

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Biotechnologie Microbienne



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Criblage des souches halophiles locales
productrices d'enzymes hydrolytiques
extracellulaires d'intérêt biotechnologique**

Présenté par :

AIADI Sabah & TOUATI Nadjet

Soutenu le : **26 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr NOURI H.

Mme YAHIAOUI H.

Mme BOUKTIT N.

MCB Président

MAA Promotrice

MAA Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ce travail:

A celle qui je ne trouve pas les mots pour m'exprimer : La seule qui n'a jamais cessé ses efforts, son aide, son soutien pour que j'atteigne ce niveau. Ta présence seulement m'enferme.

A celui qui m'a montré la patience, l'encouragement et qui a été toujours avec moi avec sa chaleur paternelle.

A mes adorables sœurs, qui ont toujours été là pour moi. A mes neveux et nièces surtout Marwa.

A mes chers frères Djelloul et Mahrez qui ont montré une totale disponibilité à chaque sollicitation, son oublier le petit charmant Aylimas.

A ma collègue Sabah, pour sa collaboration efficace.

A mes proches amies pour l'aide et la disponibilité à chaque moment.

A tous mes enseignants de tout mon cursus.

A tous mes amis (es) et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Nadjet

Remerciements

Avant tout nous remercions le bon Dieu, le tout puissant qui nous aide et nous donne le courage de réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice Madame Yahiacui Houa pour toute l'aide et le soutien de tous les instants, pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité, ainsi pour les conseils qui ont permis de nous faciliter le travail. Merci pour votre gentillesse. Merci pour tout.

Un énorme merci à Monsieur Nouri H pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail et pour avoir accepté de présider le jury.

Nos vifs remerciements vont également à Madame Bouktil N qui a bien voulu examiner ce modeste travail.

Un grand merci à tous les enseignants de notre cursus universitaire pour leur aide et leurs orientations. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes nos sincères remerciements.

Un grand merci au personnel de laboratoire de génie biologique pour tous les moments de travail passés au laboratoire et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Enfin, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à nos familles et tous nos amis. Merci pour votre compréhension.

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ce travail:

A ma merveilleuse mère qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que je puisse finir mes études. Ni sacrifices, ni privations ne l'empêché d'accomplir son devoir de mère.

A mon cher père qui a su se montrer patient, compréhensif et encouragement, qui a été un grand réconfort pour moi.

A ma grand-mère et mon grand père .

A ma chère sœur pour son aide morale et matériel ainsi qu'à mes neveux.

A mes chers frères qui ont montré une totale disponibilité à chaque sollicitation.

A ma collègue Nadjet, pour sa collaboration efficace.

A mes proches amies pour l'aide et la disponibilité à chaque moment.

A tous mes enseignants de tout mon cursus.

A tous mes amis (es) et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Sabah

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Archées halophiles extrêmes

1-Généralités.	2
2- Archaea halophiles	2
3- Ecologie.	3
4-Mécanismes d'adaptation.....	4

Chapitre 2 : Biotechnologie des halophiles

1-Les enzymes :

1-1- Les Amylases.....	5
1-2- Les protéases	6
1-3- Les Lipases et estérases.....	6
1-4-Les Xylanases.....	6
1-5-Les Cellulases	7
1-6-Les Nucléases	7

2- Les halocines

7

3-Autres composés :

3-1-Solutés compatibles	8
-------------------------------	---

3-2-Les caroténoïdes	8
3-3- La bactériorhodopsine	9

4-Autres applications :

4-1- La nanobiotechnologie	9
4-2- La biorémédiation	9
4-3- Fermentation des aliments	10

Partie 2 : Matérielles et méthodes

1-Matériel biologique	11
------------------------------------	-----------

2- Méthodes

2-1-Mise en culture des souches et revivification.....	12
2-2- La mise en évidence des activités enzymatiques	12
2-3. Etude de la stabilité thermique des enzymes	13
2-4. Effet d'acétonitrile sur l'activité enzymatique	14

Partie 3 : Résultats et discussion

3-1-Mise en culture des souches et revivification.....	15
3-2- La mise en évidence des activités enzymatiques	15
3-3. Etude de la stabilité thermique des enzymes	20
3-4. Effet d'acétonitrile sur l'activité enzymatique	24
3-5. Discussion.....	26

Conclusion

Références bibliographique

Annexes

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	La page
1	Les souches sélectionnées pour la mise en évidence de l'activité enzymatique	15
2	Aspect macroscopiques de la souche BW3-5 cultivée sur milieu Br.	16
3	Activité amylasique	17
4	Activité protéolytique. A-dégradation de protéine du lait écrémé, B- dégradation de la gélatine.	18
5	Activité lipolytique (l'hydrolyse d'huile d'olive)	18
6	Activité estérase (Tween 20)	19
7	traitement thermique à 70°C d'activités enzymatique : A-dégradation de Tween 20, B-dégradation de l'amidon, C et D-dégradation de la gélatine.	21
8	traitement thermique à 100°C pour l'activité estérase.	22
9	Effet d'acétonitrile sur la gélatinase.	24

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	La page
I	Classification des micro-organismes selon leur réponse aux sels). (Oren, 2013).	2
II	tableau comparatif entre les trois Domaines du vivant. (Besse, 2016).	3
III	Les différentes activités enzymatiques retrouvées dans les surnageants.	19
IV	Effet de la température sur l'activité enzymatique extracellulaire.	22
V	Effet d'acétonitrile sur les activités enzymatiques extracellulaires.	24

Introduction

introduction

Les microorganismes extrémophiles vivent dans des environnements qui réunissent des conditions physico-chimiques hostiles à la vie. Ces conditions comprennent la température, le pH, la pression, la radiation, la dessiccation et la salinité. (Lynn et al., 2001). Néanmoins, il y'a un grand intérêt envers l'étude de ces microorganismes de la part de la communauté scientifique en raison de leurs caractéristiques biotechnologiques. Les microorganismes extrémophiles sont une source d'extrêmzymes avec une grande variété d'applications industrielles dues à leur stabilité dans les conditions extrêmes (Dumorné et al., 2017).

Les environnements hypersalins ayant une concentration en sels supérieure à celle de l'eau de mer sont des habitats extrêmes, couvrant une bonne partie de la surface de la terre. (RodríguezValera, 1980). Les microorganismes halophiles vivant dans ces environnements sont une source de biomolécules qui peuvent avoir de nombreuses applications intéressantes notamment dans la décontamination des eaux usées hypersalées (Lefebvre et Moletta, 2006). Parmi les biomolécules synthétisées dans ces milieux hypersalins, se trouvent des enzymes. Le potentiel industriel des enzymes halophiles réside dans leur capacité à être actives et stables sous une basse activité de l'eau et, dans beaucoup de cas, aussi en présence des solvants organiques, et à des pH et température élevés (Munawar et Engel, 2013).

Le sujet développé dans le cadre de ce travail concerne le criblage de souches halophiles locales productrices d'enzymes extracellulaires d'intérêt biotechnologique et cela par la mise en évidence des activités enzymatiques : amylolytique, protéolytique et lipolytique, ainsi que l'étude de leur stabilité au traitement thermique et vis-à-vis d'un solvant organique.

La majorité des enzymes usuelles ne répondent pas aux critères dans lesquels les réactions sont menées en industrie. Le développement de la biotechnologie repose sur la recherche de nouvelles enzymes robustes qui résistent et restent stables et actives dans les conditions extrêmes.

Dans la première partie, nous trouverons la synthèse bibliographique qui comprend deux chapitres : le premier sur les halophiles et le deuxième sur leur biotechnologie. La deuxième partie est consacrée à la méthodologie suivie par la troisième partie des résultats obtenus et leur discussion. Nous terminons par une conclusion.

Partie 1

Synthèse Bibliographique

Chapitre 2

Biotechnologies des halophiles

Chapitre 1

Archaea halophiles extrêmes

1. Généralités :

Les halophiles présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve parmi les trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria et Eucarya. Les virus sont aussi plus abondants dans les environnements hypersalins. (Oren., 2002 ; Atanasova et al., 2015.). Le terme halophile est couramment utilisé pour désigner les organismes qui ont besoin de quantités substantielles en sel qui est presque toujours (NaCl). Les microorganismes halophiles sont classés sur la base de leur niveau d'exigence et de tolérance en sel. (Kushner., 1993). (Tableau I).

Tableau I: Classification des micro-organismes selon leur réponse aux sels. (Oren., 2013).

