



الجمهورية الديمقراطية الشعبية الجزائرية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
جامعة زيان عاشور- الجلفة-
Université Ziane Achour-Djelfa-
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا
Département de biologie

Mémoire de Fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Les haloenzymes : propriétés, production et applications

Présenté par : Harfouche Salma Amina et Gacem Aicha

Soutenu le : 06 /09/2021.

DEVANT LE JURY :

Président : Ounissi. M M.A.A Univ. Djelfa

Examineur : Mostfaoui. A M.C.A Univ. Djelfa

Examineur : Gougue.F M.A.A Univ. Djelfa

Encadreur : Boutaiba Saad M.C.A Univ. Djelfa

Année Universitaire 2020/2021

Remerciement

Avant tout, nous remercions ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

On tient à remercier notre encadreur monsieur Boutaiba qui est comme notre père spirituel de science, pour ses orientations durant l'élaboration du travail et pour ses conseils scientifique.

On remercie aussi les membres du jury qui on accepté l'évaluation de cet ouvrage et de nous faire par de leurs remarque sûrement pertinentes

On remercie Mr Berrabah et Mr Belaouni pour leur conseils, leur énergie positive et de nous pousser pour voir la biologie de son coté amusant et mystérieux

Les mots ne seront jamais suffisants pour remercier tout ceux qui été présent de près ou de loin durant notre parcours, nos enseignants qui nous ont suivis le long de nos études pour leurs gentillesse, leurs précieux conseils, leur disponibilité et d'avoir fourni une aide, à nos amis avec qui nous avons passez nos beaux moments : Nadjet, Asma, Karim, Toufik et Youcef.

Dédicace

Je dédie ce travail à l'âme et la mémoire de ma mère

À ma très chère grand mère "Aïcha"

Qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse. Quoi que je fasse ou que je dise ; je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force.

À mon très cher père

Pour ta confiance ; ton soutien ; tes sacrifices et toutes les valeurs que tu as su m'inculquer .Tu as été toujours à mes côtés.

Ceux qui ont toujours été là pour moi, mon tout, mes frères

"Ayoub", " Tarek ", " Aziz" et " Oussama"

À mes oncles " Mohamed", "Aïssa", " Khaled", et " Abdelaziz"

À mes sœurs " Samira, Hayat, Naima, et Maria "

À Mon binôme et amie, Salma qui m'a beaucoup aidé à qui je dis bon courage et bonne continuation

À Tous mes amis(es) et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin surtout Toufik, Karim, Youcef, Dalila, Amel, Nadjet et Asma.

Aïcha

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À

Ma très chère mère qui m'a laissé croire en moi-même, d'être là à mes moments de faiblesses et de joies, aucun mot ne peut exprimer ma gratitude

À

Mon chère père, l'épaule sur la quelle je me suis appuyé, qui a fait de moi une femme dur qui a franchi toute obstacle dans son parcours mais en restant sa petite puce

À

*Mes piliers dans la vie mes frères qui sont toujours là pour moi :
Lamine, Djaber & Nail*

À

*Mes belles sœurs : Nawel & Boutheina
Et à ma puce Batoul & mon petit Abdallah.*

À

*Ma tante Djalila qui est une deuxième maman pour moi
Khaltou Rachida*

À

Mes deux sœurs Rabab et Nadja que ma mère n'a pas mis au monde

À

Mes amies : Hanane, Fatiha, Inès, Nadjet et Aicha.

Salma Amina

sommaire

Table de matières :

Introduction :.....	1
<i>chapitre 1: Ecologie des Halophiles</i>	
1. Les extrémophiles :.....	4
1.1. Définition :.....	4
1.2. Classification des extrémophiles :.....	4
2. les Archées halophiles :	5
3. Les halophiles :.....	6
3.1 Historique des Halophiles :.....	6
3.4.1 : caractère culturaux :.....	8
3.4.2 Caractère morphologique :.....	8
4. Environnement salin et hypersalin :	9
4.1 Les habitats thalassohalines :.....	9
4.2 les habitats athalassohalines:.....	10
4.3. Caractéristique physico-chimique des environnements hypersalins :	11
5. Taxonomie des halophiles :.....	13
6. Diversité phylogénétique des halophiles :	13
6.1. Halophiles du domaine Bacteria :	14
6.2. Halophiles du domaine Archaea :	15
6.3 Eucaryote halophiles :	16
<i>chapitre 2: Osmorégulation</i>	
1. Osmorégulation:	18
1.1 Généralité :	18
2. Conditions extrêmes et mécanismes d'adaptation :.....	20
3. Adaptation moléculaire à l'halophilisme :	23
3.1 Adaptation à la salinité par production d'osmoprotecteurs :.....	23
3.2 Adaptation à la salinité par accumulation de KCl :.....	27
4. Métabolisme:.....	29
<i>Chapitre 3 : les protéines et les enzymes halophiles</i>	
1. Les protéines halophiles:.....	31
1.1 Généralité.....	31

1.2 classification des enzymes.....	32
1.3 sélectivité enzymatique.....	33
2. Caractère structural et morphologique des haloenzymes :	33
2.2.1 La beta-galactosidase :.....	36
2.1.2. L'ADN ligase:	37
2.1.3. L'amylase :.....	37
2.1.4 Protéase :.....	37
2.1.5 Enzyme lipolytique :.....	38
3.2.1 Structure du site actif de la Laccase :	41
3.2.2 Mécanisme d'action de la Laccase :	42
4. Propriétés des haloenzymes:	43
5. Adaptation des enzymes halophiles à l'hypersalinité:.....	47
<i>chapitre 4: L'intérêt des Halophiles en biotechnologie</i>	
1. intérêt des halophiles dans la biotechnologie :	49
2. Production d'enzymes halophiles :.....	49
1.2.1 Les -amylases:	52
1.2.1.1. Classement des amylases :.....	52
1.2.1.2. Type d'amylase:	53
1.2.1.2. 1. L'alpha amylase :.....	53
1.2.1.2.2. La beta amylase :	53
1.2.1.2.3. La Glucoamylase :.....	53
1.2.2. Les protéases :	54
1.2.3. Les Enzymes lipolytiques :	54
1.2.3.1 .Les lipases :.....	54
1.2.3.2 Les estérases:.....	54
1.2.4 Les nucléases H :	55
12.5 Les cellulases :.....	55
2. Production de polymères :.....	55
3. Production de biosurfactants :.....	56
4. Production de substances antibactériennes :.....	56
5. production du biocarburant:	58

Conclusion

Annexe

Abréviation:

A° : Angstrom.

ADNr 16s : ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal.

ADNr : ADN codant pour l'ARN ribosomal.

ARNr 16s : Sous unité 16S de l'ARN ribosomal.

atm : Atmosphère.

A_w : activité de l'eau.

C° : Celsius.

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique.

LDH : Lactate déshydrogénase.

NaCl : Chlorure de Sodium.

nm : Nanomètre.

M : Molaire (g/mol)

MDH : Malate déshydrogénase.

Mpa : Méga pascale.

Pa : Pascale.

pH : Potentiel d'Hydrogène

PI : point isoélectrique.

PMSF : Florure de phénylméthylsulfonyle.

P/V : Poids à volume.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des deux types de morphologies d'haloarchées prise sous microscope électronique, on trouve à gauche <i>Haloferax volcanii</i> et à droite <i>Halobacterium salinarum</i>	9
Figure 2 : Habitat Thalassohalines, Photographie Satellite de Sebkha Halk El Menzel, Sousse, Tunisia, prise par NASA World Wind, OnEarth WMS global mosaicvisualcolour layer (Kharroub K.,2007).	10
Figure 3 : Habitats athalassohalines, photographie Satellite de la grande Sebkha d'Oran (Hachemi K.,2020).	11
Figure 4 : Diversité des halophiles dans l'arbre phylogénétique dans les trois domaines de la vie (Oren A., 2008).....	14
Figure 5 : Distribution au sein de l'arbre phylogénétique des microorganismes accumulant du KCl comme soluté osmotique unique ou principal.	19
Figure 6 : Schéma représentant la Stratégie «Salt-out» (Bergmann, 2015).....	24
Figure 7 : Représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité (Sleator& Hill, in Zadi Karam <i>et al.</i> , 2012).....	25
Figure8 : Schéma présentant la Stratégie « Salt-in ».....	28
Figure 9 : Représentation schématique des transporteurs membranaires de <i>Halobacterium salinarum</i> mettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire (vincent M, 2011)	28
Figure 10 : Dégradation du glucose et du fructose chez les Archaea halophiles extrêmes (Johnsenet <i>al.</i> 2001).....	29
Figure 11 : Structure tétramérique de la <i>hMDH</i> :.....	34
Figure 12 : Comparaison de la surface électrostatique résultant de la composition en acide aminés acido-basique de la surface d'une malate déshydrogénase acidophile et halophile.	35
Figure 13 : Comparaison des acides aminés acides et basique de surface dans la beta-galactosidases.	36
Figure 14 : Réaction de catalyse des triacylglycérols par les lipases	40
Figure 15 : les principaux réactions catalysés par les lipase (Reis., 2009).....	40
Figure 16: Schéma synthétique du centre catalytique de la laccase montrant les distance entre les différents atomes (Santhanam N, et al., 2011).....	42
Figure 17 : Structure 3D de l'enzyme laccase).....	43
Figure 18 :Distribution des points isoélectrique des protéines	44

Liste des tableaux :

Tableau 1 : les micro-organismes extrêmophiles et leur différents environnements de croissance.....	5
Tableau 2 : classification des microorganismes halophiles	7
Tableau 3 : Composition ionique d'environnement thalassohalins et athalassohalins.	12
Tableau 4 : conditions extrêmes des microorganismes appropriés.	22
Tableau 5 : Solutés organiques zwitterions et non chargés les plus fréquemment utilisé lors de l'osmoadaptation de type « low saltin ».....	26
Tableau 6 : liste des différentes souches et le nombre de protéines.....	31
Tableau 7 : Micro-organismes halophiles représentatifs.....	45
Tableau 8 : Microorganismes capables de produire des enzymes hydrolytiques isolés de différents environnements hypersalins	50
Tableau 9 : Présentant la classification des archaeocine	57

Introduction :

La vie habite tous lieux possibles sur Terre interagissant avec l'environnement et en lui-même (relations inter-espèces). Dans la nature, il est très rare qu'un biotope soit habité par une seule espèce. En règle générale, la plupart des écosystèmes contiennent des communautés liées fonctionnellement (Pikuta et *al.*, 2007). Au cours de l'évolution de la Terre, un certain nombre d'écosystèmes ont été formés. Ces écosystèmes diffèrent par la grande variété des facteurs physico-chimiques et biologiques qui composent notre environnement. Traditionnellement, le pH et la salinité sont considérés comme des extrêmes géochimiques, par opposition à la température, la pression et le rayonnement que l'on appelle les extrêmes physiques (Van den Burg 2003).

La vie sur Terre subsiste sur toute la gamme des concentrations de sel rencontrées dans les habitats naturels et anthropiques. Elle prospère dans les environnements d'eau douce, aux lacs hypersalins, et à d'autres environnements saturés de sel. Les environnements hypersalins ont une distribution cosmopolite sur notre planète, et ils sont représentés par les systèmes aquatiques, en particulier les lacs salés, ainsi que les sols salins (Rodriguez-Valera, 1988; Oren, 2002a, b; de la Haba et *al.*, 2011). Les micro-organismes qui vivent dans ce type d'habitats sont appelés halophiles.

Les espèces halophiles et hautement halotolérantes se trouvent dans chacun des trois domaines de la vie: Archaea, Bacteria et Eukarya. Aux concentrations de sel les plus élevées, les membres halophiles des Archaea forment généralement la composante principale de la communauté et, par conséquent, ils méritent un intérêt particulier. Les Archaea (initialement nommées Archaeobacteria) ont été proposées comme troisième domaine de la vie à la fin des années 1970 (Woese et Fox, 1977; Woese et *al.*, 1990). Sur la base d'analyses phylogénétiques, plusieurs phyla/division ont été proposées au sein du domaine: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thaumarchaeota* (Cavicchioli, 2011).

En outre, les halophiles sont capables de produire des composés bioactifs, des produits chimiques et différentes enzymes à des fins biotechnologiques. Certains des composés bioactifs présentent des activités différentes et ont été utilisés comme antioxydants, écrans solaires et antibiotiques (Hosseini Tafreshi et Shariati, 2009; Chen et *al.*, 2014; Waditee-

Sirisattha et *al.*, 2014). Récemment, les halophiles ont subi des manipulations génétiques pour permettre la production d'une large gamme de produits (Fu et *al.*, 2014).

De nombreuses études sur leurs capacités à synthétiser des quantités massives de produits chimiques tels que l'ectoïne, les hydroxyectoïnes, la glycine et la bétaine ont mis en lumière la production de stabilisants utiles de biomolécules et d'agents anti-stress (Pastor et *al.*, 2010). Ils sont capables d'accumuler des polyhydroxyalcoanoates (PHA), une famille de plastiques biodégradables.

Les halophiles possèdent des enzymes stables qui fonctionnent dans une salinité très élevée, une condition extrême qui conduit à la dénaturation, à l'agrégation et à la précipitation de la plupart des autres protéines. Les analyses génomiques et structurales ont établi que les enzymes des archées halophiles et de nombreuses bactéries halophiles sont chargées négativement en raison d'un excès d'acides aminés acides par rapport aux résidus basiques et d'une hydrophobicité altérée, ce qui améliore la solubilité et favorise la fonction dans des conditions de faible activité de l'eau. Ici, nous fournissons une mise à jour sur l'analyse bioinformatique récente des protéomes halophiles prédits ainsi que des études moléculaires expérimentales sur des enzymes halophiles individuelles. Les efforts récents sur la découverte et l'utilisation des halophiles et de leurs enzymes pour la biotechnologie, y compris les applications de biocarburants, sont également pris en compte.

De plus, de nombreux halophiles peuvent également produire des biosurfactants et des bioémulsifiants (Satpute, et *al.*, 2010). Ainsi, les halophiles ont de vastes applications biotechnologiques comme *Halomonas sp.* qui a été candidate à la production de divers produits utilisés dans diverses industries.

Dans ce contexte, notre objectif au cours de ce travail de mémoire a consisté à étudier un type particulier d'enzymes qui sont les haloenzymes, afin de comprendre les propriétés structurales et catalytiques de ces enzymes ainsi que leurs applications dans différents domaines des bioindustries.

Ce mémoire est une étude bibliographique non exhaustive et s'articule sur quatre chapitres.

Le premier traite l'écologie des halophiles, le deuxième est consacré à l'osmorégulation alors que le troisième et le quatrième chapitres illustrent les propriétés des haloenzymes et leurs mécanismes d'action ainsi que leur intérêt en bio-industrie.

Chapitre 1

Ecologie des Halophiles

1. Les extrêmophiles :

1.1. Définition :

Le terme extrêmophile est constitué du suffixe « phile » qui est philos en grec signifiant l'amour des milieux extrêmes (Gidding, L.A., 2013 et Rothschild, L.J., 2001). Ces microorganismes habitant les environnements extrêmes, ils ont des mécanismes qui leur permettent de survivre sous des conditions difficiles (pH, température élevée, pH extrêmes, salinité, pression et aridité) (Kohli, I., 2020 et Merino, N., 2019)

1.2. Classification des extrêmophiles :

En fonction des différents environnements extrêmes, les micro-organismes extrêmophiles sont classés dans le tableau 1 et pour qu'ils puissent survivre dans ces environnements ils acquièrent des caractéristiques structurelles et métaboliques (Gbriel Z, et *al.*, 2015).

Quelques exemples des types d'extrêmophiles sont répertoriés dans ce qui suit (Prieur., 2001 ; Pikuto, V.E., 2007) :

- Thermophile : un organisme qui se développe mieux à des températures élevées et que l'on trouve couramment dans des endroits chauds tels que le désert ;
- Psychrophile : un organisme qui se développe mieux à basse température ;
- Halophile : un organisme qui prospère dans des habitats à forte concentration de sel, tels que la mer et les lacs salés;
- Alcalophile : un organisme qui se développe dans un environnement alcalin;
- Acidophile : un organisme qui se développe dans un environnement acide;
- Barophile : un organisme qui prospère dans des conditions de haute pression et que l'on trouve couramment dans les habitats d'eau profonde;
- Xérophile : un organisme qui pousse dans une zone extrêmement aride comme le désert.

Tableau 1 : les micro-organismes extrêmophiles et leur différents environnements de croissance (Horikoshi K., 2011).

Micro-organismes extrêmophiles	Environnements favorables
Acidophile	pH <3
Alcaliphile	pH Au-dessus de 10
Halophile	Nécessite au moins 1M de sel
Hyperthermophile	T° >80 °C
Thermophile	T° (60 °C - 85 °C)
Eurypsychrophile (Psychrotolérant)	T° > 25°C aussi T° < 15°C
Sténopsychrophile (Psychrophiles)	T° (10°C -20°C)
Piézophiles	Pousse sous haute pression au-dessous de 400 atm
Endolithique	Pousse à l'intérieur des rochers
Hipolithe	Pousse sous les roches et les déserts froids
Oligotrophe	Capacité de vivre dans les milieux pauvres en nutriments
Radiorésistant	Tolérance à de fortes doses de rayonnement
Métallotolérant	Tolérance à des niveaux élevés de métaux lourds
Toxitolérant	Tolère des concentrations élevées d'agents toxiques (ex. solvants organiques)
xérophile	Pousse dans une faible disponibilité en eau, résistant à la dessiccation

2. les Archées halophiles :

En 1977, Woese et ses collaborateurs venaient de caractériser un groupe d'organismes aussi éloigné des Eucaryote et des Bactéries que ne peuvent l'être ces deux derniers groupes entre eux. D'abord prénommé Archéobactéries, car ces organismes semblaient archaïques, ce groupe fut ensuite appelé archée (Woese et *al.*, 1990).

Les archées halophiles extrêmes, c'est-à-dire pouvant croître exclusivement en présence de concentrations salines très élevées (entre 1,5 et 5 M NaCl) (Oren A, 2006) et dont leur

optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2M (20-25% NaCl) (Yachai, 2009). Les archaebactéries halophiles extrêmes occupent les écosystèmes à haute salinité, qualifiés d'extrêmes. Certaines espèces ne font que tolérer la salinité, tandis que d'autres ont besoin, pour croître, d'un environnement dix fois plus salé que l'eau de mer (Noll, 1992). Ils exigent la présence de sel pour leur croissance, leur paroi cellulaire, ribosomes et enzymes sont stabilisés par l'accumulation de KCl (Yachai, 2009).

Les archées sont considérées comme non pathogènes et peuvent s'étendre d'un site à un autre sur des grains de sel cristallisés sec, par les vents ou par le biais des pattes et des plumes d'oiseaux (Perry *et al.*, 2004).

3. Les halophiles :

3.1 Historique des Halophiles :

Le premier récit connu de micro-organismes halophiles remonte à 2700 avant JC (Bass-Becking., 1931) et rapporte l'isolement de microbes de saumure rouge qui a été trouvé dans des environnements hypersalins. Le premier rapport des temps modernes est celui de Pierce (1914) qui a décrit l'isolement d'un halophile qui vivait à l'époque de l'Égypte ancienne. Entre la fin des années 1920 et le début des années 1940, des bactéries halophiles ont été isolées à partir de nombreuses sources, par exemple des poissons, des peaux d'animaux et des anchois (Baumgartner., 1937). Plus important encore, les études de Petter, 1932 et Hof, 1935 ont suscité un nouvel intérêt pour les microbes qui habitent les environnements saturés de sel. (Edbeib *et al.*, 2016) . En 1922, Harrison et Kennedy isolent une souche pratiquement identique qu'ils nommèrent *Pseudomonas salinaria*, Jusqu'en 1957, il n'y avait que 4 espèces reconnues par la septième édition du Bergey's Manuel (*Halobacterium salinarum*, *Halobacterium cutirubrum*, *Halobacterium marismortui* et *Halobacterium trapanicum*) (Grant *et al.*, 2001).

3.2 Définition :

Les halophiles sont des organismes représentés par des archées, des bactéries et des eucaryotes (Corral, P *et al.*, 2019), Ils incluent une grande diversité de microorganismes, comme : les bactéries aérobies modérément halophiles, les cyanobactéries, les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries hétérotrophes, les bactéries anaérobies, les Archaea, les protozoaires,

les mycètes, les algues et les eucaryotes multicellulaires, Ces microorganismes vivent dans des environnements hypersalins et exigent dans beaucoup de cas de la salinité pour survivre (DasSarma S, et *al.*, 2001) , la capacité des halophiles de se développer dans des milieux avec une forte et large gamme de salinité variable d'une espèce à l'autre dépendante des autres conditions de croissance : « nutriments, pH et température » attire la vue de nombreux chercheurs (Ventosa et *al.*, 1982).

3.3 Classification des halophiles :

Les microorganismes halophiles ont été classés en trois catégories par plusieurs auteurs : (Kushner, 1978 ; Larsen ,1986 ; Ramos-Cormanzana ,1989), selon la concentration en sel qui amène à une croissance optimale. Parmi toutes ces classifications celle de Kushner demeure la plus utilisée (tableau2) (Tang et *al.*, 2002). D'une manière générale, les bactéries halophiles extrêmes se développent en présence d'une concentration de sel comprise entre 20% et 30% (3,4 à 5,1M), et exigent un minimum de 12%-15% de sel pour la croissance (Johnson et al., 1986a). Les microorganismes halophiles modérés ont une bonne croissance en présence de (0,5 à 2,5M) de sel. Enfin, pour les microorganismes faiblement halophiles, la concentration en sel nécessaire pour une croissance optimale peut varier de 1 à 6% (Lefebvre, 2005), Les exigences en sel des bactéries halophiles sont plutôt spécifiques. Pour certains organismes halophiles les ions Na⁺ peuvent être remplacés par les ions K⁺ ou Mg²⁺ et le Cl⁻ par d'autres anions, mais seulement dans une mesure limitée. En effet le NaCl est indispensable pour les halo- bactéries et il est exigé en forte concentration (Mullakhanbhai et Larsen, 1975). A titre d'exemple, l'actinobactérie halophile extrême *Actinopolyspora halophila* requiert des concentrations élevées en NaCl pour sa croissance et ne se développe pas si le milieu contient du KCl au lieu du NaCl (Gochnauer, 1975).

