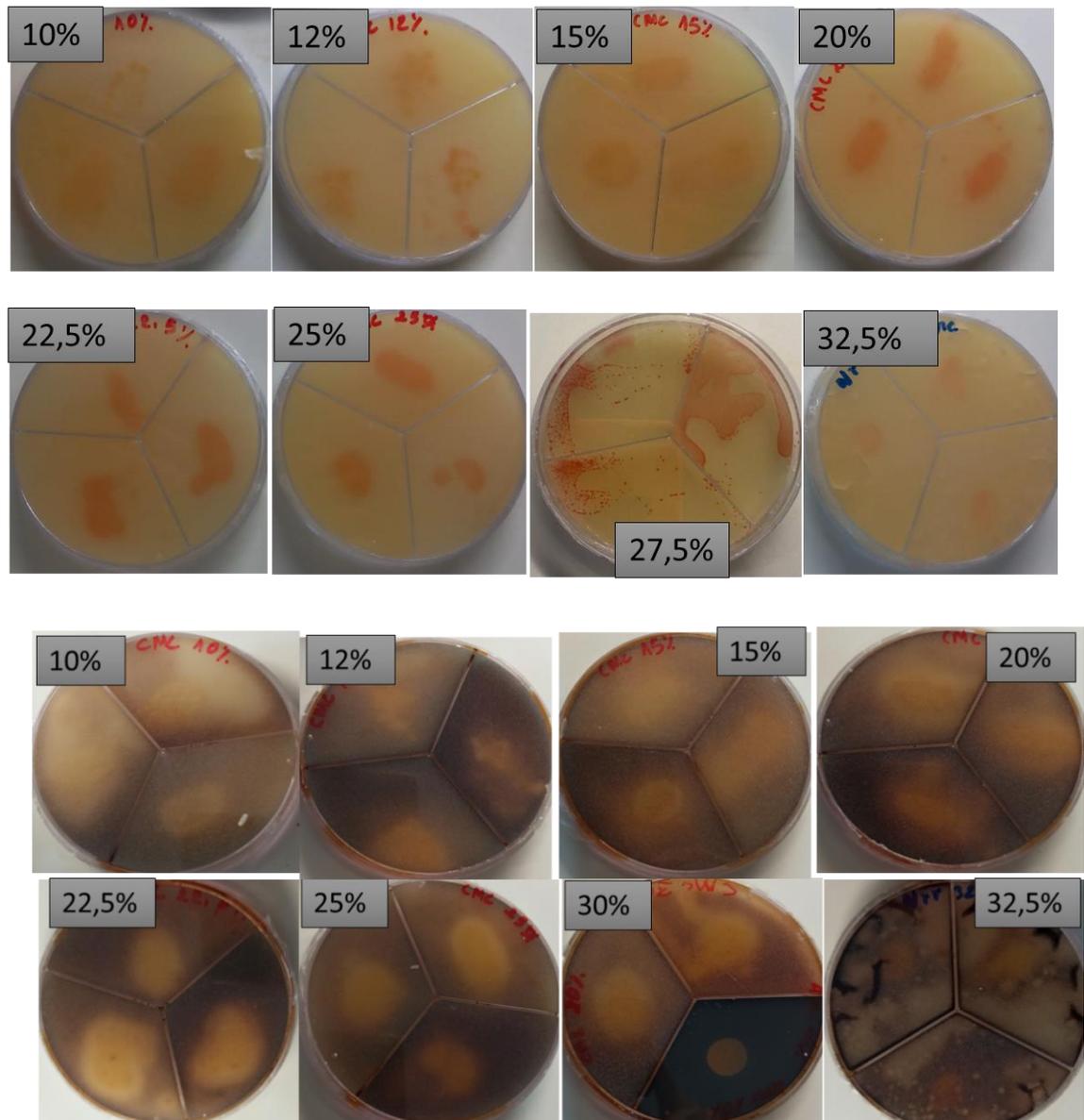


**Figure 13:** Activité amylolytique aux différentes concentrations de salinité

(Avant et Après addition du Lugol)

### III.2.2.4 Variation de l'activité cellulolytique

Sur les milieux à la CMC; une activité est observée sur toute la gamme de salinité expérimentée de 10-32.5% de NaCl (Fig.15); ce qui traduit la capacité singulière de cette souche à proliférer dans des milieux extrêmes, usant de ses halo hydrolases.



**Figure 14** :Activitécellulolytique observée eaux différentes concentrations de sel  
(Avant et après addition du Lugol)

### III.2.3 Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction du pH

La détermination des intervalles pH sur milieu solide; a présenté certains inconvénients; aussi les résultats obtenus représentent des lectures d'apparition ou non d'activité lytique sans valeur optimale.

Aucune activité lytique n'est observée sur les différents milieux aux pH 5-6. Les valeurs 7- 8.5 ayant servi lors des étapes de revivification et de mise en culture de la souche étant positifs.

**Tableau 5:** Effet du pH sur les activités exoenzymatique de l'halobactérie.

pH	Caséine	Gélatine	Amidon	CMC
5	- - -	- - -	- - -	- - -
5.5	- - -	- - -	- - -	- - -
6	- - -	- - -	- - -	- - -
6.5	+++	- - -	+++	+++
9	+++	- - -	+++	+++
9.5	+++	- - -	+++	+++
10	- - -	- - -	- - -	- - -
10.5	- - -	- - -	- - -	- - -
11	- - -	- - -	- - -	- - -
11.5	- - -	- - -	- - -	- - -

Présence de zone de lyse: Résultat positif (+)

Absence de zone de lyse : Résultat négatif (-)

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

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

### III.2.3.1 Variation de l'activité protéolytique

Decelée sur milieu à pH 6.5; la caseolyse est intense à pH 9.5; répondabt au profil alcalin de la souche.



