

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche  
Université Ziane Achour – Djelfa  
Faculté des sciences de la nature et de la vie



**Projet Fin d'étude**

**En vue de l'obtention du Diplôme de Master en  
sciences biologiques**

*Spécialité: Sciences Biologiques*

*Option: Microbiologie Appliquée*

**Intitulé**

---

**Criblage d'activités hydrolases chez des bactéries  
halophiles**

---



**Présentée par:**

**BEN KHECHIBA ZAKARIA**

**HOMIDA SIHAM**

**TOUATI ZAHRA**

**Membres de Jury:**

<i>Président:</i>	M Belmahdi Mohamed	MCB	Université Djelfa
<i>Examinatrice:</i>	M <sup>elle</sup> Khrissat Najoua	MAA	Université Djelfa
<i>Promoteur:</i>	Pr /Boutaiba Saad	PROF	Université Djelfa
<i>Co-promoteur:</i>	M Beladel Ahmed	MCA	Université Djelfa

*Année Universitaire*

**2021/2022**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## Remerciements

*Avant toute chose, je remercie ALLAH, le tout puissant qui m'a donné, la foi, la patience et la santé durant toutes mes études et surtout en accomplissant ce modeste travail.*

*On tient à remercier profondément notre promoteur Pr Boutaiba saad et notre Co-Promoteur Mr Beladel pour nous avoir encadrées, pour leurs aide, leurs conseils, sa patiences et sa disponibilités durant notre préparation de ce mémoire.*

*On tient à remercier chaleureusement les membres du jury : Mr Belmahdi et Melle Khrissat pour accepter l'examination de notre travail.*

*On tient à remercier Mr GASSAB le chef des laboratoires de département de biologie et chaleureusement Mr Ben homida Aissa sans oublier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur patience, leur aide et leurs conseils pleins de sens.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# *Dédicaces*

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail*

*Mes très chers parents*

*En reconnaissance de tous les sacrifices, les efforts, l'amour et la bonté qui mon toujours apportée, qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection, mon admiration et mon profond respect. Que Dieu vous garde pour moi.*

*A mes frères et mes sœurs et toute la famille **BENKHECHIBA***

*Pour moi voir réussir. Merci pour tes encouragements et tes conseils.*

*A tous les professeurs et les enseignants*

*De la faculté des sciences de la nature et de la vie qui m'ont formé où j'ai passé 5 merveilleuses années.*

*À Mr Benhomida Aissa et Mr bendechou Hamid*

*Trouvez ici l'expression de mes remerciements pour m'avoir guidé durant mon stage au Laboratoire de Microbiologie Appliquée.*

*Je tiens à remercier ma promotion de master en microbiologie appliquée, Et mes très chers(e)s collègue(e)s sans exception et surtout :Tifour Maghnia merci infiniment pour m'aider et vos encouragements.*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour et sur tout:*

*Dr. **EDDAIKRA.N** et Melle **BOUBECHE CHAHRAZED***

*A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles.*

*Cordialement : **BENKHECHIBA ZAKARIA***

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents, je remercie énormément pour leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien moralement, matériellement et leurs encouragements tout au long de ces années; que Dieu les garde.*

*A mes très chères sœurs qui ont été toujours à mes côtés*

*A mes chers frères*

*A toute ma famille et toutes mes amies*

*A tous mes collègues de promotion*

*A toutes les personnes que j'ai rencontré et qui ont impacté positivement ma vie*

*Cordialement : SIHAM*

# *Dédicaces*

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail*

*Je dédie ce fruit de mes efforts à la personne la plus chère et la plus précieuse de ma vie, qui a illuminé mon chemin de ses conseils, et était une mer de dons, à celle qui a décoré ma vie avec la pleine lune et des bougies de joie , à celui qui m'a donné la force et la détermination, pour continuer le chemin et a été une raison de poursuivre mes études, à celui qui m'a appris la patience et la diligence, À mon très cher ma mère*

*A mon cher père, que Dieu lui fasse miséricorde.*

*A mes frères et leurs femmes, que Dieu les protège et prenne soin d'eux.*

*À toute ma grande famille.*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

*A tous ce qui ont enseigné moi au long de ma vie scolaire.*

*A tous que je respecte et apprécie.*

*Cordialement : ZAHRA*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale ..... 01

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Environnements hypersalés ..... 02

1.1 Types d'environnements hypersalins ..... 02

1.1.1 Environnements thalassohalins ..... 03

1.1.2 Environnements athalassohalins ..... 04

2. Physico-chimie des milieux hypersalés ..... 04

2.1 pH..... 04

2.2 Température ..... 05

2.3 Oxygène..... 06

3. Organismes des milieux hypersalés ..... 06

4. Diversité phylogénétique des halophiles ..... 08

5. Osmorégulation ..... 10

5.1 Adaptation par accumulation de KCl..... 10

5.2 Adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs..... 11

6. Hydrolases ..... 13

6.1 Définition ..... 13

6.2 Classification des hydrolases ..... 13

6.2.1 Hydrolases des esters ..... 13

6.2.2 Hydrolases des glucides ..... 13

6.2.3 Hydrolases des éthers ..... 14

6.2.4 Hydrolases des peptides et des protéines ..... 14

6.2.5 Hydrolases d'anhydrides d'acide ..... 14

7. Halo-enzymes..... 15

8. Potentiel biotechnologique des enzymes halophiles..... 18

8.1 Protéases ..... 18

8.2 Amylases ..... 19

8.3 Estérases et lipases ..... 19

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Objectif ..... 20

2. Présentation du milieu d'étude ..... 20

2.1 Localisation et descriptif général.....	20
2.2 Choix des sources d'eau .....	21
3. Echantillonnage et prétraitement.....	23
4. Détermination in situ de quelques paramètres physico-chimique .....	24
5. Analyse microbiologique.....	25
5.1 Milieu de culture utilisé .....	25
5.2 Préparation du milieu MSH .....	26
5.3 Préparation du Milieu MSH avec pénicilline.....	26
6. Ensemencement.....	27
7. Isolement et purification des isolats .....	27
7.1 Mode opératoire .....	27
8. Conservation des isolats.....	27
9. Etude morphologique .....	28
9.1 Etude macroscopique.....	28
10. Étude de l'activité de protéase et amylase.....	28
11. Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	28
12. Mise en évidence de l'activité amylolytique .....	29

### **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

1. Analyses physicochimiques des échantillons.....	30
2. Croissance des bactéries halophiles.....	30
3. Caractères morphologiques.....	30
4. Criblage des activités protéase et amylase .....	34
4.1 Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique .....	34
4.2 Cinétique de croissance et de production de l'activité amylolytique.....	35
Conclusion.....	39

### **Références Bibliographiques**

### **Annexes**



# Liste des abréviations

---

**ADN:** Acide Désoxy riboNucléique

**ARN:** Acide Rribo Nucléique

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BaCl<sub>2</sub>:** Chlorure de Barium

**CaCl<sub>2</sub>:** Chlorure de Calcium

**DO:** Densité Optique

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**g/l:** Gramme par litre

**GN:** gélose nutritive

**HCl:** Chlorure d'hydrogène

**IR:** Infrarouge

**KCl:** Chlorure de Potassium

**kDa:** Kilo Dalton

**KOH:** Hydroxyde de Potassium

**MgCl<sub>2</sub>:** Chlorure de Magnésium

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfate de Magnésium

**MH:** Mueller Hinton

**MSH:** Milieu Spécifique Halophiles

**NaBr:** Bromure de Sodium

**NaCl :** Chlorure de Sodium

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonate de Sodium

**NaOH:** Hydroxyde de Sodium

**nm:** Nanomètre

**KOH:** Hydroxyde de Potassium

**p/v:** Poids/volume

**pH:** potentiel d'hydrogène

**Rpm:** Rotation Par Minute

**RS:** Rocher de sel

**UV:** Ultraviolet

**λ:** longueur d'onde

**μl:** microlitre

# Liste des figures

---

<b>Figure 01:</b> Environnements thalassohalins.....	03
<b>Figure 02:</b> Arbre phylogénétique universel.....	08
<b>Figure 03:</b> Structure tétra métrique de la HMDH.....	16
<b>Figure 04:</b> Dessin de ruban de MALDH tétramérique.....	17
<b>Figure 05:</b> (A) Dessin de ruban des monomères A et D de <i>Ca</i> MalDH.....	17
<b>Figure 06:</b> Situation géographique de la zone d'étude (Rocher de Sel).....	20
<b>Figure 07:</b> Quelques photos de la zone d'étude (Rocher de Sel).....	21
<b>Figure 08:</b> Quelques photos des zones d'échantillonnage.....	22
<b>Figure 09:</b> Matériel de mesure in situ de quelques paramètres physiques .....	24
<b>Figure 10:</b> Milieu au cours d'agitation.....	26
<b>Figure 11:</b> Milieu MSH complet prêt à l'emploi.....	26
<b>Figure 12:</b> préparation de l'antibiotique (pénicilline).....	26
<b>Figure 13:</b> L'apparition de colonies dans en une boîte de Pétri.....	31
<b>Figure 14:</b> Aspects macroscopiques des isolats cultivés sur le milieu MSH.....	33
<b>Figure 15:</b> Cinétique de croissance des 3 isolats sélectionnés pour l'activité protéolytique.....	36
<b>Figure 16:</b> Cinétique de croissance des 3 isolats sélectionnés pour l'activité amylolytique.....	36
<b>Figure 17:</b> Production d'activité protéolytique.....	37
<b>Figure 18:</b> Production d'activité amylolytique.....	37
<b>Figure 19:</b> Production de l'activité amylase sur milieu solide.....	38
<b>Figure 20:</b> Production de l'activité amylase sur milieu liquide.....	38

# Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Quelques propriétés physico-chimiques des principaux écosystèmes hypersalés du Sahara algérien et du monde.....	05
<b>Tableau 02:</b> Différentes catégories des bactéries halophiles.....	07
<b>Tableau 03:</b> Différentes catégories des bactéries halotolérantes.....	07
<b>Tableau 04:</b> Comparaison entre les Archaeas, Eubacteries, eucaryotes.....	19
<b>Tableau 05:</b> Solutés compatibles accumulées par les microorganismes halophiles.....	12
<b>Tableau 06:</b> Données générales sur la localisation des sites de prélèvement.....	23
<b>Tableau 07:</b> Composition du milieu MSH.....	25
<b>Tableau 08:</b> Valeurs des paramètres physico-chimiques mesurés dans la zone d'étude...	30
<b>Tableau 09:</b> Résultats de l'aspect macroscopique des souches.....	32

## Introduction

Ces dernières années, la recherche sur la biodiversité microbienne des environnements hypersalins s'est multipliée. Le nombre des études visant une compréhension approfondie de ces écosystèmes comme le Grand lac salé, Utah (USA), la Mer Morte, les marais salants de plusieurs pays et les lacs alcalins à savoir le lac Magadi à Kenya s'est considérablement développé (**D'Alessandro et al, 2006**)

Les microorganismes vivant dans ces environnements extrêmes sont appelés extrémophiles (**Jorquera et al, 2019**). Les premiers organismes extrémophiles connus sont des halophiles (qui aiment le sel”), découverts dans des environnements que beaucoup croyaient dépourvu de vie, comme la Mer Morte (**Detay et Thomas, 2018**).

La recherche sur les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles a été abordée par Nordberg et Hofsten en 1969 (**Nordberg et Hofsten, 1969**). Depuis lors, des efforts considérables ont été consacrés à l'évaluation des enzymes extracellulaires tolérantes au sel des bactéries modérément halophiles et à l'utilisation de telles enzymes dans des processus biotechnologiques (**Ventosa et al., 1998**). On pense généralement qu'il a été prouvé que de nombreuses enzymes halophiles sont polyextrémophiles. Ces enzymes restent non seulement actives et stables dans des environnements à haute teneur en sel, mais sont souvent aussi thermotolérantes et alcalinophiles (**Moreno et al., 2009**). Ces propriétés ont fait des enzymes halophiles d'excellents candidats pour différentes applications biotechnologiques car elles pourraient catalyser des réactions dans des conditions dures, typiques de nombreux processus industriels (**Setati, 2010**).

Le sujet développé dans le cadre de ce travail concerne le criblage d'activités hydrolases chez des isolats halophile. Le travail est organisé en trois parties:

- ❖ La première partie, est une synthèse bibliographique consacrée à l'étude des environnements hypersalés, les microorganismes halophiles, les enzymes produites par ce type de microorganismes et enfin le potentiel biotechnologique de ces enzymes.
  - ❖ La deuxième partie se focalisera sur les techniques utilisées lors de la partie expérimentale.
  - ❖ Les résultats obtenus et la discussion font l'objet du troisième partie.
- Nous terminons par une conclusion générale.

# **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

## **1 Environnements hypersalés:**

Les environnements hypersalés comportent les sols et les eaux hypersalés. Une eau hypersalée est définie comme toute eau dont sa concentration en sels est supérieure à celle des eaux de mer [qui est en moyenne de 35 g/l] (**Rodriguez-Valera, 1988**). Les sols hypersalés sont cependant moins bien définis. Selon **Kaurichev (1980)**, les sols contenant plus de 0.2% (w/v) en sels solubles sont considérés comme des sols salins, ce qui fait que les sols hypersalés sont largement représentés à travers la planète (**Rodriguez-Valera, 1988**). Les exemples des environnements hypersalés sont nombreux à travers le monde, Le Great Salt Lake, Utah, le Lac Rose au Sénégal, la mer Morte en Palestine, les marais salants plusieurs sebkhas et chotts du Sahara Algérien (**Hacene et al., 2004 ; Boutaïba et al., 2011**).

Les environnements salins et hypersalins constituent les écosystèmes les plus vastes de la planète (**Ghosh et al., 2019**). Au cours des dernières années, la diversité microbienne de tels environnements a été largement explorée à l'aide de techniques dépendantes ou indépendantes de culture (**Benloch et al., 1995 ; Burns et al., 2004 ; Youssef et al., 2012 ; Borsodi et al., 2013**), et les procaryotes halophiles ont été trouvés dans un large éventail d'environnements salins dans diverses zones géographiques (**Lizama et al., 2001**).

### **1.1 Types d'environnements hypersalins:**

Deux types d'environnements hypersalins biologiquement importants où le facteur de salinité détermine et spécifie la population bactérienne. Il s'agit de l'eau et le sol (**Hassani-Belkacem, 2015**).

Les eaux sont considérées salées lorsque la salinité dépasse 0.3% (p/v) et sont définies comme hypersalées quand elles présentent des concentrations en sels minéraux supérieures à celles de l'eau de mer (3.5%) (p/v) (**Edgerton et Brimblecome, 1981**).

