

## MATERIEL ET METHODES

Le présent travail a été réalisé durant la période de Février à Octobre 2013 au niveau de deux laboratoires : laboratoire de contrôle de qualité et d'emballages (CACQE) de la wilaya de Jijel. ALGERIE, et le laboratoire de recherche en Biotechnologie et Valorisation des Bio-Géo Ressources (LBVVG), Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet, Université de Manouba .TUNISIE.

### I. DESCRIPTION GÉOCLIMATIQUE DU SITE D'ÉTUDE

#### I.1. Site d'étude

Chott El Beïdha - Hammam Essoukhna est un lac salé saisonnier avec une prairie permanente couverte par une végétation halophyte qui se trouve en Algérie entre la wilaya de Sétif et la wilaya de Batna, localisé à Latitude 35°35'Nord Longitude 5°48'Est, classé comme site « Ramsar » depuis le 12 décembre 2004. La zone fait partie du domaine public de l'état Algérien, elle est contrôlée par trois ministères : le Ministère de l'agriculture et le développement rural, des ressources en eau et de l'aménagement du territoire et de l'environnement (Barkat et *al.*, 2004).

#### I.2. Relief, hydrographie

Le relief du chott est plat à l'exception de la partie nord où il est en forme de dunes. Le bassin versant de la zone reçoit un débit moyen annuel de 16 millions de m<sup>3</sup>, le site s'inonde avec la forte pluie si le niveau d'eau atteint les 1,5 m de profondeur, et se dessèche en été à partir de juin, et en consonance du dessèchement on peut voir toute la zone dans une couleur blanche remplie de sel, figure 9. Le pH est basique et varie autour de 8,5 (Bechtel, 1975).



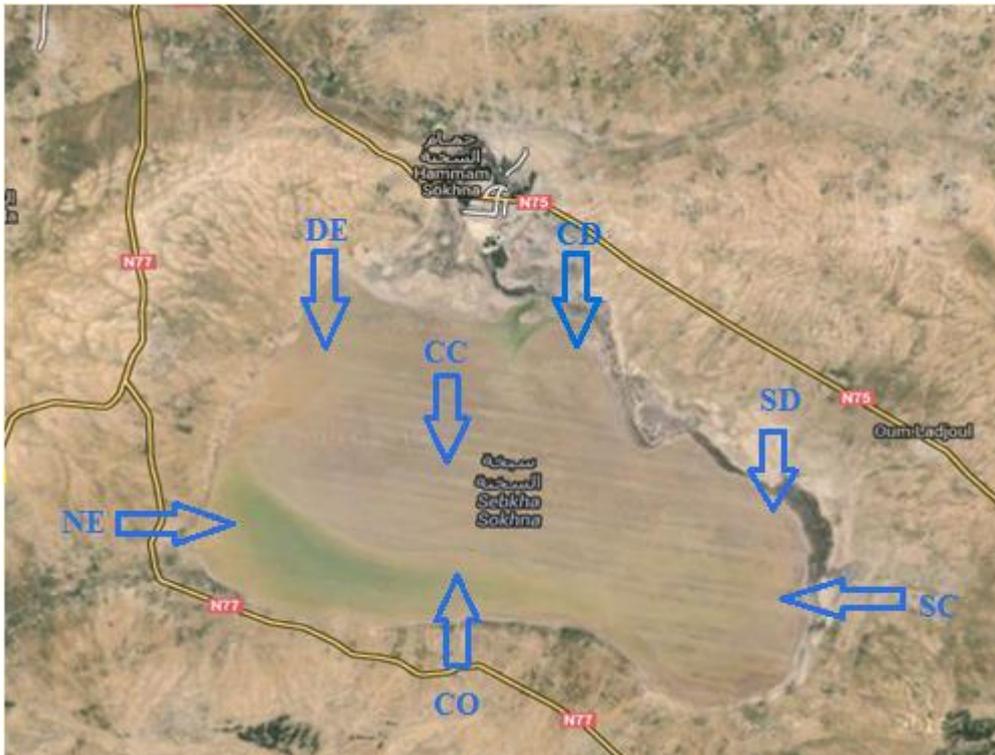
**Figure 9.** Photos du lac salé Chott El Beidha Hammam Essoukhna Sétif, ALGERIE.