Figure 15 :Activitécaséolytique observée aux différents pH

### III.2.3.2Variation de l'activité amylolytique

L'amylase signe sa présence aux pH alcalins 9-9.5; avec des zones bien évidentes.

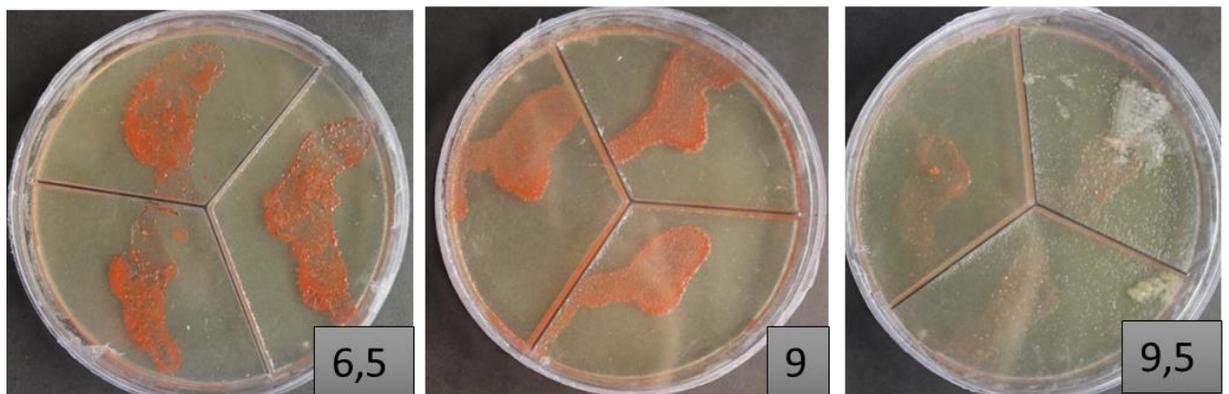
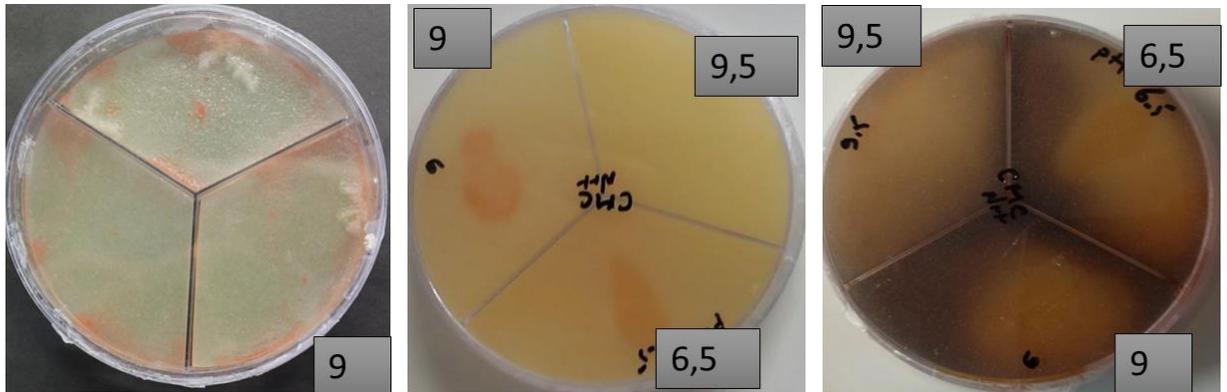


Figure 16: Activité amylolytique observée aux différentes pH

### III.2.3.3 Variation de l'activité cellulolytique

Comme illustré sur la figure ci dessous; l'hydrolyse de la CMC; est observée à pH 6.5 et à pH 9-9.5



**Figure 17:** Activité cellulolytique observée aux différents pH

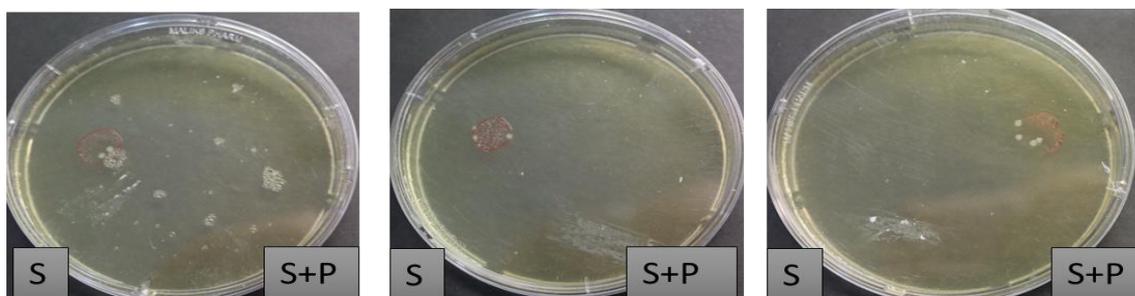
(Avant et après addition du Lugol)

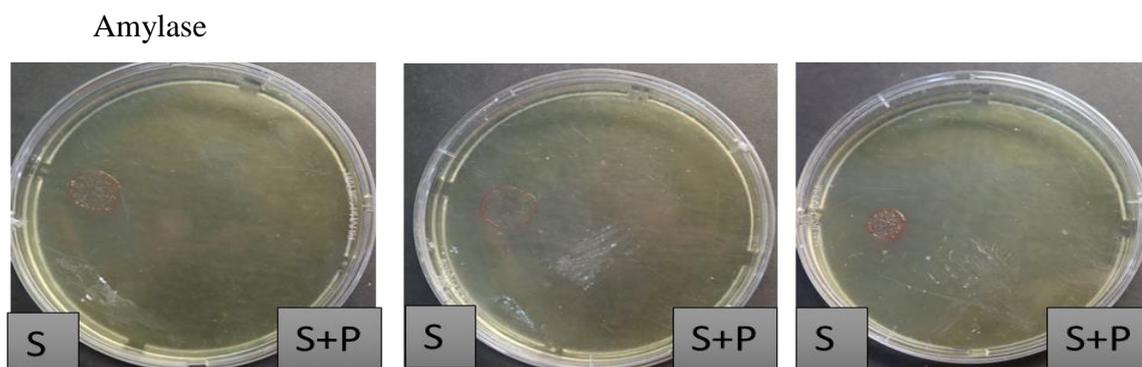
### III.2.4 Résultats du test de sensibilité à une enzyme protéolytique

Des exemples des résultats obtenus sont présentés en figure 18. Présence d'une activité protéolytique et amylolytique (spots SC visibles sur milieux); avec absence d'une zone de lyse autour des spots (SC+Pepsine) sur l'ensemble des milieux supplémentés des différents polymères. 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 nécessaire pour l'activité des haloenzymes.