Tableau 2 : classification des microorganismes halophiles (Kushner ,1978)

Micro-organismes	Concentration optimales en NaCl
Non halophile	<0,2 mol/l (1,17% NaCl)
Faiblement halophile	0,2 à 0,5 mol/l (1,17 à 2,93 % NaCl)
Halophile modéré	0,5 à 2,5 mol/l (2,93 à 14,3% NaCl)
Halophile extrême	2,5 à 5,2 mol/l (14,63 à 30,4% NaCl)
Halotolerant	0,2 à 2,5 mol/l (1,17 à 30,45 % NaCl)

3.4 Caractéristiques général des archées halophiles extrêmes :

Les archées halophiles extrêmes sont caractérisées par : chimio-organotrophes, croissance dans un milieu contenant des acides aminés ou d'extrait de levure (Kis-papoet *al*, 2003). Présentent un temps de génération relativement long (3-4h pour *Haloferax volcanii*), aérobies, immobiles ou mobiles avec des flagelles lophobranches, présentent une forme cocci, pléomorphe ; Une caractéristique physiologique intéressante est la présence, chez certaines espèces d'*halobactéries*, d'un photopigment membranaire (la bactériorubérine) qui permet la production d'ATP, quand la teneur en oxygène dans le milieu extérieur est trop faible. Ce composé formé d'une protéine (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde (rétinal) est responsable de la couleur rouge des saumures (Oren, 2002a).

Les archées halophiles extrêmes sont représentées par la famille des *Halobacteriaceae* et par les halophiles extrêmes méthanogènes anaérobies. Ces derniers sont regroupés dans deux genres, *Methanohalobium* et *Methanohalophile* de la famille des *Methanosarcinaceae* (Kamekura, 1998). Les archées halophiles appartenant à l'ordre *Halobacteriales*, famille des *Halobacteriaceae* sont considérés comme étant des halophiles par excellence (Oren, 2002). Les nombres augmentés de genres et espèce reflètent la diversité récemment découverte dans la famille *Halobacteriaceae* (Oren, 2006).

3.4.1 : caractère culturaux :

Les colonies formées sont de couleur rouge, rose, pourpre (membres de la famille *Halobacteriaceae*) est très rarement incolore (quelques souches du genre *Natrialba*). La pigmentation est due à la présence des pigments caroténoïdes C50 (pigment qui joue le rôle de protecteur contre les rayons solaires) (Hezayenet *al*, 2002). *Halobacterium salinarum* peuvent produire la bactériorhodopsine, un photopigment, c'est semblable à la rhodopsine de notre yeux, utilise la lumière du soleil comme une source d'énergie (Prescott *et al*, 2003).

3.4.2 Caractère morphologique :

Les cellules peuvent avoir diverses formes (cocci, bacille, disque, triangle, sphère,...etc.). La forme non cocci des halobactéries peut changer selon la concentration de sel de l'environnement, la dilution entraîne le changement des formes bacilles (*Halobacterium*) en forme sphériques, la surface des halobacilles (haloarchaea de forme bacillaire) est caractérisée par un assemblage de sous unités hexagonales de glycoprotéines de 17,5 nm

d'épaisseur organisées en une unique couche régulière à la surface de la cellule et liées à des groupes sulfates. Cette structure est appelée « couche de surface » (ou S layer) (Fendrihan B, et *al.*, 2006), tandis que les formes cocci (*Halococcus*) grâce à leurs parois épaisses peuvent garder leur morphologie en cocci en présence de faible concentration de NaCl (Grant et al, 2001). La paroi des *Halococcus* est constituée par des polysaccharides, Elle est complexe formée d'une seule couche rigide et qui n'est pas désintégrée en solutions salines diluées (Fendrihan, B et *al.*, 2006).

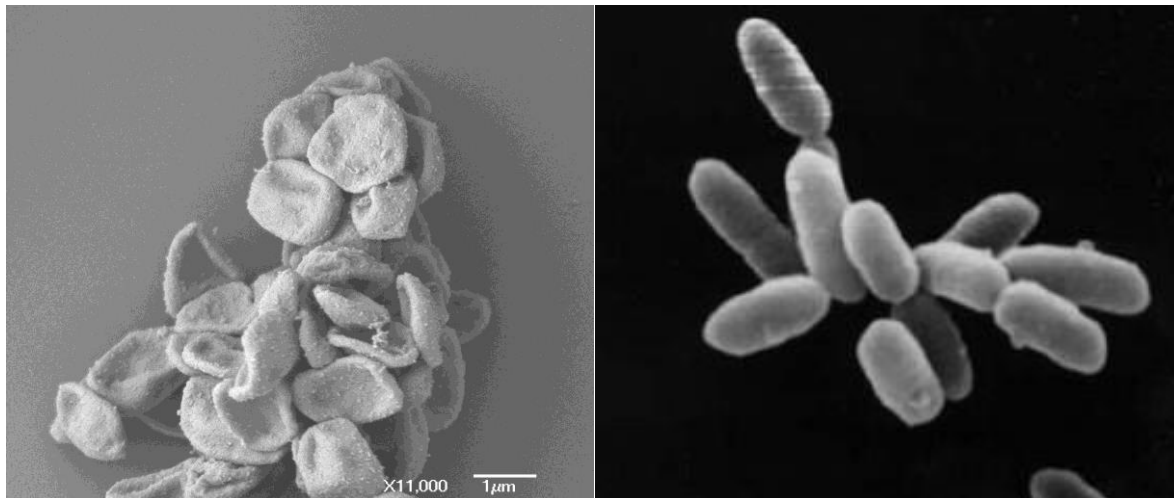


Figure 1 : Représentation des deux types de morphologies d'haloarchées prise sous microscope électronique, on trouve à gauche *Haloferax volcanii* et à droite *Halobacterium salinarum*.

4. Environnement salin et hypersalin :

4.1 Les habitats thalassohalines :

Beaucoup d'environnements hypersalins dérivent de l'évaporation d'eau de mer sont favorisés par un écoulement restreint, une température élevée et de basses précipitations,... etc. De tels environnements sont appelés thalassohalines. Leurs sels minéraux sont dans les mêmes proportions que celles contenues dans l'eau de mer. Une grande diversité de vie microbienne est observée dans les thalassohalines, seulement quelques halophiles extrêmes peuvent grandir, par exemple *Halobacterium*, *Dunaliella* et un peu d'espèce bactérienne. Des exemples d'environnements thalassohalins sont représentés par Sebkhah Halk El Menzel (Tunisie), Sebkhah El Melah,...etc. (Kharroub K., 2007).



Figure 2 : Habitat Thalassohalines, Photographie Satellite de Sebkha Halk El Menzel, Sousse, Tunisia, prise par NASA World Wind, OnEarth WMS global mosaicvisualcolour layer (Kharroub K.,2007).

4.2. Les habitats athalassohalines :

Les eaux athalassohalines proviennent de la dissolution d'évaporites par l'eau, cas de la plupart des sebkhas situées en zones semi-arides et arides. La concentration en sel des eaux athalassohalines arrive jusqu'à la saturation et au de là .la précipitation de NaCl provoque une haute concentration de potassium de magnésium. La composition ionique est un facteur clé qui détermine les propriétés de l'environnement comme un biotope (Oren, 2012). Quelques micro-organismes peuvent supporter même simultanément de hautes concentrations du sel (200g/l) et hautes températures haute jusqu'a 68°C (Cayol et *al.*, 1994)

D'autres types de lacs hypersalins sont présents dans des sites exceptionnels au fond de certaines mers comme la Mer Noire, la Mer Rouge, la Méditerranée ou le golfe du Mexique. Les compositions en sels de certains de ces lacs peuvent être exceptionnelles, comme celles de Discovery ou de Kryos au fond de la Méditerranée (sud de la Grèce) où les concentrations en magnésium atteignent 4 M (Roussel et *al.*, 2008)



Figure 3 : Habitats athalassohalines, photographie Satellite de la grande Sebkhah d'Oran (Hachemi K.,2020).

4.3. Caractéristique physico-chimique des environnements hypersalins :

La salinité des saumures se définit comme la somme des cations et des anions qu'il contient. Le principal sel, présent en quantité quasi inépuisable dans les mers, océans, lacs salés et aussi dans les mines de sel, est le chlorure de sodium. Mais la composition ionique des saumures varie selon l'origine ; thalassohalines ou athalassohalines (Tableau 3) ; la majorité des eaux hypersalines contient 8 à 10 fois plus de sels dissous totaux que l'eau de mer (Caumette, 1998).

Quand l'eau de mer est concentrée par évaporation, tous les sels présents augmentent leur concentration dans les mêmes proportions jusqu'au seuil de précipitation. Les carbonates précipitent sous forme de carbonates de Ca^{2+} dès que la salinité atteint 6 % (p/v). Ensuite, le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de calcium Ca^{2+}) dès que la salinité dépasse 10% (p/v). Au-delà de 25 % (p/v), le chlorure de sodium Na^+ commence à précipiter sous forme d'halite et précipite pleinement à 34 % (p/v) (10 fois la concentration de l'eau de mer). Les eaux sont par la suite enrichies en ions Mg^{2+} et K^+ dont les sels précipitent à des

salinités 20 fois supérieures à celle de l'eau de mer (Blattet *al.*, 1980 ; Rodriguez-Valera et *al.*, 1985).

En environnement athalassohalins, en plus de l'ion Na^+ , d'autres ions prédominent, comme l'ion Mg^{2+} dans la Mer Morte (Larsen, 1980). Alors que les lacs hypersalés sodés présentent une autre variation dans la composition ionique. Il y'a prédominance des carbonates et des chlorures comme anions et le Na^+ comme cation (Tableau 3). Le pH des lacs hypersalins d'origine thalassohalines est généralement proche de la neutralité ou légèrement alcalin alors que celui de la Mer Morte (origine athalassohaline) est légèrement acide (Tableau 3). La saturation des eaux due à l'évaporation réduit encore le pH et la solubilité de l'oxygène. Mais l'agitation des eaux de surfaces par le vent permet l'aération et donc la disponibilité de l'oxygène pour les microorganismes aérobies des couches superficielles (Litchfield et *al.*, 1998).

Tableau 3 : Composition ionique d'environnement thalassohalins et athalassohalins.

Composition ionique	Concentration (g/l)					
	Lac Mgadi (kenya)	Lac Natrun (Egypte)	Grand lac Salé Arm (USA)	Mer Morte	Mer	Bassin de cristallisation San Diego (USA)
Na^+	46.0	142.0	105.4	40.1	10.6	120.0
K^+	0.06	2.3	6.7	7.65	0.8	52.0
Ca^{2+}	0.0007	0.0	0.3	17.2	0.40	3.01
Mg^{2+}	–	0.0	11.1	44.0	1.27	14.4
Cl^-	14.0	154.6	181	224.9	18.9	210.0
CO_3^-	34.9	67.2	0.27	0.077	0.14	24.5
SO_4^{2-}	–	22.6	27.0	0.45	2.65	–
Azote total	0.038	–	4.3-7.2	–	–	–
pH	10.35	11.0	7.7	5.9-6.3	8.1	–
Référence	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)

–, non déterminé. (1), (Grant & Tindall 1986); (2), (Larsen 1980); (3), (Post 1977); (4), (Beyth 1980); (5), (Brock et *al.*, 1994) ; (6), (Javor ., 1983)

5. Taxonomie des halophiles :

Les termes « halobactérie ou haloarchaea » correspondent aux membres d'archées halophiles extrêmes aérobies de la famille des Halobacteriaceae, de l'ordre des Halobacteriales formée par (Grant et Larsen 1989). La connaissance des haloarchaea a commencé avec la formation de deux genres *Halobacterium* et *Halococcus*. Ils constituent un groupe monophylétique où la majorité des espèces ont des valeurs de 83,2 % de similitude des séquences d'ADNr 16S, indiquant une diversité génomique (Wright, 2006). Les méthanogènes est le groupe d'archaea le plus étroitement lié aux halobactéries (Olsen et al., 1994) avec des valeurs de similitudes des séquences d'ADNr 16S de l'ordre de 80 %. La diversité phylogénique des archaea halophiles extrêmes excède de beaucoup tout ce qui a pu être envisagé il y'a à peine une quinzaine d'années. Dans la seconde édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 14 genres ont été décrits (Grant et al., 2001). À l'heure actuelle, 23 genres existent. Mais, il est probable que la diversité des haloarchaea soit plus étendue que le nombre de genres décrits, si on considère les non cultivables. La comparaison des séquences des gènes 16S d'ARNr et l'analyse des lipides polaires membranaires sont actuellement utilisées comme clés de différenciation entre les membres des halobactéries (Kamekura, 1998, 1999b ; Kamekura et al., 2004)

6. Diversité phylogénétique des halophiles :

Une révolution de la vision de la diversité bactérienne et du monde vivant en général est apparue avec les travaux de Carl Woese, microbiologiste américain, qui a été le premier à faire usage de l'ARN ribosomique en phylogénie. Woese (1987) qui, par une analyse comparative des séquences des gènes ARNr 16S et 18S, décrit 3 domaines du vivant: Bacteria, Eucarya et Archaea (Figure 4) « arbre phylogénétique ». Ces travaux ont été le point de départ d'une description exponentielle de nouvelles espèces bactériennes à partir de méthodes moléculaires utilisant les propriétés de l'ARNr 16S, outre passant du même coup le problème de la faible représentativité des bactéries cultivables (Stackebrandt et Göbel, 1994). La dernière rencontre des chercheurs du monde entier qui travaillent sur les extrémophiles s'est déroulée en USA dans l'Université de Connecticut le 24 juin 2013 sous la présidence du

Dr Antonio Ventosa, et Aharon Oren. Les chercheurs ont fait un état des lieux et un inventaire détaillé des découvertes des nouveaux genres et espèces des halophiles appartenant aux eubactéries et archeobactéries. Les détails de la taxonomie de deux familles importantes qui sont : *Halobacteriaceae* et *halomonadaceae* sont reportés ci – dessous.

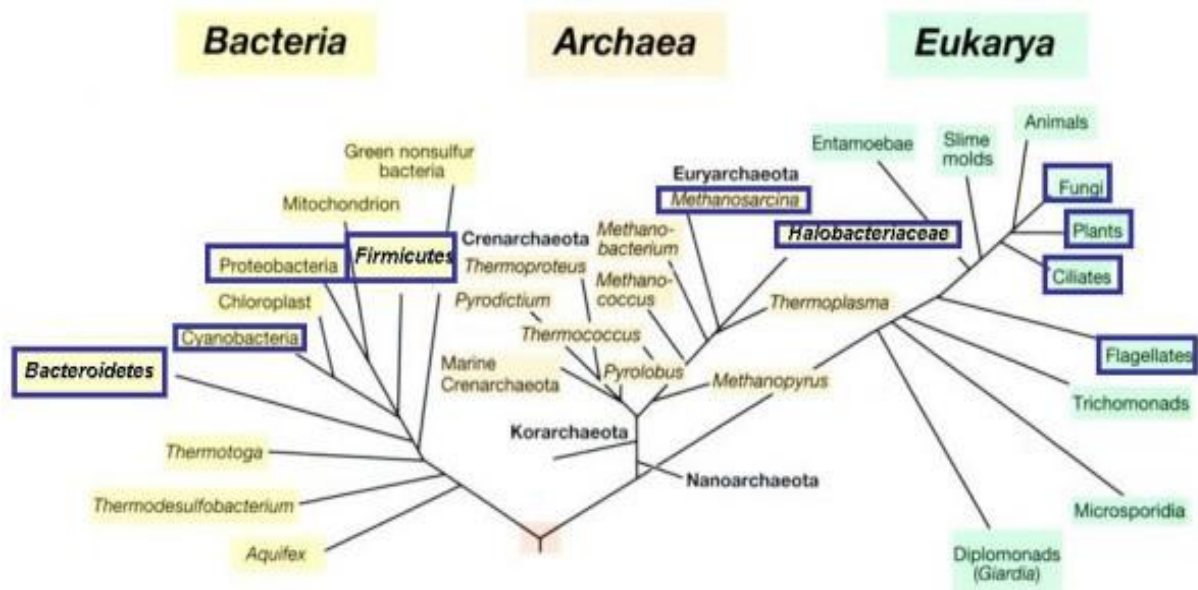


Figure 4 : Diversité des halophiles dans l’arbre phylogénétique dans les trois domaines de la vie (Oren A., 2008).

6.1. Halophiles du domaine Bacteria :

Ce domaine regroupe la plus grande diversité des halophiles qu’elles soient bactéries halophiles stricte ou halotolérantes, cependant, un grand pourcentage de bactéries halophiles modérées peuvent être Gram positif que Gram négatif, aérobie ou anaérobies facultatif (Johnson et al., 2007), les halophiles anaérobies appartiennent à l’ordre des *Halanaerobiales* (Ollivier et al., 1994).qui comprend deux familles : *Halanaerobiaceae* et *Halobacteroidaceae* Les espèces appartenant à cette famille les hydrates de carbone à l’exception *Acetohalobium arabaticum* qui réduit le CO₂ en acétate et croit sur la bétaineet triméthylamine.

L’espèce *Halocella cellulolytica* est la seule capable de cellulolyse parmi toutes les espèces décrites. Les espèces des genres *Orenia* et *Sporohalobacter* diffèrent de toutes les autres par

leur capacité à sporuler. *Halanaerobium lacusroseus* est le seul organisme anaérobie halophile considéré comme extrême (Cayolet *al.*, 2012). Les halophiles sont encore trouvés chez les cyanobactéries (Oren, 2000), les *Flavobacterium*, *Cytophaga*, les *Spirochetes* et les *Actinomycetes*. Des bactéries photosynthétiques telles que cyanobactéries et de bactéries anoxygéniques pourpres. Du genre : *Ectothiorhodospira*, *Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Thiocapsa* (Caumette, 1998). Dans le Phyla des bactéries Gram (+) (*Firmicutes*), les halophiles sont trouvés majoritairement dans La famille des *Bacillaceae* avec 21 genres incluant des espèces halophiles obligatoires (Ludwig et *al.*, 2008) dont *Halobacillus* est considéré comme le genre le plus important. La plupart des études physiologiques réalisées sur ce genre ont été focalisées sur l'espèce type *Halobacillus halophilus* (Ayad., 2011).

Une étude récente qui porte sur la biodiversité des bactéries halophiles modérées et halotolérantes isolées des sédiments et lac salé du Maroc révèlent la prédominance du genre *Bacillus* dans (89%) des isolats (Berrada et *al.*, 2012). La famille *Halomonadaceae* renferme, jusqu'à juin 2013, 10 genres bactériens avec un total de 102 espèces. Le nom de chaque genre ainsi que le nombre d'espèces pour chaque genre est le suivant : *Halomonas* (76); *Aidingimonas* (1); *Carnimonas* (1); *Chromohalobacter* (8); *Cobetia* (5); *Halotalea* (1); *Kushneria* (5); *Modicisalibacter* (1); *Salinicola* (3); *Zymbacter*(1) (Oren et Ventosa , 2013).

6.2. Halophiles du domaine Archaea :

Les halophiles du domaine Archaea appartiennent à trois familles: *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. Les deux dernières familles contiennent également des membres non halophiles (Yachai, 2009). La famille des *Halobacteriaceae* de l'ordre des *Halobacteriales* est composée entièrement de membres halophiles extrêmes et aérobies. Les représentants de cette famille se développent dans des environnements où la concentration saline est très élevée ($\approx 5M$) et dont l'optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2 M (20-25%, p/v). Ils exigent la présence de sel pour leur croissance. Leurs parois cellulaires, ribosomes et enzymes sont stabilisées 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. Cecomposé formé d'une protéine (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde (rétinal) est responsable de la couleur rouge des saumures (Oren, 2002).

En juin 2013 la famille englobe 40 genres avec 144 espèces. Le nom et l'abréviation de chaque genre e ainsi que le nombre d'espèces pour chaque genre sont les suivants :

Halobacterium (Hbt. 3), *Haladaptatus* (Hap. 3), *Halalkalicoccus* (Hac. 2), *Halarchaeum*(Hla. 2), *Halarchaeobius* (Hab. 1), *Haloarcula* (Har. 9), *Halobaculum* (Hbl. 2), *Halobellus* (Hbs. 3), *Halobiforma* (Hbf. 3), *Halococcus* (Hcc. 7), *Haloferax* (Hfx. 11), *Halogeometricum* (Hgm. 2), *Halogramum* (Hgn. 4), *Halolamina* (Hlm. 1), *Halomarina* (Hmr. 1), *Halomicrobium* (Hmc.3), *Halonotius* (Hns. 1), *Halopelagius* (Hpl. 2), *Halopenitus* (Hpt. 1), *Halopiger* (Hpg.2), *Haloplanus* (Hpn. 3), *Haloquadratum* (Hqr. 1), *Halorhabdus* (Hrd. 2), *Halorientalis* (Hos. 1), *Halorubrum* (Hrr. 25), *Halosarcina* (Hsn. 2), *Halosimplex* (Hsx. 1), *Halostagnicola* (Hst. 3), *Haloterrigena*(Htg. 9), *Halovenus* (Hvn. 1), *Halovivax* (Hvx. 2), *Natrialba* (Nab. 6), *Natrinema* (Nnm. 7), *Natronoarchaeum* (Nac. 2), *Natronobacterium* (Nbt. 1), *Natronococcus*(Ncc. 4), *Natronolimnobi* (Nln. 2), *Natronomonas* (Nmn. 2), *Natronorubrum* (Nrr. 6), *Salarchaeum*(Sar. 1)(Oren et Ventosa , 2013).