Catégorie	Propriétés	Exemple
Non-halophile	se développe mieux dans un milieu contenant moins de 0.2 M de sel	la plupart des bactéries d'eau douce
Légèrement halophile	se développe mieux dans un milieu contenant 0.2–0.5 M de sel	La plupart des bactéries marines
Halophile modéré	se développe mieux dans un milieu contenant 0.5–2.5 M de sel	<i>Salinivibrio costicola</i> <i>Halomonas elongata</i>
halophile extrême limite	se développe mieux dans un milieu contenant 1.5–4.0 M de sel	<i>Halorhodospira halophila</i>
Halophile extrême	se développe mieux dans un milieu contenant 2.5–5.2 M de sel	<i>Halobacterium salinarum</i> <i>Salinibacter ruber</i>
Halotolérant	Non-halophile qui peut tolérer le sel, si la gamme de croissance s'étend de 2.5 M en sel, il peut considérer Halotolérant extrême	<i>Staphylococcus aureus</i>

2. Archaea halophiles :

Les halophiles du domaine Archaea appartiennent à trois familles : *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. La famille *Halobacteriaceae* de l'ordre *Halobacteriales*, de classe *Halobacteria* sont des halophiles extrêmes, qui requièrent au moins 1.5M du NaCl pour leur

croissance. Plus de 40 genres et plus de 150 espèces d'*Halobacteriaceae* ont été décrites. Les représentants de cette famille sont en général des aérobies qui utilisent les substrats organiques comme source de carbone et d'énergie. Quelques espèces de *Halobacteriaceae* sont des polyextrêmophiles qui combinent la capacité de se développer aux concentrations élevées en sel, à des pH extrêmes et parfois à des températures élevées. (Yachai., 2009 ; Amoozegar et al., 2015 ; Christon et al., 2016).

Les Archaea se distinguent des deux autres domaines de la vie : Eucarya et Bacteria par des caractéristiques qui lui sont propres. (Tableau II)

Tableau II : Tableau comparatif entre les trois Domaines du vivant. (Besse., 2016)

Caractéristiques	Archaea	Bacteria	Eucarya
Taille	0.1 à 15 µm	0.1 à 15 µm	Supérieur à 5 µm
Noyau	Non	Non	Oui
Organites	Non	Non	Oui
Paroi cellulaire	Couches S	Peptidoglycane	Absente
Membrane			
Liaisons glycérol-lipide	Ether	Ester	Ester
Squelette phosphate des lipides	Glycérol-3-phosphate	Glycérol-1-phosphate	Glycérol-3-phosphate
Méthanogénèse	Oui	Non	Non
Machinerie central de la transcription	Types eucaryote	bactéries	Eucaryote
Facteurs d'élongation de la traduction	Types eucaryote	bactéries	Eucaryote

3. Écologie :

Les archées halophiles extrêmes sont des microorganismes extrêmophiles qui exigent des concentrations en sel très élevée pour croître, ils sont présents dans les environnements hypersalins avec une concentration en sel proche de la saturation tel que les lacs salés, les marais salants, la Mer morte, les salines, les sols salins, et dans les aliments fermentés et conservés à base de sel. Ils peuvent survivre pendant de longues périodes dans les cristaux de sel, et face à de

nombreux facteurs tels que l'oligothrophie et la radiation. Ces microorganismes sont dominants dans les milieux hypersalins ou leur présence peut être observée à l'œil nu, grâce à la coloration rouge, orange, ou pourpre qui est due à des pigments photosynthétiques présents dans leurs membranes et la grande densité des communautés d'haloarchaea colonisant ces milieux.(Ghai et al, 2011 ; Horikoshi et al, 2011; Stan-Lotter et al, 2015.)

4. Mécanismes d'adaptation :

Il existe deux stratégies fondamentales chez les microorganismes halophiles pour la régulation de la pression osmotique élevée, due à la concentration élevée en sel confrontée dans les milieux hypersalins. La première consiste en la régulation de la concentration en sel dans leur cytoplasme par l'accumulation des ions inorganiques, qui sont dans la plus part des cas K^+ (plutôt que Na^+) est le cation le plus dominant et Cl^- cette stratégie est utilisée par les archaea halophiles aérobies de l'ordre *Halobacteriales* et d'autres bactéries halophiles. L'autre stratégie est rencontrée chez la plupart des bactéries halophiles et halotolérantes et chez les haloarchaea méthanogènes. Elle est basée sur la biosynthèse ou l'accumulation des osmolytes (par exemple : l'éctoïne et la glycine betaine). La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action coopérative des antiports membranaire Na^+/H^+ .

Les protéines halophiles sont modifiées pour contenir un niveau élevé en acides aminés acides sur leurs surfaces externes, leur conférant une stabilité face aux concentrations élevées en sel. Cette stabilité est assurée par l'interaction entre la charge négative des protéines et les ions et la charge positive des sels. L'ADN des haloarchaea s'adapte à la concentration intracellulaire élevée en cations par le pourcentage élevé en guanine plus cytosine qui s'étend de 59.5 à 71.2%.(Oren., 2013 ; Shrestha et al., 2018).

Les microorganismes halophiles présentent une source de biomolécules possédant plusieurs propriétés uniques et intéressantes, disposant d'un potentiel biotechnologique très important pour différentes applications industrielles.

1 Les enzymes

Les enzymes halophiles sont des polyextrémophiles capables de catalyser des réactions dans des conditions extrêmes pour divers processus industriels. Certaines propriétés intéressantes ont été rapportées pour les amylases, les protéases, les nucléases, les cellulases, les chitinases, les xylanases, les estérases et les lipases d'halophiles. (Setati, 2010 ; Kumar et al., 2016).

1.1. Les Amylases

L' α -amylase (E.C. 3.2.1.1, 1, 4- α -D-glucane glucano-hydrolase) hydrolyse les liaisons α (1- 4) glycosidiques de l'amidon et les polysaccharides apparentés. Les α -amylases sont une classe importante d'enzymes industrielles, trouvant des applications à grande échelle dans l'industrie alimentaire, textile, papier, détergent et pharmaceutique. Les alpha-amylases halophiles peuvent également être particulièrement résistantes aux solvants organiques car elles fonctionnent dans des conditions où l'activité de l'eau est faible. L'activité et la stabilité de ses enzymes sont maintenues dans divers solvants organiques tels que le n-décane, le n-nonane, le n-octane, le xylène, le styrène, le toluène, le benzène et le chloroforme. Cependant, l'activité est perdue en présence de solvants hydrophiles (Kumar et al., 2016).

L' α -amylase est produite par de nombreux genres haloarchaea, y compris *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* et *Natronococcus*. Une α -amylase thermostable de *Haloferax sp.* HA10 avec une activité optimale à 55 ° C conserve une activité de 44% entre 90-100 ° C. Cette α -amylase est active à des concentrations allant de 0,5 à 3 M en NaCl et son activité à faible teneur en sel pourrait être bénéfique pour des applications industrielles (Singh et Singh, 2017).

1.2. Les Protéases :

Les protéases microbiennes font partie des enzymes les plus étudiées et elles sont largement utilisées dans les procédés industriels. Elles sont couramment utilisées comme additifs dans les détergents à lessive, la transformation des aliments, les produits pharmaceutiques ainsi que la gestion des déchets. (Setati, 2010)

Une protéase extracellulaire de *Halobacterium halobium* a été exploitée pour la synthèse de peptides dans l'eau / N'-N'-diméthylformamide. La synthèse de tripeptides par la protéase extracellulaire de *Natrialba megadii* (Nep) en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) sous différentes concentrations de sel. (Singh et al., 2017).

1.3. Les Lipases et estérases :

Elles sont utiles en industrie avec une large spécificité de substrat et une grande stabilité. Elles fonctionnent en hydrolysant les liaisons ester entre au sein des lipides. Les lipases et les estérases qui sont stables dans des conditions extrêmes peuvent trouver des applications dans la production de biocarburants, les industries textiles, le traitement des eaux usées et come détergents. *Haloarcula marismortui* et d'autres haloarchaea produisent des lipases et des estérases thermostables et thermoactives sel dépendantes (Singh et Singh, 2017 ; Schreck et Grunden, 2014).

Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les chaînes carbonées courtes et elles ne sont pas actives sur les substances qui forment des micelles.