Nous ne pouvons conclure à la nature protéique des toutes ces exoenzymes; une autre approche expérimentale doit être envisagée.

Protéase





**Figure 18:** Résultats du test à la pepsine

### III.2.5 Discussion

La présence d'enzymes hydrolytiques au niveau du (SC) de la souche *Nrr.bangense*A33<sup>T</sup> a été confirmée lors de l'étude antérieure; menée en 2019. Certes cette souche n'a montré aucun pouvoir dégradant vis à vis du Tween 80 ou encore l'huile d'olive; cependant elle est dotée d'une caséinase; une gélatinase; une amylase et une cellulase.

Un potentiel qui selon Cohen (2011), permet à de tels microorganismes de s'adapter aux conditions extrêmes de certains milieux.

Notre étude s'est donc fixée comme objectif; la détermination des intervalles température; pH et salinité ; qui conditionnent les capacités lytiques de cette souche.

En effet; la *Nrr.bangense* A33<sup>T</sup> montre une activité protéolytique contre la caséine et la gélatine intenses entre 40°C-45°C; observées dans des plages de température allant de 22°C à 60 °C et de 20°C-50°C, respectivement. Ce pouvoir lytique se manifeste dans un intervalle de pH (6.5-9.5), sous des teneurs en NaCl de (10%-32.5%); avec des optimaux de (25%-27.5%), pour la caséinase et entre (10%-25%) avec un optimum (22.5%) pour la gélatinase.

En passant en revue certains études ; il ressort que la protéase de *Chromohalobactersp.* TVSP101; isolé en 2009 par Vidyasagaret *al.* était active dans une large gamme de concentrations de NaCl ~6-29% avec une activité optimale dépassant de peu les 26%. L'enzyme conservait son pouvoir lytique dans un intervalle de pH de 7 à 10 avec une activité optimale à pH 8; de plus cette protéase était thermoactive dans la gamme de température 60-80°C avec optimum à 75°C.

En termes de salinité; la protéase de la *Nrr.* est bien plus exigeante en sel que la protéase extracellulaire libérée par l'Haloarchaea *Halococcussalifodinae* ; dont l'activité est

observée entre 30-65°C, pH 6-10.5 et 3 à 23.4% de NaCl ; avec les optimaux suivants (45 °C, pH 9.0 et 11.7% NaCl) (Jing Hou *et al.*,2021).

Toujours dans ce contexte; l'étude faite par Gaonkar *et al.*, (2020), évoque une protéase extracellulaire de l'Haloarchaea *Halococcus* sp. GUGFAWS-3 (MF425611), fonctionnelle dans un intervalle de 0–29% de NaCl; avec un optimum à 17.5%. Précisant qu'un large intervalle thermique convenait à son activité (20 et 80°C); avec un optimum à 70°C. Cette protéase était également très active dans une large plage de pH de 3 à 13 avec une activité optimale à pH 7,0.

En 2016; Abanozet *et al.* soulignaient que les optimaux de l'activité de la protéase de *Haloarculasp.* TG1 étaient de 50°C, pH 4,0 et >26.32% de NaCl. Avec des intervalles températures (25-90°C), pH (3-10) et une salinité de 6- 29% de NaCl.

La protéase extracellulaire de la souche *Haloferaxlucentensis* VKMM 007; archa halophile isolée par (Manikandan *et al.*,2009), montrait une stabilité à des concentrations de sel très variées (0.85–5.13 M) à des températures (20 à 70 °C) et à un pH (5 à 9), avec une activité maximale observée à 4.3M NaCl, 60 °C, pH 8.

La *Nrr.bangense*A33<sup>T</sup> produit une cellulase dans une plage de température de 22- 55°C avec un optimum (40-45°C), un pH entre 6.5-9.5 optimum de 9 ; sur une large plage de salinité 10% à 32.5% avec un optimum à 25%.

Des caractéristiques semblables sont évoquées par diverses études ; ainsi le *Gracilibacillus* sp. SK ; isolé d'un lac salé en Chine; produit une cellulase très active et stable sur de larges plages de température (40-70 °C), de pH (6,0-10,0) et de concentration en NaCl (7,5-17,5 %), avec des optimaux à 60 °C, pH 8,0 et 12,5 % de NaCl (Yuet *et al.*,2015).

D'autres part; une cellulase alcaline halostable libérée par une bactérie *Salisedimini-bacteriumhalotolerans*, isolée du lac Sambhar en Inde ; est active à des pH de 8,0 à 11,0, de 10 à 30 % de NaCl avec des valeurs optimales de pH de 11,0 et de 25 % de NaCl (Abhijit Sar *et al.*, 2021).

Les exemples d'amylases rapportés par diverses études se succèdent, ainsi l'halophile obligatoire *Aspergillus flavus* secrète une cellulase caractérisée en 2021 ; par AnnaBanoet *al.* ayant une activité optimale à un pH de 10, 60°C et 20% de NaCl. Sur une gamme de 30-90°C, pH de 6-12 et 0% à 40% de NaCl.