6.3 Eucaryote halophiles :

Bien que les organismes procaryotes soient très majoritaires dans les écosystèmes hypersalés, des micro-organismes eucaryotes peuvent être retrouvés dans ces environnements. Cela inclut des espèces qui sont soit adaptées à de fortes concentrations en sels, soit capables de survivre dans ces conditions. Il s'agit d'algues, de diatomés, de protozoaires ou même de champignons. Des études menées en Slovénie ont permis d'observer une grande diversité de champignons appartenant notamment au genre *Cladosporium*. Ainsi, Des études réalisées sur la Mer Morte ont permis de caractériser un grand nombre de champignons filamenteux appartenant aux groupes des *Zygomycètes* et des *Ascomycètes*. Des algues vertes du genre *Dunaliella* ont souvent été rencontrées dans la Mer Morte mais aussi dans des écosystèmes artificiels tels que les marais salants (Cayol et *al.*, 2012).

Chapitre 2

Osmorégulation

1. Osmorégulation:**1.1 Généralité :**

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). 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).

Les limites chimiques et physiques associées aux environnements salins extrêmes et les adaptations physiologiques des organismes habitant ces eaux sont en grande partie inconnues (Frenkel, 1987). Cependant, il est reconnu que le problème majeur auquel sont confrontés les halophiles est le contrôle de leur pression osmotique. Sans adaptations aux salinités élevées, ils perdraient de l'eau dans le milieu environnant (Gunde-Cimermanet *al.* 2005).

Une propriété de base de tous les micro-organismes halophiles est le fait que leur cytoplasme doit être au moins isoosmotique avec leur milieu environnant. Les membranes biologiques sont perméables à l'eau, le transport actif de l'eau vers l'intérieur dépendant de l'énergie pour compenser l'eau perdue par des processus osmotiques n'est pas énergétiquement faisable. De plus, les cellules qui maintiennent une turgescence ont même besoin de maintenir leur pression osmotique intracellulaire supérieure à celle de leur environnement (Oren, 2008)

Les stratégies d'osmoadaptation peuvent être grossièrement classées en deux types principaux. La stratégie du « salt-in », qui consiste en l'accumulation de K^+ et Cl^- dans le cytoplasme des cellules, est utilisée par les archées aérobies extrêmement halophiles, les bactéries fermentaires halophiles et la bactérie extrêmement halophile *Salinibacter ruber*. (M. Pastor et *al.*, 2013). Cette stratégie n'est pas largement utilisée parmi les différents groupes phylogénétiques et physiologiques de halophiles (Figure 5) (Oren, 2008). La stratégie des « solutés organiques dans », qui implique l'accumulation de solutés organiques « compatibles », est utilisée par une plus grande variété d'organismes, y compris toutes les bactéries mésophiles, les algues halophiles, les archées méthanogènes halophiles et les bactéries aérobies halotolérantes et halophiles (M. Pastor et *al.*, 2013)

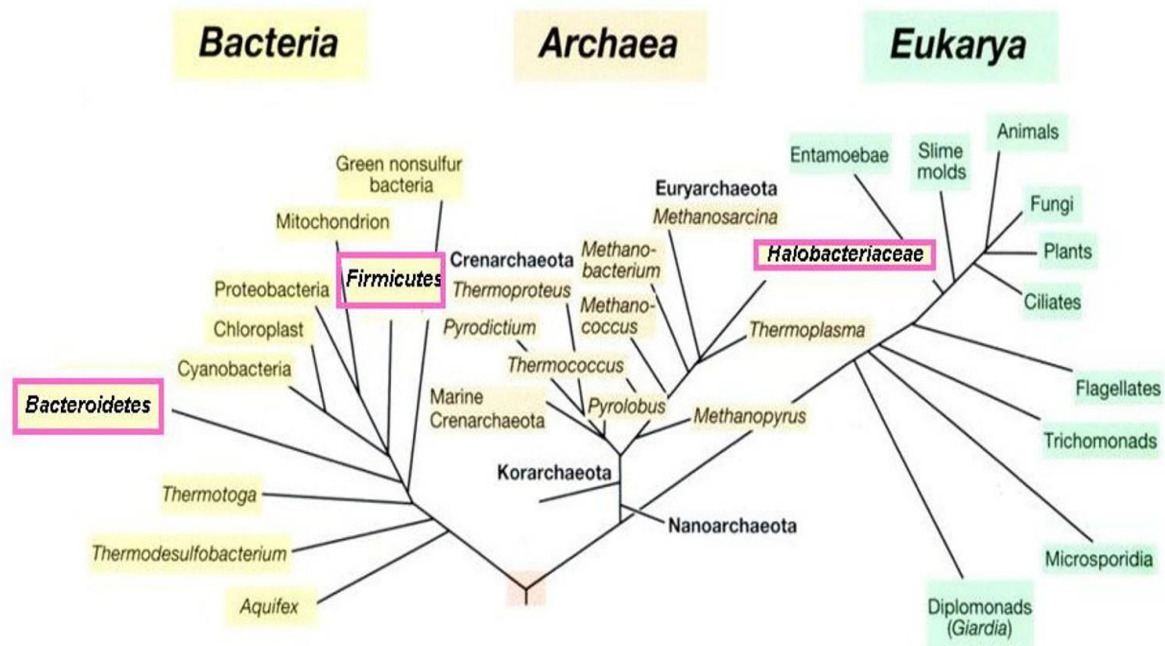


Figure 5 : Distribution au sein de l'arbre phylogénétique des microorganismes accumulant du KCl comme soluté osmotique unique ou principal.

Les groupes marqués de cases violettes contiennent au moins un représentant halophile (par exemple, *Salinibacter ruber* au sein des Bacteroidetes). Le groupe des *Firmicutes* contient à la fois des micro-organismes qui utilisent le KCl pour l'équilibre osmotique (l'ordre Halanaerobiales au sein de la branche basse G+C, constituée d'organismes fermentaires anaérobies) et différents aérobies halophiles (*Halobacillus spp.* et autres) qui accumulent des substances inorganiques solutés. Des concentrations élevées de KCl intracellulaire sont également trouvées dans les halophiles méthanogènes, mais ceux-ci accumulent également des solutés organiques.

2. Conditions extrêmes et mécanismes d'adaptation :

2.1 Température :

A des environnements classé extrêmes chaudes où froides ayant des températures variable de -5 °C jusqu'à 100°C (D'Amico *et al.*, 2002 ; Deming, 2002). Des études de (Irwin et Baird, 2004) ont marqué que les microorganismes suivant ont leur température optimale de croissance :

- Thermophiles : 50°C ;
- Hyperthermophiles : 80°C ;
- Psychrophiles : 15°C ou moins ;
- Psychrotrophes : entre 5°C et 25°C.

En étant donnée que la température affecte la structure des protéines (Bischof et He, 2005 ; Scharnagel *et al.*, 2005). Les psychrophiles, thermophiles et hyperthermophiles ont donc développé des stratégies afin de maintenir la stabilité de leurs protéines et de préserver leur activité optimale sous différentes conditions. A haute température, les thermophiles et les hyperthermophiles diminuent la flexibilité de leurs protéines grâce à l'augmentation du nombre d'interactions ioniques, de liaisons hydrogène, de ponts disulfure et d'interactions hydrophobes (Reed *et al.*, 2013).

2.2 pH :

Les environnements acides sont généralement associés à des zones volcaniques qui sont des sources naturelles de dioxyde de soufre. On retrouve un pH très acide dans les lacs de cratère comme le Kawah Idjen à Java qui détient des records de taille (700 x 600 m, 200 m de profondeur moyenne) et d'acidité (pH de 0,15 en août 1999) (Löhret *et al.*, 2005). Les geysers et les lacs sulfuriques sont également une source importante d'acidité. Enfin, les eaux acides proviennent du drainage de sites miniers acides comme ceux du Rio Tinto (Espagne) où l'eau a un pH de 2,2 (García-Moyano *et al.*, 2012). Les micro-organismes qui colonisent les environnements acides sont appelés acidophiles et ont un pH Optimal de croissance inférieur à 3 (Baker-A et Dopson., 2007) . Les environnements alcalins, peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Dans ce dernier cas, ils sont le fruit de processus

commerciaux comme la fabrication du ciment ou du papier. Les lacs et les déserts de soude sont le principal type d'environnements alcalins naturels (Kaluzhnaya *et al.*, 2001). Ces lacs sont caractérisés par la présence de grandes quantités de carbonate de sodium formées par l'évaporation sous des conditions géologiques, géographiques et climatiques particulières. Bien que les environnements alcalins semblent inhospitaliers, ils sont colonisés par des organismes que l'on appelle alcalophiles et dont la croissance nécessite un pH compris entre 10 et 11 (Irwin et Baird, 2004).

Pour conserver l'activité optimale de leurs protéines et leur intégrité structurale, les organismes doivent maintenir un pH cytoplasmique entre 7,4 et 7,8 (Padan *et al.*, 2005). Les acidophiles et les alcalophiles évoluant dans des milieux où le pH externe est respectivement en dessous de 1 et au-dessus de 10, ils ont développé des stratégies afin de maintenir leur pH interne proche de la neutralité.

2.3 Pression :

Les environnements terrestres viables pour l'Homme où la pression atmosphérique est de 105 Pascal (Pa) ou moins ne représentent qu'1 % de la biosphère (Oger et Jebbar, 2010). Les organismes colonisateurs des environnements à haute pression ont initialement été appelés barophiles par Zobell et Johnson (Zobell et Johnson, 1949). Pour des raisons étymologiques, le terme barophile a aujourd'hui été remplacé par celui de piézophile puisque le préfixe « baro » signifiait poids en grec alors que le préfixe « piezo » signifie pression. On appelle piézophiles les organismes qui supportent des pressions supérieures à 0,1 MPa. On distingue les hyperpiézophiles dont l'optimum de croissance est supérieur à 60 MPa. Actuellement, les organismes les plus piézophiles sont des actinomycètes affiliées aux genres *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Tsukamurella* et *Williamsia* isolés de la fosse des Mariannes à 10 898 mètre de profondeur dans l'océan Pacifique où la pression enregistrée est supérieure à 100 MPa (Pathom-Aree *et al.*, 2006).

Les environnements où l'on enregistre une forte pression sont presque exclusivement associés à des températures extrêmes (Alain *et al.*, 2002 ; Callac *et al.*, 2016). Les mécanismes d'adaptation des piézophiles à leur environnement ont été beaucoup moins étudiés que ceux des autres extrémophiles. Néanmoins, il a été observé dans la Photo que *Bacterium profundum* accumule des monomères et oligomères de β -hydroxybutyrate en réponse à une pression hydrostatique) et que *Marinitoga piezophila* accumule des acides

aminés (α -glutamate, proline et alanine) en réponse à une pression atmosphérique élevée (Jebbaret *al.*, 2015).

Le tableau 4 récapitule les différents groupes de microorganismes extrêmophiles et les paramètres environnementaux correspondants.

Tableau 4 : conditions extrêmes des microorganismes appropriés (Nas *et al.*, 2013).

Paramètres environnementaux et types de microorganismes	Description des microorganismes	Références
La Salinité		
Halotolérant	Croissance sans sel avec tolérance à des concentrations élevées	(Echigoet <i>al.</i> ,2005)
Légèrement halotolérant	Tolérance de 6 à 8% (p/v) de NaCl	(Echigoet <i>al.</i> ,2005)
Halotolérants modérés	Tolérance de 18 à 20 %(p/v)	(Echigoet <i>al.</i> ,2005)
Halotolérants extrêmes	Tolérance de 0% jusqu'à saturation	(Echigoet <i>al.</i> , 2005)
Halophiles		
Légèrement halophiles	Nécessitent le sel pour la croissance 2 à 5 % NaCl (0.2-0.85M)	(Tiquiaet <i>al.</i> , 2007) (Olivier <i>et al.</i> , 1994)
Halophiles modérés	5-20% NaCl (0.85-3.4M) 3-15% NaCl (0.5-2.5M)	(Olivier <i>et al.</i> , 1994) (Echigoet <i>al.</i> , 2007)
Halophiles extrême	20-30% NaCl (3.4-5.1M) 15-30% NaCl (2.5-5.1M) $\geq 10\%$ NaCl (1.7M)	(Olivier <i>et al.</i> , 1994) (Echigoet <i>al.</i> , 2005) (Bowers <i>et al.</i> , 2009)
Les non halophiles	Nécessitant moins de 2% NaCl	(Olivier <i>et al.</i> , 1994)
La température		
thermophiles	Optimum aux alentours de 60°C	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2005)
Hyperthermophiles	Optimum entre 80-110°C	(Madiganet Martino, 2006)
Psychrophiles	Optimum $\leq 15^\circ\text{C}$ pas de croissance $\geq 20^\circ\text{C}$	(Irwin et Baird, 2004)
psychrotrophes	Croissance à $\leq 15^\circ\text{C}$ optimum à $\geq 18^\circ\text{C}$	(Irwin et Baird, 2004)
Le pH		
La Pression		
Piézophiles	Supportent des pressions $\geq 40\text{MPa}$	(Yayanos, 1995)

3. Adaptation moléculaire à l'halophilisme :

Dans l'état naturel il est extrêmement rare de trouver un habitat composé d'une seule espèce ou lignée cellulaire. Différents microorganismes coexistent, interagissent entre eux et avec l'environnement qui les entoure et de ce fait même définissent la communauté. Cette dernière forme un système en constante évolution mais qui en même temps possède une certaine homéostasie qui reflète les interactions entre tous les membres de cette communauté et l'habitat qu'ils occupent (Alexander, 1997). Aussi, la vie dans les lacs hypersalés n'est possible qu'aux prix d'une forte spécialisation qui n'est atteinte que par quelques microorganismes, capables de maintenir une pression osmotique égale à celle de l'environnement. Deux stratégies sont utilisées pour s'adapter au milieu hypersalé et donc à une faible activité d'eau (A_w). (Kharroub, K, 2007).

3.1 Adaptation à la salinité par production d'osmoprotecteurs :

La première stratégie d'haloadaptation est basée sur la biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés organiques compatibles (Figure 6). (Sleatoret Hill, 2002). Et sur la conservation d'une faible concentration ionique intracellulaire, grâce à un transport actif des ions en dehors des cellules empêchant ainsi l'agrégation des protéines. L'efflux de Na^+ est réalisé par des systèmes de transporteur couplés Na^+ / H^+ (Kempf et Bremer, 1998). Afin de fournir et de soutenir la balance osmotique (CHUN et *al*, 2000), donc sont des réponses au stress hyperosmotique, Deux opérations au coût énergétique élevé pour la bactérie qui optera généralement pour le transport au lieu de la synthèse de ces composés organiques dissous les «osmolytes » s'ils sont déjà présents dans le milieu (Sleatoret Hill, 2002). Cette stratégie est adoptée par de nombreux microorganismes eucaryotes et bactériens, mais aussi par des archées halophiles méthanogènes (DasSarma, 2001).

L'osmoprotecteur le plus fréquemment observé est la glycine bêtaïne (Courtenay et *al*, 2000). Il est utilisé par de nombreux microorganismes halophiles et halotolérants telles que les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archées méthanogènes. En grande majorité des bactéries accumulent la glycine bêtaïne par absorption active, mais certaines sont capables de synthèse comme les bactéries pourpre et les bactéries sulfato-réductrices (Welsh et *al.*, 1996).

L'osmoprotecteur le plus fréquemment observé est la glycine bêtaïne (Courtenay et al, 2000). Il est utilisé par de nombreux microorganismes halophiles et halotolérants telles que les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archées méthanogènes. En grande majorité des bactéries accumulent la glycine bêtaïne par absorption active, mais certaines sont capables de synthèse comme les bactéries pourpre et les bactéries sulfato-réductrices (Welsh et *al.*, 1996).

Le mode d'action des osmoprotecteurs est loin d'être clair. Ils pourraient n'être que des solutés compatibles permettant de maintenir l'osmolarité de la cellule vis à vis de l'environnement ou ils pourraient aussi jouer un rôle protecteur actif en interagissant avec les protéines et les protégeant de telle sorte que leur présence dans le cytoplasme n'exige pas une adaptation particulière des protéines cellulaires ; Ces composés agiraient comme des chaperons chimiques en aidant les protéines cytoplasmiques à conserver leur état de compaction (Figure 7) (Streit, 2008 ; Bourotet *al.*, 2000).

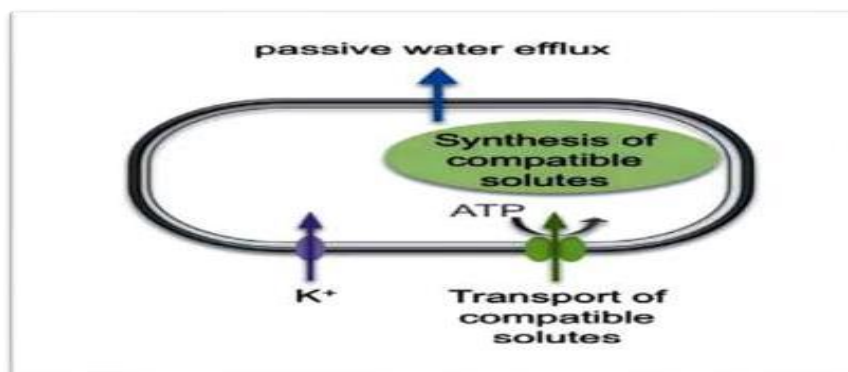


Figure 6 : Schéma représentant la Stratégie «Salt-out» (Bergmann, 2015)

Les solutés compatibles peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), certains acides aminés et dérivés (proline, acide glutamique, glutamine, acide -aminobutyrique, glycine bêtaïne), éctoïne et dérivés et des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol) (Tableau 5). Ils sont des molécules organiques très hydrosolubles qui n'interagissent pas avec les protéines et n'interfèrent pas, même à forte concentration (>1M), avec les fonctions cellulaires vitales (Sleatoret Hill, 2002).

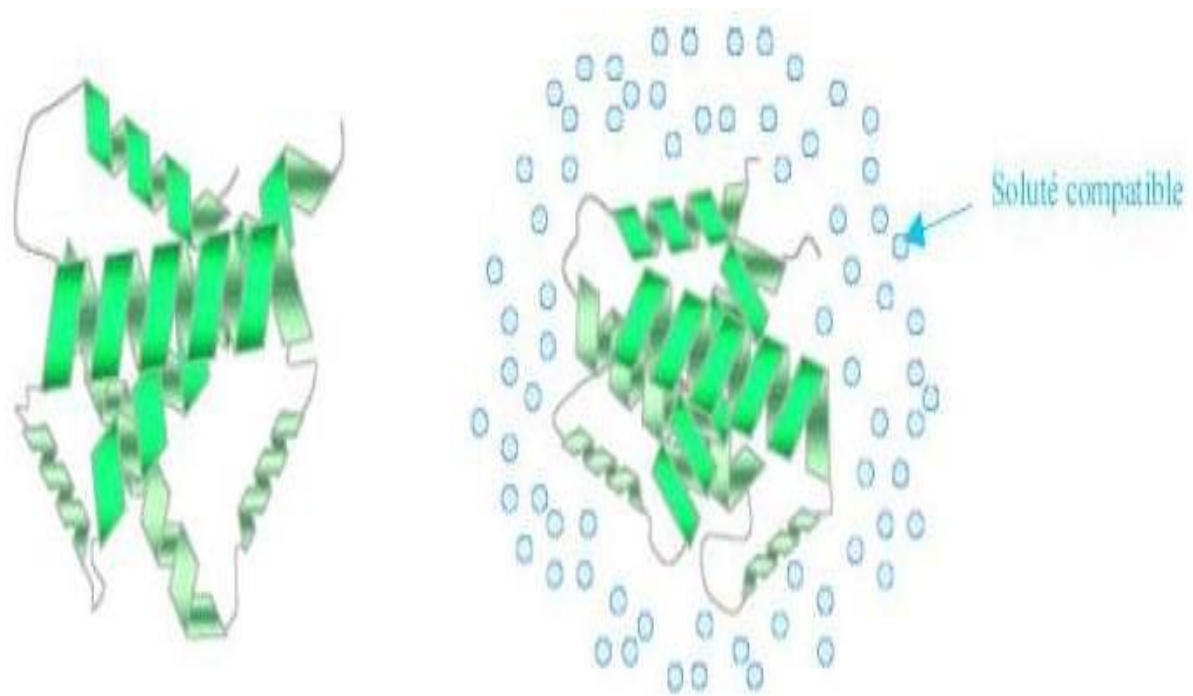


Figure 7 : Représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité (Sleator & Hill, in Zadi Karam *et al.*, 2012).

Tableau 5 : Solutés organiques zwitterions et non chargés les plus fréquemment utilisés lors de l'osmoadaptation de type « lowsaltin » (Roberts, 2005).

