



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la  
Recherche



Université Ziane Achour – Djelfa

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Projet Fin d'étude

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

Spécialité: Sciences Biologiques

Option: Microbiologie Appliquée

THEME

**Criblage d'activités enzymatiques chez des  
isolats halophiles**

Présentée par: Abbas Chaima et Djennad Khadidja

Membres de Jury:

Président : M/ LAHRECH Mokhtar Boualem    PROF    Université Djelfa

Examinatrice: M/ OUNISSI Mourad    MCB    Université Djelfa

Promoteur: Pr / Boutaiba Saad    PROF    Université Djelfa

Année Universitaire

2022/2023

# *Remerciements*

*Avant tout nous remercions « ALLAH » tout puissant qui m'a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*On tient à remercier profondément notre **promoteur Pr Boutaiba saad** pour nous avoir encadrées, pour son aide, ses conseils, sa patience et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*On tient à remercier chaleureusement **les membres du jury :***

***M/LAHRECH Mokhtar Boualem** et **M/OUNISSI Mourad** pour accepter l'examination de notre travail.*

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

*Enfin, nous remercions tous nos enseignants qui ont assuré notre formation, sans oublier tous les hommes et femmes du « Département de biologie ».*

***Merci à tous***

# *Dédicaces*

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

*Mes très chers parents*

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

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

*A mes amis je suis fier de t'aimer et d'aimer et de vous aimer et de  
vous soutenir à moi.*

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

*A tous les professeurs et les enseignants*

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

*A toute ma famille et toutes mes amies*

*A tous mes collègues de promotion*

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

*Cordialement : Djennad Khadidja*

# *Dédicaces*

*Tout d'abord, merci à "Allah" de m'avoir aidé et de m'avoir donné patience et courage pendant cette période de l'année scolaire. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti*

***Je dédie ce mémoire à...***

***Aux meilleurs pères,***

*Tu me conduis toujours sur le bon chemin, Merci pour vos nobles valeurs,*

*Votre éducation et votre soutien constant*

***A ma très chère maman***

*Pour moi, tu représentes le symbole d'une grande gentillesse, source de tendresse et exemple de dévouement, vous m'avez constamment encouragé et prié pour moi. Que tu trouves en moi la source de leur fierté, qu'Allah le Tout Puissant te protège, toi accorde la santé et le bonheur.*

***Mes frères et sœurs***

*Un profond respect et un merci spécial et sincère pour leur aide, leur générosité, leur soutien, leurs encouragements et tous leurs efforts.*

***Cordialement : Abbas Chaima***

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction ..... 1**

## **Chapitre 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

**1. Généralités..... 2**

**2. Diversité phylogénétique des halophiles..... 3**

**3. Environnements hypersalés ..... 5**

**4. Types d'environnements hypersalins ..... 6**

4.1. Environnements thalassohalins ..... 6

4.2. Environnements athalassohalins ..... 7

**5. Organismes des milieux hypersalés ..... 8**

**6. Osmorégulation..... 10**

6.1. Adaptation par accumulation de KCl..... 11

6.2. Adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs ..... 12

**7. Physico-chimie des milieux hypersalés ..... 15**

7.1. Température ..... 15

7.2. Oxygène ..... 15

7.3. pH..... 15

**8. Halo-enzymes ..... 16**

**9. Potentiel biotechnologique des enzymes halophiles..... 21**

9.1. Protéases ..... 22

9.2. Amylases..... 23

## **Chapitre 2 Matériels et méthodes**

**1. Matériel biologique: ..... 24**

**2. Appareillages..... 25**

<b>3. Analyse microbiologique.....</b>	<b>27</b>
3.1. Milieux de culture utilisés: .....	27
3.2. Préparation du milieu de culture : .....	28
<b>4. Repurification : .....</b>	<b>29</b>
4.1. Ensemencement sur milieu gélosés MSH complet : .....	29
4.2. Conservation des isolats: .....	29
<b>5. Tests de criblage de l'activité protéolytique et amylolytique : .....</b>	<b>29</b>
5.1. Criblage de l'activité protéolytique et amylolytique sur milieu semi solide : .....	29
5.2. Criblage de l'activité protéolytique et amylolytique sur milieu liquide : .....	30
<b>6. Mise en évidence de l'activité protéolytique: .....</b>	<b>30</b>
<b>7. Mise en évidence de l'activité amylolytique: .....</b>	<b>31</b>
<b>8. Cinétique de croissance : .....</b>	<b>31</b>

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

<b>1. Revivification des souches.....</b>	<b>32</b>
<b>2. Conservation des souches.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Criblage des isolats pour l'activité .....</b>	<b>34</b>
3.1. Criblage de l'activité protéolytique sur milieu solide.....	34
3.2. Criblage de l'activité protéolytique sur milieu liquide : .....	35
3.3. Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique.....	37
3.4. Cinétique de croissance et de production de l'activité amylolytique: .....	37
3.5. Cinétique de croissance: .....	41
<b>Conclusion .....</b>	<b>43</b>

### **Références bibliographies**

### **Annexes**

### **Résumé**

## Liste des abréviations

<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>DO</b>	<b>Densité Optique</b>
<b>HCl</b>	<b>Chlorure d'hydrogène</b>
<b>IR</b>	<b>Infrarouge</b>
<b>KCl</b>	<b>Chlorure de Potassium</b>
<b>Kda</b>	<b>Kilo Dalton</b>
<b>MH</b>	<b>Mueller Hinton</b>
<b>MSH</b>	<b>Milieu Spécifique Halophiles</b>
<b>Nm</b>	<b>Nanomètre</b>
<b>Rpm</b>	<b>Rotation Par Minute</b>
<b>RS</b>	<b>Rocher de sel</b>
<b>UV</b>	<b>Ultraviolet</b>
<b><math>\lambda</math></b>	<b>longueur d'onde</b>
<b>SN</b>	<b>Surnageant</b>
<b>SVT</b>	<b>Solvant témoin</b>
<b>SNT</b>	<b>Surnageant témoin</b>
<b>SVL</b>	<b>Solvant</b>

## Liste des symboles

<b>C°</b>	<b>Degré Celsius</b>
<b>H</b>	<b>Heure</b>
<b>Min</b>	<b>Minute</b>
<b>L</b>	<b>Litre</b>
<b>ML</b>	<b>Milliliter</b>
<b>µl</b>	<b>Microliter</b>
<b>T°</b>	<b>Temperature</b>
<b>pH</b>	<b>potentiel d'hydrogène</b>
<b>Tr/min</b>	<b>tours/minute</b>
<b>v/v</b>	<b>volume/volume</b>
<b>p/v</b>	<b>poids/volume</b>
<b>G</b>	<b>Gramme</b>
<b>g/l</b>	<b>Gramme/litre</b>
<b>%</b>	<b>Pourcentage</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Représentations schématiques de l'arbre phylogénétique universel selon les deux théories de l'existence de trois ou deux domaines du vivant. Les arbres sont construits à partir de (Woese et al., 1990) .....	4
<b>Figure 2:</b> Exemples d'environnements hypersalins thalassohalins (Menasria et al., 2020). .....	6
<b>Figure 3:</b> Environnements hypersalins athalassohalins (Besse, 2016; Khallef, 2019).....	7
<b>Figure 4:</b> Gammes de concentrations et terminologie des eaux (D'après Kharaka et Hanor, 2005).....	9
<b>Figure 5:</b> Stabilisation de la structure des enzymes halotolérantes à osmolarité élevée. L'exclusion préférentielle de solutés compatibles (cercles bleus) de la surface des protéines aide à maintenir la structure enzymatique à une osmolarité élevée, tout en aidant à augmenter le volume cellulaire (Sleator et Hill, 2001). .....	11
<b>Figure 6:</b> Structure tetramérique de la HMDH : les acides aminés acides sont représentés en rouge et les basiques en bleu. Les nombres 1 à 4 désigne les différentes sous-unité de la protéine.(Marty et al., 2016). .....	19
<b>Figure 7:</b> Comparaison de la surface électrostatique résultant de la composition en acide amines acido-basique de la surface d'une malate déshydrogénase acidophile et halophile. (Marty et al., 2016).....	19
<b>Figure 8:</b> Dessin en ruban de MalDH tétramérique. (Talon et al., 2014).....	20
<b>Figure 9:</b> (A) Dessin en ruban des monomères A et D de Ça MalDH. Les polygones d'eau sont représentés en lignes bleues. (B) Dessin en ruban de monomère A (vert) et monomère D (jaune) de Sr MalDH. La surface l'acide aminé acide est indiquée en rouge (Talon et al., 2014).....	20
<b>Figure 10:</b> : Situation géographique de la zone d'étude (Rocher de Sel). (BEN KHECHIBA et al. 2022). .....	24
<b>Figure 11:</b> exemples des produites de MSH.....	27
<b>Figure 12:</b> milieu de culture MSH pendant la préparation .....	28
<b>Figure 13:</b> Exemples d'aspects macroscopiques d'isolats cultivés sur milieu MSH par méthode des quadrants.....	32
<b>Figure 14:</b> Aspect des colonies sur boîtes de Pétri des souches (S1A1 ; S1PA4) .....	33
<b>Figure 15:</b> conservation des souches dans des tubes inclinés par MSH solide .....	34
<b>Figure 16:</b> Production d'activité protéase sur milieu minimum MSH solide .....	34
<b>Figure 17:</b> Test de l'activité des souches, S1A1, S1PA4, par la méthode de diffusion sur gélose .....	35

<b>Figure 18:</b> Cinétique de croissance des 2 isolats sélectionnés d'activité protéolytique.....	36
<b>Figure 19:</b> la croissance de souche S1PA4 dans milieu de culture MSH après l'incubation..	37
<b>Figure 20:</b> Cinétique de croissance des 2 isolats sélectionnés d'activité amylolytique .....	39
<b>Figure 21:</b> Production de l'activité amylase sur MSH liquide.....	40
<b>Figure 22:</b> Production de l'activité amylase sur culture solide.....	40
<b>Figure 23 :</b> Cinétique de croissance pour les souches S1A1 ; S1PA4 étudiées. ....	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Tableau comparatif entre les trois Domaines du vivant.(Besse et al., 2017) .....	2
<b>Tableau 2:</b> Classification des micro-organismes selon leur réponse aux sels (Oren, 2013). ....	3
<b>Tableau 3:</b> Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins (Grant, 2004).....	8
<b>Tableau 4:</b> Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiquia et al. 2007).....	10
<b>Tableau 5:</b> : Solutés compatibles accumulées par les microorganismes halophiles .....	14
<b>Tableau 6:</b> Quelques propriétés physico-chimiques des principaux écosystèmes hypersalés du Sahara algérien et du monde (Oren, 1993 ; Hacene et al., 2004 ;Boutaiba et al., 2011).....	16
<b>Tableau 7:</b> Composition du milieu MSH. ....	27
<b>Tableau 8:</b> Activité protéase sur milieu minimum MSH solide et liquide .....	36
<b>Tableau 9:</b> Activité amylase sur milieu minimum MSH solide et liquide .....	39

# **Introduction**

## Introduction

Les microorganismes vivant dans les environnements extrêmes sont appelés extrémophiles (**Jorquera et al., 2019**). Les microorganismes extrémophiles vivent dans des environnements qui réunissent des conditions physico-chimiques hostiles à la vie. Ces conditions comprennent la température, le pH, la pression, la radiation, la dessiccation et la salinité (**Rothschild and Mancinelli, 2001**). Le nombre des études visant une compréhension approfondie de ces écosystèmes comme le Grand lac salé, Utah (USA), la Mer Morte, les marais salants de plusieurs pays et les lacs alcalins à savoir le lac Magadi au Kenya s'est considérablement développé (**D'Alessandro et al., 2007**). Ces applications nécessitent souvent des conditions de réaction agressive (**Boutaiba et al., 2006**).

La recherche sur les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles a été abordée par (Norberg et von Hofsten, 1969) Ces propriétés ont fait des enzymes halophiles d'excellents candidats pour différentes applications biotechnologiques dans de nombreux processus industriels (**Setati, 2010**).

Les microorganismes halophiles vivant dans ces environnements sont une source de biomolécules qui peuvent avoir de nombreuses applications intéressantes notamment dans la décontamination des eaux usées (**Lefebvre et Moletta, 2006**). L'utilisation de méthodes moléculaires indépendantes de la culture devient un outil essentiel et fiable pour évaluer la diversité de la vie microbienne dans les environnements extrêmes, à savoir ceux soumis à des conditions inhabitables par la plupart des organismes vivants (**Boutaiba et al., 2011**).

Le présent travail s'inscrit dans cette optique de recherche et s'organise en trois parties:

- La première partie, est une synthèse bibliographique consacrée à l'étude des environnements hypersalés, les microorganismes halophiles, les enzymes produites par les archées halophiles et enfin le potentiel biotechnologique de ces enzymes.
- Les techniques utilisées lors de la partie expérimentale sont décrites dans la deuxième partie.
- Les résultats obtenus et la discussion sont présentés dans de la troisième partie.
- Le travail est clôturé par une conclusion générale.

**Chapitre 1**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



## 1. Généralités

Les archaeas halophiles forment la famille des Halobacteriaceae, la seule famille de l'ordre des Halobacteriales. Haloarchaea a été l'un des premiers domaines de recherche en raison de leur rôle dans la dégradation de la nourriture salée. (Mari, 2011). Les protéines des archaea halophiles (qui aiment littéralement le sel) sont très adaptées et magnifiquement conçues pour fonctionner dans un milieu contenant entre 2 et 5 M de sel inorganique. En raison de cet environnement salin extrême et hostile, les protéines halophiles et leurs gènes d'encodage représentent un dépôt précieux et des ressources pour reconstruire et visualiser les processus de sélection naturelle et évolution adaptative. (Dennis et Shimmin, 1997).