### **I.3. Climat**

Le climat est de type semi-aride froid avec une pluviométrie moyenne annuelle de 304 mm qui varie entre 300 et 350 mm, le tiers tombe en hiver et au printemps avec respectivement 81,4 mm et 108,8 mm, en automne il tombe 93,4 mm et en été 20,20 mm. La pluviométrie calculée sur une plus longue période est de 427 mm. La Température minimale moyenne annuelle est de 8,6°C, la température minimale moyenne de décembre, le mois le plus froid, est de -0,6°C et celle minimale moyenne de Juillet, mois le plus chaud, est de 19,3°C. La température maximale moyenne annuelle est de 21,4°C, les valeurs extrêmes sont 8,9°C en décembre et 36,3°C en Juillet et la Température moyenne annuelle est de 15,0°C. L'humidité relative moyenne annuelle est de 62,74 %, le nombre de jours de neige est de 19 jours /an et il gèle en moyenne presque 2 mois par an (Barkat et *al.*, 2004).

## **II. ÉCHANTILLONNAGE**

Les échantillons d'eau sur lesquels nous avons travaillé proviennent des marais salants de la Sebkhah (Chott el Beidha), l'échantillonnage a été effectué en sept stations différentes réparties comme suit : NE, DE, CD, CC, CO, SD et SC. Le choix des stations n'est pas arbitraire et commence de la partie nord vers la partie sud de la Sebkhah, figure 10.



**Figure 10.** Positionnements sur la carte des sites de prélèvement des échantillons d'eau de Chott El Beidha. Google map, 2014.

## II. 1. Analyse physico-chimique des échantillons

Les échantillons d'eau prélevés ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques : les mesures du pH sont réalisées avec un pH mètre « DENVER », la température d'eau est mesurée à l'aide d'un thermomètre digital.

Les concentrations en ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  sont analysées dans le laboratoire de chimie de la Faculté des Sciences Exactes de l'Université de Jijel à l'aide d'un photomètre de flamme « JENWAY. ».

Les concentrations en ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  sont analysées par les méthodes colorimétriques et complexométriques avec EDTA, dans la société « AFRICAVER » de Taher.

Les concentrations en ions  $\text{Cl}^-$  sont calculées par la méthode de Mohr, au laboratoire de biologie de l'Université de Jijel.

## II.2. Analyse microbiologique des échantillons (dénombrement de la flore totale et flore pathogène)

### II. 2. 1. Dénombrement des germes totaux (ou flore totale aérobie mésophile : F. T. A. M)

Le dénombrement des germes totaux concerne surtout les bactéries aérobies mésophiles revivifiables après 72 heures d'incubation à 30°C. Ce dénombrement permet d'apprécier la pollution microbienne de l'eau.

1 ml d'eau ou de ses dilutions est ensemencé dans la masse du milieu gélosé de numération gélose nutritive GN. Les colonies formées sont comptées après 48 à 72 heures d'incubation à 30°C.

### II.2.2. Colimétrie

Les coliformes sont des entérobactéries (bacilles Gram-, asporulés, glucose+, oxydase, nitrate réductase+, aérobie-anaérobie facultatifs) qui fermentent le lactose avec production de gaz à 30°C.

Le dénombrement des coliformes totaux est encore considéré comme un indice de contamination fécale.

La numération des coliformes est réalisée par ensemencement de :

- Trois tubes de milieu BCPL concentré par 10 ml d'eau chacun.
- Trois tubes de milieu BCPL simple par 1 ml d'eau chacun.
- Trois tubes de milieu BCPL simple par 0.1 ml d'eau chacun.