Solutés	Distribution
solutés zwitterions bêtaïne ectoïne hydroxyectoïne Nγ-acétyldiaminobutyrate Nε-acétyl-β-lysine β- glutamine 	Halo tolérants: <i>Thioalkalivibrio versutus</i> , <i>Actinopolyspora</i> sp. Halo philes: <i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Halorhodospira halochloris</i> , <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1, <i>Methanosarcina thermophila</i> , <i>Synechococcus</i> sp. DUN52 Halo tolérants: <i>Sporosarcina pasteurii</i> , <i>Brevibacterium spidermidis</i> , <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i> , <i>Vibrio cholerae</i> et <i>Vibrio costociola</i> Halo philes: <i>Chromohalobacter israelensis</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> , <i>Halorhodospira halochloris</i> , <i>Halomonas elongata</i> , <i>Halomonas variabilis</i> , <i>Methylarcula marina</i> , <i>Methylarcula terricola</i> , <i>Methylophaga alcalica</i> , <i>Methylophaganatronica</i> , isolats halophiles des lacs de soude Halo philes: <i>Halomonas elongata</i> , <i>Nocardiosis halophila</i> Halo tolérants: <i>Halomonas elongata</i> CHR63 Halo tolérants: <i>Methanosarcina thermophila</i> , <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> , <i>Methanosarcina mazei</i> Go1 Halo philes: <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1, <i>Methanohalophilus</i> sp. Z7302 Halo philes: <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1
solutés non chargés α-glucosylglycérol α-mannosylglyceramide tréhalose sucrose N-α-carbamoyl-L- glutamine 1- amide N-acétylglutaminylglutamine amide 	Halo tolérants: <i>Synechocystis</i> sp., <i>Microcystis firma</i> , eubactéries phototrophiques, <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Stenotrophomonas</i> Halo tolérants: <i>Rhodothermus marinus</i> Halo tolérants: <i>Picrobaculum aerophilum</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Sulfolobus ambivalens</i> , <i>Thermoproteus tenax</i> , <i>Thermoplasma acidophilum</i> Halo philes: <i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Chromobacter israelensis</i> , <i>Desulfovibrio halophilus</i> , <i>Rhodothermusobamensis</i> , <i>Natrialba magadii</i> Halo tolérants: plusieurs cyanobactéries et protéobactéries Halo philes: <i>Ectothiorhodospira mobilis</i> Halo tolérants: <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> Halo philes: bactéries de soufre violet

Chapitre 2 : Osmorégulation

la bétaine, l'ectoïne et l'hydroxyectoïne, N ϵ -acétyl- β -lysine et β -glutamine sont des solutés zwitterioniques, alors que les non chargés les plus fréquemment utilisés sont des glucides (trehalose et sucrose), dérivés de glucides (glucosylglycerol et α -mannosylglyceramide) ou des dérivés d'acides aminés (carboxamine et dipeptide glutamine acétylé) (Robert, M F., 2005)

3.2 Adaptation à la salinité par accumulation de KCl :

La seconde stratégie est adoptée par des groupes phylogénétiquement différents : *Halobacteriales*, bactéries halophiles anaérobies de l'ordre des *Haloanerobiales* et par la bactérie aérobie *Salinibacter ruber*. Ils accumulent essentiellement du KCl (Christian & Waltho, 1962 ; Lanyi, 1974 ; Kushner, 1978 ; Tindall et Trüper, 1986 ; Oren, 1999a; Oren et al, 2002a ; Grant 2004) L'accumulation d'ions inorganiques dans le cytoplasme cellulaire permet de maintenir des concentrations salines intracellulaires extrêmement élevées (Oren, 2006) Ce mécanisme implique le maintien d'une grande concentration ionique intracellulaire, où K⁺ est en concentration interne supérieure à la concentration en Na⁺ externe, c'est ce qu'on appelle mécanisme type KCl ou Halobacteriales de prévention de choc osmotique, par transport d'ions à travers la membrane par des pompes ioniques. Ainsi, la concentration en sels intracellulaires (KCl) est considérée comme un agent osmorégulateur (Kushner, 1985). L'ensemble des mécanismes intracellulaires vont fonctionner en présence d'un taux élevé de salinité (Dennis et Schimmin, 1997).

Une concentration en ion K⁺ de 5,0 M a été mesurée chez *Halobacterium* lorsque la croissance a lieu à 4,0 M en ion Na⁺ (Christian et Waltho, 1962 ; Grant et al., 2001). Cependant, il est trouvé que chez les membres alcalophiles, il y'a également une accumulation du 2- sulfo-tréhalose (Desmarais et al. 1997) (Figure 8).

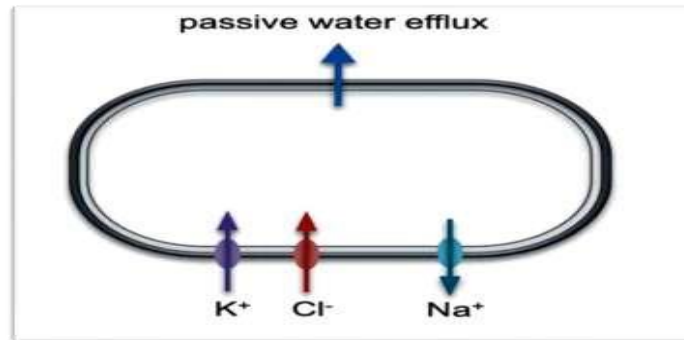


Figure 8 : Schéma présentant la Stratégie « Salt-in » (Bergmann., 2015). L'exclusion du Na^+ du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na^+ / H^+ (Figure 9), au niveau de la membrane cytoplasmique (Oren, 2001).

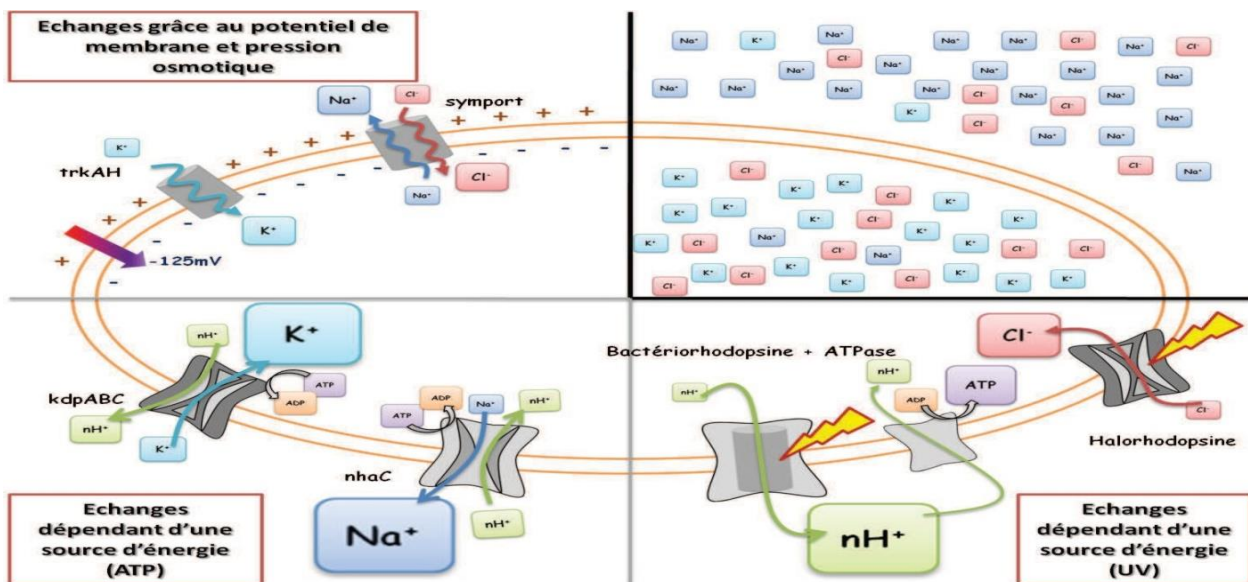


Figure 9 : Représentation schématique des transporteurs membranaires de *Halobacterium salinarum* mettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire (vincent M, 2011)

La représentation schématique de la localisation intracellulaire et extracellulaire des ions Na^+ , K^+ et Cl^- est présenté en haut à droite. Cependant,

les transporteurs dont l'action dépend de la pression osmotique et du potentiel de membrane sont présentés en haut à gauche et les transporteurs dont leur action dépend d'une source d'énergie chimique de type ATP sont présentés en bas à gauche. Enfin, les transporteurs dont l'action est dépendante d'une source d'énergie physique de type UV sont présentés en bas à droite (vincent M, 2011).

4. Métabolisme:

Les haloarchaea sont des chimio-organotrophes, aérobies qui se développent mieux sur les acides aminés mais leur métabolisme est peu connu. En dépit de la réputation des haloarchaea à avoir une activité métabolique des sucres limitée, quelques espèces telles que *Halorubrum saccharovororum* (Tomlinson & Hochstein, 1972 ; Tomlinson et al., 1974), *Haloarcula vallismortis* (Gonzalez et al., 1978), *Haloferax mediterraneii* (RodriguezValera et al., 1983) et *Haloferax volcanii* (Mullakhanbhai & Larsen, 1975) utilisent les sucres.

Les polysaccharides sont d'abord dégradés par des hydrolases extracellulaires spécifiques en oligosaccharides puis transportés à l'intérieur par des transporteurs de type ABC (pour « ATP-binding cassette ») (Tawara & Kamo, 1991 ; Wanner & Soppa, 1999) où ils sont dégradés en monosaccharides. Le glucose est oxydé par une modification de la voie d'Entner-Doudoroff (Rawalet al., 1988 ; Johnsen et al., 2001 ; Verhees et al., 2003).

Le glucose 6-phosphate est absent et le premier intermédiaire phosphorylé est le 2-céto-3-désoxygluconate-6-phosphate qui est converti en pyruvate et en 3-phosphoglyceraldéhyde. Ce dernier est oxydé en pyruvate par les enzymes conventionnelles de la glycolyse. Chez *Halococcus saccharolyticus*, le glucose et le fructose sont dégradés par 2 voies différentes. Le premier via la voie modifiée d'Entner-Doudoroff (ED) et le second par une modification de la voie d'Embden- Meyerhof (EM) (Johnsen et al., 2001) (Figure 10). Les enzymes intervenant dans les deux voies sont inductibles.

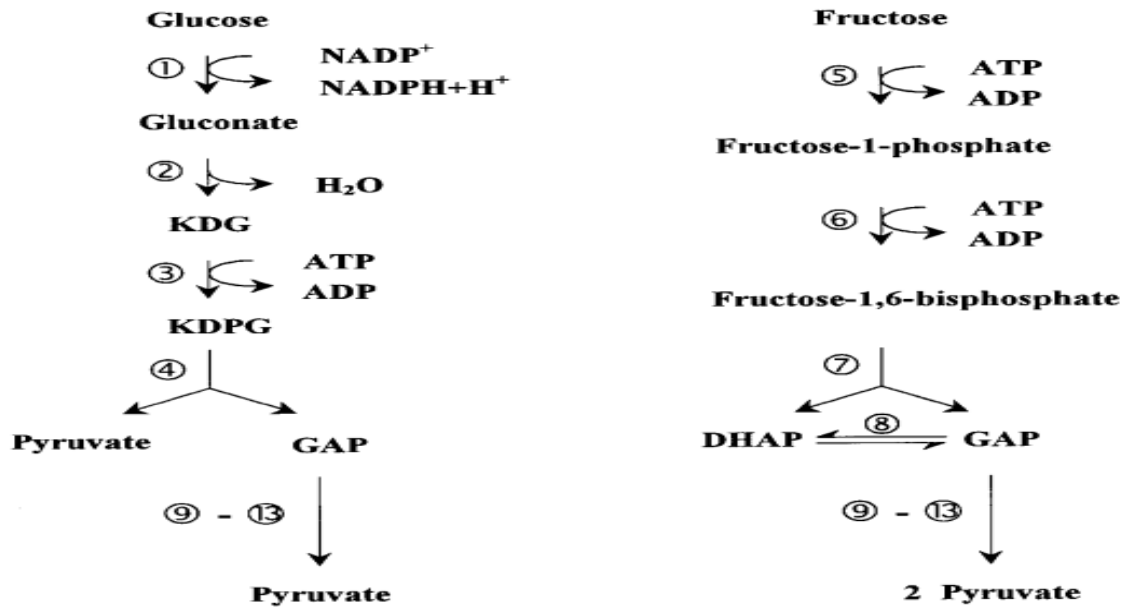


Figure 10 : Dégradation du glucose et du fructose chez les Archaea halophiles extrêmes (Johnsen *et al.* 2001).

1, Glucose déshydrogénase ; 2, Gluconate déshydrogénase ; 3, 2-céto-3-désoxygluconate kinase ; 4, 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase ; 5, Cétohexokinase ; 6, 1-phosphofruktokinase ; 7, Fructose-1, 6-diphosphate aldolase ; 8, Triosephosphate isomérase ; 9, 3-phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase ; 10, 3-phosphoglycérate kinase ; 11, phosphoglycérate mutase ; 12, Enolase ; 13, Pyruvate kinase.

Chpaitre 3

Protéines et enzymes halophiles

1. Les protéines halophiles:

1.1 Généralité :

Les protéines halophiles sont connues pour être très stables grâce à leur richesse en acides aminés acides qui se trouvent majoritairement à la surface des protéines. Les analyses de structure tridimensionnelle ont montré que la plupart des résidus acides se trouvent à la surface de ces protéines, ce qui facilite l'hydratation excessive des protéines. Cela rend la surface plus hydrophile et plus flexible. Aussi elle favorise à son tour les interactions électrostatiques non spécifiques avec les sels en solution (Kennedy SP, et *al.*, 2001 ; Paul S, et *al.*, 2008).

Une liste de 21 souches d'archées/bactéries halophiles représentée ci-dessous dans le (tableau 6) montrant le nombre d'informations sur les protéines dont chaque souche contient.

Tableau 6 : liste des différentes souches et le nombre de protéines (Sharma N, et *al.*, 2014)

S. non	Nom de la souche	Nombre totale d'information sur les protéines
1	<i>Azotobacter vinelandii</i>	10 414
2	<i>Bacillus cereus ATCC 1098</i>	10 691
3	<i>Halobacterium salinarium</i>	16
4	<i>Haloferax mediterranei ATCC 33500</i>	04
5	<i>Natronomonas pharaonis DSM 2160</i>	447
6	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	08
7	<i>Haloferax volcanii</i>	462
8	<i>Haloarcula vallismortis ATCC29715</i>	510

9	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM304	6359
10	<i>Haloferax dénitrificans</i> ATCC 35960	490
11	<i>Halorubrum saccharovororum</i> DSM 113	6009
12	<i>Halorubrum distributum</i> JCM 1011	467
13	<i>Bacillus cereus</i> G924	2480
14	<i>Salinibacter ruber</i> DSM 1385	5287
15	<i>Bacillus cereus</i> E33L	9914
16	<i>Chromohalobacter</i> sp. HS	16
17	<i>Halorubrum lacusprofundi</i> ATCC 49239	459
18	<i>Halorubrum trapanicu</i>	01
19	<i>Salinibacter ruber</i> M	5735
20	<i>Halomonas allongé</i> DSM 258	127
21	<i>Chromohalobacter beijerincki</i>	03
	totale	59 897

1.2 Classification des enzymes :

Les enzymes sont classées selon une nomenclature établie par la commission des enzymes, en leur attribuant un nombre à 4 chiffre appelé le chiffre EC (Enzyme Commission number). Les enzymes sont groupées en six classes majeures. Le premier chiffre du nombre EC correspond à l'une des six classes suivantes (1) les oxydoréductases ; (2) les transférases ;

(3) les hydrolases ; (4) les lyases ; (5) les isomérase et (6) les ligases. Ces classes sont elles même subdivisées en sous classes et en sous-sous classes. Les autres chiffres du nombre EC sont attribués pour faire référence à plus de détails sur les réactions spécifiques qu'elles peuvent catalyser (Pantaleone, 1999).

1.3 Sélectivité enzymatique :

La sélectivité enzymatique peut intervenir à quatre niveaux :

- La sélectivité de substrat : c'est la capacité d'une enzyme à distinguer et à agir sur un composé distinct parmi un groupe étendu de composés chimiques.
- La stéréosélectivité : c'est la capacité d'agir sélectivement sur un énantiomère ou diastéréoisomère.
- La régiosélectivité : c'est la capacité d'agir sélectivement avec un site précis de la molécule parmi plusieurs sites possibles.
- La chimiosélectivité : c'est la capacité d'agir sur un groupement fonctionnel parmi plusieurs autres sur la même molécule (Rozzel, 1999).

2. Caractère structural et morphologique des haloenzymes :

La caractérisation structurale et biochimique de plusieurs enzymes halophiles a montré que l'amélioration de la solvatation est la condition clé essentielle pour maintenir la solubilité et l'activité des enzymes halophiles dans une faible activité de l'eau, qui peut approcher des valeurs aussi basses que 0,75 dans une solution saturée de NaCl (Karan R, et *al.*2012).

Dans ces conditions extrêmement limitées en eau, les liaisons hydrogène entre les chaînes latérales chargées négativement et les molécules d'eau deviennent essentielles pour maintenir une enveloppe d'hydratation stable (Dym A, et *al.*, 1995. Britton KL, et *al.*2006). D'autres facteurs importants pour la fonction des protéines en cas de salinité élevée comprennent l'augmentation des réseaux de paires d'ions, la réduction des taches de surface hydrophobes et un nombre inhabituellement élevé de chaînes latérales ordonnées. Les conditions de faible activité de l'eau imitent les mélanges de solvants aqueux-organiques et par conséquent les enzymes halophiles conservent généralement une activité considérable dans les milieux organiques, ce qui les rend potentiellement utiles en tant que biocatalyseurs industriels (Karan R, et *al.*, 2012. De lourdes Moreno M, et *al.*, 2013).

2.1 La malate déshydrogénase:

La malate déshydrogénase (MDH) est une enzyme clé qui catalyse la conversion de la malate en oxaloacétate (et inversement) dans le cycle de l'acide citrique Présenté dans la plupart des organismes, la malate déshydrogénase existe comme une molécule homotétramérique dont la sous unité possède un poids moléculaire aux alentours de 30 KDa avec une structure proche de celle du lactate déshydrogénase (LDH) (Vincent M., 2011).

Il est intéressant de noter que la séquence en acides aminés de MDH d'archée est plus proche de celle du lactate déshydrogénase LDH que celle de MDH d'autres organismes (cela indique qu'il existe un lien possible entre l'évolution de la LDH et MDH). Il sera donc plus intéressant de comparer les structures des MDH d'archée à des LDH des autres organismes (Vincent, M, 2011).

La MDH d'archées halophile la plus étudiée à ce jour est la MDH d' *Haloarcula marismortui* (*hMDH*). La structure homotétramérique de la *hMDH* est représentée par la figure 11, cette structure a été obtenue par cristallographie à rayon X avec une résolution de 3,2Å par Dym et al en 1995 (Vincent, M, 2011).

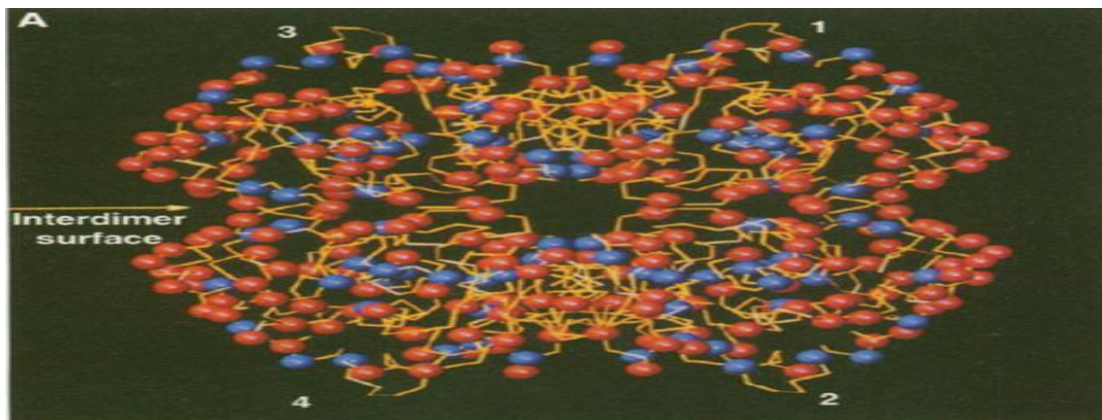


Figure 11 : Structure tétramérique de la *hMDH* : les acides aminés acides sont représentés en rouge et les basiques en bleu. Les nombres 1 à 4 désignent les différentes sous-unités de la protéine. Source Dym et al 1995.