En ce qui concerne les "Eaux salées" l'origine des sels est, le plus souvent, l'eau de mer. La quantité de sels dissous dans les mers ou océans a été estimée à 4.2610<sup>16</sup> tonnes (**Gavrielietal., 1999**). On y trouve principalement 11 ions différents :  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Br^-$ ,  $F^-$ , et  $BO_3^{3-}$ . Ces environnements sont divisés en plusieurs types ou catégories:

### 1.1.1. Environnements thalassohalins:

Beaucoup d'environnements hypersalins proviennent de l'évaporation de l'eau de mer, favorisée par un écoulement restreint, une température élevée, de basses précipitations, etc. De tels environnements aquatiques sont désignés sous le nom de thalassohalins (du grecque thalasso, la mer) (McGenity *et al.*, 2000; Oren, 2006). Ces environnements aquatiques ont une composition en NaCl prédominante. La quantité des différents sels inorganiques est approximativement égale à celle de l'eau de la mer, les marais salants, créés par de nombreux pays comme la France et l'Espagne etc., afin de produire du sel (Ventoza *et al.*, 2008). (Figure01).

Les environnements hypersalins, notés thalassohalines, ont une salinité de 35% (Satyanarayana *et al.* 2012).



**Figure 01** : Environnements thalassohalins, Marais salants de l'île de Ré en France (**Site1**) et Marais salants à Formentera en Espagne (**Site2**) et Environnement athalassohalins, la Mer Morte (**Site 3**) le Lac Rose Salé au Sénégal (**Site 4**).

### **1.1.2. Environnements athalassohalins:**

Contrairement à l'environnement hypersalin thalassohaline, la composition ionique d'un environnement athalassohaline peut être très différente. L'évaporation complète de l'eau de mer est à l'origine des formations de dépôts de sels qui constituent à travers le temps des évaporites. Leur dissolution par l'eau crée de nouveaux milieux athalassohalins. Comme la Mer Morte, le Lac Rose Salé (Sénégal), le Lac Salé d'El Goléa (Algérie) et la plupart des sebkhas situées en zones semi-arides et arides (**Litchfield et Gillevet, 2002 ; Oren, 2002; Roussel et al., 2008**). (Figure01).

Cependant, une des différences les plus importantes entre les plans thalassohalins et athalassohalins est le pH. Comme mentionné précédemment, les eaux thalassohalines sont légèrement plus alcalines que l'eau de mer à partir de laquelle elles ont été établies. Cela est principalement dû à la précipitation des carbonates de calcium en excès sous forme de calcite. Dans les systèmes athalassohalins, les eaux sont typiquement déficientes en  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ainsi, le système tend à générer un pH acide (**Grant et McGenity, 1998**).

## **2 Physico-chimie des milieux hypersalés:**

Les écosystèmes hypersalés (marais salants, lacs continentaux hypersalés) montrent une assez large variabilité quant à leur pH, leur composition chimique et la concentration en sels comme le montre le tableau 1.

Dans la plupart de ces écosystèmes, ce sont les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  qui prédominent en solution comme l'ont montré des études sur le Grand Lac Salé où leur concentration est respectivement de 105 et 181 g/l (**Coton et al., 2004**).

### **2.1 pH :**

Le Grand lac salé ou la Mer Morte contiennent des concentrations en sels totaux de plus de 330 g/l et leurs pH est proche de la neutralité. Selon **ROSS et al., (1986)**, la précipitation du calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) ou de sulfate de calcium ( $\text{CaSO}_4$ ) et celle du magnésium sous la forme de sépiolite ( $\text{MgSi}_3\text{O}_8 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), influencent le pH final du milieu car la formation de la sépiolite génère des ions  $\text{H}^+$  et la précipitation du carbonate supprime l'alcalinité du milieu (**Dassarma et Arora, 2002**).



**Tableau 1:** Quelques propriétés physico-chimiques des principaux écosystèmes hypersalés du Sahara algérien et du monde (Oren, 1993. Hacene et al., 2004. Boutaiba et al., 2011).

Ecosystèmes Hypersalins	Propriétés Physico-chimiques								
	pH	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub>	Salinité
Sebkha d'El Goléa (Algerie)	9.0	107	n.d	0.3	0.4	198	n.d	n.d	296
Sidi Aneur (Algerie) – eau	7.4	67.1	0.17	3.0	0.51	111	2.1	0.19	200
Sidi Aneur (Algérie) – sédiment	7.15	94.5	0.23	2.9	1.7	170	1.1	n.d	n.d
Himalatt (Alegria) – eau	7.2	24.5	0.12	1.6	0.22	63.8	3.1	n.d	117
Saltern Solaire (Porto Rico)	n.d	65.4	5.2	20.1	0.2	144	1.9	n.d	254
Grand Lac salé (USA)	7.7	105	6.7	11.1	0.3	181	27	0.72	333
Lac Assal (Djibouti)	n.d	77.8	5.4	8.0	14.6	164	2.3	n.d	277
Mer morte (Palestine)	7.8	40.1	7.6	44.0	78.2	225	0.44	0.26	340
Wadi Natrun (Egypte)	11	142	2.3	nd	nd	155	22.6	67	394
Mer d'Aral	8.2	2.2	0.08	0.55	0.51	3.47	3.2	0.07	10.2
Mer Caspienne	8.3	3.18	0.09	0.73	0.34	5.33	3.0	0.4	12.8
Océan Atlantique	8.5	10.6	0.38	1.29	0.42	19.2	2.68	0.14	34.85

\* Les concentrations des ions sont en g/l ; nd: non déterminé.

## 2.2 Température:

Les lacs salés sont le plus souvent situés dans les régions arides tropicales, ils existent aussi dans les régions tempérées et même polaires. La température des lacs continentaux peut énormément varier durant l'année, ainsi la température de la région du Grand Lac salé varie de -30°C en hiver à +48°C en été (Post, 1981). La grande majorité de la flore halophile extrêmophile ou thermotolérantes. Les Archaeobactéries halophiles ont un optimum entre 40 et 55°C (Parry et al., 2002) et dominant dans certaines Sebkhas.

### 2.3 Oxygène:

Les systèmes hypersalés sont des environnements anoxiques en dehors de la surface des eaux, car les températures élevées et les fortes salinités limitent la solubilisation de l'oxygène et engendrent des zones favorables à la prolifération d'une flore anaérobie. Des études effectuées en 1980 dans la Mer Morte, révèlent la présence de 0,7 à 0,9 ml d'oxygène par litre d'eau (**Levy, 1980 ; Por, 1980**).

### 3 Organismes des milieux hypersalés:

Le mot halophile composé de « hals » qui signifie sel et « phil » aime, de ce fait les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes qui requièrent du sel pour leur croissance (**Ebel et al., 2004**). 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 (**Ventoza et Nieto, 1995**).

Les microorganismes vivants dans les environnements salins ou hypersalins, sont divisés en :

- Ceux qui sont capables de se développer sans sel tout en tolérant des concentrations élevées en sel, ce sont les microorganismes halotolérants (**Echigoetal., 2005**) par exemple l'espèce *Halobacillus salinus* qui a été isolée à partir d'un lac salé en Corée, cette espèce se développe sans sel et dans des milieux contenant plus de 23% de NaCl (**Yoon et al., 2003**).
- Ceux qui ne se développent qu'en présence de sel, ce sont les microorganismes halophiles (**Tiquia et al., 2007**).

Les microorganismes nécessitant moins de 2% (p/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles (**Ollivier et al., 1994**). La plupart de ces microorganismes halophiles ont une teneur élevée en pigments, c'est pour cette raison que les eaux du Grand Lac salé Utah, les marais salants et le Lac Magadi (Kenya) sont souvent de couleur rouge-vif, les eaux rouges sont mêmes parfois trouvées dans la Mer Morte (**Oren, 2002**).

En 1962, **Larsen** a défini trois catégories de bactéries halophiles, selon la concentration en sel qui permet une croissance optimale des microorganismes. Mais, en 1993, **Kushner** a réparti les microorganismes halophiles en différentes catégories selon les gammes de concentration en sel nécessaire à leur croissance. Beaucoup d'organismes marins sont des halophiles légers (avec 3%, p/v de NaCl en eau de mer). Les halophiles modérés se développent de façon optimale à 3-15% (p/v) (0,5-2,5M) de NaCl et les halophiles extrêmes à 25% (p/v) (4,2M) de NaCl.

Dans le groupe de microorganismes halotolérants, il existe plusieurs catégories (**Tiquia et al., 2007**)

**Tableau 2:** Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de **Larsen (1962)** et de **Kushner (1993)**.

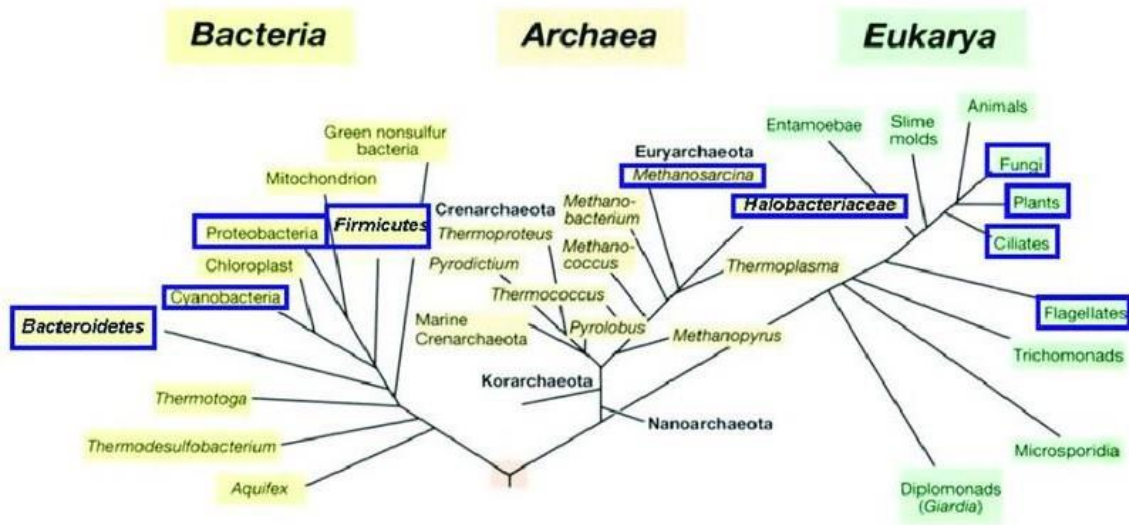
Classification de Larsen (1962)	Pourcentage	Classification de Kushner (1993)	Pourcentage
Catégories	NaCl	Catégories	NaCl
Les non-halophiles	<2%	Les non-halophiles	~1%
Les halophiles légères	2 à 20%	Les halophiles légères	1 à 3%
Les halophiles modérées	5 à 30%	Les halophiles modérées	3 à 15%
Les halophiles extrêmes	20 à 30%	Les halophiles à bord extrêmes	9 à 23%
		Les halophiles extrêmes	15 à 32%

**Tableau 3:** Différentes catégories des bactéries halotolérantes (**Tiquia et al., 2007**)

Catégories	NaCl
Légèrement halotolérantes	6 à 8%
Modérément halotolérantes	18 à 20 %
Les halotolérantes extrêmes	0% à le point de saturation.

#### 4 Diversité phylogénétique des halophiles :

Les halophiles et les halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve parmi les trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Oren, 2010) (Figure2).



**Figure N° 2:** Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halophiles et halotolérants sont encadrés en bleu (Oren, 2008).

Au sein du domaine des *Eucarya*, les halophiles sont plus rares. Le principal microorganisme eucaryote halophile est l'algue verte *Dunaliella* qui est aussi le principal producteur primaire dans la mer morte et d'autres lacs hypersalins. Cette algue comprend plusieurs espèces, certaines entre elles produisent le  $\beta$ -carotène dont ses propriétés sont exploitées en biotechnologie. L'algue *Dunaliella* est un halotolérant plutôt qu'un halophile, plusieurs espèces peuvent se développer à toutes concentrations de NaCl relativement faibles (1M). Parmi les micro-organismes, on peut citer le crustacé *Artemia* qui joue des rôles importants dans des milieux hypersalins (Oren, 2002). Il existe aussi des représentants halophiles des champignons qui nécessitent des concentrations très élevées de sels et proches de la saturation, exemple, le champignon *Trimmatostroma salinum* (Zalar et al., 1999).

Au sein des *Archaea*, la famille des *Halobacteriaceae* comprend des membres aérobies, hétérotrophes, et capables de croître en présence de fortes concentrations en sels pouvant aller jusqu'à 5,2M de NaCl ( $\approx 300\text{g/l}$ ). 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, 2002**).

Le royaume de *Bacteria* regroupe la plus grande diversité de microorganismes halophiles et halotolérants dont la plus part de ces microorganismes sont des modérés plutôt qu'extrêmes (**Oren, 2002**), ils sont répandus et présents dans un grand nombre de groupes phylogénétiques, ils appartiennent au phylum *Spirochaetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, et *Bacteroides*. Dans le groupe des *Firmicutes*, les halophiles existent dans les branches des aérobies (*Bacillus*) et des anaérobies (**Oren, 2008**). Les bactéries les plus isolées sont les bactéries fermentatives strictes appartenant à la famille des *Halobacteroidaceae* et *Haloanaerobiaceae* (**Rainey et al., 1995**).

**Tableau 4:** Comparaison entre les Archaeas, Eubacteries, Eucaryotes (**Woese, 1981**)

<u>Caractéristiques</u>	<b>Archaeobactéries</b>	<b>Eubactéries</b>	<b>Eucaryotes</b>
Taille de la cellule	Environ 1 micromètre	Environ 1 micromètre	Environ 1 micromètre
Membrane cellulaire	Néant	Néant	Présent
Membrane nucléaire	Néant	Néant	Présent
Paroi	De nombreux types mais aucune ne contient pas d'acide muramique	Toutes les variantes renferment de l'acide muramique	Pas de paroi dans les cellules animales ni de nombreux types ailleurs
Lipides des membranes	Chaines aliphatiques ramifiées avec des liaisons éther	Chaines aliphatiques linéaires avec des liaisons ester	Chaines aliphatiques linéaires avec des liaisons ester
ARN de transfert : présence de thymine dans le bras commun	Absente	Présente dans la plupart des ARN de transfert de la plupart des espèces	Présente dans la plupart des ARN de transfert de toutes les espèces
Longueur l'ARN 16S ,18S) approximative	1500 nucléotides	1500 nucléotides	1800 nucléotides
Longueur approximative de l'ARN 23S (25 -28S)	2900 nucléotides	2900 nucléotides	3500 nucléotides
Ribosomes :	30S - 50S	30S - 50S	40S - 60S
Réaction avec le chloramphénicol	Pas de réaction	Positive	Pas de réaction

## **5 Osmorégulation:**

Le terme "osmoadaptation" décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement de forte ou de faible osmolarité (**Galinski, 1995**). L'osmorégulation est le processus majeur d'osmoadaptation contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule dans des conditions de culture osmotiquement stressantes (**Csonka, 1989**).