Les Archaea sont différents des deux autres domaines de la vie: Eucarya et les bactéries par des caractéristiques qui leur sont propres. (Tableau 1)

**Tableau 1:** Tableau comparatif entre les trois Domaines du vivant. (Besse et al., 2017)

Caractéristique		Domaine du vivant		
		Archées	Bactéries	Eucaryotes
<b>Morphologie</b>	Noyau	Non	Non	Oui
	Organites	Non	Non	Oui
	Appendices uniques	Cannula hamus bindosome		
<b>Paroi cellulaire</b>		Couche S	Peptidoglycane	Pas chez les animaux et les protozoaires
<b>Membrane</b>	Liaison glycérol-lipide	Ether	Ester	Ester
	Squelette phosphate des lipides	Glycérol-3-phosphate	Glycérol-1-phosphate	Glycérol-3-phosphate
<b>Métabolisme</b>	Méthanogénèse	Oui	Non	Non
	Machinerie centrale de la transcription	type eucaryote	bactérie	eucaryote
	Facteurs d'élongation de la traduction	type eucaryote	bactérie	eucaryote

Les enzymes de bactéries halophiles sont considérées comme une nouvelle alternative pour l'utilisation comme biocatalyseurs dans différentes industries. Il existe actuellement peu d'études sur les enzymes halophiles. En raison de leurs propriétés uniques, les micro-organismes halophiles ont été explorés pour leur potentiel biotechnologique dans diverses applications telles que; la transformation des aliments, dans l'environnement (bioremédiation), en pharmaceutiques et l'industrie du cuir. Ces enzymes sont stables à des

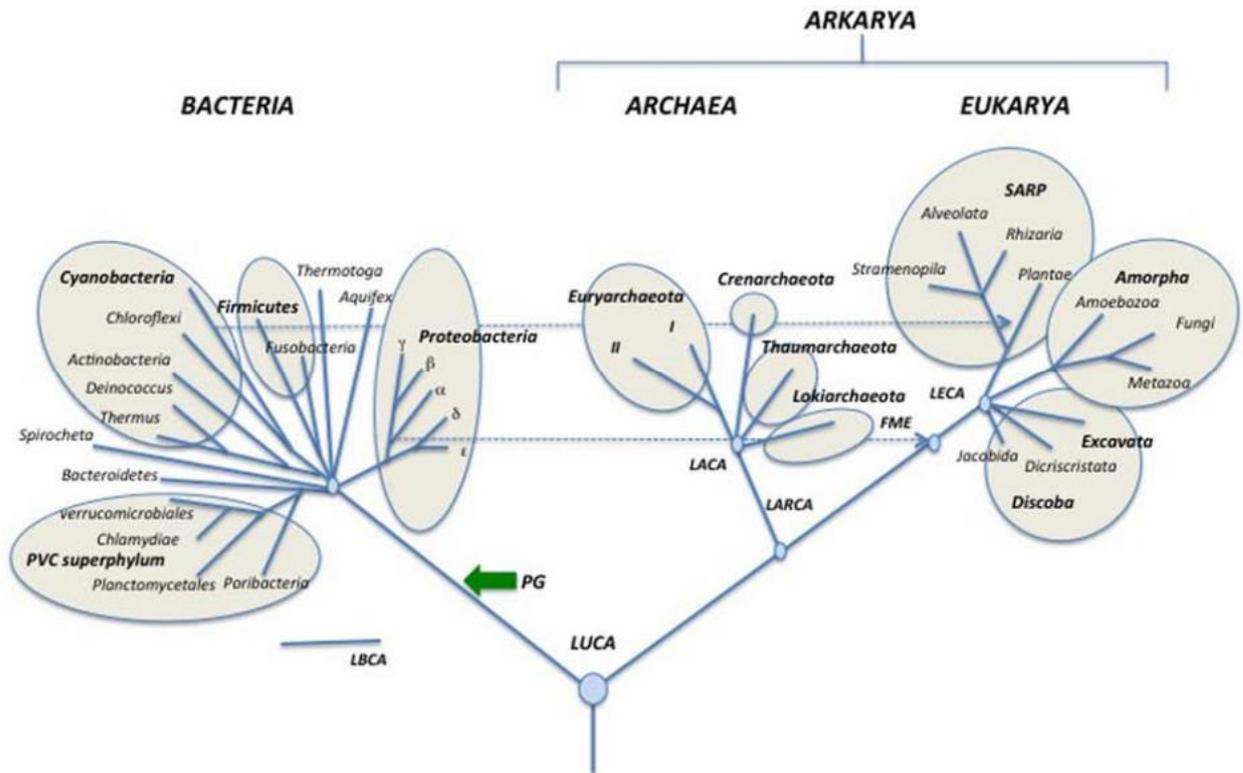
concentrations élevées de sel, mais peuvent également résister et catalyser des réactions dans des conditions extrêmes de pH, de température, de pression en oxygène, et en présence des métaux toxiques (Dumorné, 2018).

**Tableau 2:** Classification des micro-organismes selon leur réponse aux sels (Oren, 2013).

Categories	Propriétés	Exemple
<b>non-halophile</b>	Se développe mieux dans un milieu contenant moins de 0.2 M de sel	La plus part des bactéries d'eau douce
<b>Légèrement halophile</b>	Se développe mieux dans milieu contenant 0.2-0.5 M de sel	La plus part des bactéries marines
<b>Halophile modéré</b>	Se développe mieux dans un milieu contenant 0.5-2.5 M de sel	<i>Salinivibrio costicola</i> <i>Halmonas elongate</i>
<b>Halophile extrême limite</b>	Se développe mieux dans un milieu contenant 1.5-4 M de sel	<i>Halorhodospira halophile</i>
<b>Halophile extrême</b>	Se développe mieux dans un milieu contenant 2.5-5.2 M de sel	<i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Salinibacter ruber</i>
<b>Halotolérant</b>	Non halophile qui peut tolérer le sel. Si la gamme de croissance s'étend de 2.5 M en sel, il peuvent être considérés comme halotolérant extrême	<i>Staphylococcus aureus</i>

## 2. Diversité phylogénétique des halophiles

La diversité phylogénétique des halophiles et des halotolérants est élevée. Ils sont présents dans les trois zones de vie: Archaea, Bactéries et Eukarya. (Oren, 2010) (Figure1). Les biotopes salés sont l'hôte d'un grand nombre de phylotypes de la flore procaryote et des bactéries (Boutaiba et al., 2011).



**Figure 1:** Représentations schématiques de l'arbre phylogénétique universel selon les deux théories de l'existence de trois ou deux domaines du vivant. Les arbres sont construits à partir de (Woese et al., 1990)

Sont une version simplifiée présentant seulement les groupes les plus importants. En haut : l'arbre représentant les trois domaines du vivant. En bas : l'arbre basé sur l'hypothèse Eocyte selon laquelle deux domaines du vivant existent. LBCA : dernier ancêtre commun des Bactérie. LACA : dernier ancêtre commun des Archaea. LARCA : dernier ancêtre commun des Arkarya. LECA : dernier ancêtre commun des Eukarya. FME : première mitochondrie eucaryote. SARP : Stramenophila, Alveolata, Rhizobia, Plantae (Forterre, 2015)

Les halophiles sont des organismes vivant en milieu hypersalin. Ils comprennent principalement les procaryotes et les eucaryotes et les micro-organismes qui ont la capacité d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement et sont résistants à l'effet de dénaturation du sel (DasSarma et al., 2010).

Dans le domaine des eucaryotes, les halophiles sont relativement rares. Le principal micro-organisme eucaryote halophile est l'algue verte *Dunaliella*, qui est également un important producteur primaire dans la mer Morte et dans d'autres lacs hypersalins. Cette algue comprend une variété d'espèces dont certaines produisent du bêta-carotène, une propriété qui

peut être exploitée en biotechnologie. Certaines algues peuvent se développer à des concentrations relativement faibles (1 M) Parmi les microbes, on peut citer le crustacé *Artemia*, qui joue un rôle important dans les milieux hypersalins. (Oren, 2002a) , Le règne des bactéries contient la plus grande variété de micro-organismes halophiles et halotolérants, dont la plupart sont modérés plutôt qu'extrêmes. (Oren, 2002a), Ils sont communs et présents dans de nombreux groupes phylogénétiques, ils appartiennent au phylum Spirochètes, Protéobactéries, Cyanobactéries, Actinobactérie, et Bactéroïdes. Chez les Firmicutes, il existe des halophiles dans les branches aérobiques (*Bacillus*) et anaérobiques (**Oren, 2008**).

Les haloarchaea sont les principaux représentants des halophiles extrêmes, qui peuvent prospérer dans les milieux dont les concentrations de sel varient de 20 à 30 %. Ces microorganismes unique sont caractérisés par l'accumulation de grandes quantités de KCl dans le cytoplasme, pour maintenir l'équilibre osmotique avec le milieu, contrairement aux halophiles modérés ou facultatifs, qui stockent habituellement des solutés compatibles dans le même but. Par conséquent, les protéines intra- et extracellulaires des haloarchaea sont spécialement adaptés pour fonctionner correctement à haute salinité. Ces protéines possèdent des caractéristiques exceptionnelles qui les rendent différentes de leurs homologues non halophiles; ils ont une composition unique d'acides aminés acide en surfaces et faible hydrophobie globale, pour empêcher l'agrégation et, en même temps, conserver une certaine souplesse dans une salinité aussi élevée. La plupart des enzymes d'haloarchaea sont considérées poly-extremotolérantes, car ils fonctionnent de manière appropriée dans plus d'une condition extrême, températures habituellement élevées, en plus d'une salinité élevée. Pour cette raison, les enzymes de ces microorganismes halophiles peuvent avoir des intérêts dans de nombreux procédés biotechnologiques (**Gómez-villegas et al., 2021**).

### 3. Environnements hypersalés

La présence d'une forte concentration d'ions est généralement dévastatrice pour les protéines et autres macromolécules : (i) elles provoquent une agrégation ou un effondrement de la structure des protéines en raison de l'amélioration de l'hydrophobie, ii); ils interfèrent avec l'interaction électrostatique essentielle au sein ou entre les macromolécules en raison de la charge, (iii) il réduit la disponibilité d'eau libre. inférieur à celle requise pour soutenir les processus biologiques essentiels en raison de l'hydratation par les ions salins (**Dennis et Shimmin, 1997**).

## 4. Types d'environnements hypersalins

Les lacs hypersalés, sont distribués dans le monde entier et ils relèvent de deux catégories selon leur origines : thalassohaline et athalassohaline.

### 4.1. Environnements thalassohalins

En milieu thalassohalin (thalasso grec, mer) l'eau de mer est concentrée par évaporation. Tous les sels présents augmentent leurs concentrations dans les mêmes proportions jusqu'à la limite des précipitations. Les carbonates précipitent sous forme de carbonates de  $\text{Ca}^{2+}$  dès que la salinité atteint 6 %. Le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de  $\text{Ca}^{2+}$ ) dès que la salinité dépasse 10%. Au-delà de 25 %, le Na Cl commence à précipiter sous forme d'halite et précipite pleinement à 34 %. Les eaux sont par la suite enrichies en ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{K}^+$  dont les sels précipitent à des salinités 20 fois supérieures à celle de l'eau de mer (**Blatt et al, 1980 ; Rodriguez-Valera et al, 1985**).

Les habitats thalassohalins (Figure 1) comprennent principalement les marais salants , constituées par une série d'étangs peu profonds dans lesquels l'eau de mer est évaporée jusqu'à ce que les sels soient précipités, le Grand Lac Salé de l'Utah, la Mer Morte en Palestine, la mer Rouge et les lacs du désert d'Atacama au Chili (**Le Borgne et al., 2008; Ventosa et al., 2015**).



Chott Melghir (Biskra)

Chott El Bieda Hammam Essoukhna (Sétif)

**Figure 2:** Exemples d'environnements hypersalins thalassohalins (**Menasria et al., 2020**).

## 4.2. Environnements athalassohalins

Les eaux athalassohalines proviennent de la dissolution d'évaporites par l'eau, cas de la Mer Morte, du Lac Rose au Sénégal et de la plupart des sebkhas situées en zones semi-arides et arides. Ces milieux possèdent une composition ionique saline différente de celle des eaux de mer (**Litchfield et Gillevet, 2002; Oren, 2002c; Roussel et al., 2008**).

La composition ionique des lacs alcalins hypersalés varie également. L'anion (carbonate et chlore) et le cation ( $\text{Na}^+$ ) prédominent. Les lacs hypersalins ont un pH généralement neutre ou légèrement alcalin, tandis que celui de la mer Morte est légèrement acide (**Litchfield, 1998**). Les milieux athalassohalins sont ceux dans lesquels la composition ionique diffère grandement de celle de l'eau de mer et dans lesquels les sels sont d'une proportion non maritime. La concentration de l'eau de mer mène aux précipitations de  $\text{NaCl}$ , laissant une résistance élevée de toutes les formes biologiques (**Das Sarma et Arora, 2001**), un lac dans lequel la concentration de cations bivalents (actuellement environ  $1,9\text{M Mg}^{2+}$  et  $0,4\text{M Ca}^{2+}$ ) dépasse celle des cations monovalents ( $1,6\text{M Na}^+$  et  $0,14\text{M K}^+$ ), et dont le pH est relativement bas (environ 6,0) (**Oren, 2002a**).

Le tableau 03 reprend la composition ionique de différents environnements thalassohalins et athalassohalins.



**La Mer morte**

**Lac Magadi**

**Figure 3:** Environnements hypersalins athalassohalins (**Besse, 2016; Khallef, 2019**).

**Tableau 3: Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins (Grant, 2004).**

Ion (g/L)	L'eau de mer	La mer morte	Grand lac salé
Na+	10.8	39.2	105.4
K+	0.4	7.3	6.7
Mg+	1.3	40.7	11.1
Ca <sup>2+</sup>	0.4	16.9	0.3
Cl-	19.6	212.4	181.4
Br-	0.1	5.1	0.2
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.7	0.5	27
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	0.1	0.2	0.7
Salinité totale (g / L)	35.2	322.6	333.6
Ph	8.2	5.9-6.3	7.7

## 5. Organismes des milieux hypersalés

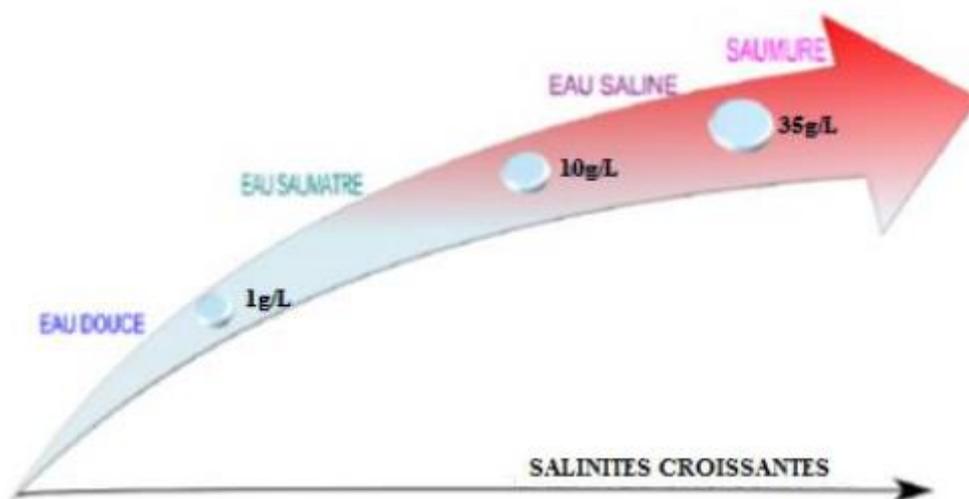
Un organisme halophile grec (halos, sel et phile, aimer) est un organisme qui exige la présence du sel pour survivre. Il existe deux genres d'halophiles : halophiles extrêmes et halophiles modérés. Les halophiles sont des organismes qui nécessitent des concentrations élevées en sel, plus de 0,2 M pour leur croissance, et qui ont la capacité de résister aux effets du stress osmotique. (DasSarma et al., 2010).

Les bactéries halophiles sont classées de légères à extrêmement halophiles en fonction des concentrations de sel dans lesquelles elles sont capables de survivre. Les halophiles sont présents dans la gamme complète de la salinité allant de faibles concentrations à la saturation en sel dans les solutions aqueuses (~6 M.) (Gaffney et al., 2021). Les halophiles sont des organismes qui vivent dans des milieux hypersalins. Ils comprennent principalement les procaryotes eucaryotes et les micro-organismes qui ont la capacité d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement et sont résistants à l'effet de dénaturation du sel. (DasSarma et al., 2010).

Les halophiles peuvent vivre dans des habitats hypersalins grâce à leur capacité à maintenir l'équilibre osmotique. Ils accumulent des sels comme le sodium ou le chlorure de

potassium (NaCl ou KCl) jusqu'à des concentrations qui sont isotoniques avec l'environnement. En conséquence, les protéines des halophiles doivent faire face à des concentrations de sel très élevées. Les enzymes se sont adaptées à cette pression environnementale en acquérant un nombre relativement important de résidus d'acides aminés déchargés négativement sur leurs surfaces pour prévenir les précipitations. Les halophiles du domaine archaïque constituent la principale source d'enzyme extrêmement halophile. Les potentiels des halophiles et des haloenzymes ont déjà été examinés. La production d'enzymes halophiles comme les xylanes, amylases, protéases et les lipases a été reprise pour certains halophiles appartenant aux genres (*Acinetobacter*, *Haloferax*, *Halobacterium*, *Halorhabdus*, *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Natronococcus*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Halothermothrix*) (Kumar et al., 2011).

Les halophiles ont joué un rôle important dans la production de sel naturel car ils facilitent la cristallisation du sel par absorption de rayonnement solaire en utilisant leurs pigments caroténoïdes. Plus récemment, les halophiles ont été utilisés en bio technologie comme producteurs d'antimicrobiens, de bioplastiques, d'extrêmzymes et de polysaccharides extracellulaires. (Haque et al., 2020).



