

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieure Et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Science biologique
Spécialité : Biotechnologie microbienne



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

MASTER

*La caractérisation phénotypique,
physiologique et métabolique
de quelques souches
d'haloarchées*

Présenté par :
AGAOUA SABIHA & HAMZI DIHIA

Soutenu le : 18 Juin 2016

Devant le Jury composé de :

M^{me} : BOUCHERBA N.

M.C.A.

Présidente

M^{me} : IDRES N.

M.A.A.

Encadreur

M : BENDJEDOU K.

M.C.A

Examineur

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Nous remercions avant tout Allah de nous avoir accordé la force et le courage de réaliser ce modeste travail.

Il nous est très agréable de réserver cette page comme un témoin de reconnaissance à toutes les personnes qui nous ont soutenus et encadrée pour réaliser ce travail

*En premier nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et une reconnaissance toute particulière à notre promotrice **M^{me} IDRES** qui nous a prêté de son temps le plus précieux et qui a toujours rependu présente à nous solitudes, nous a enrichi par sa vision critique des choses, son savoir faire et son savoir être.*

*On remercie **M^{me} BOUCHERBA N.** responsable de master biotechnologie microbienne et docteur à l'université de Bejaia et **M. BENDJEDOU K.** docteur à l'université de Bejaia pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'examiner ce travail et de participer au jury.*

Nous voulons remercier également l'ingénieure Menisse Badria, souhila doctorante à l'université de Bejaia et tout le personnel de laboratoire génie biologie pour leur accueil, leur collaboration et leur sympathie.

Merci également à tout nos amis et nos collègues qui ont été d'un soutien moral tout au long de ce travail.

Que tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin, trouvent ici l'expression de notre gratitude.

MERCI A VOUS

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique.....	2
I.1-La découverte des Archaea.....	2
I.2- Taxonomie et diversité des halophiles.....	2
I.2.1- Taxonomie.....	2
I.2.2- La biodiversité des archaea.....	3
I.3-Comparaison entre les trois domaines.....	4
I.4- Adaptation aux milieux hypersalins.....	5
I.5-Les haloarchaea.....	5
I.5.1- Ecologie des microorganismes halophiles extrêmes.....	6
I.5.2- Application.....	7
I.5.3-Caractères généraux.....	7
I.5.3.1-La morphologie des haloarchaea.....	7
I.5.3.2-Le type trophique des haloarchaea.....	7
I.5.3.3-La physiologie des haloarchaea.....	8
I.5.3.4 Métabolisme des haloarchées.....	9
I.5.3.5- La pigmentation.....	9
I.5.3.6-La production d'halocines.....	9
Chapitre II - Matériels et méthodes.....	11
II.1-Matériel.....	11
II.1.1-matériel biologique.....	11
II.1.2-Appareillages et réactifs.....	12
II.1.3-les milieux de cultures.....	12
II.2-Méthodes.....	12
II.2.1-Réactivation des souches.....	12
II.2.2-Culture liquide.....	12
◆ Préparation de la pré-culture.....	12
◆ Culture en milieu liquide.....	12
◆ Culture en milieu solide.....	12
II.2.3-Caractérisation des souches d'haloarchaea.....	13
II.2.3.1-Caractérisation morphologique.....	13
II.2.3.2-Caractérisation physiologique des souches.....	13

Sommaire

a.La croissance à différents pH	13
b.La croissance à différentes concentration de NaCl.....	13
c.la croissance à différentes concentration de MgSO4	13
II.2.3.3-Sensibilité des souches d'haloarchées à certains antibiotiques	14
II.2.4-Utilisation de certains carbohydrates comme seule source de carbone par les souches d'Haloarchaea.....	14
II.2.5-détermination de l'activité enzymatique	14
a-détermination de l'activité protéolytique	14
b-détermination de l'activité lipolytique.....	14
c-détermination de l'activité amylolytique	14
II.2.6-Caractéristiques biochimiques	15
a.réduction de nitrate et production de gaz....	15
b.la production d'indole	15
c.mannitol mobilité	15
II.2.6-Recherche de l'activité antibiotique.....	15
Chapitre III. Résultats et discussion	16
III.1-Caractéristiques morphologique des souches d'haloarchaea.....	16
III.2-Caractérisation physiologique des souches.....	19
III.2.1-Croissances des souches d'haloarchées à différents pH.....	19
III.2.2-Croissance à différentes concentrations de Na Cl	21
III.2.3-Croissance à différentes concentrations de MgSO4.....	25
III.3-Sensibilité des souches d'haloarchées à certains antibiotiques.....	27
III.4- la croissance sur certains carbohydrates comme seule source de carbone par les souches d'Haloarchaea.....	28
III.5- détermination de l'activité enzymatique	30
III.6-Caractéristiques biochimiques	31
III.6.1- la réduction de nitrate et production de gaz.....	31
III.6.2- la production d'indole.....	32
III.6.3- Mannitol mobilité	32
III.7-Recherche de l'activité antibiotique	34
III.8-Affiliation des souches à quelques souches de référence	36
Conclusion	39
References bibliographiques	
Annexes	