La composition ionique des milieux hypersalés change en fonction de l'évaporation ou d'apport d'eaux (précipitations). Ces brusques variations ioniques conduisent les microorganismes à s'adapter rapidement à ces nouvelles conditions (**Koch, 1982**). La vie dans ces milieux n'est ainsi possible qu'au prix d'une forte spécialisation. En réponse à des teneurs élevées en sel du milieu externe, la cellule bactérienne maintient une osmolarité interne supérieure à celle de l'environnement extracellulaire (**Pocard et al., 1994**). Elle accumule dans le cytoplasme des molécules osmotiquement actives afin de restaurer une pression de turgescence cellulaire (**Kempf et Bremer, 1998**).

En absence de solutés adéquates, l'eau s'échappe de la cellule afin d'équilibrer AW (l'activité de l'eau) aux deux côtés de la membrane, ce qui conduit à la réduction du volume de la cellule, altérant les concentrations intracellulaires des métabolites et l'activité des enzymes (**Litchfield, 1998 ; Roberts, 2005**).

De ce fait, pour être capable de vivre à hautes concentrations de sels et puisque toutes les membranes biologiques sont perméables à l'eau, les microorganismes halophiles et halotolérants doivent maintenir leur cytoplasme en iso-osmose avec le milieu extérieur. Pour atteindre cet équilibre osmotique deux stratégies existent, elles sont basées sur le principe de créer une haute pression osmotique dans le cytoplasme tout en gardant une faible concentration en ion sodium ( $\text{Na}^+$ ) (**Oren, 2002**), en l'expulsant grâce à un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localisé au niveau de la membrane cytoplasmique (**Oren, 2001**).

### **5.1 Adaptation par accumulation de KCl**

Cette stratégie est basée sur l'accumulation du KCl, Les ions  $\text{K}^+$  sont les ions les plus accumulés par les *Archaea* extrêmement halophiles, le taux des ions de potassium intracellulaire chez ces microorganismes est cinq fois plus important que le taux des ions de sodium, la caractéristique qui leur permet de maintenir leur équilibre osmotique dans l'environnement où ils existent (**Perez-Fillol et Rodriguez-Valera, 1986**).

Les ions  $K^+$  entrent passivement via un système uniport sous l'impulsion du potentiel de membrane, une partie de sodium cellulaire est remplacée par le potassium. L'afflux des cations doit être compensé par un nombre équivalent d'anions  $Cl^-$ , ces derniers vont pénétrer grâce à une pompe  $Na^+/Cl^-$ , ce mécanisme est largement adopté chez les *Archaea* halophiles ce qu'il les a distingué des bactéries, mais certaines bactéries halophiles, comme les *Salinibacter*, utilisent la même stratégie (**Zafrilla et al., 2010**).

L'adaptation à la salinité par accumulation de KCl nécessite l'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire, car l'accumulation dans le cytoplasme de fortes quantités de sels principalement le KCl, soumis ces microorganismes à un nouveau stress cellulaire, cependant ces microorganismes ne semblent pas connaître ce stress, leurs protéines ne sont pas seulement fonctionnelles et stables à de telles salinités mais elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1M (**Madern et al., 2000**).

## **5.2 Adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs**

Cette stratégie est basée sur l'exclusion du sodium et l'accumulation ou la production de composés organiques de faible poids moléculaire solubles dans l'eau 'solutés compatibles' pour éviter la perte d'eau (**Galinski, 1993**). Ce mécanisme est largement utilisé dans les trois domaines de vie *Archaea*, *Eucarya* et *Bacteria*. Il existe une large variété de solutés compatibles, comme exemples la glycine bêtaïne, l'éctoïne et d'autres dérivés d'acides aminés, des polyalcools et des sucres (**Galinski, 1995**), qui peuvent être synthétisés par les microorganismes ou importés de l'environnement externe, par des systèmes de transport sans qu'ils interfèrent avec leurs métabolismes (**Brown, 1976**). Les osmoprotecteurs les plus utilisés dans le domaine de *Bacteria* sont l'éctoïne et la glycine bêtaïne. L'éctoïne est synthétisée par une grande variété de microorganismes halophiles et halotolérants comme les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les *Archaea* méthanogènes tandis que la glycine bêtaïne est synthétisée exclusivement par des procaryotes photosynthétiques et accumulée à partir du milieu par des bactéries hétérotrophes (**Oren, 2008**).

Les microorganismes halophiles ou halotolérants utilisant le mécanisme de la production ou accumulation de solutés compatibles sont plus flexibles pour l'adaptation à la pression osmotique que les microorganismes utilisant le mécanisme de l'accumulation de KCl (**Kunte et al., 2002**). Également, l'adaptation à la salinité par l'accumulation de solutés organiques nécessite moins d'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire que la stratégie de l'accumulation des ions potassium, cependant la production des solutés est énergétiquement coûteuse (**Oren, 2002**).

Le tableau 5 résume la diversité des solutés compatibles accumulées par des microorganismes halophiles. La nature des solutés compatibles accumulées par une bactérie dépend du niveau de présence de ces composés (ou de leur précurseurs) dans le milieu extérieur, de l'existence de systèmes de transport (ou de synthèse) d'osmoprotectants adéquats et de l'intensité du stress osmotique auquel elle doit faire face (**Beumer et al., 1994 ; Galinski., 1995**).

**Tableau 5:** Solutés compatibles accumulées par les microorganismes halophiles

<b>Microorganismes</b>	<b>Solutés accumulées</b>	<b>Références</b>
Micro algues	Sucrose, Glycerol, Proline, Manitele, Glycine-bétaïne Dimethylsulfonio propionate	<b>Grenway et Stetter, 1979, Brown, 1976, Ahmad et Hellebust, 1984 Blunden et al., 1992</b>
Champignons	Glycérol, Arabitol, Sorbitol, Tréhalose	<b>Meikle et al., 1988 Larsson et al., 1990</b>
Cyanobactéries	Sucrose\ tréhalose Glycosylglycerol Glycine bétaïne	<b>Reed et al., 1984</b>
Bactéries phototrophes	Sucrose- tréhalose Glycinebétaïne Hydroxycetoine	<b>Welsh et al., 1993</b>
Bactéries sulfacto- réductrices	Tréhalose Glycine bétaïne	<b>Welsh et al., 1996</b>
Bactéries hétérotrophes	Glutamate, Proline N-acetylgluminyInglutamine amide, Glycine bétaïne Acetoine \ Hydroxycetoine Tréhalose	<b>Welsh et al., 2000</b>
Actinomycètes	Acetoine\ Hydroxycetoine Tréhalose, Proline, Glutamine, alanine	<b>Killham et Firestone, 1984</b>
Archaeobactéries	Glycine, bétaïne, B-glutamate	<b>Robertson et al., 1990</b>



## **6 Hydrolases**

### **6.1 Définition:**

Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'une liaison chimique dans les biomolécules, ils utilisent l'eau comme donneur de groupe hydroxyle lors de la dégradation du substrat. Ils catalysent le clivage hydrolytique des liaisons carbone-oxygène (C-O), carbone-azote (C-N), carbone-carbone (C-C), phosphore-azote (P-N), etc. (**Shukla et al., 2022**).

### **6.2 Classification des hydrolases:**

Les hydrolases appartiennent à la classe d'enzymes 3 (EC 3) et sont en outre classées en fonction du type de liaison qu'elles clivent (**Tsai, 2003**).

#### **6.2.1 Hydrolases des esters:**

Les estérases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse et la synthèse des liaisons ester. Il existe une large gamme d'estérases différentes qui diffèrent par leur spécificité de substrat, leur structure protéique et leur fonction biologique. Les estérases sont subdivisées en celles agissant sur les esters carboxyliques ( EC 3.1.1 ), les thioesters hydrolases ( EC 3.1.2 ), les monoesters phosphoriques hydrolases, les phosphatases ( EC 3.1.3 ), les phosphodiester hydrolases (EC3.1.4), les monoesters triphosphoriques les hydrolases (EC3.1.5), les sulfatases ( EC 3.1.6 ), les monoestérases diphosphoriques ( EC 3.1.7 ) et les hydrolases de triester phosphorique ( EC 3.1.8 ), les nucléase : les exonucléases (EC 3.1.11-16) et les endonucléases ( EC 3.1.21-31) (**Perrin, 2021**).

#### **6.2.2 Hydrolases des glucides:**

Ces enzymes sont capables de catalyser l'hydrolyse de la liaison osidique dans les glucides, présentent une spécificité du type de liaison.

Les glycosidases sont des catalyseurs spécifiques qui décomposent les liaisons glycosidiques des polysaccharides complexes, tels que la cellulose, les hémicelluloses, l'amidon, etc. À ce jour, les glycosidases sont divisés en plus de 150 familles, parmi ces familles les amylases, les pullulanases, les dextranases, les hyaluronidases, les xylosidases et les cellulases (**Shrivastava, 2020**).

### **6.2.3 Hydrolases des éthers:**

A cette petite sous-classe appartiennent les enzymes qui agissent sur les liaisons éther. Elles se subdivisent en ceux qui s'hydrolysent sur les composés thioéther et trialkylsulfonium ( EC 3.3.1 ) et ceux qui agissent sur les éthers ( EC 3.3.2 ) (**Perrin, 2021**).

### **6.2.4 Hydrolases des peptides et des protéines:**

Ces hydrolases catalysent la protéolyse, pour permettre de transformer les protéines en polypeptides plus petits ou en acides aminés simples et stimulent la formation de nouveaux produits protéiques.

Elles peuvent être simplement divisées selon que les liaisons peptidiques terminales sont clivées (exopeptidases et exoprotéinases) à l'extrémité amino (aminopeptidases) ou à l'extrémité carboxy (carboxypeptidases). Les liaisons peptidiques non terminales sont clivées par des endopeptidases et des endoprotéinases, qui sont divisées en sérine endopeptidases (EC3.4.21), cystéine endopeptidases (EC 3.4.22 ), aspartate endopeptidases ( EC 3.4.23 ), métallo endopeptidases ( EC 3.4.24 ) et thréonine endopeptidases ( EC 3.4.25 ) (**Chatonnet et al., 2022**).

### **6.2.5 Hydrolases d'anhydrides d'acide:**

A cette sous-classe appartiennent principalement les enzymes agissantes sur les liaisons diphosphate dans des composés tels que les di- et triphosphates de nucléosides ( EC 3.6.1 ), sur les anhydrides contenant des sulfonyles tels que l'adénylylsulfate ( EC 3.6.2 ) et sur les anhydrides d'acides ; catalyser le mouvement transmembranaire des substances ( EC 3.6.3 ) (**Perrin, 2021**).

## **7 Halo-enzymes:**

Les micro-organismes halophiles sont une source potentielle d'extrêmozymes appelés halozymes comme les protéases, les amylases, les nucléases, les lipases, les cellulases, les xylanases, les catalases et les estérases, qui sont capables de fonctionner sous des concentrations élevées de sel, une large gamme de valeurs de pH et des températures, ces enzymes sont extraordinairement stables fonctionnent dans des conditions où les enzymes conventionnelles cessent de fonctionner, se dénaturent et précipitent (**DasSarma S et DasSarma P., 2016 ; Gupta et al.,2016**).

Les premiers microbiologistes s'intéressant à l'adaptation des enzymes halophiles à une salinité élevée ont découvert deux caractéristiques principales : un nombre substantiel de charges protéiques et une hydrophobicité accrue (**Enach et Kamekura, 2010**).

Du fait de la présence d'une forte concentration en sel dans le cytoplasme, les protéines halophiles ont nécessairement développé des mécanismes spécifiques pour la rétention de leur conformation native et de leur activités en milieu saturé en sel. Tout d'abord, l'analyse statistique de 26 séquences de protéines halophiles a montré que la plupart des protéines halophiles (24 sur 26) sont très acides (excès de résidus acide par rapport au basique) par rapport aux non-halophiles (**Marty, 2011**).

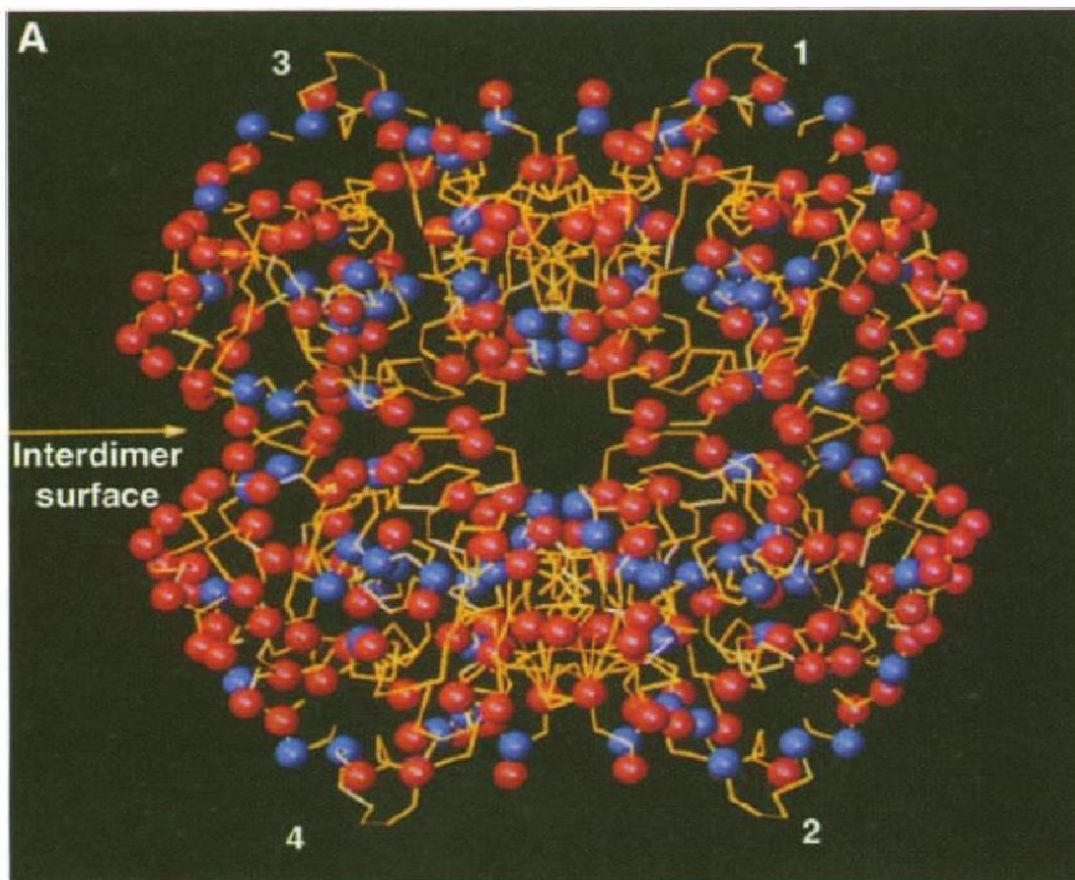
Les structures cristallines de plusieurs protéines halophiles ont montré des surfaces riches en résidus acides (Figure 3). L'utilisation de résidus d'acides aminés chargés négativement conduit à une organisation des ions salins en réseau à la surface des protéines, qui renforce à la fois les interactions faibles particules-particules (répulsion) et les interactions protéine-solvant. Il est probable que ces charges négatives sont nécessaires comme mécanisme de défense qui leur permettrait de retenir une couche d'hydratation aux forces ioniques élevées. Etant donné que les groupes acides sont les plus efficaces en ce qui concerne la capacité d'hydratation, ils peuvent lier environ 6-8 molécules d'eau, par rapport à 3-4 dans le cas des groupes basiques. La sélection d'une surface acide est donc nécessaire pour maintenir la solubilité des protéines dans un environnement en sel élevé. De plus, de nombreuses protéines halophiles ont des sites de liaison aux ions, souvent à l'interface de sous-unité. La formation de ponts salins avec d'autres résidus va permettre d'augmenter la stabilité des protéines (**Marty, 2011; Boudjemai, 2020**).

