

**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

**Réalisé par :** BOUROUBA Imane et HAMDY Sekoura Roumaïssa

### **Thème**

**Recherche de biomolécules actives produites  
par des halobactéries**

**Soutenu publiquement**

**Le : 04/07/2019**

**Devant le jury :**

**M<sup>me</sup> BOUDJENAH. S**

**Pr**

**Présidente**

**UKM Ouargla**

**M<sup>me</sup> ATTAB.S**

**M.A.A**

**Examinatrice**

**UKM Ouargla**

**M<sup>me</sup> KHALLEF. S**

**M.C.B**

**Encadreur**

**UKM Ouargla**

**Année universitaire 2018/2019**

## Remerciements

*Avant tout, nous remercions ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous a aidé et nous a donné le courage de tout faire.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements pour toutes les personnes qui ont participé à l'accomplissement de ce travail, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidés, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail.*

*En premier lieu, nous adressons nos vifs et sincères remerciements à M<sup>me</sup> Khallel.S pour l'intérêt qu'elle a porté au sujet proposé ; mais également pour nous avoir fait l'honneur de nous encadrer et nous orienter. Nous lui devons beaucoup pour ses encouragements, sa patience et les conseils qu'elle nous a prodigués. Nous ne saurions la remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique le long de la réalisation de ce travail. Qu'elle reçoive l'expression de nos vives gratitudee.*

*Tous nos sincères remerciements pour Monsieur le Pr. Amar Messaitfa, directeur du laboratoire Génie de l'Eau et de l'Environnement en Milieu Saharien (LGEEMS), centre de recherche université Kasdi Merbah, Ouargla, de nous avoir accueilli au sein du laboratoire de recherche.*

*Nos vifs remerciements vont à Madame Boudjnah.S, pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant ce jury.*

*Nous remerciant également Madame Attab.S, pour le temps qu'elle nous accorde en acceptant d'examiner ce modeste travail.*

*Un immense merci est adressé également à Melle Ayachi Omar ASMA, laboratoire Génie de l'Eau et de l'Environnement en Milieu Saharien (LGEEMS), Pr Segni et le personnel du laboratoire Génie des procédés (LGP), Mme Kaci S., Mer BOUZEGAG I., Laboratoire de bioressources sahariennes, Préservation et valorisation (BRS), ainsi que Mer Gaja Omar, laboratoire de Géologie Saharienne.*

*Sans oublier les ingénieurs du laboratoire de biochimie et bactériologie de l'hôpital Mohammed Boudiaf-Ouargla et aux ingénieurs des laboratoires pédagogiques, FSNV, université Kasdi Merbah-Ouargla, pour leur gentillesse, leurs précieux conseils, leur disponibilité et pour nous avoir fourni une aide matérielle et technique, ou tout simplement humaine.*

## *Dédicace*

*Dieu tout puissant merci d'être toujours auprès de moi.*

*Je dédie ce mémoire aux êtres les plus chers à mon cœur:*

*La meilleure de toutes les mères Nouara*

*Qui m'a soutenu durant toute ma vie, qui m'a aidé durant mes années d'études,  
pour son amour infini et sa bienveillance jour et nuit.*

*Je souhaite prouver mon grand remerciement qui ne sera jamais suffisant à elle  
que j'espère rendre fière par ce travail.*

*Mon très cher père Mouhamed*

*Pour être le bon exemple de père par son soutien, ses encouragements et aides dès  
mes premiers pas d'études jusqu'à ce jour.*

*Mes chers frères qui ont toujours été là pour moi.*

*Toute Ma famille ainsi mes amis en particulier Sana et Meriem.*

*Mon binôme à qui je dis bon courage et bon continuation et tous ceux qui m'ont  
aidé de près ou de loin.*

*Imane*

*Dédicaces*  
*Je dédie ce modeste travail*

*À la mémoire de mes très chers parents que Dieu bénisse leurs âmes  
À ma sœur et son époux qui a été un père, un ami et un frère ainsi que leurs  
enfants Rihane et Ranime*

*À mon frère qui a été toujours présent pour moi Mounim ainsi que sa petite  
famille*

*À ceux qui ont toujours eu une pensée pour moi, à mes tantes et oncles, à mes  
cousins et cousines que j'aime et à toute ma famille*

*À ma seconde famille, ceux qui m'ont encouragé et soutenu, ceux qui ont  
toujours été là pour moi, ceux qui m'ont offert leur aide quand j'en avais besoin,  
ceux avec qui j'ai passé de merveilleux moments, à mes amis(es)*

*À mon binôme, avec qui j'ai partagé la joie et les difficultés relatives au suivi de  
ce travail, à qui je souhaite beaucoup de réussite*

*Roumaissa*

## Table des matières

Remerciements	
Didécaces	
Sommaire	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux Liste des figures	
Introduction .....	1
<b>Chapitre I: revue bibliographique</b>	
1.Microorganismes extrêmophiles.....	3
1.1.Généralités .....	3
1.2.Diversité des microorganismes extrêmophiles .....	4
1.2.1.Microorganismes halotolérants et halophiles .....	4
1.2.2.Les micro-organismes des températures extrêmes .....	6
1.2.2.1.Les microorganismes psychrophiles.....	6
1.2.2.2.Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles.....	6
1.2.3.Les micro-organismes piézophiles .....	7
1.2.4.Les micro-organismes acidophiles .....	8
1.2.5.Les micro-organismes alcalophiles .....	8
2.Environnements salins et hyper salins.....	9
2.1.Environnements thalassohalins.....	9
2.2. Environnements athalassohalins.....	10
2.3.Sols salés.....	10
3.Diversité phylogénétique des halophiles .....	12
3.1.Eucaryotes halophiles .....	12
3.2.Bactéries halophiles .....	12
3.2.1.Phylum proteobacteria.....	12
3.2.2.Phylum Firmicutes.....	13
3.2.3. Phylum Actinobacteria .....	14

3.2.4. Phylum Spirochètes .....	14
3.2.5. Phylum Bacteroidetes .....	14
3.3. Archaea halophiles .....	14
4. Adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité .....	15
5. Intérêt biotechnologique des halophiles et halotolérants.....	16
5.1. Enzymes.....	16
5.1.1. Protéases .....	16
5.1.2. Amylases .....	16
5.1.3. Lipases et estérases .....	16
5.1.4. Xylanases.....	17
5.1.5. Cellulases.....	17
5.1.6. Nucéases .....	17
5.2. Autres composés.....	18
5.2.1. Production d'exo polysaccharides.....	18
5.2.2. Production des antibiotiques.....	18
5.2.3. Bactériorhodopsine et photosynthèse chez les haloarchaea .....	19

## **Chapitre II: Matériel et méthodes**

1. Matériel biologique.....	20
2. Méthodes .....	21
2.1. Réactivation des souches (revivification).....	21
2.2. Précultures .....	21
3. Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'halobactéries .....	22
3.1. Recherche d'activités antagonistes.....	22
3.2. Recherche de l'activité enzymatique .....	25
3.2.1. Détermination de l'activité protéolytique.....	25
3.2.2. Hydrolyse de la gélatine .....	25
3.2.3. Détermination de l'activité amylolytique .....	25
3.2.4. Détermination de l'activité lipolytique et estérasique .....	26

3.2.5. Détermination de l'activité cellulolytique .....	26
4. Stabilité thermique des enzymes .....	26
5. Séparation des substances bioactives par chromatographie analytique sur couche mince...	26
6. Extraction des pigments membranaires .....	27

## **Chapitre III: Résultats et discussion**

1.Revivification des souches: .....	29
2.Préculture.....	29
3.Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'halobactéries .....	30
3.1.Recherche d'activités antagonistes .....	30
3.1.1.Résultats de la méthode des cylindres d'agar.....	30
3.1.2.Résultats de la méthode de diffusion en double couche d'agar .....	30
3.2.1. Détermination de l'activité protéolytique.....	34
3.2.2. Détermination de l'activité amylolytique .....	35
3.2.3. Détermination de l'activité lipolytique et estérasique .....	35
3.2.4.Détermination de l'activité cellulolytique .....	36
4. Stabilité thermique des exo enzymes.....	36
4. Séparation des substances bioactives par chromatographie analytique sur couche mince..	37
5. Extraction des pigments membranaires .....	39
7. Discussion.....	39
Conclusion et perspectives .....	48
Références bibliographiques.....	48

## Liste des abréviations

**Br:**milieu de culture Brown

**pH:**potontiel d'Hydrogène

**rpm / min :**rotation par minute

**Hrr:***Halorubrum*

**Nrr:***Natronorubrum*

**SC:**Surnageant de Culture

**SCE:**Surnageant de Culture Extrait

**CMC :** CarboxyMéthyl Cellulose

**Ep :** Extrait protéique

**Na Cl :** Chlorure de sodium

**KCl :** Chlorure de potassium

**° C :** Température en degré Celsius

**H :** Heure

**Rf:** Rapport frontal

**ml :** millilitre

**mm :** millimètre

**µl :** microlitre

**v/v :** volume /volume

**p/v :**poids / volume

**TCA :** acide Trichloracétique

**% :** pourcentage

**DO :** densité optique

**nm :** nanomètre

**SS :** solution saline

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de Kushner (1993). .....	5
Tableau 2 : Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiqula <i>et al.</i> , 2006). .....	5
Tableau 3: Composition ionique des environnements thalassohalins et athalassohalins. ....	11
Tableau 4 : Caractéristiques morphologiques et physiologique des souches halophiles .....	21
Tableau 5: Résultats des tests d'antagonisme entre halobactéries .....	32
Tableau 6 : Résultats des tests d'antagonisme vis-à-vis des souches cibles non halophiles....	33
Tableau 7 : Résultat de la recherche de l'activité lytique des trois isolats. ....	35
Tableau 8: Résultats de l'activité exo enzymatique après chauffage .....	37

## Liste des figures

Figure 1: Habitats thalassohalins : Marais salants de Costa Blanca en Espagne (a), le Grand Lac Salé Utah aux USA (b). Habitats athalassohalins : Lac Magadi au Kenya (c), Lac Rosé au Sénégal (d) ( <a href="http://www.jmg.centerblog.net/rub">http://www.jmg.centerblog.net/rub</a> ), in Khallef et al., 2019). .....	11
Figure 2:: Arbre phylogénique des êtres vivants (Marty., 2011). .....	13
Figure 3: Schéma récapitulatif du test d'antagonisme selon la méthode des cylindres d'agar. 24	
Figure 4: Protocole d'extraction acide et à froid des protéines totales du surnageant de culture (Yang <i>et al.</i> , 1992) .....	25
Figure 5 : Protocole d'extraction des pigments membranaires (Morin-Savy <i>et al.</i> , 2005).....	29
Figure 6: Aspect macroscopique des souches réactivées sur milieu solide (a) : <i>Hrr. litoreum</i> JCM13561 <sup>T</sup> (b) <i>Nrr. bangense</i> A33 <sup>T</sup> (c) <i>A.haloalkaliphilus C-5</i> .....	30
Figure 7 : Précultures des trois isolats tests sur milieu liquide .....	30
Figure 8: Exemple des résultats de la méthode des cylindres d'agar. ....	31
Figure 9: Surnageant extraits à partir des précultures des isolats tests .....	31
Figure 10: Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant (SC) et (SCE) des souches d'halobactéries actives vis-à-vis de l' <i>A.haloalkaliphilus</i> C-5 .....	32
Figure 11: Résultats de l'activité antibactérienne dans le surnageant (SC), (SCE) et (EP) de certaines souches d'halobactéries actives sur les souches <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579, <i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028, K12 et <i>Staphylococcus aureus</i> M 450 respectivement. ....	34
Figure 12: Exemples de l'activité protéolytique et caséolytique .....	35
Figure 13: Exemple de l'activité gélatinase avant et après addition de TCA. ....	36
Figure 14 : Exemple de l'activité amylolytique des souches <i>Hrr.</i> et <i>C-5</i> avant et après addition du lugol .....	36
Figure 15: Activité exo enzymatique des souches halophiles sur milieux additionnés de Tween 80 et l'huile d'olive respectivement .....	36
Figure 16: Exemple de l'activité cellulosique des souches halophiles .....	37
Figure 17: Exemples des résultats du test de stabilité thermique du surnageant (SC) de <i>Hrr. litoreum</i> JCM13561 <sup>T</sup> sur milieu au lait écrémé, à la caséine et au CMC respectivement .....	38
Figure 18 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de gel de silice des surnageants des souches halophiles: A : révélation sous UV, B : composante protéique révélation avec la ninhydrine à 0,2%; B: composante lipidique révélation avec le diiode. ....	39
Figure 19 : Spectre d'absorbance des différentes souches halophiles .....	40

# *Introduction*

## **Introduction**

Principaux producteurs primaires sur notre planète, les microorganismes sont, grâce à leur diversité, capables de coloniser les environnements les plus hostiles en termes de déficit hydrique, de température, de salinité, de pression et de pH. Des déserts arides aux profondeurs des océans, on se heurte à une surprenante diversité microbienne qui a su s'adapter à tout !

En milieu désertique chaud et sec, la très faible teneur en matière organique (<1mg/g de sable), la limitation en eau n'affectent pas la diversité des espèces mais leurs effectifs moyen.

Ainsi, à la surface de chaque grain de sable de la dune de Merzouga, à l'est du Maroc, 10 cellules bactériennes en moyenne ont été découvertes (par marquage fluorescent de l'ADN), soit 220 000 bactéries par gramme de sable ! (**Jebbar et al., 2012**).

Exceptionnels, les « **extrémophiles** » défient les lois de la biologie. Ces microorganismes ne sont pas seulement tolérants à ces conditions extrêmes, mais celles-ci sont requises pour leur croissance et développement (**Pikuta et al., 2007, Echigo et al., 2005 in khallef et al., 2019**).

Les sebkhas constituent un environnement extrême abritant des microorganismes qui survivent à des salinités très élevées, à de hautes températures et résistent à de graves radiations solaires, ces lieux sont explorés pour dépister leur potentiel producteur de nouvelles molécules bioactives (**Motta et al., 2004**).

Très répons dans ces milieux extrêmes, les halophiles extrêmes forment le troisième grand groupe des archaebactéries après les méthanogènes et les thermophiles. Ces microorganismes constituent un outil performant pour les sciences fondamentales du fait qu'ils représentent le modèle unique de la stabilité des biomolécules aux conditions extrêmes de l'environnement (**Campbell et Reece, 2004**).

L'amélioration des processus industriels exige des molécules robustes qui restent actives et stables dans des conditions extrêmes de salinité, de pH et de température. Par conséquent, une quête de nouvelles sources pour de nouvelles molécules est fondamentale. La recherche sur les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles a été abordée par **Nordberg et Hofsten en 1969**.

Les propriétés de ces enzymes ont fait d'eux d'excellents candidats pour différentes applications biotechnologiques dans de nombreux processus industriels (l'industrie alimentaire, production des détergents, produits pharmaceutiques...) (**Setati, 2010**).

L'objectif de ce présent travail est la recherche des biomolécules extracellulaires produites par des halobactéries, isolées de milieux extrêmes, des dépressions salées d'Ouargla par **Khallef et al. (2019)**.

Il s'agit des haloarchées *Halorubrum litoreum*JCM13561<sup>T</sup>, *Natronorubrum bangense*A33<sup>T</sup> et la bactérie alcali-halotolérante extrême *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5, Cette étude est scindée en trois parties:

- !! La première partie présente une synthèse bibliographique relative aux environnements extrêmes et hypersalins et aux bactéries halophiles et leurs intérêts biotechnologique ;
- !! La deuxième partie indique les différentes méthodes suivies pour la recherche et la pré-caractérisation de molécules antimicrobiennes et enzymatiques produites par ces halobactéries ;
- !! 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*

## **1. Microorganismes extrêmophiles**

### **1.1. Généralités**

Pour pouvoir définir un environnement extrême, il faudrait d'abord définir ce qu'est un environnement non-extrême ou normal. Pour cela, un consensus général établit les facteurs physiques et chimiques les plus importants pour un environnement normal. Ces facteurs se situeraient approximativement à des valeurs de température de 4 à 50°C, de pH de 5 à 8,5 et de salinité entre celle de l'eau douce et celle de l'eau de mer (3,5%, p/v).

Le terme « extrêmophile » est utilisé par les microbiologistes pour décrire les microorganismes qui vivent dans des conditions extrêmes dans lesquelles d'autres formes de vie ne peuvent pas résister. La notion d'extrêmophile 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**).

Depuis la découverte des microorganismes extrêmophiles, les Archaea (du grec *archaios*, ancien) ont été les plus identifiées dans les environnements extrêmes (**Woese *et al.*, 1978**). Ils sont très divers, aussi bien du point de vue morphologique que physiologique (**Prescott *et al.*, 2003**), souvent considérés comme étant les seuls microorganismes pouvant survivre dans ce genre d'écosystème. Cependant, de nombreuses études ont démontré qu'il existe, dans les autres domaines de la vie (Bacteria et Eukarya) des microorganismes qui sont également capables de survivre dans des environnements extrêmes (**Weber *et al.*, 2004**).

Les premiers microorganismes extrêmophiles isolés font partie des halophiles (des grecs *halos*= sel), découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie ; la Mer Morte. Ils vivent dans des concentrations en sels très élevées. Les milieux hypersalés ou sursalés sont ceux dont la teneur en sels dissouts est supérieure à celle de l'eau de mer (35g/l) (**Satayarayana *et al.*, 2005**). Lorsqu'on dépasse les 100g/l en sels, les milieux deviennent extrêmes et inhibent la croissance d'une grande majorité des microorganismes (**RodriguezValera, 1985 in Khallef *et al.*, 2019**).

Les microorganismes halophiles sont rencontrés dans les lacs hyper salés, les marais salants et dans les grands lacs alcalins extrêmement salés tels que Oued El Natron-Egypte le lac Mgadi au Kenya, les étangs de distillation solaire et le « lac Utah » aux U.S.A. Ils sont également fréquents au niveau des sols salés des déserts, des régions arides et semiarides et se développent aussi dans les produits alimentaires conservés par salaison tels que la viande et le poisson, ce qui confère aux produits contaminés une forte coloration rouge (**Oren et al., 1999 ; Tortora et al., 2003**)

Les microorganismes extrêmophiles peuvent être répertoriés en plusieurs groupes, selon leurs paramètres de croissance et les conditions dans lesquelles ils existent (hautes et basses températures, valeurs extrêmes de pH, hautes concentrations de sel, hautes pressions et radiations).

## **1.2.Diversité des microorganismes extrêmophiles**

### **1.2.1.Microorganismes halotolérants et halophiles**

Les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes « qui aiment le sel » (Salt-Loving). Le nom halophile est utilisé généralement pour désigner les microorganismes exigeants une certaine quantité de sel qui est presque toujours le chlorure de sodium. La distinction entre les différents groupes de microorganismes halophiles est basée sur leur niveau d'exigence ou de tolérance aux sels (**Kushner, 1993**). Ils incluent une grande diversité d'organismes, comme les bactéries aérobies modérément halophiles, les cyanobactéries, les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries hétérotrophes, les bactéries anaérobies, les Archaea, les protozoaires, les mycètes, les algues et les eucaryotes multicellulaires (**Gregoire et al., 2009**). Qualifiées de bactéries extrêmes, elles peuplent de façon quasi-exclusive les marais salants, les lacs salés et les mines de sel où la salinité est bien supérieure à celle des océans (**Leclerc et Mossel, 1989 ; Ventoza et Nieto, 1995**).