Sommaire

La liste des abréviations

ADNr: Acide désoxyribonucléotidique ribosomal

ARN: Acide ribonucléotidique

ARNr 16S: Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

KCl: Chlorure de potassium

M: Molarité

NaCl: Chlorure de sodium

NaOH: Hydroxyle de sodium

DO: Densité Optique

M : Molaire

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MC : Milieu complexe

Br : Brown

KCl : Chlorure de potassium

K₂HPO₄ : Potassium dihydrogénophosphate

NaCl : Chlorure de sodium

PH : Potentiel hydrogène

rpm : Rotation par minute

NR: Nitrate réductase

ATB : Antibiotique

AMO: Amoxiciline

TICA: Ticarciline

CIFOX: Cifoxitin

PEPi : Pepiraciline

VANC: Vancomycin

CIFOT: Ciftazidine

ERYT: Erytromycyn

AMIC: Amicacine

La liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	classification des microorganismes selon leurs réponses au sel	03
II	Les différences et les similitudes entre les trois domaines : Archaea, Bactéria, Eucarya, basées sur les caractères moléculaires, structurels, et physiologiques.	04
III	les souches d'Archaea utilisées	11
IV	résultats de l'étude morphologique	17
V	Densité optique des cultures à différents pH	19
VI	Croissance des souches d'haloarchées à différentes concentration de Na Cl	22
VII	croissance des souches à différentes concentration de MgSO ₄	25
VIII	la sensibilité des souches h'haloarchées aux ATB	27
IX	Résultats de la croissance sur certains carbohydrates	28
X	les résultats de tests d'activité enzymatique	30
XI	Résultats de la réduction de nitrate	31
XII	résultats de production d'indole	32
XIII	Détermination de la dégradation du mannitol et la mobilité des souches d'haloarchées.	32
XIV	la production d'ATB dans différentes cultures	34
XV	Affiliation des souches étudiées à quelques souches de référence.	36

La liste des tableaux

La liste des figures

figure	Titre	page
01	Arbre du vivant et la distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre.	02
02	Environnements hypersalins: la Mer Morte (A), étang d'évaporation ensoleillé (Atlit, Israël) (B), étang de cristallisation ensoleillé (Eilat, Israël) coloré rouge par communautés denses d'Archaea et cellules Dunaliella (C)	06
03	la pigmentation des haloarchées vue de bassin de cristallisation d'Israël	09
04	Aspect de quelques colonies d'haloarchaea sur le milieu MC	18
05	Coloration de Gram des souches S1, S2, et S16 vue au microscopique optique (100X10).	18
06	L'absorbance des souches isolées d'Ouargla	19
07	L'absorbance des souches isolées d'Ichekaben	20
08	L'absorbance des souches isolées de Batna	20
09	L'absorbance des souches isolées d'Oran	21
10	Croissance de la souche S5 à différents pH	21
11	Optimum de croissance des souches d'haloarchées en fonction de la concentration de NaCl	24
12	Croissance de la souche S12 sur MgSO4	27
13	Croissance des souches d'haloarchées sur différentes sources de carbone	28
14	Utilisation de certains carbohydrates par la souche S8	29
15	Caractérisation des enzymes produites par des souches d'haloarchées	30
16	Fermentation de mannitol par quelques souches d'haloarchaea.	33
17	Production d'antibiotiques par quelques souches d'aloarchaea	35