Les molécules d'eau sont nécessaires dans le processus de repliement et de stabilisation des protéines. Pour montrer l'impact relatif de l'enrichissement en surface acide sur l'organisation de la structure de l'eau entre une protéine halophile et sa contrepartie non adaptée, les enveloppes de solvant de deux

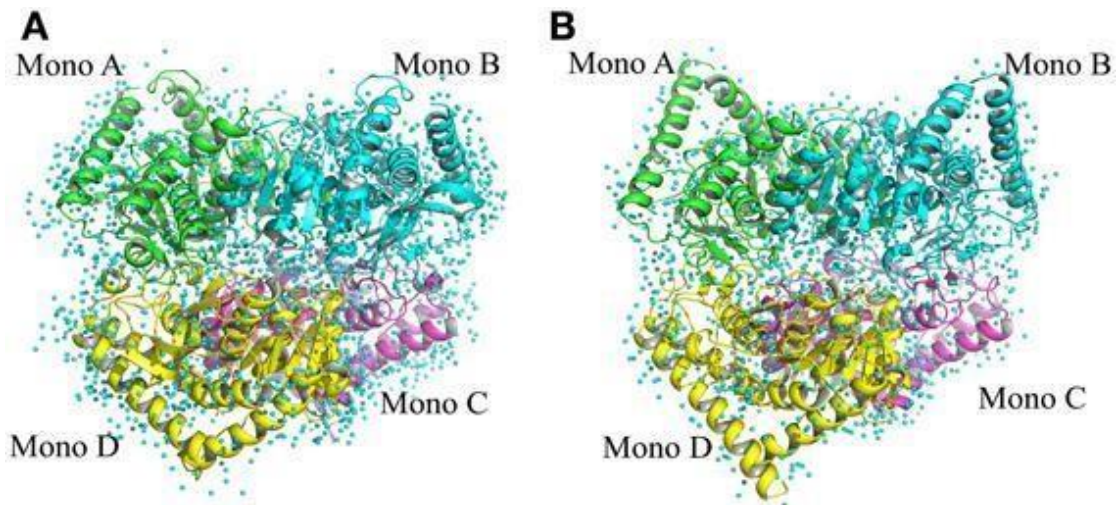
malates déshydrogénases tétramères orthologues (MalDH) de bactéries halophiles et non halophiles à été comparée, (Figure4). La structure cristalline de la MalDH de la bactérie non halophile *Chloroflexus aurantiacus*. (CaMalDH) résolue, de novo, à une résolution de 1,7Å présente de nombreuses molécules d'eau dans sa coquille de solvatation. On a observé qu'un grand nombre de ces molécules d'eau sont disposées en polygones pentagonaux dans la première couche d'hydratation de CaMalDH.

La structure cristalline de MalDH de la bactérie halophile extrême *Salinibacter ruber*. (Sr) résolue à 1,55 Å de résolution montre que sa surface est fortement enrichie en acides aminés acides et aucun polygone n'a été observé (Figure 5), Mais 14 molécules d'eau se trouvent dans la poche catalytique de (Sr) MalDH.

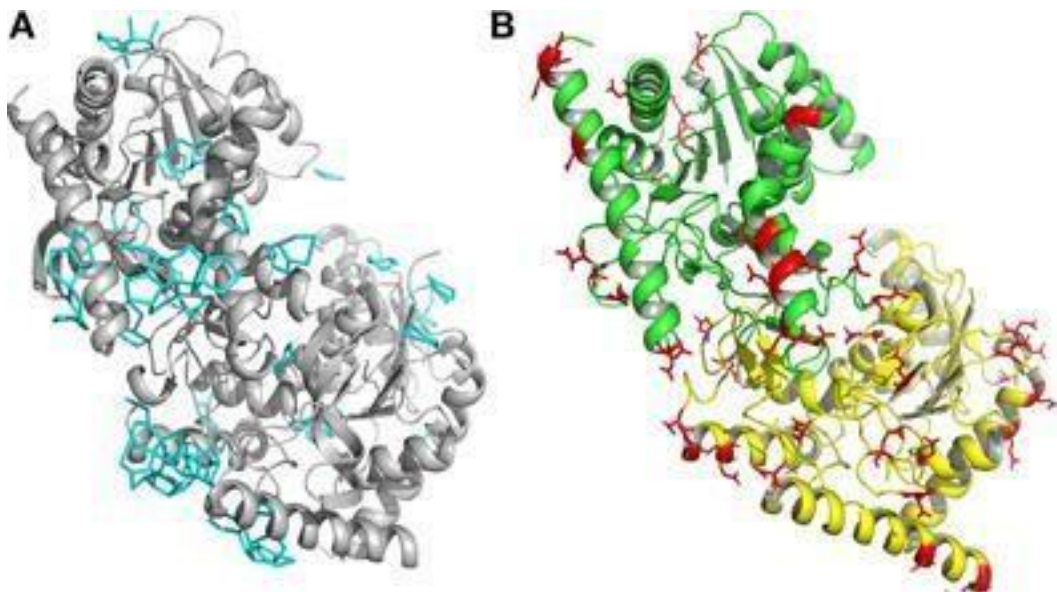
Les données montrent que les acides aminés acides de surface perturbent les réseaux d'eau pentagonaux dans la coquille d'hydratation (Talon et al., 2014).



**Figure N° 3.** Structure tétramérique de la HMDH : les acides aminés acides sont représentés en rouge et les basiques en bleu (Marty, 2011). Les nombres 1 à 4 désigne les différentes sous-unités de la protéine.



**Figure N° 4.** Dessin de ruban de maldh tetramérique. (A) *Chloroflexus aurantiacus*. MalDH. (B) *Salinibacter ruber*. MalDH. Les monomères sont représentés en quatre couleurs différentes. Les molécules d'eau sont représentées par de petites sphères bleues.



**Figure N° 5.** (A) Dessin de ruban des monomères A et D de *Ca* MalDH. Les polygones d'eau sont représentés en lignes bleues. (B) Dessin de ruban du monomère A (vert) et du monomère D (jaune) de *Sr* MalDH. L'acide aminé acide de surface est représenté en rouge.

## 8. Potentiel biotechnologique des enzymes halophiles:

Les micro-organismes qui se développent dans des conditions extrêmes ont une source importante d'enzymes stables et précieuses. Leurs enzymes, parfois appelées "extrémozymes", remplissent les mêmes fonctions enzymatiques que leurs homologues non extrêmes, mais elles peuvent catalyser de telles réactions dans des conditions qui inhibent ou dénaturent les formes les moins extrêmes (**Karan et al., 2012**).

Les enzymes halophiles sont considérées comme une nouvelle alternative pour une utilisation dans les industries biotechnologiques en raison de leur capacité à s'adapter aux conditions extrêmes de certains processus industriels, telles que les températures élevées, la large gamme de pH, les concentrations élevées en sel, la dénaturation par les solvants, etc. (**Delgado-Garcia et al., 2012**).

Les enzymes tels que les protéases, amylases et lipases qui fonctionnent à une forte concentration saline, peuvent être utiles dans des processus biotechnologiques exigeant une concentration élevée en sels pour la dégradation des macromolécules (**Fukushima et al., 2005**).

### 8.1 Protéases:

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques qui rompent la liaison peptidique dans les protéines et transforment les protéines en courts polypeptides et acides aminés (**Faridah et Suharti, 2021**).

Les protéases microbiennes comptent parmi les enzymes les plus étudiées et sont largement utilisées dans les processus industriels. Ils constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles et représentent près de 60% de la vente totale d'enzymes. Ils ont de nombreuses applications dans la production industrielle de différents articles, notamment les détergents, les aliments, les produits pharmaceutiques, le cuir, les diagnostics, la gestion des déchets et la récupération de l'argent (**Karbalaei-Heidari et al., 2009**).

Les protéases qui ont été produites par *Halobacterium spp.*, *Haloferax mediteranei*, *Natrialbaasiatica*, *Natrialba magadii*, *Natronococcus occultus* et *Natronococcus pharaonis*, ont été purifiées et caractérisées. Par exemple ; la sérine-protéase d'*Halobacterium salinarum* était la première hydrolase extracellulaire identifiée à partir d'une *Archaea* extrêmement halophile, elle nécessite 4M de NaCl pour une activité catalytique et une stabilité optimale avec un rendement allant jusqu'à 76% dans un milieu dont l'activité en eau (aw) est faible (**Patel and Saraf, 2015**).

## 8.2 Amylases:

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes et sont d'une grande importance dans la biotechnologie actuelle. Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes digestives qui hydrolysent les liaisons glycosidiques de l'amidon en glucose, maltose, maltotriose et dextrine (**Mobini-Dehkordi et javan, 2012**). La caractéristique principale de ces amylases est la stabilité de ces enzymes dans des concentrations élevées de sel, parmi les souches halophiles productrices des amylases, on peut citer: *Haloarculahispanica*, *Halobacillus* sp., *Chromohalobactersp*, *Bacillusdipsosauri*, *Halobacterium salinarum* et *Halomonas meridiana* (**Gopinath et al., 2017**).

Good et Hartman, ont criblé une dizaine d'halophiles dès 1970, pour l'activité amylasique. Ils ont signalé que *Halobacterium salinarum* (anciennement *Halobacterium halobium*) était le meilleur producteur. L'amylase de *Halobacterium halobium* avait une activité optimale à pH 6,4 à 6,6 et 0,05 % de NaCl à 55 °C (**Good et Hartman, 1970 ; Kumar et al., 2016**).

L'amylase représente environ 25 % du marché mondial des enzymes industrielles. Elle est utilisée dans les aliments, les détergents, les produits pharmaceutiques et les industries du papier et du textile. Avec l'avènement de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre d'application de l'amylase s'est étendu à de nombreux autres domaines, tels que la chimie clinique, médicale et analytique (**Mobini-Dehkordi et javan 2012 ; Gopinath et al, 2017**).

## 8.3. Estérases et lipases:

Les enzymes lipolytiques, Estérases (EC3.1.1.1) et lipases (EC3.1.1.3), sont largement utilisées comme biocatalyseurs en raison de leur capacité à produire des composés optiquement purs (**Dassarma et al., 2010**). Les estérases catalysent l'hydrolyse des esters en un acide ou un alcool, et la synthèse des liaisons ester (**Calimlioglu et Arga, 2014**). Ils représentent une famille d'enzymes à fort potentiel dans divers processus industriels, telles que l'hydrolyse stéréospécifique, la trans-estérification, la synthèse d'esters et d'autres réactions de biosynthèse organique (**Enache et Kamekura, 2010**). Les lipases sont des hydrolases d'ester carboxylique du groupe enzymatique estérase et catalysent le clivage et la formation d'acylglycérols à longue chaîne. Ils sont principalement actifs contre les substrats insolubles dans l'eau, ainsi que les triglycérides composés d'acides gras à longue chaîne. La capacité des lipases à effectuer une transformation chimique ou biologique très spécifique les a rendues de plus en plus populaires dans les industries alimentaires, détergentes, papetières, cosmétiques, de synthèse organique, agrochimique, énergétique et pharmaceutique, ainsi que dans le contrôle de la pollution (**Calimlioglu et Arga, 2014**).

## **Chapitre 2: Matériel et méthodes**

---







**Figure 07:** Quelques photos de la zone d'étude (Rocher de Sel) Mars 2022.

## **2.2. Choix des sources d'eau:**




La zone d'étude a plusieurs cours d'eau provenant de plusieurs sources, nous avons donc sélectionné uniquement les sources que nous pensions être les plus différentes les unes des autres, en tenant compte de changements de quelques paramètres physicochimiques tel que le pH et la conductivité électrique. Donc nous avons retenu (03) sources, comme illustré dans la figure 8.





**Figure 08:** Quelques photos des zones d'échantillonnage

**Tableau 06:** Données générales sur la localisation des sites de prélèvement.

Code site	Vue d'ensemble	Coordonnées GPS				
Source 01		Latitude	Longitude	Précision position	Altitude	Précision Altitude
		34,83527°N	3,09051°E	21,17m	985m	40m
Source02		Latitude	Longitude	Précision position	Altitude	Précision Altitude
		34,83501°N	3,09024°E	26,61m	962,5m	27,5
Source 04		Latitude	Longitude	Précision position	Altitude	Précision Altitude
		34,83027°N	3,09493°E	31,74m	966m	43,5m

### 3. Echantillonnage et prétraitement

Le prélèvement d'un échantillon est une opération délicate, à laquelle le plus grand soin doit être apporté parce qu'il conditionne les analyses à effectuer, les résultats analytiques et l'interprétation qui en seront donnés. Ainsi, nous avons essayé de répondre à certains critères jugés d'importance lors de l'échantillonnage (points d'échantillonnage, période d'échantillonnage, et les paramètres à analyser (physico-chimiques et microbiologiques).

Les prélèvements des eaux sont effectués à partir de 3 sources choisies. L'eau est récupérée dans des flacons stériles de 1.5 litres de chaque source. Puis nous avons transféré les échantillons au laboratoire d'analyse de l'Algérienne des Eaux de la ville de Djelfa, pour une filtration à travers des membranes stériles millipore de 0.45µm.



#### 4. Détermination in situ de quelques paramètres physico-chimique

Avant de procéder à l'échantillonnage, nous avons effectué une analyse physico-chimique sur les échantillons d'eau, dans lequel Le pH, la conductivité électrique et la température de l'eau ont été mesurés sur site par un pH mètre, un conductimètre, et un thermomètre portatifs.

Cette analyse est très importante afin d'avoir une idée sur le type de microflore (halophiles, alcalophiles...) qui peut exister dans nos échantillons.