L'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures. Les tubes présentant une couleur jaune et des gaz dans la cloche (au moins 1/10 du volume de la cloche) sont considérés comme contenant au moins un coliforme présumé.

Les coliformes fécaux (ou thermotolérants) sont souvent associés à des entérobactéries pathogènes comme *Salmonella* et *Shigella*. La numération des coliformes fécaux (ou *E. coli* présumés) est effectuée par le test de Schubert, ce test utilise la propriété de *E. coli* de fermenter le lactose et de produire l'indole à 44°C. Une öse d'un tube positif est inoculée dans un tube du milieu Schubert avec cloche, et une autre dans un tube d'eau peptonée. Si après incubation à 44°C pendant 24 heures il y a production de gaz (Schubert) et d'indole (mis en

évidence par addition de réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée) on peut soupçonner la présence d'*E. coli*.

### II.2.3. dénombrement des Streptocoques fécaux

Les streptocoques du groupe D ou streptocoques fécaux font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux. Ces germes résistent mieux que les coliformes et *E. coli* à des conditions de milieu défavorables.

La numération des streptocoques fécaux en milieu liquide comprend deux temps :

#### ➤ 1<sup>er</sup> temps (enrichissement ou présomptif)

Ce test est effectué par ensemencement d'un milieu de Rothe. Ce milieu contient l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), qui inhibe la plupart des microorganismes (inhibiteur des phénomènes respiratoires). Ce milieu est peu favorable à la croissance des streptocoques fécaux et la plupart des autres bactéries ne s'y cultivent pas.

On ensemence :

- 5 tubes de Rothe concentré avec 10 ml de l'eau ;
- 2 tubes de Rothe simple avec 1 ml de l'eau ;
- 1 tube de Rothe simple avec 0.1 ml de l'eau.

Après incubation 24 heures (ou 48 h) à 37°C, on considère comme positif tout tube présentant un louche bactérien. Ces tubes sont soumis au test confirmatif.

#### ➤ 2<sup>e</sup> temps (confirmatif)

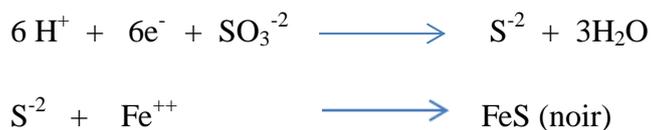
On reporte une ose de contenu de chacun des tubes de Rothe positifs (louche microbien) dans un tube de milieu de Litsky. Ce milieu est plus sélectif que le milieu de Rothe, les germes adaptés à l'effet inhibiteur de l'azide étant ensuite à même de s'adapter à la présence d'éthyl violet.

Les tubes présentant, après incubation 24 à 48 heures à 37°C, un trouble homogène et une pastille violette (non constante) au fond contiennent au moins un streptocoque fécal.

#### II. 2. 4. Recherche et dénombrement des spores des anaérobies sulfitoréducteurs

Ces bactéries anaérobies sulfitoréductrices sont des hôtes normales de l'intestin de l'homme et des animaux, mais on les rencontre fréquemment dans la nature et en particulier dans le sol et dans les matières organiques en cours de putréfaction.

Ce dénombrement est réalisé en anaérobiose (en tube) et repose sur l'appréciation de la réduction du sulfite en H<sub>2</sub>S dont la mise en évidence est obtenue par l'addition au milieu de sels de fer. La réaction est la suivante :



La numération des sulfitoréducteurs se fait après traitement à 80°C pendant 10 minutes pour éliminer les formes végétatives, puis on refroidit rapidement à l'eau froide. Le milieu utilisé viande-foie est régénéré au bain marie puis on ajoute à chaque tube 1ml de sulfite de sodium et 4 gouttes d'alun de fer et on mélange sans faire de bulles.