Chapitre I
Revue bibliographique

I.1-La découverte des Archaea

A de très rares exceptions, l'idée que les microorganismes ont dominé l'histoire de la vie sur terre depuis son apparition est largement acceptée. En effet, sur la base de traces indirectes d'activité biologique et de microfossile présumé, il est admis que les premières communautés microbiennes qui ont pu apparaître sont des archaea, plus précédemment au cours d'une période située entre 3,4 et 2,5 milliards d'années, les micro-organismes apparaissant dans le registre fossile beaucoup plus tard (à partir de 1,2 milliards d'années) (**Gribaldo, 2008**).

Les Archaea sont phylogénétiquement un groupe rationnel de procaryotes qui a une organisation différente des bactéries (**Ventosa, 2015**). La mise en évidence en tant que groupe monophylitique par Woese en 1977 est basée sur l'analyse de la petite sous unité ribosomale des séquences d'ADNr (**Ventosa, 2015**).

I.2- Taxonomie et diversité des halophiles

I.2.1- Taxonomie

Le monde de micro-organismes halophiles est très divers. Les microorganismes adaptés à des concentrations de sel élevées se retrouvent dans les trois domaines de la vie (figure 01):

Archaea, Bacteria et Eucarya (**Yanhe et al., 2010**)

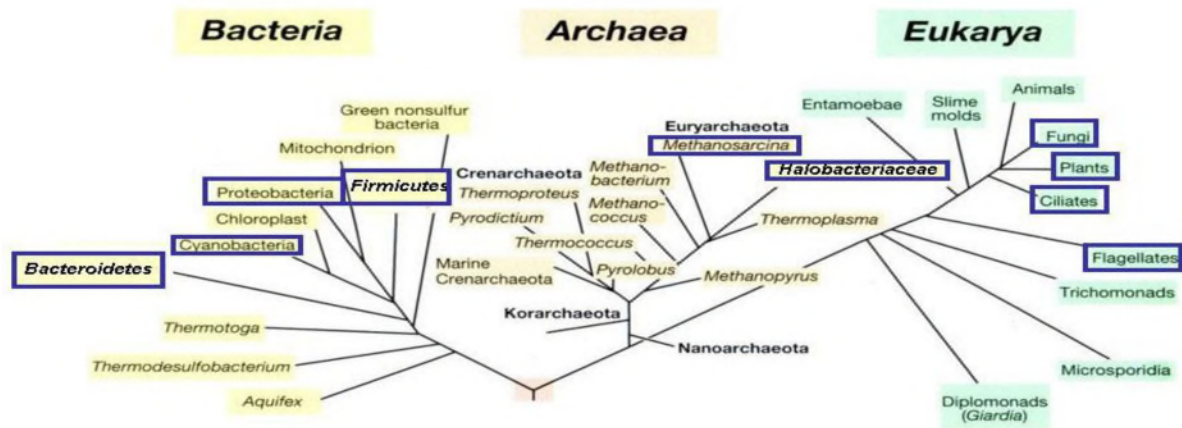


Figure 01: Arbre du vivant et la distribution de microorganismes halophiles (**Oren., 2008**).

Dans le domaine *Archaea*, la plupart des microorganismes halophiles appartiennent l'ordre *Halobacteriales*, qui contient une seule famille, *Halobacteriaceae*. L'Halophilisme est également répandu dans le domaine *Bacteria* : le phylum *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes*. Avec quelques exceptions notables, les microorganismes eucaryotes forment un groupe faiblement négligé tant par

l'étude de leur distribution dans des environnements hyper-salins que par leur adaptation physiologique. Les algues vertes unicellulaires du genre *Dunaliella* sont étudiées de façon détaillée. Etant donné qu'ils sont les principaux ou uniques « acteurs » dans beaucoup d'environnements hyper-salins, ils sont devenus un modèle pour l'étude de l'adaptation au sel en utilisant des solutés organiques compatibles. De plus, ces organismes ont des applications biotechnologiques (Oren, 2008).

Les microorganismes halophiles présentent une exigence pour des concentrations différentes du sel illustré dans le tableau I.