**Figure 09:** Matériel de mesure in situ de quelques paramètres physiques (pH, conductivité électrique et température).

## 5. Analyse microbiologique

### 5.1 Milieu de culture utilisé:

Le choix d'un milieu de culture dépend des espèces recherchées et du but de l'étude à réaliser. Pour cela nous avons utilisé un milieu spécifique qui est nécessaire à la croissance des microorganismes halophiles qui est le milieu MSH, dont la composition en g/l est donnée dans le tableau suivant:

**Tableau 07** : Composition du milieu MSH.

<b>Le produit chimique</b>	<b>Quantité en (g)</b>
<b>NaCl</b>	200
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	50
<b>MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub> O</b>	32
<b>KCl</b>	05
<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub> O</b>	0.8
<b>NaBr</b>	0. 6
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.16
<b>Extrait de levure</b>	05

Le milieu solide est obtenu par l'ajout de 20 g/l d'Agar. Cependant le milieu semi solide contient uniquement 15 g/l. Le milieu liquide minimum est bien entendu dépourvu d'Agar et d'extrait de levure

### 5.2 Préparation du milieu MSH:

Pour préparer un litre du milieu de culture, nous avons suivi les étapes suivantes:

- versement de 800 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 1L.
- Ajout des composants cités dans le tableau 7 dans l'erlenmeyer placé sous chauffage et agitation pour faciliter l'homogénéisation des différents composants.
- Addition en dernier de l'extrait de levure, du NaCl et de l'agar.
- l'ouverture de l'erlenmeyer doit être fermée à l'aide d'un papier aluminium pour éviter l'évaporation de la solution
- Au moment de l'ébullition on ajoute le volume manquant de l'eau distillée jusqu'à 1L.
- Le milieu est réparti dans des flacons de 250 ml puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes

### 5.3 Préparation du Milieu MSH avec pénicilline:

On prépare un milieu MSH comme décrit dans le protocole précédent. Juste après la stérilisation et après le refroidissement, on ajoute l'antibiotique à l'aide d'une seringue, on prend l'antibiotique (pénicilline 500mg) et on le stérilise par filtration à travers un filtre de type Swinex

1 ml du filtrat est additionné à 200ml de milieu pour avoir une concentration finale de l'antibiotique de 100 µg/L. Cette étape nécessite une agitation puis on coule le milieu dans des boites de Pétri et on laisse se solidifier.



**Figure 10:** Milieu au cours d'agitation



**Figure 11:** Milieu MSH complet prêt à l'emploi.



**Figure 12 :** Préparation de l'antibiotique (pénicilline)

## **6. Ensemencement:**

Le milieu de culture MSH solide est coulé dans les boîtes de Pétri sous des conditions stériles. Après la filtration d'échantillons d'eau (500ml pour chaque source) à travers des membranes millipore stériles de 0.45µm, nous avons divisé chaque membrane en deux moitiés dont l'une est déposée dans une boîte de Pétri contenant le milieu MSH sans pénicilline et l'autre moitié dans une autre boîte de Pétri contenant le milieu MSH avec pénicilline de concentration 100µg/L, puis les boîtes sont incubées à 40° C pendant 8 jours.

## **7. Isolement et purification des isolats:**

Après 8 jours, nous avons isolé les colonies apparues sur les membranesensemencées dans les boîtes de Pétri (des boîtes contenant le milieu MSH solide avec pénicilline et d'autres boîtes sans pénicilline), puis incubées à 40°C jusqu'à l'apparition des colonies. Après 2 jours, on a commencé la première purification des souches.

Les colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées et purifiées par repiquage successifs jusqu'à l'obtention d'une culture pure dans chaque boîte de Pétri.

### **7.1 Mode opératoire :**

Après une analyse macroscopique des différents types de colonies obtenues (différenciations entre les colonies par rapport à la forme et la couleur), chaque type de colonie a été isolé.

À l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève un type de colonie puis on ensemence en stries serrées, selon la méthode des quadrants.

Ensuite on met le para film autour des boîtes, puis les boîtes sont mises dans des sachets en plastique fermés contenant du papier humidifié afin d'éviter la dessiccation rapide du milieu de culture et la cristallisation des sels, puis on fait une incubation à 40°C jusqu'à l'apparition des colonies.

## **8. Conservation des isolats:**

La conservation des isolats purifiés se fait dans des tubes inclinés contenant le milieu MSH solide, on ensemence les isolats en strie sur la gélose des tubes à vice. Les tubes sont incubés à température 40°C pendant 7 jours où l'apparition des colonies dans les tubes inclinées, puis on les conserve à température 4°C dans le réfrigérateur.



## **9. Etude morphologique:**

### **9.1 Etude macroscopique:**

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu solide. Elle est basée sur tous les critères observés à l'œil nu comme :

- La forme des colonies;
- La taille des colonies par la mesure du diamètre;
- La couleur;
- L'opacité;
- L'élévation;
- Le contour.

## **10. Étude de l'activité de protéase et amylase:**

On prépare des solutions bactériennes 9 ml d'eau saline à 15% avec l'inoculât, puis on calcule la densité optique à (680 nm) de chaque solution de façon que la (DO) sera comprise entre 0.2 et 0.5 de chaque solution est met dans des flacons qui contient (40 ml) de milieu minimum liquide (milieu MSH à 0.25 g extrait de levure), additionnée de lait écrémé 1% (pour 500 ml on ajoute 5 ml lait écrémé). En effectue chaque jour et pendant 6 jours des lectures au spectrophotomètre à 680 nm.

On prend 1 ml après chaque lecture et les conserve dans des micro-tubes à -20°C (tube Eppendroff).

Les variations en DO sont tracées dans une courbe d'étalonnage, figure (N°15)

- ❖ Même protocole de la protéase a été effectué pour l'amylase, sauf ici le substrat utilisé est l'amidon à 1%.

## **11. Mise en évidence de l'activité protéolytique:**

On prépare un milieu minimum semi solide (lait écrémé de 5% et à des concentrations des sels très petites et avec de l'agar 15g/l). Après la stérilisation on coule ce milieu dans des boites de pétri (On laisse 1 jour pour une bonne solidification des géloses). On procède à une perforation des puits sur les milieux de cultures (5 puits dans chaque boite de pétri, un puit pour chaque prélèvement). Après centrifugation (à 4°C avec 3000 tour/s pendant 20 min) de la solution bactérienne déjà conservée on prend le surnageant et on le met dans les puits effectués auparavant dans les milieux de culture.

## **12. Mise en évidence de l'activité amylolytique:**

Même protocole de la protéase a été effectué pour l'amylase, sauf ici le substrat utilisé est l'amidon. Il est additionné au milieu de culture à raison de 1%.

La lecture se fait après addition du Lugol qui réagit avec l'amidon (donner une couleur bleue violet).

## **Chapitre 3: Résultats et discussion**

---

## 1. Analyses physicochimiques des échantillons:

Les résultats des paramètres physico-chimiques des souches sélectionnées à partir de la rocher de sel sont résumés dans le tableau 08.

Les paramètres étudiés montrent une variabilité d'un échantillon à l'autre. Les résultats montrent que les pH varient de 6,89 à 7. Cette valeur de pH est proche de celle des lacs Himalatt (**Boutaiba et al, 2011**), la mesure du pH est en relation étroite avec la température et la conductivité (**Rodier, 1996**). La mesure du pH des différents échantillons montre qu'il s'agit de souches neutrophiles.

**Tableau 08:** la valeur des paramètres physico-chimiques mesurés dans la zone d'étude (Rocher de Sel).

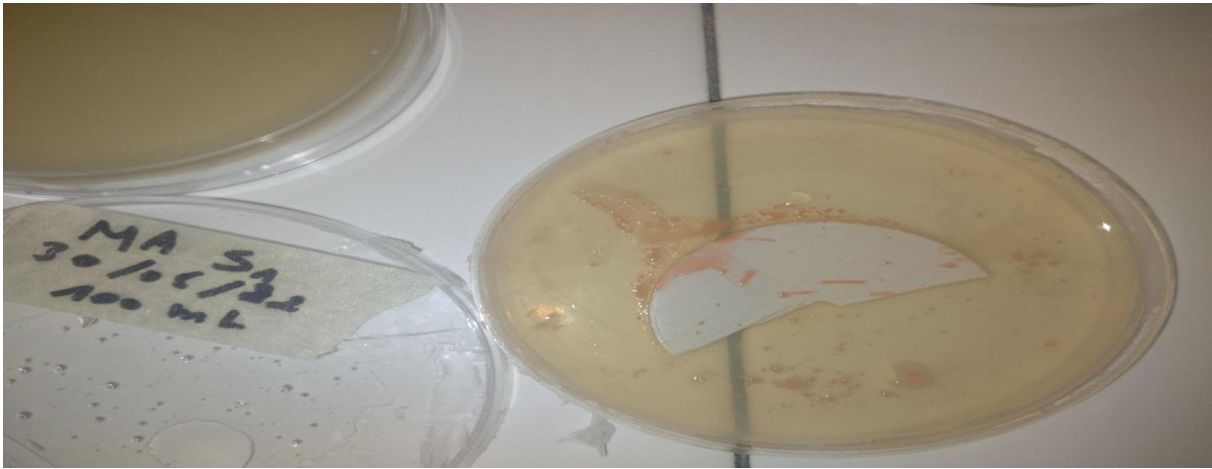
Sources	pH	Humidité	Conductivité (ms/cm)	Température (°C)	
				De l'air	Dans l'eau
S1	6,89	53,9	136,9	17,6*	18
S2	6,89	47,7	nd	20,6*	18
S4	7	27,3	nd	33,5**	25,5

nd: non déterminé. \* Température prise le matin. \*\* Température prise le soir

## 2. Croissance des bactéries halophiles:

Après 8 jours d'incubation, on a remarqué l'apparition des colonies, dans des boîtes Pétri.

La croissance des souches signifie que le milieu MSH est un milieu qui rassemble beaucoup les milieux des halophiles, car il contient les composants nécessaires à la croissance bactérienne, comme NaCl, MgSO<sub>4</sub>, KCl (**Hacène et al, 2004**), et La température d'incubation de 40°C est très convenable à la croissance de souches halophiles (Figure13).



**Figure N°13:** L'apparition de colonies dans les boîtes Pétri (source 1).

### **3. Caractères morphologiques**

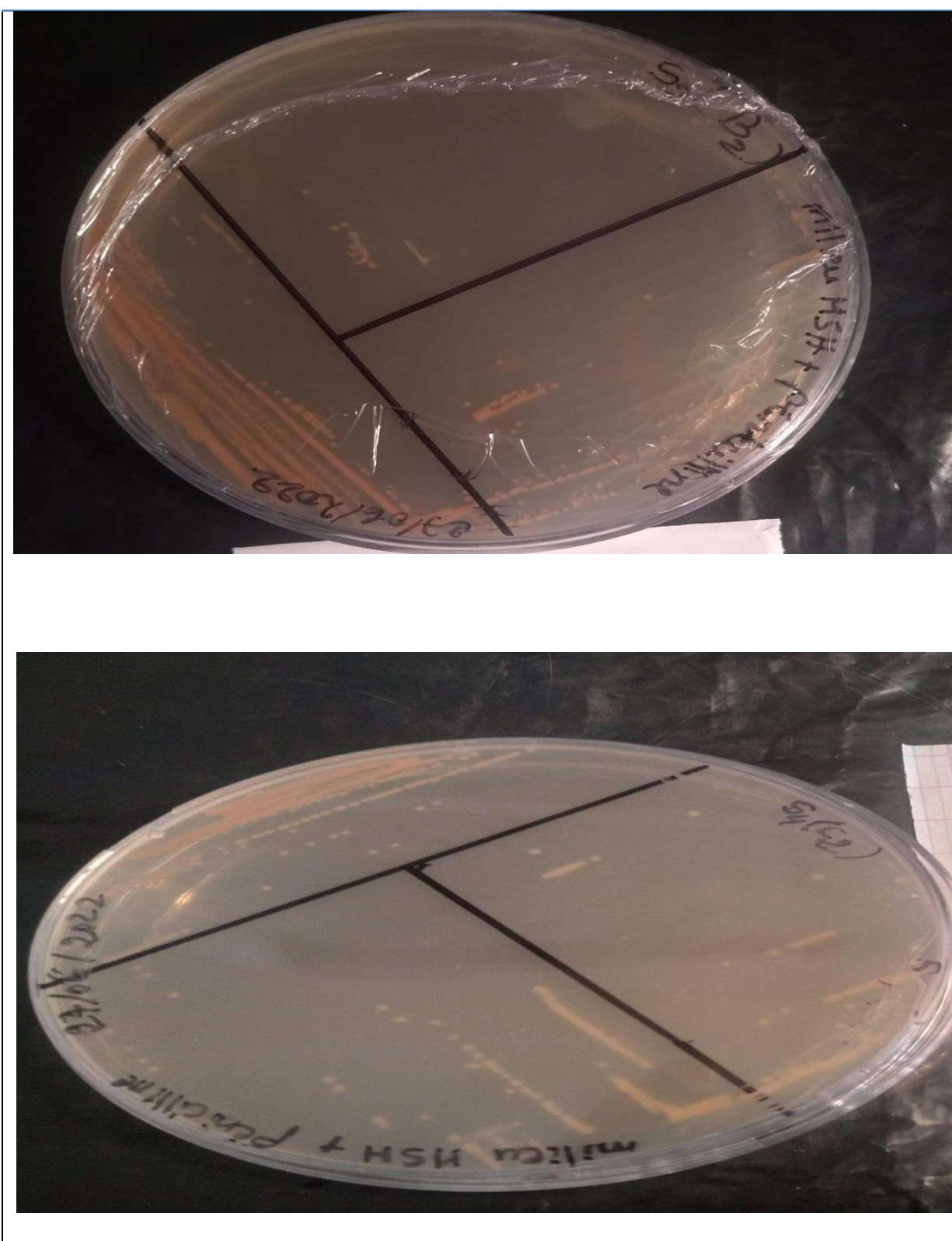
Les résultats de l'examen macroscopique des souches sélectionnées à partir de la rocher de sel sont résumés dans le tableau 09.

L'analyse des résultats montre que la plupart des colonies sont de couleur rouge-orangé. Ce type de pigmentation selon **Grant et al., (2001)** ; **Oren et Rodriguez-Valera, (2001)** est un trait caractéristique des Archaea halophiles extrême dû à un pigment de type caroténoïde.

De point de vue morphologique les colonies sont de petites tailles < 2mm, visqueuses a bords réguliers et convexe. Dans la source S1 les isolats sont de couleur orange entre claire et foncé elles sont opaques; la S1PA4 est une soucheensemencée dans un milieu MSH avec antibiotique ce sont des souches transparentes. Les isolats de la source S2 sont aussi de couleur orange entre claire et foncé, les souches S2B1 et S2PB3 ont des colonies opaques; les colonies des isolats S2B2 et S2PB4 sont transparentes. Dans la source S4 les isolats ont des colonies transparentes de couleur soit orange claire ou crémeuse. au total donc on a pu isoler et distinguer 10 isolats répartis sur les trois sources dont 4 au niveau de la source S1, 4 dans la source S2 et enfin 02 dans la source S3.