On introduit dans 5 tubes le volume nécessaire de l'eau (5 ml) et on porte au bain marie à 80°C pendant 10 minutes. On verse le contenu du milieu dans chaque tube, on mélange doucement puis on incube à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Les colonies des bactéries sulfitoréductrices sont nettement noires.

#### II. 2. 5. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

La numération est effectuée sur le milieu de Chapman. Ce milieu n'est sélectif que des germes aérobies halophiles. Ainsi de nombreuses espèces de *Bacillus* peuvent être cultivées.

Le milieu est ensemencé en surface par 0.1 ml d'eau. La boîte est incubée 24 heures à 37°C. Les colonies de *Staphylococcus aureus* sont rondes, régulières, bombées, opaques et pigmentées en jaune-doré; elles sont entourées d'un halo jaune correspondant à une acidification à partir du mannitol.

L'identification de *Staphylococcus aureus* (coque Gram +, groupé en amas, catalase +, glucose +, halophile) repose surtout sur la recherche de l'activité coagulase et ADNase (thermonucléase).

### III. ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ BACTÉRIENNE PAR LES MÉTHODES CULTURALES

#### III. 1. Enrichissement et isolement de la flore halophile et halotolérante

L'isolement des microorganismes halophiles et halotolérants est fait selon la technique de (Montalvo- Rodriguez et *al.*, 1998 ; Elevi et *al.*, 2004), presque 500 ml d'eau de sebkha de chaque échantillons sont filtré aseptiquement sur des membranes filtrantes de 0.2  $\mu\text{m}$ , figure 11.



**Figure 11.** Dispositif de filtration sur membrane.

Après la filtration, les filtres sont placés dans un flacon qui contient 20 ml d'un milieu d'enrichissement contenant 1 g d'extrait de levure et 1 g de casaaminoacides. Pour chaque station il y a un milieu d'enrichissement. A partir de chaque milieu d'enrichissement on fait un ensemencement en masse (on met 1ml de la solution d'enrichissement dans une boîte de pétri et on inonde la boîte avec le milieu gélosé qui correspond à la station approprié. L'ensemencement en masse est réalisé sur quatre milieux de culture : gélose nutritive, milieu naturel de sebkha et les deux milieux conventionnels.

Les milieux de cultures utilisées durant cette étude sont :

**a. Milieux naturelles de sebkha**

Contenant : 01 litre d'eau de sebkha comme diluant ,7.5 g/l de casa aminoacides, 10 g/l d'extrait de levure. Les milieux de cultures solides sont obtenus par addition de 20 g/l d'agar bactériologique .Un milieu de culture est préparé pour chaque station.

**b. Milieu conventionnel I**

Ce milieu de culture contient en (g/l) : NaCl, 250 g; MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 13 g; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 20 g; KCl, 4 g; CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, 1 g; NaBr, 0.5 g; NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 g; extrait de levure, 5 g; Tryptone, 8 g; Glucose 1g. Les milieux de cultures solides sont obtenus par addition de 20 g/l d'agar bactériologique, Le pH est ajusté à 7.2 avant l'autoclavage du milieu (Hedi et *al.*, 2009).

**c. Milieu conventionnel II**

Le milieu conventionnel II contient en (g/l) : NaCl, 150 g; MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 13 g; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 4.5 g; KCl, 4 g; CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 1 g; NaBr, 0.5 g; NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 g; extrait de levure, 5 g; Tryptone, 8 g; Glucose 1 g. Les milieux de cultures solides sont obtenus par addition de 20 g/l d'agar bactériologique, Le pH est ajusté à 7.2 avant l'autoclavage du milieu.

**d. Milieu gélose nutritive**

Le milieu gélose nutritive est utilisé pour le dénombrement de la flore totale aérobie mésophiles (FTAM), et surtout pour le classement des bactéries (test de salinité).

Le milieu conventionnel II est préparé après le résultat des analyses physicochimiques des eaux de la sebkha : la composition du milieu conventionnel II est similaire au milieu conventionnel I sauf pour la quantité du chlorure, du magnésium et du chlorure de sodium.