**Figure 4:** Gammes de concentrations et terminologie des eaux (D'après Kharaka et Hanor, 2005).

**Tableau 4:** Différentes catégories des bactéries halotolérantes (**Tiquia et al. 2007**)

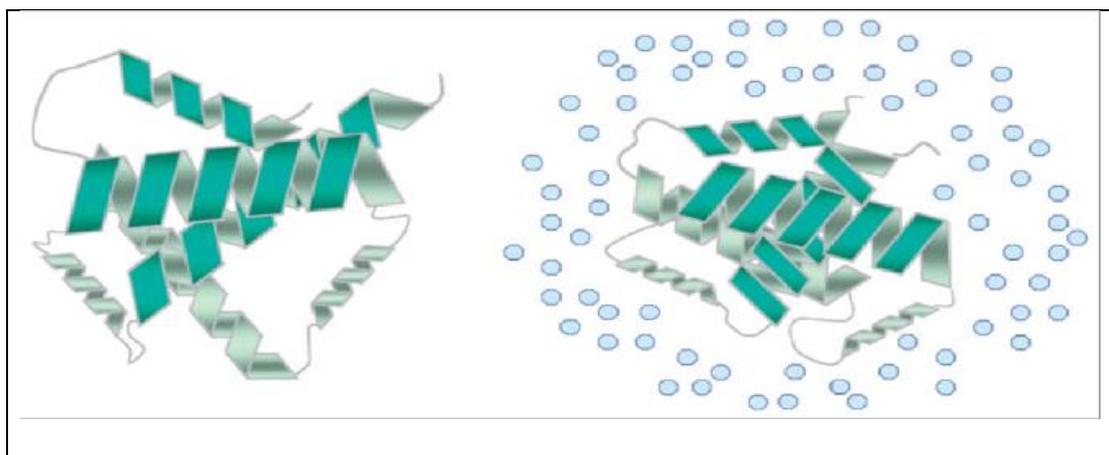
Catégories	NaCl
Légèrementhalotolérantes	6 à 8%
Modérémenthalotolérantes	18 à 20 %
Les halotolérantesextrêmes	0% à le point de saturation.

## 6. Osmorégulation

Le terme "osmoadaptation" désigne toutes les manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement fortement ou faiblement osmolaire (**Galinski, 1995**). L'osmorégulation est le principal procédé d'osmo-adaptation qui contrôle l'écoulement et l'efflux des solutés cellulaires dans des conditions de culture osmotiques stressantes (**Csonka, 1989**).

La composition ionique des milieux hypersalés se modifie avec l'évaporation ou l'apport d'eau (précipitations). Ces variations ioniques soudaines entraînent une adaptation rapide des micro-organismes à ces nouvelles conditions (**Koch, 1982**). Ils accumulent dans leur cytoplasme des molécules osmotiquement actives afin de restaurer une pression de turgescence cellulaire (**Kempf et Bremer, 1998**). En absence de solutés adéquates, l'eau s'échappe de la cellule afin d'équilibrer la AW (l'activité de l'eau) aux deux côtés de la membrane, ce qui conduit à la réduction du volume de la cellule, altérant les concentrations intracellulaires des métabolites et l'activité des enzymes (**Litchfield, 1998; Roberts, 2005**).

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



Osmolarité faible

osmolarité élevée

**Figure 5:** Stabilisation de la structure des enzymes halotolérantes à osmolarité élevée.

L'exclusion préférentielle de solutés compatibles (cercles bleus) de la surface des protéines aide à maintenir la structure enzymatique à une osmolarité élevée, tout en aidant à augmenter le volume cellulaire (Sleator et Hill, 2001).

### 6.1. Adaptation par accumulation de KCl

Cette stratégie consiste à accumuler des ions  $K^+$  et  $Cl^-$  afin de maintenir un équilibre osmotique. Il est adopté par des archaées halophiles aérobies extrêmes de l'ordre des Halobacteriales et par des bactéries halophiles fermentatrices anaérobies ou homoacétogènes de l'ordre des Halanaerobiales. Cependant, la présence intracellulaire de fortes concentrations de KCl nécessite une adaptation supplémentaire de l'appareil enzymatique, de sorte que les protéines doivent maintenir leur activité et leur conformation appropriées. (Lanyi, 1974). Des études de protéomique ont montré que leurs protéines sont très acides, et la plupart d'entre elles sont dénaturées à de faibles concentrations de sel. (Kennedy et al., 2001).

Ainsi les études réalisées sur la malate déshydrogénase (Hm MalDH) d'*Haloarcula marismortui* (une haloarchaée), ont montré qu'elle contient plus de résidus acides (aspartique et glutamique) et hydrophobes mais moins de résidus basiques (lysine) que son homologue non halophile (Madern et al., 1995). Cette accumulation de résidus acides permet donc de s'adapter à des concentrations élevées de sel.

Cette enzyme se compose de dimères connectés par un vaste réseau de molécules d'eau structurées dans la cavité centrale et par de multiples ponts salins aux deux extrémités. Ceux-ci sont précisément bloqués par les ions Cl, ce qui augmente leur stabilité en présence de fortes concentrations salines. De même, les ponts salins complexes entre les dimères sont formés par des ions Na<sup>+</sup>. Ces analyses révèlent que l'adaptation halophile ne concerne pas tant la protection de la protéine contre les concentrations élevées de sel, mais plutôt son exploitation. (Costenaro, 2004).

## 6.2. Adaptation par production et accumulation d'osmoprotecteurs

Cette stratégie est rencontrée chez la plupart des bactéries halophiles, elle est basée sur l'exclusion de sodium et l'accumulation ou la production de composés organiques de faible poids moléculaire solubles dans l'eau « solutés compatibles » pour éviter la perte d'eau (Galinski, 1995).

Les solutés compatibles sont des osmolytes organiques qui s'accumulent dans le cytoplasme responsables de l'équilibre osmotique et en même temps compatibles avec le métabolisme des cellules, et sont avérés être des stabilisants efficaces des enzymes, offrant une protection contre la salinité et les températures élevées (Galinski et Trüper, 1994), comme par exemple la glycine, la bêtaïne et l'ectoïne servent d'agents de protection contre le stress salin, stabilisateurs d'enzymes, d'acides nucléiques et de parois cellulaires. (Canovas et al., 2000).

Dans les bactéries halotolérantes et moyennement halophiles, la stratégie d'osmoadaptation consiste principalement à accumuler des ions K<sup>+</sup> et du glutamate (réponse primaire.) (Sleator et Hill, 2001), ensuite des solutés organiques de faible masse moléculaire si le choc persiste ou augmente (réaction secondaire.) (Lucht et Bremer, 1994).

Cette stratégie est largement utilisée dans les trois domaines de la vie et exige beaucoup moins d'adaptations en profondeur des machines enzymatiques intracellulaires que l'accumulation de KCl. Cependant, produire ces solutés est coûteux en énergie. Les algues *Dunaliella* peuvent présenter un taux élevé de glycérol intracellulaire. Les bactéries semblent largement utiliser l'ectoïne (synthétisée par une grande variété de bactéries) et la glycine bêtaïne (synthétisée presque exclusivement par des procaryotes photosynthétiques, mais accumulée à partir du milieu par de nombreuses bactéries hétérotrophes). des solutés osmotiques organiques ont également été détectés, comme le 2-sulfotrèhalose, dans le domaine Archaea (Oren, 2002c).

Le sel dans le cytoplasme constitue un mécanisme spécifique pour les halobactéries. (**Galinski, 1995**), grâce à laquelle l'équilibre osmotique est obtenu par maintien dans le cytoplasme d'une concentration de sel identique à celle du milieu externe. (**Lanyi, 1974**). En outre, les halobactéries ont développé des mécanismes d'adaptation qui leur permettent d'avoir des machines cellulaires capables de supporter des concentrations élevées d'ions intracellulaires. (**Sleatoret Hill, 2001**). Les microorganismes halophiles ou halotolérants utilisant le mécanisme de la production ou l'accumulation de solutés compatibles sont plus flexibles pour l'adaptation à la pression osmotique que les microorganismes utilisant les mécanismes de l'accumulation de KCl (**Kunte et al., 2002**) également, l'adaptation à la salinité par l'accumulation de solutés organiques nécessite moins d'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire que la stratégie de l'accumulation des ions potassium, cependant la production des solutés est énergétiquement coûteuse (**Oren, 2002a**).

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

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

## 7. Physico-chimie des milieux hypersalés

Les écosystèmes hypersalés (marais salants, lacs continentaux hypersalés) montrent une assez large variabilité quant à leur pH, leur composition chimique et la concentration en sels comme le montre le tableau 1. Dans la plupart de ces écosystèmes, ce sont les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  qui prédominent en solution comme l'ont montré des études sur le Grand Lac Salé où leur concentration est respectivement de 105 et 181 g/l (Caton *et al.*, 2004).

La majorité des processus industriels sont réalisés dans le cadre des conditions extrêmes de température, de pH et de fortes concentrations de solvants organiques, où la majorité des enzymes ne fonctionnent. Ainsi, les enzymes d'origine halo-alcaliphile visent la stabilité et l'activité à plusieurs extrémités (Raval *et al.*, 2018).

### 7.1. Température

Les lacs salés se trouvent généralement dans les régions tropicales arides, ils existent également dans les régions tempérées et même polaires. La température des lacs continentaux peut varier énormément tout au long de l'année, ce qui fait que la température de la région des Grands lacs salés varie de  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  en hiver à  $+48\text{ }^\circ\text{C}$  en été (Post, 1981). La vaste majorité des plantes halophiles extrêmes ou thermotolérantes. La température optimale des archaebactéries halophiles est de  $40$  à  $55\text{ }^\circ\text{C}$ . (Laybourn-Parry *et al.*, 2002).

### 7.2. Oxygène

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

### 7.3. pH

Le Grand lac salé ou la mer Morte contiennent des concentrations totales de sel supérieures à  $330\text{ g/l}$  et leur pH est proche de la neutralité. Selon ROSS *et al.* (1986), précipiter le calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) ou le sulfate de calcium ( $\text{CaSO}_4$ ) et le magnésium sous forme de sépiolite ( $\text{MgSi}_2\text{O}_5 \cdot \text{nH}_2\text{O}$ ), influent sur le pH final du milieu puisque la formation de sépiolite produit des ions  $\text{H}^+$  et que la précipitation du carbonate élimine l'alcalinité du milieu (Dassarma et Arora, 2002).

**Tableau 6:** Quelques propriétés physico-chimiques des principaux écosystèmes hypersalés du Sahara algérien et du monde (**Oren, 1993 ; Hacene et al., 2004 ;Boutaiba et al., 2011**).

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

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

## 8. Halo-enzymes

Les micro-organismes extrêmes prospèrent dans des environnements difficiles où d'autres organismes ne peuvent même pas Survie. Les extrémophiles sont largement répartis en termes de classification et forment un groupe diversifié sur le plan fonctionnel qui comprend les amateurs de chaleur, les psychrophiles, les amateurs d'alcali, les halophiles, les barophiles, les piezophiles les métalophiles et les radiophiles (**Raddadi et al., 2015**) . Les extrémophiles procaryotes sont devenus un point d'intérêt scientifique en raison de leurs propriétés uniques en termes de physiologie, d'écologie, de biochimie et de génétique. La plupart des extrémophiles qui ont été identifiés jusqu'à maintenant appartiennent au domaine des Archaïes. (**Mari, 2011**). Les extrémophiles ont le potentiel de produire des biomolécules de grande pertinence pour les secteurs biotechnologiques blancs, gris et rouges. Ces micro-organismes produisent des enzymes extrémophiles (extrémozymes) et des biomolécules (extremolytes) qui transmettent des caractéristiques de survie dans les conditions extrêmes de l'environnement (**Raddadi et al., 2015**).

Les extrêmophiles sont des micro-organismes qui se trouvent dans des environnements de température extrême ( $-2^{\circ}\text{C}$  à  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  à  $110^{\circ}\text{C}$ ) ou pH ( $<4, >9$ ). La majorité des extrêmophiles sont membres de l'archaea, l'un des trois domaines phylogénétiques de la vie, défini par comparaison de 16s rRN séquences de gène bien que les membres extrêmophiles du domaine bactérien sont également connus. Les extrêmophiles sont une source d'enzymes (extrêmozymes) d'une stabilité extrême et l'application de ces enzymes en tant que biocatalyseurs est attrayante parce qu'ils sont stables et actifs dans des conditions auparavant considérées comme incompatibles avec les matériaux biologiques en outre, il est clair que certains extrêmophiles, en particulier ceux de l'archaea, ont de nouvelles voies métaboliques et pourraient donc servir de source d'enzymes avec de nouvelles activités et applications. La majorité des extrêmophiles n'ont toutefois pas encore été isolés en culture pure et il est donc difficile de déterminer les caractéristiques de stabilité et la spécificité précise du substrat et l'élasticité de leurs enzymes. Nous nous sommes concentrés sur les progrès dans l'isolement et l'identification des extrêmozymes vers la compréhension de la stabilité des extrêmozymes au niveau moléculaire et l'ingénierie enzymatique pour créer de nouveaux biocatalyseurs avec une stabilité et une stabilité améliorées spécificité altérée. (**Kumar et al., 2011**).

Les extrêmozymes ont été utilisés comme source des enzymes en raison de leur stabilité et de leur capacité à vivre dans des conditions extrêmes. Malgré leur potentiel, les extrêmozymes sont très peu. En particulier, les enzymes thermophiles ont un grand potentiel d'applications biotechnologiques, en raison de leur haute résistance à des températures extrêmes, des produits chimiques, des solvants organiques et du pH. Les extrêmozymes ont un potentiel d'application économique dans l'agriculture. (**Dumorné et al., 2017**). Les extrêmozymes ont un grand potentiel économique dans de nombreux processus industriels, y compris les applications agricoles, chimiques et pharmaceutiques, de nombreux produits de consommation bénéficieront de plus en plus de l'ajout ou de l'exploitation des extrêmozymes. (**Kumar et al., 2011**). Les extrêmozymes des microorganismes halophiles offrent de grandes possibilités aux industries de l'alimentation, de la biorestauration et des processus biosynthétiques. Les utilisations biotechnologiques des enzymes halophiles ne se limitent pas à leur stabilité à des concentrations élevées de sel, car elles tolèrent les températures élevées et sont stables en présence de solvants organiques. (**Dumorné et al., 2017**). Ces halozymes ont été commercialisés dans diverses industries, y compris les aliments, la boulangerie, les aliments pour animaux, les produits chimiques et industrie pharmaceutique, papeterie,

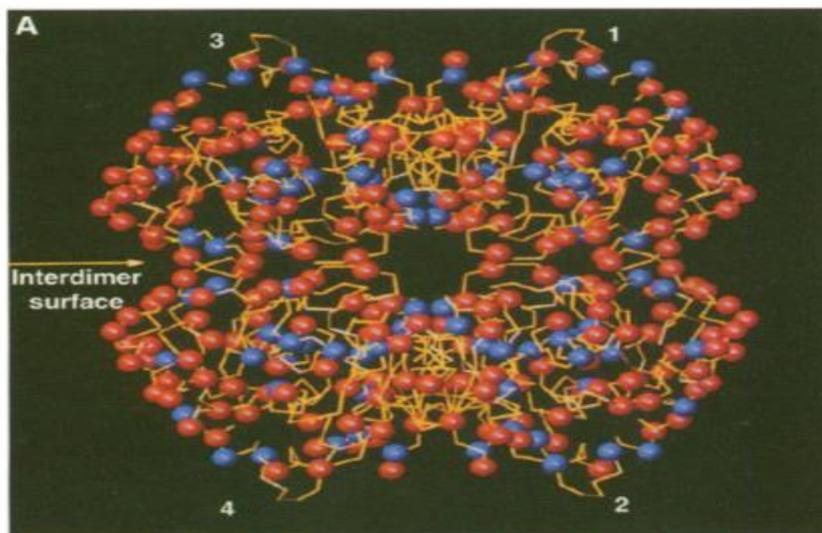
détergent, cuir, les préparations de sauce de poisson et de sauce soya, les eaux usées salines et traitement des déchets pétroliers (**Gupta et al., 2016**).