**Tableau N°09:** Aspect macroscopique des isolats.

Source	Souche	couleur	Opacité	consistance	contour	Élévation	Diamètre (mm)
S1	S1 A1	Orange foncé	Opaque	Visqueuse	Régulier	Convexe	0,9
	S1 A2	Orange claire	Opaque	Visqueuse	Régulier	Convexe	1,49
	S1 A3	Orange foncé	Opaque	Visqueuse	Régulier	Convexe	1,13
	S1PA4	Orange	Transparent	Visqueuse	Régulier	Convexe	1,76
S2	S2 B1	Orange	Opaque	Visqueuse	Régulier	Convexe	1
	S2 B2	Orange foncé	Transparent	Visqueuse	Régulier	Convexe	0,6
	S2PB3	Orange	Opaque	Visqueuse	Régulier	Convexe	1,36
	S2PB4	Orange claire	Transparent	Visqueuse	Régulier	Convexe	1,07
S4	S4 C1	Orange claire	Transparent	Visqueuse	Régulier	Convexe	1,08
	S4PC2	crème	Transparent	Visqueuse	Régulier	Convexe	0,74



**Figure N°14** : Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur le milieu MSH par la méthode des quadrants.

## 4. Criblage des activités protéase et amylase:

### 4.1 Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique:

L'observation des résultats de cinétique de la croissance bactérienne et de la production réalisée pendant six jours permet de déduire que les bactéries halophiles ont une activité protéolytique satisfaisante. En effet, les puits étaient entourés d'un halo clair indiquant la dégradation de la caséine du lait par la protéase et donc de son utilisation comme substrat de croissance par la souche productrice de l'enzyme. (Figure 19). Cette caséine (groupe protéique qui précipite à pH=4,6 à 20°C) représentent environ 80% des protéines totales du lait, ce sont des polypeptides phosphorés associés surtout à des constituants minéraux de manière à former des micelles de phospho-caséinate de calcium (Roc, 2001 ; Fox et al. 2000-2004; Chandan, 2006). Dans cette étape on a utilisé les surnageant après centrifugation des solutions bactériennes conservées pour faire l'étape de lecture des (DO), ce qui va nous montrer que l'activité protéolytique de nos échantillons est une activité exocellulaire. Il a est noté que les isolats présentent leur capacité de croissance et de production enzymatique avec une importance différente,

L'activité protéolytique qui s'est manifestée est représentée par la figure 15:

- l'isolat S1 PA4 affiche une bonne croissance DO =0,279nm au bout du 3<sup>ème</sup> jour correspond à la phase exponentielle et la valeur maximale de production est un diamètre de 1.4mm
- l'isolat S2 B1 au bout du 3<sup>ème</sup> jour, affiche une DO =0,269nm et un diamètre de 1.2mm.
- l'isolat S1 A2 au bout du 3<sup>ème</sup> jour, affiche une DO =0,216 nm et la valeur maximale de production est un diamètre de 1.2mm.

A travers les résultats de mesure de la densité optique, on constate que les différents isolats ont subi une croissance durant les trois premiers jours (phase exponentielle), après cette période, on constate une stabilisation de la croissance (phase stationnaire). La décroissance des isolats s'explique par la diminution du substrat et la mortalité des cellules. On remarque la production de la protéase a eu lieu à partir du premier jour (figure17), ce qui peut être expliqué par la production de la protéase pour dégrader la caséine existant dans le milieu et l'utiliser comme source de carbone durant leurs périodes de croissance et de développement.

Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Gupta et al., 2002; Sandhya et al., 2005).



## 4.2 Cinétique de croissance et de production de l'activité amylolytique:

De plus, la même procédure a été réalisée pour la cinétique de l'activité amylolytique des 2 isolats sur 6 jours. Les résultats obtenus (Figure 16) sont les suivants:

- l'isolat S1 PA4 affiche une bonne croissance avec une DO à 680 nm de 0,195 (Figure 16) . Cependant l'activité amylase sur milieu solide se traduit par un diamètre de dégradation de l'amidon de 3.1mm, alors qu'en milieu liquide elle est de 3.4 (figure 21 et22).
- l'isolat S1 A1, sa DO de croissance est de 0,125 nm (figure 16), alors que son activité amylase affiche des diamètres de 2.7 et 3.5 mm sur milieu solide et liquide respectivement.

Les 2 isolats ont donc une croissance rapide du fait d'avoir dégradé le substrat comme seule source de carbone et avec production de l'amylase en abondance. Ce résultat est observé après l'obtention d'une meilleure croissance de l'isolat S1 PA4 par rapport à l'isolat S1 A1. (Tableau 10)

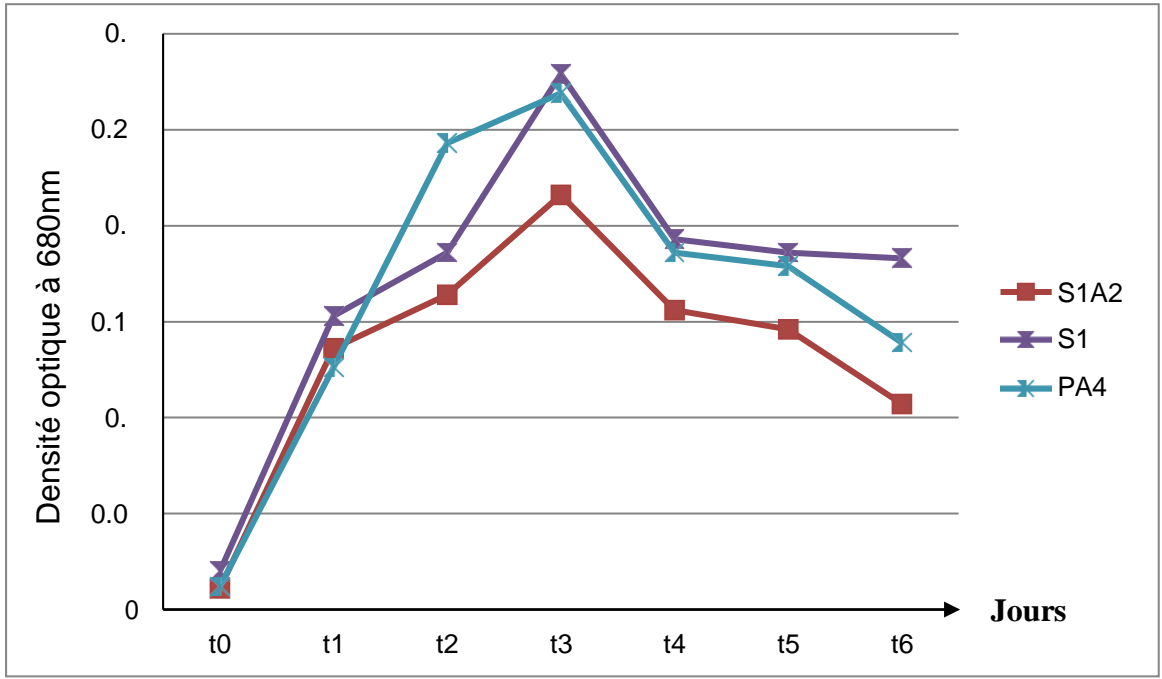
Enfin et d'après les résultats du criblage des activités amylases et protéase qui a été effectué sur dix isolats, il apparaît que l'isolat PA4 se distingue des autres isolats par la présence des deux activités en même temps (figure 17 et 18) et (figure 21 et 22). Il est à noter aussi que les deux activités protéase et amylase sont inductible et exocellulaire.

**Tableau 10:** Activité protéase sur milieu minimum MSH solide et liquide

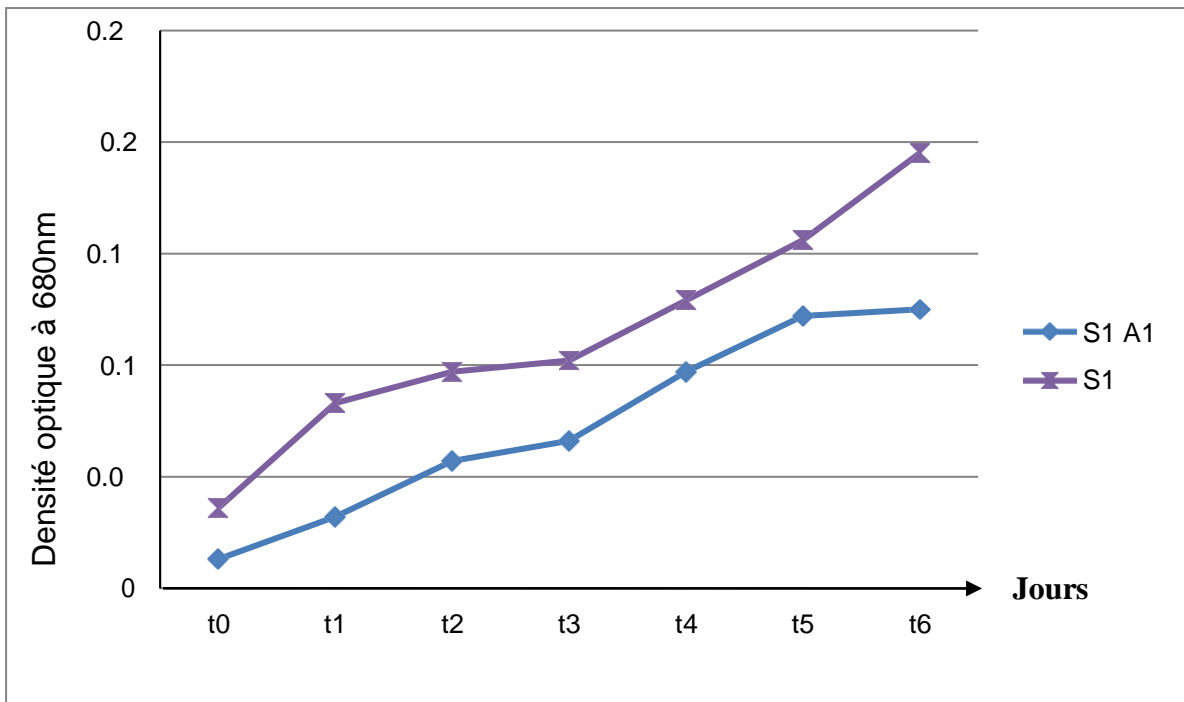
Origine de l'isolat (source S)	S1	S1 (+ATB)	S2	S1	S1 (+ATB)	S2	S2 (+ATB)	S2 (+ATB)	S3	S3 (+ATB)
<b>Isolat</b>	<b>A2</b>	<b>PA4</b>	<b>B1</b>	<b>A1</b>	<b>PA3</b>	<b>B2</b>	<b>PB3</b>	<b>PB4</b>	<b>C1</b>	<b>PC2</b>
<b>Milieu liquide Diamètre en cm</b>	<b>1.2</b>	<b>1.4</b>	<b>1.2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Milieu solide Diamètre en cm</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**Tableau 11:** Activité amylase sur milieu minimum MSH solide et liquide

Origine de l'isolat (source S)	S1	S1 (+ATB)	S2	S1	S1 (+ATB)	S2	S2 (+ATB)	S2 (+ATB)	S3	S3 (+ATB)
<b>Isolat</b>	<b>A2</b>	<b>PA4</b>	<b>B1</b>	<b>A1</b>	<b>PA3</b>	<b>B2</b>	<b>PB3</b>	<b>PB4</b>	<b>C1</b>	<b>PC2</b>
<b>Milieu liquide Diamètre en cm</b>	<b>-</b>	<b>3.4</b>	<b>-</b>	<b>3.5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Milieu solide Diamètre en cm</b>	<b>-</b>	<b>3.1</b>	<b>-</b>	<b>2.7</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>



**Figure 15:** Cinétique de croissance des 3 isolats sélectionnés d'activité protéolytique.



**Figure 16:** Cinétique de croissance des 2 isolats sélectionnés d'activité amylolytique.

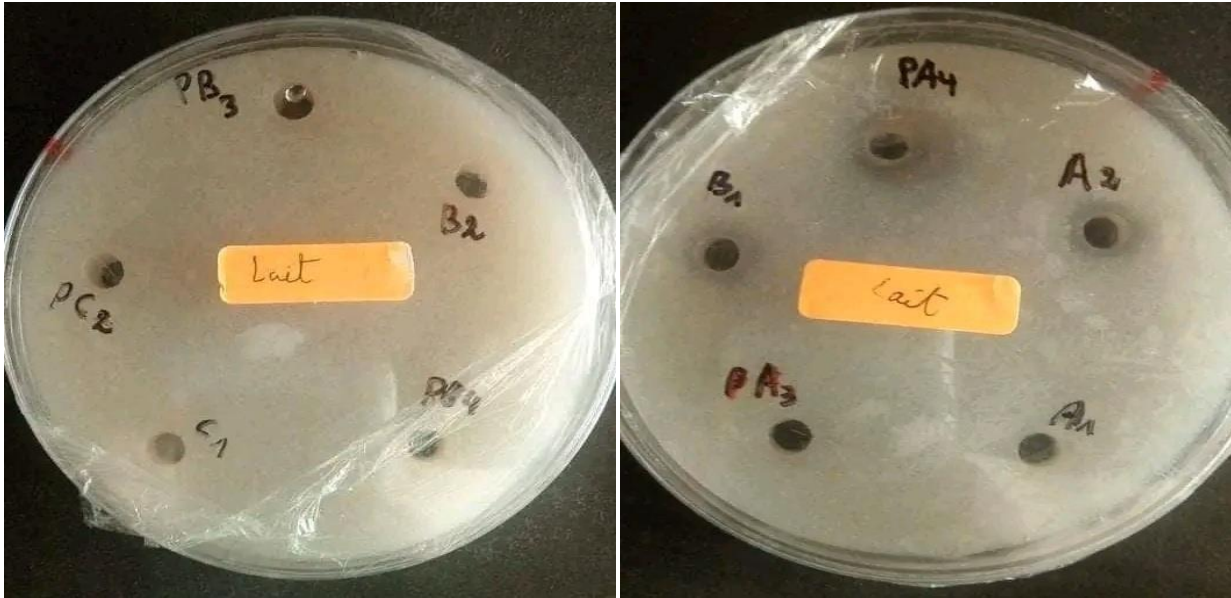
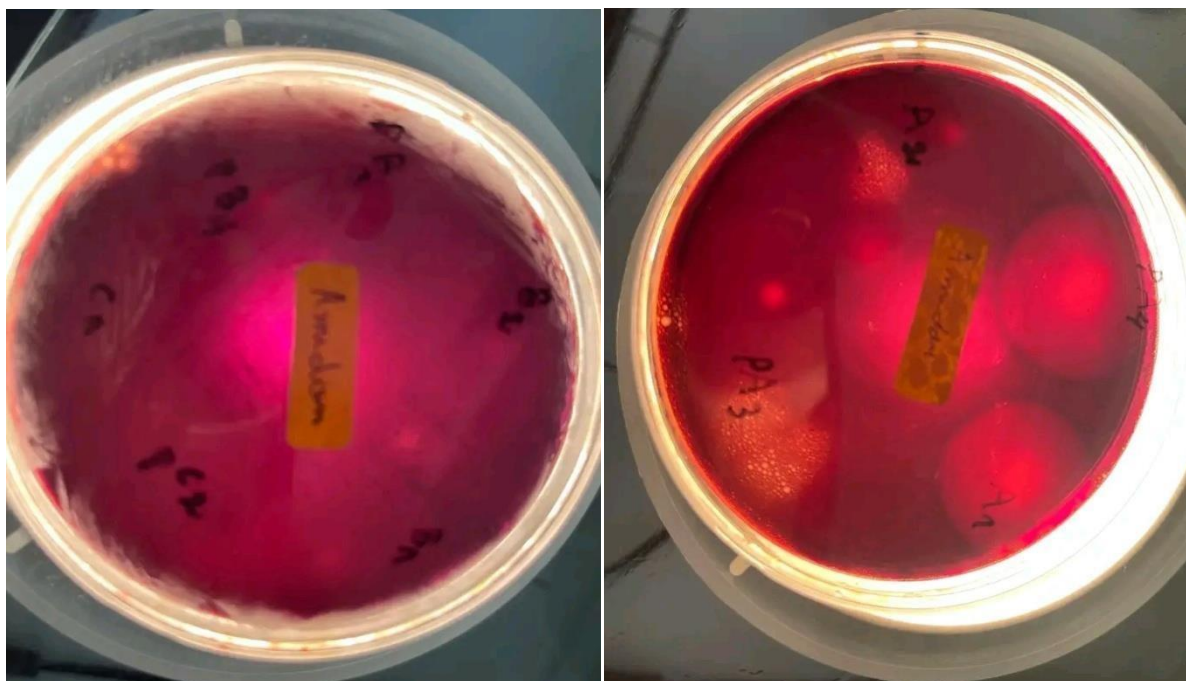