Les microorganismes qui peuvent se développer en absence aussi bien qu'en présence du sel sont qualifiés d'halotolérants et ceux qui sont capables de se développer au-dessus de 15% de Na Cl sont considérés comme extrêmement halotolérants (**Dassarma, 2001**). Les bactéries nécessitant moins de 1 % de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles. **Kushner (1993)**, proposa une classification de bactéries halophiles en fonction de

leur réponse au Na Cl, en se basant sur leur croissance maximale. Cinq groupes ont été définis, motionnés dans le tableau 1.

Les bactéries halotolérantes se développent dans les milieux qui contiennent une concentration de sel <0.2 M (~1%) mais peuvent aussi tolérer des concentrations élevées en sel (Yoon *et al.*, 2003). Même au sein des halotolérantes, différentes catégories apparaissent, (Tiqula *et al.*, 2006) comme le montre le tableau 2.

**Tableau 1 : Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de Kushner (1993).**

Catégories	Na Cl
Les non-halophiles	~1%
Les halophiles légères	1 à 3%
Les halophiles modérées	3 à 15%
Les halophiles à bord extrêmes	9 à 23%
Les halophiles extrêmes	15 à 32%

Il est difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence et la nature de nutriments disponibles aussi la présence des autres sels modifient considérablement la réponse des microorganismes au Na Cl (Kushner, 1993 ; Ventosa *et al.*, 1998). Ainsi, la concentration saline optimale de croissance de l'espèce *Halomonas halophila* est de 5% à 22 % alors qu'elle est de 7.5% lorsque la température varie de 32 à 42 °C (Quesada *et al.*, 1987).

**Tableau 2 : Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiqula *et al.*, 2006).**

Catégories	NaCl
Légalement halotolérantes	6 à 8%
Modérément halotolérantes	18 à 20%
Les halotolérantes extrêmes	0 à 30%

## 1.2.2. Les micro-organismes des températures extrêmes

### 1.2.2.1. Les microorganismes psychrophiles

Les bactéries psychrophiles sont des bactéries adaptées au froid pouvant vivre dans des environnements variés : régions arctiques, glaciers pour les températures négatives, et les océans profonds pour des températures légèrement positives (aux alentours de 4°C).

Selon la classification la plus répandue de **D'Amico's et al. (2006)**, les micro-organismes psychrophiles auraient un optimum de croissance entre 15°C et 20°C, certains pouvant se développer en dessous de 0°C. Les archées représenteraient jusqu'à 30 % de la population totale dont une majorité de Methanoarchaea. Les genres bactériens les plus rencontrés appartiennent aux gamma-protéobactéries : *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella*, *Shewanella* et *Psychromonas*, et d'autres tels que : *Alteromonas*, *Glacieola*, *Pseudoalteromonas*, et *Polaribacter* (**Gregoire et al., 2009**).

La surface terrestre est composée à 60 % de d'eaux marines, à plus de 1000 mètres de profondeur, les bactéries rencontrées dans ces conditions environnementales, sont dites psychrophiles, mais peuvent être également piézophiles. La première bactérie piézopsychrophile isolée est la souche CNPT 3, apparentée au genre *Spirillum*, retrouvée à une profondeur de 5600 mètres. Elle se développant de manière optimale entre 2 et 4°C pour une pression de 50 MPa. Une deuxième souche, la MT 41 collectée à 10476 mètres, poussant de manière optimale à 2°C et à 69 MPa (**Yayanos, 1995, in Khallef et al., 2019**).

### 1.2.2.2. Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles

La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles, sont des organismes vivants à des températures optimales de croissance comprises entre 50 et 80°C. Les hyperthermophiles ont des optima au-dessus de 80 °C, telles les bactéries, *Thermotogamaritima* et *Aquifexpyrophilus* qui croissent à des températures de 90°C et 95°C respectivement (**Niehaus et al., 1999 in khallef et al., 2019**). Ces derniers sont également caractérisés par la présence de la gyrase reverse, une enzyme responsable de la stabilisation de l'ADN bicaténaire aux températures élevées (**Holden, 2009**).

Les micro-organismes retrouvés dans ces zones appartiennent aux domaines des *Bacteria* et des *Archaea*. Chez les *Bacteria*, il existe un grand nombre de bactéries thermophiles

anaérobies hétérotrophes de l'ordre des *Clostridiales* mais également des espèces aérobies appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermustelles* que les espèces des genres *Thermus*, *Rhodothermus*. (Madigan et Martinko, 2006).

Chez les *Archaea* thermophiles et hyperthermophiles, il existe deux phylums, celui des *Euryarchaeota* regroupant des hyperthermophiles (croissance possible jusqu'à 110°C pour certains) producteurs de méthane ou *Methanoarchaea*. Le phylum des *Crenarchaeota* composé en particulier les *Sulfolobales*, qui sont plutôt spécifiques des habitats chauds terrestres alors que les *Desulfurococcales* colonisent essentiellement les habitats volcaniques sous-marins. Une des caractéristiques majeures de cet ordre est qu'il comporte les organismes les plus thermophiles connus à ce jour : *Pyrolobus fumarii* isolée d'une cheminée hydrothermale de la dorsale medio Atlantique détient le record de la température de croissance la plus élevée (113°C) chez les procaryotes (Madigan et Martinko, 2007). Les thermophiles habitent également les systèmes thermiques artificiels tels que les circuits d'alimentation et les réservoirs d'eau chaude, les centrales nucléaires, les usines géothermiques, les puits et les forages de pétrole, le compost et les bioréacteurs (Ferrera et Resynbach, 2007).

### 1.2.3. Les micro-organismes piézophiles

Le terme piézophiles (en Grec piezo= pression et philo = aimer) a été introduit officiellement en 1995 pour décrire les microorganismes barophiles. Dans la fosse des Mariannes, les bactéries *Thermaerobacter*, mais aussi *Shewanella* et *Moritella* ont été trouvées à une profondeur de presque 11 000 mètres sous le niveau de la mer (Yayanos, 1995).

Les sources hydrothermales océaniques profondes constituent également un habitat idéal pour les bactéries piézophiles. Situées sur les dorsales océaniques, leur profondeur varie de 800 à 4000 mètres et la gamme de température s'étend de 2°C à 350°C on y retrouve des thermopiézophiles (Zeng X et al., 2009). En 2009, l'archée hyperthermophile piézophile stricte découverte à 4.000 mètres sous la surface de l'eau, au fond de l'Atlantique, dans une source hydrothermale, il s'agit de *Pyrococcus* CH1 (organisme incapable de pousser à la pression atmosphérique). Les auteurs indiquent qu'elle vit dans une plage de températures entre 85 à 105°C, elle, meurt de froid, cette archée a également besoin d'une pression énorme. Elle se divise normalement entre 500 et 1.200 bars (rappelons que la pression atmosphérique au niveau de la mer est d'environ 1 bar) (Goudet, 2009).

#### 1.2.4. Les micro-organismes acidophiles

Les microorganismes acidophiles se développent de façon optimale à un pH égal à 2 (**Morozkina et al., 2010**), ils colonisent des environnements acides alors que les acidotolérants peuvent être isolés à partir des environnements à pH neutre (**Horikoshi, 1999**).

Les environnements où sont retrouvés les micro-organismes acidophiles ont généralement un pH < 4, et sont souvent riches en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...).

On compte dans ces environnements acides des chimio-lithotrophes capables d'oxyder le fer et les composés minéraux soufrés appartenant aussi bien au domaine des *Bacteria* (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum* spp. chez les mésophiles et *Sulfobacillus* spp. chez les thermophiles) qu'à celui des *Archaea* (*Ferroplasma* et *Sulfolobus* spp.). Les hétérotrophes strictes et facultatives colonisent également les environnements acides, elles appartiennent aux genres *Acidiphilium* et *Acidimicrobium* du domaine des *Bacteria* (**Fardeau et al., 2005**). Le record de l'acidophilie est atteint par l'archée thermoacidophile *Picrophilustorridus* dont l'optimum de croissance se situe à pH 0,7 et 65°C, capable de se diviser à pH 0 et dont le milieu intracellulaire est à pH 4,6 (**Futterer et al., 2004 in khallef et al., 2019**).

#### 1.2.5. Les micro-organismes alcalophiles

Le terme alcaliphiles (alcali de l'arabe, carbonate de sodium, phile, aimant). Les alcaliphiles sont définis comme des organismes qui poussent de manière optimale à pH supérieure à 8, certains pouvant même croître à un pH supérieur à 11 (**Horikoshi, 1999a ; Grant 2000 in Khallef et al., 2019**). Les bactéries alcalophiles peuvent également être halophiles et se développer jusqu'à des concentrations en sel (Na Cl) proches de la saturation (35 % de Na Cl), notamment dans les lacs et déserts sodiques ou les sources alcalines, le Lac Magadi au Kenya, affiche des valeurs de pH supérieures à 10 atteignant parfois 12 (**Jones et al., 1998**). L'alcalinité du milieu ambiant est induite par la forte concentration en carbonate, mais la différence d'un milieu à un autre se situe au niveau de la salinité.

En ce qui concerne les environnements alcalins salés à fortement salés, ce sont des bassins fermés où la vitesse d'évaporation est élevée et permet d'atteindre une salinité de 35 % en NaCl pour des pH compris entre 8 et 12. Ces lacs aux couleurs pouvant aller du vert au rouge, en passant par le rose ou l'orange selon la saison et l'ensoleillement. La diversité microbienne

retrouvée dans ces environnements est très variée mais les bactéries halo-alcalophiles les plus étudiées sont les cyanobactéries filamenteuses (*Spirulina*, *Anabaenopsis* et *Arthrospira*) ; et les bactéries pourpres (*Ectothiorhodospira* et *Halorhodospira*) mais également les bactéries fermentaires anaérobies (**Gregoire et al.,2009**).

Les produits de microorganismes alcalophiles, en particulier les enzymes, ont un potentiel industriel très important, essentiellement dans l'industrie alimentaire, l'industrie des détergents, du papier et des tissus (**Sarethy et al., 2011**).

## **2.Environnements salins et hyper salins**

Deux types d'environnements peuvent avoir le sel comme facteur agissant sur les populations microbiennes ; le sol et l'eau (**Hachicha, 2007**).

La vie microbienne peut être trouvée sur un éventail extrême de concentrations en sel; passant de l'eau douce (contenant moins de 0,5 g/l de sel dissous), à l'eau de mer et enfin aux environnements hypersalins (**Oren, 1999**). Les eaux marines constituent le plus grand biome sur notre planète avec une concentration en sel autour de 35g/l, et les environnements hypersalins ont été définis comme ceux ayant des concentrations salines au-dessus de celle-ci (**Oren, 1999; Gerday et Glansdorff, 2007**). La diversité des propriétés des habitats salins et hyper salins sur terre est reflétée par la grande diversité au sein des communautés microbiennes adaptées à la vie sous les conditions dominantes (**Oren, 2006**).

Les environnements hyper-salins peuvent être divisés en trois groupes : thalassohalins, athalassohalins et sols salés. (**Litchfield, 1998**).

### **2.1.Environnements thalassohalins**

Dans les environnements thalassohalins, (du grec thalasso, mer) l'eau de mer est concentrée par évaporation. Tous les sels présents augmentent leurs concentrations dans les mêmes proportions jusqu'au seuil de précipitation. Les carbonates précipitent sous forme de carbonates de  $Ca^{2+}$  dès que la salinité atteint 6 %. Le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de  $Ca^{2+}$ ) dès que la salinité dépasse 10%. Au-delà de 25 %, le Na Cl commence à précipiter sous forme d'halite et précipite pleinement à 34 %. Les eaux sont par la suite

enrichies en ions  $Mg^{2+}$  et  $K^{+}$  dont les sels précipitent à des salinités 20 fois supérieures à celle de l'eau de mer (**Blatt *et al.*, 1980 ; Rodriguez-Valera *et al.*, 1985**).

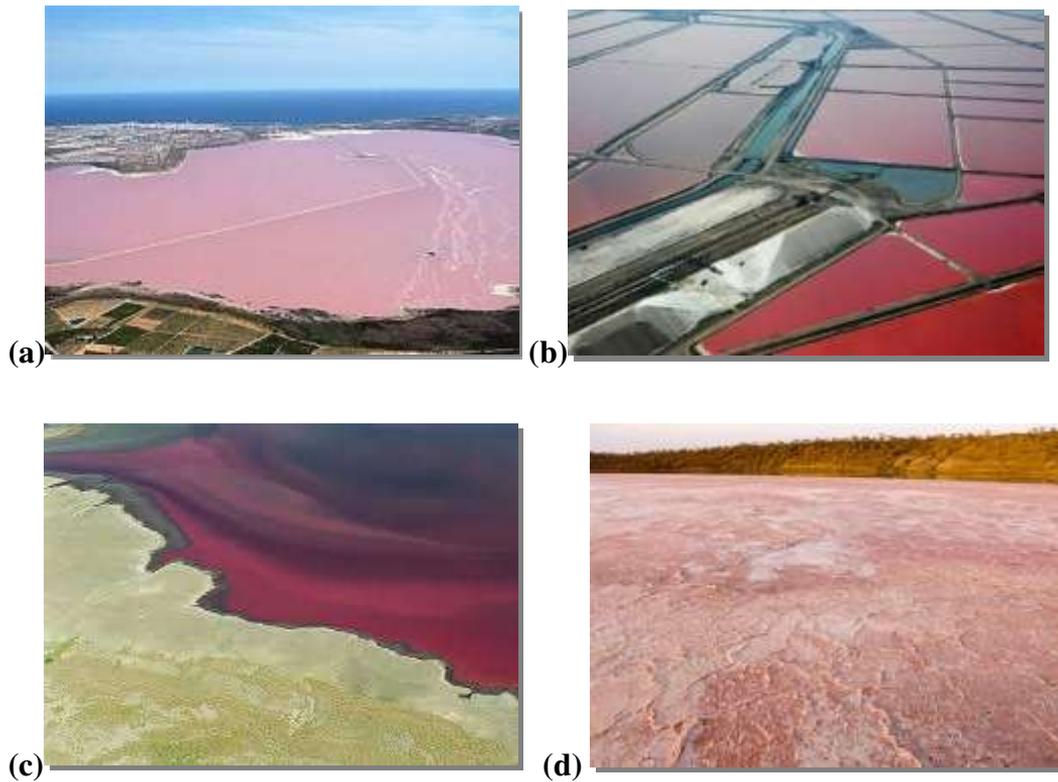
## **2.2. Environnements athalassohalins**

Les eaux athalassohalines proviennent de la dissolution d'évaporites par l'eau, cas de la Mer Morte, du Lac Rose Salé au Sénégal et de la plupart des sebkhas situées en zones semi-arides et arides. Ces environnements ont une composition ionique saline différente de celle de l'eau de mer (**Litchfield et Gillevet, 2002 ; Oren, 2002a ; Roussel *et al.*, 2008**). La figure 1 reprend des exemples d'environnements thalassohalins et athalassohalins.

Les lacs hypersalés alcalins présentent une autre variation dans la composition ionique. Il y'a prédominance d'anions (carbonates et chlorures) et de cations ( $Na^{+}$ ). Le pH des lacs hypersalins est généralement neutre ou légèrement alcalin, alors que celui de la Mer Morte est légèrement acide (**Litchfield, 1998**). Le tableau 03 reprend la composition ionique de différents environnements thalassohalins et athalassohalins.

## **2.3.Sols salés**

Les sols contenant des quantités supérieures à 2g/l de sels contenu dans la solution des sols sont considérés comme salins (**Kaurichev, 1983**). Ils sont très communs à travers le monde surtout dans les régions arides ou désertiques. L'augmentation progressive de la concentration des sels dans ces sols est due à l'apport d'eau d'irrigation salée, de l'aridité du climat ou de conditions hydrologiques particulières (lessivage insuffisant, proximité de la nappe...). (**Lergos, 2009in Khallef *et al.*, 2019**).



**Figure 1: Habitats thalassohalins : Marais salants de Costa Blanca en Espagne (a), le Grand Lac Salé Utah aux USA (b). Habitats athalassohalins : Lac Magadi au Kenya (c), Lac Rosé au Sénégal (d) (<http://www.jmg.centerblog.net/rub>), in Khallef et al., 2019).**

**Tableau 3: Composition ionique des environnements thalassohalins et athalassohalins.**

Ions	Environnements					
	Mer Morte <sup>a</sup>	Mer <sup>a</sup>	Grand lac salé <sup>a</sup> (USA)	Lac Natrun <sup>b</sup> (Egypte)	Lac Magadi <sup>b</sup> (Kenya)	Lac salé El Goléa <sup>c</sup> (Algérie)
Na <sup>+</sup>	40,10	10,60	105	142	46	107
K <sup>+</sup>	7,70	0,38	6,70	2,30	0,06	nd
Mg <sup>2+</sup>	44	1,27	11	<1	<1	0,30
Ca <sup>2+</sup>	17,20	0,40	0,30	<1	<1	0,40
Cl <sup>-</sup>	225	18,90	181	155	14	198
Br <sup>-</sup>	5,30	0,065	0,20	nd	nd	nd
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,50	2,65	27	22,60	nd	nd
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0,20	0,14	0,70	67,00	34,90	nd
pH	6,10	8,10	7,70	>11,50	>11,50	9,00

○ Les concentrations des ions sont en g/l ; nd, non déterminé. **a**, Gerday et Glansdorff, (2007) ; **b** Madigan et Martinko, (2006) ; **c** Boutaiba *et al.*, (2011).

### 3. Diversité phylogénétique des halophiles

Les organismes halophiles peuvent être rencontrés dans les trois domaines de la vie : Archaea, Bacteria et Eucarya (Oren, 2008) (Figure 2). L'augmentation de la salinité s'accompagne d'une réduction de la diversité des communautés microbiennes (Oren, 2002).

Le développement des techniques de la biologie moléculaire ont permis l'isolement de nouvelles espèces bactériennes halophiles et halotolérantes dans divers environnements salins et hypersalins, elles sont incluses dans les 5 phyla du domaine des Bacteria : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes* (Oren, 2002).

#### 3.1. Eucaryotes halophiles

Dans le domaine Eucarya, les halophiles sont rares. En fait, le seul microorganisme eucaryote d'importance, et presque ubiquitaire dans les environnements à hautes concentrations en sel, est l'algue verte *Dunaliella*. Elle est halotolérante plutôt que strictement halophile : la plupart des souches se développent sur une large gamme de concentrations en sel (jusqu'à 1M) (Oren, 2002a).

Les moisissures, longtemps négligées dans la recherche des halophiles, contiennent un certain nombre de représentants halophiles faibles et modérés tels que *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium spp* (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000 ; 2005; Kis-Papo *et al.*, 2003) et les levures noires *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis* et *Aureobasidium pullulans* (Zalar *et al.*, 1999; Gunde-Cimerman *et al.*, 2000). Des protozoaires flagellés ont été observés dans des étangs artificiels (Cho, 2005).

#### 3.2. Bactéries halophiles

Les microorganismes halophiles et halotolérants du domaine Bacteria sont inclus dans 5 phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes*.

##### 3.2.1. Phylum proteobacteria

Ce phylum contient cinq classes de bactéries à Gram négatifs : Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria (ou Deltabacteria) et Epsilonproteobacteria (Brenner *et al.*, 2005). Les microorganismes appartenant à ce phylum

sont très ubiquitaires et hétérogènes, avec des propriétés physiologiques diverses. Ils peuvent être isolés de divers environnements comprenant des habitats marins, hypersalins, alcalins et acides.