1.4. Les Xylanases:

Les xylanases, (EC 3.2.1.8) pour l'endo- β -xylanase et EC 3.2.1.7 pour les β -xylosidases, ont été partiellement purifiées à partir de l'haloarchéon *Halorhabdus utahensis* dégradant l'hémicellulose. La β -xylanase est active sur

une gamme de sels allant de zéro à 30% de NaCl avec un optimum de 5 à 15% de NaCl. (**Litchfield., 2011**)

Les xylanase jouent un rôle central dans la dégradation du xylane. Elles sont largement utilisées dans l'industrie boulangère pour améliorer les propriétés de la pâte et dans le bioblanchiment du papier. Cependant une application efficace des xylanases dans le bioblanchiment exige qu'elles soient alcaliphiles et thermotolérantes. (**Setati, 2010**)

1.5. Les Cellulases:

Les cellulases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons β (1-4)D-glucosidiques dans la cellulose. (**ShaoMin et Guang, 2013**). L'endocellulase, l'exocellulase et la β -glucosidase sont des enzymes cellulotiques qui agissent ensemble pour hydrolyser complètement les liaisons β (1-4) D-glycosidiques de la cellulose pour former du glucose. Les cellulases pourraient être utilisées dans les industries alimentaires, chimiques et textiles. (**Zhang et al., 2012**).

Une souche d'Haloarcula a montré une activité cellulolytique considérable à une salinité élevée, cette activité devient meilleure lorsqu'elles sont immobilisées dans un polymère d'alginate de sodium. (**Ogan et al., 2012**).

1.6. Les Nucléases :

Les RNases agissent sur les ARN pour produire des 5' ribonucléotides ou des 2',3'-nucléotides et les DNases sur les ADN pour libérer des 5'-désoxyribonucléotides ou des 2', 3'-nucléotides. Les 5'-nucléotides sont des arômes qui donne une bonne saveur aux aliments. (**Kanlayakrit et al., 2001**).

2-Les Halocines :

Les halocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique, produites par les haloarchaea et synthétisées par la voie ribosomique qui agissent comme inhibiteurs d'archaea halophiles phylogénétiquement liées. Parmi les halocines décrites, L'halocine H6, présente une cible clairement identifiée : l'échangeur Na^+/H^+ , qui est indispensable pour l'osmo-adaptation

des cellules halophiles. Chez l'homme: l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) est impliqué dans des fonctions essentielles telles que la régulation du pH intracellulaire, l'homéostasie du sodium et le volume cellulaire. Des données récentes montrent que le dysfonctionnement du NHE est associé à plusieurs maladies graves ou mortelles, comme les maladies cardiaques et les cancers. Les inhibiteurs de la NHE eucaryote pourraient donc être des candidats-médicaments intéressants. Ils peuvent être utilisés comme agents de conservation des aliments. (Karthikeyan et al., 2013 ; Besse et al., 2015)

3. Autres composés:

3.1. Les solutés compatibles :

La majorité des microorganismes halophiles et halotolérants trouvent comme stratégie la production de solutés compatibles pour pouvoir s'adapter à leur environnement hypersalins afin de pouvoir exclure du sel de leur cytoplasme. Les protéines halophiles ont besoin de ces solutés pour adapter à des concentrations élevées en sel. L'éctoïne est l'un des solutés les plus connus produits par les halophiles extrêmes à de nombreuses applications comme la conservation in vitro d'enzymes et d'acides nucléiques commerciaux et dans les produits cosmétiques dermatologiques. (Oren., 2010 ; Uratani et al., 2014).

3.2. Les caroténoïdes :

La culture de l'algue verte *Dunaliella salina* et *D. bardawil* pour la production du β -carotène est l'histoire majeure du succès dans la biotechnologie des halophiles. Ce pigment est trop demandé pour différentes applications comme antioxydant, source de pro-vitamine A et comme colorant alimentaire. L'activité anti-oxydante lui permet d'être populaire pour leur utilisation dans l'alimentation humaine. Les extraits de caroténoïdes de l'Archaea halophile ont montré une capacité anti-oxydante élevée. (Oren., 2010 ; Calegari-Santos et al., 2016).

3.3. La bactériorhodopsine :

La bactériorhodopsine est l'analogue bactérien de la rhodopsine visuelle trouvée dans l'œil des mammifères. C'est une protéine transmembranaire constituée de 248 acides aminés et dont la masse moléculaire est d'environ 26 kDa. La membrane cellulaire phospholipidique a une épaisseur d'environ 6 nm et la bactériorhodopsine représente environ 75% de la masse membranaire. *Halobacterium salinarum* prospère et produit de la bactériorhodopsine dans des environnements à forte salinité et à faible teneur en oxygène. Le processus de pompage de protons est utilisé comme source d'énergie pour conduire la conversion de l'ADP en ATP pour les besoins de la cellule. Cependant les propriétés optiques de cette protéine lui permettent d'être utilisée dans différentes applications telles que la convection de l'énergie lumineuse en énergie chimique. (Knoblauch et al., 2014 ; Oren et al., 2010).

4. Autres applications

4.1. La nanobiotechnologie :

Les nanoparticules peuvent être explorées pour différentes applications biologiques. Les protéines de la couche S d'haloarchaea peuvent être les candidats requis pour la synthèse de nanoparticules. Les nanoparticules argentées intracellulaires synthétisées par *Halococcus salifodinae* BK6 présentent une activité antibactérienne envers les bactéries gram négatives et gram positives. (Singh et Singh, 2017)

4.2. La biorémédiation:

Les microorganismes halophiles et halotolérant ont montré une bonne efficacité pour le traitement des eaux salées et la dépollution des environnements salins et hypersalins, couramment exposés à des contaminations dues à l'activité industrielle continue, générant ainsi des polluants tels que les composés pétroliers et phénoliques ainsi que les métaux. (Popescu et al., 2009; Castillo-Carvajal et al., 2014)

4.4. Fermentation des aliments :

Les archaea halophiles sont impliqués dans le processus de fermentation des aliments présentant une concentration élevée en sel. Les aliments fermentés salés traditionnellement préparés, comme la sauce de poisson, les pâtes et les cornichons, nécessitent un temps et un espace extrêmement longs pour la fermentation naturelle. Ces produits riches en protéines et en acides aminés trouvent un marché important dans les pays en développement. Cependant, les temps de fermentation longs et les grands besoins en espace rendent le procédé coûteux. Les Archées halophiles, en vertu des protéases extracellulaires peuvent accélérer le processus de fermentation et améliorer la qualité du produit, ce qui réduit le coût global. (**Mokashe et al., 2018; Singh et Singh, 2017**)

Partie 2

Matériels et Méthodes

Lieu de travail : Laboratoire de Génie biologique de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Objectif du travail : La recherche d'enzymes hydrolytiques d'intérêt biotechnologique produits par des souches d'archées halophiles locales.

1. Matériel biologique

1.1. Les souches

Dans cette étude, nous avons utilisé des souches d'archées halophiles extrêmes locales isolées d'environnements hypersalins. Quinze souches ont fait l'objet d'un criblage pour la production d'enzymes. Deux sont isolées à partir de la saline d'Ichakaben de la wilaya de Bejaia. Il s'agit d'A9 et SH. Les autres (BW (1-1, 1-2, I-2, 2-2, 2-4, 3-5, 4-1 ,4-4), (BS2, BS3, BG2, BS7) sont isolées du chott El Beida dans la wilaya de Sétif.

1.2. Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé dans cette étude est le milieu Brown qui est spécifique aux microorganismes halophiles car il répond à leurs exigences nutritionnelles selon leur concentration en NaCl ou en KCl, et la présence en acides aminés ainsi qu'en MgSO₄. (**Schneegurt et al., 2012**).

- Pour la revivification des souches le milieu Brown (Br) a été utilisé.
- Pour la mise en évidence des différentes activités enzymatiques, le milieu Brown (Br) a été additionné de différents substrats spécifiques pour chaque enzyme.
 - Le milieu (Br) est préparé à pH neutre (7,2).
 - La composition du milieu (Br) est donnée en **annexe II**.
 - Les milieux de culture utilisés pour le criblage des souches et pour la mise en évidence des différents métabolites sont mentionnés dans **l'annexe II**.

L'appareillage et les réactifs sont donnés en **annexe I**.

2. Méthodes

2.1. La mise en cultures des souches(Revivification)

Milieu liquide

- Revivification des souches : Nous avons effectué des inoculations à partir de chaque suspension bactérienne conservée à 4°C, 3 ml du milieu de culture liquide (Br) à 25% est inoculé par 50µl de la suspension conservée, ensuite les cultures sont incubées dans un bain-marie à 40°C à 200 rpm pendant 5 à 6 jours (jusqu'à l'apparition d'un trouble).

Milieu solide :

- Après une semaine d'incubation à 40 °C, 1µl de chaque culture liquide on étéensemencé dans des boites de Pétri contenant le milieu (Br) solide par la méthode des stries.
- Pour éviter la dessiccation des milieux, les boites sont mises dans des sachets en plastique (**Rodriguez et al., 1980**), et incubées à 40°C jusqu'à apparition des colonies.