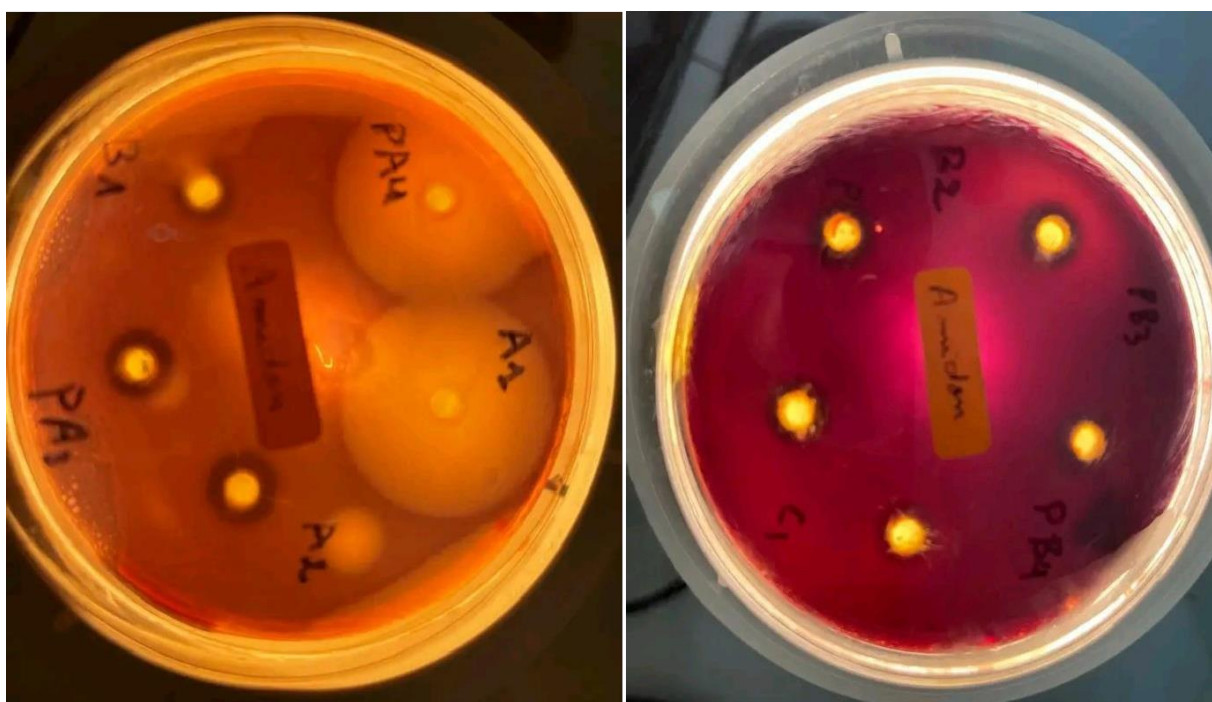
Figure N°17: Production de l'activité protéase sur culture liquide.



Figure N°18: Production d'activité protéase sur culture solide



**Figure N°19:** Production de l'activité amylase sur culture solide



**Figure N°20:** Production de l'activité amylase sur culture liquide

# Conclusion

Le travail effectué consiste à l'isolement, la purification mais aussi à mettre en évidence l'activité hydrolase (protéase et amylase) des souches halophiles isolées à partir d'un biotope extrême qui est Le Rocher de Sel (Hadjer Elmelh).

Les cultures des prélèvements sur milieu MSH ont permis d'isoler dix souches différentes, qui ont des colonies rondes, à surface convexe, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 0.6 à 1.7 mm. Presque toutes les souches forment sur milieux solides des colonies orange. Une étude taxonomique et physiologique plus approfondie s'avère indispensable pour classer ces isolats.

La recherche des activités hydrolytiques extracellulaires a été effectuée sur deux substrats: l'amidon, et le lait écrémé, pour la détermination des activités amylolytique, et protéolytique respectivement. Trois souches montrent une activité protéolytique en particulier l'activité caséinolytique, et deux autres souches montrent une activité amylolytique. La souche (S1PA4) a exprimé les deux activités protéolytique et amylolytique en même temps. Les 5 souches restantes sont incapables de produire ni la protéase, ni l'amylase.

Les halophiles sont potentiellement productrices d'hydrolases notamment les protéases et les amylases qui peuvent être utilisées en bio-industrie.

## Références bibliographiques

**AHMAD.J., et HELLEBUST J.A.1984.** Osmoregulation in the extremely auryhaline micro-alga *Chlorella autotrophica*. *Plant.Physiol.***74:1010-1015.**

Arnaud Chatonnet, David Fairlie, Christopher M. Overall, Neil Rawlings, Christopher Southan, Anthony J. Turner. Peptidases and proteinases. (page consulté le 18/06/2022). IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, [En ligne]. Adresse URL:

<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=759>.

**BENLOCH S., MARTÍNEZ-MURCIA A.J., RODRÍGUEZ-VALERA F. 1995.** Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 574–581.

**BORSODI A.K., FELFOLDI T., MATHE I., BOGNAR V., KNAB M., KRETT G., JURECSKA L., TOTH E.M., MARIALIGETI K. 2013.** Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities inhabiting the saline Lake Red located in Romania Sovata. *Extremophiles*. **17: 87–98.**

**BOUDJEMAI A. (2020).** Potentiels biotechnologiques des bactéries halophiles. Mémoire de fin d'étude. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université de TIZI-OUZOU.

**BOUTAIBA .S, HACENE. H, BIDLE. K.A, MAUPIN-FURLOW. J.A., 2011.** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Aneur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J of Arid Environments*, pp. 1-8.

**BROWN A. 1976.** Microbial water stress, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 40: 803-846.

**BURNS D.G., CAMAKARIS H.M., JANSSEN P.H., DYALL-SMITH M.L. 2004.** Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5258-5265.

**CALIMLIOGLU B, ARGHA K.Y. (2014).** Proteins from halophilic bacteria: purification and their applications. *Protein Purification-Principles and Trends*. Concept Press Ltd, pp. 1-23.

**COTON T. M., WITTE L. R., NGYUEN H. D., BUCHHEIM J. A., BUCHHEIM M. A., AND SCHNEEGURT M.A., 2004.** Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology*. 48: 449-462.

**CSONKA, L.N. 1989.** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*53:121-147.

**DASSARMA P, COKER J.A, HUSE V, DASSARMA S. (2010).** Halophiles, industrial applications. *Encyclo Ind Biotechnol: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. 1–43. detectable endoglucanases, exoglucanases and  $\alpha$ -glucosidases. *Eur J Biochem* 146: 301-308.

**DASSARMA S. et ARORA P., 2002.** Halophiles. London. Nature publishing group. E.L.S., 8 :458 – 466.

- DASSARMA S, DASSARMA P. 2016.** Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25: 120-126.
- D'ALESSANDRO C.P., DE CASTRO R.F., GIMENEZ M.I., PAGGI R.A. (2006).** Effect of nutritional condition on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett Appl Microbiol* 44: 265-267 .
- DELGADO-GARCIA, M., VALDIVIA-URDIALES, B., AGUILAR-GONZALEZ, C. N., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., RODRIGUEZ-HERRERA, R. 2012.** Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13), 2575–2580.
- EBEL C., MADERN D., ET ZACCAI G. (2004).** Molecular adaptation of halophilic proteins. *Extremophiles*, 2:1-7.
- 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) *Saline Systems*, 1:8.
- EDGERTON M.E ET BRIMBLECOME P., (1981) –** Thermodynamics of halobacterial environments. *Can J Microbiol*, 27: 899-909.
- ENACHEM, KAMEKURAM. 2010.** Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 47-59.
- FARIDAH N, SUHARTI S. (2021).** Characterization of extracellular protease from halophilic microbes isolated from Bledug Kuwu, Grobogan, Central Java. *AIP Conference Proceedings*, 2353(1).
- 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. 1993.** Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water- solute interaction, stress protection, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 49: 487- 496.
- GALINSKI, E. A. 1995.** Osmoadaptation in bacteria. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 37, pp. 273-328). Academic Press.
- GAVRIELI I., MICHAEL B., AND YUCEF Y., 1999.** The Dead Sea A terminal lake in the dead sea rift: A short overview. In: *Microbiology and Biochemistry of hypersaline environments*. CRC press. London, pp. 121-127.
- GHOSH S., KUMAR S., KUMAR KHARE S. 2019.** Microbial Diversity of Saline Habitats: An Overview of Biotechnological Applications. In: *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions*, Springer, 65-92.
- WENDY A. GOOD, PAUL A. HARTMAN. (1970).** *Properties of the Amylase from Halobacterium halobium*. *Bacterioogyl*, 104(1): 601–603.
- GOPINATH S.C.B, ANBU P, ARSHAD M.K.M, LAKSHMIPRIYA T, VOON C.H, HASHIM U, CHINNI S.V. (2017).** Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed research*



international, 2017.

**GRANT, W. D., GEMMELL, R. T. & MCGENITY, T. J. 1998.** Halobacteria: the evidence for longevity. *Extremophiles*, 2, 279-287.

**GRANT W. D. 2004.** Life at low water activity. *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 1249-1267. **GUPTA S, SHARMA P, DEV K, SOURIRAJAN A. 2016.** Halophilic Bacteria of Lunsu Produce an Array of Industrially Important Enzymes with Salt Tolerant Activity. *Biochemistry Research International*, 2016.

**HACENE H., FATIMA R., NAILA C., BOUTAIBA S., TEJ B., BARATTI J.C., OLLIVIER B., 2004.** Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara. *J. And. Environ.*, 58: 273-284.

**HASSANI-BELKACEM I.I., 2015** – Etudes des archaea halophiles et *hydrocarbonoclastes isolées des zones arides du Sahara algérien*. Thèse doctorat, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, 163p.

**JORQUERA M.A., GRAETHER S.P., MARUYAMA F. (2019).** Editorial: Bioprospecting and Biotechnology of Extremophiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*,

**KARAN R, CAPES M.D, DASSARMA S. 2012.** Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic Biosystems*, 8:1-4.

**KARBALAEI-HEIDARI HR, AMOOZEGAR MA, HAJIGHASEMI M, ZIAEE AA, VENTOSA A. (2009).** Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(1):21-27.

**KAURICHEV, I. S. 1980.** *Practicas de Edofologia*. Mir Publishers, Moscow.

**KEMPF, B., ET BREMER, E. 1998.** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170, 319–330.

**KOCH, A.L. 1982.** On the growth and form of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128:2527-2540.

**Kumar S, Grewal J, Sadaf A, Hemamalini R, Khar S.K. (2016).** Halophiles as a source of polyextremophilic  $\alpha$ -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2(1): 1-26.

**KUNTE H., TRÜPER H., ET STAN-LOTTER H. 2002.** *Halophilic Microorganisms in Astrobiology "The Quest for the Conditions of Life"*, Berlin, Springer.

**KUSHNER D.J. 1993.** Growth and nutrition of halophilic bacteria. In: *The biology of halophilic bacteria*. Vreeland R H, Hochstein L I, editors. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc. pp.87-103.

**LARSEN, H. 1962.** Halophilism. In *The Bacteria: a treatise on structure and function*. Volume IV. Eds. I. C. Gunsalus & R. Y. Stanier. pp. 297-342. Academic Press Inc, New York.

**LEVY, Y. 1980.** Seasonal and long range changes in oxygen and hydrogen sulfide concentration in the Dead Sea. Report M G /9/90, Ministry of energy and infrastructure, Geological survey of Israel.