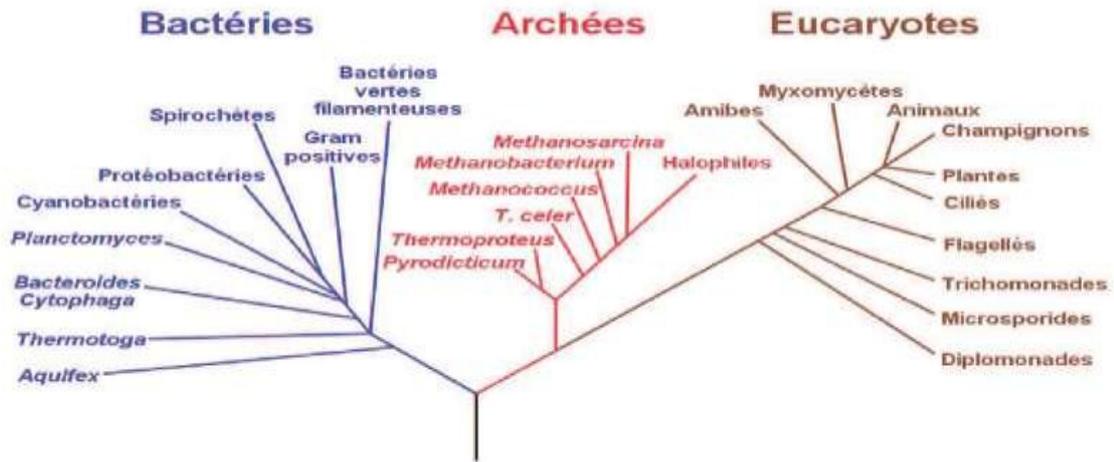


Figure 2:: Arbre phylogénique des êtres vivants (Marty., 2011).

La famille des *Halomonadaceae* (Franzmann *et al.*, 1988) de la classe Gammaproteobacteria contient le nombre le plus important d'espèces halophiles modérées. Ces dernières ont été isolées de plusieurs habitats différents, à savoir, les lacs hypersalins et/ou alcalins, sols salins, environnements hydrothermiques, gisements de pétrole. (Kim *et al.*, 2010).

Cette famille comprend également trois genres de bactéries halophiles extrêmes apigmentées (Maturrano, 2006 ; Sorokin *et al.*, 2006) dont une des espèces a été isolée de la sebkhia Ezzemoul en Algérie (Kharroub *et al.*, 2006a).

### 3.2.2. Phylum Firmicutes

Les membres de ce phylum sont capables d'habiter une grande variété d'environnements, tels que les habitats hypersalins, ce qui signifie leur diversité au niveau morphologique et physiologique. La famille des *Bacillaceae* est la plus importante avec 21 genres incluant des espèces halophiles obligatoires principalement le genre *Halobacillus* (Ludwig *et al.*, 2008).

La plupart des études physiologiques réalisées sur ce genre a été focalisé sur l'espèce type, *Halobacillus halophilus*. L'importance du chlorure est démontrée par plusieurs approches non seulement pour la croissance de cette bactérie mais également pour la motilité et la synthèse

flagellaire, la germination des endospores, la régulation d'une variété de protéines et le transport de l'osmoprotecteur glycine bêtaïne (Roefler et Müller, 2002 ; Roefler *et al.*, 2000).

### 3.2.3. Phylum Actinobacteria

C'est l'un des principaux groupes du domaine Bacteria (Ludwig et Klenk, 2001) répartie en 48 familles. L'ordre des Actinomycetales inclue des bactéries halophiles (Zhi *et al.*, 2009).

### 3.2.4. Phylum Spirochètes

Le genre *Spirochaeta*, inclue quatre espèces modérément halophiles. Il s'agit de *Spirochaetahalophila* (Greenberg et Canale-Parola, 1976), des espèces haloalcaliphiles (*Spirochaetaafricana* et *Spirochaetaalkalica*) et *Spirochaetaasiatica* (Zhilina *et al.*, 1996).

### 3.2.5. Phylum Bacteroidetes

Ce phylum se compose de trois classes: Bacteroidia, Flavobacteria et Shingobacteria (Garrity et Holt, 2001) incluent des espèces halophiles faibles et modérées (Denger *et al.*, 2002; Donachie *et al.*, 2004; Nedashkovskaya *et al.*, 2005), et uniquement quatre espèces halophiles extrêmes aérobies et pigmentées: *Salinibacter ruber* (Antón *et al.*, 2002), *Salinibacter iranicus*, *Salinibacter luteum* (Makhdoumi-Kakhki *et al.*, 2012) et *Salisaeta longa* (Vaisman et Oren, 2009).

## 3.3. Archaea halophiles

Depuis la découverte des microorganismes extrêmophiles, les Archaea ont été les plus identifiées dans les environnements extrêmes, surtout associées à des sources thermales (Woese *et al.*, 1978). Les halophiles du domaine Archaea appartiennent à trois familles : *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. La famille des *Halobacteriaceae* (haloarchaea ou halobactéries) de l'ordre des *Halobacteriales* est composée entièrement de membres halophiles extrêmes et aérobies. Les représentants de cette famille se développent dans des environnements où la concentration saline est très élevée ( $\approx 5M$ ) et dont leur optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2M (20-25%, p/v). Ils exigent la présence de sel pour leur croissance. Leur paroi cellulaire, ribosomes et enzymes sont stabilisés par l'accumulation de KCl (Yachai, 2009).

Une caractéristique physiologique intéressante est la présence, chez certaines espèces d'halobactéries, d'un photopigment membranaire (la bactériorubérine) qui permet la production d'ATP, quand la teneur en oxygène dans le milieu extérieur est trop faible.

Ce composé formé d'une protéine (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde (rétinal) est responsable de la couleur rouge des saumures (**Oren., 2002a**).

#### **4. Adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la salinité**

Les microorganismes halophiles et halotolérants rencontrent différentes difficultés telle la forte pression osmotique exercée par leur environnement fortement salin. Aussi ils ont développé deux stratégies fondamentalement différentes pour équilibrer la pression osmotique de leur cytoplasme avec le milieu extérieur:

Les halophiles ont développé deux différentes stratégies d'adaptation pour faire face à la pression osmotique induite par la forte concentration en Na Cl du milieu. La première, utilisée par les Archées halophiles aérobies de la famille *Halobacteriaceae* et les bactéries halophiles anaérobies de l'ordre des *Halanaerobiales* implique l'accumulation de concentrations molaires de KCl (**Kerkar, 2004**). Cette stratégie nécessite une adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire. Les protéines doivent conserver leur propre conformation et activité à des concentrations salines quasi-saturantes. Les protéines halophiles sont riches en acides aminés acides qui confèrent une charge négative en surface. Ces protéines interagissent avec les ions de chlorure et de sodium pour former des ponts en sel (**Richard et al., 2000**), qui se dénaturent à de faibles teneurs en sel.

La deuxième stratégie d'haloadaptation qui est observée chez la plupart des bactéries halophiles, des eucaryotes et aussi chez les archées halophiles méthanogènes (**Kerkar, 2004**), consiste à exclure le plus de sels possible de leur cytoplasme pour éviter la perte d'eau (**Galinski, 1995**) et/ou d'accumuler des solutés organiques "compatibles" qui n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique. Une variété de ces solutés sont connus, telles la glycine bêtaïne, et l'ectoïne, d'autres dérivés d'acides aminés, les sucres et les alcools de sucre (**Oren, 2008**). Le glycérol et d'autres polyalcools sont largement utilisés pour l'adaptation osmotique chez les eucaryotes, les algues et les moisissures halophiles, mais rarement chez les procaryotes halophiles (Tableau annexe 1). Il y a quelques solutés compatibles, dans le domaine des archées non encore détectées chez les autres halophiles. Les halophiles méthanogènes comme

l'espèce de *Methanohalophilus* contient, en plus de la glycine bêtaïne trouvée dans la nature, les  $\beta$ -acides aminés ( $\beta$ -glutamine,  $\beta$ -glutamate et N $\epsilon$ -acetyl- $\beta$ -lysine) et les dérivés qui sont rarement trouvés dans d'autres groupes (**Oren, 2008**).

## 5. Intérêt biotechnologique des halophiles et halotolérants

Les microorganismes halophiles, présentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant de survivre et de se développer de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. Ces dernières années un intérêt croissant est porté à ces microorganismes, dont l'utilisation est envisagée dans différents secteurs.

### 5.1. Enzymes

Les enzymes sont des molécules catalyseurs très importantes utilisées dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques et cosmétiques (**Fukushima et al., 2005**).

#### 5.1.1. Protéases

Les protéases hydrolysent les protéines en libérant des peptides plus petits. Les protéases microbiennes sont l'une des classes d'enzymes les plus étudiées (**Amoozegar et al., 2007**). Chez les microorganismes halophiles, ces enzymes exercent une activité optimale en présence de NaCl et restent stables sur une gamme de pH (5 à 10) (**Gupta et al., 2005**).

#### 5.1.2. Amylases

Quelques  $\alpha$ -amylases ont été purifiés et caractérisés à partir des microorganismes halophiles (**Perez-Pomares et al., 2003**). Les amylases ont une gamme étendue d'applications dans beaucoup de champs tels que les industries de textile, des aliments, de boulangerie, de brassage et la distillation (**Gupta et al., 2003**).

#### 5.1.3. Lipases et estérases

Les lipases sont parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes avec un potentiel dans divers domaines de l'industrie pharmaceutique et l'agriculture. (**Amoozegar et al., 2008**).

Les enzymes hydrolysant les esters carboxyliques sont ubiquistes et ont été trouvées dans les trois domaines du vivant et chez certains virus.

#### 5.1.4. Xylanases

Les xylanases sont les enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\beta$  (1, 4) entre deux résidus  $\beta$ -Dxylopyranoses. Elles sont utilisées dans l'industrie de boulangerie pour améliorer les propriétés de la pâte, dans le bio blanchiment de papier (Mamo *et al.*, 2009). Cependant, l'application efficace des xylanases dans le bio-blanchiment exige que ces enzymes soient alcaliphiles et thermotolérantes.

Les organismes halophiles sont la source la plus susceptible des enzymes avec de telles propriétés. Bien que la recherche dans cet axe soit encore limitée, seulement quelques xylanases halophiles ont été décrites. Elles incluent les enzymes dérivées des bactéries marines et hypersalines telles que *Glaciecolamesophila* (Guo *et al.*, 2009), *Chromohalobacter sp.* (Prakash *et al.*, 2009a) et *Nesterenkonia sp.* (Govender *et al.*, 2009).

Une partie de ces enzymes montre une grande stabilité dans un intervalle large de pH (6 à 11) et reste active à des températures au-dessus de 60°C (Wejse *et al.*, 2003 ; Guo *et al.*, 2009 ; Prakash *et al.*, 2009b).

#### 5.1.5. Cellulases

Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons  $\beta$ -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 (Beldman *et al.*, 1985).

Les cellulases sont principalement utilisées dans l'industrie textile pour le bio-blanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pour ramollir les tissus (Aygan et Arikan, 2008). Des cellulases halophiles dérivées de *Bacillus sp.* (Aygan *et al.*, 2008) et de *Salinivibrio sp.* sont thermostables et également stables à l'alcalinité et à la salinité ce qui fait d'elles des candidats idéaux pour différentes applications industrielles. (Wang *et al.*, 2009).

#### 5.1.6. Nucléases

Une des quelques enzymes halophiles appliquées dans les processus industriels est la nucléase H, isolée de *Micrococcus varians sub sp. halophilus*, utilisée dans la production commerciale

de l'agent aromatisant : l'acide 5'-guanylique (5'-GMP). Cette enzyme dégrade l'ARN à 60°C en présence de 12% (p/v) de sel (**Kamekura et al., 1982**).

## 5.2. Autres composés

### 5.2.1. Production d'exo polysaccharides

Les exopolysaccharides sont produits majoritairement par des souches appartenant aux genres *Haloferax*, *Halomonas*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Vibrio* (**Rodriguez-Valera, 1992; Calvo et al, 2002; Nazarenko et al., 2003**).

Ils ont un intérêt en biotechnologie en raison de leur capacité à augmenter la viscosité des milieux aux valeurs basses de pH, ils sont employés en médecine, pharmacie, dans les produits de beauté et dans l'industrie du pétrole (**Quesada et al., 2004**).

### 5.2.2. Production des antibiotiques

#### ○ Les halocines

Les halophiles extrêmes du domaine Archaea produisent des substances protéiques excrétées dans l'environnement, appelées halocines. (**Price & Shand, 2000**).

Les halocines sont un groupe d'antibiotiques peptidiques potentiellement intéressant qui inhibent les haloarchées phylogénétiquement liées (**Litchfield, 2011**). Bien que la production d'halocines semble être une caractéristique universelle des halophiles extrêmes (**Torreblanca et al., 1991**), seulement cinq halocines ont été caractérisées au niveau protéique. Trois d'entre elles se distinguent par leur haut poids moléculaire :

L'halocine H4 produite par *Haloferax mediterranei* R4 d'environ 28 kDa (**Meseguer & Rodriguez-Valera, 1985**). L'halocine H6 produite par *Haloferax gibbonsii* Ma d'environ 32 kDa (**Torreblanca et al., 1989**). Les résultats des tests effectués sur les mammifères sont significatifs du fait que cette halocine peut servir comme traitement pour réduire les ischémies lors d'une transplantation d'organe, en réduisant par exemple la taille de l'infarctus et le nombre de battements ectopiques d'un cœur nouvellement transplanté. La base de l'application biomédicale de l'halocine H6 est la découverte de son mécanisme d'action

(Shandet *al.*, 2007). L'halocine III de 31 kDa produites par *Haloferoxmediterranei* Xia3 (Plataset *al.*, 1996).

### 5.2.3. Bactériorhodopsine chez les haloarchaea

La bactériorhodopsine est une protéine de 25 kDa qui porte un groupe rétinol lié à la lysine216. Elle sert de pompe à protons à lumière-dépendante (Oren, 2010).

Certains membres des genres *Halobacterium*, *Haloarcula* et l'espèce *Halorubrum sodomense* sont capables de réaliser un type particulier de photosynthèse en absence de chlorophylle (Blaurock&Stoeckenius, 1971 ; Oren, 1983b ; Kitajima *et al.*, 1996). A basse pression partielle d'oxygène, elles synthétisent des taches pourpres qui apparaissent sur leur membrane cytoplasmique (membrane rouge) et qui peuvent couvrir plus de la moitié de la membrane cellulaire : c'est la membrane pourpre, qui contient environ 25 % de lipides et 75 % de protéines (Kates, 1988). Les taches pourpres sont formées de feuilletts plats contenant un réseau cristallin d'une seule protéine : la bactériorhodopsine (br) (Oesterhelt&Stoeckenius,

1971). Celle-ci ressemble fortement au pigment sensoriel, la rhodopsine, des bâtonnets et des cônes des yeux des vertébrés. Chaque agrégat protéique est lié à un dérivé de caroténoïde : le rétinol (l'aldéhyde de la vitamine A). La membrane pourpre est sensible aux détergents (Hendler&Dracheva, 2001).

La bactériorhodopsine est fabriquée commercialement sous la forme de membrane plane pourpre préparé à partir de *Halobacterium salinarum*. Certaines de ces utilisations potentielles sont basées sur la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, les applications possibles sont la génération d'ATP, la conversion de la lumière du soleil en électricité et de dessalement de l'eau de mer, mais aussi les applications des nano-technologies telles que la construction de transistors moléculaires, les moteurs moléculaires, des rétines artificielles et des capteurs moléculaires (Oren, 2010).

# *Chapitre II*

## *Matériel et Méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche : Génie de l'Eau et de l'Environnement en Milieu Saharien (LGEEMS), et le laboratoire de microbiologie de Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV), université kasdi Merbah Ouargla, sur une période allant de Février à Mai, 2019. L'objectif est la recherche de substances bioactives élaborés par les bactéries halotolérantes et halophiles extrêmes.

## 1. Matériel biologique

### Description des souches productrices

Les souches utilisées dans notre étude sont des halobactéries, isolées des dépressions salées de Ouargla, séquencées au niveau du laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) Paris-France (Khallef *et al.*, 2019). Il s'agit des archaea *Halorubrum litoreum* JCM13561<sup>T</sup>, *Natronorubrum bangense* A33<sup>T</sup> appartenant toutes deux à la famille des *Halobacteriaceae* et l'*Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5.

Le genre *Halorubrum* a été formellement proposé en 1995 par **Mc Genity et Grant**. Le genre *Natronorubrum* a été établi par **Xu et al.** (1999). Le genre *Alkalibacillus* a été proposé par **Jeon et al.** (2005) basé sur une reclassification de *Bacillus haloalkaliphilus* (Fritze, 1996).

Le tableau ci-dessous, rapporte quelques propriétés des isolats.

**Tableau 4 : Caractéristiques morphologiques et physiologique des souches halophiles (Khallef *et al.*, 2019)**

Caractéristiques	<i>JCM 13561<sup>T</sup></i>	<i>Nrr. A33<sup>T</sup></i>	<i>A.haloalkaliphilus</i> C-5
Morphologie	Bacilles	Bacilles	Bacilles
Gram	-	-	+
Mobilité	+	-	+
Pigmentation	Rouge	Orange	Beige
NaCl intervalle (%) (p /v)	10->29	10-25	0-25
NaCl optimale (%) (p /v)	20	20	10-15
Intervalle T°C	20-45	20-45	10-45

Température Optimale °C	40	45	37
Intervalle pH	6,0-9,5	7-9,5	7-9,5
pH Optimale	7,5	9	9,5

### Les souches cibles

Récupérées en majorité de la souchothèque du laboratoire LABAB-Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, les souches cibles sont représentées par :

*Staphylococcus aureus* ATCC43300 MRSA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 MRSA, *Staphylococcus aureus* M450, et *Staphylococcus aureus* LGA 257, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* WDCM 0009, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *Salmonella typhi* ATCC 14028.

Le matériel, appareillage et réactifs utilisés sont donnés en annexe2.

## 2. Méthodes

### 2.1. Réactivation des souches (revivification)

Le milieu de culture Brown (Br) utilisé pour la revivification des souches halophiles doit répondre aux exigences nutritionnelles des micro-organismes halophiles par sa concentration élevée en Na Cl, supplémenté de KCl, et d'acides aminés, ce milieu est préparé et ajusté à pH neutre (7,2). Sa composition est donnée en annexe 3.

Les souches précédemment isolées purifiées et conservées à 4°C sur gélose inclinée conditionnée en tubes, sont incubées 48h à 37°C. Un inoculum de chacune des trois souches est déposé à la surface du milieu, qui sera ensemencé par stries, puis porté à l'étuve à 37°C pendant 7 jours.

### 2.2. Précultures

Des précultures des isolats sont préparées en introduisant 50ml des milieux liquides à 20% de Na Cl (le même milieu ayant servi à leur revivification, sans addition d'agar) dans des Erlenmeyer de 250ml. Ces milieux sont inoculés avec le contenu d'une boîte Pétri des souches *Hrr.litoreum*, *Nr. Bangense* et l'*A. haloalkaliphilus C-5* âgées d'une semaine.

L'incubation durera 7 jours à 37°C, sous une agitation de 150 trs/min.

### 3. Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'halobactéries

#### 3.1. Recherche d'activités antagonistes

L'objectif de cette étude est de sélectionner parmi les 3 isolats une ou plusieurs souches productrices de substances bioactives 'bactériocine' ou autre substance 'antibactérienne' vis-à-vis d'un germe cible.

Les souches cibles ont subi une revivification dans des tubes à essais stériles contenant 10 ml de bouillon nutritif (composition annexe 3), incubés à 37 °C pendant 24 heures.