La souche halophile extrême *Haloarculasp.*, libère une cellulase dont l'activité optimale a été obtenue à 70 °C, à un pH de 7,0 et en présence de 23% de NaCl. Une activité qui s'étend sur une large gamme de températures (37 à 90 °C) ; de concentrations en NaCl (~12 à > 25%), et des pH de 3-7 (**Şafaket al.,2020**).

L'amylase extracellulaire de la souche étudiée a un spectre salin de 10% à 32.5% avec un optimum (25%-27.5%); une  $T_{opt}$  de 40-45°C; active dans un intervalle thermique 22-50°C et pH de 6.5-9.5.

Nos données s'alignent aux données de **Gómez-Villegaset al.** (2021) ; qui précisent que l'amylase extracellulaire de la souche *Haloarculasp.* est thermostable (optimum 60°C) ; demeure active à des températures entre 30-80°C; de 5-15% de NaCl (optimum 25%) ; pH maximale à 5 sur un intervalle de (2-9).

Quant à l'alpha-amylase de la souche halophile extrême *Halococcus*sp. GUVSC8 ; elle est fonctionnelle entre 3- à > 29% de NaCl, avec un maximum à 12% de NaCl ; sur un intervalle de pH de 6 à 9, optimum à 6. Cette haloenzyme demeure active même à 90 °C ; avec un optimum à 45 °C (**Salgaonkaret al., 2019**).

En 2016, **Abel-Nabeyet al.** caractérisaient une amylase extracellulaire chez *Bacilluslichineformis* AH214 ; active sous des températures de 25-60°C et optimale à 40°C, sous des pH de 4-10 ( $pH_{opt}$ 7.5) et de 0-21% de NaCl.

A la différence; l' $\alpha$ -amylase extracellulaire produite par *Bacillus persicuse* est alcalo-thermostable; est active aux pH, température et concentrations en NaCl de 5-12, 25-70 °C et 0 à ~15% respectivement. Ces optimums se situent à pH 10, 45°C et à 5% de NaCl (**Hadipouret al.,2016**).

# *Conclusion*

L'étude réalisé sur la souche halophile extrême, *Nrr.bangense*A33<sup>T</sup> ; isolée d'Ouargla; portant sur son potentiel hydrolases a débuté en 2019.

En poursuivant cette étude, notre objectif était de voir l'effet de trois principaux facteurs: température; pH et salinité; sur les activités lytiques exoenzymatiques de cette souche; dont les capacités à dégrader l'amidon, la gélatine, la caséine et la CMC ; ont bien été mises en évidence.

Nos résultats s'alignent aux données bibliographiques qui se relatent la stabilité thermique des exo enzymes des haloarchées et leurs capacité à demeurer actives sur un large intervalle de salinité et parfois de pH.

La souche halophile obligatoire *Nrr.bangense* à proliféré sur milieux chargés en sel ; grace à ses hydrolases ; qui demeurent actives aussi bien à 10 % qu'à 32.5 % de NaCl; avec une caséinase; une amylase et une cellulase fonctionnelles aux seuils de la saturation (32.5%).

L'intervalle thermique propice à l'activité de ces exoenzymes se situe entre de 20°C à 60°C; avec un optimum entre 40-45°C. Cette panoplie variée d'hydrolases permet à la souche de sévir dans les milieux hostiles à la vie; est serait très avantageuse dans diverses applications biotechnologiques.

Compte tenu de la spécificité physiologique et métabolique de cette haloarchée, certains tests s'avèrent peu pertinents ; telle que la détermination des pH en milieu solide ou le test de digestion enzymatique; qui sont à reconduire suivant des approches plus appropriées. Cette spécificité est à prendre en considération également pour la prolongation des délais d'incubation, lors de l'application des divers protocoles.

A cause de manque des moyens et de techniques de pointe, certaines manipulations ont été freinées et restent en perspectives ; telles que la purification et la caractérisation de ces hydrolysats et de prise en compte des autres testes vis-à-vis la stabilité et l'activité de ces exoenzymes

*Références  
bibliographiques*

- 
- Akimoto, T., & Nagase, Y. (2003). Novel trans dermal drug penetration enhancer: synthesis and enhancing effect of alkyldisiloxane compounds containing glucopyranosyl group. *Journal of controlled release*, 88(2), 243-252.
  - Albers. S., Vossenbergh. J., Driessen. A., and Konings. W. (2001). Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*; 5: 285- 294.
  - Allen, E. E., & Bartlett, D. H. (2002). Piezophiles: microbial adaptation to the deep-sea environment. *Extremophiles*. Eolss Publishers Co. Ltd, Oxford, UK.
  - Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., & Malik, K. A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of microbiological methods*, 52(3), 353-359.
  - Baker RA, Wicker L. (1996). Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*. 1996; 7:279-284.
  - Baker, R. A., & Wicker, L. 1996. Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 7(9), 279-284.
  - Barrett, A. J. (1994). Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol*. 244:1–15.
  - Bartlett D.H. (1992). Microbial life at high pressures. *Science Progress* 76, 479–496.
  - Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxylesterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, 26(1), 73-81.
  - Cary, S. C., T. Shank, and J. Stein. (1998). Worms bask in extreme temperatures. *Nature* 391:545–546.
  - Chandra, P., Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-42.
  - Chandra sekaran, M. (Ed.). (2012). *Valorization of food processing by-products*. CRC press.
  - Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., von Herzen, R. P., Ballard, R. D., ... & van Andel, T. H. (1979). Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, 203(4385), 1073-1083.