Du fait de la présence d'une forte concentration en sel dans le cytoplasme, les protéines halophiles ont nécessairement développé des mécanismes spécifiques pour la rétention de leur conformation native et de leur activités en milieu saturé en sel. Tout d'abord, l'analyse statistique de 26 séquences de protéines halophiles a montré que la plupart des protéines halophiles (24 sur 26) sont très acides (excès de résidus acide par rapport au basique) par rapport aux non-halophiles (**Marty et al., 2016**). Les structures cristallines de plusieurs protéines halophiles ont montré des surfaces riches en résidus acides (Figure 6) et (figure7). L'utilisation de résidus d'acides aminés chargés négativement conduit à une organisation des ions salins en réseau à la surface des protéines, qui renforce à la fois les interactions faibles particules-particules (répulsion) et les interactions protéine-solvant. Il est probable que ces charges négatives sont nécessaires comme mécanisme de défense qui leur permettrait de retenir une couche d'hydratation aux forces ioniques élevées. Etant donné que les groupes acides sont les plus efficaces en ce qui concerne la capacité d'hydratation, ils peuvent lier environ 6-8 molécules d'eau, par rapport à 3-4 dans le cas des groupes basiques.

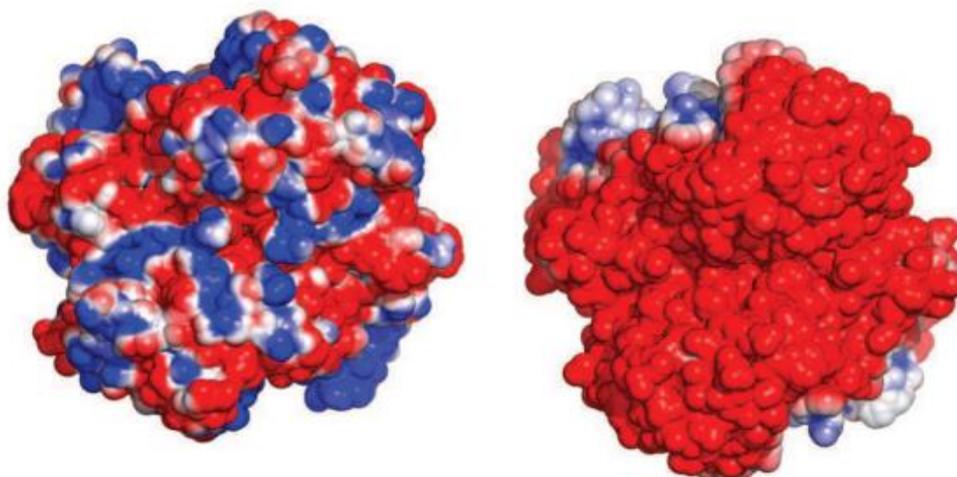
La sélection d'une surface acide est donc nécessaire pour maintenir la solubilité des protéines dans un environnement en sel élevé. De plus, de nombreuses protéines halophiles ont des sites de liaison aux ions, souvent à l'interface de sous-unité. La formation de ponts salins avec d'autres résidus va permettre d'augmenter la stabilité des protéines (**Marty et al., 2016; Boudjemai, 2020**).

Les molécules d'eau sont nécessaires dans le processus de repliement et de stabilisation des protéines. Pour montrer l'impact relatif de l'enrichissement en surface acide sur l'organisation de la structure de l'eau entre une protéine halophile et sa contrepartie non adaptée, les enveloppes de solvant de deux malates déshydrogénases tétramères orthologues (MalDH) de bactéries halophiles et non halophiles ont été comparé, (Figure8). La structure cristalline de la MalDH de la bactérie non halophile *Chloroflexus aurantiacus*. (CaMalDH) présente de nombreuses molécules d'eau dans sa coquille de solvation. On a observé qu'un grand nombre de ces molécules d'eau sont disposées en polygones pentagones dans la première couche d'hydratation de CaMalDH. La structure cristalline de la MalDH de la bactérie halophile extrême *Salinibacter ruber*, montre que sa surface est fortement enrichie en acides aminés acides et aucun polygone n'a été observé (Figure 9), Mais 14 molécules d'eau se trouvent dans la poche catalytique de (Sr) MalDH. Les données montrent que les acides

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



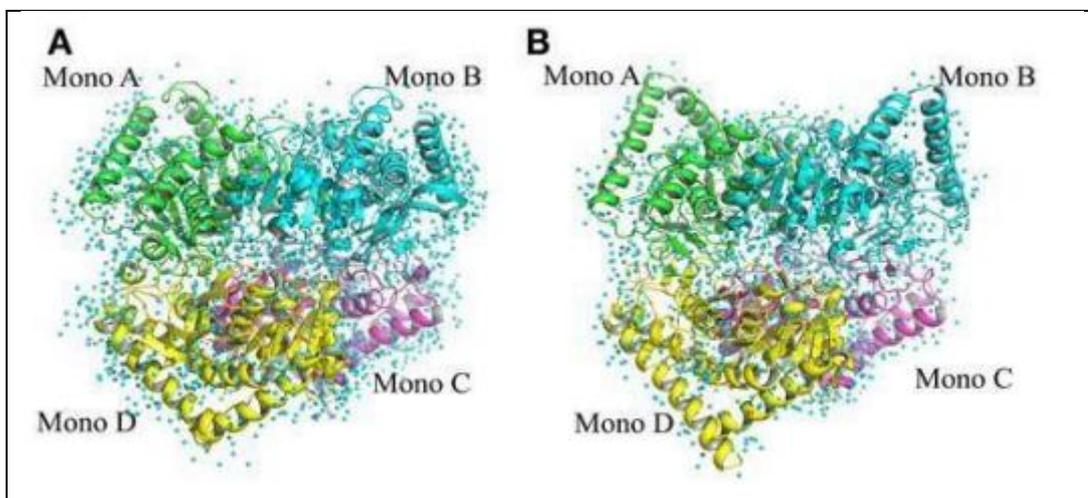
**Figure 6:** Structure tetramérique de la HMDH : les acides aminés acides sont représentés en rouge et les basiques en bleu. Les nombres 1 à 4 désignent les différentes sous-unités de la protéine.(Marty *et al.*, 2016).



**Figure 7:** Comparaison de la surface électrostatique résultant de la composition en acides aminés acido-basique de la surface d'une malate déshydrogénase acidophile et halophile.

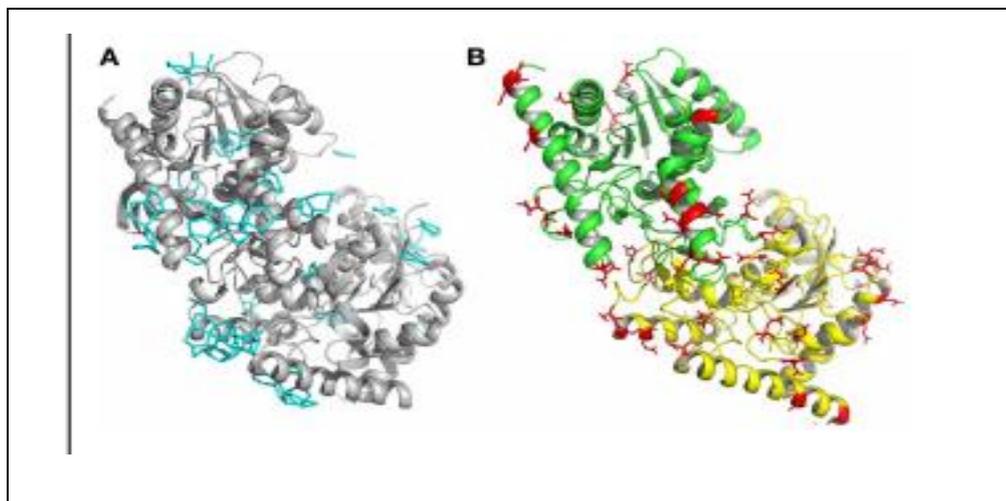
(Marty *et al.*, 2016)

Structure tetramérique 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. (Marty *et al.*, 2016)



**Figure 8:** Dessin en ruban de MalDH tétramérique. (Talon *et al.*, 2014)

(A) *Chloroflexus aurantiacus* MalDH. (B) *Salinibacter ruber* MalDH. Les monomères sont représentés en quatre couleurs différentes. Les molécules d'eau sont affichées par petites sphères bleues.



**Figure 9:** (A) Dessin en ruban des monomères A et D de Ca MalDH. Les polygones d'eau sont représentés en lignes bleues. (B) Dessin en ruban de monomère A (vert) et monomère D (jaune) de Sr MalDH. La surface l'acide aminé acide est indiquée en rouge (Talon *et al.*, 2014)

## 9. Potentiel biotechnologique des enzymes halophiles

Les enzymes ont gagné une importance dans diverses industries en raison de la fonctionnalité et des applications élargies. Les enzymes sont appliquées dans divers domaines, les plus sont, la fabrication d'aliments pour animaux, les cosmétiques et les médicaments. Les processus enzymatiques remplacent les étapes des processus chimiques traditionnels qui étaient autrefois exécutés dans des conditions industrielles difficiles (température, pression, pH et produits chimiques). **(Bccet Staff, 2021)**.

Les enzymes actives à froid permettent une augmentation de la flexibilité structurelle qui contribue à maintenir l'action catalytique à basse température, Les extrêmozymes comme les protéases, les lipases, les cellulases et les amylases sont des enzymes commerciales utilisées dans l'industrie, en particulier dans les détergents. La production de détergents à partir d'enzymes est un énorme marché qui représente environ 40 % du total des enzymes produites à l'échelle mondiale, allant de la transformation à grande échelle aux produits à plus petite échelle à forte valeur ajoutée. **(Dumorné et al., 2017)**. Les enzymes halophiles sont également stables présence de fortes concentrations de sel en raison de la congglomération de groupes légèrement hydrophobes et l'hydratation de la protéine surface due aux groupes carboxyliques présents dans le glutamate et aspartate **(Gupta et al., 2016)**. Ils sont actifs et stables dans des milieux à faible activité hydrique, car ils ont suffisamment d'eau pour maintenir une répartition appropriée de la charge sur le site actif, en maintenant la conformation de l'enzyme. **(Dumorné et al., 2017)**

Les enzymes sont des catalyseurs très importants utilisés dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques et cosmétiques. Ces enzymes présentent cependant des performances relativement médiocres au regard des températures élevées. Cependant, beaucoup d'activités enzymatiques d'archées halophiles ont été caractérisées, y compris des enzymes à intérêt potentiel, telles que les cellulases, les xylanases, les amylases, les lipases, les protéases et les gélatinases. **(Fukushima et al., 2005)**. Les enzymes des halophiles utilisent différents mécanismes d'adaptation et sont très stables à faible activité hydrique et en présence de solvants organiques, Les enzymes halophiles présentent un pourcentage élevé de résidus acides aminés tels que la sérine et la thréonine, en

comparaison avec les microorganismes non halophiles; il s'agit notamment des enzymes polysaccharidiques hydrolysantes pour les xylanes et l'amidon. **(Dumorné et al., 2017)**.

L'importance des enzymes et leur rôle dans de nombreux processus ont été étudiés au cours des dernières années, en particulier les enzymes des extrêmophiles. De nombreux enzymes ont été identifiés (plus de 3000), dont la majorité a été utilisée pour des applications biotechnologiques et industrielles, mais le marché des enzymes est encore insuffisant pour répondre aux demandes de l'industrie. La raison principale des exigences insuffisantes des enzymes est le fait que beaucoup ne résistent pas aux conditions industrielles. En outre, les enzymes sont utilisées dans des technologies utilisant des processus écologiques. Le processus industriel a besoin de biocatalyseurs capables de résister à des conditions de pH, de température et d'aération différentes, avec une reproductibilité élevée et d'autres paramètres. Avec la croissance et le développement de la biotechnologie, l'intérêt pour les enzymes a considérablement augmenté en tant que stratégie vers l'atteinte d'une bioéconomie. **(Dumorné et al., 2017)**. La majorité des processus industriels sont réalisés dans le cadre des conditions extrêmes de température, de pH et de fortes concentrations de solvants organiques, où la majorité des enzymes ne fonctionnent pas. Par conséquent, les enzymes d'origine haloalcaliphile confèrent la stabilité et de l'activité à plusieurs extrémités **(Raval et al., 2018)**.

Selon Dewan, Le marché mondial des enzymes dans les applications industrielles devrait passer de 6,4 milliards de dollars en 2021 à 8,7 milliards de dollars d'ici 2026, à un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 6,3 % pour la période de 2021 à 2026.

L'Amérique du Nord pour les enzymes dans les applications industrielles devrait passer de 2,3 milliards de dollars en 2021 à 3,0 milliards de dollars d'ici 2026, à un TCAC de 5,0 % pour la période de 2021 à 2026. L'Asie-Pacifique pour les enzymes dans les applications industrielles devrait passer de 1,9 milliard de dollars en 2021 à 2,8 milliards de dollars d'ici 2026, à un TCAC de 7,3 % pour la période de 2021 à 2026.. **(Bccet Staff, 2021)**.

## 9.1. Protéases

Les protéases, qui sont parmi les groupes les plus importants des enzymes industrielles, représentent 60% du marché total des enzymes **(Jaouadi et al., 2008)**. La demande a augmenté en raison de ses applications dans divers secteurs comme les détergents, le cuir, les aliments, les produits laitiers, les produits pharmaceutiques, les textiles et les peptides de synthèse **(Bhatt et Singh, 2020)**.

Les protéases des micro-organismes halophiles sont en demande pour diverses applications en raison de leur capacité à fonctionner à pH alcalin, températures élevées et à des concentrations élevées en sel (Sinha and Khare, 2013) **Raval et al., 2014**). Ainsi, ils conviennent également à la transformation des aliments dans des conditions salines. Les protéases sont largement utilisées dans les détergents en raison de l'inefficacité de détergents non enzymatiques pour l'élimination des protéines matériaux des fibres textiles. Les enzymes non seulement améliorer l'efficacité de lavage mais aussi de réduire la durée de lavage à températures modérées (**Bhatt et Singh, 2020**).

## 9.2. Amylases

Les amylases sont un groupe diversifié d'enzymes d'hydrolase ou de transférase qui dégradent de grandes polysaccharides alpha-liés, tels que l'amidon et les oligosaccharides connexes, et sont unes des enzymes les plus nécessaires dans les opérations industrielles. Ils représentent environ 30 marché mondial des enzymes, et cette valeur devrait augmenter dans les années à venir, en raison augmentation mondiale de la demande de produits de boulangerie et de produits dérivés du sucre, biocarburants, détergents, brasseries, aliments pour animaux, produits pharmaceutiques, papier et textiles. (**Gómez-villegas et al., 2021**).

Les amylases sont des enzymes anciennes omniprésentes dans les plantes, les animaux et les micro-organismes. Parmi eux, des bactéries du genre *Bacillus* ou des champignons appartenant à *Aspergillus* genres sont la source d'amylases préférée pour la production à grande échelle [14]. Hydrolytique les amylases peuvent être classées en deux grandes catégories : les endoamylases, qu'intérieur de la molécule d'amidon; et exo-amylases, qui dégradent successivement l'amidon de non-extrémités réductrices. La plupart des endoamylases appartiennent à la famille des  $\alpha$ -amylases (CE 3.2.1.1) et hydrolysent les liaisons  $\alpha,1-4$  glycosidiques internes entre les unités de glucose, produisant des oligosaccharides et des dextrines avec des longueurs variables. De plus, les  $\alpha$ -amylases sont généralement divisé en deux groupes, selon les produits d'hydrolyse et le degré d'amidon hydrolysé;  $\alpha$ -amylases saccharifiantes qui produisent des sucres libres et  $\alpha$ -amylases liquéfiantes qui décomposent le polymère d'amidon sans produire de sucres libres. (**Gómez-villegas et al., 2021**).