2.2 La mise en évidence des activités enzymatiques

Une recherche qualitative sur milieu Brown modifié par réduction de la quantité d'extrait de levure à 0,3 g/l (milieu de base) et par rajout d'un polymère teste, utilisé pour tester la production d'hydrolase (**Oren et al., 1997**).

Les cultures liquides des souches à testés on été centrifugé dans des eppendorf, à 10000 rpm pendant 10 min afin de séparé le culot du surnageant. Ces derniers sont transférés dans de nouvelles eppendorf stérile pour les tester ultérieurement.

A l'aide d'un emporte-pièce des puits de 0.5 cm de diamètres sont découpés dans les boites de Pétri contenant le milieu Brown modifié à base du polymère teste, et 50µl de chaque surnageant y sont déposés dans ces puits. Après incubation à 40°C pendant 3 jours, les diamètres des zones d'hydrolyse autours des puits sont mesurés.

Détermination de l'activité amylolytique

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par **Amoozegar et collaborateurs (2003)**, en utilisant le milieu de base additionné de 1% (m/v) d'amidon soluble. Après incubation à 40°C pendant 3 jours, les boîtes sont inondées avec une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour des puits. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu.

Détermination de l'activité protéolytique

La Recherche des protéases de lait écrémé : le milieu de base est supplémenté par 10% (m/v) de lait écrème. Après avoir déposé les surnageants, les boîtes de Pétri sont incubées à 40°C pendant 3 jours. La présence de cette activité est mise en évidence par apparition d'un halo clair autour des puits indiquant une hydrolyse des protéines du lait.

Détermination de l'activité lipolytique et estérasique

Un milieu de base contenant 1% (v/v) de Tween 20 (**Gonzalez et al., 1978**) ou encore 2,5 % (v/v) d'huile d'olive (**Sigurgísladóttir et al., 1993**) est utilisé pour la mise en évidence de l'activité estérasique ou lipolytique respectivement. Après incubation à 40°C pendant 3 jours, le développement d'un précipité autour des puits indique la présence d'une estérase ou d'une lipase.

Détermination de l'activité gélatinasiq

Le milieu de base est supplémenté par 0,8 % (m/v) de gélatine. Les boîtes de Pétri sont incubées à 40°C pendant 3 jours. L'hydrolyse de la gélatine est révélée par l'addition de 1 à 2 ml du TCA (10%) en surface des boîtes, et l'apparition d'une zone claire autour des puits indique la production d'une gélatinase (**Kim et Hope, 1986**).

2.3. Etudes de la stabilité thermique des enzymes

Les surnageants qui présentent des résultats positifs (présence d'activité enzymatique) ont été traités à 70°C et 100°C pendant 10 min dans un bain-marie.

Après refroidissement de ces surnageants, on a déposé 50µl dans les puits de chaque boîte.

La stabilité thermique de l'amylase

Après solidification du milieu Br à 1% d'amidon, des puits sont réalisés et 50µl des surnageants traités y sont déposés, puis incubés à 40°C.

La stabilité thermique des protéases

Après solidification du milieu Br (M2), des puits sont réalisés et 50µl des surnageants traités y sont déposés, puis incubés à 40°C.

La stabilité thermique des lipases et estérases

Après solidification du milieu Br (M3, M4), des puits sont réalisés et 50µl des surnageant traité y sont déposés et incubés à 40°C.

La stabilité thermique des gélatinases

Après solidification du milieu Br à 0.8% de gélatine, des puits sont réalisés et 50µl des surnageant traité y sont déposés et incubés à 40°C.

2.4. Effet de l'acétonitrile sur l'activité enzymatique

Dans le but d'étudier l'influence du solvant organique (Acétonitrile) sur l'activité enzymatique, Nous avons mélangé 25µl d'acétonitrile avec 25µl des surnageants présentant une activité, le mélange obtenu est incubé pendant une heure à température ambiante. Après cette incubation, 50µl de chaque mélange est prélevés avec une micropipette et déposé dans les puits, et incubés à 40°C (Karthikeyan et al., 2013).

Partie 3

Résultats et Discussion

1. Mise en culture des souches et revivification :

- Milieu liquide

Revivification des souches

Parmi les souches revivifiées, nous avons sélectionné quinze pour l'étude de la production des enzymes hydrolytiques extracellulaires (Figure 1).

La croissance des souches est estimée à l'œil nu par l'apparition d'un trouble et d'une pigmentation rose ou orange après incubation à 40°C. Cette pigmentation est due à la production d'un pigment caroténoïde par ces souches d'haloarchaea qui est presque toujours le bactériorubérine (Ventosa et Arahal, 1993; Calegari-Santos et al., 2016).



Figure 1 : Les souches sélectionnées pour la mise en évidence de l'activité enzymatique

- **Milieu solide**

Aspect des colonies :

Les souches forment, sur milieux solides, des colonies plates, circulaires, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm. Cet aspect est apparu après plus d'une semaine d'incubation à 40°C. Les souches se colorent en rose ou orange (Figure 2). Cette pigmentation qui est de type caroténoïde est une caractéristique des archaea halophiles extrêmes (Grant *et al.*, 2001; Oren et Rodriguez-Valera, 2001).

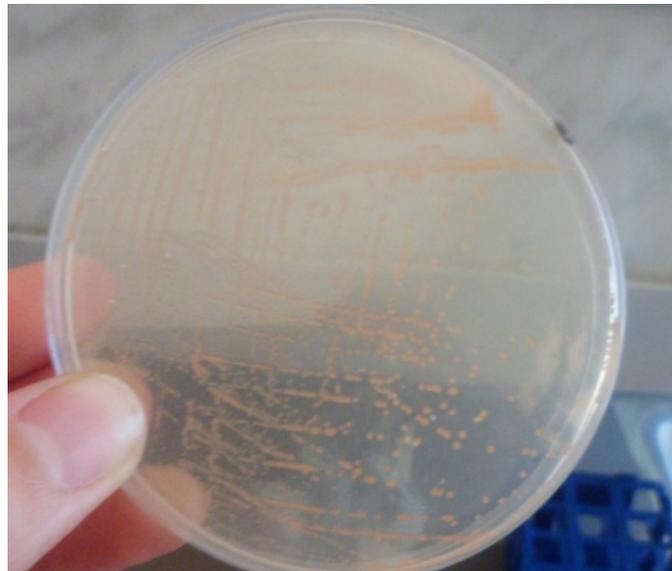


Figure 2: Aspect macroscopique de la souche BW3-5 cultivée sur milieu Br.

2. La mise en évidence des activités enzymatiques

Les activités amylolytiques, protéolytiques, gélatinasiqes, lipolytiques et estérasiques ont été mises en évidence en utilisant respectivement les milieux : gélose additionnés d'amidon, du lait écrémé, de la gélatine, d'huile d'olive et du Tween 20.

Toutes les souches qu'on a étudiées sont productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, avec une dominance d'activité Amylasique, estérasique et gélatinasiqes respectivement, et une faible activité pour l'activité lipolytique.

Activité amylolytique

Les souches (A9, BW2-4, BWI-2, SH, BW1-2, BS3, BW3-5, BG2, BW1-1, BS7, BW4-4) présentent une activité amylolytique qui se manifeste par l'apparition d'une zone d'hydrolyse (halo clair autour des puits), cela signifie que ces souches sont productrices d'amylase. (Figure 3)