Depuis, plusieurs structures de cette protéine ont été réalisées avec une meilleure résolution. La comparaison des résidus de surface des différentes MDH et LDH provenant d'organismes halophile, thermophile, acidophile et mésophile, permet de visualiser la forte proportion de résidus acide de la protéine halophile en contact avec le solvant (sauf dans les régions où la présence d'acide aminé positif est nécessaire pour les fonctions biologique) et donc le fort potentiel isoélectrique négatif. Sont représenté sur la figure13 la surface électrostatique de la MDH de l'archée acidophile *Picrophilus torridus* (*Pt-MDH*) qui croit à un pH=0 et celle de l'archée halophile *Haloferax volcanii* (*Hv-MDH*). Il est supposé que cette surface chargée négativement va permettre de recruter un grand nombre de molécules de solvant, créant une couche d'hydratation car les ions salins sont hydratés.(Vincent, M, 2011)

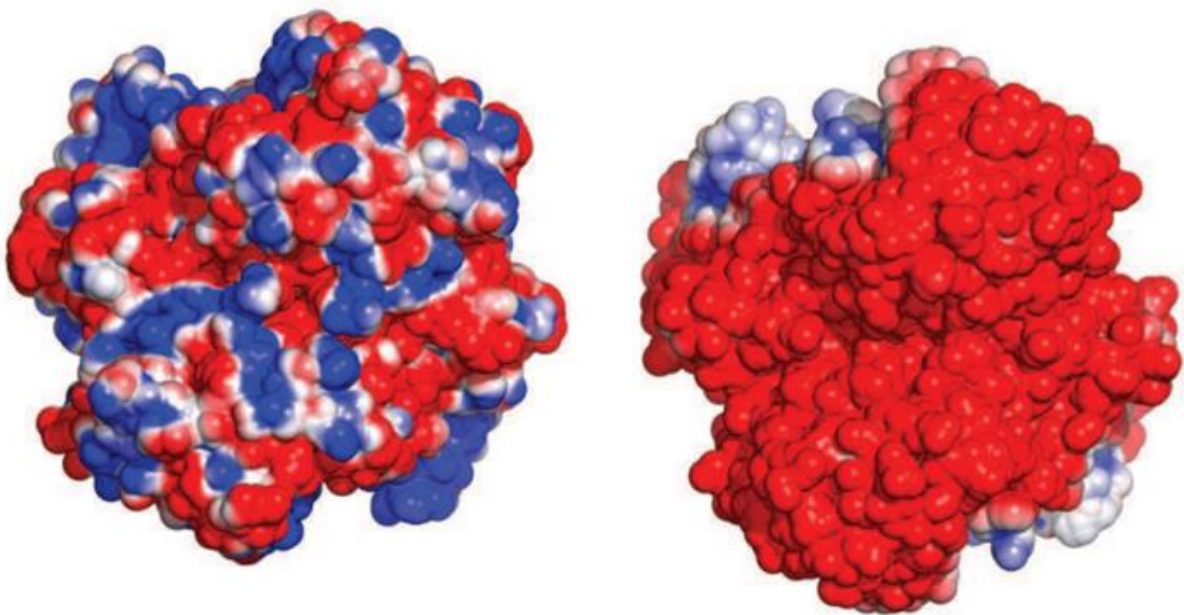


Figure 12 : Comparaison de la surface électrostatique résultant de la composition en acide aminés acido-basique de la surface d'une malate déshydrogénase acidophile et halophile.

Structure tétramérique de la *Pt-MDH* (à gauche) et de la *Hv-MDH* (à droite), la surface électrostatique négative est représentée en rouge et positive en bleu. Structure et image réalisées par Romain Talon, groupe ELMA IBS.

A partir des données structurales de la *hMDH*, il a été possible de déterminer d'autres particularités structurales, en particulier la présence de sites spécifiques de ponts ioniques à l'interface des sous-unités. Cette incorporation d'ions à l'intérieur de la structure va permettre de créer un très grand nombre de ponts et de réseaux salins entre les sous-unités (cette fonctionnalité est aussi utilisée pour la thermostabilité des protéines).

Depuis, ces données structurales ont été confirmées sur d'autres protéines halophiles, provenant aussi d'autres organismes halophiles (Vincent, M, 2011)

2.2 Activité des haloenzymes:

2.2.1 La beta-galactosidase :

Dans une étude d'une beta-galactosidase de *Halorubrum lacusprofundi*, l'enzyme s'est avérée active sur une plage de températures exceptionnellement large (-5 à 70 °C) dans des conditions optimales (4-5 M NaCl ou KCl) (Karan R, et al., 2013).

L'enzyme s'est également avérée présenter une stabilité et une activité élevées dans les solutions aqueuses d'alcools, y compris le méthanol et l'éthanol (DasSarma S, et al., 2015)

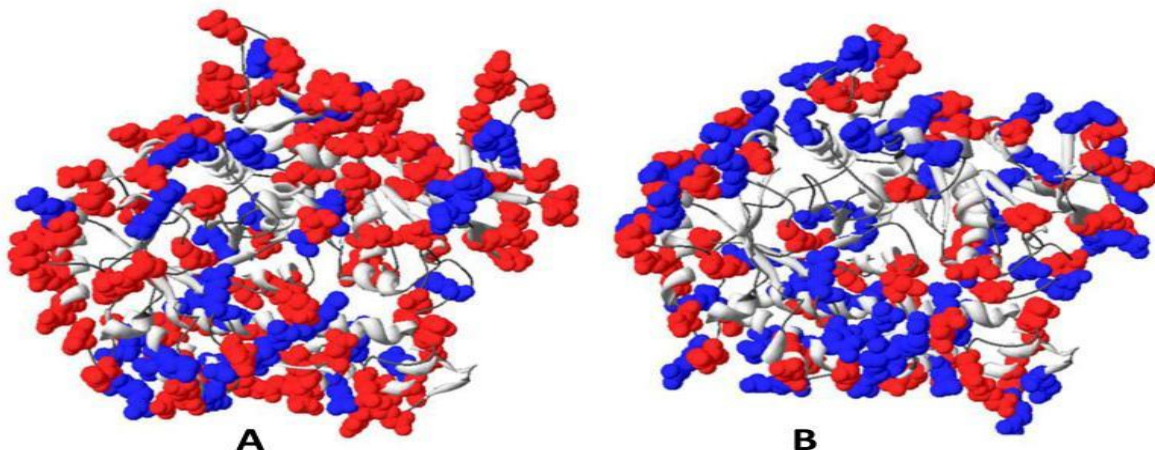


Figure 13 : Comparaison des acides aminés acides et basique de surface dans la beta-galactosidases.

Une structure modèle est illustrée pour l'enzyme de *Halorubrum lacusprofundi* (A) et structure cristalline pour celle de *Thermus thermophilus* (B), avec une épine dorsale en blanc sous forme de ruban et des groupes de surface acides (rouge) et basique (bleu) illustrés en utilisant

le remplissage d'espace des modèles. Les charges surfaciques nettes sont de -65 (A) et de -4 (B) (DasSarma S, et al., 2015).

2.1.2. L'ADN ligase:

L'ADN ligase de *Haloflex volcanii* accumule des ions K^+ qui ont été trouvés pour déclencher une activité catalytique en stabilisant préférentiellement le site actif, et sur la base des prédictions, l'enzyme pourrait ensuite être muté pour améliorer les performances en présence d'ions Na^+ (Ortego G, et al, 2011)

La base structurelle de la résistance au sel a également été déterminée expérimentalement pour un domaine de l'ADN ligase de *Haloflex volcanii* (DasSarma., 2015)

2.1.3. L'amylase :

Dans une étude sur l'halophile modéré *Nesterenkonia* sp l'amylase a présenté une activité maximale à pH (7-7,5) et relativement stable à pH (6,5-7,5), ainsi il a marqué une activité optimale et stable à une température de 45°C, comme il est été très active dans une large gamme de concentration de NaCl (0 à 4M). L'activité de l'amylase n'était pas influencée par : Ca^{2+} , Rb^+ , Li^+ , Cs^+ , Mg^{2+} et Hg^{2+} tandis que le Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Al^{2+} inhibe fortement son activité, de plus l'étude faite sur ce dernier a observé que le PMSF et le beta-mercaptoéthanol ont un effet inhibiteur sur l'activité de l'amylase contrairement à l'EDTA qui l'inhibe (De lourdes M et al., 2012).

2.1.4 Protéase :

En raison de voir l'activité de la protéase de la bactérie modérément halophile *Pseudoalteromonas ruthenica*, Maria de lourdes et al 2012 ont détecté que l'enzyme après purification a une activité optimale à 55°C, pH 8,5 et une tolérance élevé à une large gamme de concentration de NaCl (0-4M). Cependant, l'activité de l'enzyme était inhibé par : EDTA, PMFS et le Pefabloc (De lourde M, et al., 2012)

2.1.5 Enzyme lipolytique :

Une étude a montré que la bactérie modérément halophile *Marinobacter lipolytica* produit une enzyme lipolytique attribué a la famille VIII, cette enzyme est désignée : LipBL, Cette enzyme a marqué une activité optimal à : 80°C, pH optimal déterminé à 25°C était 7,0. Aussi, elle a montré une activité optimale sans chlorure de sodium, tout en maintenant une activité de 20% dans une large gamme de concentrations de NaCl. Cette enzyme a une identité élevé avec la beta-lactames de classe c (De lourdes M. et al., 2012).

3. Mécanisme catalytique des haloenzymes :

L'hydrolyse du substrat commence par l'attaque du nucléophile via l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle du résidu sérine, sur l'atome de carbone du groupement carbonyle impliqué dans la liaison ester du substrat. Se forme ainsi un intermédiaire tétraédrique (complexe enzyme- substrat) caractérisé par une charge négative (Jaeger et al. 1999). Ce dernier est stabilisé par des liaisons hydrogènes, établies entre la charge négative sur l'oxygène du groupement carbonyle, ce que l'on dénomme un "oxyanion", et les atomes d'azote 'N' de deux groupements NH (le trou oxyanion) (Nardini et Dijkstra, 1999). Au cours de cette catalyse, un proton est transféré du groupement OH de la sérine nucléophile à l'histidine, puis à l'oxygène de la liaison ester cible, qui est ainsi clivée. Les composés acides du substrat sont estérifiés par le nucléophile Ser, avec la formation d'un complexe lipase-acyle et libération d'alcools (R'-OH). C'est l'étape d'acylation (Muralidhar, 2002). L'étape suivante est celle de la deacylation. Au cours de cette étape, le complexe lipase- acyle est hydrolysé à son tour par une molécule d'eau avec libération des acides gras et régénération de l'enzyme, qui sera impliquée dans un autre cycle de catalyse (Jaeger et al. 1999; Jaeger et al., 1998).

3.1. Mécanisme catalytique des lipases :

Les lipases catalysent non seulement des réactions d'hydrolyse, mais elles sont aussi capables de catalyser les réactions inverses en fonction du microenvironnement dans lequel elles se trouvent (Aracil et al., 2006). En milieu aqueux, elles agissent en tant qu'hydrolases et en

milieu organique elles catalysent la synthèse des liaisons esters. Les réactions de synthèse comprennent les réactions d'estérification, et les réactions de transestérification qui regroupent l'alcoolyse, l'acidolyse, et l'interestérification (Reis et *al.*, 2009). L'équilibre entre l'hydrolyse et la synthèse est contrôlé par l'activité d'eau dans le milieu réactionnel, et une activité d'eau faible favorise les réactions de synthèse (Bornscheuer, 1995) (Addou AN.,2009).

- **Hydrolyse :**

Cette réaction se réfère à la dégradation des lipides et des huiles, en acide gras et glycérol (alcool). Cette réaction aboutit à la formation de produits importants pour de multiples applications, il en résulte la formation d'acides gras libres, de monoglycérides, et de diglycérides (Gandhi, 1997).

- **La synthèse :**

- L'estérification :

Le terme estérification fait référence à la réaction entre les alcools polyhydrique et les acides gras libres. Cette réaction est catalysée par les lipases dans les solvants organiques. Des composés d'intérêt particulier sont obtenus par ces réactions d'estérification, tels que les esters d'acide oléique (Villeneuve et al., 2000).

- La transestérification :

Les réactions de transestérification sont les réactions d'échange d'un radical acyle : entre un ester et un acide (acidolyse) ; entre un ester et un autre ester (interestérification), ou bien entre un ester et un alcool (alcoolyse). Cette réaction est utilisée par exemple dans la synthèse du beurre de cacao, où la lipase catalyse la transestérification, entre l'huile de palme et l'acide stéarique (Villeneuve et al., 2000).

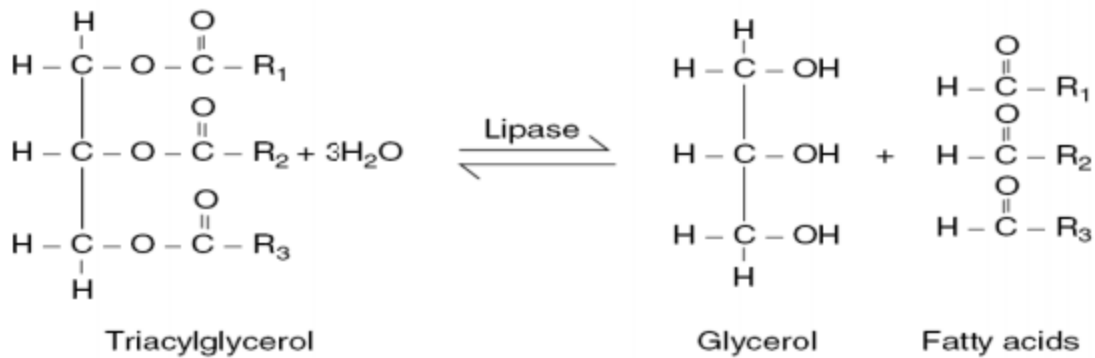


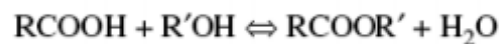
Figure 14 : Réaction de catalyse des triacylglycérols par les lipases en milieux aqueux et la réaction inverse de synthèse dans des milieux organiques à faible activité d'eau (Salameh et Wiegel, 2006).

(i) Hydrolysis:

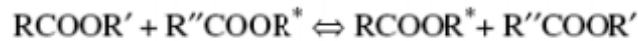


(ii) Synthesis:

(a) Esterification



(b) Interesterification



(c) Alcoholysis



(d) Acidolysis

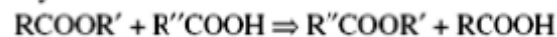


Figure 15 : les principaux réactions catalysés par les lipase (Reis., 2009)

III.2 structure du site actif et mécanisme catalytique de la laccase :

Les laccases catalysent l'oxydation d'une grande variété de substrats avec la réduction concomitante de l'oxygène moléculaire en eau. Ce type de catalyse est relativement rare du fait que beaucoup d'enzymes utilisent l'oxygène moléculaire, mais seulement très peu d'entre elles le réduisent complètement en eau. La laccase partage cette propriété de catalyse avec l'ascorbate oxydase et la ceruloplasmin. Les trois enzymes forment le groupe des oxydases

bleues Le travail sur la structure cristalline de ce groupe d'enzymes a donné l'information utile pour des déductions au sujet de l'emplacement actif des laccases (Xuliet al., 2007 ; Hakulinen et al., 2006 ; Bertrand et al., 2002).

3.2.1 Structure du site actif de la Laccase :

Les laccases et les autres oxydases bleues contiennent le cuivre à leur emplacement actif. Les laccases contiennent quatre atomes de cuivre, un de type 1, isolé, responsable de l'oxydation des phénols et aussi de la couleur bleue des préparations purifiées de cette enzyme et un cluster de 3 atomes de cuivre (1 de type 2 et 2 de type 3) responsable de l'activation du dioxygène. Dans la laccase, une cystéine et deux histidines lient l'atome de cuivre cependant, dans les autres oxydases bleues un quatrième acide aminé la méthionine, est souvent trouvée. (Boutaiba S., 2008)

Cette différence peut expliquer le potentiel plus positif d'oxydoréduction trouvé dans la laccase à ce centre comparé aux autres oxydases bleues (Bertrand et al., 2002). La paire d'atomes de cuivre du type 3 et l'atome de cuivre de type 2 forment le centre trinuéculaire et qui est distant d'environ 12.5 Å du centre de cuivre type 1. Cependant Les centres de cuivres de type 2 et 3 sont presque équidistants avec 4.8 Å entre la paire d'atome de cuivre de type 3 et environ 4.64 et 4.67 Å entre celle-ci et celle du type 2. Les atomes de cuivre du type 3 sont liés chacune par trois résidus histidine, alors que le cuivre type 2 est lié par 2 histidine (Enguital et al., 2004) présenté dans (la figure 16 et 17) Les résidus de cystéine et d'histidine qui lient ces centres de cuivre et petite partie de leur séquence environnante sont bien conservés parmi les oxydases bleues (Rosalia et al., 2005).

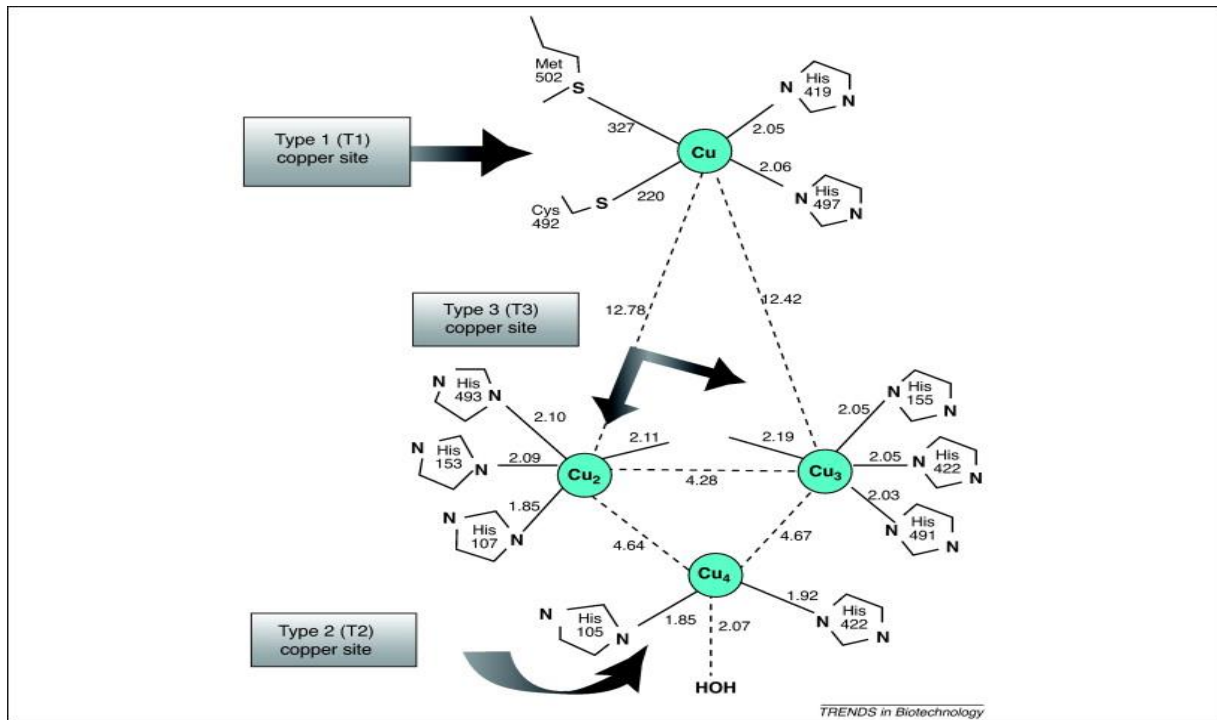


Figure 16: Schéma synthétique du centre catalytique de la laccase montrant les distance entre les différents atomes (Santhanam N, et al., 2011).

3.2.2 Mécanisme d'action de la Laccase :

Le mécanisme d'action des laccases et notamment le rôle du centre métallique, reste mal connu. Il est admis d'un processus de trois étapes :

- 1) le cuivre de type 1 est réduit par le substrat qui est oxydé ;
- 2) transfert de l'électron gagné à partir du cuivre de type 1 au centre trinucléaire T2/T3 ;
- 3) la réduction du dioxygène (O_2) en eau au même centre trinucléaire (Gianfredaet *al.*, 1999).

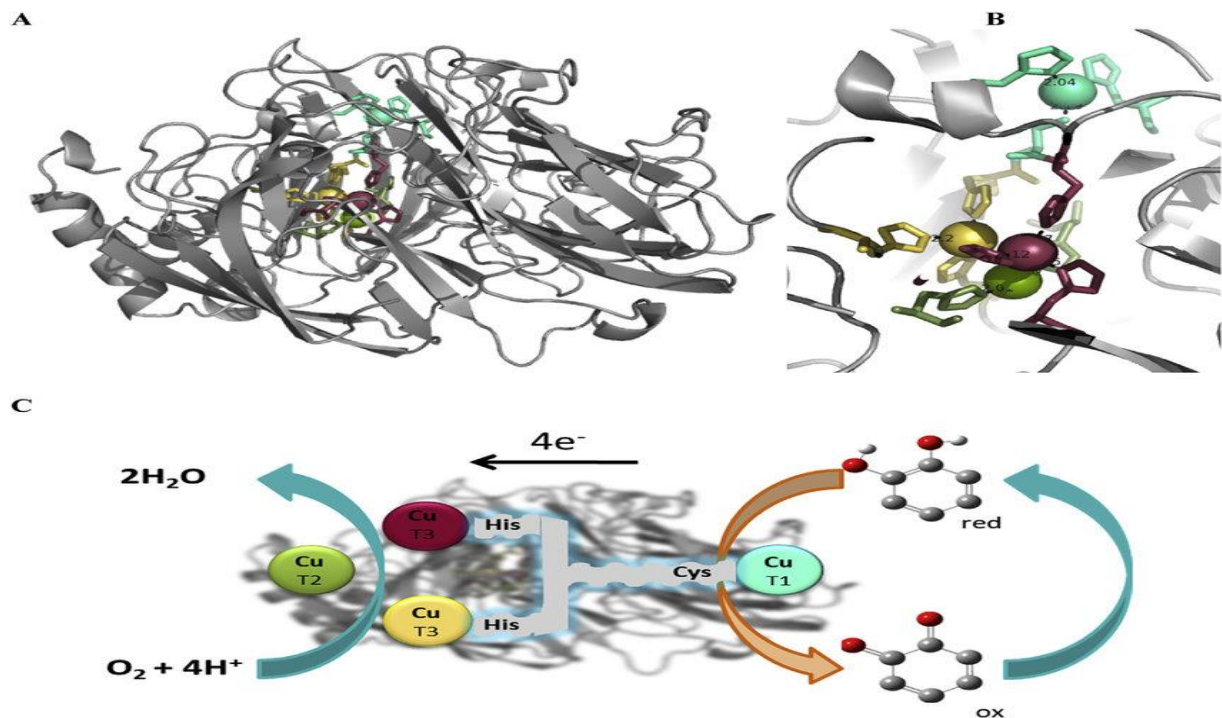


Figure 17 : Structure 3D de l'enzyme laccase (A) et de son amas de cuivre (B) où le Cu de type 1 (T1) est ligaturé à His395, His458, Cys453, Cu de type 2 (T2) à His64, His398 et 2 Cu de type 3 (T3) à His66, His109, His454 et His111, His400, His452. C) Schéma des mécanismes Redox dans l'enzyme laccase en présence de catéchol (Avaldi L, et al., 2019).