Ensuite les boites de pétri sont incubées à 37°C jusqu'à apparition des colonies. Les colonies à différents aspect macroscopiques sont sélectionnées, purifiées par repiquages successif sur le même milieu d'isolement. Elles sont ensuite conservées à 4°C sur des tubes contenant une gélose inclinée du même milieu qui a servi pour l'isolement.

## **III. 2. Caractérisation des isolats**

### **III. 2. 1. Étude morphologique des isolats**

La morphologie des colonies (pigmentation, diamètre, aspect, etc.) est déterminée sur milieu solide. La morphologie et l'arrangement cellulaire sont déterminés par la coloration de Gram modifiée par Dussault (1955) par application, après fixation, d'une solution d'acétate à 2% (v/v) pendant 5 minutes. L'observation est effectuée à l'immersion à l'aide d'un microscope photonique (Olympus).

### **III.2. 2. Mise en évidence des enzymes respiratoires des isolats**

#### **III.2. 2. 1. Cytochrome-oxydase**

La recherche de la cytochrome-oxydase est effectuée à l'aide de disques « Ox » dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N, N-diméthyl-1,4-énylènediamine-dichlorure. Une partie de la colonie est prélevée à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur et dissociée sur le papier filtre imbibé d'eau distillée. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Gerhardt et *al.*, 1994).

#### **III.2. 2. 2. Catalase**

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (Gerhardt et *al.*, 1994).

Sur la base de l'étude morphologique des isolats (coloration de Gram, pigmentation des colonies, enzymes respiratoires, nous avons sélectionné 26 souches pour la suite du travail).

## **III. 3. Tolérance des souches à différentes concentrations de sels**

Les isolats ont été ensemencés dans la gélose nutritive additionnée de 0.5 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % et 30 % de NaCl et incubés à 30°C pendant 24 h, 48 h et 72 h.

La gélose nutritive ordinaire contient 0.5 % de chlorure de sodium.

### III. 4. Étude du polymorphisme génétique et séquençages du gène codant pour la sous unité ribosomale 16S des isolats

#### III. 4. 1. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique est faite directement à partir des colonies bactériennes par la technique du Choc Thermique « boiling lysis », pour un total de 24 souches. Le protocole d'extraction est (Guesmi et *al.*, 2013) :

- On met 200 µl de la solution TE (Tris-EDTA), dans chaque tube eppendorf stérile et on prend avec l'anse de platine une quantité suffisante des différentes colonies. Chaque souche est diluée séparément dans la solution TE, ensuite on agite chaque tube à l'aide d'un vortex.
- Directement, on transfère les tubes eppendorf vortexés dans un bain marie bouillant pendant 8 minutes.
- Immédiatement les tubes eppendorf sont tirés du bain marie bouillant et plongés dans un bain de glace pendant 5 minutes.
- On fait une centrifugation 12000 rpm pendant 10 minutes.
- Transférer le surnageant de chaque tube dans un autre tube eppendorf stérile.
- On conserve à -20°C.

La nomenclature des souches qui ont fait l'objet d'une extraction d'ADN génomique est la suivante :

CD15- CO8- SC3- SD47- SD36- SD40a- DE22- CD5- SD7<sub>2</sub>- SD49a- CD26- DE14- CD18- SD24- SD7<sub>1</sub>- SC12- CO8a- SD40b- SD40c- SD40d- SD35- CD2- SD7b- SD7a.

#### III. 4. 2. Amplification du gène codant pour la sous unité 16S et les ITS (Internal Transcribed Spacer)

L'amplification du gène codant pour la sous unité 16S et les ITS est pratiquée dans le but d'une identification moléculaire des 24 Souches isolées à partir de l'environnement salé « Chott el Beidha ».

L'amplification des ITS permet de distinguer les différents haplotypes au sein du groupe de 24 souches (Guesmi et *al.*, 2013).