- Damic. S., Collins.T., Marx. J.C., Feller. G., Gerday. C. (2006). Psychrophilic micro-organisms: challenges for life. *EMBO Rep*; 7: 385-389.
- Dhiman, T. R., Zaman, M. S., Gimenez, R. R., Walters, J. L., & Treacher, R. (2002). Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. *Animal Feed Science and Technology*, 101(1-4), 115-125.
- Dienes, D., Egyhazi, A., & Reczey, K. (2004). Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products*, 20(1), 11-21.
- Ducret, A., Trani, M., & Lortie, R. (1998). Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(4), 212-216.
- Gold, T. (1992). The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6045–6049.
- Gómez-Villegas, P., Vígara, J., Romero, L., Gotor, C., Raposo, S., Gonçalves, B., & León, R. (2021). Biochemical characterization of the amylase activity from the new Haloarchaeal strain *Haloarcula* sp. Hs isolated in the Odiel Marshlands. *Biology*, 10(4), 337.
- Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978). *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24: 710–715.
- Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29:45–72.
- Helistö, P., & Korpela, T. (1998). Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenylalkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(1-2), 113-117.
- Hendriksen, H. V., Pedersen, S., & Bisgard-Frantzen, H. (1999). A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. *Patent application*.
- Horikoshi, K. 1991. *Microorganisms in Alkaline Environments*. Kodansha, Tokyo, Japan/VCH, Weinheim, Germany.
- Horikoshi, K., and W. D. Grant. (1998). *Extremophiles, Microbial Life in Extreme Environments*. Wiley-Liss, A John Wiley & Sons, New York, NY
- Hou, J., Yin, X. M., Li, Y., Han, D., Lü, B., Zhang, J. Y., & Cui, H. L. (2021). Biochemical characterization of a low salt-adapted extracellular protease from the extremely halophilic archaeon *Halococcus salifodinae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 253-259.

- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27:307–317.
- Kandler, O., Wiegel, J., & Adams, W. W. (1998). Thermophiles: The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?. *Athens: Taylor and Francis*, 19-31.
- Kelley, D. S., J. A. Baross, and J. R. Delaney. (2002). Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 30:385–491.
- Khallef, S. (2019). *Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla- Algérie*. Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri.
- Khambhaty, Y. (2020). Applications of enzymes in *leather processing*. *Environmental Chemistry Letters*, 18(3), 747-769.
- Kim, S.J., and Hoppe, H.G. (1986). *Microbial* extracellular enzyme detection on agar plates by means of methylumbelliferyl-substrates. In: Gerbam Deuxieme Colloque International de Bacteriologie Marine, Actes de Colloque. Remer, Brest. 175-181.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature*, 409(6817), 241-246.
- Kottwitz, B., Upadek, H., & Carrer, G. (1994). Application and benefits of enzymes in detergents. *Chimicaoggi*, 12(11-12), 21-24.
- Kristjansson. J. K., Hreggvidsson. G. O. (1995). Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 17-25.
- Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. *Microbial life in extreme environments*.
- Lee, S. Y., Nielsen, J., & Stephanopoulos, G. (2016). *Industrial biotechnology: microorganisms*. John Wiley & Sons.
- Luo, Y., Zheng, Y., Jiang, Z., Ma, Y., & Wei, D. (2006). A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(2), 349-355.
- M. K. Bhat, (2000). “Cellulases and related enzymes in biotechnology,” *Biotechnology Advances*, vol. 18, no. 5, pp. 355–383.

- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., ...& Smyth, W. F. (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1), 81-87.
- Menendez, E., Garcia-Fraile, P., & Rivas, R. (2015). Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioengineering*, 2(3), 163-182.
- Mesbah, N. M., and J. Wiegel. (2005). Halophilic thermophiles: a novel group of extremophiles, p. 91–118. In T. Satyanarayana and B. N. Johri (ed.), *Microbial Diversity: Current Perspectives and Potential Applications*. I.K. International Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- Nirmal, N. P., & Laxman, R. S. (2014). Enhanced thermostability of a fungal alkaline protease by different additives. *Enzyme Research*, 2014.
- 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.
- Oren, A. (2002). Biotechnological applications and potentials of halophilic microorganisms. *Halophilic Microorganisms and their Environments*, 357-388.
- Oren, A. (2015). *Natronorubrum*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., & Soccol, V. T. (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource technology*, 77(3), 203-214.
- Pérez, D., Martín, S., Fernandez-Lorente, G., Filice, M., Guisán, J. M., Ventosa, A., ... & Mellado, E. (2011). A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PloS one*, 6(8), e23325.
- Priest, F. G., M. Goodfellow, and C. Todd. (1998). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1847–1882.
- Rampelotto P. (2013). *Extremophiles and extreme environments*, multidisciplinary digital publishing institute

- 
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205–218
  - Reysenbach, A., and E. L. Shock. (2002). Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystems. *Science* 296 :1077–1082.
  - Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.
  - 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.
  - Russel, M. J., D. E. Daia, and A. J. Hall. (1998). The emergence of life from FeS bubbles at alkaline hot springs in an acid ocean, p. 77–1126. In J. Wiegel and M. W. W. Adams (ed.), *Thermophiles: The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?* Taylor & Francis, London, United Kingdom.
  - Russell, N. J. (1990). Cold adaptation of microorganisms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 326:595–608, discussion 608–611.
  - Salwan, R., Sharma, V., Pal, M., Kasana, R. C., Yadav, S. K., & Gulati, A. (2018). Heterologous expression and structure-function relationship of low-temperature and alkaline active protease from *Acinetobacter* sp. IHB B 5011 (MN12). *International journal of biological macromolecules*, 107, 567-574.
  - Sar, A., Pal, S., Islam, S., Mukherjee, P., & Dam, B. (2021). An Alkali-Halostable Endoglucanase Produced Constitutively by a Bacterium Isolated from Sambhar Lake in India with Biotechnological Potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 91(2), 319-326.
  - Schaechter, M. (2009). *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press.
  - Sievert, S. M., J. Kuever, and G. Muyzer. (2000). Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3102–3109.
  - Singh, A. (2007). Industrial application of microbial cellulases in Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects, RC Kuhad and A. Singh, Eds.