4. Propriétés des haloenzymes:

La négativité frappante du protéome halophile a été révélée pour la première fois par le séquençage du génome de *Halobacterium sp.* CNRC-1 (tableau 8) (NG W-L, et al, 1998., Kennedy SP, et al, 2001) Une distribution unimodale des points isoélectriques des protéines (PI) avec une moyenne de 5,0 et un mode de 4,2 a été observée, contrairement à tous les protéomes non halophiles qui possèdent une distribution bimodale avec des protéines acides et basiques et un PI moyen très proche de la neutralité (Figure. 18).

Halobacterium présentait un excès d'acides aminés acide telle que : (acide glutamique et aspartique) et un déficit d'acides aminés basiques comme : (lysine et arginine).

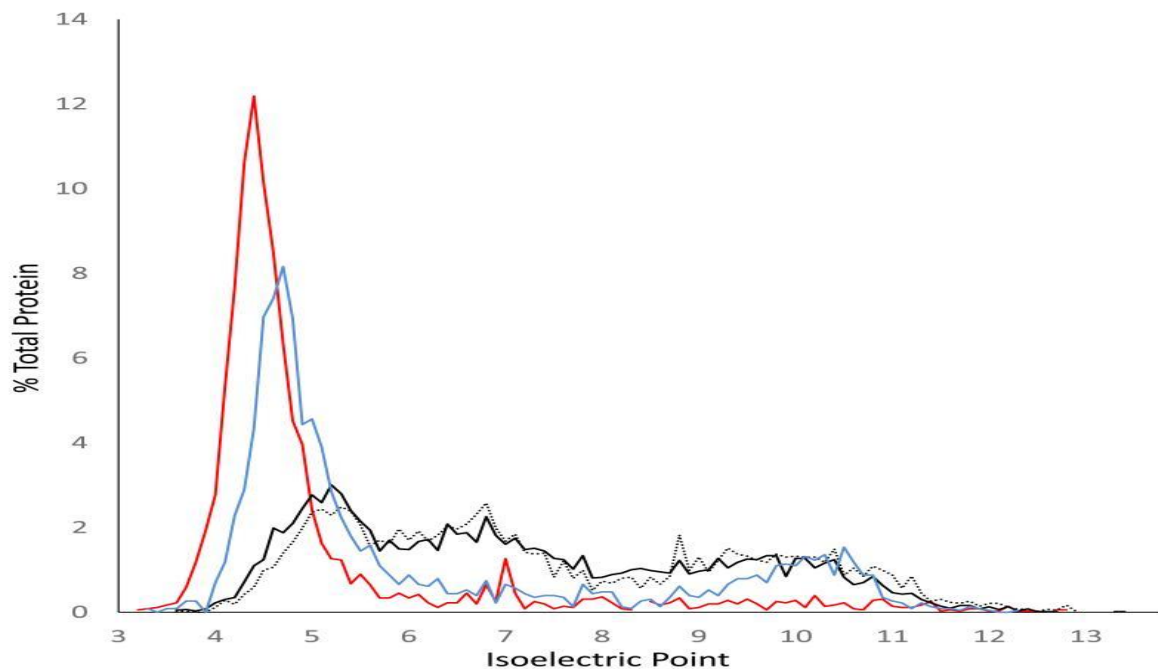


Figure 18 : Distribution des points isoélectrique des protéines prédites à partir des séquences du génome le pourcentage de protéines totales est tracé en fonction du PI par incréments de 0,1 pour *Halorubrum lacusprofundi* (rouge), *Acetohalobium arabaticum* (bleu), *Debaryomyces Hansenii* (ligne noire) et *Escherichia coli* (point noirs).

Les charges négatives en excès ont été localisées à la surface des protéines modélisées, conformément aux travaux structurels disponibles (Dym A, et al, 1995. Kennedy SP, et al., 2006. DasSarma S et al., 2006). Avec le séquençage ultérieur de nombreux génomes supplémentaires, les études bioinformatiques ont confirmé la grande dominance des résidus acides et un déficit en résidus basiques, en particulier la lysine, pour les procaryote halophiles, mais pas nécessairement les eucaryotes halophiles (Tableau 7) (Bolhuis A, et al. 2012).

En plus de leur nature négative, les protéines halophiles et surtout haloarchées se sont avérées contenir une composition légèrement inférieure de chaînes latérales hydrophobes volumineuses (phénylalanine, isoleucine et leucine) à leur surface par rapport aux petites et à la limite hydrophobe (glycine, alanine, sérine et thréonine) résidus d'acides aminés (Kasrtritis PL, et al., 2007) Ces résultats sont cohérents avec une flexibilité et une hydratation de surface accrues des protéines halophiles (DasSharma S, et al., 2015).

Tableau 7 : Micro-organismes halophiles représentatifs (DasSarm S, et al., 2015).

Domaine et Organisme	Physiologie et isolement	PI moyen
Archées		
<i>Halobacterium</i> sp. CNRC-1	Modèle de laboratoire, phototrophe anaérobie facultatif	5.0
<i>Haloferax volcanii</i>	Modèle de laboratoire, phototrophe, de boue de la Mer Morte	5.0
<i>Haloferax méditerranéen</i>	Métabolisme polyvalent, producteur de PHA de saltern espagnol	4.8
<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	Halophile adapté au froid du lac Antarctique	4.8
Bactéries		
<i>Acetohalobium arabaticum</i>	Fermicute homoacétogène méthylophile de la lagune d'Arabat	5.9
<i>Chromohalobacter salexigens</i>	Protéobactérie chimioorganotrophe anaérobie de Bonair	6.6
<i>Halomonas allongé</i>	Protéobactérie productrice d'ectoïne à partir de la saline solaire de Bonaire	6.3
<i>Halanaerobium hydrogéniformans</i>	Firmicute haloalcalophile produisant de l'hydrogène à partir de Soap Lake	6.6
<i>Halorhodospira halochloris</i>	Proteobacterium de soufre pourpre anaérobie, lac Wadi Nantroun	6.7

<i>Halorhodospirahalophila</i>	Proteobacterium anaérobie de soufre pourpre, boue du lac Summer	6.3
<i>Salinibacterruber</i>	Bactériodes hétérotrophes du salé solaire espagnol	5.9
Eucarya		
<i>Debaryomyceshansenii</i>	Levure hémiascomycète du sol de Nouvelle-Zélande	6.9
<i>Dunaliella salina</i>	Microalgue unicellulaire/chlorophyceae comme dans les marais salants	N/A
<i>Wallémie ichtyophage</i>	Basidomycète xérophile du saltern slovène	7.2

4.1. Propriété physique-chimique des protéines halophiles:

Chaque protéine a des propriétés physico-chimiques spécifiques. Les effets délétères des sels monovalents à des concentrations multimolaires sur les macromolécules biologiques de divers organismes ont été notés depuis longtemps de Jencks W.P 1969 et kyte.J 1982 (semble être causé dans une large mesure par la dissociation de groupes, sous-unités,...etc. qui sont impliqués dans les liaisons ioniques. Si de telles liaisons ioniques manquent dans les constituants cellulaires halophiles, la chimie physique de ces structures doit être inhabituelle.

En général, les structures halophiles se sont en effet avérées stables uniquement en présence d'au moins 1 M de sel. De plus, la plupart des systèmes nécessitaient ou étaient stimulés par le sel à des concentrations proches ou même supérieures à cette valeur. Ainsi, plutôt que d'être détruites à forte concentration en sel, les structures macromoléculaires responsables de l'activité biologique chez les halophiles semblent, en fait, dépendre de la présence de sels. Un exemple dramatique de cette dépendance au sel unique est le comportement de l'enveloppe cellulaire des halobactéries, lorsque la concentration en sel est abaissée. Dans ces conditions, les cellules (Van Hippel P.H 1969 et Abram D. 1961) et les enveloppes cellulaires isolées (Brown AD.1963, 1964, Kyte J 1982 et Kushner DJ, 1966) se désintègrent pour donner des

fragments à sédimentation lente, et plusieurs enzymes liées à la membrane sont inactivées (Onishi 1966 et Hochstein L.I 1968).

Il est clair que, lors de l'abaissement de la concentration en sel, des changements considérables se produisent dans la structure de l'enveloppe cellulaire et de ses constituants (Farooqui.MS., 2014).

5. Adaptation des enzymes halophiles à l'hypersalinité:

Au cours des dernières décennies, l'adaptation des micro-organismes halophiles à leur environnement a fait l'objet d'un intérêt croissant, les méthodologies de culture, de manipulation et de génie génétique progressant régulièrement. La compréhension de l'adaptation des halophiles à une salinité élevée comprend plusieurs mécanismes différents pour équilibrer le stress osmotique du milieu extérieur. Les archées halophiles (*Haloarchaea*) utilisent principalement une stratégie de « sel-in », accumulant des concentrations de KCl égales à NaCl dans leur environnement et lorsqu'elles sont examinées leurs enzymes tolèrent ou nécessitent 4 à 5 M de sel (Lanyi JK. 1974).

En revanche, la plupart des Bactéries halophiles et Eukarya utilisent largement une stratégie de "salage", excluant les sels et accumulant ou synthétisant de novosolutés compatibles (par exemple la glycine bêtaïne et d'autres composés zwitterioniques pour les bactéries et le glycérol et d'autres polyols pour Eukarya) de Robert MF, 2005 (DasSarma S, et al., 2015).

Les premiers microbiologistes qui se sont penchés sur l'adaptation des enzymes halophiles à une salinité élevée ont découvert deux caractéristiques principales : un nombre substantiel de charges protéiques et une hydrophobie accrue (Bayley, 1978).

Les ions dissous ont protégé les répulsions électrostatiques à de faibles concentrations (<1 M) de sels et des effets hydrophobes accrus se sont produits à des concentrations plus élevées de 4 M à des conditions de saturation. Des rôles pour des paires d'ions spécifiques ont également été parfois suggérés, par exemple dans la stabilisation de régions de sites actifs ou la promotion d'interactions de sous-unités. Les effets combinés de ces forces ont été supposés entraîner une amélioration de la fonction dans des conditions hypersalines où la plupart des protéines non halophiles sont inactivées par une faible activité de l'eau et une solvation limitante entraînant leur dénaturation, agrégation et précipitation. (DasSarma S, et al., 2015).

Chapitre 4

L'intérêt des Halophiles en biotechnologie

1. intérêt des halophiles dans la biotechnologie :

1.1 Généralité :

Les propriétés des micro-organismes halophiles et de leurs enzymes chargées négativement les rendent potentiellement très utiles pour la biotechnologie, ces derniers peuvent servir de source de nombreuses biomolécules uniques, telles que des enzymes stables, des biopolymères et des solutés compatibles et ils peuvent également être précieux pour les processus de bioremédiation et de biofermentation, et d'autres nouvelles applications en agriculture et en médecine (DasSarma, S et al., 2015).

Malgré que les enzymes halophiles soient considérées comme une nouvelle alternative à utiliser comme biocatalyseurs dans différentes industries, il existe relativement peu d'études sur haloenzymes, certaines étant basées sur leur isolement et d'autres sur leur caractérisation. Cependant, il est important d'étudier en profondeur ces enzymes afin de les utiliser dans des processus biotechnologiques (De Lourdes MM, et al., 2012).

2. Production d'enzymes halophiles :

Les micro-organismes halophiles et halotolérants représentent des sources prometteuses d'enzymes tolérantes au sel qui pourrait être utilisées dans divers processus biotechnologiques.

2.1. Les Hydrolases:

Les hydrolases constituent une classe d'enzymes largement distribuées dans la nature, des bactéries aux eucaryotes supérieurs. Les micro-organismes halophiles sont une source potentielle d'extrêmzymes appelés haloenzymes comme : les protéases, les amylases, les nucléases, les lipases, les cellulases, les xylanases, les catalases et les estérases.

Ces haloenzymes sont capables de fonctionner sous des concentrations élevées de sel, une large gamme de valeurs de pH et des températures auxquelles d'autres les protéines précipitent ou se dénaturent généralement (Sonika G, et al., 2016).

Tableau 8 : Microorganismes capables de produire des enzymes hydrolytiques isolés de différents environnements hypersalins (Pérez D et al., 2013).

Site d'isolement	Analyse de l'activité hydrolytique	Activité hydrolytique la plus abondante	Isoler l'affiliation	références
Salterns à Almeria, Cadix et Huelva (Espagne)	amylase protéase lipase DNase pullulanase	Amylase	<i>Salinivibrio</i> <i>Halomonas</i> <i>Chromohalobacter</i> <i>Bacillus</i> - <i>Salibacillus</i> <i>Salinicoccus</i> <i>Marinococcus</i>	(Sanchez P, et al., 2003)
Saltern à Huelva (Espagne)	lipase protéase amylase nucléase	Amylase	<i>Halorubrum</i> <i>Haloarcula</i> <i>Halobacterium</i> <i>Salicola</i> <i>Salinibacter</i> <i>Pseudomonas</i>	(Moreno, ML et al., 2009)
Lac HowzSoltan (Iran)	lipase amylase protéase xylanase DNase inulinase pectinase cellulase pulullanase	Lipase	<i>Salicola</i> <i>Halovibrio</i> <i>Halomonas</i> <i>Oceanobacillus</i> <i>Thalassobacillus</i> <i>Halobacillus</i> <i>Virgibacillus</i> <i>Gracilibacillus</i> <i>Salinicoccus</i> <i>Piscibacillus</i>	(Rohban, R et al., 2009)
Lac salé de Maharlu (Iran)	protéase lipase	ND	<i>Bacillus</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Halobacterium</i> <i>Aeromonas</i> <i>Staphylococcus</i>	(Ghasemi Y, et al., 2011)

Sédiments profonds du sud de la fosse d'Okinawa (Chine)	amylase protéase lipase DNase	Amylase	<i>Alcanivorax</i> <i>Bacillus</i> <i>Cobetia</i> <i>Halomonas</i> <i>Methylarcula</i> <i>Micrococcus</i> <i>Myroides</i> <i>Paracoccus</i> <i>Planococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Psychrobacter</i> <i>Sporosarcina</i> <i>Sufflavibacter</i> <i>Wangia</i>	(Zhu, H et al., 2009)
Mine de sel de Slanic Prahova (Roumanie)	amylase gélatinase lipase protéase cellulase xylanase	Lipase protéase	ND	(Cojoc R, et al., 2009)
Désert d'Atacama (Chili)	amylase protéase lipase DNase xylanase pullulanas	DNase	<i>Bacillus</i> <i>Halobacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Halomonas</i> <i>Staphylococcus</i>	(Moreno, ML et al., 2012)
Désertsalin « Indian Wild Ass Sanctuary » (Inde)	amylase	ND	<i>Bacillus</i>	(Khunt M, et al., 2011)

ND : no déterminé.

1.2.1 Les -amylases:

Les amylases constituent un groupe d'enzymes intéressantes du point de vue biotechnologique. Leurs applications les plus intéressantes se trouvent dans la chimie clinique et analytique, ainsi que leurs applications répandues dans la saccharification de l'amidon et dans les industries du textile, de l'alimentation, de la brasserie et de la distillation (de lourdes MM, et al., 2012).

La dégradation des polysaccharides extracellulaires par les amylases halophiles fait bénéficier de nombreuses opérations industrielles nécessitant des conditions extrêmes, malgré cela l'amylase intracellulaire ou associées aux cellules haloarchées reste peu étudiée à celle d'autre microorganisme. (Gómez-Villegas P, et al., 2021).

Des études montrent que la production d'amylase dans les haloarchées est induite par l'amidon, comme décrit pour : *Halorubrum*, *Haloferax*, *Haloarcula* et certaines bactéries halophiles (Gómez-Villegas P, et al., 2021)

Dans d'autres cas la production d'alpha-amylases a été influencée par : l'azote, les ions métalliques ou le phosphate. Pérez-Pomares et al., 2003, par exemple, ont signalé une faible excretion d'amylase lors de l'utilisation d'un milieu minimal contenant de l'acétate d'ammonium comme source de carbone et d'azote, plus de l'amidon dans *Haloferax mediterranei*. (Gómez-Villegas P et al., 2021).

1.2.1.1. Classement des amylases :

Les amylases hydrolytiques peuvent être classées en deux grandes catégories :

- les endo-amylases : hydrolysent l'intérieur de la molécule d'amidon ;

La plupart des endo-amylases appartiennent à la famille des α -amylases (EC 3.2.1.1) et clivent les liaisons α , 1-4 glycosuriques internes entre les unités glucose, produisant des oligosaccharides de longueurs variables et des dextrans à limite ;

- les exo-amylases : dégradent successivement l'amidon des extrémités non réductrices.

De plus, les -amylases sont typiquement divisées en deux groupes, selon les produits d'hydrolyse et le degré d'hydrolyse de l'amidon :

- les -amylases saccharifiantes qui produisent des sucres libres ;

- les α -amylases liquéfiantes qui décomposent le polymère d'amidon sans produire de sucres libres (Gómez-Villegas P, et al., 2021)

1.2.1.2. Type d'amylase:

1.2.1.2. 1. L'alpha amylase :

L' α -amylase (également connue sous le nom d'endo-1, 4- α - d- glucane glucanohydrolase EC 3.2.1.1) clive les liaisons α -1,4 entre les unités glucose adjacentes de l'amidon et produit du glucose, du maltose et du maltotriose pour former des chaînes d'amylose linéaires (Sivaramakrishnan et al., 2006). La présence de cette endoenzyme extracellulaire a été rapportée dans plusieurs micro-organismes halophiles qui sont résumés dans Tableau en tant qu'annexe. Cette enzyme a été trouvée dans divers groupes de micro-organismes halophiles, dont principalement des bactéries (Antonio v, et al. 2019).

1.2.1.2.2. La beta amylase :

L' β -amylase est une exoenzyme qui hydrolyse l'amidon en éliminant le maltose de l'extrémité non réductrice de l'amidon (Antonio v, et al., 2019)

Cette enzyme est sécrétée par plusieurs espèces du genre *Bacillus*, dont *B. polymyxa*, *B. cereus* et *B. megaterium*, et par *Clostridium thermosulfurogenes* (Kawazu et al., 1987). Jusqu'à présent, la présence d' β -amylase n'a été rapportée que chez deux bactéries halophiles. Ces deux β -amylases proviennent de deux bactéries modérément halophiles, *Halobacillus* sp. souche LY9 (Li et Yu., 2011) et *Salimicrobium halophilum* souche LY20 (Antonio ventosa et al., 2019).

1.2.1.2.3. La Glucoamylase :

C'est une autre enzyme hydrolysant l'amidon qui catalyse le clivage séquentiel des liaisons glycosidiques -(1,4) et -(1,6) des extrémités non réduites de l'amidon et des oligosaccharides apparentés et produit du glucose comme seul produit final (Xu et al., 2016).

L'archéon halophile *Halorubrum* sp synthétise l'amylopullulanase qui est un type de glucoamylase (Antonio v, et al., 2019).

1.2.2. Les protéases :

Les protéases des microorganismes halophiles sont largement utilisées dans les industries des détergents et des produits alimentaires. Ils sont également utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire, et l'industrie du cuir, ainsi que dans la fabrication de produits à base de soja, et la production de l'aspartame. La production de protéases qui possèdent un potentiel industriel important a été caractérisé chez les espèces *Halobacterium spp*, *Haloferax mediteranei*, *Natrialba asiatica*, *Natrialba magadii*, *Natronococcus occultus*, et *Natronomonas pharaonis* (Kamekura, et al., 1995).

1.2.3. Les Enzymes lipolytiques :

Le terme d'enzymes lipolytiques regroupe les lipases (EC. 3.1.1.3) et les estérases (EC. 3.1.1.1) et désigne une classe d'enzymes largement répandue dans la nature. Elles se rencontrent aussi bien chez les végétaux que chez les animaux et les micro-organismes. A l'exception des phospholipases D, shingomyélinases, cholestérol-estérases et céramidases, les enzymes lipolytiques sont capables en milieu aqueux d'hydrolyser les liaisons esters de substrats lipidiques en libérant des acides gras et du glycérol (Boutaiba S., 2008)

1.2.3.1 .Les lipases :

Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentant ainsi un intérêt potentiel pour l'industrie des détergents. Boutaiba et al, 2006 ont pu mettre en évidence l'activité lipolytique d'une archaebactérie halophile extrême, *Natronococcus sp*, qui hydrolyse l'huile d'olive, ayant un intérêt biotechnologique.

1.2.3.2 Les estérases:

Les estérases sont largement utilisées comme biocatalyseurs en raison de leur capacité à produire des composés optiquement purs. Ces types d'enzymes sont très utiles dans

fabrication des détergents et lessive, ils permettent l'élimination des taches d'huile / graisse. Une estérase à partir de *Haloarcula marismortui* a été purifiée et récemment caractérisée. Cette enzyme présente une préférence pour les acides gras à chaîne courte et des monoesters et elle est dépendante du sel (Muller-santos *et al.* 2009).

1.2.4 Les nucléases H :

Une des quelques enzymes halophiles appliquées dans les processus industriels est la nucléase H isolée de *Micrococcus varians subsp. Halophilus* et utilisée dans la production commerciale de l'agent aromatisant: l'acide 5'-guanylique (5'-GMP). Cette enzyme dégrade l'ARN à 60°C et en présence de 12% (p/v) de sel (Kamekura *et al.* 1982).