### • Réaction PCR

- Pour l'amplification de l'ensemble du gène codant pour la sous unité ribosomale 16S, un couple d'amorce universelle est utilisé : S-D-Bact-0008-a-S-20(5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'), et S-D-Bact-1495-a-S (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (Guesmi et *al.*, 2013).

- Beaucoup plus utilisés que le 23S rDNA, les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (Internally Transcribed Spacer ou ITS) sont des séquences très variables en taille et en composition dans l'opéron des trois ARNr (16S, 23S, 5S). (Huybens et *al.*, 2009).

- Pour l'amplification de l'espace intergénique ITS (16S-23S), le couple d'amorce universelle utilisé est le suivant :

S-D-Bact-1494-a-20 (5'-GTC GTA ACA AGG TAG-CCG TA-3') et L-D-Bact-0035-a-15 (5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3') (Guesmi et *al.*, 2013).

La réaction d'amplification est réalisée dans le mélange réactionnel préparé comme suit (tableau 5).

**Tableau 5.** Mélange réactionnel pour l'amplification des ITS.

Mélange réactionnel	Volume par réaction
Eau bidistillée stérile QSP 25 µL	17.6 µl
Tampon réactionnel	2.5 µl
dNTP Mix (25 mM)	0.2 µl
MgCL <sub>2</sub>	2.5 µl
Amorce forward (25 mM)	0.5 µl
Amorce reverse (25 mM)	0.5 µl
Taq DNA Polymerase	0.2 µl
ADN	1 µl

- Pour chaque tube réactionnel, 1 µL d'ADN est ajouté au mélange réactionnel pour avoir un volume réactionnel final de 25 µL.

- Les produits PCR sont conservés à -20°C et un contrôle sur mini gel d'agarose à 1.5 % et 2 % est effectué, respectivement pour les gènes ITS permettant de vérifier la réaction PCR par la visualisation des fragments amplifiés.

- L'ordre de dépôt dans les deux gels d'agarose 2% lors de la vérification de l'amplification des ITS est le suivant : le gel n° 1 : SD40c- SD35- CO8- CD26- SD24- CD15- SD72- SD40a- SD47- SC12- SC3- SD36- SD49a- CD5- DE22-Témoin négatif-Marqueur de taille.

Le gel n° 2 : SD71- SC7a- SD40d- DE14- CD18- CD8- SD40b- SC7b- CD2- CD18- SD40a- Témoin négatif.

- En chargeant les échantillons dans les puits il ne faut pas oublier de déposer dans un puits un témoin négatif plus un marqueur de taille 100 pb qui permet de positionner et quantifier les différentes bandes dans le gel : Le témoin négatif doit obligatoirement donner un résultat négatif après la révélation.

### III. 4. 3. Séquençage et analyse phylogénétique des séquences de l'ARNr 16S

Le séquençage dans un seul sens a été effectué selon la méthode de Sanger. Le séquençage automatique des réactions de séquence du gène ARNr 16S est effectué avec les Biosystèmes ABI 3130. Les séquences obtenues sont déposées dans la banque de données « GenBank » et ainsi comparées avec celles disponibles dans le centre national de l'information biotechnologique : National centre for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant l'outil de base de recherche de l'alignement multiples : l'algorithme (BLAST). L'alignement des séquences est exécuté en utilisant le logiciel Clustel W. Le cladogramme phylogénétique est construit suivant la méthode (Neighbor-joining), qui est couramment utilisée en microbiologie.

Cette dernière est une méthode de distance : elle est basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences "voisines" qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. C'est une méthode relativement rapide, qui génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats pour des séquences proches. Cependant elle n'est pas utilisable pour des séquences très éloignées, et elle traite toutes les substitutions de manière équivalente ce qui induit une perte d'informations (Kitouni, 2007).