- 
- Stetter, K. O. (1989). Extremely thermophilic chemolithoautotrophic Archae bacteria, p. 167–173. In H. G. Schlegel and B. Bowen (ed.), *Autotrophic Bacteria*. Springer-Verlag, New York, NY.
  - Stetter, K. O. 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 18:149–158.
  - Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges.
  - Thongaram, T., Kosono, S., Ohkuma, M., Hongoh, Y., Kitada, M., Yoshinaka, T., ...&Kudo, T. (2003). Gut of higher termites as a niche for alkaliphiles as shown by culture-based and culture-independent studies. *Microbes and Environments*, 18(3), 152-159.
  - Tolan JS. Pulp and paper. (1996) In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*, 2nd ed. New York: Stockton Press,:327/38.
  - Uddin M., M. N U., S. K R., D S., Das S., M. S J., Islam M., Rahman M., M. N H (2018). Proteases produced by bacillus subtilis isolated from local soil of Bangladesh: For various industrial and environmental applications. 76 157-164.
  - Ward, O. P. (2011). Proteases. *Comprehensive biotechnology*, 571.
  - Waring, G. A. (1965). Thermal springs of the United States and other countries of the world. A summary. Geological Survey Professional paper 492 (revised by R. R. Blankenship and R. Bentall), US Government Printing Office, Washington, D.C.
  - Wiegel, J. (1990). Temperature spans for growth: a hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:155–170. Wiegel, J. 1992. The obligately anaerobic thermophilic bacteria, p. 105–184. In J. K. Kristjansson (ed.), *Thermophilic Bacteria*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
  - Wiegel, J. (1998a). Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles* 2:257–267.
  - Wiegel, J. (1998b). Lateral gene exchange, an evolutionary mechanism for extending the upper or lower temperature limits for growth of microorganisms? A hypothesis, p. 177–185. In J.
  - Windish, W. W., &Mhatre, N. S. (1965). Microbial amylases. *Advances in applied microbiology*, 7, 273-304.

- Yang R., Johnson M.C. and Ray B. (1992). Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology 58 (10) : 3355 - 3359.
- Yang, H., Li, J., Shin, H. D., Du, G., Liu, L., & Chen, J. (2014). Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 23-29.
- Yayanos. A. A. (1995). Microbiology to 10,500 m in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 777–805.
- Youn, K. S., Hong, J. H., Bae, D. H., Kim, S. J., & Kim, S. D. (2004). Effective clarifying process of reconstituted apple juice using membrane filtration with filter-aid pretreatment. *Journal of Membrane Science*, 228(2), 179-186.
- Zeldes, B. M., Keller, M. W., Loder, A. J., Straub, C. T., Adams, M. W., & Kelly, R. M. (2015). Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Frontiers in microbiology*, 6, 1209.
- Zuber H. (2013). *Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms Structure and Function*.

---

# *Annexes*

---

## Annexe 1

### Appareillage

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

### Instruments

- Portoirs de tubes
- Tubes à essai
- Boîtes Petri
- Erlen Mayer
- Béchers
- Pipette graduée
- Eprouvette graduée
- Flacons
- Pipettes Pasteur
- Micropipette
- Embouts jaunes
- Spatule
- Coupelle

### Réactifs utilisés

- Lugol
- Réactif TCA

## Annexe 2

➤ Milieu Brown :

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

PH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

N.B : Les mêmes ingrédients servis à la préparation du milieu Brown liquide sans l'addition d'agar. Pour solidifier; 20gr d'agar.

Milieu pour la recherche de	composition de milieu
Protéase :	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu Br.....100ml</li> <li>• Caséine .....1g</li> </ul>
Gélatinase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu Br.....100ml</li> <li>• Gélatine .....0.8g</li> </ul>
Amylase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu Br.....100ml</li> <li>• Amidon .....1g</li> </ul>
Tween 80	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu Br.....100ml</li> <li>• Tween 80 .....1ml</li> </ul>
CMC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu Br.....100ml</li> <li>• CMC.....1g</li> </ul>
pH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min	

### Solutions

La composition de la solution TCA :

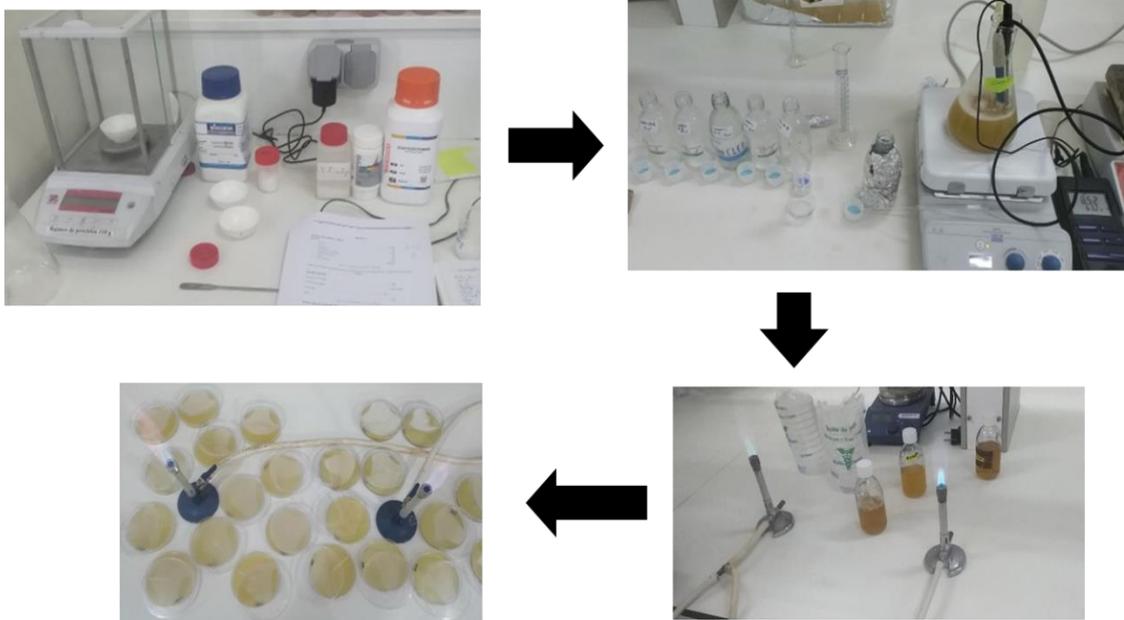
- TCA.....163,39g
- Eau distillé stérile.....1L