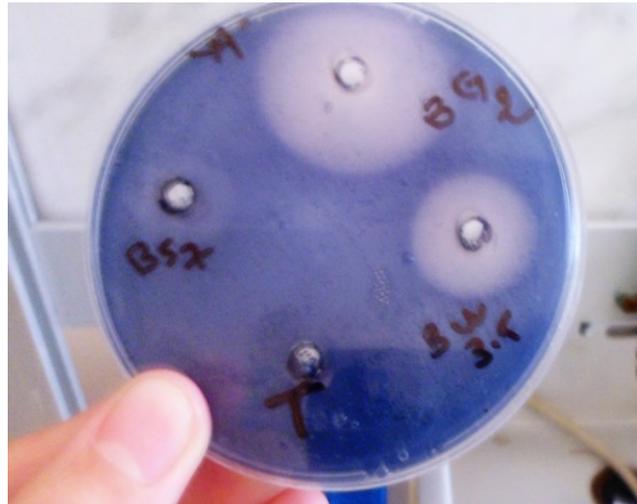


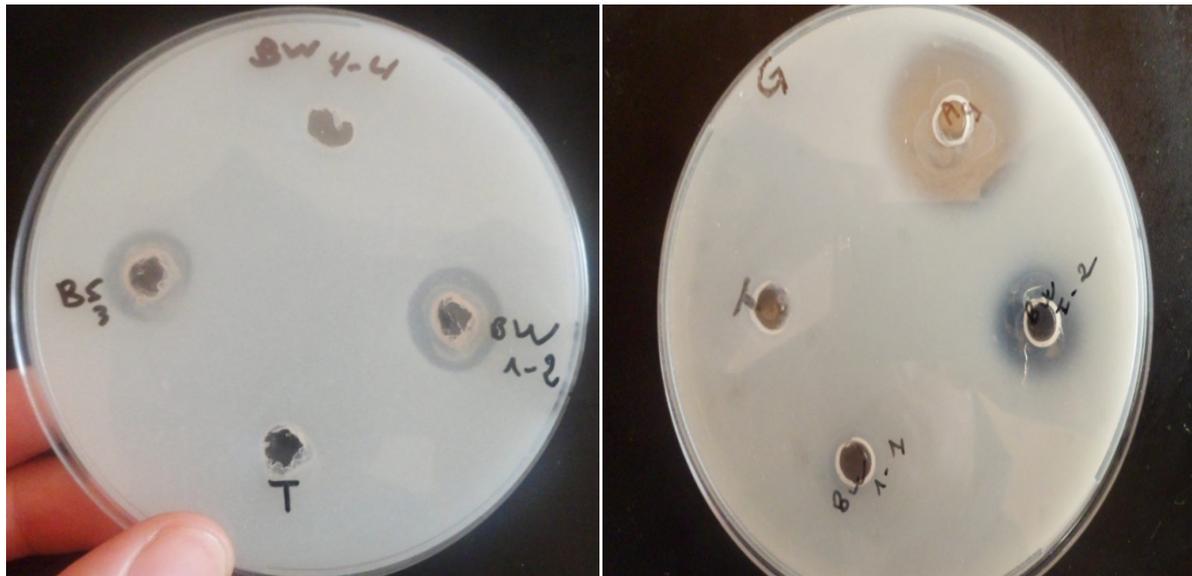
Figure 3 :
Activité amylolytique

Activité protéolytique

Les souches (A9, AS, BWI-2, BW1-2, BS3, BW1-1) présentent une activité protéolytique. Elles sont donc productrices d'enzymes dégradant les protéines du lait écrémé (protéases). (Figure 4)

Activité gélatinasiq

Un nombre important de souches (A9, BWI-2, SH, BW1-2, BS3, BW3-5, BW2-2, BW4-1, BW4-4) sont productrices d'enzymes dégradant la gélatine (Figure 4)



A

B

Figure 4:

Activité protéolytique.

A-dégradation des protéines du lait écrémé

B- dégradation de la gélatine.

Activité lipolytique

C'est l'activité la moins présente par rapport aux autres activités. Seulement quatre souche (SH, BG2, BS3, BW1-1) présentent une activité lipolytique ce qui indique que ces dernières sont productrice de lipase. (Figure 5).



Figure 5:

Activité lipolytique (huile d'olive)

Activité estérasique

Dix souches ont montré une capacité de dégrader le Tween 20 (A9, AS, SH, BS3, BS2, BG2, BW2-2, BW4-1, BS7, BW4-4), elles sont donc productrices de l'estérase. (Figure6).

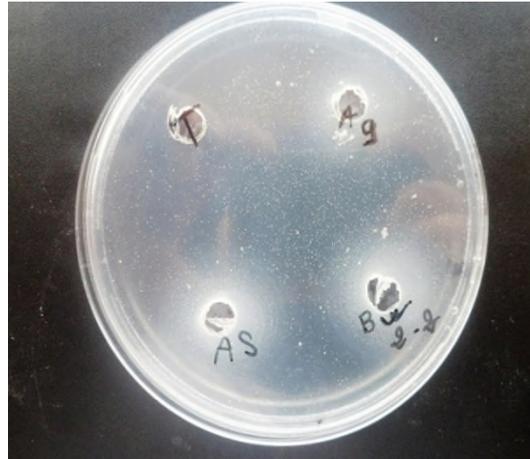


Figure 6 :
Activité estérasique (Tween 20)

Remarque

La souche BS3 présente les cinq activités (amylasique, gélatinasique, protéasique, lipolytique et estérasique). Donc cette souche est productrice des enzymes (amylases, gélatinases, protéases, lipases et estérases).

Tableau III: Les différentes activités enzymatiques retrouvées dans les surnageants.

souches	amylase	D	protéases	D	gélatinase		lipase	D	estérase	D
A9	+	0.8	+	1.5	+	1.6	-		+	2.1
BW2-4	+	1.5	-		-		-		-	
AS	-		+	1.3	-		-		+	1.8
BW1-2	+	1.3	+	0.9	+	0.7	-		-	
SH	+	0.6	-		+	1.7	+	1.4	+	1.3
BW1-2	+	1	+	1.1	+	1.2	-		-	
BS3	+	1.5	+	1	+	1.5	+	1.5	+	1.2
BW3-5	+	1.1	-		+	1.4	-		-	

BS2	-		-		-		-		+	1.1
BG2	+	1.9	-		-		+	1	+	0.6
BW2-2	-		-		+	1.5	-		+	2.6
BW1-1	+	1.6	+	0.7	-		+	1.2	-	
BW4-1	+	1	-		+	0.6	-		+	1.4
BS7	-		-		-		-		+	1.7
BW4-4	+	1.4	-		+	2.4	-		+	1.7

(+) : présence de zone d'hydrolyse.

(-) : absence de zone d'hydrolyse.

D : Diamètre d'hydrolyse en cm.

D= Diamètre de la zone d'hydrolyse – le Diamètre du puits.

Diamètre du puits = 0.5 cm.

3. Etude de la stabilité thermique des enzymes :

Le traitement thermique concerne les surnageant présentant une activité enzymatique, et cela effectuer à deux températures 70°C et 100°C pendant 10 min.

Pour le traitement à la température 70°C, il ya des activités qui ont persistés pour tous les enzymes sauf la lipase. Comme le montre les figures, il ya des zones d'hydrolyse même après un traitement thermique à 70°C, cela signifie que ces enzymes sont thermorésistantes à 70°C. (Figure 7).