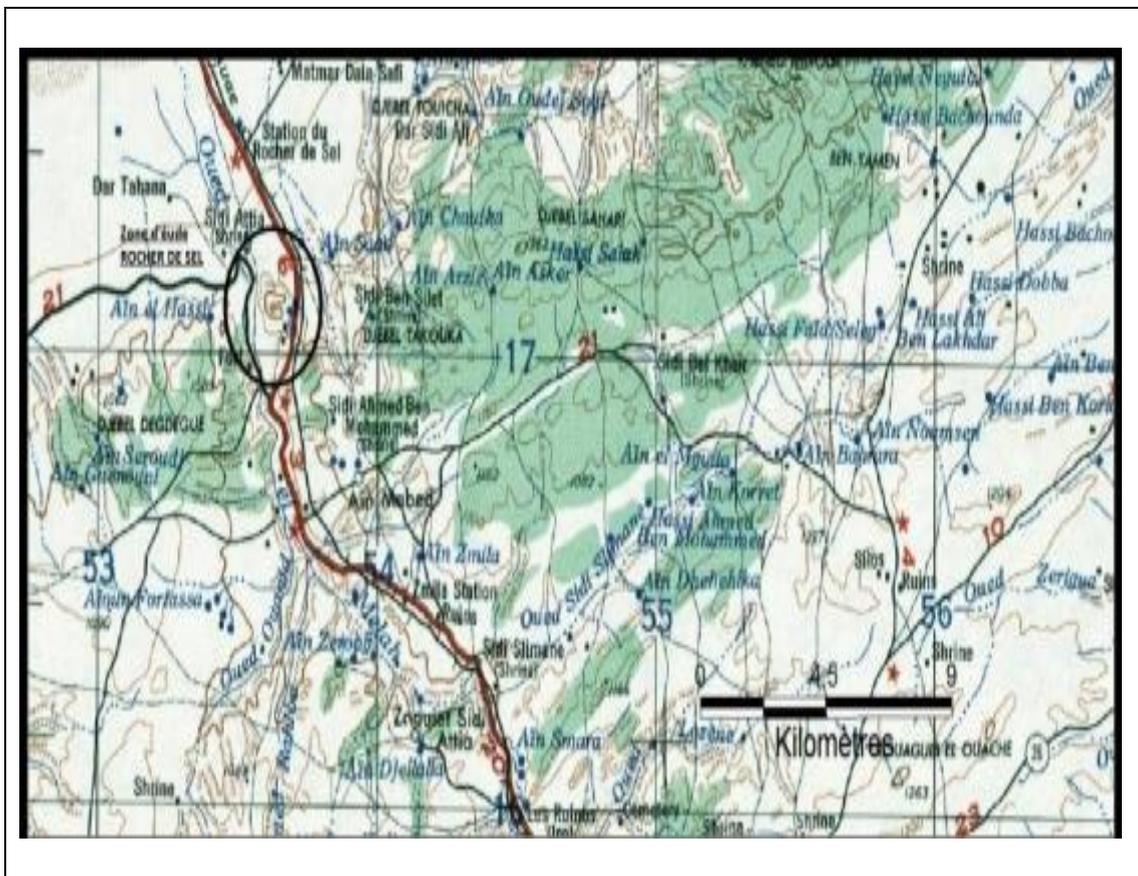
# **Chapitre 2**

## **Matériels et méthodes**

Notre travail de criblage d'activités enzymatiques chez des isolats halophiles, a été réalisé au niveau du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Ziane Achour –Djelfa.

### 1. Matériel biologique:

Nous avons utilisé dans cette étude 2 souches d'archées halophiles codées (S1A1) et (S1PA4). Ces souches ont été isolées par nos collègues (BEN KHECHIBA ; HOMIDA et TOUATI) (2022), à partir du Rocher de sel situé à 25Km au Nord de la ville de Djelfa, dans la commune de Ain-Maabad, entre les coordonnées géographiques latitude : 34°77' 39.04" Nord et longitude : 3°17' 37.89" Est, et s'élève sur une altitude de 1083m.



**Figure 10:** Situation géographique de la zone d'étude (Rocher de Sel). (BEN KHECHIBA et al. 2022).

## 2. Appareillages

- ❖ **Autoclave** : pour la stérilisation de milieu de culture et des quelques matériels, (stérilisation à 120C° pendant 20min dans une pression 1Bar).



- ❖ **Incubateur** : pour l'incubation des cultures (à 40°C).



- ❖ **Centrifugeuse** : pour la centrifugation (séparation) (à 4°C avec 3000 tour/s pendant 20 min).



- ❖ **Spectrophotomètre** : pour calculer la densité optique à (680 nm).



- ❖ **Hotte de laboratoire** : permet l'extraction des vapeurs toxiques des produits utilisés lors de manipulations. Sa fonction première est de protéger le manipulateur.



### 3. Analyse microbiologique

#### 3.1. Milieux de culture utilisés:

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des souches halophiles est le milieu MSH (Milieu Spécifique pour les Halophiles), dont la composition en g/l est la suivante :

**Tableau 7:** Composition du milieu MSH.

Le produit chimique	Le produit chimique	Quantité en (g)
chlorure de sodium	NaCl	200
sulfate de magnésium	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	50
Chlorure de Magnésium	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	32
Chlorure de Potassium	KCl	05
Calcium chloride	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.8
Sodium bromide	NaBr	0.6
Sodium bicarbonate	NaHCO <sub>3</sub>	0.16
Extrait de levure	–	05
Eau distillée	–	1litre

❖ Pour la quantité d'agar :

Le milieu solide contient 20 g/l

Le milieu semi solide contient uniquement 15 g/l

Le milieu liquide minimum est bien entendu dépourvu d'Agar et d'extrait de levure



**Figure 11:** exemples des produits de MSH.

### 3.2. Préparation du milieu de culture :

Pour préparer un litre de ce milieu de culture, nous avons procédé comme suit :

- ❖ Verser 800 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 1L.
- ❖ Ajout des éléments mentionnés à l'erlenmeyer chauffé.
- ❖ Agitation pour favoriser l'homogénéisation des différents éléments.
- ❖ Ajout final d'extrait de levure, Na Cl et agar.
- ❖ L'ouverture de l'erlenmeyer doit être refermée avec une feuille d'aluminium pour éviter l'évaporation de la solution.
- ❖ À l'ébullition le volume manquant de l'eau distillée est ajouté jusqu'à 1L.
- ❖ Le milieu est distribué en flacons de 250 ml et ensuite autoclavé à 120 °C pendant 20 minutes.
- ❖ Le milieu stérile de MSH est coulé dans des boîtes de Pétrie et on laisse se solidifier



**Figure 12:** milieu de culture MSH pendant la préparation

## **4. Repurification :**

### **4.1. Ensemencement sur milieu gélosés MSH complet :**

La purification des souches a été effectuée à l'aide de la méthode d'épuisement des stries. Tout d'abord l'anse de platine est stérilisée sur la flamme d'un bec bunsen puis refroidi au contact du milieu solide. Ensuite ; l'échantillonnage est fait à partir d'une colonie dans le tube à vice par la boucle de l'anse.

Pour ensemenecer les souches, la boite de Pétri est divisée en trois parties. Le premier tiers de la boite de Pétri estensemencé en balayant une anse de platine sur la surface de la gélose des stries serrées, puis stérilisez et refroidissez l'anse, et le deuxième tiers de l'inoculum est des stries sont formées en «empiétant » légèrement avec l'anse de la première partie pour obtenir certaines cellules seront réparties dans la deuxième zone et réparties dans la troisième zone l'isolement des bactéries se fait de la même manière.

La boiteensemencée est étiquetée et placée dans un sac plastique avec un coton imbibé avec l'eau distillée pour éviter la dessiccation de la gélose, puis incubées par la suite dans une étuve à 40°C pendant 8 jours.

### **4.2. Conservation des isolats:**

La conservation des isolats purifiés se fait dans des tubes inclinés contenant le milieu solide MSH, par la méthode des stries. Les tubes sont ensuite incubés à 40°C pendant 8 jours, après l'apparition de bactéries, les tubes inclinés sont placés le réfrigérateur à 4°C.

## **5. Tests de criblage de l'activité protéolytique et amylolytique :**

### **5.1. Criblage de l'activité protéolytique et amylolytique sur milieu semi solide :**

Des isolats ont été inoculés par stries sur gélose dans des boîtes de Pétri contenant du milieu minimal MSH semi solide additionné du substrat de l'enzyme recherché. Il s'agit du lait écrémé à 5 % pour l'activité protéase et l'amidon à 1 % pour la mise en évidence de l'activité amylase.

Les boîtes sont placées dans des sacs en plastique remplis de coton cardé stérile Humidifié pour éviter la dessiccation de la gélose, puis placés dans une étuve à 40°C Pendant 5 jours.

La présence de l'activité protéolytique se traduit par l'apparition d'un halo de dégradation autour des puits.

L'activité amylolytique est révélée après l'ajout de Lugol qui réagit avec l'amidon en donnant la couleur bleue violacée, alors que les halos de dégradation autour des puits restent incolores.

### **5.2. Criblage de l'activité protéolytique et amylolytique sur milieu liquide :**

Ensemencer chaque isolat dans un flacon stérile contenant 50 ml de milieu minimal MSH (milieu MSH à 0.25 g extrait de levure), Ajouter 1 % de lait écrémé au liquide. Placer ensuite le flacon dans l'incubateur pendant 10 jours à 40 °C.

Effectuer des lectures quotidiennes du spectrophotomètre à 680 nm pendant 10 jours. Prélever 1 ml après chaque lecture et conserver dans des microtubes (tubes Eppendorf) à -20°C. Le changement de DO est tracé dans la courbe d'étalonnage.

- Le même protocole de l'activité protéase a été exécuté pour celle de l'amylase, à l'exception du substrat utilisé qui est l'amidon à 1%.

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

Pour démontrer l'activité protéolytique, la méthode du puits de diffusion a été utilisée sur gélose.

Ce test d'activité est basé sur la diffusion de protéases sécrétées par des souches dans la gélose pour décomposer la caséine du lait autour des puits.

Un milieu minimal semi-solide a été préparé (lait écrémé de 5% et avec de l'agar 15g/l). Après stérilisation, le milieu a été versé dans une boîte de Pétri.

La gélose est perforée d'un nombre de puits utilisant une pipette Pasteur pour délivrer environ de 100 µl solution surnageant obtenu après centrifugation de tubes Eppendorf préalablement conservés, à raison de 3000 rpm pendant 20 minutes et à 4°C. Enfin, les boîtes ont été incubées à 40°C pendant 24 h.

Un halo distinct émerge en raison de la présence d'une activité protéolytique (dégradation). En revanche, un résultat négatif indique qu'il n'y a pas de zone d'hydrolyse autour du puit.

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

La même procédure que l'activité protéase a été réalisée pour l'amylase, sauf ici que le substrat utilisé est l'amidon. Il a été ajouté au milieu de culture à raison de 1 %.

Les lectures ont été faites après l'ajout de Lugol et observation des halos de dégradation autour des puits.

### **8. Cinétique de croissance :**

Des flacons stériles contenant 50 ml de milieu de culture sont inoculés avec les souches actives (S1A1) et (S1PA4). Les flacons sont ensuite placés dans un agitateur-incubateur à 40°C pendant 7 jours. Avec prélèvement stérile quotidien pour la mesure de la densité optique à l'aide du spectrophotomètre à 680 nm.

Les variations en DO sont représentées sous forme d'une courbe.