12.5 Les cellulases :

Les cellulases et d'autres enzymes cellulolytiques hydrolysent les matières cellulosiques en sucres ensuite ces sucres seront fermentés pour produire du bioéthanol.

Dans une étude faite dans le lac salé de Yuncheng en Chine a montré que l'haloarchéon *Haloarcula sp* et l'halobactérie *Gracilibacillus sp* ont une activité cellulolytique très active et stable qui sont présentés successivement :

- une température variée (40-80°) / (40-70°C) ;
- pH de (7,0-11,0) / (6,0-10,0) ;
- une concentration de NaCl (17,5-30%) / (7,5-17,5%).

2. Production de polymères :

La souche *Haloferax mediterranei*, appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*, produit un polymère, le β -hydroxyalcanoate (plus connus sous le nom de polyesters biodégradables), pourrait servir de plastiques biodégradables. La souche peut utiliser l'amidon comme source de carbone (bon marché) pour la production du polymère (Oren, 2002).

Haloferax mediterranei produit également des quantités importantes d'exopolysaccharides qui peuvent être utilisés comme des gélifiants, des stabilisants ou des épaississants. Elle produit aussi un hétéropolysaccharide sulfaté qui possède une viscosité élevée à de faibles

concentrations, ses propriétés rhéologiques sont excellentes, et il est résistant aux pH et températures extrêmes (Oren, 2002).

3. Production de biosurfactants :

Les Archées halophiles peuvent être utilisées pour la dépollution des environnements par la dégradation des polluants organiques, et dans le traitement des eaux résiduaires concentrées du textile. La production de biosurfactants par les bactéries halophiles peut jouer un rôle important dans la dépollution accélérée des environnements salins pollués par les huiles (Joo et Kim., 2005).

4. Production de substances antibactériennes :

4.1. Généralités :

La production de substances antibactériennes est une caractéristique pratiquement universelle dans les trois domaines de la vie (Shand et Leyva., 2007). Les halocines appartiennent à un groupe de bactériocines produites par des archées halophiles extrême habitants des environnements hyper salins (Platas et al., 1996). Elles sont produites en grandes variétés et elles ressemblent aux bactériocines des eubactéries (Rodriguez-Valera et al., 1985).

La première découverte des halocines date de 1982, suite aux travaux de Rodriguez-Valera qui a mis en évidence l'existence d'un antagonisme parmi les souches d'halophiles isolés des marais salants d'Espagne. Les halocines présentent un large mode d'action (inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, lyse et déstabilisation de la membrane cellulaire) (Oren, 1999). Par contre, leur spectre d'action est étroit : elles n'agissent que sur les microorganismes phylogénétiquement proches de la souche productrice.

4. 2. Classification des archaeocine :

Le terme « archaeocine » a été inventé pour distinguer les substances antibactériennes de nature protéique produites par les Archées de celles produites par les membres du domaine Bactéries (Price et Shand., 2000). Les Halocines se caractérisent par une diversité dans leur taille qui s'étend de 3 à 35 kDa, par une stabilité thermique et une dépendance au sel. Leur spectre d'activité est large vis-à-vis des autres haloarchaea. Les principales caractéristiques de certaines d'halocines sont résumées dans le tableau annexe.

Selon (Shand et Leyva, 2007), Les halocines sont regroupées en deux familles à savoir les microhalocines dont le poids moléculaire ne dépasse pas 10 kDa et les halocines qui sont des protéines de poids moléculaire supérieur à 10kDa, le tableau 9 ci-dessous récapitule leur classification.

Tableau 9 : Présentation de la classification des archaeocine selon Shand et Leyva, 2007.

Microhalocines (≤ 10 kDa)	Halocines (> 10 kDa)
Halocine S8 (HalS8)	Halocine H1 (HalH1)
Halocine R1 (HalR1)	Halocine H4 (HalH4)
Halocine H6/H7	
Halocine A4 (HalA4)	
Halocine C8 (HalC8)	

Ces substances ont une large application, notamment dans la conservation des produits alimentaires par salaison (viande, poisson,...) (Oren., 1999).

L'utilisation des halocines comme agents chimiothérapeutiques, actifs contre les germes pathogènes humains ou animaux n'a pas été encore concrétisée, mais vu les centaines de différentes halocines qui restent encore non caractérisées, suggère que d'autres halocines puissent avoir des applications cliniques (Shand et Leyva., 2007).

L'inhibition de l'antiport Na^+/H^+ par l'halocine H7 a été montré chez les haloarchaea (Meseguer et al., 1986) et chez certains chiens. Cette halocine peut servir de traitement pour protéger le myocarde contre les effets nocifs de l'ischémie (Shand et Leyva., 2007).

5. production du biocarburant:

Les biocarburants sont disponibles en cinq types, dont le bioéthanol, le biobutanol, le biogaz, l'hydrogène et le biodiesel. Le biodiesel et le bioéthanol sont les principaux biocarburants produits à l'échelle industrielle et plus de 90 % du marché total des biocarburants leur est dédié (Oh et al., 2018) ;

Leur succès sur ce marché est déterminé par diverses conditions préalables définies à la fois par des propriétés chimiques et physiques. Il existe plusieurs procédés chimiques et thermochimiques disponibles pour la production de biocarburant, mais la conversion biologique de la biomasse en biocarburant par des micro-organismes est plus rentable et a fait l'objet d'une attention considérable au cours des dernières années (Barnard et al., 2010).

Au cours du processus de synthèse des biocarburants, des conditions difficiles telles que l'augmentation du pH et de la concentration en sel se produisent, ce qui rend la synthèse chimique difficile dans de tel sort d'environnement (Woolard & Irvine, 1995). Les micro-organismes halophiles et halotolérants peuvent se développer dans ces conditions, ce qui en fait le meilleur choix pour les processus industriels, en particulier pour la production de biocarburants (Margesin et Schinner., 2001) ; la présence d'acides aminés acide supplémentaire sur la surface des haloenzymes renforce leur effet durant la production du biocarburant (Mosier et al., 2005).

Il existe des rapports sur la fermentation du sucre et la production directe d'éthanol et de butanol par des halophiles. Par exemple, Amiriet al. 2016 ont signalé que la bactérie modérément halophile, *Nesterenkonia sp.* La souche F, isolée du lac hypersalin Aran-Bidgol en Iran, a la capacité de produire du butanol et de l'éthanol ainsi que de l'acétone dans des conditions aérobies et anaérobies. (Amiriet al, 2016) Il s'agissait du premier signalement de production de butanol et d'éthanol par un micro-organisme sauvage n'appartenant pas à la classe des *Clostridia*. (Amiriet al, 2016).

Conclusion

Conclusion :

Les halophiles montrent une extraordinaire capacité d'adaptation aux conditions physicochimiques dans les environnements extrêmes tant en termes de température, de salinité, de pH que de pression hydrostatique. Répandues dans des habitats écologiques extrêmes nommé thalassohalines et athalassohaline, ces micro-organismes vivent en utilisant leur polyvalence adaptative dans différentes situations de stress.

L'adaptation des halophiles à ces conditions extrêmes à laisser que les halophiles aient un grand potentiel en biotechnologie cela est grâce aux haloenzymes dont nous sommes intéressé dans notre projet de fin d'études, on est basé sur une recherche bibliographique sur ces enzymes musclé qui s'adaptent et garde leur activité sous différent stress.

De différentes recherches a montré que les haloenzymes ont une activité stable est optimale à une salinité entre 0-4 M telle que chez les amylases, les protéases et les enzymes lipolytique des souches d'halophiles divers comme *H. mediterranei*, *H. lacusprofundi*, *P. ruthenica*, *Nesterenkonia sp* et *M. lipolyticus*. Il y a aussi des haloenzymes qui ont une activité optimale à une concentration en NaCl entre 4-5 M le cas des beta-galactosidases, ces derniers ont bien marqué une activité à une température de -5°C cas des beta-galactosidase de l'espèce *H. lacusprofundi* et une température allant à 80°C chez les enzymes lipolytique *M. lipolyticus*.

L'activité des haloenzymes dans ces conditions est due à des propriétés structurales qui se distinguent par une répartition et une richesse de sa surface en acide aminé acide et la présence faible de résidus hydrophobe qui leur permet de rester flexibles en gardant une hydratation même dans une concentration élevé en sel.

Ces caractéristiques structurales et adaptatives des haloenzymes ont donné la main aux chercheurs d'utiliser les haloenzymes dans la biotechnologie industrielle ou pharmaceutique, médicale, agroalimentaire et dans la dépollution.

Les haloenzymes ont fait gagner le domaine de la biotechnologie plusieurs avantages comme :

L'augmentation de la vitesse de la réaction, diminution des risques de contamination et la facilité de la récupération des substrats par simple évaporation (Narima, AA., 2009)

Références Bibliographique

A :

1. **Addou, A. N.** (2009). *Les actinobactéries thermo-halophiles* (Doctoral dissertation).
2. **Alain, K., Marteinsson, V.T., Miroschnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Prieur, D., and Birrien, J.-L.** (2002). *Marinitogapieizophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1331–1339.
3. **Amiri, H., Azarbaijani, R., Yeganeh, L. P., Fazeli, A. S., Tabatabaei, M., Salekdeh, G. H., et al.** (2016). *Nesterenkonia* sp. strain *F*, a halophilic bacterium producing acetone, butanol, and ethanol under aerobic conditions. *Sci. Rep.* 6, 18408–18418.
4. **Ayad, R., & Kharroub, K.** (2011). Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien.

B :

5. **Baker-Austin, C., and Dopson, M.** (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* 15, 165–171.
- 4 **Barnard, D., Casanueva, A., Tuffin, M., and Cowan, D.** (2010). Extremophiles in biofuel synthesis. *Environ. Technol.* 31, 871–888.
- 5 **Bass-Becking, L. G. M.** (1931). Historical notes on salt and salt-manufacture. *The Scientific Monthly*, 32(5), 434-446.
- 6 **Baumgartner JG** (1937) The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophile. *Food Res* 2:321–329.
- 7 **Bayley, S. T., Morton, R. A., et Lanyi, J. K.** (1978). Développements récents dans la biologie moléculaire de bactéries extrêmement halophiles. *CRC critical reviews in microbiology*, 6(2), 151-206.
- 8 **Bergmann, S.** (2015). Ectoine production by halotolerant microorganisms – Process optimization and characterization of cellular state. Retiré de <http://Cuvillier/de/de:schop/publications/6548>.
- 9 **Berrada, I., Willems, A., De Vos, P., Swings, J., Bendaou, N., Melloul, M., & Amar, M.** (2012). Diversity of culturable moderately halophilic and halotolerant bacteria in a marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco). *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), 2419-2434.
- 10 **Bertrand, T., C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N.J. Catherine & C. Mougin.** 2002. Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. *Biochemistry* 41: 7325-7333.
- 11 **Besse, A.** (2016), Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme. Paris.
- 12 **Bischof, J.C., and He, X.** (2005). Thermal stability of proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066, 12–33.
- 13 **Blatt, H., Middleton, G. & Murray, R.** (1980). Evaporites and native sulphur In Origin of Sedimentary Rocks. Ed. H. Blatt, G. Middleton & R. Murray. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- 14 **Bolhuis, A., Kwan, D., & Thomas, J. R.** (2008). Halophilic adaptations of proteins. In *Protein adaptation in extremophiles: design, selection and applications* (pp. 71-104). Nova Science Publishers.

- 15 **Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D. A., & Baratti, J.C.** (2006). Caractérisation préliminaire d'une activité lipolytique à partir d'un archéon extrêmement halophile, *Natronococcus* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(1-2), 21-26.
- 16 **Boutaiba, S.** (2008). Caractérisation biochimique et moléculaire de deux activités enzymatiques; lipase et laccase produites par des archaebactéries halophiles isolées du lac d'El-Goléa (Doctoral dissertation, Alger).
- 17 **Britton, K. L., Baker, P. J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, D. J., Bonete, M. J., ... & Rice, D. W.** (2006). Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 4846-4851.

:C

- 18 **Castrovilli, M. C., Bolognesi, P., Chiarinelli, J., Avaldi, L., Calandra, P., Antonacci, A., & Scognamiglio, V.** (2019). The convergence of forefront technologies in the design of laccase-based biosensors—An update. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115615.
- 19 **Caumette, P.** (1998). Les bactéries halophiles: la vie dans les conditions extrêmes de salinité. *C R Acad Agric Fr* 84, 11-21.
- 20 **Cayol, J. L., Jabari, L., Gannoun, H., Hedi, A., Sakamoto, M., Falsen, E., ... & Fardeau, M. L.** (2012). *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_10), 2522-2527.
- 21 **Cayol, J. L., Ollivier, B., Patel, B. K. C., Prensier, G., Guezennec, J., & Garcia, J. L.** (1994). Isolation and characterization of *Halothermothrixorenia* gen. nov., sp. nov., a halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 534-540.
- 22 **Christian, J. H. B. & Waltho, J. A.** (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 124, 423-429.
- 23 **Chung YR., Kim CH., Hwang I., & CHUN J** (2000) *Paenibacillus koreensis* sp. nov. A new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int J Syst Evol Microbiol*.50:1495–1500.

D :

- 24 **D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.-A., Feller, G., and Gerday, C.** (2002). Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357, 917–925.
- 25 **D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., and Gerday, C.** (2006). Psychrophilic microorganisms: *challenges for life*. *EMBO Rep.* 7, 385–389.
- 26 **Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B.** (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, 13(4), 1925-1965.
- 27 **DasSarma, S., Kennedy, S. P., Ng, W. V., Salzberg, S. L., & Hood, L.** (2001). Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome research*, 11(10), 1641-1650.
- 28 **DasSarma, S., Berquist BR, Coker JA, DasSarma P, Müller JA.** (2006) Post-génomique du modèle haloarchaéon *Halobacterium* sp. CNRC-1. *Systèmes salins* ; 2 :3. 1746-1448

- 29 **DasSarma, S., & DasSarma, P.** (2015). Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Current opinion in microbiology*, 25, 120-126.
- 30 **de Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M. T., & Mellado, E.** (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3(1), 38-51.
- 31 **Desmarais, D., Jablonski, P. E., Fedarko, N. S. & Roberts, M. F.** (1997). 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea. *J Bacteriol* 179, 3146-3153.
- 32 **Dyall-Smith ML.** (2006). The Halohandbook : Protocols for halobacterial genetics Ver 6.01. Haloarchaeal Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia .6 - 9.
- 33 **Dym, O., Mevarech, M., & Sussman, J. L.** (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium. *Science*, 267(5202), 1344-1346.

E :

- 34 **Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F.** (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8).
- 35 **Enguital, F.G., D. Marc, L.O. Martins, R. Grenha, A.O. Henriques, P.F. Lindley, & M. A. Carrondo.** 2004. Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 23472–23476.

F :

- 36 **Fendrihan S, Legat A, Pfaffenhuemer M, Grüber C, Weidler G, Gerbl et Stan- Lotter, H.** (2006). Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Rev Environ Sci Biotechnol* .5, 203-218.

G :

- 37 **García-Moyano, A., González-Toril, E., Aguilera, Á., and Amils, R.** (2012). Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 303–314.
- 38 **Giddings L-A, Newman DJ.** (2015) Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. In: Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. Springer, pp 1–75
- 39 **Gómez-Villegas, P., Vígara, J., Romero, L., Gotor, C., Raposo, S., Gonçalves, B., & León, R.** (2021). Biochemical Characterization of the Amylase Activity from the New Haloarchaeal Strain Haloarcula sp. HS Isolated in the Odiel Marshlands. *Biology*, 10(4), 337.
- 40 **Grant WD, Kamekura M, McGenity TJ et Ventosa A.** (2001). Classe III. Halobacteria In Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd Ed. Springer-Verlag, New York. 1,294 – 334.
- 41 **Gonzalez, C., Gutierrez, C., & Ramirez, C.** (1978). Halobacterium vallismortis sp. nov., an amylolytic and carbohydrate metabolizing extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24, 710-715.
- 42 **Gunde-Cimerman, N., Oren A., & Plemenitas, A.** (2005). Adaptation to life at high salt concentration in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Netherlands. Edition Springer, 534p.
- 43 **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*, volume.2016.

H:

- 44 **Hachemi, K., Amrouni, Y., Daoudi, M., & Bamoussa, A. O.** (2020). Diachronic study of the great Sebkhha of Oran (western Algeria) based on SAR radar images (1992–2011). *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 1433-1446.
- 45 **Hezayen FF, Rehm BHA, Tindall et Steinbuchel A** (2001). Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialbataiwanensis* sp. Nov and description of *Natrialbaegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, nonpigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). *Int J Syst Evol Microbiol*. 51,1133–1142
- 46 **Horikoshi K., Bull A.T. Prologue.** (2011) : Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles. In: Horikoshi K., Antranikaian G., Bull A.T., Robb F.T., Stetter K.O., editors. *Extremophiles Handbook*. Springer; Tokyo, Japan:. pp. 4–15
- 47 **Hui, M. L. Y., Tan, L. T. H., Letchumanan, V., He, Y. W., Fang, C. M., Chan, K. G., ... & Lee, L. H.** (2021). The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine. *Antibiotics*, 10(6), 682.

I :

- 48 **Irwin, J.A., and Baird, A.W.** (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Ir. Vet. J.* 57, 348–354.

J :

- 49 **Jebbar, M., Franzetti, B., Girard, E., and Oger, P.** (2015). Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles* 19, 721–740.
- 50 **Johnson, K.J., Lanthier, P. H., Gochnauer, M.B.** (1986) Cell walls from *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Arch Microbiol*, 143: 365- 369.
- 51 **Johnsen, U., Selig, M., Xavier, K. B., Santos, H. & Schönheit, P.** (2001). Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*. *Arch Microbiol*;175, 52-61.
- 52 **Johnson, A. M., Thurlow, L. R., Zwenger, S. R., & Gillock, E. T.** (2007). Partial characterization of two moderately halophilic bacteria from a Kansas salt marsh.
- 53 **Joo WA et Kim CH.** (2005). Proteomic of halophilic Archaea. *Journal of Chromatography B*. 815 , 237- 250.

K :

- 54 **Kaluzhnaya, M., Khmelenina, V., Eshinimaev, B., Suzina, N., Nikitin, D., Solonin, A., Lin, J.L., McDonald, I., Murrell, C., and Trotsenko, Y.** (2001). Taxonomic characterization of new alkaliphilic and alkalitolerant methanotrophs from soda lakes of the Southeastern Transbaikal region and description of *Methylobacterium buryatense* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 166–176.
- 55 **Kamekura M et Dyall-Smith ML.** (1995). Taxonomy of the family Halobacteriaceae and the description of two new genera *Halorubrabacterium* and *Natrialba*. *Journal of General Applied Microbiology*. 41, 333-350
- 56 **Kamekura, M. A. S. A. H. I. R. O., Hamakawa, T., & Onishi, H.** (1982). Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Applied and environmental microbiology*, 44(4), 994-995.

- 57 **Kamekura, M.** (1998). **Kamekura, M.** (1999b). Diversity of members of the family Halobacteriaceae. In *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Ed. A. Oren. pp. CRC Press, Boca Raton, London New York Washington, DC 13-25.
- 58 **Kamekura, M., Mizuki, T., Usami, R., Yoshida, Y., Horikoshi, K. & Vreeland, R. H.** (2004). The Potential Use of Signature Bases from 16S rRNA Gene Sequences To Aid Assignment of Microbial Strains to Genera of Halobacteria. In *Halophilic Microorganisms*. Ed. A. Ventosa. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 77-87.
- 59 **Karan, R., Capes, M. D., DasSarma, P., & DasSarma, S.** (2013). Cloning, overexpression, purification, and characterization of a polyextremophilic β -galactosidase from the Antarctic haloarchaeon *Halorubrum lacusprofundi*. *BmcBiotechnology*, 13(1), 1-11.
- 60 **Kennedy, S. P., Ng, W. V., Salzberg, S. L., Hood, L., & DasSarma, S.** (2001). Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genomeresearch*, 11(10), 1641-1650.
- 61 **Khallef, S.** (2019), Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides d'Ouargla (Algérie). Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques, Université de Tizi Ouzou.
- 62 **Kharroub, K.** (2007). Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine. Algérie.
- 63 **kharroub, K., Quesada, T., Ferrer, R., Fuentes, S., Aguilera, M., Boulahrouf, A. RamosCormenzana, A. & Monteoliva-Sanchez, M.** (2006). *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1583-1588.
- 64 **Kis-Papo, T., Grishkan, I., Oren, A., Wasser, S.P. and Nevo, E.** (2003) Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microb. Ecol.* 45, 183–190
- 65 **Kohli, I., Joshi, N. C., Mohapatra, S., & Varma, A.** (2020). Extremophile—an adaptive strategy for extreme conditions and applications. *Current Genomics*, 21(2), 96-110.
- 66 **Kushner, D.J.** (1978) Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In *Microbial life in extreme environments*. Ed: Kushner DJ. Academic press, Ltd, London. , pp 317-368.
- I :
- 67 **Irwin, J.A., and Baird, A.W.** (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Ir. Vet. J.* 57, 348–354.
- L :
- 68 **Lanyi, J. K.** (1974). Propriétés dépendantes du sel des protéines de bactéries extrêmement halophiles. *Revue bactériologiques*, 38(3), 272-290.
- 69 **Larsen, H.** (1986) Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 39: 3 – 7
- 70 **Lefebvre, O., Vasudevan, N., Torrijos, M., Thanasekaran, K., & Moletta, R.** (2005). Halophilic biological treatment of tannery soaks liquor in a sequencing batch reactor. *Water research*, 39(8), 1471-1480.
- 71 **Li, X., & Yu, H. Y.** (2011). Production extracellulaire de bêta-amylase par un isolat halophile, *Halobacillus* sp. LY9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(11), 1837-1843 Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 2, 289-295.