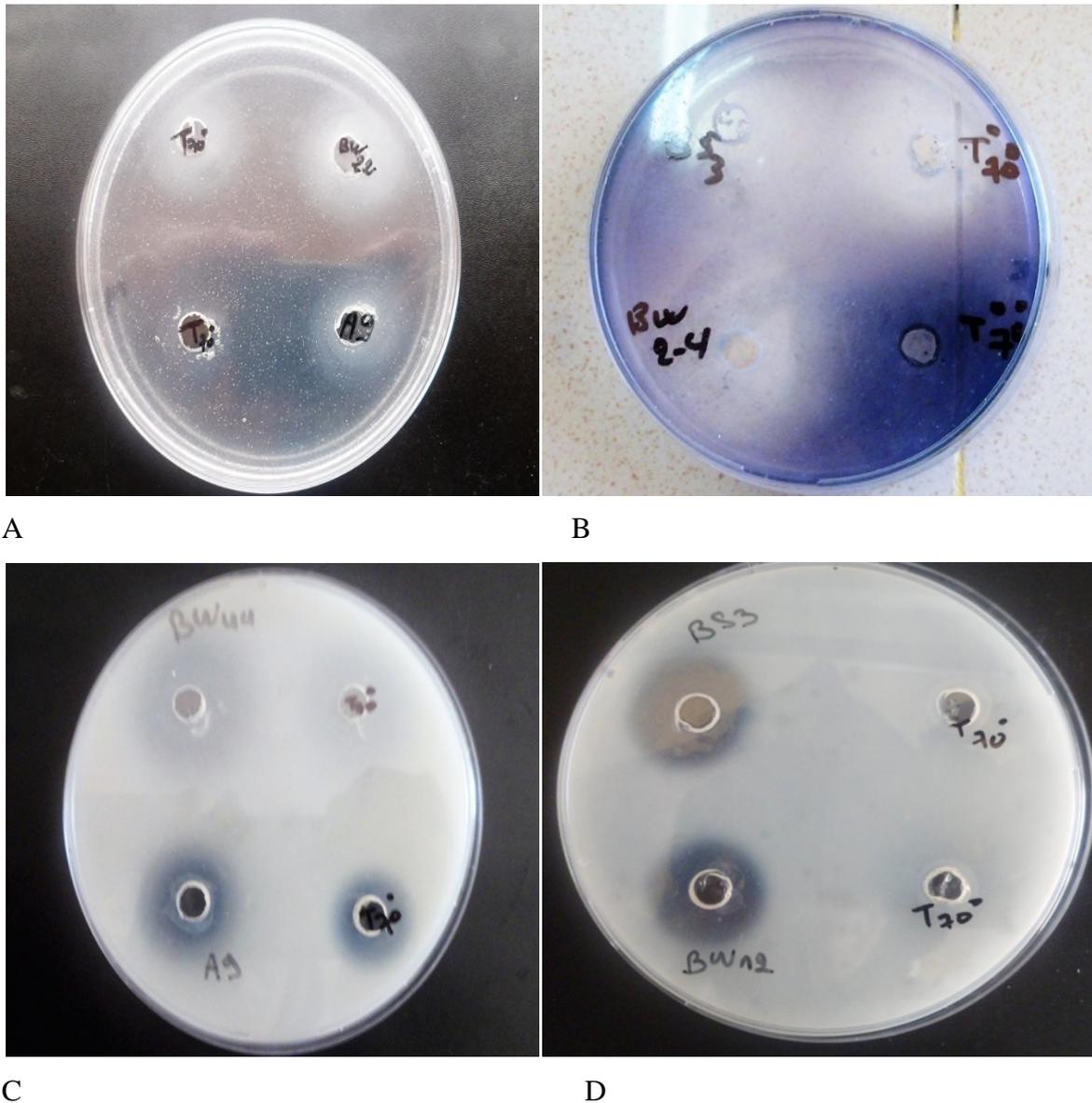


Figure 7 : Traitement thermique à 70°C des surnageants : A-dégradation de Tween 20, B-dégradation de l'amidon, C et D-dégradation de la gélatine.

Le traitement thermique à une température de 100°C concerne les surnageants qui présentent une activité à température 70°C. Aucune activité enzymatique n'est apparue après traitement des surnageants à une température de 100°C. Ces enzymes sont probablement dénaturées à cette température (Figure8).

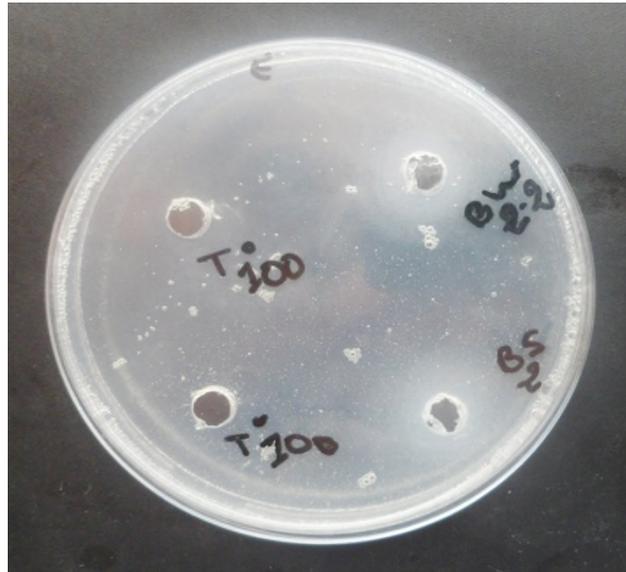


Figure 8: Traitement thermique à 100°C (activité estérase).

Tableau IV: Effet de la température sur l'activité enzymatique extracellulaire

Les enzymes	Les souches	T ⁺	D	Température 70°C	D	Température 100°C
Amylase	A9	+	0.7	-		
	BW2-4	+	1.4	-		
	BW1-2	+	1.2	+	0.9	-
	SH	+	0.4	-		
	BW1-2	+	0.8	-		
	BS3	+	1.2	+	1.1	-
	BW3-5	+	0.9	+	0.8	-
	BG2	+	1.6	+	0.7	
	BW1-1	+	1.4	-		
	BS7	+	0.8	-		
	BW4-4	+	1.2	-		
	A9	+	2	+	1.1	-
	AS	+	1.7	+	0.4	-
	SH	+	1.3	-		
	BS3	+	1.1	-		

Estérase	BS2	+	1	+	0.7	-
	BG2	+	0.5	-		
	BW2-2	+	1.4	+	0.9	-
	BW4-1	+	1.3	-		
	BS7	+	1.5	+	1	-
	BW4-4	+	1.7	-		
Gélatinase	A9	+	1.5	+	1	-
	BWI-2	+	0.7	-		
	SH	+	1.7	+	0.8	-
	BW1-2	+	1.1	+	0.9	-
	BS3	+	1.4	-		
	BW2-2	+	1.2	+	0.7	-
	BW4-1	+	0.6	-		
	BW3-5	+	1.3	-		
	BW4-4	+	2.5	+	2.4	-
Protéase du lait écrémé	A9	+	1.2	+	0.9	-
	AS	+	0.5	+	0.3	-
	BWI-2	+	1	-		
	BW1-2	+	1.1	-		
	BS3	+	1	-		
	BW1-1	+	0.75	+	0.3	-
Lipase	SH	+	1.1	-		
	BS3	+	1.3	-		
	BG2	+	0.9	-		
	BW1-1	+	1	-		

(+) : présence de zone d'hydrolyse.

(-) : absence de zone d'hydrolyse.

(T+) : témoin positif (non traite).

D : Diamètre d'hydrolyse en cm.

D= Diamètre de la zone d'hydrolyse – le diamètre du puits.

Diamètre du puits = 0.5 cm.

4. Effet de l'acétonitrile sur l'activité enzymatique

L'étude de la stabilité des enzymes en présence d'un solvant organique ce fait après 1 heure de contact des enzymes actifs avec le solvant organique (mélange de 25µl d'Acétonitrile avec 25µl des surnageants).

Les résultats montrent que les surnageants restent actifs en présence d'acétonitrile pour quelques souches, ce qui indique que ces enzymes sont stables et actives en présence de ce solvant organique (Figure 9).

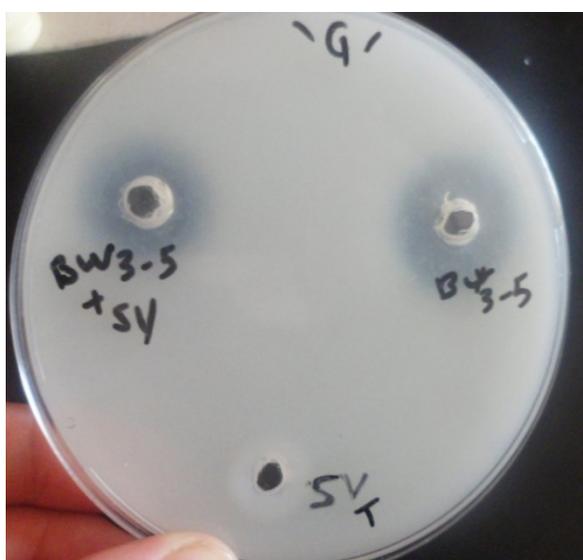


Figure 9 : Effet de l'acétonitrile sur la gélatinase

Tableau V: Effet de l'acétonitrile sur les activités enzymatiques extracellulaires

Les enzymes	Les souches	SN _T	D	SV _T	SN+SV	D
Amylase	A9	+	0.7	-	-	
	BW2-4	+	1.3	-	-	
	BW1-2	+	1.5	-	+	0.7
	SH	+	0.5	-	-	
	BW1-2	+	0.7	-	+	0.3

	BS3	+	1	-	-	
	BW3-5	+	1.5	-	-	
	BG2	+	1.3	-	-	
	BW1-1	+	0.6	-	-	
	BS7	+	1.3	-	-	
	BW4-4	+	1.9	-	-	
Estérase(T20)	A9	+	1.5	-	+	0.6
	AS	+	1.2	-	-	
	SH	+	0.8	-	-	
	BS3	+	1.1	-	-	
	BS2	+	0.6	-	-	
	BG2	+	1.5	-	-	
	BW2-2	+	1.4	-	-	
	BW4-1	+	1.2	-	-	
	BS7	+	2	-	-	
	BW4-4	+	1.5	-	-	
Gélatinase	A9	+	0.6	-	-	
	BWI-2	+	1.6	-	-	
	SH	+	1	-	-	
	BW1-2	+	1	-	+	0.6
	BS3	+	1.3	-	-	
	BW2-2	+	0.7	-	-	
	BW1-1	+	1.1	-	-	
	BW3-5	+	1.4	-	+	1.1
BW4-1	+	1.2	-	-		
Protéase du lait	A9	+	1.3	-	-	
	AS	+	0.6	-	-	
	BWI-2	+	1	-	-	

écrémé	BW1-2	+	1	-	+	0.7
	BS3	+	0.6	-	-	
	BW1-1	+	0.7	-	-	
Lipase (huile d'olive)	SH	+	1.1	-	-	
	BS3	+	1.4	-	-	
	BG2	+	0.8	-	+	0.3
	BW1-1	+	1.1	-	-	

SV : Solvant SN : Surnageant SN_T : Surnageant témoin SV_T : Solvant témoin

(+) : présence de zone d'hydrolyse. (-) : absence de zone d'hydrolyse.