# **Chapitre 3**

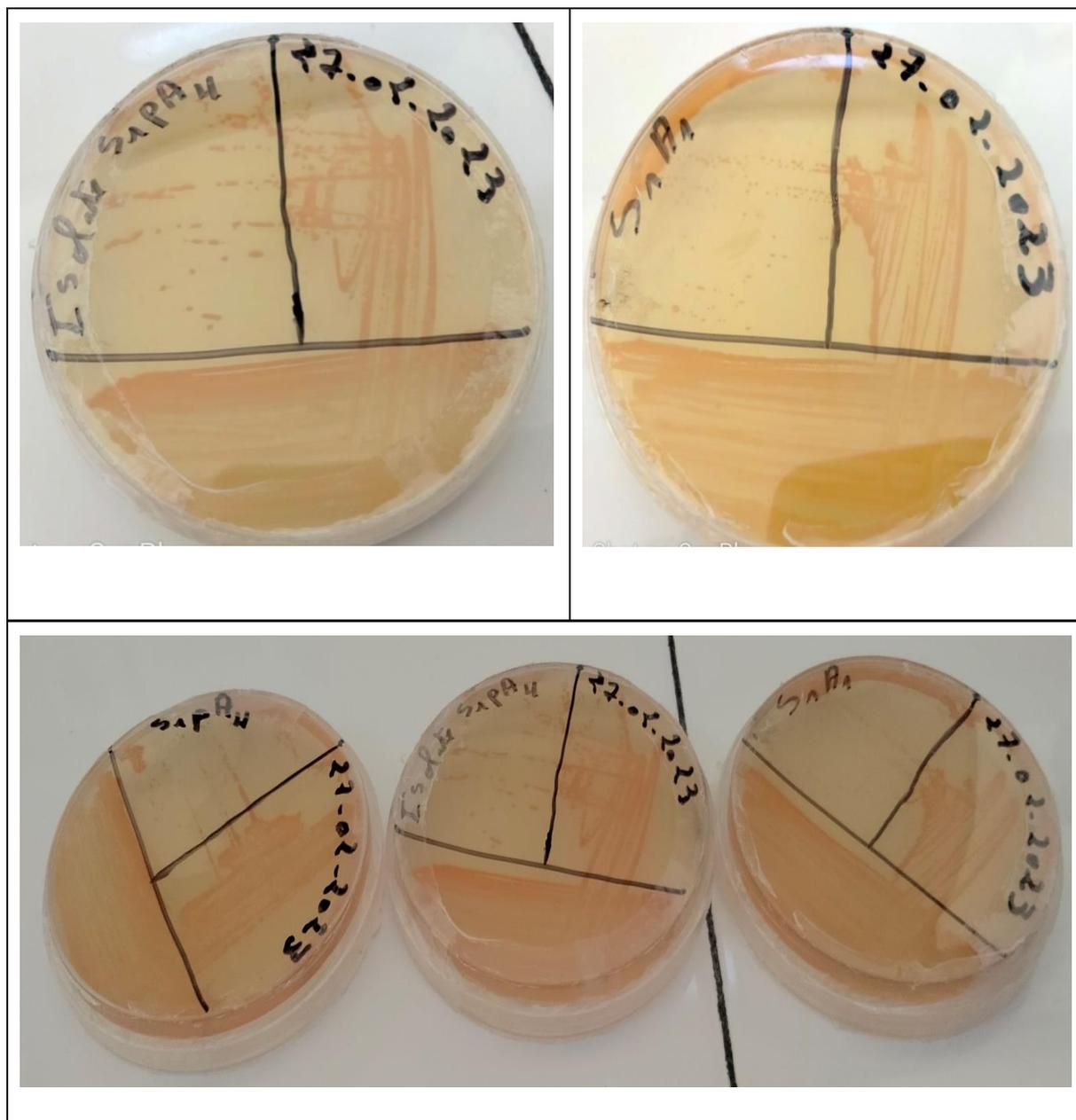
## **Résultats et discussion**



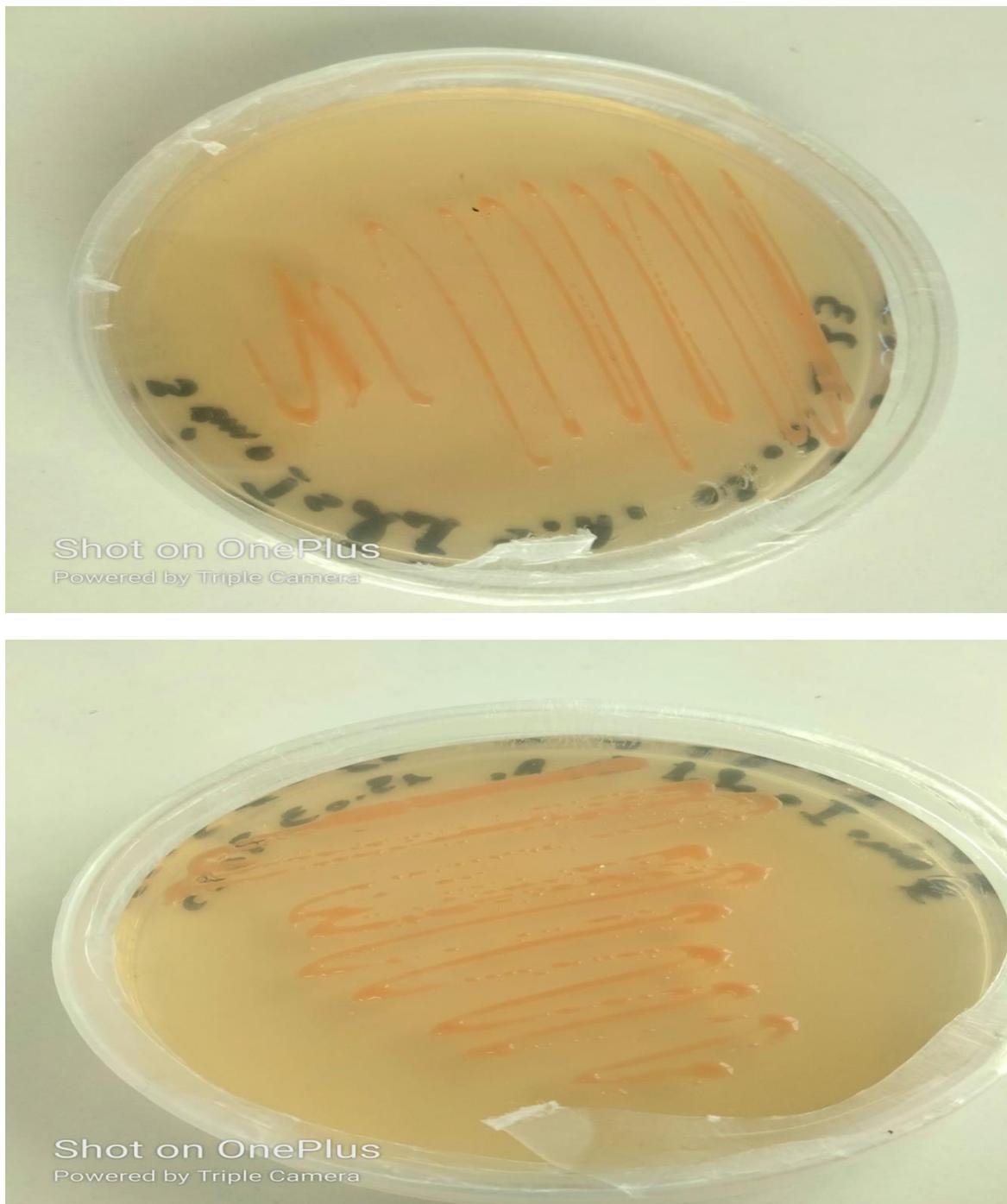
## 1. Revivification des souches

Après 8 jours de culture dans l'incubateur à 40°C, nous avons constaté l'apparition de plusieurs colonies des souches [S1A1 ; S1PA4] dans les boîtes de Pétri.

La croissance des souches signifie que le milieu MSH est un milieu qui rassemble beaucoup au milieu naturel des halophiles, car il contient les composants nécessaires à la croissance bactérienne, comme NaCl, MgSO<sub>4</sub>, KCl etc... (Hacène et *al*, 2004).



**Figure 13:** Exemples d'aspects macroscopiques d'isolats cultivés sur milieu MSH par méthode des quadrants.



**Figure 14:** Aspect des colonies sur boîtes de Pétri des souches (S1A1 ; S1PA4)

## 2. Conservation des souches

On note l'apparition de colonies dans les tubes inclinés. Ces tubes sont transférés au réfrigérateur pour une utilisation antérieure.

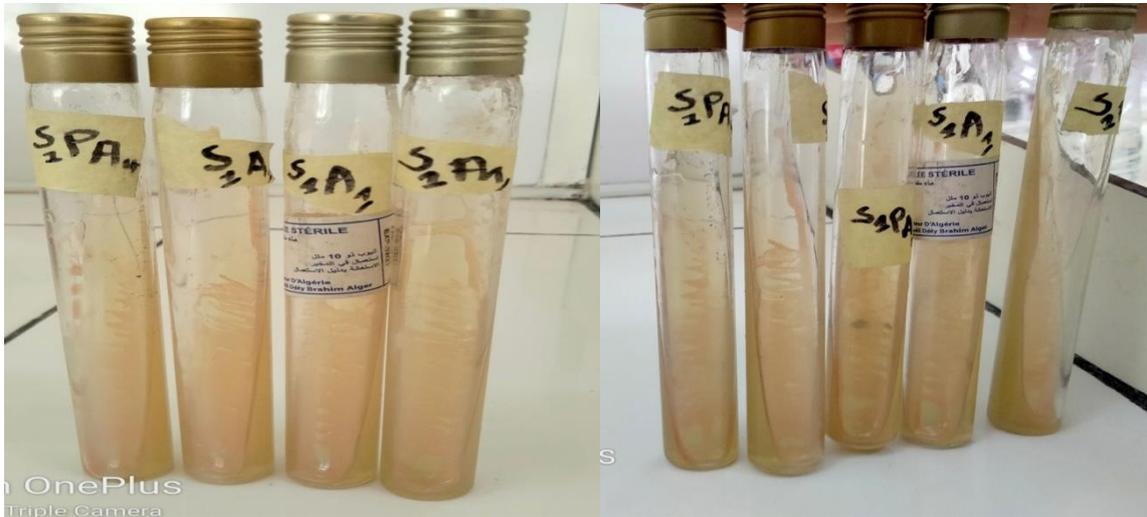


Figure 15: conservation des souches dans des tubes inclinés par MSH solide

## 3. Criblage des isolats pour l'activité

### 3.1. Criblage de l'activité protéolytique sur milieu solide

Après 5 jours d'incubation des souches à 40°C, nous avons constaté la présence des halos de dégradation autour des stries pour les isolats, S1A1, S1PA4, indiquant ainsi qu'ils présentent une activité protéase.

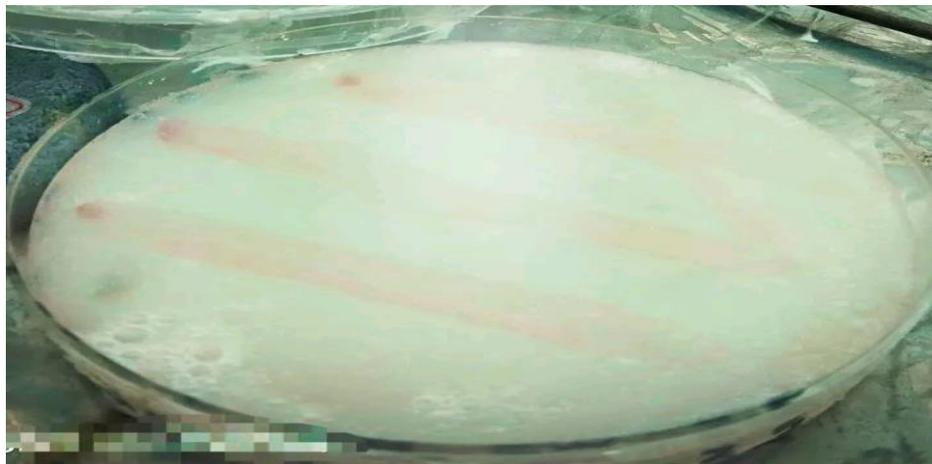


Figure 16: Production d'activité protéase sur milieu minimum MSH solide

### 3.2. Criblage de l'activité protéolytique sur milieu liquide :

Après 24 H d'incubation des souches cultivées à 40°C pendant 10 jours un halo très faible a été observé autour du puits des isolats S1PA4 montrant une hydrolyse de la caséine. Cette caséine (groupe protéique qui précipite à pH=4,6 à 20°C) représente environ 80% des protéines totales du lait, ce sont des polypeptides phosphorés associés surtout à des constituants minéraux de manière à former des micelles de phospho-caséinate de calcium (BEN KHECHIBA et al. 2022). Cependant, l'isolat S1A1 n'a pas montré de zones hydrolytiques autour du puits.

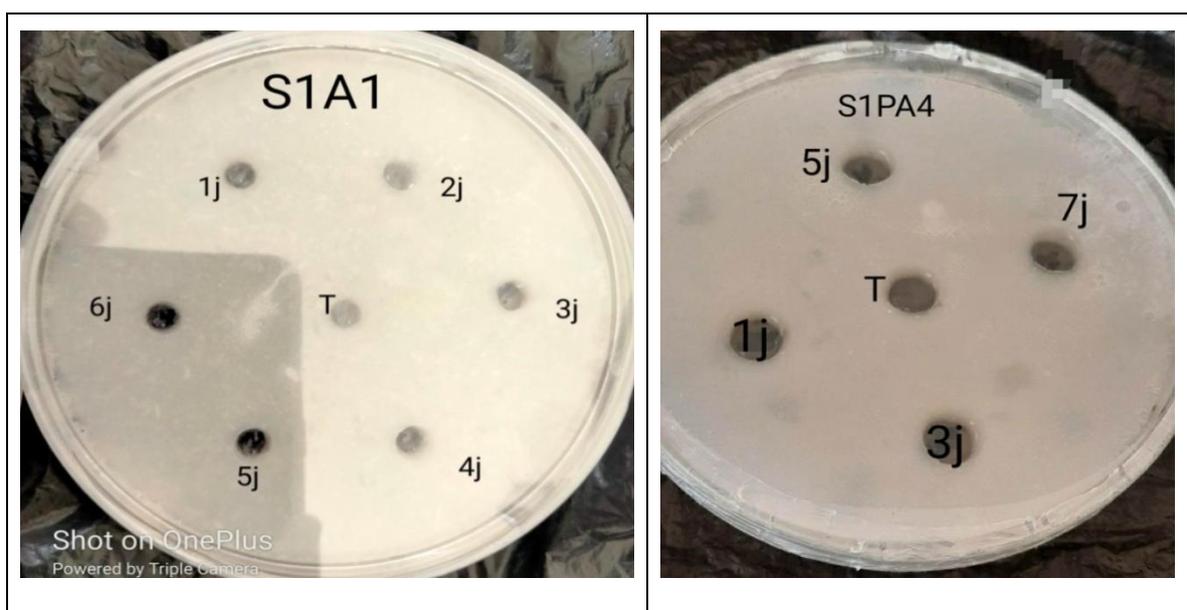
L'activité protéolytique qui s'est manifestée est représentée par la figure 17:

#### Isolat S1PA4 :

Au début de l'expérience (T0), la valeur de DO pour S1PA4 était de 0,105nm, qui ont progressivement augmenté jusqu'à 0,362nm à T5, et la valeur maximale de production est un diamètre très faible.

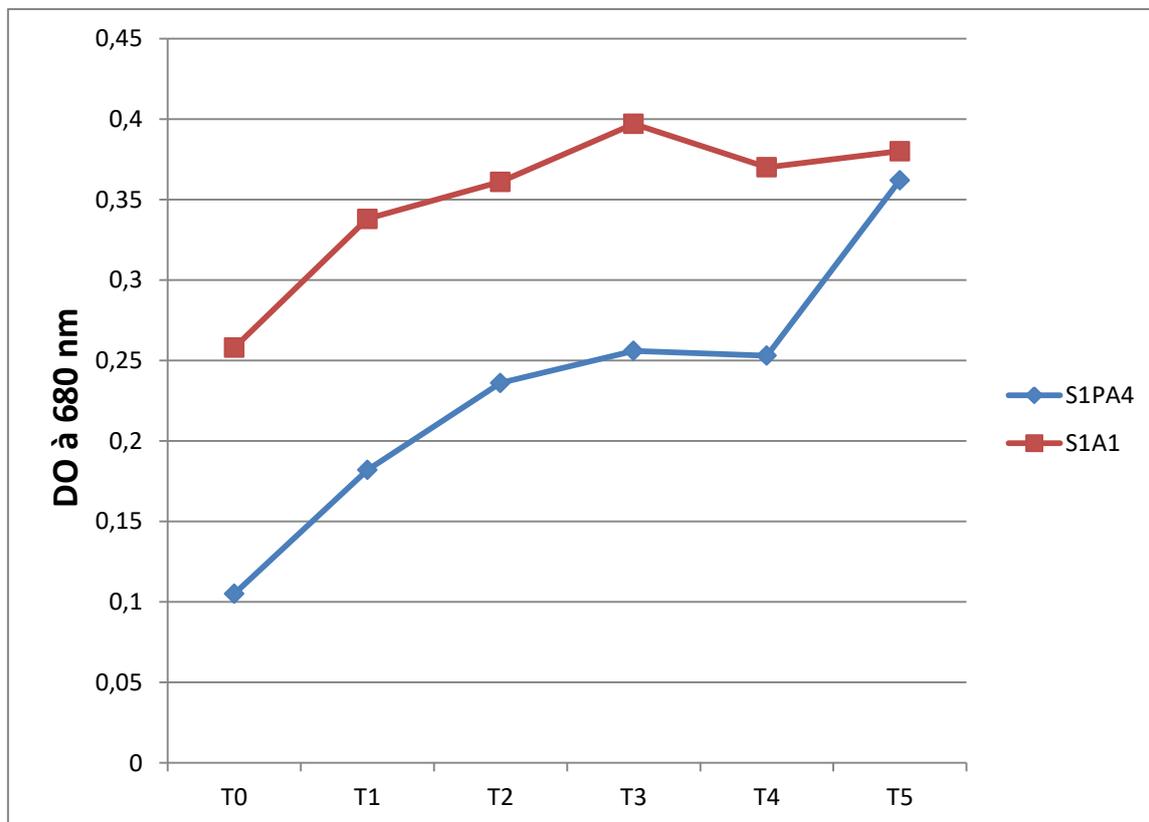
#### Isolat S1A1 :

À T0, la valeur DO pour S1A1 était de 0,258nm, montrant une augmentation progressive à 0,38nm à T5.



**Figure 17:** Test de l'activité des souches, S1A1, S1PA4, par la méthode de diffusion sur gélose

D'après les résultats des tests de sélection des souches étudiées sur milieu solide et liquide, il ressort que la souche qui produit la protéase la plus efficace est la souche S1PA4.



**Figure 18:** Cinétique de croissance des 2 isolats sélectionnés d'activité protéolytique.

Tableau 8: Activité protéase sur milieu minimum MSH solide et liquide

<b>Origine de l'isolat (source S)</b>	<b>S1</b>	<b>S1</b>
<b>Isolat</b>	<b>A1</b>	<b>PA4</b>
<b>L'activité sur Milieu liquide</b>	–	+
<b>L'activité sur Milieu solide</b>	–	+

### 3.3. Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique

La modification de couleur du milieu de culture MSH minimum en présence du lait écrémé Progressivement du blanc à l'orange pendant les jours d'incubation, démontre la croissance de la souche S1PA4 et ceci Comparativement au témoin non inoculé (**Figure19**).

Par conséquent, il semble que le lait écrémé a induit la synthèse des protéases qui ont permis la dégradation de la caséine et donc, la croissance de la souche S1PA4 en utilisant la caséine comme seule source de carbone et d'azote.