0,1 ml est prélevé stérilement de chaque culture et ensemencé en stries serrées par écouvillonnage, sur gélose Muller Hinton (Annexe 4). La recherche de substances inhibitrices est mise en évidence par deux approches :

##### **La méthode des cylindres d'agar**

Appelée également méthode d'antibiogramme, cette méthode consiste à prélever des cylindres de 5mm de diamètre de culture des souches réactivées qui seront déposés à la surface de milieux préalablement ensemencés par écouvillonnage par des germes cibles (**Meseguer et al., 1986**).

Chacune des trois souches est testée vis-à-vis des deux autres isolats, puis testée en même temps sur les 10 souches cibles. Ainsi, 3 disques d'agar de cultures de 7 jours sont déposés à la surface de la boîte pétri contenant une culture du germe cible (Figure 3).

Les zones d'inhibition sont mesurées après 24-48h d'incubation à 37°C pour les eubactéries, et après 5-7 jours pour les bactéries halophiles.

##### **La méthode de diffusion en double couche d'agar**

Une couche fine de milieu solide est coulée sur boîte Pétri. Après solidification, elle est additionnée d'une autre couche de gélose molle du même milieu ensemencé à 1% par le germe cible. Après solidification, 5µl de surnageants : surnageant de culture(SC), surnageant extrait de culture (SCE) et d'extrait protéique obtenus de l'extraction (**Figure 4**) des différentes cultures des halobactéries, sont déposés à la surface des boîtes, après séchage des spots, les boîtes sont incubées à 40°C jusqu'au développement du germe cible. Un résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des spots (**Shand, 2006**).

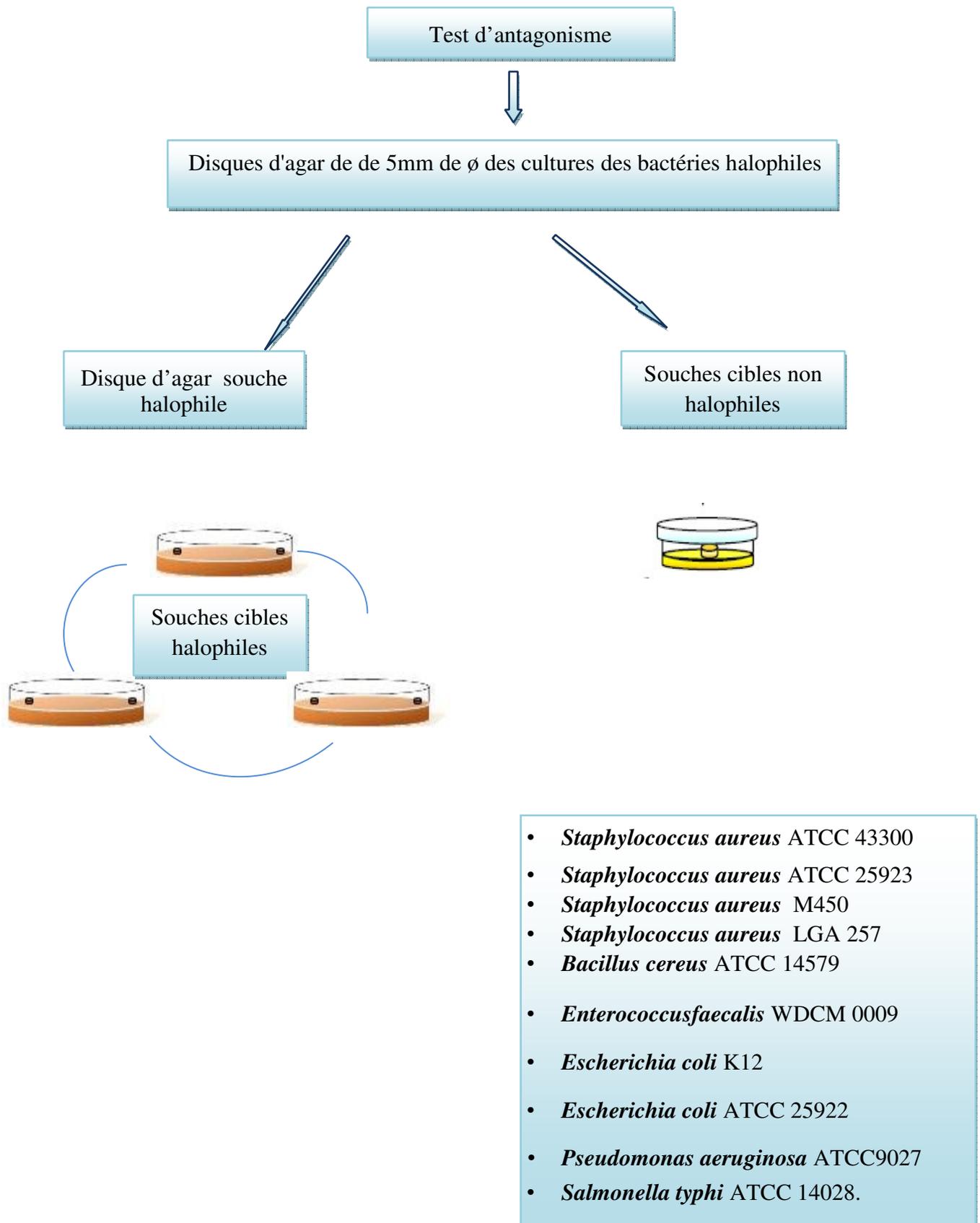


Figure 3: Schéma récapitulatif du test d'antagonisme selon la méthode des cylindres d'agare

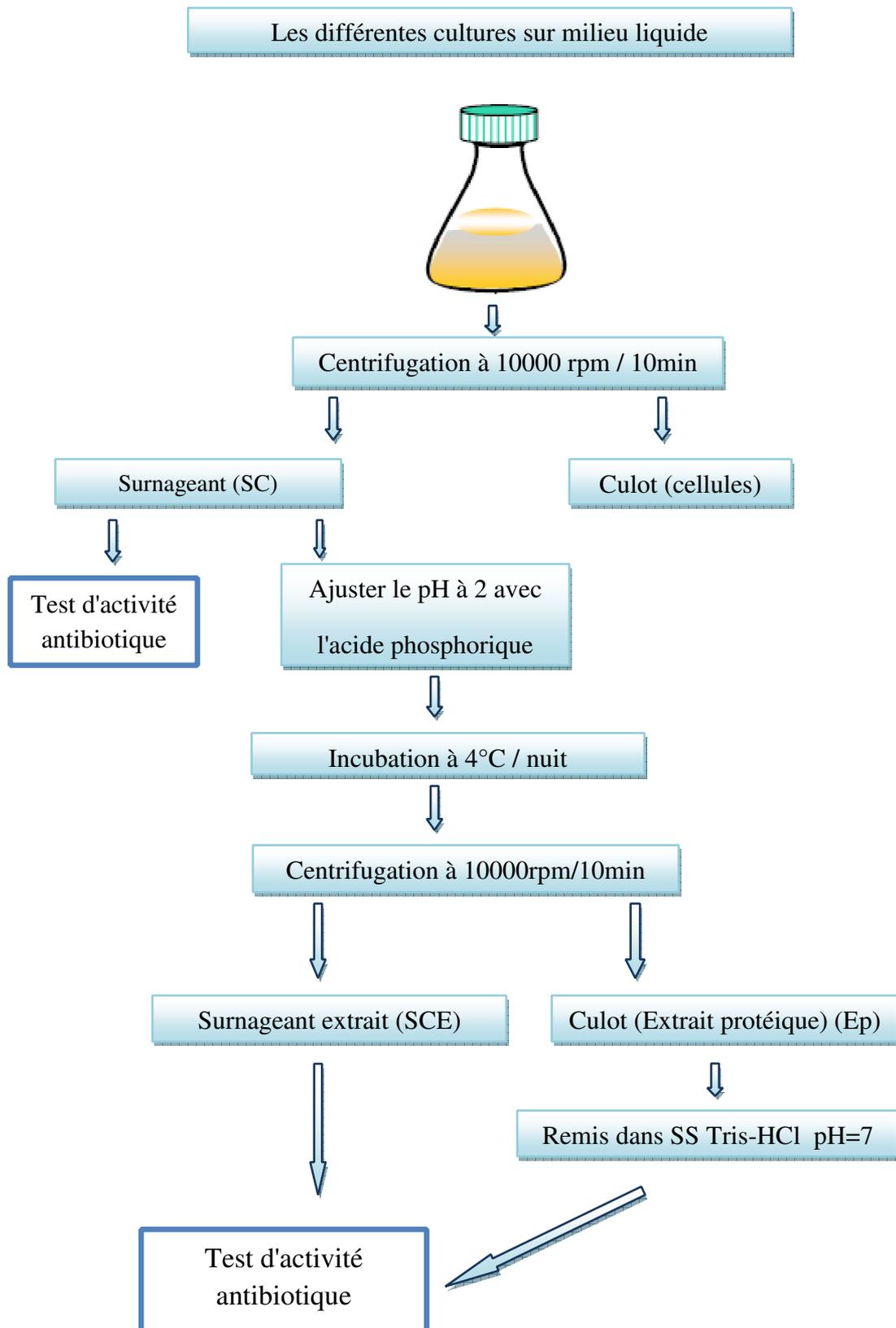


Figure 4: Protocole d'extraction acide et à froid des protéines totales du surnageant de culture (Yang *et al.*, 1992)

### 3.2. Recherche de l'activité enzymatique

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**). Deux essais ont été réalisés avec les différentes souches pour chaque substrat.

#### 3.2.1. Détermination de l'activité protéolytique

##### ✦ Hydrolyse du lait écrémé

L'activité protéolytique est déterminée en déposant en spots les surnageants de cultures sur le milieu (Br) additionné de lait écrémé 1% (p/v). Les boîtes sont incubées à 40°C.

Des halos clairs autour des spots sont considérés comme une activité protéolytique (**Roxana et al., 2009**).

##### ✦ Recherche de la caséinase

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 à 40 °C. La présence de cette activité est détectée par un halo autour des spots indiquant une hydrolyse de la caséine (**Roxana et al., 2009**).

#### 3.2.2. Hydrolyse de la gélatine

Les produits d'extraction sont déposés en spots sur le milieu de base supplémenté de 2% (p/v) de gélatine. Les boîtes de Pétri sont incubées à 40 °C, l'hydrolyse est révélée par addition de 1 à 2ml du réactif TCA (10%) en surface afin de mieux observer les zones claires, celles-ci indiquent la production d'une gélatinase (**Kim et Hoppe, 1986**).

#### 3.2.3. Détermination de l'activité amylolytique

La présence de l'action d'une amylase extracellulaire est déterminée par addition de 1% (p/v) d'amidon soluble (**Amoozegar et al. 2003**). Les produits d'extraction sont déposés en spots, après incubation à 40°C, 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.

### 3.2.4. Détermination de l'activité lipolytique et estérasique

Le milieu additionné de 1% de Tween 80 est préconisé pour la recherche d'estérase (**Gonzalez et al., 1978**), alors que la recherche de lipase est effectuée par l'hydrolyse de l'huile d'olive. Cette activité est recherchée sur milieu de base contenant 2,5% (v/v) d'huile d'olive (**Sigurgísladóttir et al., 1993**). L'ensemencement des souches est effectué par la méthode des spots suivie d'une incubation à 40°C, le développement d'un précipité autour des touches témoigne la présence d'une lipase.

### 3.2.5. Détermination de l'activité cellulolytique

La présence d'une cellulase est examinée sur milieu contenant 1% (p/v) de Carboxy Méthyl Cellulose (CMC). Après incubation à 40°C, les boîtes sont pulvérisées avec une solution de Lugol. L'apparition de zones claires autour des spots au bout de 10 à 12 minutes signifie un résultat positif indiquant la présence de la cellulase.

## 4. Stabilité thermique des enzymes

Pour vérifier la stabilité thermique des enzymes produites, les surnageants sont déposés dans un bain Marie à température 70 °C et 100°C pendant 10 min. Après refroidissement 50µl de ces surnageants sont déposés à la surface des milieux gélosés contenant les substrats à dégrader, suivi d'une incubation à 40°C.

## 5. Séparation des substances bioactives par chromatographie analytique sur couche mince

Des plaques de gel de silice (F254 MERCK 20 x 20 cm) prêts à l'emploi sont utilisées. Après réactivation du gel 30min à 100°C ; 50µl de chaque extrait actif est déposé sous forme de spots à 1 ou 3cm du bord inférieure de la plaque et à 2cm des bords latéraux. Le dépôt s'effectue en petites fractions à l'aide d'une seringue ou micropipette. Ces plaques sont ensuite maintenues verticalement dans des cuves de CCM contenant 100 ml de solvant. Les systèmes de solvants qui ont été utilisés durant la manipulation sont :

-Chloroforme –méthanol (60/40)

-Acétate d'éthyle- méthanol (100 : 15, v / v)

-Chloroforme –méthanol –ammoniaque (8 : 1 : 1, v / v) (**Badji et al., 2005**).

L'atmosphère des cuves est saturée pendant deux heures, avant d'y introduire les plaques. La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant atteint le bord supérieur de la plaque. Le solvant est éliminé de la plaque par une simple évaporation à température ambiante, les chromatogrammes sont observés à l'œil nu et sous lumière UV (Annexe 5). Cette étape a été réalisée dans le laboratoire de recherche : Génie des procédés (LGP).

## **6. Extraction des pigments membranaires**

Les différents culots récupérés de culture ont subi un traitement avec l'acétone / méthanol (v/v) puis incubés à l'obscurité pour extraire les pigments membranaires suivant le protocole repris en (Figure 5).

L'extraction est pratiquée sur un culot cellulaire préalablement lavé, les pigments sont ensuite dissous dans un solvant approprié.

La culture bactérienne est homogénéisée à l'ultra-turax. 15 ml sont prélevés et centrifugés 15 minutes à 3800rpm (Annexe 6). Le surnageant obtenu est alors éliminé (absence de pigments extracellulaires). Le culot repris dans 5mL d'eau osmosée. Une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions est réalisée. Le culot est repris dans 7 à 8 ml de méthanol. Le tube est enveloppé dans du papier aluminium, afin de protéger les pigments de la lumière, et agité pendant 2 heures à 100trs à 60°C. A l'issue de l'extraction dans le méthanol, on centrifuge 15 minutes à 3800rpm.

Le surnageant est récolté et son volume mesuré. Si le culot n'est pas totalement décoloré une deuxième extraction dans l'acétone est nécessaire. Le culot est alors repris dans 5 ml d'acétone, le tube est enveloppé dans du papier aluminium, agité à 100 trs à température ambiante pendant 24 heures. Le tube est centrifugé à 3800rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est récolté et son volume mesuré. L'absorbance des extraits pigmentaires ainsi récupérés est mesurée, à 450-700 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (**Savy et al., 2005**).

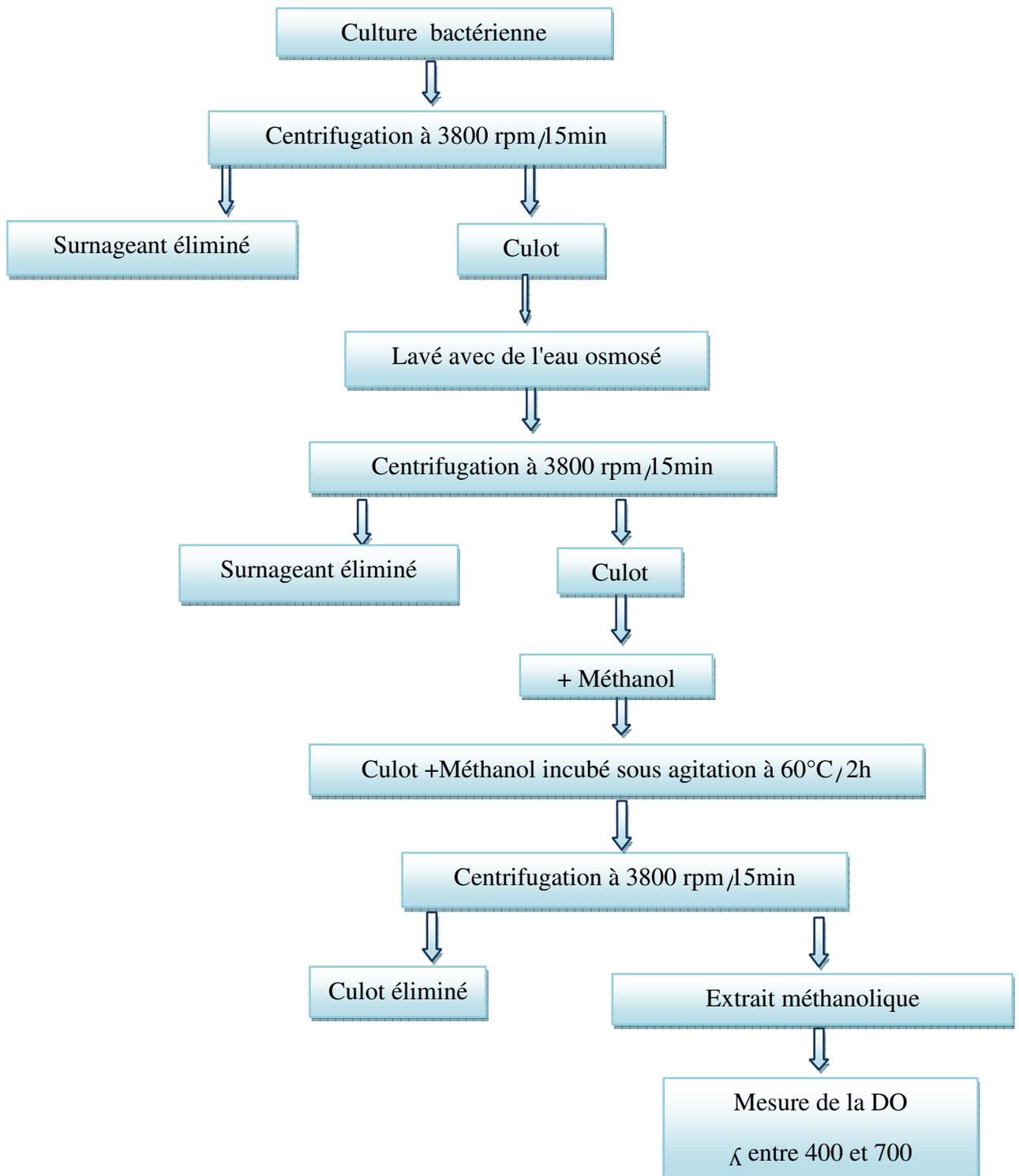


Figure 5 : Protocole d'extraction des pigments membranaires (Morin-Savy *et al.*, 2005).

***Chapitre III***  
***Résultats et discussion***

### 1.Revivification des souches:

Les souches purifiées, sont revivifiées à partir des cultures conservées à 4°C, après 7 jours d'incubation à 37°C sur milieu solide à 15% de Na Cl. Les colonies sont pigmentées : *Halorubrum litoreum* JCM13561<sup>T</sup> caractérisé par une couleur rougeâtre, *Natronorubrum bangense* A33<sup>T</sup> avec une couleur orangé et l'*Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 avec une couleur beige.