Seules les souches qui présentent des haplotypes distincts feront l'objet d'une identification moléculaire par le gène 16S : c'est-à-dire que nous devons attendre les résultats de l'amplification des ITS pour procéder à la prochaine étape, ceci est très important du point de vue économique et gain de temps.

#### **IV. ESSAI D'ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ MICROBIENNE PAR LES TECHNIQUES MOLÉCULAIRES**

##### **IV. 1. Extraction d'ADN génomique à partir des échantillons d'eaux**

Une technique d'extraction de l'ADN génomique des bactéries présentes sur les filtres a été adaptée à partir du protocole de Tsai et Olson (1991). Les cellules bactériennes sont ensuite soumises à une série de trois chocs thermiques en présence de SDS (concentration finale de 10 %). Après avoir éliminé le SDS, les acides nucléiques sont purifiés par une extraction phénol/chloroforme. L'enchaînement des étapes d'extraction d'ADN est le suivant :

##### **• Lyse cellulaire**

Après la filtration des échantillons d'eaux de sebkha sur le dispositif de filtration sur membrane selon la même technique citée en haut (Environ 250 ml d'eau de sebkha de chaque échantillon sont filtrées séparément). Les filtres sont tout d'abord découpés en petits fragments dans des conditions stériles puis incubés dans un tube eppendorf contenant 1.8 ml d'une solution de lyse stérile. La solution de lyse contient (EDTA 40 Mm, Tris HCL PH8 50 Mm, saccharose 0.75 M).

##### **• Lyse enzymatique**

- L'ajout de 90 µl de lysozyme (concentration finale 1%) et l'incubation pendant 30 minutes à 37°C.
- L'ajout de 210 µl de SDS10 % (concentration final 10 %) et 53 µl de la protéinase K (concentration finale 0.5 mg/ml) et l'incubation à 55°C pendant 02 heures.
- On transfère les produits de lyse, en les divisant sur deux tubes eppendorf stériles, et on lave le filtre qui reste dans le premier tube eppendorf avec 1ml de la solution de lyse décrite ci-dessus et on incube à 55°C pendant 15 minutes.

**• Purification de l'ADN**

- L'extraction des trois fractions de lyse avec 01 volume de phénol : chloroforme : alcool isoamilique (25 :24 :1), et on fait une centrifugation à 13000 g pendant 5 minutes, on recueille le surnageant et on le transfère dans un autre tube eppendorf stérile.
- Une deuxième extraction de la phase aqueuse avec un volume de chloroforme : alcool isoamilique (24 :1).
- Centrifugation à 13000 g pendant 5 minutes, ensuite on transfère le surnageant sur un autre tube eppendorf stérile.

**• Précipitation et réhydratation de l'ADN**

- L'ADN est précipité avec un volume d'isopropanol à température ambiante pendant 1 heure ; pour augmenter le rendement de la précipitation il est possible de laisser le tube eppendorf toute la nuit à -20°C.
- Centrifugation à 13000 g pendant 25 minutes et on élimine délicatement le surnageant à l'aide d'une micropipette.
- Lavage du culot avec de l'éthanol 70% (environ 600 µl), tout en mélangeant délicatement en inversant le tube pour laver le culot d'ADN.
- Suspendre l'ADN dans un volume de la solution TE (Tris-EDTA) : voir annexe, comprise entre 50- 100 µl selon la concentration d'ADN prévue.
- L'ADN est placé à +4°C jusqu'au lendemain pour permettre la dissolution totale de l'ADN.
- A la fin de l'extraction, on vérifie la pureté de l'ADN extrait en effectuant une électrophorèse sur un mini gel à 0.8% d'agarose. Ce dernier permet d'apprécier la quantité et la qualité de l'ADN et de confirmer l'absence d'ARN. Ainsi, 3 µL de l'ADN à tester additionnés de 1 µL de tampon de charge sont chargés et laissés migrer dans un gel d'électrophorèse à 100 V pendant 30 min. Les bandes obtenues donnent une idée sur la qualité et la quantité de l'ADN extrait.