### Annexe 3

Revivification de la souche

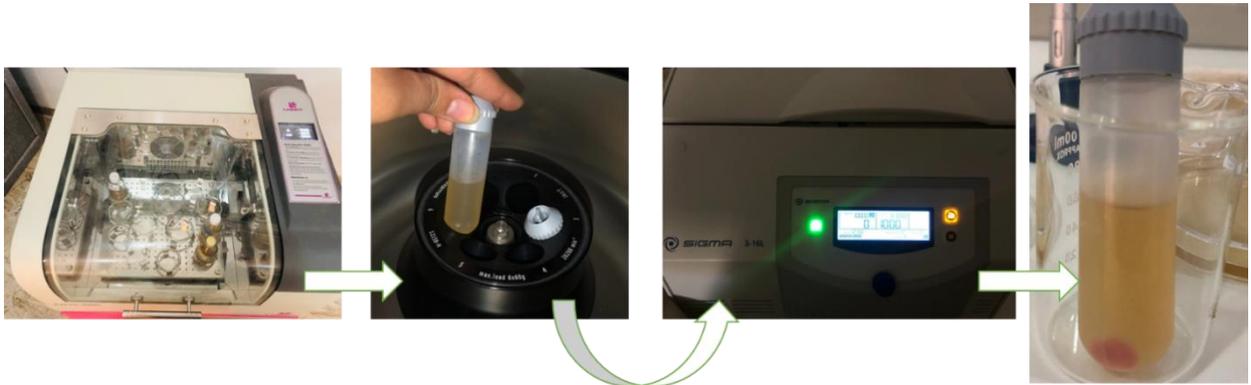


Préparation des milieux de culture solides, liquides et addition substrat à tester

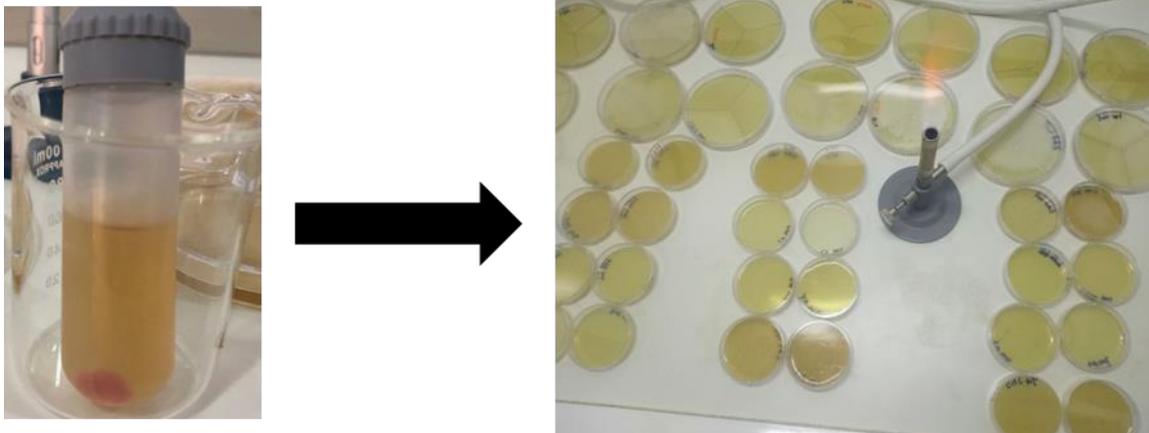


## Annexe 4

- Etapes préparation de la culture liquide; centrifugation et récupération du (SC)



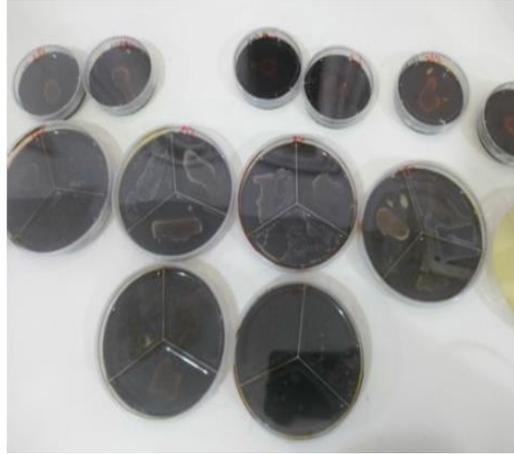
Centrifugeuse 10000rpm de milieu liquide après l'incubation de 7 jour sous agitation 150 tes/min