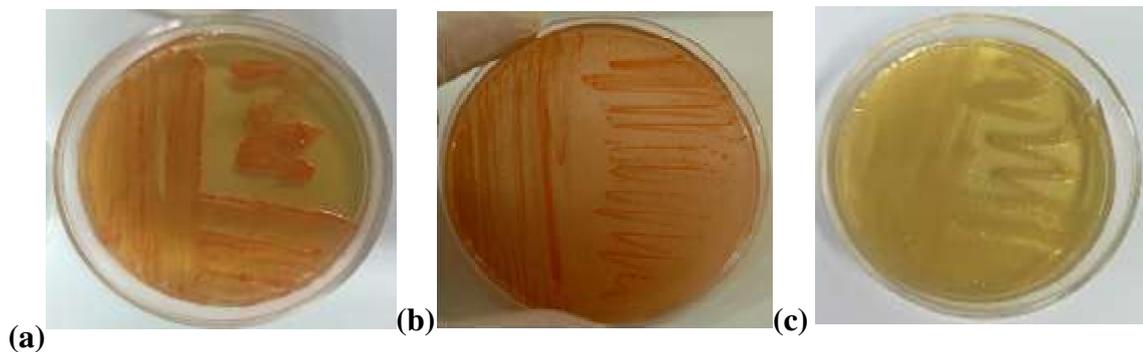


Figure 6: Aspect macroscopique des souches réactivées sur milieu solide (a) : *Hrr. litoreum* JCM13561<sup>T</sup> (b) *Nrr. bangense* A33<sup>T</sup> (c) *A.haloalkaliphilus* C-5

### 2.Préculture

Au bout de 7 jours d'incubation à 37°C sous agitation du milieu Br liquideensemencé par les germes tests, les précultures obtenues laissent apparaître une forte coloration des bouillons en beige, orange et en rose rouge témoignant d'une bonne croissance des 03 isolats.

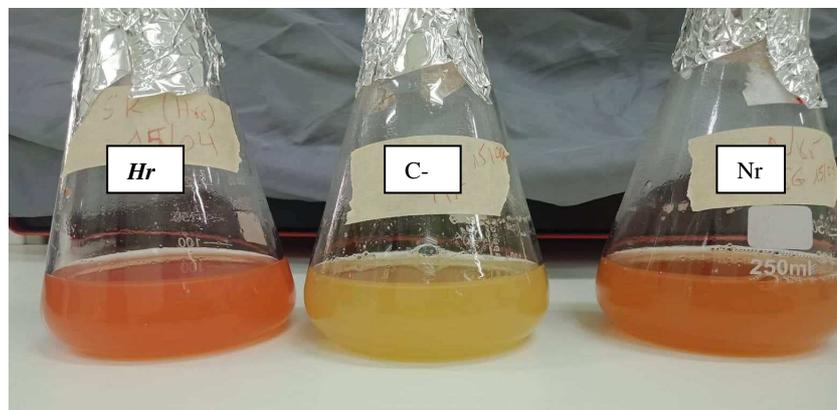


Figure 7 : Précultures des trois isolats tests sur milieu liquide

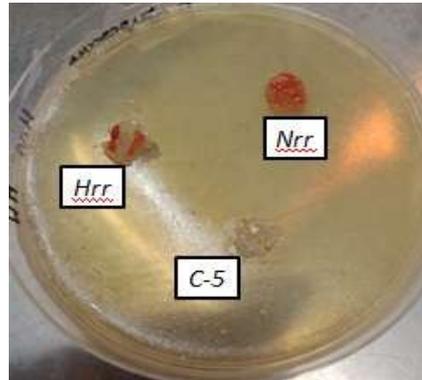
### 3. Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'halobactéries

#### 3.1. Recherche d'activités antagonistes

##### 3.1.1. Résultats de la méthode des cylindres d'agar

Le screening primaire de la production des activités antimicrobiennes extracellulaires a été réalisé par la technique des cylindres d'agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé qui permet de détecter l'effet inhibiteur d'un isolat test envers les deux autres isolats (halobactéries) et les souches cibles.

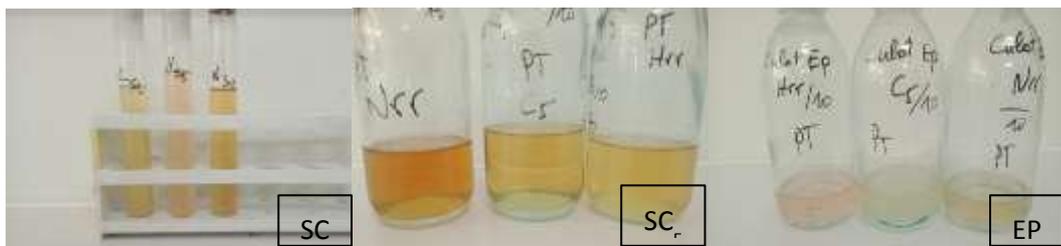
La méthode permet de déceler la présence d'une activité antibactérienne qui est révélée en principe par une zone transparente autour de cylindre d'agar déposé.



**Figure 8: Exemple des résultats de la méthode des cylindres d'agar.**

##### 3.1.2. Résultats de la méthode de diffusion en double couche d'agar

3. Les produits d'extraction (figure ci-dessous) obtenus à partir des précultures, des trois halobactéries sur milieu liquides, ont été testés à la recherche aussi bien de l'activité antibactérienne que de l'activité exo-enzymatique.



**Figure 9: Surnageant extraits à partir des précultures des isolats tests**

Les résultats des tests d'antagonisme obtenus avec les différents produits d'extraction des isolats sont indiqués dans les tableaux(5) et (6).

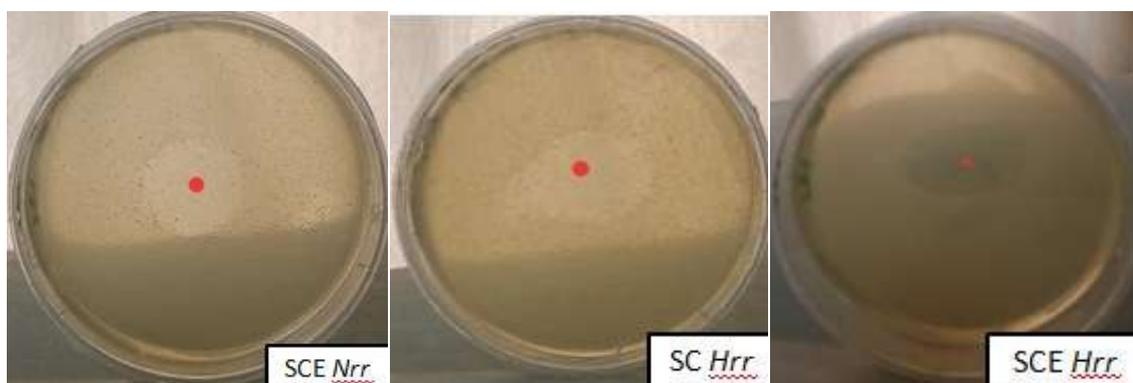
**Tableau 5: Résultats des tests d'antagonisme entre halobactéries**

	SC			SCE			EP		
	Hrr.	Nrr.	C-5	Hrr.	Nrr.	C-5	Hrr.	Nrr.	C-5
Hrr.	/	-	-	/	-	-	/	-	-
Nrr.	-	/	-	-	/	-	-	/	-
C-5	++	+	/	-	++	/	-	-	/

(+) : présence d'une zone d'inhibition, (-) : absence d'une zone d'inhibition

(/) : non effectué même souche

La figure 10 montre les halos d'inhibition du test d'antagonisme entre les isolats d'halobactéries mené suivant la méthode d'ensemencement en double couche d'agar sur milieu Br.



**Figure 10: Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant (SC) et (SCE) des souches d'halobactéries actives vis-à-vis de l'*A.haloalkaliphilus*C-5**

Les résultats montrent que les souches archéennes extrêmes halophiles inhibent la croissance de l'*A.haloalkaliphilus*C-5 avec des diamètres de la zone d'inhibition variant de 7 à 11 mm. Ces souches secrètent des biomolécules actives récupérées dans les surnageants (SC) et (SCE), absentes cependant dans l'extrait protéique obtenu (EP), dans lequel aucune activité inhibitrice n'a été observée. De même, aucune activité antagoniste n'a été révélée entre les deux souches d'archée testées l'une vis-à-vis de l'autre.

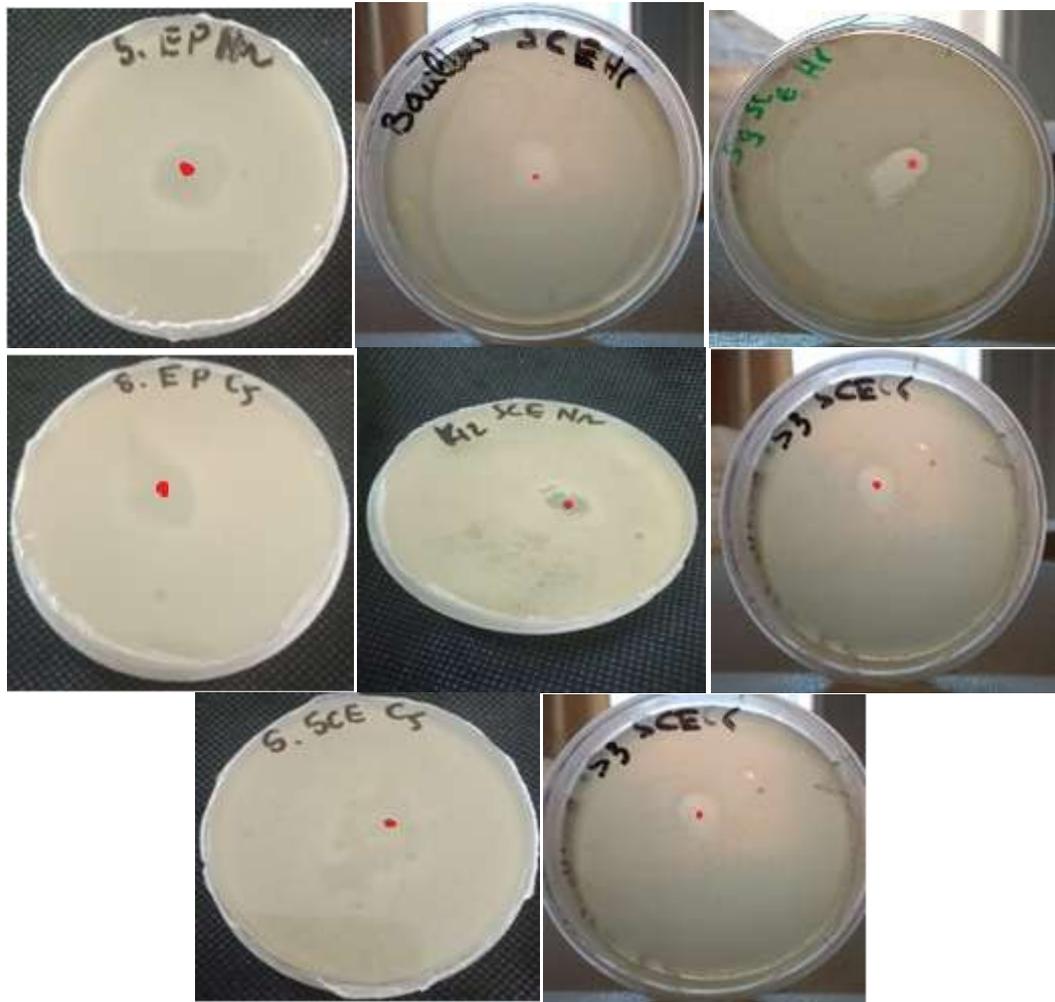
Tableau 6 : Résultats des tests d'antagonisme vis-à-vis des souches cibles non halophiles

Extrait testé Souches cibles	SC			SCE			EP		
	Hrr.	Nrr.	C-5	Hrr.	Nrr.	C-5	Hrr.	Nrr.	C-5
<i>E.coli</i> 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> K12	-	-	-	-	+ / -	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	++	+	-	+	++	+	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028	-	-	-	+	++	+	-	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 0009	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LGA 257	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> M 450	-	+	-	++	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : Présence d'une zone d'inhibition, (-) : Absence d'une zone d'inhibition, (+/-) : Présence d'une zone d'inhibition de diamètre réduit

Les résultats montrent que les isolats testés sont actifs contre au moins un germe cible avec des diamètres d'inhibition allant à 5mm. L'effet inhibiteur est plus ou moins faible vis-à-vis

de la souche *E.coli* K12, néanmoins il s'observe avec l'ensemble des extraits. La figure 11, reprend des exemples de l'activité antibactérienne à l'égard de souches cibles.



**Figure 11: Résultats de l'activité antibactérienne dans le surnageant (SC), (SCE) et (EP) de certaines souches d'halobactéries actives sur les souches *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella typhi* ATCC 14028, K12 et *Staphylococcus aureus* M 450 respectivement.**

### Recherche de l'activité enzymatique

La méthode des spots appliquée avec les différents isolats sur milieu Br supplémenté par différents substrats, révèle que seul le surnageant (SC) des trois souches tests 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. Les trois souches montrent un large éventail d'activités exo enzymatiques reporté sur le tableau 7.

Tableau 7 : Résultat de la recherche de l'activité lytique des trois isolats.

Germe producteur	SC			SCE			EP		
	<i>Hrr</i>	<i>Nrr</i>	<i>C5</i>	<i>Hrr</i>	<i>Nrr</i>	<i>C5</i>	<i>Hrr</i>	<i>Nrr</i>	<i>C5</i>
Substrat									
Lait	+	-	++	-	-	-	-	-	-
Caséine	++	++	++	-	-	-	-	-	-
Gélatine	++	++	++	-	-	-	-	-	-
Amidon	++	++	++	-	-	-	-	-	-
CMC	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Tween 80	++	+/-	++	-	-	-	-	-	-
Huile d'olive	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : présence d'un halo, (-) : absence d'un halo

### 3.2.1. Détermination de l'activité protéolytique

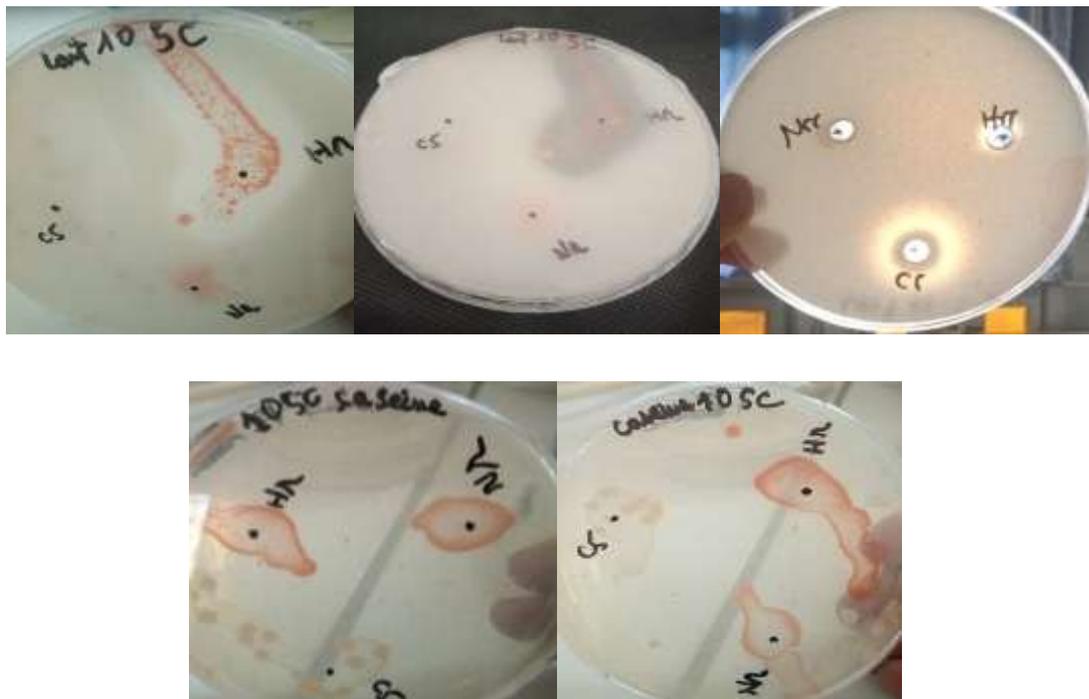


Figure 12: Exemples de l'activité protéolytique et caséolytique

L'activité protéolytique est un trait de caractère commun aux deux souches *Hrr.litorem*JCM13561<sup>T</sup> et la bactérie haloalcaliphile C-5, sans dire que la caséinase fait partie du bagage enzymatique des trois isolats.

Nous avons remarqué également une différence d'opacité des zones qui peut être expliquée par la variation de concentration d'enzyme présente dans le surnageant.

#### ✦Hydrolyse de la gélatine



Figure 13: Exemple de l'activité gélatinase avant et après addition de TCA.

#### 3.2.2. Détermination de l'activité amylolytique



Figure 14 : Exemple de l'activité amylolytique des souches *Hrr.* et *C-5* avant et après addition du lugol

#### 3.2.3. Détermination de l'activité lipolytique et estérasique

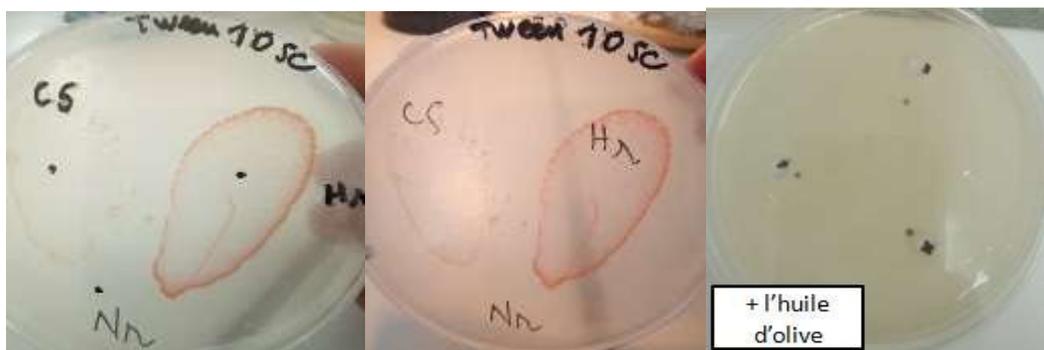


Figure 15: Activité exo enzymatique des souches halophiles sur milieux additionnés de Tween 80 et l'huile d'olive respectivement

### 3.2.4. Détermination de l'activité cellulolytique



Figure 16: Exemple de l'activité cellulolytique des souches halophiles

Les résultats montrent que l'activité hydrolytique extracellulaire est diversifiée et intense chez les isolats halophiles, qui s'avèrent dotés d'une activité protéolytique, amylolytique et cellulolytique et un pouvoir lipolytique limité à la dégradation du tween 80.

#### 4. Stabilité thermique des exo enzymes

Les surnageant (SC) des trois souches tests ayant donné une réaction positive lors de l'étape précédente, sont chauffés 10 min à 70°C et à 100°C, puis déposés en spots comme précédemment à la surface des milieux contenant les différents substrats.

Après incubation, on remarque que l'activité lytique extracellulaire des souches *Nrr. bangense*A33<sup>T</sup> et *A.haloalkaliphilus* C-5 se dissipe, exception faite ; chez l'archée l'*Hrr. litoreum*JCM13561<sup>T</sup> seule l'amylase est désactivée (Fig.17). Les résultats de ce test sont repris dans le tableau qui suit.