Le gel d'agarose est préparé dans un tampon qui, est le TBE (Tris Borate EDTA voir annexe) 0.5 X, en chauffant aux micro-ondes jusqu'à ébullition ; il faut que l'agarose soit complètement dissout, on laisse refroidir jusqu'à environ 55°C (point de fusion de l'agarose).

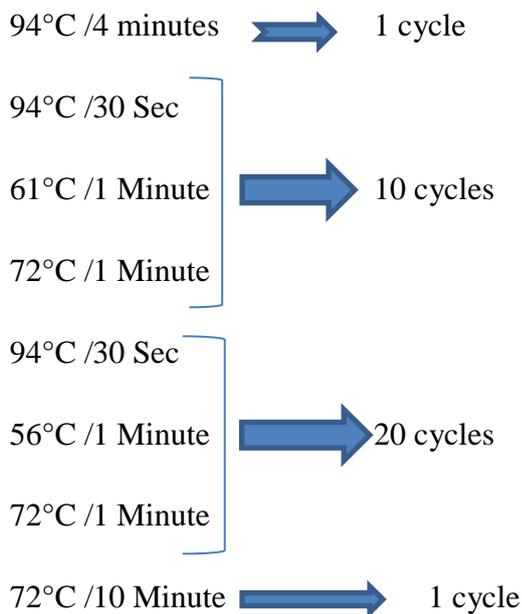


**Tableau 6.** Préparation du mélange réactionnel pour la PCR-DGGE.

Mélange réactionnel	Volume par Réaction
Tampon réactionnel	2.5µL
Eau bidistillée stérile QSP 25µl	17.7
DNTP mix	0.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
Amorce forward	0.3 µl
Amorce reverse	0.3 µl
Taq DNA polymerase	0.2 µl
ADN	1 µl

- Les réactions d'amplification ont été faites en utilisant le thermocycleur « BOECO »

Selon le schéma suivant :



A la fin de l'extraction, on vérifie la présence de l'ADN amplifié en effectuant une électrophorèse sur un mini gel à 1.5- 2% d'agarose. Ce dernier permet d'apprécier la quantité et la qualité de l'ADN. Ainsi, 3 µL de l'ADN amplifié à tester additionnés de 1 µL de tampon de charge sont chargés. On laisse migrer dans un gel d'électrophorèse à 100V pendant 30 min. Les bandes obtenues donnent une idée sur la qualité et la quantité de l'ADN extrait.

## V. RECHERCHE D'ACTIVITÉS ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES DES ISOLATS

24 isolats de Chott el Beidha ont fait l'objet d'un screening de deux activités enzymatiques (amylase et estérases). Les souches qui n'ont fait l'objet d'aucune application biotechnologique sont BO1 et BO2.

### V. 1. Détermination de l'activité amylolytique

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon en dextrines et progressivement en petits polymères composés d'unités de glucose (Chena *et al.*, 2005).

Pour rechercher l'activité amylolytique on a préparé un milieu de base qui contient l'amidon soluble 1% (p/v) selon la méthode décrite par Amoozegar *et al.* (2003). La composition chimique du milieu de base est : extrait de levure 0.05 g, peptone 0.5 g, amidon soluble 1g/50 ml, eau distillé 450 ml, agar 10 g. Après incubation, les colonies sont inondées avec une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon virent au brun.

### V. 2. Détermination de l'activité Estérases

L'activité estérase est testée sur un milieu de culture additionné de tween (80 ou 20) (Gonzalez *et al.*, 1978). La composition du milieu est la suivante :  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g, KCl 4 g,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  0.1 g, NaCl 50 g, tween (80 ou 20) 01 ml, extrait de levure 1 g, agar 15 g, eau distillé 1000 ml. Le pH est ajusté à 7.5. L'ensemencement des souches est effectué par des touches. Après incubation, le développement d'un précipité autour des touches témoigne de la présence d'une activité estérase.