**LITCHFIELD C.D., GILLEVET P.M. 2002.** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 48-55.



- LITCHFIELD, C.D.1998.** Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & Planetary Science* 33,813-819.
- LIZAMA C., MONTEOLIVA-SANCHEZ M., PRADO B., RAMOS CORMENZANA A., WECKESSER J., CAMPOS V., 2001.** Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the Salar de Atacama, Chile. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 464-474.
- MADERND.,EBELC.ANDZACCAIG.2000.** Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4, 91-98.
- MARTY V. 2011.** Adaptation de l'Archaea halophile halobacterium salinarum aux stress environnementaux: mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire. Thèse de Doctorat. Faculté de Biologie Structurale. Université de Grenoble Français.
- MCGENITY T.J., GEMMELL T.N., GRANT W.D ET STAN-LOTTER H., 2000** Microorganisms from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev*24, 263-290.
- MOBINI-DEHKORDI M, JAVAN F.A. (2012).** Application of alpha-amylase in biotechnology. *Biology and today's world*, 1(1):39-50.
- MORENO M.D.L., GARCIA M.T., VENTOSA A., MELLADO E. (2009).** Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and proteaseproducing extreme halophile. *FEMS Microbiol Ecol* 68: 59-71.
- NORDBERG P., Von Hofsten B. (1969).** Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J Gen Microbiol* 55: 251-256.
- OLLIVIER B., CAUMETTE P., GARCIA J. L. AND MAH R. A. 1994.** Anaerobic bacteria from hypersalin environments. *Microbiology Reviews* 58, (1), 27-38.
- OREN, A. 1993.** Availability, uptake, and turnover of glycerol in hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*12:15-23.
- OREN, A. 2001.** The bioenergetics basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* 466,61-72.
- OREN A., 2002** – Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Botechnol* , 28 :56-63.
- OREN A., 2006** – Life at High Salt Concentrations. *Prokaryotes*, 2: 263–282.
- OREN A. 2008.** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:2.
- OREN A. 2010.** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31:8-9,825-834.
- PARRY J.L., QUAYLE W., HENSHAW T., 2002.** The biology and evolution of Antarctic saline lakes in relation to salinity and trophic. *Polar Biol.*, 25:542-552.
- PATEL S, SARAF, M. (2015).** Perspectives and application of halophilic enzymes. In *Halophiles* (pp. 403-419).Springer, Chap.

**PEDUZZI R., TONOLLA M., BOUCHER-RODONI R. (2006).** Milieux extrêmes: Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques: 9

PERRIN, Jean-François.( mise à jour 2009/2021). EC 3. Hydrolase Nomenclature, [En ligne]. Adresse URL: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/intro.html> .

**PÉREZ-FILLOL M. ET RODRIGUEZ-VALERA F. 1986.** Potassium ion accumulation in cells of different halobacteria, PRONADISA: Reactivos de Calidad Internacional, 2:73-80.

**POR F. D., 1980.** A Classification of hypersaline waters, based on trophic criteria. Mar. Ecol.,1:121-131.

**POST F. J., 1981.** Microbiology of the Great Salt Lake north arm. Hydrobiologia., 81:59-69.

**RAINEY, F., ZHILINA, T., BULIGYNA, E., STACKEBRANDT, E., TOUROVA, T. & ZAVARZIN, G. 1995.** The taxonomic statut of the fermentative halophilic anaerobic bacteria. Anaerobe 1,185-189.

**ROBERTS M.F. 2005.** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline Systems,1(5):1-30.

**RODRÍGUEZ-VALERA, F. 1988.** Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In:F. Rodríguez-Valera (ed.). Halophilic Bacteria. CRC Press, Boca Raton, pp.3–30.

**ROSS H.N., COLLINS M.D., TINDALL B.J., GRANT W.D., 1986.** A rapid procedure for the detection of archaeobacterial lipids in halophilic bacteria. Journal of General Microbiology 123: 165–173.

**ROUSSEL E.G., CAMBON BONAVIDA M-A., QUERELLOU J., CRAGG B.A., WEBSTER G., PRIEUR D., PARKES R.G.2008.** Extending the subsea-floor biosphere. Science, 320 (5879),1046.

**SATYANARAYANA T., JOHRI B.N., PRAKASH A. 2012.** Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology. Springer, Netherlands, India.

**SETATI M.E. (2010).** Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/ halotolerant eubacteria. Afr J Biotechnol 9 (11): 1555-1560.

**SHUKLA E, BENDRE A.D, GAIKWAD S.M. 2022.** Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes. Hydrolases .chap.

**SHRIVASTAVA S. (2020).** Industrial Applications of Glycoside Hydrolases. India. 259 p.

**TALON R, COUELLE N, MADERN D, GIRARD E. 2014.** An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. Front Microbiol, 5(66).

**TSSAI S.C . (2003).** An Introduction to Computational Biochemistry. Canada. 368 p.

**VENTOSA, A., NIETO, J. J. ET OREN, A. 1998.** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62(2), 504-544.

**VENTOSA A ET JJ NIETO. 1995.** Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. World J Microbiol Biotechnol 11: 85 – 9

**VENTOSA, A., MELLADO, E., SANCHEZ-PORRO, C., MARQUEZ, M. C. 2008.** Halophilic And halotolerant microorganisms from soils. In *Microbiology of extreme soils* (pp.87-115). Springer, Berlin, Heidelberg.

**TIQUIA S. M., DAVIS D., HADID H., KASPARIAN S., ISMAIL M., SAHLY R., SHIM J., SINGH S. AND MURRAY K. S. 2007.** Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of southeastern Michigan. *Environmental Technology*, Vol. 28.297-307.

**YACHAI M. 2009.** Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thèse de Doctorat, université de Prince of Songkla.

**YOON J. H., KANG K. H. ET 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.

**YOUSSEFN.H., ASHLOCK-SAVAGEK.N.,ELSHAHEM. 2012.** Phylogenetic diversities and community structure of members of the extremely halophilic archaea (order Halobacteriales) in multiple saline sediment habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 78,1332-1344.

**ZAFRILLA B., MARTINEZ-ESPINOSA R. M., ALONSO M. A. AND BONETE M. J. 2010.** Biodiversity of Archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopó Valley, Spain. *Saline Systems*. 6: 10.

**ZALAR P., DE HOOG S., GUNDE-CIMERMAN N. 1999.** *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Stud. Mycol.*, 43:57-62.

## **Les sites web**

**1/**[https://www.google.dz/search?q=Marais+salants+de+l%E2%80%99ile+de+R%C3%A9+en+France&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj4ysbt7\\_vdAhUIxoUKHXepCnkQ\\_AUIDigB&biw=1708&bih=921](https://www.google.dz/search?q=Marais+salants+de+l%E2%80%99ile+de+R%C3%A9+en+France&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj4ysbt7_vdAhUIxoUKHXepCnkQ_AUIDigB&biw=1708&bih=921)

**2/**[https://www.google.dz/search?q=Marais+salants+%C3%A0+Formentera+en+Espagne&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiY0Ze97vvdAhUDXRoKHY1DDO0Q\\_AUIDigB&biw=1708&bih=921](https://www.google.dz/search?q=Marais+salants+%C3%A0+Formentera+en+Espagne&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiY0Ze97vvdAhUDXRoKHY1DDO0Q_AUIDigB&biw=1708&bih=921)

**3/**[https://www.google.dz/search?q=la+Mer+Morte&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj4ysbt7\\_vdAhUIxoUKHXepCnkQ\\_AUIDigB&biw=1708&bih=921](https://www.google.dz/search?q=la+Mer+Morte&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj4ysbt7_vdAhUIxoUKHXepCnkQ_AUIDigB&biw=1708&bih=921)

**4/**[https://www.google.dz/search?q=Lac+Rose+Sal%C3%A9&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiI5cuw8PvdAhVNyxoKHWNEAEUQ\\_AUIDigB&biw=1708&bih=921](https://www.google.dz/search?q=Lac+Rose+Sal%C3%A9&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiI5cuw8PvdAhVNyxoKHWNEAEUQ_AUIDigB&biw=1708&bih=921)

# Annexes

## Annexe 01

### Matériel utilisé:

Agitateur-plaque chauffante

Agitateur

Autoclave 120°C

Bec bunsen

Balances analytique

Balance dépaillasse

Bain marie

Portoirs de tubes

Centrifugeuse

Chauffe ballon

Etuve

Incubateur à 40°C

Spectrophotomètre-Visible

Réfrigérateur

Hôte microbiologique

Pied à coulisse

Vortex

Loupe

Eprouvette graduée

Flacons

Barreaux magnétiques

Cuvette

Micropipette

Pipette pasteurs

Seringues

Spatules

Tubes Eppendorf

Erlenmeyers

Papier aluminium

Para film

Porte filtre Swinnex

Embouts jaunes

Embouts bleus

Boîtes Pétri

Tubes à essai

**Produits chimiques:**

Chlorure de sodium (NaCl)

Chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>)

Sulfate de magnésium (Mg SO<sub>4</sub>)

Chlorure de potassium (KCl)

Chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>)

Bromure de sodium (NaBr)

Bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>)

Extrait de levure

Agar

## Annexe 02

**Tableau N°01:** Les valeurs de la DO mesurée à 680 nm des dix souches bactériennes sur milieu MSH minimum liquide additionnée de 1% de lait écrémé.

<b>temps</b>	<b>t0</b>	<b>t 1</b>	<b>t 2</b>	<b>t 3</b>	<b>t 4</b>	<b>t 5</b>	<b>t 6</b>
<b>les souches</b>							
<b>S1 A1</b>	<b>0,033</b>	<b>0,046</b>	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>	<b>0,012</b>		
<b>S1 A2</b>	<b>0,011</b>	<b>0,136</b>	<b>0,164</b>	<b>0,216</b>	<b>0,156</b>	<b>0,146</b>	<b>0,107</b>
<b>S1 A3</b>	<b>0,028</b>	<b>0,008</b>	<b>0,006</b>	<b>0,016</b>			
<b>S1 PA4</b>	<b>0,020</b>	<b>0,153</b>	<b>0,186</b>	<b>0,279</b>	<b>0,193</b>	<b>0,186</b>	<b>0,183</b>
<b>S2 B1</b>	<b>0,012</b>	<b>0,126</b>	<b>0,243</b>	<b>0,269</b>	<b>0,186</b>	<b>0,179</b>	<b>0,139</b>
<b>S2 B2</b>	<b>0,010</b>	<b>0,129</b>	<b>0,068</b>	<b>0,021</b>			
<b>S2 PB3</b>	<b>0,009</b>	<b>0,012</b>	<b>0,026</b>	<b>0,017</b>			
<b>S2 PB4</b>	<b>0,026</b>	<b>0,053</b>	<b>0,044</b>	<b>0,031</b>			
<b>S4 C1</b>	<b>0,029</b>	<b>0,088</b>	<b>0,002</b>	<b>0,005</b>			
<b>S4 PC2</b>	<b>0,018</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,007</b>			

**Tableau N°02:** Les valeurs de la DO mesurée à 680 nm des dix souches bactériennes sur milieu MSH minimum liquide additionnée de 1% d'amidon.

<b>temps</b>	<b>t0</b>	<b>t 1</b>	<b>t 2</b>	<b>t 3</b>	<b>t 4</b>	<b>t 5</b>	<b>t 6</b>
<b>les souches</b>							
<b>S1 A1</b>	<b>0,013</b>	<b>0,032</b>	<b>0,057</b>	<b>0,066</b>	<b>0,097</b>	<b>0,122</b>	<b>0,125</b>
<b>S1 A2</b>	<b>0,046</b>	<b>0,016</b>	<b>0,003</b>				
<b>S1 A3</b>	<b>0,012</b>	<b>0,057</b>	<b>0,082</b>	<b>0,153</b>	<b>0,172</b>	<b>0,163</b>	<b>0,146</b>
<b>S1 PA4</b>	<b>0,036</b>	<b>0,083</b>	<b>0,097</b>	<b>0,102</b>	<b>0,129</b>	<b>0,156</b>	<b>0,195</b>
<b>S2 B1</b>	<b>0,042</b>	<b>0,033</b>	<b>0,027</b>	<b>0,022</b>			
<b>S2 B2</b>	<b>0,019</b>	<b>0,027</b>	<b>0,026</b>	<b>0,011</b>			
<b>S2 PB3</b>	<b>0,032</b>	<b>0,024</b>	<b>0,012</b>				
<b>S2 PB4</b>	<b>0,026</b>	<b>0,029</b>	<b>0,003</b>				
<b>S4 C1</b>	<b>0,029</b>	<b>0,005</b>					
<b>S4 PC2</b>	<b>0,018</b>	<b>0,009</b>	<b>0,006</b>				

## Résumé

Les microorganismes halophiles présentent une microflore particulière qui peuvent s'adapter à vivre dans des conditions extrêmes. Ces germes représentent une source de biomolécules intéressantes pour divers applications biotechnologique, parmi ces biomolécules on trouve les enzymes. Notre étude basée sur un criblage d'activités protéolytique et amylolytique chez des bactéries halophiles isolées du rocher de sel dans la wilaya de Djelfa. Un milieu de culture spécifique aux halophiles a servi à l'isolement et à la purification des isolats, dix souches obtenues. Les souches pures sont caractérisées macroscopiquement puis soumises à une recherche qualitative d'activités hydrolytiques. D'après les résultats obtenus, pas toutes les souches testées capable de produisant la protéase et l'amylase, il existe 2 souches productrices de la protéase, une souche produisant l'amylase et une souche produisant l'amylase et la protéase. Tandis que les 5 souches restantes n'ont montré aucune activité protéolytique ni amylolytique.

Mots clés : halophiles, criblage, protéase, amylase.

## Abstract

The halophilic microorganisms are a particular microflora which can adapt to live in extreme conditions. These microorganisms are a source of interesting biomolecules for various biotechnological applications, among these biomolecules which are enzymes.

Our study is based into screening the proteolytic and amylolytic activities in halophilic bacteria isolated from the salt rock in the wilaya of Djelfa. A culture medium specific to halophiles was used for the isolation and purification of the isolates. Ten strains were obtained. The strains pure are characterized macroscopically then subjected to a qualitative research of hydrolytic activities. According to the results obtained, not all strains tested are capable to producing the protease and amylase, there are 2 strains producing protease, one strain producing amylase and one strain producing amylase and protease. While the remaining 5 strains showed no proteolytic or amylolytic activity. Key words: Halophiles, screening, protease, amylase.

## المخلص

الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملح تمثل كائنات دقيقة مميزة حيث يمكنها التكيف للعيش في ظروف قاسية. تمثل هذه الكائنات الحية الدقيقة مصدرًا للجزيئات الحيوية المثيرة للاهتمام لتطبيقات التكنولوجيا الحيوية المختلفة، ومن بين هذه الجزيئات الحيوية نجد الإنزيمات. استندت دراستنا إلى فحص نشاط البروتياز و الأميلاز في البكتيريا المحبة للملحة المعزولة من حجر الملح في ولاية الجلفة. تم استخدام وسط زراعي خاص بالكائنات المحبة للملحة لعزل وتنقية العزلات وتم الحصول على عشر سلالات. يتم تمييز السلالات النقية بشكل مجهرى ثم إخضاعها للبحث النوعي لأنشطة التحليل المائي. وفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها ، ليست كل السلالات التي تم اختبارها قادرة على إنتاج البروتياز و الأميلاز ، هناك سلالتان تنتجان البروتياز ، وسلالة واحدة تنتج الأميلاز ، وسلالة واحدة تنتج الأميلاز و البروتياز. بينما لم تظهر السلالات الخمس المتبقية أي نشاط لانزيم البروتياز أو الأميلاز. الكلمات المفتاحية : المحبة للملحة, استقصاء, البروتياز, الأميلاز.