Tableau 8: Résultats de l'activité exo enzymatique après chauffage

Germe producteur Substrat	SC (70°C)		
	<i>Hrr.</i>	<i>Nrr.</i>	C-5
Lait	+	--	--
Caséine	+	--	--
Gélatine	++	--	--
Amidon	--	--	--
CMC (1)	+	--	--
Tween 80	++	--	--

(+) : présence d'un halo, (-) : absence d'un halo, résultats négatifs à 100°C



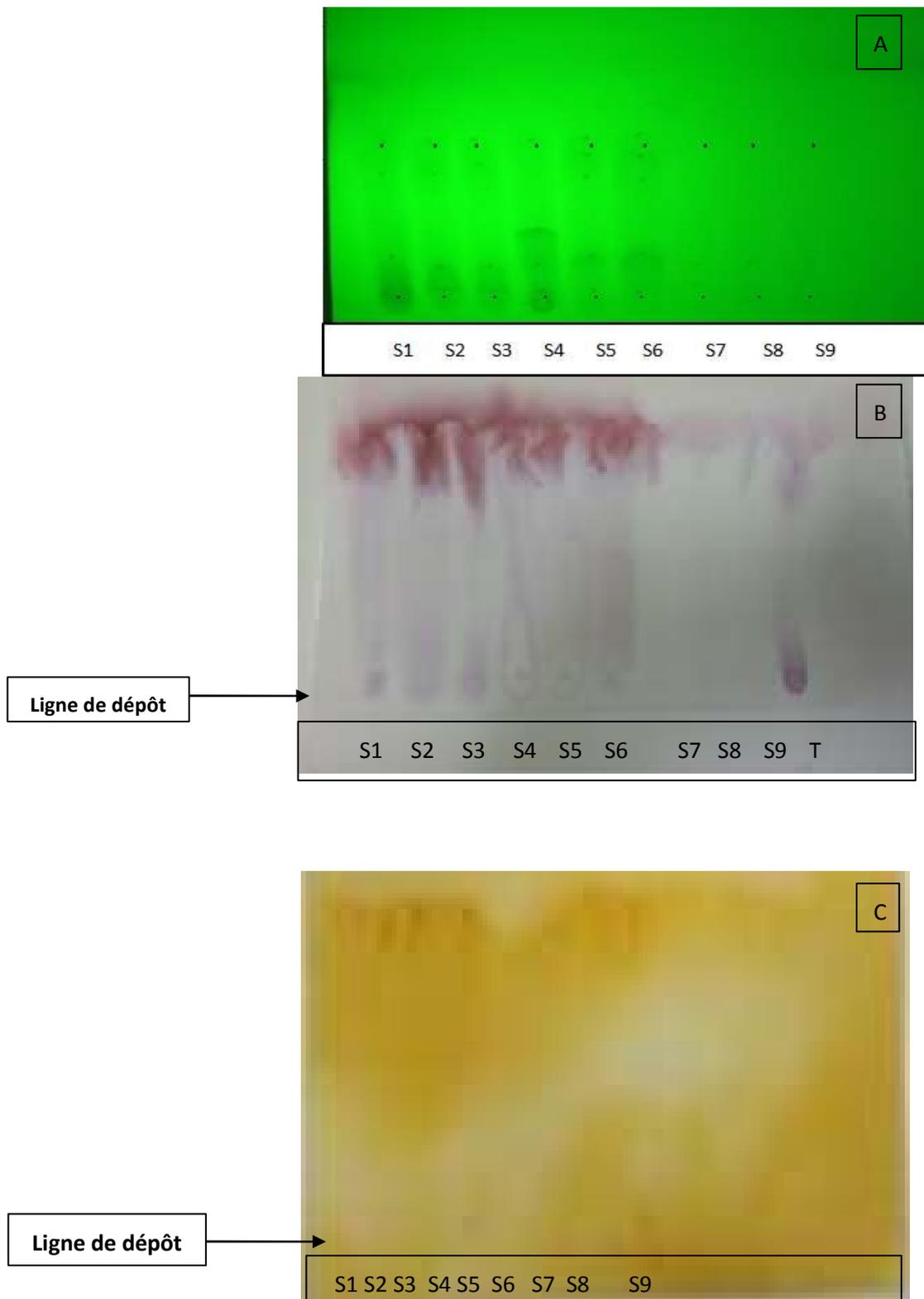
**Figure 17: Exemples des résultats du test de stabilité thermique du surnageant (SC) de *Hrr. litoreum* JCM13561<sup>T</sup> sur milieu au lait écrémé, à la caséine et au CMC respectivement**

Les résultats obtenus suite au traitement thermique des surnageants (70°C et 100°C) montrent que certaines enzymes sont désactivées, l'activité exo enzymatique est altérée à une température avoisinant les 70°C pour deux isolats.

#### **4. Séparation des substances bioactives par chromatographie analytique sur couche mince**

Dans un but analytique, une chromatographie sur couche mince a été réalisée. Ces plaques permettent de pratiquer, après la séparation, des révélations chimiques. Le système de solvant qui a donné une bonne migration des molécules bioactives présentes dans nos extraits (figure 18-A) était le méthanol. (Tableau B annexe 5).

Des réactions chromogéniques ont été réalisées en utilisant trois révélateurs (Annexe 5) et qui sont : la ninhydrine à 0,2% ; pour les composés aminés, le diode pour les composés lipidiques et le Nigrum, pour les sucres, qui n'a pas donné de résultats.



**Figure 18 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de gel de silice des surnageants des souches halophiles: A : révélation sous UV, B : composante protéique révélation avec la ninhydrine à 0,2%; C: composante lipidique révélation avec le diiode.**

### 5. Extraction des pigments membranaires

Après traitement au méthanol des différents culots, les absorbances des extraits sont mesurées par le spectrophotomètre de paillasse (UV-VIS DR 6000LANGE), les longueurs d'ondes varient de 400 jusqu'à 700, sont présentées dans le graphe suivant :

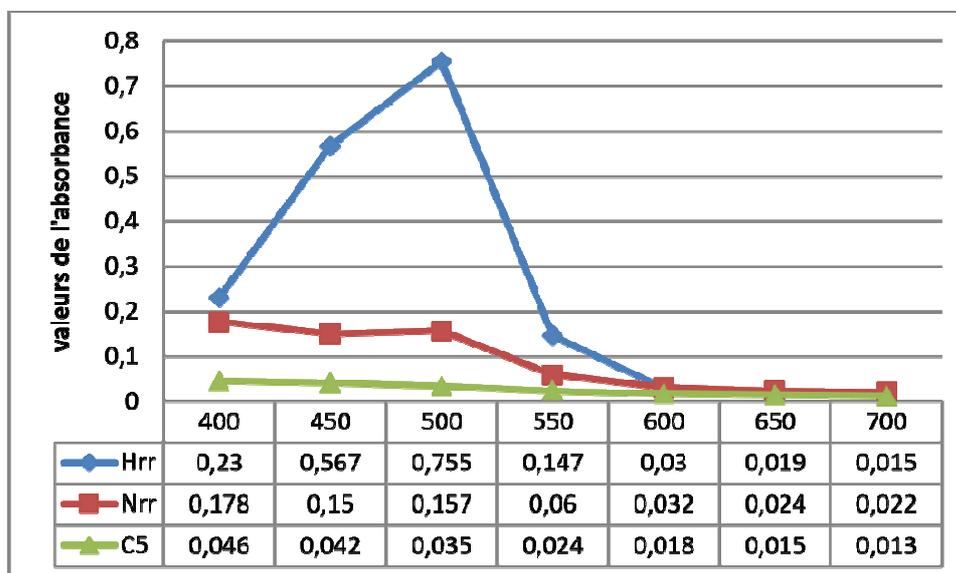


Figure 19 : Spectre d'absorbance des différentes souches halophiles

Les valeurs de l'absorbances des deux souches halophiles archéennes sont bien plus importantes comparées à celles de l'*A.haloalkaliphilus* C-5, qui se situent loin derrière.

### Discussion

L'étude réalisée sur les souches halophiles extrêmes locales isolées d'environnements hypersalins avait pour objectif la mise en évidence des activités hydrolytiques. Les 3 souches forment des colonies pigmentées entre le jaune, orange et rouge en milieu solide.

Aucune activité inhibitrice contre l'ensemble des souches cibles testées par la méthode de cylindres d'agar n'a été observée. Plusieurs études ont rapporté que la nature et la concentration des composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la capacité et la quantité de métabolites secondaires produits par le microorganisme producteur (**Cheng et al.; 1995 ; Boughachiche et al., 2005**).

En effet, tous les facteurs nutritionnels et environnementaux ont une relation directe avec la production des substances antibactériennes qui ne sont pas nécessairement identiques à celles

permettant la croissance (Cheng *et al.*, 1995). A cela vient s'ajouter la faible concentration de l'inoculum reconnue aussi comme un des facteurs intervenant dans l'augmentation de la sensibilité de cette technique (Brook *et al.*, 1995).

La méthode de cylindres d'agar ne représente qu'un screening primaire de l'activité antibiotique, donc il est possible que cette activité est faible dans les cylindres d'agar déposés.

#### **Diffusion en double couche d'agar**

Les résultats de screening de l'activité antibactérienne entre les isolats tests, par cette approche montrent que chacune des archées extrêmes halophiles est active contre la souche C-5 avec des diamètres d'inhibition plus au moins importants, ce qui peut être alloué au fait que ces souches d'halobactéries sont phylogénétiquement proches (Litchfield, 2011).

Quant souches cibles pathogènes non halophiles, leur choix était justifié. Les souches *Pseudomonas*, *E. coli*, *Enterococcus* et *Staphylococcus aureus* ont servi comme modèle de référence dans plusieurs études préliminaires afin d'évaluer l'activité antibactérienne aussi bien nombreuses bactéries et d'actinomycètes productrices de composés bioactifs (Reghioua *et al.*, 2008; Kamat *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus montrent que nos trois isolats ont un effet inhibiteur variable sur les bactéries cibles pathogènes non halophiles ; *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella typhi* ATCC 14028 et *Staphylococcus aureus* M 450. L'activité antibactérienne contre les souches cibles non halophiles à Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, est plus importante dans le surnageant extrait (SCE) que dans le surnageant de culture (SC) ou l'extrait protéique (Ep).

Les agents responsables de l'inhibition des souches cibles sont excrétés en dehors de la cellule productrice (agents extracellulaires). Par conséquent, en milieu liquide, ces agents se trouveraient dans les surnageants de culture des souches productrices. En comparant ces deux techniques de screening, on peut conclure qu'en ce qui concerne notre étude, la production sur milieu liquide est meilleure que celle sur milieu solide.

La faible intensité de l'activité antibactérienne observée sur certains germes pourrait être expliquée d'une part, par une faible concentration de la substance antimicrobienne dans un milieu (Reghioua *et al.*, 2008) et d'autres part des conditions de culture non optimisées.

L'activité antibactérienne contre les bactéries-tests à Gram+ apparaît plus importante que celle contre les bactéries à Gram-, ceci rejoint les résultats de **Diabi et al. (2015)**, qui rapportent un effet antibactérien chez 100% des souches à Gram +, représentées par des *S.aureus*, *S.saprophyticus*, *Enterococcusfeacalis* et *Bacillus cereus*

Les différences en composition de la paroi entre les bactéries peuvent être responsables de leurs différences de sensibilité. En effet, les bactéries à Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de nature lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (**Pelaez et al., 1998 ; Sateesh et al., 2011**).

La présence d'activité chez les souches étudiées isolées de milieux extrêmes confirme qu'elles ont un pouvoir antimicrobien remarquable par rapport à leurs homologues isolées à partir d'autres écosystèmes non halophiles (**Gayathri et al., 2011**).

L'adaptabilité de certaines souches aux conditions de température, de pH et de salinité a une relation avec la capacité de ces mêmes souches à produire des enzymes extracellulaires, ce qui implique des mécanismes métaboliques plus développés, comparativement aux microorganismes qui en sont dépourvus (**Cohen, 2011**). En effet, la vie en milieu extrême, des halobactéries n'est possible qu'au prix d'une spécialisation de leur machinerie enzymatique, leur assurant des propriétés structurales et fonctionnelles qui leur confère une importance biotechnologique. Leurs enzymes 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**).

Si l'hydrolyse des polymères testés ne donne pas une appréciation quantitative de l'activité enzymatique, elle ramène néanmoins une vue d'ensemble sur le profil enzymatique de nos halobactéries. En recensant les activités enzymatiques produites à 40°C, et à 20% (v/p) de NaCl, on retrouve dans le (SC) des trois souches une activité hydrolytique allant contre la caséine, la gélatine, la cellulose, l'amidon et le tween 80, tandis que l'hydrolyse protéine du lait écrémé est restreinte aux deux souches ;l'*A.haloalkaliphilus* C-5 et l'*Hrr. litoreum* JCM13561<sup>T</sup>.

En passant en revue les données bibliographiques, l'*Halomicrobium mukohataei* peut hydrolyser l'amidon mais la gélatine, la caséine et le tween 80 ne sont pas hydrolysés. (**Orenet et al., 2002**). Par ailleurs la souche *Halobiforma haloterrestriis* hydrolyse la caséine, la gélatine, tween 20, 40 et 80 mais aucun effet observé sur l'amidon. (**Heyzayen et al., 2006**). De même, *Halorubrum ezzemoulense* n'hydrolyse pas l'amidon, l'esculine, la gélatine et le tween 80 (**kharoub et al., 2006**).

La combinaison des activités hydrolytiques chez nos isolats est très importante du point de vue biotechnologique. De nombreuses études menées sur des habitats hypersalins géographiquement séparés ont souligné la présence de telles combinaisons chez les halophiles, en outre les travaux de **Yahiaoui et al. (2017)**, qui rapportent une activité protéolytique, lipolytique et amylolytique chez la majorité des souches halophiles étudiées, avec la dégradation de tween 20 chez 100% des isolats. En 2009, **Rohban et al.** Isolèrent des souches halophiles pouvant hydrolyser le tween 80, appartenant aux genres *Salicola*, *Halomonas*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus* et *Salinicoccus*. Ces estérases sont actives en présence de fortes concentrations salines, ce qui rejoint nos résultats. En 2013, **Khelil et al.** Rapportaient une activité protéolytique et amylolytique intense révélée chez la souche ML9831, comparée à son activité lipolytique relativement faible, ce qui, en grande partie s'accorde avec nos résultats. Il n'y a pas tant d'exemples d'estérases halophiles, particulièrement les lipases produites par des bactéries. L'activité lipolytique a été rapportée chez des souches de *Bacillus halodurans*, *Bacillus alcalophilus* et *Bacillus licheniformis*, *Salinivibrio* SA-2, peut produire une lipase extracellulaire avec une activité optimale à une concentration de sel, de pH et de température de, 0.5M de Na Cl, pH 7.5 et 50°C, respectivement (**Amoozegar et al., 2008, in Khelil et al., 2013**). Les lipases bactériennes sont essentiellement extracellulaires produites durant la croissance bactérienne, qui peut varier de quelques heures à plusieurs jours selon les bactéries et les conditions environnementales (**Gupta et al., 2004**).

De nombreuses bactéries halotolérantes possèdent une activité amylolytique et dont l'enzyme responsable a été identifiée comme étant une amyloglucosidase (**Khelil et al., 2013**).

Ce bagage enzymatique semble directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement direct.

Les bactéries et les archées halophiles ont émergé en tant que sources possibles et importantes d'hydrolases résistantes à la salinité et à la dénaturation thermique (**Sanchez-Porro et al., 2003**). Après le traitement thermique de nos surnageants à 70 °C, l'activité enzymatique est conservée pour les protéases, gélatinases, estérases et cellulases secrétées par la souche *Hrr. litoreum*. Ces résultats sont en accord avec les résultats de production d'amylase de divers *Bacillus sp.*, tels que *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus sp.PN5* qui produisent de l'amylase à des températures de 37 à 70°C (**Syu 1997, Swain 2006 et Saxena, 2007**).

De même pour les protéases isolées et caractérisées à partir de plusieurs bactéries halotolérantes y compris celles du genre *Bacillus sp.* (**Setyorini et al., 2006**), qui présentent une activité optimale en présence de 3% à 25% (p/v) de Na Cl, sur un intervalle de pH de 5 à 10 et aux températures comprises entre 40 et 75°C (**Vidyasagar et al., 2009**). Ces enzymes trouvent application dans les processus industriels comme additives, dans les détergents à lessive, la transformation des aliments, dans des produits pharmaceutiques et les réactifs de diagnostic (**Karbalaei-Heidari et al., 2009** in **Khelil et al., 2013**).

La chromatographie sur couche mince permet d'avoir les empreintes du contenu des surnageants. Observées sous UV, les plaques montrent des tâches distinctes, néanmoins la révélation des composés actifs laisse apparaître des fractions de différents métabolites non identifiées. En outre, la pré- caractérisation des activités antibactériennes et lytiques devrait être précédée par des tests indicatifs et une purification sur les surnageants obtenus.

### **Pigments membranaires**

Nos souches présentent une pigmentation beige-jaune, orange et rouge sur le milieu Br liquide, ceci est dû à la production de caroténoïdes ou la bacterioruberine, protégeant les cellules contre les rayons UV (**Mandelli et al., 2012**). La plupart des espèces d'archées halophiles (famille *Halobacteriaceae*) sont colorées en rouge rose due au contenu élevé de pigments de caroténoïde dans leur membrane cellulaire. Les pigments membranaires d'haloarchées ont des pics de 378, 466, 488 et 525 qui correspond à la bacterioruberine (**Oren, 2009**).

Au vu des résultats obtenus, le pigment de la souche rouge et orange peuvent être attribués à la présence de la bactériorubrine isomère et de la bactériorubrine, du fait qu'elles présentent des maxima d'absorption aux alentours de 525,5nm à 526,5 nm respectivement.

D'après Hazayen *et al.*, (2002), *Halobiforma haloterrestis* présente des maxima d'absorption à 370, 390, 494 et à 528 qui correspondent au maxima d'absorption de la bactériorubrine, une des caractéristiques majeures des archaebactéries halophiles extrêmes (**Gochnauer *et al.*, 1972 ; Grant *et al.*, 2001**).

D'autre part, le spectre d'absorption de la bactériorubrine d'*Halobacterium gomoense* présente des pics à 494 et à 528 (**Oren *et al.*, 1995**).

L'analyse de la composition de caroténoïde d'*Haloferax alexandrinus* a montré la présence de  $\beta$ -carotène à 481 nm,  $\gamma$ -carotène à 496 nm, lycopène à 505 nm, 3-hydroxyechinenone à 477 nm, canthaxantine à 481 nm, cis-astaxanthine à 480 nm, trisanhydro-bactériorubrine à 522 nm, monoanhydro-bactériorubrine à 491 nm, bactériorubrine isomère à 525,5 nm et bactériorubrine à 526,5 nm (**Asker *et al.*, 2002**).

L'intensité de la pigmentation dépend de la salinité dans laquelle les cellules sont développées, *Haloferax mediterranei* est faiblement pigmentée à haute salinité, mais une production élevée de pigment est atteinte à des concentrations de sel optimales pour la croissance (**Oren, 2009**).

*Conclusion et  
perspectives*

## **Conclusion et perspectives**

L'étude réalisée sur des souches halophiles isolées d'environnements hyper salins d'Ouargla, avait pour objectif la recherche d'activités antibactériennes et hydrolytiques.

Le criblage de souches présentant une activité antibactérienne s'est fait par deux approches et a porté sur les 3 souches. Deux d'entre elles, précisément les archaebactéries ont révélé une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche halotolérante extrême; *A.haloalkaliphilus* C-5, dont la présence est limitée aux extraits (SC & SCE).

Les tests d'antagonisme effectués vis-à-vis des germes cibles pathogènes non halophiles, révèlent la présence de substances antibactériennes dans les différents surnageants, y compris (EP), justifiée par l'apparition de zones d'inhibition.

Les activités hydrolytiques combinées sont également observées chez tous des isolats, ce qui est un véritable atout biotechnologique. De nombreux travaux ont permis d'isoler des bactéries halotolérantes et halophiles d'environnements hypersalins possédant des lipases actives en présence de fortes concentrations salines. Dans l'enquête actuelle, les souches halophiles ont montré une préférence notable pour la dégradation de l'amidon, la gélatine, la cellulose et le tween 80 et ceci dans une plage de température de 40°C, à 20% (p/v) de Na Cl et à pH 7.2. Le traitement thermique des différents extraits révèle à la fois le caractère thermolabile et thermostable de ces enzymes.