D : Diamètre d'hydrolyse en cm.

D= (diamètre de la zone d'hydrolyse et le puits)- diamètre de puits.

Diamètre de puits=0.5 cm.

5. Discussion :

La démarche abordée dans ce travail consiste en un criblage des souches halophiles locales productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires isolées à partir de quelques environnements hypersalins.

Le criblage de l'activité enzymatique à été réalisé sur des milieux gélosés à 25% de NaCl contenant le substrat à hydrolyser. Après avoir revivifié les souches dans un milieu liquide, les surnageants sont récupérés et testés pour leur pouvoir hydrolytique. La stabilité des enzymes à été vérifiée par le traitement des surnageants à la température et à un solvant organique. Beaucoup d'activités enzymatiques d'archées halophiles ont été caractérisées, y compris des enzymes d'intérêt et d'application potentielle, telles que des amylases et des protéases. Beaucoup d'enzymes halophiles fonctionnent également aux températures élevées (Oren, 2010).

L'étude de production des enzymes hydrolytiques par 15 souches a montré que ces dernières possèdent un arsenal enzymatique versatile. Elles sont capables d'hydrolyser l'amidon, le lait écrémé, la gélatine, l'huile d'olive et le tween20. Les 15 souches utilisées dans cette étude sont productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Les activités hydrolytiques les plus abondantes sont celle de la dégradation de l'amidon. Une étude récente

basée sur l'isolement et le criblage d'enzymes extracellulaires produits par des archaea halophiles extrêmes à partir de sebkha algérien a conclu à la prédominance de l'activité amylolytique (**Kharroub et al., 2014**).

Parmi les souches étudiées, plusieurs possèdent des activités hydrolytiques combinées comme la souche BS3 par exemple possédant un pouvoir hydrolytique pour les cinq substrats, d'où son éventuelle importance biotechnologique. De nombreuses études réalisées sur des habitats hypersalins ont rapporté la présence de telles combinaisons chez les halophiles (**Moreno et al., 2007**).

L'activité amylolytique est présente chez 11 souches, après traitement thermique, 4 souches possèdent des amylases actives et thermostable à 70°C et aucune amylase n'est active à 100°C. De nombreuses études montrent que les amylases des halophiles sont souvent stables et restent actives à des températures au-dessus de 50°C (**Prakash et al., 2009**). L'amylase produite par la souche *Haloferax mediterranei* possède une activité maximale à une température allant de 50°C à 60°C, et retient 65% de son activité maximale à 80°C (**Pérez-Pomares et al., 2003**).

Parmi les 10 souches hydrolysant le tween 20, cinq d'entre elles possèdent des estérases actives à 70°C et aucune n'a pu résister à 100°C. Par contre, aucune des 4 souches hydrolysant l'huile d'olive n'a pas pu résister au-delà de 70°C.

L'isolement des lipases et des estérases sel-dépendantes et température-tolérantes de cinq souches d'archaea halophile, de différents environnements hypersalins en Turquie, a été rapporté. L'activité estérasique la plus élevée de ces souches a été obtenue à une température entre 60-65°C. L'activité lipase la plus élevée se situe dans l'intervalle entre 45-65°C (**Ozcan et al., 2009**).

En plus de l'activité lipolytique, 10 souches possèdent une activité protéolytique avec une préférence plus notable pour la dégradation de la gélatine. Les protéases de 6 souches maintiennent leur activité à 70°C et perdent leur activité à 100°C. Les protéases des microorganismes halophiles et halotolérants sont actifs en présence des concentrations élevées en sels et dans un large intervalle de température 30°C-80°C (**Mokashe et al., 2018**).

Les souches BWI-2, BG2, BW1-2, A9 et BW3-5 sont considérées comme productrices d'enzymes tolérantes et actives en présence du solvant organique. Plusieurs enzymes

halophiles tolérantes et résistantes en présence des solvants organiques sont rapportées. (Munawar *et al.*, 2013).

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail préliminaire était de faire un criblage des souches halophiles locales productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires d'intérêt biotechnologique, isolé à partir des environnements hypersalins.

La recherche des activités hydrolytiques extracellulaires a été effectuée sur cinq substrats-tests : l'amidon, la gélatine, le lait écrémé, le Tween 20 et l'huile d'olive. Toutes les souches ont la capacité d'hydrolyser au minimum un polymère.

L'hydrolyse de l'amidon, du tween 20 et de la gélatine semblent les activités les plus dominantes, et l'activité la plus faible est celle de l'hydrolyse de l'huile d'olive.

Certaines souches possèdent des activités combinées, telles que la souche BS3 qui présente des activités vis-à-vis de tous les substrats utilisés.

La caractérisation de la stabilité thermique d'une part, et la tolérance des enzymes envers l'acétonitrile d'autre part, sont réalisées sur les surnageants présentant une activité enzymatique. Certaines souches produisent des enzymes thermorésistantes actives à 70°C et en présence de l'acétonitrile, avec une différence de tolérance d'une souche à une autre.

D'après cette étude, nous pouvons conclure que les milieux extrêmes tels que les environnements salins et hyper salins, sont une source importante pour l'isolement et le criblage d'enzymes hydrolytiques. Les micro-organismes halophiles possèdent des enzymes stables qui fonctionnent à des concentrations en sels très élevées et dans des conditions extrêmes qui mènent à la dénaturation, l'aggrégation et la précipitation de la plupart des autres protéines. Cela fait de ces microorganismes ainsi que de leurs métabolites, de bons candidats pour leurs applications en biotechnologie. L'exploitation de ces derniers nécessite le développement de procédés de fermentation et d'extraction rentables et à faible coût, dans le but de substituer les produits chimiques synthétiques par les métabolites des halophiles.

Références
bibliographique

A

Amoozegar MA, Malekzadeh F., Malik K.A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Microbiol Methods* 52: 353-359.

Amoozegar M.A, Makhdoumi-Kakhki A, Mehrshad M et al. (2015). *Halovivax cerinus* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.65, 65–70.

Atanasova.N.S., Oksanen.H.M., and Bamford. D.H. (2015). Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 40–48.

B

Besse.A., Peduzzi.J., Rebuffat. S., and Carré-Mlouka, A. (2015). Antimicrobial peptides and proteins 557 in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie*, pp.344-355.

Besse.A. (2016). Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles These de Doctorat de microbiologie Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227.

C

Calegari-Santos.R., Diogo.R.A., Fontana.J.D. et al. (2016) Carotenoid Production by Halophilic Archaea Under Different Culture Conditions 72:641-651.

Christon J. Hurst C.J. (2016). Their World: A Diversity of Microbial Environments *Advances in Environmental Microbiology* Springer.

Castillo-Carvajal, L.C., Sanz-Martín, J.L., Barragán-Huerta, B.E. (2014). Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review *Environ Sci Pollut Res* 21: 9578-88.

D

DasSarma. P, Negi .V.D, Balakrishnan .A, Karan R., Barnes .S, Ekulona F., D. Chakravortty, S. DasSarma. (2014). Haloarchaeal gas vesicle nanoparticles displaying

Salmonella SopB antigen reduce bacterial burden when administered with live attenuated bacteria Vaccine, 32, pp. 4543-4549.

Dumorné K, Córdova DC, Astorga-Eló and M, Renganathan P. (2017). Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications, J. Microbiol. Biotechnol.(4), 649–659.

G

Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A.B., Martín-Cuadrado, A.-B., Mizuno, C.M., McMahon, K.D., Papke, R.T., Stepanauskas, R., Rodriguez-Brito, B., Rohwer, F., et al. (2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. Sci. Rep. 1, 135.

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.

Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J. & Ventosa, A. (2001). Order I. Halobacteriales. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 1, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, pp 294–334. Edited D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.

H

Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, Robb FT, and Stetter KO. (2011) Extremophiles handbook. Springer, Tokyo.

K

Kanlayakrit W, Ikeda T, Tojai S, Rodprapakorn M, Sirisansaneeyakul S. (2001) Isolation and characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* species. Kasetsart J 35:179–187

Karthikeyan, P., Bhat, S.G., and Chandrasekaran, M. (2013). Halocin SH10 production by an extreme 585 haloarchaeon Natrinema sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. Saudi J. Biol. Sci. 20, 586,205–212.

Kharroub, K., Gomri, M.A., Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., (2014). Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaea isolated from Algerian sabkhas. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8, 3992–4001.

Kim, S.J., and Hoppe, H.G. (1986). Microbial extracellular enzyme detection on agar plates by means of methylumbelliferyl-substrates. In: GERBAM Deuxième Colloque International de Bactériologie Marine, Actes de Colloque. REMER, Brest. 175-181.