- 72 .
- 73 **Litchfield, C. D., Irby, A. & Vreeland, R. H.** (1998). The Microbial Ecology of Solar Salt Plants In Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments. Ed. A. Oren. CRC Press, Boca Raton, London New York Washington, DC pp. 39-52.
- 74 **Löhr, A.J., Bogaard, T.A., Heikens, A., Hendriks, M.R., Sumarti, S., Van Bergen, M.J., Van Gestel, C.A.M., Van Straalen, N.M., Vroon, P.Z., and Widianarko, B.** (2005). Natural pollution caused by the extremely acidic crater lake KawahIjen, East Java, Indonesia. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 12, 89–95.
- 75 **Louche Khelil, N., Aissaoui, N., Nas, F., Cayol, J. L., and Ghellai, L.** (2013). A Novel Halotolerant Bacterium Isolated from El Goléa Lake in Algeria and Antimicrobial Potential of this Strain. *Journal of Agricultural Science and Technology*, A3, 825-834.
- 76 **Lui C., Baffore DK.,ZahanY.,Zhang M., Li Y., Zhang G.**(2019) . Halophile, an essential platform for bioproduction. *Journal of Microbiological Methods*,166,.

M :

- 77 **Marty, V.** (2011). Adaptation de l'Archaea halophile halobacteriumsalinarum aux stress environnementaux: mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire (Doctoral dissertation, Université de Grenoble).
- 78 **Margesin, R., and Schinner, F.** (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, 73–83
- 79 **Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., &Giovannelli, D.** (2019). Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in microbiology*, 10, 780.
- 80 **Meseguer I et Rodríguez-Valera F.**(1986). Effect of halocin H4 on cells of Halobacterium. halobium. *Journal of General Microbiology*.132,3061–3068.
- 81 **Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & al.** (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686.
- 82 **M. Pastor J., Bernal V., Salvador M., Argandoña M., Vargas C., Csonka L., Sevilla A., L. Iborra J., J. Nieto J., Cánovas M.** (2013). Role of Central Metabolism in the Osmoadaptation of the Halophilic Bacterium Chromohalobactersalexigens. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 288, 17769 –17781.
- 83 **Mullakhanbhai, M. F., & Larsen, H.** (1975). Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Archives of microbiology*, 104(1), 207-214.
- 84 **Müller-Santos, M., de Souza, E.M., Pedrosa, F. D. O., Mitchell, D. A., Longhi, S., Carrière, F., ... & Krieger, N.** (2009). Première preuve du repliement dépendant du sel et de l'activité d'une estérase des archées halophiles Haloarculamarismortui. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(8), 719-729.

N :

- 85 **Noll K.M.** (1992). Archaeobacteria (Archaea). *Encyclopedia of microbiology*.1,149-160

86 Ng WL, Ciufu SA, Smith TM, Bumgardner RE, Baskin D, Faust J, Hall B, Loretz C, Seto J, Slagel J, et al.(1998) Instantané d'un grand réplicon dynamique d'un archéon halophile : mégaplasmide ou minichromosome ? *Génome Res.* 8 : 1131–1141.

O :

87 Oger, P.M., and Jebbar, M. (2010). The many ways of coping with pressure. *Res. Microbiol.* 161, 799–809.

88 Oh, Y. K., Hwang, K. R., Kim, C., Kim, J. R., and Lee, J. S. (2018). Recent developments and key barriers to advanced biofuels: a short review. *Bioresour. Technol.* 257, 320–333.

89 Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L., & Mah, R. A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological reviews*, 58(1), 27-38.

90 Olsen GJ, Woese CR, Overbeck R (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* 176:1–6

91 Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63, 334-348.

92 Oren, A. (2001). The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* 466, 61-72.

93 Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.

94 Oren, A., Heldel, M., Norland, S. & Galinski, E. A. (2002a). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* 6, 491-498

95 Oren A. (2006). The order Halobacteriales. *The prokaryotes*. 3, 113-164

96 Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. *Aquat. Biosyst.*4(2), 1746-1448.

97 Oren, A., Andrei, A. Ş., & Banciu, H. L. (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS microbiology letters*, 330(1), 1-9.

98 Oren, A., & Ventosa, A. (2013). Sous-comité sur la taxonomie des Halobacteriaceae et Sous-comité sur la taxonomie des Halomonadaceae : procès-verbal de la réunion publique conjointe, 24 juin 2013, Storrs, Connecticut, États-Unis. *Revue internationale de microbiologie systématique et évolutive*, 63(Pt 9), 3540.

99 Ortega G, Laín A, Tadeo X, López-Méndez B, Castaño D, Millet O.(2011). Activation de l'enzyme halophile induite par les sels. *Sci Rep.* 1 :6.

P :

100 Padan, E., Bibi, E., Ito, M., and Krulwich, T.A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim. Biophys. Acta* 1717, 67–88.

101 Pathom-Aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., and Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extrem. Life Extreme Cond.* 10, 181–189.

102 Pikuta, E.V.; Hoover, R.B.; Tang, J.(2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.* 33, 183–209.

103 Perry JJ, Staley TJ et Lory S. (2004). Microbiologie « Cours et questions de révision» Ed. Dunod, pp .397- 403

104 P. Corral, Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2020). Halophiles and their biomolecules: Recent advances and future applications in biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33.

- 105 Prescott M, Hasley JP & Klein DA.**(2003). Biologie. 2ème Ed. Boeck Université, Paris,pp.493-1015
- 106 Paul S., Bag SK, DasSarma& al.** (2008) Signature moléculaire de l'adaptation hypersaline: informations sur la composition du génome et du protéome des procaryotes halophiles. *Génome Biol.*, 9, R70.
- 107 Pantaleone, D. P., Fotheringham, I. G., Grinter, N Senkpeil, R. F., & Taylor, P. P.** (1999). Engineering of a novel biochemical pathway for the biosynthesis of L-2-aminobutyric acid in *Escherichia coli* K12. *Bioorganic&medicinalchemistry*, 7(10), 2209-2213.
- 108 Price LB et Shand RF.** (2000) .Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* .182, 4951–4958.

R :

- 109 Ramos-Cormenzana, A.** (1989) Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms, In *Microbiology of Extreme Environments and Its Potential for Biotechnology*. Ed., M. S. Da Costa J C D and D. Williams R A, Elsevier Applied Science, London. pp.289–309
- 110 Rawal, N., Kelkar, S. M. & Altekar, W.** (1988). Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacteria. *Indian J BiochimBiophys* 25, 674-686.
- 111 Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., and Evilia, C.** (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea Vanc. BC*; 2013, 373275.
- 112 Roberts, M.F.** (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Syst.* 1, 5.
- 113 Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R.** (2009) Lipases at interface: A review, *Advances in Colloid and Interface*.
- 114 Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. & Imhoff, J. F.** (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-ponds saltern. *MicrobEcol* 11, 107-115.
- 115 Rosalia, N., B. Valderrama, & S.D. Sandoval.**(2005). Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 244: 235–241
- 116 Rothschild LJ, Mancinelli RL** (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409(6823):1092
- 117 Roussel, E. G., Bonavita, M. A. C., Querellou, J., Cragg, B. A., Webster, G., Prieur, D., & Parkes, R. J.** (2008). Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science*, 320(5879), 1046-1046.
- 118 Rozzell, D.J.** (1999) Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities. *Bioorganic and medicinalchemistry* 7: 2253-2261.

S :

- 119 Salameh, M., Wiegel, J.** (2007) Lipases from Extremophiles and Potential for Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 61: 253-277.
- 120 Santhanam, N., Vivanco, J. M., Decker, S. R., & Reardon, K. F.** (2011). Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends in biotechnology*, 29(10), 480-489.
- 121 Shand RF et Leyva KJ.**(2007). Peptide and Protein Antibiotics from the Domain Archaea: Halocins and Sulfobocins, In *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, Ed. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* .93 - 109.
- 122 Sharma, N., Farooqi, M. S., Chaturvedi, K. K., Lal, S. B., Grover, M., Rai, A., & Pandey, P.** (2014). The halophile protein database. *Database*, 2014.

123 Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). α -Amylases de sources microbiennes – un aperçu des développements récents. *Food Technol Biotechnol*, 44(2), 173-184.

124 Scharnagl, C., Reif, M., and Friedrich, J. (2005). Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochim. Biophys. Acta* 1749, 187–213.

T :

125 Tang, S.K., Wang, K., Cai, M., Zhi, X.Y., Lou, K., Xu, L.H., Jiang, C.L., Li, W.J. (2008) *Saccharopolyspora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a saline lake in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 555-558.

126 Tawara, E. & Kamo, N. (1991). Glucose transport of *Haloferax volcanii* requires the Na⁺ electrochemical potential gradient and inhibitors for the mammalian glucose transporter inhibit the transport. *Biochim Biophys Acta* 1070, 293-299.

127 Tomlinson, G. A. & Hochstein, L. I. (1972). Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. *Can J Microbiol* 18, 1973-1976.

128 Tomlinson, G. A., Koch, K. & Hochstein, L. I. (1974). The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. *Can J Microbiol* 20, 1085-1091.

V :

129 Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1982). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Microbiology*, 128(9), 1959-1968.

130 Ventosa Ucero, A., Amoozegar, M. A., Noghabi, K. A., Bakhtiary, T., & Safarpour, A. (2019). Les halophiles et leur vaste potentiel dans la production de biocarburants. *Frontiers in Microbiology*, 10 (art. 1895), 1-17.

131 Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J. & Adams M. W. W. (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J* 375, 231-246.

W :

132 Wanner, C., & Soppa, J. (1999). Genetic identification of three ABC transporters as essential elements for nitrate respiration in *Haloferax volcanii*. *Genetics* 152, 1417-1428.

133 Welsh, D., Lindsay, Y., Caumette, P., Herbert, R. & Hannan, J. (1996). Identification of trehalose and glycine betaine as compatible solutes in the moderately halophilic sulphate reducing bacterium, *Desulfovibrio halophilus*. *FEMS Microbiol Lett* 140, 203-207.

134 Woese CR, Kandler O et Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 4576- 4579

135 Woolard, C. R., and Irvine, R. L. (1995). Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Res.* 29, 1159–1168.

136 Wright, A. D. G. (2006). Phylogenetic relationships within the order Halobacteriales inferred from 16S rRNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(6), 1223-1227.

X :

- 137 Xu, Q. S., Yan, Y. S., & Feng, J. X.** (2016). Hydrolyse efficace de l'amidon brut et fermentation de l'éthanol: une nouvelle glucoamylase digérant l'amidon brut de *Penicillium oxalicum*. *Biotechnologie pour les* **Xue, Y., Fan, H., Ventosa, A., Grant, W. D., Jones, B. E., Cowan, D. A. & Ma, Y.** (2005). *Halalkalicocustibetensis* gen. nov, sp., nov., representing a novel genus of haloalkaliphilic archaea. In *J Syst Evol Microbiol* 55, 2501-2505.

Z :

- 138 Zadi Karam, H., Boublenza, F., Baghdad, B., Semar, F. Z.** (2012). Etude du stress osmotique acide et thermique chez les Lactobacilles. Mémoire de Magister en Biotechnologie. Option Génie Microbiologique. Université d'Oran.
- 139 Zobell, C.E., and Johnson, F.H.** (1949). The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J. Bacteriol.* 57, 179–189.
- 140** *biocarburants*, 9(1), 1-18.

Annexe

Tableau 1 : Microorganismes capables de produire des enzymes hydrolytiques isolés de différents environnements hypersalins (de Lourdes MM, et al., 2013).

Site d'isolement	Analyse de l'activité hydrolytique	Activité hydrolytique la plus abondante	Isoler l'affiliation	Les références
Salterns à Almeria, Cadix et Huelva (Espagne)	amylase protéase lipase DNase pullulanase	Amylase	<i>Salinivibrio</i> <i>Halomonas</i> <i>Chromohalobacter</i> <i>Bacillus-Salibacillus</i> <i>Salinicoccus</i> <i>Marinococcus</i>	(Sanchez P et al., 2003)
Saltern à Huelva (Espagne)	lipase protéase amylase nucléase	Amylase	<i>Halorubrum</i> <i>Haloarcula</i> <i>Halobacterium</i> <i>Salicola</i> <i>Salinibacter</i> <i>Pseudomonas</i>	(Moreno ML, et al., 2009)
Lac HowzSoltan (Iran)	lipase amylase protéase xylanase DNase inulinase pectinase cellulase pulullanase	Lipase	<i>Salicola</i> <i>Halovibrio</i> <i>Halomonas</i> <i>Oceanobacillus</i> <i>Thalassobacillus</i> <i>Halobacillus</i> <i>Virgibacillus</i> <i>Gracilibacillus</i> <i>Salinicoccus</i> <i>Piscibacillus</i>	(Rohban R et al., 2009)
Lac salé de Maharlu (Iran)	protéase lipase	ND	<i>Bacillus</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Halobacterium</i> <i>Aeromonas</i> <i>Staphylococcus</i>	(Ghasemi Y et al., 2011)

Sédiments profonds du sud de la fosse d'Okinawa (Chine)	amylase protéase lipase DNase	Amylase	<i>Alcanivorax</i> <i>Bacillus</i> <i>Cobetia</i> <i>Halomonas</i> <i>Methylarcula</i> <i>Micrococcus</i> <i>Myroides</i> <i>Paracoccus</i> <i>Planococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Psychrobacter</i> <i>Sporosarcina</i> <i>Sufflavibacter</i> <i>Wangia</i>	(Zhu H, et al. ,2009)
Mine de sel de Slanic Prahova (Roumanie)	amylase gélatinase lipase protéase cellulase xylanase	Lipase protéase	ND	(Cojoc R et al., 2009)
Désert d'Atacama (Chili)	amylase protéase lipase DNase xylanase pullulanas	DNase	<i>Bacillus</i> <i>Halobacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Halomonas</i> <i>Staphylococcus</i>	(Moreno, ML et al., 2012)
Désertsalin « Indian Wild Ass Sanctuary » (Inde)	amylase	ND	<i>Bacillus</i>	(Khunt M, et al., 2011)

Tableau 2 : Différents types d'amylase (alpha-amylase, beta-amylase et Glucoamylase) des microorganismes Halophiles (Ventosa, A *et al.*, 2019).

Type d'amylase	Nom De microorganisme	type	Souche	Taille d'enzyme (KDa)	Stabilité et activité enzymatique			Clonage De l'enzyme	
					Ecart de Température optimal en C°	Gamme de pH optimal	Gamme optimal de NaCl M		
alpha-amylase	<i>H.mediterranei</i>	HA	S-1	58	60	7-8	3	NR	
	<i>Haloarculasp</i>	HA		70	50	7	4.3	NR	
	<i>Haloarculahispanique</i>	HA		43.3	50	6.5	4-5	NR	
	<i>Halorbrumxinjiagense</i>	HA		60	70	8.5	4	NR	
	<i>Natronococcus sp</i>								
	<i>Chromohalobacter sp</i>	HA	Ah-36	74	55	8.5	2.5	+	
	<i>Salimicrobiumhalophilum</i>	HB	TVSP 101	72 - 62	65	9	0-3.4	NR	
	<i>Thalassobacillus sp</i>	HB	LY20	81	70	10		NR	
	<i>Halothermothrixoreonii</i>						1.7	NR	
	<i>VariantesdekocuriaHalomonasmeridiana</i>	HB	LY18	31	70	9	1.7		
	<i>Marinobactersp</i>	MHB		52 -72.3	65	7.5		+	
	<i>Actinobactersp</i>	MHB		77	NR	NR	0.9		
	<i>Micrococcus halobius</i>	MHB		NR	37	7	1-2	+	
	<i>Halomonassp</i>	MHB	EMB8	72	45	7	1.7	+	
	<i>Bacillus dipsosauri</i>	MHB		55 et 65	50-55	7	0.1	NR	
	<i>Halobacillussp</i>	MHB		89	50-55	6-7	0.2-0.6	NR	
	<i>Bacillus sp</i>	MHB	AAD21	NR	50	6.5	0.25	NR	
	<i>Bacillus sp</i>	MHB	DD1	30	> 60	6.5	0.4	NR	
	<i>Nesterenkonia sp</i>	MHB	MA-2	NR	50	7,8	NR	NR	
	<i>Zunongwangia profunda</i>	MHB	TSCVKK	NR	55	7,5	0.9	NR	
	<i>Saccharopolyspora sp</i>	MHB	AB68	NR	50	10,5	1.7	NR	
	<i>Streptomyces sp</i>	MHB	F	100 -106	45	7,5	0.9	NR	
	<i>Aspergillus penicillioides</i>	MO		66	35	7	0.5	NR	
	<i>Engyodontium album</i>	MA	A9	66	55	11	1.5	+	
		MA	D1	66	45	9	1.8	NR	
		HF	TISTR 3639	42	>90 ou 80	9	1.2	NR	
		HF	TISTR 3645	50	60	9	5.1	NR	
	Beta-amylase	<i>Halobacillus sp</i>	MHB	LY9	NR	60	8	1.7-2.1	NR
		<i>Salimicrobiumhalophilum</i>	MHB	LY20	81	70	10	1.7	NR
	Glucoamylase	<i>Halolactibacillussp</i>	HB	SK71	78.5	70	8	1.3	NR
<i>Halorubrum spAlkalilimnicola sp</i>		HA	Ha25	140	50	7-7.5	0-4.5	NR	
		HB	NM-DCM-1	80	55	9.5	2	+	

HA : archéon halophiles ; HB : bactérie halophile ; MHB : bactérie halophile modéré ; MB : bactérie marine ; MA : actinomycètes marin ; HF : champignons halophile ; NR : non signalé.

ND : no déterminé.

الملخص:

تعتبر الأوساط الفائقة الملوحة موطن للكائنات الحية المجهرية المحبة للملوحة وهي الهالوفيلات حيث انها قادرة على التعايش في مثل هذه البيئة رغم قساوة الظروف (درجة الحموضة ودرجة الحرارة والضغط والملوحة) ، و ترجع هذه الخاصية لإنتاجها انزيمات هالوفيلية (هالوانزيمات) ،لذا في بحثنا سنركز على الخصائص الفيزيوكيميائية و التفاعلية في مثل هذه الأوساط وكيف لها ان تغدو محور اهتمام في التكنولوجيا.

وفقا لدراسات فيزيوكيميائية و بنوية ثلاثية الأبعاد أقيمت على الهالوانزيمات تم اظهار ان استقرارها و نشاطها في الأوساط المعيشية القسوى يعود الى تواجد الاحماض الامينية الحمضية بكثافة وكذلك فقر الموقع الفعال من الاحماض الامينية الكارهة للماء وهذا ما يجعل الانزيمات تحافظ على رطوبتها رغم ارتفاع تركيز الاملاح في الوسط .

ان النشاط التحفيزي للهالوانزيمات المختلفة: الأميلاز ، البروتياز ، الليباز ، اللاكاز، ... الخ. يسهل المهام في الصناعة الحيوية ، ومكافحة التلوث وعلى المستوى الطبي الحيوي من خلال إنتاج الجزيئات الحيوية مثل المواد الخافضة للتوتر السطحي والمبلمرات الحيوية والوقود الحيوي والهالوسينات ،وقد أدى هذا الى وضع الهالوانزيمات في مجال التكنولوجيا الحيوية باهتمام واسع .

الكلمات المفتاحية : الهالوفيلات ، الهالوانزيمات ، الوقود الحيوي ، والمبلمرات الحيوية ، مخفضات التوتر السطحي ،هالوسينات.

Résumé :

Les habitats hypersalins abritent des microorganismes halophiles capables de survivre, se développer dans des conditions de (pH, température, pression et salinité) extrêmes, cette capacité est dû à des enzymes « haloenzymes » synthétisés par les halophiles, l'objectif de notre travail se concentre sur l'étude des propriétés physico-chimique et catalytique qui met ces enzymes des stars dans l'intérêt en biotechnologie.

D'après les études physico-chimiques et structurales tridimensionnel sur les haloenzymes a montré que leur stabilité et activité dans les milieux aqueux salins et organique se fait grâce aux surplus d'acides aminé acide sur leur surface de plus de la réduction de résidus hydrophobe au site actif qui maintient l'hydratation même lorsque la concentration en sel dans le milieu est élevé.

L'activité catalytique de différents haloenzymes : amylase, protéase, lipase, laccase,...etc. sous des conditions extrêmes, leur a permet d'être un potentiel biotechnologique où ces enzymes sont utilisés dans la dépollution des mers en produisant des biosurfactants, ou bien dans le domaine médicale dont elles permettent de produire des molécules antibactériennes, le

cas des halocines, ainsi que leur utilisation pour la production de biocarburant notamment le bioéthanol.

Mots clés : halophiles, haloenzymes, biocarburants, biopolymères, biosurfactants, halocines.

Abstract :

The halophilic microorganisms can survive under hard and extreme conditions (pH, temperature, pressure and salinity), this ability is due to synthesizing halophilic enzymes « haloenzymes ». Our objective in this work focuses on the physico-chemical and catalytic properties of the haloenzymes which makes them a biotechnological interest.

The physico-chemical and the three-dimensional studies on halophilic enzymes have shown that their stability and activity in aqueous saline, in the organic media is due to the excess of acidic amino acids on their surface, it is also caused by a reduced number of hydrophobic residues at the active site.

The catalytic activity of different haloenzymes as : amylase, protease, lipase, laccase, ... etc. under extreme conditions, has given them a vast potential in the biotechnology, where these enzymes are used in the depollution of the seas by producing biosurfactants, or in the medical field where they allow the production of antibacterial molecules, the case of halocines, these last ones make the production of biofuels and the biopolymers easier.

Key words: halophiles, haloenzymes, biofuels, biopolymers, biosurfact, halocine.