Un début de caractérisation de ces activités a été entamé en utilisant la chromatographie sur couche mince en gel de silice.

L'arsenal enzymatique varié dont sont dotés nos isolats, présente une grande importance en biotechnologie et souligne une fois de plus que les halotolérants et halophiles extrêmes sont des micro-organismes précieux et un attrait des chercheurs.

Notre étude n'est qu'un premier pas dans la caractérisation des sécrétions des holobactéries, elle doit être reconduite et affinée sur l'aspect sécrétion de substances antibactériennes, car de nouveaux antibactériens sont absolument nécessaires pour lutter contre le nombre croissant de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, mais également sur l'aspect dégradation de polymères.

Le manque de moyens a entravé certaines manipulations, en perspective de ce travail, plusieurs voies d'investigations sont envisageables:

- Approfondir la caractérisation des molécules bioactives notamment leur nature chimique ; purification des substances ;
- Refaire les tests d'antagonisme en concentrant les surnageants pour revoir leurs effets antibactérien par rapport à aux surnageants bruts testés ;
- Rechercher le caractère protéique de l'agent responsable de l'inhibition des souches cibles, en le soumettant à l'effet des protéases et ribonucléases ;
- Déterminer l'intervalle et l'optimale pH, température et salinité de l'activité antibactérienne et lytique détectée chez chacune des souches ; surtout que deux d'entre elles sont haloalcalitolerantes.

*Références  
bibliographiques*

**Références bibliographiques**

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

**Amoozegar M.A., Fatemi Z.A., Karbalaei-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.

**Amoozegar M.A., Schumann P., Hajighasemi M., Ashengroph M., Razavi M.R. (2008).** *Salinicoccus iranensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 178–183.

**Antón J., Rossello-Mora R., Rodriguez-Valera F., Amann R. (2000).** Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 66 (7): 3052–3057.

**Asker, D.; Awad, T.; Ohta, T.(2002).** Lipids of *Haloferax alexandrinus* Strain TMT. An Extremely Halophilic Canthaxanthin-Producing Archaeon. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 37–43.

**Aygan A., Arikan B. (2008).** A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake. *Int J Agric Biol* 10: 369374.

**Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005).** Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharien sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*; 15: 211–219

**Beldman G., Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J. (1985).** The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparaison of al detectable endoglucannases, exoglucanases and  $\alpha$ -glucosidases. *Eur J Biochem* 146: 301-308.

**Blatt H., Middleton G., et Murray R( 1980).** Evaporites and native sulphur. In *Origin of Sedimentary Rocks*. Ed. H. Blatt, G. Middleton & R. Murray. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 782p.

**Blaurock, A. E. & Stoekenius, W. (1971).** Structure of the purple membrane. *Nat New Biol* 233, 152-155.

**Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Boulahrouf A.( 2012).** Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against clinical resistant bacteria. *Ann Biol Clin.* 70(2),169-74.

**Boutaiba S., Hacene H., Bidle K.A., Maupin-Furlow J.A.( 2011).** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J Arid Environ* 75: 909-916.

**Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. (2005).** *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn, vol 2 (The Proteobacteria). Springer, New York. P. 1136.

- Brock T. D.(1965).**The road to Yellowstone-and Beyond. Annual Review of Microbiology ;49:1-28.
- Calvo C., Martínez-Checa F., Toledo F.L., Porcel J., Quesada E. (2002).** Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by Halomonas eurihalina and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol 60: 347–351.
- Cheng J. R., Fang A., Demain A. L. (1995).** Effect of aminoacids on rapamycin biosynthesis in Streptomyces hygroscopicus. Applied Microbiology and Biotechnology. 43: 1096-1098.
- Cho B.C. (2005).**Heterotrophic flagellates in hypersaline waters. In:Gunde-Cimerman N.,Oren A., Plemenitaš A. (eds) Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya. Springer, Dordrecht. Pp. 543–549.
- Cohen G.N.(2011).** *Microbial Biochemistry, 2nd Edition* .Springer, New York, USA. D.R., Castenholz R.W (eds) Bergey’s manual of systematic bacteriology, vol 1, 2 nd edn, The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Springer, New York: Pp. 155–166.
- D'Amico S, Collins T, Marx J-C et al.(2006).** Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO Reports 7: 385–389.
- Dassarma, S.(2001).** Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences: 1-9.
- Denger K., Warthmann R., Ludwig W., Schink B. (2002).** Anaerophaga thermohalophila gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. Int J Syst Evol Microbiol 52:173–178.
- Donachie S.P., Bowman J.P., Alam M. (2004).** Psychroflexus tropicus sp. nov., an obligately halophilic Cytophaga-Flavobacterium -Bacteroides group bacterium from an Hawaiian hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol 54: 935–940.
- Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M. and Usami, R. (2005).** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). Evolut. Microbial. 52:2271-2280
- Fardeau, M.L, Gounant, C., Dorléac, N., Cayol, J.L. and Ollivier, B. (2005).** Isolation and phylogenetical characterization of anaerobic thermophiles originating from thermal springs in France.in **Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla.Aalgérie.These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri.Tizi-Ouzou.
- Ferrera I., Reysenbach A.L. (2007).** Thermophiles in: encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons; P:1-9.

- Franzmann P.D., Wehmeyer U., Stackebrandt E. (1988).** Halomonadaceae fam. nov., a new family of the class Proteobacteria to accommodate the genera Halomonas and Deleya. *Syst Appl Microbiol* 11:16–19.
- Fritz, D. (1996).** *Bacillus haloalkaliphilum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 98-101.
- Fukushima T., Mizuki T., Echigo A., Inoue A., Usami R. (2005).** Organic solvent tolerance of halophilic  $\alpha$ -amylase from a haloarchaeon, Haloarcula sp. strain S-1. *Extremophiles* 9: 85–89.
- Galinski E.A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* 37: 273–328.
- Garrity G.M., Holt J.G. (2001).** Taxonomic outline of the archaea and bacteria. In: Boone D.R., Castenholz R.W (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2 nd edn, The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Springer, New York: Pp. 155–166.
- Gayathri A., Madhanraj P., et Panneerselvam A. 2011.** Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. *Asian J. Pharm. Tech.* 1: 79 - 81.
- Gerday C. and Glansdorff N.(2007).** Physiology and biochemistry of extremophiles. ASM press, Washington, DC. P. 450.
- Gohnauer M. B. , Kushwaha S. C. , Kates M. , Kushner D. J. (1992).** Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. *Archi.Mikrobiol.*84, 339-349.
- 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.
- Govender L., Naidoo L., Setati M.E. (2009).** Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1,4- $\beta$ -xylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *Afr J Biotechnol* 8: 5458-5466.
- Grant, W.D., Kamekura, M., Mcgenity, T.J. & Ventosa, A. (2001).** Class III Halobacteria class. nov. Order I. Halobacteriales. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria vol 1, eds. Boone, D.R. & Garrity, G.M. pp. 294–334. New York: Springer-Verlag. ISBN 0- 38798771-1.
- Greenberg E.P., Canale-Parola E. (1976).** *Spirochaeta halophila* sp. nov. a facultative anaerobe from a high-salinity pond. *Arch Microbiol* 110: 185–194.
- Gregoire, P., Fardeau, M.L, Guasco, S., Bouanane, A., Michotey, V., Bonin, P., Dubourg K., Cambar, J. et Olivier, B. (2009).** Les micro-organismes de l'extrême. *Press Therm Climat*,146:49-61.
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. (2000).** Hypersaline waters in salterns e natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* 32:235–240.

- Guo B., Chen X.L., Sun C.Y., Zhou B.C., Zhang Y.Z. (2009).** Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- $\beta$ -xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 1107–1115.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$  amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38: 1599-1616.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$ -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38: 1599-1616.
- Hachicha M. (2007).** Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. *Sécheresse*;18 (1) : 4550. Halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, and Springer. P. 1248. halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 35:55–58. halophilic bacterium isolated from a solar in Cabo de Gata, Almería, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1238–1242.
- Hendler, R. W. & Dracheva, S. (2001).** Importance of Lipids for Bacteriorhodopsine.
- Heysayen F.F., Tindall B.J., Streinbuchel A., Rehm B.H.A. (2002).** Characterization of a novel halophilic archaeon, *halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobioforma nitratireducens* comb. nov. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 52:2271-2280.
- Holden J.F. (2009).** Extremophiles: Hot Environments in *Encyclopedia of microbiology*, 3rd Ed., Schaechter M. P: 127-146. Elsevier.
- Horikoshi K. (1999).** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 735–750.
- Jebbar M, Godfroy A et Heulin T. (2012).** *Biofutur* 336.
- Jee-Min Lim, Che Ok Jeon, Sung-Min Song, Jae-Chan Lee, Yoon Jung Ju, Li-Hua Xu, Cheng-Lin Jiang and Chang-Jin Kim. (2005).** *Lentibacillus lacisalsi* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline lake in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1805–1809.
- Jeon, C. O., Lim, J. M., Lee, J. M., Xu, L. H., Jiang, C. L. & Kim, C. J. (2005).** Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen. nov., comb. nov. and the description of *Alkalibacillus salilacus* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. In **Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla. Algérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- Kamat T.K., Kiran S. and Kerkar S. (2011).** Antimicrobial potential of *Bacillus marismortui*, a salt pan isolate of Cavellolim, Goa, India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*; 3: 321-328.

- Kamekura M., Hamakawa T., Onishi H. (1982).** Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol* 44: 994–995.
- Karan R., Capes1 M.D, et DasSarma S. (2012).** Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *AquaticBiosystems*, 8:1-4.
- Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A. and Ziaee A.A.(2009).** Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Journal of industrial Microbiology and biotechnology*:36:21-27.
- Kates, M. (1988a).** Structure, Physical Properties, and Function of Archaeobacterial Lipids. *Biological Membranes: Aberrations in Membranes Structure and Function*. Ed. R. Alan. pp. 357-384. Liss Inc.
- Kerkar S. (2004).** Ecology of Hypersaline Microorganisms. Department of Biotechnology, Goa University, Goa, *Mar Microbiology* ; chap 05:37-47.
- Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla. Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- Kharroub K, Aguilera M, Quesada T, Antonio Morillo J, Ramos-Cormenzana A, Boulharouf A and Monteoliva-Sa´nchez M. (2006).** *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2647–2652.
- Kim K.K., Lee K.C., Oh H-M., Lee J-S. (2010).** *Halomonas stevensii* sp. nov., *Halomonas hamiltonii* sp. nov. and *Halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. *Int JSyst Evol Microbiol* 60:369–377.
- 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.
- Kis-Papo T., Oren A., Wasser S.P., Nevo E. (2003).** Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microb Ecol* 45:183-190.
- Kitajima, T., Hirayama, J.-I., Ihara, K., Sujiyama, Y., kamo, N. & Mukotatai (1996).** Novel Bacterial Rhodopsins from *Haloarcula vallismortis*. *Biochem Biophys Res Communications* 220, 341-345.
- Kristjansson J. K. and Hreggvidsson G. O.(1995).** Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 17-25.
- Kushner D.J.(1993).** Growth and nutrition of halophilic bacteria, In: Vreeland R.H., Hochstein L.I. (ed) *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton, CRC Press.

- Leclerc H. A. Vache´e, D.A. and Mossel A. (1989)** Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. *Journal of Applied Microbiology* 1997, 83, 652–658.
- Lergos, J.P. (2009).** La salinisation des terres dans le monde. Conférence n°4069. **in Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla. Aalgérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri.Tizi-Ouzou.
- Litchfield C.D. (2011).** Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:1635–1647.
- Litchfield C.D.(1998).** Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritical Society. Meteoritics & Planetary Science* 33,813-819.
- Litchfield C.D., Gillevet P.M.(2002).**Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *J Ind Microbiol & Biotechnol* 28 (1): 48-55.
- Ludwig W., Klenk H.P. (2001).**Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M (edn) *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2<sup>nd</sup> edn. Springer, New York. Pp. 49– 65.
- 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): 506577.
- Madigan M.T., Martinko J.M.(2006).** Brock Biology of Microorganisms, 11<sup>th</sup> edition.Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Pp. 1012.
- Makhdoumi-Kakhki A., Amoozegar M.A., Ventosa A. (2012).** *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov.,isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and *Salinibacter ruber*. *IJSEM*: 1-26 (sous presse).
- Mamo G., Thunnissen M., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2009).** An alkaline active xylanase: Insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie* 91: 11871196.
- Mandelli, F., Miranda, V. S., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2012).** Identification of carotenoidswith high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *WorldJ MicrobiolBiotechnol*, 28(4), 1781-1790.
- Marty V. (2011).** Préparée au sein de l’Institut de Biologie Structurale et de l’Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant.
- Maturrano L., Santos F., Rosselló-Mora R. and Antón J.( 2006b).** Microbial Diversity in Maras salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology*;72: 3887-3895.

- McGenity, T. J. & Grant, W. D. (1995).** Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. in **Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla.Aalgérie.These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri.Tizi-Ouzou.
- Meseguer, I. & Rodriguez-Valera, F. (1985).** Production and purification of halocin H4.*FEMS Microbiol Lett* 28, 177-182.
- Morin-savy,(2005).** Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques :Des carotènes aux xanthophylles,p65.
- Morozkina E. V., Slutskaia E. S., Fedorova T. V., Tugay T. I., Golubeva L. I.and Koroleva O. V.(2010).** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 46: 1-14.
- Motta A.S., Cladera-Olivera F. and Brandelli A. (2004).** Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology* 35 : 307-310.
- Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Lysenko A.M., Frolova G.M.,Mikhailov V.V., Bae K.S., Lee D.H., Kim I.S. (2005).** Gramella echinicola gen. nov., sp. nov.,a novel halophilic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the sea urchin Strongylocentrotus intermedius. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:391–394.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. (1999).** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **In Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla.Aalgérie.These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri.Tizi-Ouzou.
- Nordberg P., Von Hofsten B. (1969).** Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J Gen Microbiol* 55: 251-256.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1971).** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature*, 233, 149-152.
- Oren A. (1983).** A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the Dead Sea. *Curr Microbiol* 8: 225-230.
- Oren A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations:phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:2.
- Oren A. (2009).** Microbial diversity and microbial abundance insalt-saturated brines : Why are the waters of hypersaline lakes red ? DigitalCommons@USU, 2009.
- Oren A.( 1999).**Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 334-348.

- Oren A. (2002a).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 5663.
- Oren A. (2006).** The order Halobacteriales. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 3*. 3<sup>rd</sup> edition. Edited by: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: Springer. 113-164.
- 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. (2010).** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* 2010, 31, 825–834.
- Oren, A.; Gurevich, P. (1995).** Dynamics of a bloom of halophilic archaea in the Dead Sea. *Hydrobiologia*, 315, 149–158.
- Pelaez F., Collado J., Arenal F., Basilio A., Cabello A., Matas M.T.D., Garcia J.B., Del Val A.G., Gonzalez V., Gorrochategui J., Hernandez P., Martin I., Platas G. and Vicente F. (1998 ).** Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*; 102:755–761.
- Pérez-Pomares F., Bautista V., Ferrer J., Pire C., Marhuenda-Egea F.C., Bonete M.J. (2003).** Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* 7:299–306.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B. (2007).** Microbial Extremophiles at the Limits of Life. In **Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla. Algérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- Platas, G., Meseguer, I. & Amils, R. (1996).** Optimisation of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* XIA3. *Microbiologia SEM* 12, 75-84.
- Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009b).** Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 44: 210-215.
- Prescott L. M., Harley J.P. et Klein D.A. (2003).** Microbiologie. 2<sup>em</sup> édition française. Ed. De Boeck, Bruxelles. 1101p.
- Price, L. B. & Shand, R. F. (2000).** Halocin S8 a 36-amino-acid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* 182, 4951-4958.
- Quesada . E ., Bejar. V., Ferrer. M.R., Calvo. C., Llamas ., Martinez- checa. F., Arias.S., Ruiz-Garcia.C., Paez.R., Martinez- canovas.M.J., del Moral.A.**

- (2004). Moderately halophilic, exopolysaccharide producing bacteria. In: Ventosa A (ed) *Halophilic Microorganisms*. Springer-Verlag, Berlin, pp 285-295.
- Quesada E., Bejar V., Valderrama M. J. and Ramos-Cormenzana A. (1987).** Growth characteristics and salt requirement of *Delaya halophila* in a defined medium. *Curr. Microbiol.*, 16, 21-25.
- Reghioua S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. and Boulahfrouf A. (2008).** Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolés de sol aride de la région de Biskra. *Sciences & Technologie C*;28 : 59-64.
- Rodriguez -Valera F. (1992).** Biotechnological potential of halobacteria. In: Danson M.J., Hough D.W., Lunt G.G (Edn.), *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. Biochemical Society Symposium n° 58. Biochemical Society, London. Pp. 135-147.
- Rodriguez-Valera F., Ventosa A., Juez G., et Imhoff J.F. (1985).** Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-ponds saltern. *Microbial Ecology* 11:107-115.
- Roeßler M., Müller V. (2002).** Chloride, a new environmental signal molecule involved in gene regulation in a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol* 184: 6207-6215.
- Roeßler M., Wanner G., Müller V. (2000).** Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *J Bacteriol* 182: 532-535.
- Rohban R., Amoozegar M .A. and Ventosa A. (2009)** .Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 36: 333-340.
- Roussel E.G., Cambon Bonavita M-A., Querellou J., Cragg B.A., Webster G., Prieur D., Parkes R.G. (2008).** Extending the subsea-floor biosphere. *Science* 320 (5879): 1046.
- 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.
- Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E., Ventosa A. (2003a).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Appl Microbiol* 94: 295-300.
- Sarethy I. P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S. K., Gupta V. and Gupta S. (2011).** Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38:769-790.
- Sateesh V., Naikpatil et Rathod. J. L. (2011).** Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*;3: 48 - 53.

- Satyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S., 2005.** Extremophilic microbes: Diversity and perspective. *Current Science* 89,78-90.
- Schinner F Margesin R. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* (2001) 5:73–83
- Schinner F, Margesin R. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5:73–83.
- Setati,(2010).** Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol* 9 (11): 1555-1560.
- Setyorini E., Takenaka S., Murakami S. and Aoki K.( 2006).** Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP133. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; 70: 433-440.
- Shand R.F et Leyva K J. (2007).** Peptide and Protein Antibiotics from the Domain *Archaea*: Halocins and Sulfolobocins. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, ed. by M.A. Riley and M.A Chavan Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 93-109.
- Sigurgisladottir S., Konraosdottir M., Jonsson A., Kristjansson J.K., Matthiasson E. (1993).** Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. Volume 15, Number 4, 361-366.
- Sorokin D.Y., Tourove T.P., Galinski E.A., Belloch C. and Tindall B.J.( 2006).** Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov., and *Halospina denitrificans* gen. nov. sp. nov. and evidence that the genus name *Halovibrio* (Fendrich ,1989) with the type species *H. variabilis* should be associated with DSM 3050. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 56:379-388.
- Swain MR, Kar S, Padmaja G, Ray RC.(2006).** Partial characterization and optimization of production of extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung micro flora. *Pol J Microbiol*,55:289-96.
- Syu MJ, Chen YH.(1997).** A study on the  $\alpha$ -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chem Eng J*,65:237–247.
- Tiqula S. M., Davis D., Hadid H., Kasparian I., Sahly Shim S. and Murray K. S. (2006).** Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the Rouge river of southern Michigan. *Environment Technology*; 28: 297-307.
- Torreblanca, M, Meseguer, I. & Rodriguez-Valera, F. (1989).** Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J Gen Microbiol.* 135, 2655-2661.
- Torreblanca, M., Meseguer, I. & Ventosa, A. (1991).** Production of halocin is a patically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett Appl Microbiol* 19, 201-205.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Ed. De Renouveau pédagogique Inc. 157-355.