Knoblauch C., Griep M, Friedrich C. (2014) Recent advances in the field of bionanotechnology: an insight into optoelectric bacteriorhodopsin, quantum dots, and noble metal nanoclusters. *Sensors* 14:19731–19766.

Kumar S, Grewal J, Sadaf A, Hemamalini R and , Khare SK. (2016) Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiol* 2:1–26.

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.

L

Lefebvre, O., and Moletta, R. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water Res.* 40, 3671–3682.

Litchfield, C.D. J Ind Microbiol Biotechnol. (2011). Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. 38: 1635-47.

Lynn J. Rothschild, Rocco L and Mancinelli. (2001). Life in extreme environments *NATURE*, VOL 409: :1092–1100.

M

Mokashe N., Chaudhari.B., Patil.U. (2018) Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International Journal of Biological Macromolecules* 117 : 493–522

Moreno M.L., Mellado E., Garcia M.T., Ventosa A. (2007). Diversity of extreme Halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats. *Halophiles-2007 booklet*: 59–60.

Munawar N and Engel PC, (2013). Halophilic Enzymes: Characteristics, Structural Adaptation and Potential Applications for Biocatalysis, *Current Biotechnology*, 2, 334-344.

Q

Ogan A, Danis O, Gozuacik A, Cakmar E, and Birbir M. (2012). Production of cellulase by immobilized whole cells of *Haloarcula*. *Appl Biochem Microbiol*.48(5):440–453.

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., Rodriguez-Valera, F. (2001).The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMSMicrobiol Ecol*1242, 1-8.

Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56-63.

Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*. 31, p. 825–834.

Oren, A. (2013). Life at high salt concentrations. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 421–440.

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

P

Pérez-Pomares F, Bautista V, Ferrer J, Pire C, Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ (2003) α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* 7:299–306.

Popescu G., Dumitru L. (2009). Biosorption of Some Heavy Metals from Media with High Salt Concentrations by Halophilic *Archaea*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 23 : 791-795.

Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant,

thermostable, and alkali-stable α -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 44: 210-215.

R

Rodriguez-valera.F., Ruiz-Berraquero.F et cormenzana.R.A., (1980),isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganicwith carbon sources. *Journal of general Microbiology*.119:535-538.

S

Schneegurt MA. (2012). Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and archaea. In: Vreeland RH, editor. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Dordrecht: Springer;35–58.

Schreck SD, Grunden AM (2014) Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1011–1021.

ShaoMin Y, Guang W (2013) Secretory pathway of cellulase: a mini-review. *Biotechnol Biofuels*.doi: 10.1186/1754-6834-6-177.

Shrestha, N., Chilkoor, G., Vemuri, B., Rathinam, N., Sani, R.K., Gadhamshetty, V., (2018). Extremophiles for microbial-electrochemistry applications: a critical review, *Bioresource Technology*.

Setati M.E. (2010). Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (11), pp. 1555-1560.

Sigurgísladóttir S., Konraosdóttir M., Jonsson A., Kristjansson J.K., Matthiasson E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. *15, 4: 361-366*.

Singh.A., Singh.A.K., (2017). Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential A.K. *Biotechnol Lett*. 39: 1793-1800.

Stan-Lotter.H, and Fendrihan.S, (2015), Halophilic Archaea: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. *5, 1487-1496*.

U

Uratani, J.M., Kumaraswamy, R., and Rodríguez, J. (2014). A systematic strain selection approach for halotolerant and halophilic bioprocess development: a review. *Extrem. Life Extreme Cond.* 18, 629–639.

V

Ventoza, A., Arahall, D.R., (1993). Microbial life in the Dead Sea. In: *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments* (ed. J. Seckbach), pp. 357-368. Kluwer Dordrecht.

Y

Yachai M. (2009). Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.

Z

Zhang, G., Li, S., Xue, Y. et al. (2012). Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10.16, pp 35–43.

Annexes

Annexe 1

1. Appareillage et réactifs

1.1. Appareillage

- ✓ Autoclave (PBI international)
- ✓ Bain- marie muni d'un agitateur rotatif (HMR-Lnv)
- ✓ Bain - marie
- ✓ Centrifuges (6000rpm(HETTICH,ZENTRIFUGEN.EBA20),14800rpm)
- ✓ Etuves (TORRE PICENARDCCR, CBM)
- ✓ Plaque chauffante et agitateur magnétique (TRADE RAYPA)
- ✓ Balance électronique
- ✓ Balance analytique de précision (Adventure TM)
- ✓ Vortex (VELP SCIENTIFICA)
- ✓ Micropipette (FORTUNA)
- ✓ PH mètre
- ✓ Spatule, anse de platine
- ✓ Appareille photo numérique (SAMSUNG)

1.2. Réactifs

- ✓ Acétonitile (30%)
- ✓ Lugol
- ✓ TCA (10%)
- ✓ TCA (35%)

2. Produits et solutions préparés

2.1. Produits :

- ✓ Amidon (1%)

- ✓ Lait écrémé (10ml)
- ✓ Tween 20(1%)
- ✓ L'huile d'olive (2.5ml)
- ✓ Gélatine (0.8g)

2.2. Solutions préparés :

Solution : TCA (10%)

- ✓ TCA (35%).....3ml
- ✓ L'eau distillée stérile.....7ml

Annexe 2

Les milieux de cultures

1-Milieu de culture liquide

Milieu Brown :

- ✓ Extrait de levure.....5g.
- ✓ NaCl..... 250g.
- ✓ KCl..... .2g.
- ✓ MgSO₄.....20g.
- ✓ Citrate tri-sodique.....3g.
- ✓ Eau distillée.....1000g.

2-Milieux de culture solides (g/l)

Milieu solide pour l'isolement et criblage de souches productrices des métabolites.

Milieu Brown :

- ✓ Extrait de levure.....5g.
- ✓ NaCl.....250g.
- ✓ KCl.....2g.
- ✓ MgSO₄.....20g.
- ✓ Citrate tri-sodique.....3g.
- ✓ Agar.....20g.
- ✓ Eau distillée.....1000g.

3-Milieux de culture solides additionnés pour la recherche des métabolites

3-1-Milieu pour la recherche de l'amylase :

M1

- ✓ Milieu Br.....100ml.
- ✓ Amidon.....1g.

3-2-Milieu pour la recherche de protéase :

M2

- ✓ Milieu Br.....100ml.
- ✓ Lait écrémé stérile.....10ml.

N.B. La stérilisation du milieu se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation, la préparation est mise en mélange stérilement.

3-3-Milieu pour la recherche de lipase et d'estérase :

M3

- ✓ Milieu Br.....100l.
- ✓ L'huile d'olive.....2,5ml.

M4

- ✓ Milieu Br.....100ml.
- ✓ Tween 20.....1ml.

3-4-Milieu pour la recherche de gélatinase :

M5

- ✓ Milieu Br.....100ml.
- ✓ Gélatine.....0,8g.

Résumé

Les microorganismes halophiles présentent une microflore particulière ou ils peuvent s'adapter à vivre dans des conditions extrêmes. Ces germes présentent une source de biomolécules intéressantes pour divers applications biotechnologique, parmi ces biomolécules on trouve les enzymes. Notre étude basée sur un criblage de souches d'archées halophiles locales pour la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaire. Nous avons sélectionnés quinze souches pour la mise en évidence d'activités enzymatiques, amylasique, protéasique, gélatinasique, lipasique et estérasique. D'après les résultats obtenus toutes les souches sont productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires qui sont parfois stables à des températures élevées ainsi qu'en présence de solvants organiques, ces résultats sont confirmés d'après une étude de leurs stabilités thermiques et en présence d'un solvant organique. Ces propriétés rendent les enzymes halophiles souhaitables dans plusieurs applications biotechnologiques.

Mots clés : haloarchaea, criblage, production, biomolécules, intérêt biotechnologique.

Abstract

The halophilic microorganisms have a particular microflora wich can adapt to live in extreme conditions. These microorganisms have a source of interesting biomolecules for various biotechnological applications, among these biomolecules there are enzymes. Our study is based on a screening of local halophilic archaeal strains for the production of extracellular hydrolytic enzymes. Fifteen strains that we are selected for the demonstration of enzymatic activities, amylase, protease, gelatinase, lipase and esterase. According to the results obtained, all the strains produce extracellular hydrolytic enzymes which are stable at high temperatures and in the presence of organic solvents, these results are confirmed from a study of their thermal stabilités and in the presence of an organic solvent. These properties make halophilic enzymes desirable in several biotechnological applications.

Key words: haloarchaea, screening, production, biomolecules, biotechnological interest.