**Figure 19:** la croissance de souche S1PA4 dans milieu de culture MSH après l'incubation

### 3.4. Cinétique de croissance et de production de l'activité amylolytique:

La même méthode a été utilisée pour suivre la cinétique de l'activité de dégradation de l'amidon des deux isolats. Variations de densité optique (DO) des isolats S1A1 et S1PA4 dans le milieu MSH minime + l'amidon pendant 7 jours : la densité optique (DO) est une mesure précieuse utilisée pour surveiller la croissance microbienne dans les cultures liquides. Cette étude s'est concentrée sur l'examen des valeurs de DO des isolats S1A1 et S1PA4 dans le milieu MSH minime + l'amidon sur une période de 7 jours. Les résultats obtenus (**Figure20**) sent les suivants:

➤ Isoler S1PA4 :

La valeur de DO de S1PA4 était de 0,022 à T0 et a progressivement augmenté jusqu'à 0,038 à T5. Une croissance notable s'est produite entre T0 et T3, la valeur de la DO passant de 0,022 à 0,076. Cependant, l'activité de l'amylase sur les milieux liquide a entraîné un diamètre de dégradation de l'amidon est de 1,5 mm, et dégradation de l'amidon est de 3,7 mm à la (T5) 0,038 de DO.

Cependant, il y avait une diminution de la DO à T4 et T5, suggérant une possible altération de la croissance ou une altération de l'activité métabolique.

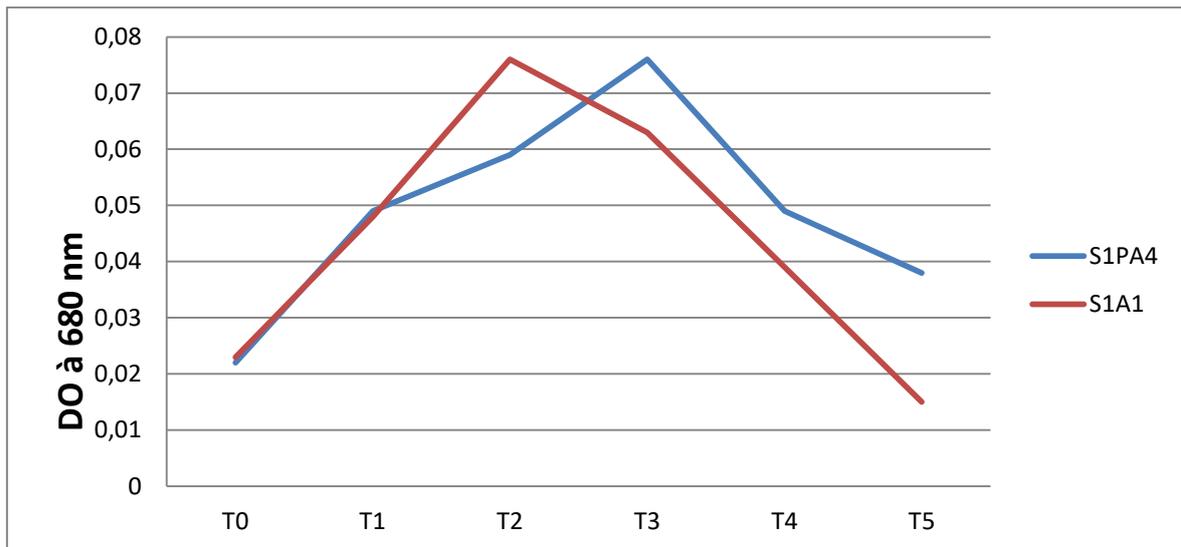
➤ Isoler S1A1 :

À T0, la valeur DO de S1A1 est de 0,023, augmentant légèrement à 0,015 à T5. Contrairement à S1PA4, l'isolat S1A1 présentait un schéma de croissance moins constant, avec des fluctuations des valeurs de DO sur une période de 7 jours. Le taux de croissance de S1A1 s'est avéré relativement stable, mais la valeur de la DO a augmenté de manière insignifiante au fil du temps, tandis que son activité amylique sur des milieux liquides montre des diamètres de 1,3 et 3,4 mm à T3 et T5, respectivement.

En comparant la dynamique de croissance des isolats S1PA4 et S1A1 dans le milieu MSH+ l'amidon, il est clair que les deux isolats ont une croissance limitée ou même une diminution des valeurs de DO sur une période de 7 jours. S1PA4 a montré une croissance plus significative aux stades précoces (T0 à T3) que S1A1, mais les deux isolats ont montré une croissance ou une survie réduite aux stades ultérieurs (T4 et T5).

La croissance restreinte ou la diminution des valeurs de DO observées pour les deux isolats suggèrent que le milieu MSH +l'amidon n'est peut-être pas le milieu de croissance optimal pour ces isolats particuliers.

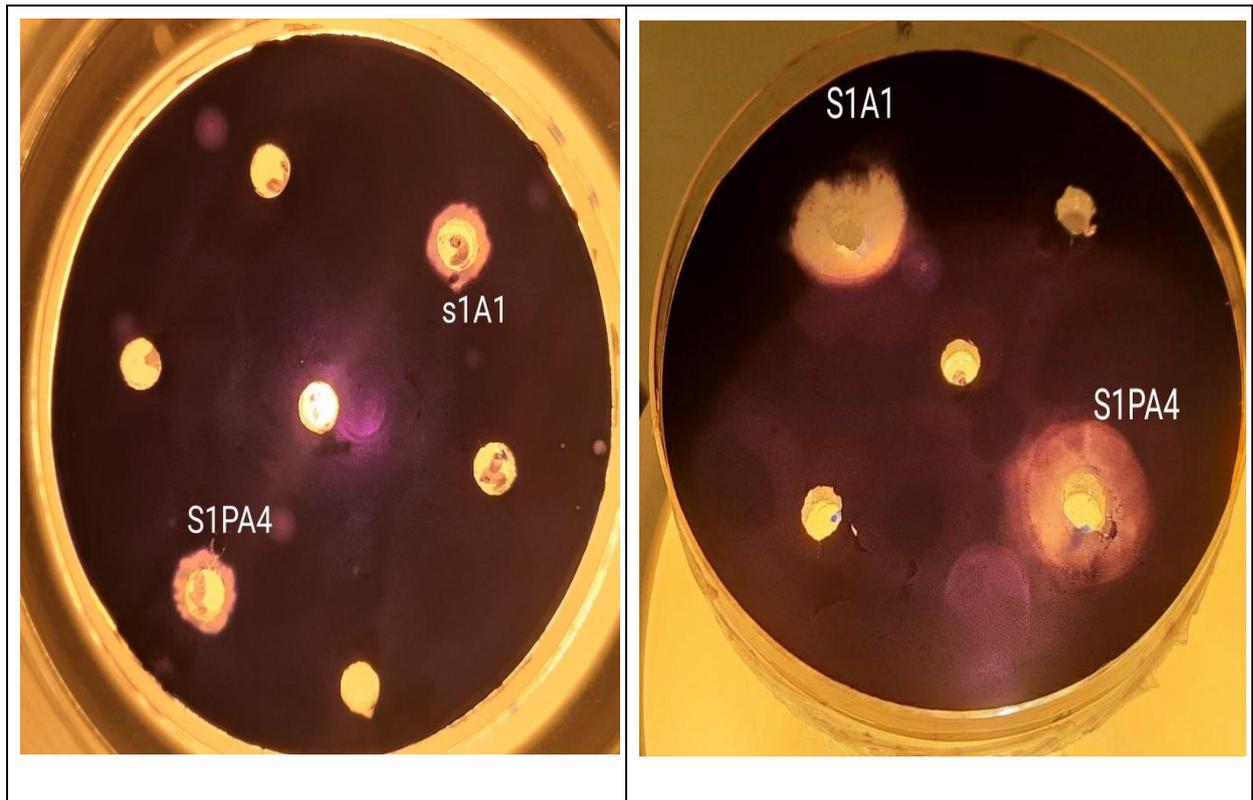
- ❖ Enfin, et selon les résultats du criblage des activités amylases et protéase a été réalisé sur deux isolats, il semble que les isolats S1PA4 se distinguent des isolats S1A1 par la présence de deux activités dans simultanément.



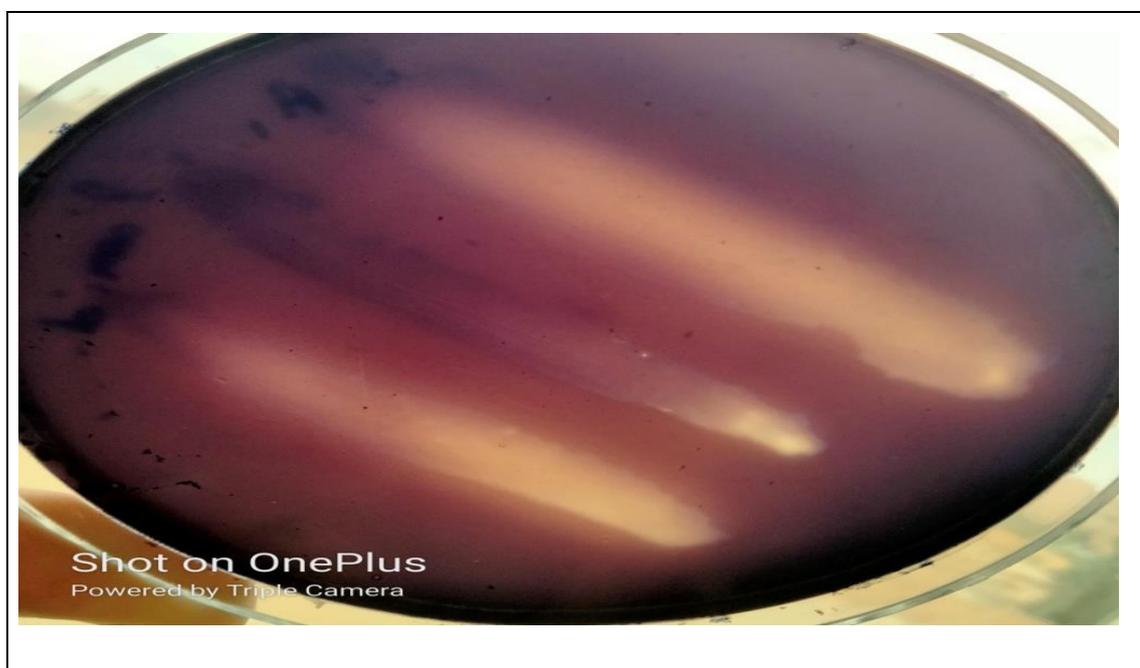
**Figure 20:** Cinétique de croissance des 2 isolats sélectionnés d'activité amylolytique

**Tableau 9::** Activité amylase sur milieu minimum MSH solide et liquide

Origine de l'isolat (source S)	S1	S1
Isolat	A1	PA4
L'activité sur Milieu liquide	+	+
L'activité sur Milieu solide	+	+



**Figure 21:** Production de l'activité amylase sur MSH liquide



**Figure 22:** Production de l'activité amylase sur culture solide

### 3.5. Cinétique de croissance:

L'analyse des données DO a révélé des schémas de croissance distincts des deux isolats dans un milieu (MSH) au cours des 8 jours de test. La représentation graphique des données (**Figure N°23**) fournit les informations suivantes :

❖ Isoler S1PA4 :

La valeur de la DO pour S1PA4 est de 0,024 à T0 augmentant avec le temps jusqu'à 0,55 à J8. Une augmentation notable a été observée entre T0 et J3, la valeur de la DO passant de 0,024 à 0,274. S1PA4 a continué de croître à un rythme relativement régulier, atteignant une valeur de DO de 0,55 à la fin de la période de 8 jours.

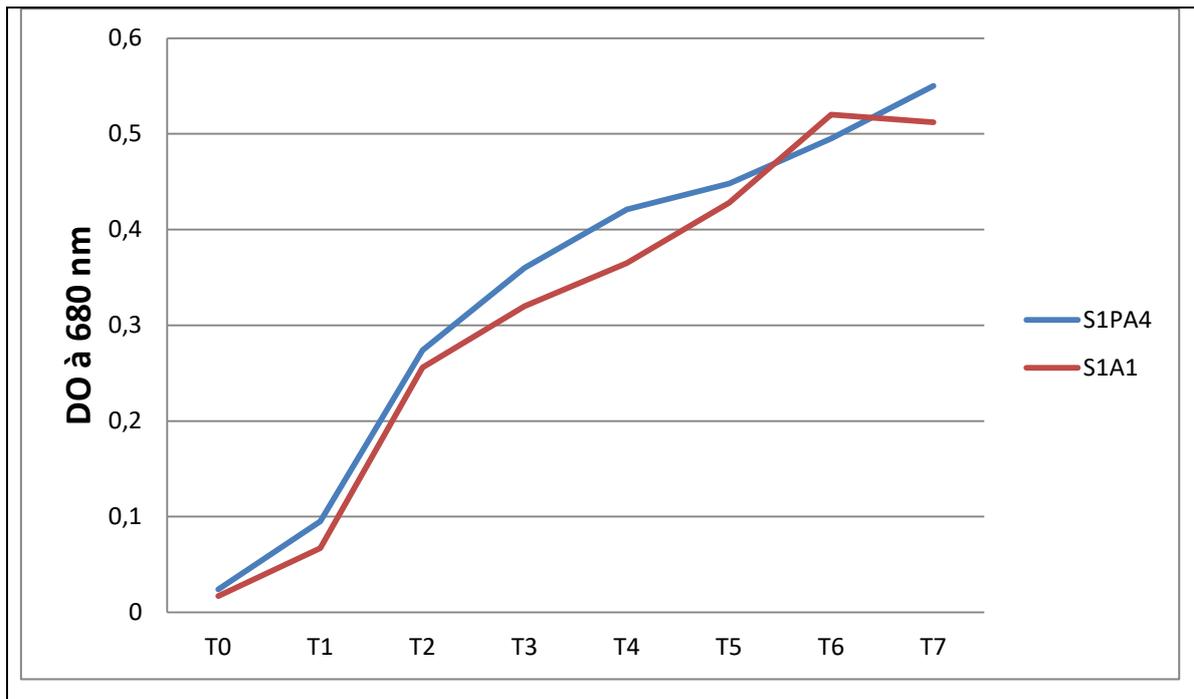
S1PA4 a affiché une croissance rapide et constante dans le milieu MSH complet, indiquant une meilleure disponibilité des nutriments.

❖ Isoler S1A1 :

À T0, la valeur DO pour S1A1 est de 0,017, augmentant progressivement jusqu'à 0,512 à J8. S1A1 affiche la même tendance de croissance que S1PA4, avec une croissance significative entre T0 et J3 (0,017 à 0,256). Le taux de croissance de S1A1 semblait ralentir après T3 mais atteignait toujours une valeur de DO de 0,512 à J8.

S1A1 a présenté une croissance soutenue dans le milieu MSH complet, similaire à S1PA4.

- ❖ Notre étude fournit des informations précieuses sur la dynamique de croissance des souches S1PA4 et S1A1 dans les milieux complets MSH à l'aide de mesures de densité optique. Les différences dans les schémas de croissance entre les isolats et l'influence de la composition du milieu sur la croissance soulignent l'importance de sélectionner des conditions de croissance appropriées pour différentes souches microbiennes.



**Figure 23 :** Cinétique de croissance pour les souches S1A1 ; S1PA4 étudiées.

# Conclusion



### **Conclusion**

Le travail entrepris consiste à mettre en évidence l'activité hydrolase (protéase et amylase) de souches halophiles isolées à partir d'un biotope extrême qui est Le Rocher de Sel (Hadjer El melh).

Le but de cette étude est de tester la protéase et l'amylase. À partir des deux souches S1A1 et S1PA4. Une culture des deux isolats sur MSH complet solide a permis une revivification de ces dernières. Les tests de croissance et de production des activités enzymatiques des deux souches S1A1 et S1PA4 ont donné une activité amylolytique, et protéolytique maximale de diamètre 3,4 et 3,7mm en 7 jours respectivement, pour l'activité amylolytique cependant l'activité protéolytique s'est avérée extrêmement faible pour les deux isolats.

En se basant sur les résultats préliminaires trouvés, il serait intéressant d'approfondir l'étude de ces activités pour une éventuelle exploitation de ces enzymes en bioindustrie.