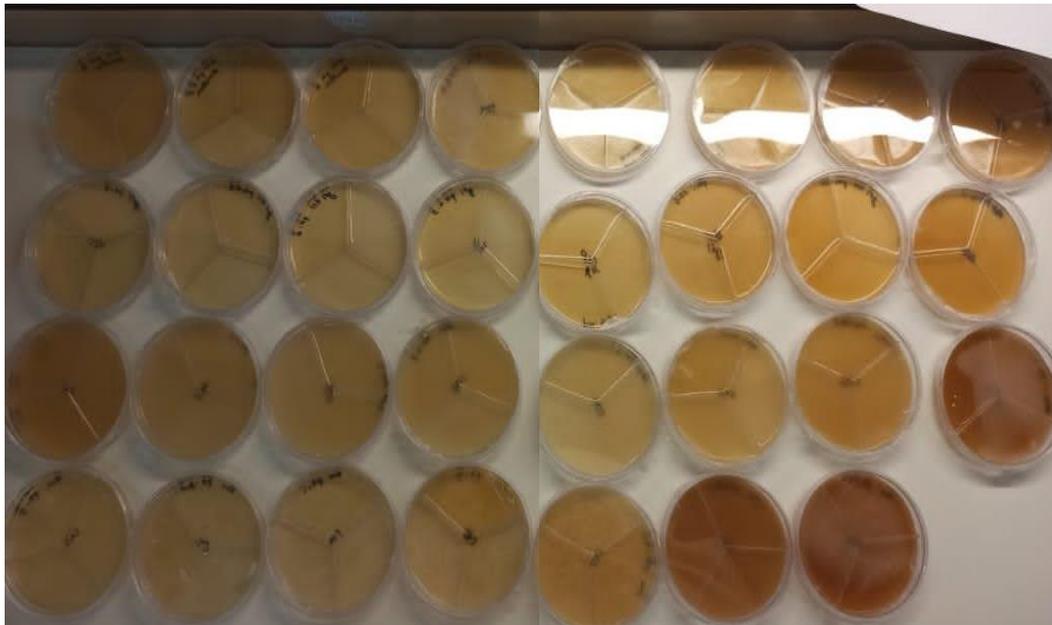
- Dépôt du surnageant de culture (SC) par la méthode des spots sur les milieux additionnés des différents polymères à tester (Amidon CMC, Tween 80, caséine, Gélatine)
- Réalisation de trois essais pour chaque substrat testé.  
Adition de révélateur pour le CMC, Amidon

---

L'ajout de  
Lugol



Les résultats négatifs de pH



## Résumé

Les halobactéries sont parmi les microorganismes les plus halophiles connus qui dominent lorsque la teneur en sel des milieux approche de la saturation. Une adaptation extraordinaire possible grâce à leurs machinerie enzymatique.

Le but de cette étude est de suivre les variations des activités lytiques exo enzymatique de la bactérie halophile extrême isolée d'Ouargla ; appartenant au genre *Natronorubrum* ; sous l'effet de trois facteurs : température ; pH et salinité.

Les résultats montrent une activité lytique sur une large gamme de salinité allant de 10- 32.5% de NaCl pour la caséinase ; l'amylase et la cellulase avec des optimaux entre 25-27.5% ; excepté la gélatinase qui montre un maximum et un optimum de NaCl à 27.5 et 22.5% respectivement. Ces exo enzymes restent stables sur des plages de températures de 22 à 50°C, voir 60°C pour la caséinase et 55°C pour la cellulase ; avec un optimum à 40-45°C pour l'ensemble de ces hydrolases. Ces activités lytiques sont relevées sur des milieux à pH alcalin.

Cette combinaison d'hydrolases extracellulaires est un potentiel promoteur pour diverses applications en biotechnologie.

Mots clés : extrême halophile, *Natronorubrum*, activités enzymatiques, biotechnologie, exoenzymes.

## Abstract

Halobacteria are among the most known halophilic microorganisms that dominate when the salt content of media approaches saturation. An extraordinary adaptation is possible due to their enzymatic machinery.

The purpose of this study is to monitor the variations of extreme halophilic bacterium exo-enzymes lytic activities belonging to the genus *Natronorubrum* isolated from Ouargla; under the effect of three factors: temperature; pH and salinity.

The results show a lytic activity over a wide range of salinity ranging from 10-32.5% NaCl for caseinase; amylase and cellulase with optima between 25-27.5%; except gelatinase which shows a maximum and optimum of NaCl at 27.5 and 22.5% respectively. These exo enzymes remain stable over temperature ranges of 22 to 50°C, see 60°C for casein and 55°C for cellulase; with an optimum of 40 to 45°C for all these hydrolases. These lytic activities are observed on alkaline pH media.

This combination of extracellular hydrolases is a potential promoter for various applications in biotechnology.

Key words: extreme halophilic, *Natronorubrum*, enzymatic activity, biotechnology, exoenzymes.

## ملخص

تعتبر الهالوبكتيريا واحدة من الكائنات المجهرية المحبة للملوحة المعروفة حيث تهيمن على الوسط عندما يقترب من التشبع بالملح ; تظهر تأقلم بفضل ألياتها الأنزيمية المذهلة.

الغرض من هذه الدراسة هو متابعة تغيرات الأنزيمات الهاضمة المفترزة خارج الخلية الخاصة بالبكتيريا المحبة للملح من سلالة *Natronorubrum* المعزولة من منطقة ورقلة تحت تأثير ثلاثة عوامل : درجة الحرارة, معدل الحموضة, نسبة الملوحة.

وتظهر النتائج نشاطاً تحليلياً على نطاق واسع من الملوحة يتراوح بين 10-32.5 في المائة من NaCl للكازيناز ؛ والأميلاز والسيلولاز مع تسجيل أعلى نشاط بين 25-27,5% ؛ باستثناء الجيلاتينيز الذي يظهر حد أقصى و أفضل من NaCl عند 27.5% و 22.5% على التوالي. وتظل هذه الإنزيمات الخارجية مستقرة على مدى درجات حرارة من 22 إلى 50 درجة مئوية، و 60 درجة مئوية بالنسبة للكازيناز و 55 درجة مئوية للسيلولاز ؛ مع نشاط مثالي من 40 إلى 45 درجة مئوية لجميع هذه الهيدروليزات. و لوحظت هذه الأنشطة كذلك في وسائط قاعدية.

هذا المزيج من الهيدروليزات خارج الخلية هو محفز محتمل لتطبيقات مختلفة في التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات المفتاحية : نشاط أنزيمي , محب للملوحة , التكنولوجيا الحيوية, *Natronorubrum* , أنزيمات خارجية .