- Vaisman N., Oren A. (2009).** *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the Bacteroidetes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2571–2574.
- Ventosa A., Nieto J. J. and Oren A.(1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 62: 504–544.
- Vidyasagar M., Prakash S., Mahajan V., Shouche Y.S. and Sreeramulu K.( 2009).** Purification and characterization of an extremehalothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Brazilian Journal of Microbiology* ; 40: 12-19.
- 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.
- Weber A. P. M., Oesterhelt C., Gross W., Brautigam A., Imboden L. A., Krassovskaya I. (2004).** EST- analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. 55: 17-32.
- Woese C. R., Magrum L. J. and Fox G. E. (1978).** Archaeobacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 11: 245-251.
- Xu, Y., Zhou, P. and Tian, X. (1999).** Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov. in **Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla. Algérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- Yachai M. (2009).** Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.
- Yahyaoui Saxena RK, Dutt K, Agarwal L, Nayyar P.(2007).** A highly thermo stable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Biores Technol*,98:260-265.
- 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.
- 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.
- Yayanos, A. A. ( 1995).** Microbiology to 10,500 m in the deep sea. in **Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla. Algérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- Yoon J. H., Kang K. H. and Park Y. H.(2003).** *Halobacillus salinus* sp. nov., isolated from a salt lake on the coast of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 687–693.

**Zalar P., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. (1999).** Ecology of Halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology* 43: 38–48.

**Zeng, X, Birrien, J.L., Fouquet, Y., Cherkashov, G., Jebbar, M., Querellou, J. (2009).** *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile : extending the upper pressure-temperature limits for life. **in Khallef S, Houali K (2019).** Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla. Algérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.

**Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. (2009).** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 589–608.

**Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F., Kevrim V.V., Kostrikina N.A., Lysenko A.M.(1996).** *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the continental soda lakes in Central Asia and the East African Rift. *Int J Syst Evol Microbiol* 46: 305–312.

# *Annexes*

## Annexe 1

**Tableau 10 : Solutés compatibles accumulées par les microorganismes halophiles  
(Boutaiba *et al.*, 2005 in Khallef *et al.*, 2019)**

Microorganismes	Solutés accumulées	Références
<b>Micro algues</b>	Sucrose Glycerol Proline Manitole Glycine bêtaïne Dimethylsulfoniopropionate	<b>Grenway et Stetter, 1979</b> <b>Brown, 1976</b> <b>Ahmad et Hellebust, 1984</b>  <b>Blunden <i>et al.</i>, 1992</b>
<b>Champignons</b>	Glycérol Arabitol Sorbitol Tréhalose	<b>Meikle <i>et al.</i>, 1988</b> <b>Larsson <i>et al.</i>, 1990</b>
<b>Cyanobactéries</b>	Sucrose \ tréhalose Glycosylglycerol Glycine bêtaïne	<b>Reed <i>et al.</i>, 1984</b>
<b>Bactéries phototrophes</b>	Sucrose- tréhalose Glycine bêtaïne Hydroxycétoïne	<b>Welsh <i>et al.</i>, 1993</b>
<b>Bactéries sulfato- réductrices</b>	Tréhalose Glycine bêtaïne	<b>Welsh <i>et al.</i>, 1996</b>
<b>Bactéries hétérotrophes</b>	Glutamate Proline N-acetylgluminynglutamine amide Glycine bêtaïne Actoine \ Hydroxycétoïne Tréhalose	<b>Welsh <i>et al.</i>, 2000</b>
<b>Actinomycètes</b>	Actoine \ Hydroxycétoïne Tréhalose Proline, Glutamine, alanine	<b>Killham et Firestone, 1984</b>
<b>Archaeobactéries</b>	Glycine bêtaïne B-glutamate	<b>Robertson <i>et al.</i>, 1990</b>

## Annexe 2

### Matériel utilisé

#### 1)Appareillage

- Autoclave
- Bain marie
- Spectrophotomètre à absorption atomique
- Centrifugeuse 3800rpm
- Centrifugeuse 10000rpm
- Etuve
- Four Pasteur
- Vortex
- Plaques chauffantes agitratrices
- Balance
- pH mètre
- Becs benzène
- Réfrigérateur
- Plaques de chromatographie sur couche mince
- Lampe UV
- Pipette graduée
- Eprouvette graduée
- Flacons
- Cuve de CCM
- Seringues
- Pipettes Pasteur
- Micropipette
- Embouts jaunes
- Embouts bleu
- Spatule
- Ecouillons
- Scalpels
- Coupelle

#### 2)Instruments

- Portoirs de tubes
- Tubes à essai
- Boîtes Petri
- Erlen mayer
- Béchers

#### 3)Réactifs utilisés

- Acide phosphorique
- Lugol
- Réactif TCA 10%
- Méthanol
- Butanol
- Acétonetile
- Chloroforme
- Acétate d'éthyle
- Ammoniaque

### Annexe 3

#### Milieux de culture Milieu

##### Brown:

- Na Cl.....250g
- K Cl.....2g
- Mg SO<sub>4</sub>.....20g •Citrate Tri-Sodique.....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.

##### Bouillon nutritif :

- Peptone de viande.....10g
- Extrait de viande.....3g Extrait
- de levure.....3g
- NaCl.....5g

pH=7,4 ; 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, autoclave à 121°C / 20 min.

#### Milieu pour la recherche de cellulase:

- Milieu Br.....100ml
- CMC.....1g

pH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

#### Solutions

##### La composition de la solution saline:

- Eau distillé.....1L
- Na Cl.....180g/l
- Mg SO4.....10g/l

##### 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 d'acide phosphorique:

Pour 100 ml (pH=7,2)

Eau distillé.....95ml Acide  
phosphorique .....5ml

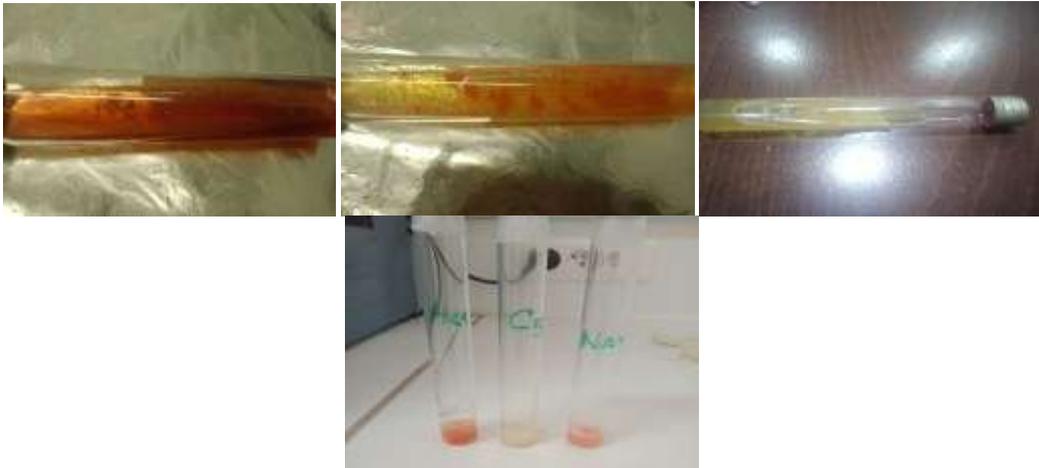
Autoclavage à 120°C / 30min.

**La composition de la solution TCA:**

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

## Annexe 4

### ○ Revivification des souches tests et cibles



### Souches tests conservées à 4°C réactivées



### Souches cibles réactivées dans le bouillon nutritif



### Repiquage des souches cibles sur milieu MH par méthode d'écouvillonnage



**Méthode des cylindres d'agar**



**Milieux ensemencés par souches cibles et tests pour la recherche de l'activité antibactérienne**



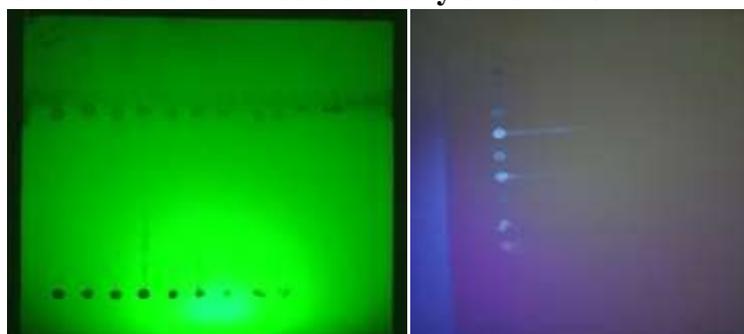
**Préparation des milieux avec différents substrats pour la recherche de l'activité enzymatique**

Annexe 5

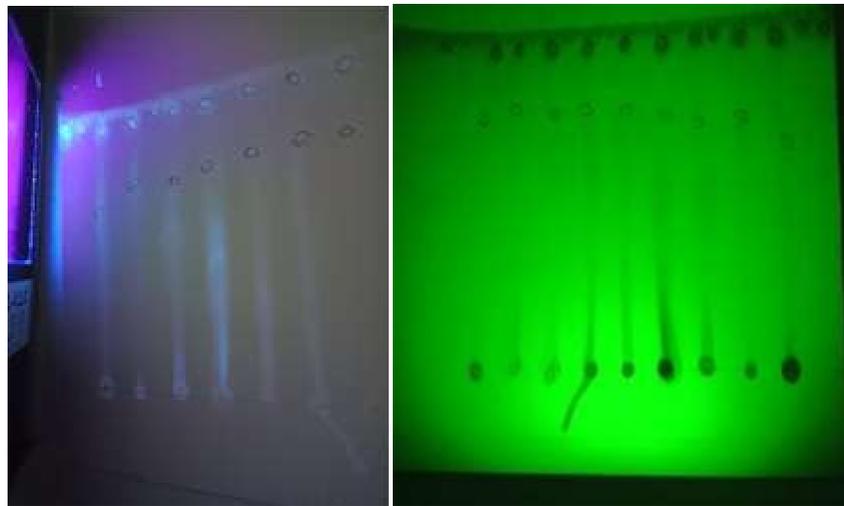
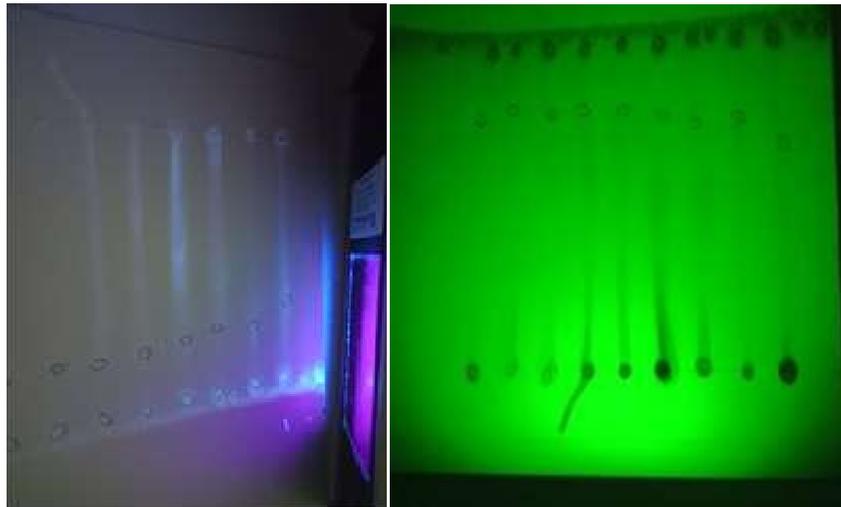
Séparation des substances bioactives par chromatographie analytique sur couche mince



Etapes de préparation et de lecture des résultats de la CCM Tests avec différents solvants A.Acétate d'éthyle méthanol



**B.Chloroforme-méthanol**



**C.Ammoniaque-chloroforme-acétate**



A. Acetate d'ethyle-Méthanol : Hm=11.5 cm

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
H1	0.9	0.65	0.6	1.6	0.55	1.95	-	-	-
H2	-	-	-	2.8	1.3	-	-	-	-
H3	-	-	-	3.6	-	-	-	-	-
H4	-	-	-	4.6	-	-	-	-	-

#### B. Chloroforme –Méthanol : Hm=10.5

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
H1	11	11.2	11	11.3	11.1	11.1	11.2	11	11
H2	6.8	7.3	7.1	7.4	7.6	7.7	7.5	7.7	7.5
H3	9.6	9.6	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.6	9.5

#### C. Ammoniaque – chloroforme – méthanol : Hm=11.9

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
H1	-	1.8	1.6	11.6	1.65	1.7	-	11.6	-
H2	-	-	-	-	11.8	-	-	-	-

### Révélation des sucres

Le réactif de Nigrum a été utilisé pour cette révélation. Après chauffage des plaques CCM à l'étuve à 105°C pendant 10 à 15 min les aldohexoses donnent une coloration bleuâtre, et les cétooses donnent une coloration rougeâtre.

- Préparation des solutions A et B:

**A** : 4g de diphenylamine dans 100 ml d'acétone.

**B**: 96 ml d'acétone, compléter jusqu'à 100 ml par l'aniline.

- Après mélange les deux solutions A et B, ajouter 20 ml d'acide orthophosphorique à 85%.

### Révélation des protéines

Elle est obtenue en pulvérisant sur le film, une solution de ninhydrine à 0,2% dans le mélange éthanol-acide acétique (4V : 1V), sécher le chromatogramme pendant 2 à 3 minutes dans une étuve à 80°C.

Préparation de la solution de ninhydrine à 0.2% :

- 0,4g de ninhydrine (se présente sous forme de poudre)

- Mélanger éthanol -acide acétique en mesurant 160 ml d'éthanol et en rajoutant 40 ml d'acide acétique (4V : 1V)

- Dissoudre les 0,4 g de ninhydrine avec le mélange éthanol-acide acétique de façon à ce que le volume final soit de 200 ml. **Révélation des lipides**

Préparation de la solution d'iode :

- 2.5 g iode
- 5g d'iodure de potassium
- 100 ml éthanol

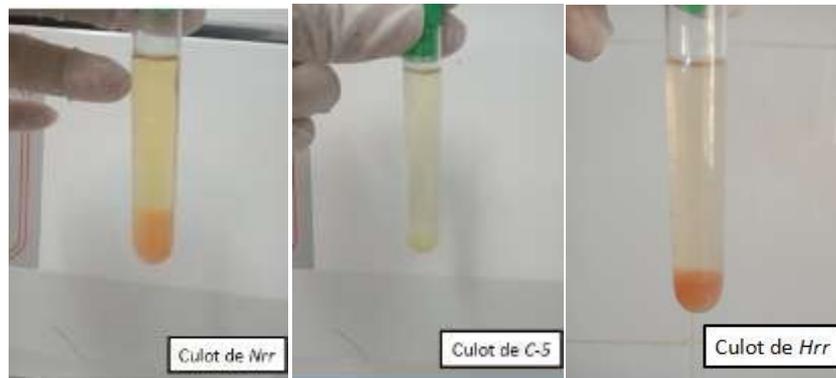
NB : Broyer l'iode et l'iodure de potassium puis l'ajout de l'éthanol progressivement.

Annexe 6

Extraction des pigments membranaires



Centrifugeuse (HuMax 14 K HUMAN)



Spectrophotometre (UV-VIS DR 6000 LANGE)

## Résumé

Les bactéries vivant dans les milieux extrêmes et en particulier, les halophiles extrêmes et les halotolérantes représentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales. L'objectif de cette étude était la recherche d'activités antibactériennes et la capacité à produire des enzymes hydrolytiques extracellulaires, chez trois souches d'halobactéries.

L'activité antibiotique est détectée dans l'ensemble des surnageants et extraits protéiques de culture des souches étudiées. Le test d'antagonisme souligne un effet inhibiteur aussi bien vis-à-vis de la bactérie halotolérante extrême, que contre les bactéries cibles pathogènes non halophiles à Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. Dans cette étude, une combinaison de plusieurs activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été relevée dans le surnageant de culture des trois halobactéries, qui s'avèrent capables d'hydrolyser plusieurs substrats en outre, la caséine, la gélatine, la cellulose, l'amidon et le tween 80 et ceci à 40°C, à 20% (v/p) de Na Cl et à pH 7,2. Le pouvoir de ces halobactéries à produire des molécules d'intérêt biotechnologique constituent l'une de leurs propriétés les plus prisées par les scientifiques.

Un début de caractérisation de ces activités a été entamé en utilisant la chromatographie sur couche mince en gel de silice.

**Mots clés:** Halotobactéries, biomolécules, activité antibactérienne, enzymes extracellulaires.

## Summary

Bacteria living in extreme environments and in particular, extreme halophiles and halotolerants represent a repertoire of metabolic pathways and original biomolecules. The objective of this study was the search for antibacterial activities and the ability to produce extracellular hydrolytic enzymes in three strains of halobacteria.

The antibiotic activity is detected in all the supernatants and protein extracts of culture of the strains studied. The antagonism test emphasizes an inhibitory effect both on the extreme halotolerant bacteria and on the non-halophilic pathogenic target bacteria Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup>.

In this study, a combination of several extracellular hydrolytic enzyme activities was found in the culture supernatant of the three halobacteria, which were shown to be able to hydrolyze several substrates in addition to casein, gelatin, cellulose, starch and tween 80 and this at 40 ° C, 20% (v / p) Na Cl and pH 7.2. The power of these halobacteria to produce molecules of biotechnological interest is one of their most valued properties by scientists.

A start of characterization of these activities was initiated using thin layer chromatography in silica gel.

**Key words:** Halotobacteria, biomolecules, antibacterial activity, extracellular enzymes.

**ملخص** تمثل البكتيريا التي تعيش في البيئات القاسية ، وعلى وجه الخصوص ، الهالوفيلات الشديدة ومزيلات الهالوجين ، ذخيرة من مسارات التمثيل الغذائي والجزيئات الحيوية الأصلية. كان الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الأنشطة المضادة للبكتيريا والقدرة على إنتاج إنزيمات تحلل المياه خارج الخلية في ثلاث سلالات من البكتيريا. تم الكشف عن نشاط المضادات الحيوية في جميع المواد الطافية ومقتطفات البروتين من ثقافة السلالات التي شملتها الدراسة. يؤكد اختبار الخصومة على التأثير المثبط على كل من البكتيريا الشديدة الهلوسة وعلى البكتيريا المستهدفة المسببة للأمراض غير الممرضة

Gram<sup>+</sup> و Gram<sup>-</sup>. في هذه الدراسة ، تم العثور على مزيج من العديد من أنشطة الإنزيم المائي خارج الخلية في طاف الثقافة للبكتيريا الثلاثية ، والتي تبين أنها قادرة على تحلل عدة ركائز بالإضافة إلى الكازين والجيلاتين والسليولوز والنشا و توين 80 وهذا عند 40 درجة مئوية ، 20 ٪ (ت / ع) كلوريد الصوديوم ودرجة الحموضة 2.7. قوة هذه البكتيريا في إنتاج جزيئات ذات أهمية للتكنولوجيا الحيوية هي واحدة من أكثر خصائصها قيمة من قبل العلماء.

بدأت بداية توصيف هذه الأنشطة باستخدام اللوني طبقة رقيقة في هلام السيليكا.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا ، الجزيئات الحيوية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، الإنزيمات خارج الخلوي.