**Références**

**bibliographiques**

## Références bibliographies

**Bcc, A.B., Staff, P.**, 2021. for Enzymes in Industrial 0–11.

**Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., Ahmane, Z.**, 2019. Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *J. King Saud Univ. - Sci.* 31, 706–712. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2018.03.008>

**BEN KHECHIBA, Z ., HOMIDA, S ., TOUATI ., Z.** (2022).Criblage d'activité hydrolases chez des bactéries halophiles. (Université Ziane Achour/Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie)

**Besse, A., Naturelle, D.H., Besse, A.**, 2017. Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d ' archées halophiles To cite this version : HAL Id : tel-01592394 Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d ' archées halop.

**Bhatt, H.B., Singh, S.P.**, 2020. Cloning, Expression, and Structural Elucidation of a Biotechnologically Potential Alkaline Serine Protease From a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. *Front. Microbiol.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00941>

**Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D.A., Baratti, J.C.**, 2006. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *J. Mol. Catal. B-enzymatic* 41, 21–26. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2006.03.010>

**Boutaiba, S., Hacene, H., Bidle, K.A., Maupin-Furlow, J.A.**, 2011. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J. Arid Environ.* 75, 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.04.010>

**Brown, A.D.**, 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40, 803–846. <https://doi.org/10.1128/BR.40.4.803-846.1976>

**Caton, T.M., Witte, L.R., Ngyuen, H.D., Buchheim, J.A., Buchheim, M.A., Schneegurt, M.A.**, 2004. Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microb. Ecol.* 48, 449–462. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0211-7>

**Costenaro, L.**, 2004. Interactions faibles protéine – protéine en solution : La malate déshydrogénase halophile To cite this version : HAL Id : tel-00007698 Interactions faibles protéine – protéine en solution : La malate déshydrogénase halophile.

**Csonka, L.N.**, 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 121–147. <https://doi.org/10.1128/MR.53.1.121-147.1989>

**D'Alessandro, C.P., De Castro, R.E., Giménez, M.I., Paggi, R.A.**, 2007. Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 637–642. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02122.x>

**DasSarma, P., Coker, J.A., Huse, V., DasSarma, S.**, 2010. Halophiles, Industrial Applications. *Encycl. Ind. Biotechnol.* 1–43. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.EIB439>

- Dennis, P.P., Shimmin, L.C.**, 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 90–104.  
<https://doi.org/10.1128/mnbr.61.1.90-104.1997>
- Dumorné, K.**, 2018. Biotechnological and Industrial Applications of Enzymes Produced by Extremophilic Bacteria. A Mini Review 22.  
<https://doi.org/10.20944/preprints201801.0198.v1>
- Dumorné, K., Córdova, D.C., Astorga-Eló, M., Renganathan, P.**, 2017. Extrêmozymes: A potential source for industrial applications. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 649–659.  
<https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>
- Forterre, P.**, 2015. The universal tree of life: an update. *Front. Microbiol.* 6.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00717>
- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., Usami, R.**, 2005. Organic solvent tolerance of halophilic alpha-amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extrêmophiles* 9, 85–89. <https://doi.org/10.1007/S00792-004-0423-2>
- Gaffney, E.M., Simoska, O., Minter, S.D.**, 2021. The Use of Electroactive Halophilic Bacteria for Improvements and Advancements in Environmental High Saline Biosensing. *Biosensors* 11. <https://doi.org/10.3390/BIOS11020048>
- Galinski, E.A.**, 1995. Osmoadaptation in Bacteria, *Advances in Microbial Physiology*.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60148-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60148-4)
- Galinski, E.A., Trüper, H.G.**, 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 95–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x>
- 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 (Basel)*. 10. <https://doi.org/10.3390/biology10040337>
- Gupta, S., Sharma, P., Dev, K., Sourirajan, A.**, 2016. Halophilic Bacteria of Lunsu Produce an Array of Industrially Important Enzymes with Salt Tolerant Activity. *Biochem. Res. Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9237418>
- HACENE H., FATIMA R., NAILA C., BOUTAIBA S., TEJ B., BARATTI J.C., OLLIVIER B.**, 2004. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara. *J. And. Environ.*, 58: 273-284.
- Haque, R.U., Paradisi, F., Allers, T.**, 2020. *Haloferax volcanii* for biotechnology applications: challenges, current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10314-2>
- Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M., Bejar, S.**, 2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie* 90, 1291–1305.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2008.03.004>
- Jorquera, M.A., Graether, S.P., Maruyama, F.**, 2019. Editorial: Bioprospecting and biotechnology of extremophiles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00204>

- Kempf, B., Bremer, E.,** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170, 319–330.  
<https://doi.org/10.1007/s002030050649>
- 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. *Genome Res.* 11, 1641–1650.  
<https://doi.org/10.1101/GR.190201>
- Koch, A.L.,** 1982. On the growth and form of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2527–2539. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-11-2527>
- Kumar, L., Awasthi, G., Singh, B.,** 2011. Llevation of Salt Stress By Halotolerant and.Pdf.
- Kunte, H.J., Trüper, H.G., Stan-Lotter, H.,** 2002. Halophilic Microorganisms. *Astrobiology* 185–200. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59381-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59381-9_13)
- Lanyi, J.K.,** 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38, 272–290. <https://doi.org/10.1128/BR.38.3.272-290.1974>
- Laybourn-Parry, J., Quayle, W., Henshaw, T.,** 2002. The biology and evolution of Antarctic saline lakes in relation to salinity and trophic. *Polar Biol.* 25, 542–552.  
<https://doi.org/10.1007/s00300-002-0383-x>
- Le Borgne, S., Paniagua, D., Vazquez-Duhalt, R.,** 2008. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 74–92.  
<https://doi.org/10.1159/000121323>
- Lefebvre, O., Moletta, R.,** 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Res.* 40, 3671–3682.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.027>
- Litchfield, C., Gillevet, P.,** 2002. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 48–55.  
<https://doi.org/10.1038/SJ/JIM/7000175>
- Litchfield, C.D.,** 1998. Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteorit. Planet. Sci.* 33, 813–819.  
<https://doi.org/10.1111/J.1945-5100.1998.TB01688.X>
- Lucht, J.M., Bremer, E.,** 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolality environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 3–20. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.1994.TB00067.X>
- Madern, D., Pfister, C., Zaccai, G.,** 1995. Mutation at a Single Acidic Amino Acid Enhances the Halophilic Behaviour of Malate Dehydrogenase from *Haloarcula Marismortui* in Physiological Salts. *Eur. J. Biochem.* 230, 1088–1095.  
<https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1995.1088G.X>
- Mari, R.,** 2011. Halophiles and Hypersaline Environments. *Halophiles Hypersaline Environ.*  
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-20198-1>
- Marty, V., De, A., E, D.D.E.L.U.,** 2016. Adaptation de l ' Archaea halophile halobacterium salinarum aux stress environnementaux : mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire To cite this version : HAL Id : tel-01328136 Adaptation de l ' Archaea

halophile Ha-lobacterium salina.

- Menasria, T., Aguilera, M., Hocine, H., Benammar, L., Ayachi, A., Si Bachir, A., Dekak, A., Monteoliva-Sánchez, M.,** 2018. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiol. Res.* 207, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.011>
- Menasria, T., Sp, S.B., Appliqu, M.,** 2020. Doctorat en Sciences Filière : Sciences Biologiques Spécialité : Microbiologie Appliquée Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien Devant le jury composé de : 2019–2020.
- Norberg, P., von Hofsten, B.,** 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 55, 251–256. <https://doi.org/10.1099/00221287-55-2-251>
- Oren, A.,** 2013. Life at high salt concentrations. *Prokaryotes Prokaryotic Communities Ecophysiol.* 9783642301230, 421–440. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0\\_57/COVER](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_57/COVER)
- Oren, A.,** 2010a. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* 31, 825–834. <https://doi.org/10.1080/09593330903370026>
- Oren, A.,** 2008. Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Oren, A.,** 2002a. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56–63. <https://doi.org/10.1038/SJ/JIM/7000176>
- Oren, A.,** 2001. *Hydrobiologia*, Volume 466, Numbers 1-3 - SpringerLink. *Hydrobiologia* 466, 61–72.
- Oren, A.,** 1993. Availability, uptake and turnover of glycerol in hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12, 15–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1993.tb00012.x>
- Por, F.D.,** 1980. A Classification of Hypersaline Waters, Based on Trophic Criteria. *Mar. Ecol.* 1, 121–131. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1980.tb00214.x>
- Post, F.J.,** 1981. 6. Microbiology of the Great Salt Lake north arm. *Hydrobiologia* 81–82, 59–69. <https://doi.org/10.1007/BF00048706>
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., Fava, F.,** 2015. Biotechnological applications of extrémophiles, extrémozymes and extremolytes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7907–7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>
- Raval, V.H., Bhatt, H.B., Singh, S.P.,** 2018. Adaptation Strategies in Halophilic Bacteria. *Extrémophiles* 137–164. <https://doi.org/10.1201/9781315154695-7>
- Raval, V.H., Pillai, S., Rawal, C.M., Singh, S.P.,** 2014. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochem.* 49, 955–962. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.03.014>
- Roberts, M.F.,** 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1, 1–30. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>

- Romanescu, G., Stoleriu, C.C., Enea, A.,** 2013. Limnology of the Red Lake, Romania : an interdisciplinary study.
- Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L.,** 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Roussel, E.G., Bonavita, M.C., Querellou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D., Parkes, R.J.,** 2008. Extending the Sub – Sea-Floor Biosphere 16.
- Samraoui, B., Samraoui, F.,** 2008. An ornithological survey of Algerian wetlands: Important Bird Areas, Ramsar sites and threatened species. *Wildfowl* 58, 71–96.
- Setati, M.E.,** 2010. Diversity and industrial potential of hydrolaseproducing halophilic/halotolerant eubacteria. *African J. Biotechnol.* 9, 1555–1560. <https://doi.org/10.5897/ajb10.051>
- Sinha, R., Khare, S.K.,** 2013. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresour. Technol.* 145, 357–361. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.11.024>
- Sleator, R.D., Hill, C.,** 2001. Instrumentistes et luthiers parisiens : XVII-XIXe siècles. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 49–71.
- Talon, R., Coquelle, N., Madern, D., Girard, E.,** 2014. An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00066/PDF>
- Ventosa, A., de la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C., Papke, R.T.,** 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: A metagenomic approach. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.002>
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L.,** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.12.4576>

## Annexes

## Annexes 01

## Matériel utilisé:

01	Agitateur-plaque chauffante
02	Agitateur
03	Autoclave 120°C
04	BecBunsen
05	Balances analytique
06	Balance dépaillasse
07	Bain marie
08	Portoirs de tubes
09	Centrifugeuse
10	Chauffeballon
11	Etuve
12	Incubateur à 40°C
13	Spectrophotomètre-Visible
14	Réfrigérateur
15	Hôtémicrobiologique
16	Pied à coulisse
17	Vortex
18	Loupe
19	Eprouvettegraduée
20	Flacons
21	Barreauxmagnétiques
22	Cuvette
23	Micropipette
24	Pipette pasteurs

<b>25</b>	<b>Seringues</b>
<b>26</b>	<b>Spatules</b>
<b>27</b>	<b>Tubes Eppendrof</b>
<b>28</b>	<b>Erlenmeyers</b>
<b>29</b>	<b>Papier aluminium</b>
<b>30</b>	<b>Para film</b>
<b>31</b>	<b>Porte filtre Swinnex</b>

**Produits chimiques:**

<b>01</b>	<b>Chlorure de sodium</b>	<b>NaCl</b>
<b>02</b>	<b>Chlorure de magnesium</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>
<b>03</b>	<b>Sulfate de magnesium</b>	<b>Mg SO<sub>4</sub></b>
<b>04</b>	<b>Chlorure de potassium</b>	<b>KCl</b>
<b>05</b>	<b>Chlorure de calcium</b>	<b>CaCl<sub>2</sub></b>
<b>06</b>	<b>Bromure de sodium</b>	<b>NaBr</b>
<b>07</b>	<b>Bicarbonate de sodium</b>	<b>(NaHCO<sub>3</sub></b>
<b>08</b>	<b>Extrait de levure</b>	<b>-----</b>
<b>09</b>	<b>Agar</b>	<b>-----</b>

**Annexes 02**

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

<b>Souches</b>	<b>S1PA4</b>	<b>S1A1</b>
<b>Temps</b>		
<b>T0</b>	0,105	0,258
<b>T1</b>	0,182	0,338
<b>T2</b>	0,236	0,361
<b>T3</b>	0,256	0,397
<b>T4</b>	0,253	0,37
<b>T5</b>	0,362	0,38

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

Souches	S1PA4	S1A1
Temps		
T0	0,022	0,023
T1	0,049	0,048
T2	0,059	0,076
T3	0,076	0,063
T4	0,049	0,039
T5	0,038	0,015

**Tableau N°03:** Les valeurs de la DO mesurée à 680 nm des deux souches bactériennes sur milieu MSH complet liquide.

Souches	S1PA4	S1A1
Temps		
T0	0,024	0,017
T1	0,095	0,067
T2	0,274	0,256
T3	0,36	0,32
T4	0,421	0,365
T5	0,448	0,428
T6	0,495	0,52
T7	0,55	0,512

## ملخص

تعيش الكائنات الحية المحبة للملوحة في بيئات ذات تركيز عالي من كلوريد الصوديوم. وتعتبر ذات أهمية في مجال التكنولوجيا الحيوية بسبب انتاجها لمواد اىضية مثل الانزيمات المحبة للملوحة. ويتم فحص الكائنات الدقيقة التي تنمو في ظل الظروف القاسية كمصدر مهم للإنزيمات المستقرة والمميزة. تستند دراستنا الى فحص نشاط البروتياز والاميلاز في البكتيريا المحبة للملوحة المعزولة من حجر الملح في ولاية الجلفة. تم استخدام وسط زراعي خاص بالكائنات المحبة للملوحة لعزل وتنقية العزلات, التي تحصل عليها زملائي العام الماضي. ووفقا للنتائج التي تم الحصول عليها, (لم يتم اختبار جميع السلالات) لإنتاج البروتياز والاميلاز, فتحصلنا على سلالة تنتج البروتياز وسلالة تنتج الاميلاز والبروتياز

**كلمات مفتاحية :** محبة للملوحة، انزيمات ملحية، انتاج، العتائق.

## Résumé

Les archées halophiles sont des micro-organismes qui vivent dans les environnements. à concentration élevée de chlorure de sodium. Ils présentent un intérêt biotechnologique du fait de leur production de Métabolites tels que les haloenzymes. Les micro-organismes qui croissent dans des conditions extrêmes sont examinés. En tant qu'importante source d'enzymes stables et précieuses. Ces dernières appelées parfois « Extrêmozymes » Notre étude basée sur un criblage d'activités protéolytique et amylolytique chez des bactéries halophiles isolées à partir du rocher de sel de la wilaya de Djelfa. Un milieu de culture spécifique aux halophiles a été utilisé pour la purification des isolats, deux souches obtenu par mes collègues l'année passée. Selon les résultats obtenus, pas la totalité des souches testées pour la production de protéase et d'amylase, il existe une souche produisant la protéase et une souche produisant les deux activités amylase et protéase.

**Mots clés:** halophiles, halo enzymes, production, Archaea, extrêmozymes.

## Abstract

Halophilic archaea are micro-organisms that live in environments. High concentration of sodium chloride. These are microorganisms of biotechnological interest because of their production. Metabolites such as haloenzymes. Micro-organisms that grow under extreme conditions are examined as an important source of stable and valuable enzymes. The latter sometimes called « Extrêmozymes » Our study based on a screening of proteolytic and amylolytic activities in halophilic bacteria isolated from the salt rock of the wilaya of Djelfa. A halophile-specific culture medium was used for isolation and purification of isolates, two strains. Obtained by my colleagues last year. According to the results obtained, not all strains tested for the production of protease and amylase, there is a strain producing protease and a strain producing amylase and protease.

**Keywords:** halophiles, halo enzymes, production, Archaea, extrêmozymes.