Tableau I : classification des microorganismes selon leurs réponses au sel (Oren, 2006)

catégorie	Propriétés	exemple
Non halophiles	Poussent bien dans les environnements qui contiennent moins de 0.2 M de sel	La plupart des bactéries d'eau douce
Légèrement halophiles	Poussent bien dans les environnements qui contiennent 0.2 -0.5 M de sel	La plupart des bactéries marines
Halophiles modérées	Poussent bien dans les environnements qui contiennent 0.5 – 2.5 M de sel	<i>Salinivibrio costicola</i>
Halophiles extrêmes limités	Poussent bien dans l'environnement qui contient 1.5– 4 M de sel	<i>Hahorhodospira halophila</i>
Halophiles extrêmes	Poussent bien dans l'environnement qui contient 2.5– 5.2 M de sel	<i>Halobacterium salinarum</i>
Halotolerants	qui peuvent tolérer du sel, la gamme au-dessus de 2.5M	<i>Staphylococcus aureus</i>

I.2.2- La biodiversité des archaea

Le domaine Archaea est composé de quatre phylums phylogénétiquement distincts : Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota et Nanoarchaeota (Bharti et Apexa, 2012). Récemment deux autres phylums ont été reconnus, Aigarchaeota (Nunoura et al., 2010) et Geoarchaeota (Kozubal et al., 2013).

I.3-Comparaison entre les trois domaines

Les archaea sont de point de vue morphologique sont très proche des bactéries cependant de point de vue moléculaire, structurels et physiologiques sont des organismes aussi différents des eubacteria que des eucarya (Tableau II).

Tableau II : Les différences et les similitudes entre les trois domaines : Archaea, Eubactéries, Eucaryotes, basées sur les caractères moléculaires, structurels, et physiologiques (Okafor, 2011).

caractéristiques	Archaea	Eubacteria	Eucarya
Biologie moléculaire			
Matériel génétique (ADN) chromosomique	ADN double brin circulaire fermé	ADN double brin circulaire fermé	Vrai noyau avec une multitude de chromosome linéaire
Structure des Gènes (introns)	Introns absents	Introns absents	Introns absents
Opérons	présent	Présent	absent
RNA polymérase	plusieurs (10-12 sous unités toutes homologues aux eucaryennes	une (4 sous unités)	Trois (12-14 sous unités)
Ribosomes	70s	70s	80s
Plasmides	commun	commun	rare
ARNt initiateur	Non sensible à la streptomycine, chloramphénicol	Sensible à la streptomycine, chloramphénicol	Non sensible à la streptomycine, chloramphénicol
caractères structurels			
Membrane cellulaire	Embranchés, liés par des liaisons Ether au Glycérol	chaîne linéaire liées par des liaisons Ester au Glycérol	chaîne linéaire liées par des liaisons Ester au Glycérol
Organelles internes	absent	absent	présent

I.4- Adaptation aux milieux hypersalins

Le cytoplasme des micro-organismes halophiles est iso-osmotique avec le milieu environnant et cela est une propriété de base des halophiles. Les membranes biologiques sont perméables à l'eau et sont énergie-dépendantes lorsqu'il s'agit de transporter l'eau vers la cellule pour compenser sa perte par osmose. De plus, les cellules qui ont besoin de garder une turgescence continue doivent maintenir leur pression osmotique intracellulaire plus haute que celle de leur environnement (**Oren, 2008**).

Il y a deux stratégies fondamentalement différentes utilisées par les microorganismes halophiles pour équilibrer la pression osmotique de leur cytoplasme avec le milieu extérieur :

La première implique l'accumulation des concentrations de chlorure de potassium (KCl). Cette stratégie exige l'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire aux concentrations du chlorure de potassium (KCl), de façon que les protéines puissent maintenir leur conformation et activité à des concentrations en sel proches de la saturation. Les protéines des organismes halophiles sont fortement acides et la plupart de ces protéines se dénaturent quand elles sont en solution à faible concentration en sels. Ce qui explique que ces microorganismes ne peuvent généralement pas se développer dans des milieux à faibles concentrations en sels (**Oren, 2008**).

La deuxième stratégie d'haloadaptation est basée sur la biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés organiques compatibles. Les cellules qui utilisent cette stratégie excluent le plus de sels possible de leur cytoplasme. Les concentrations élevées de solutés organiques compatibles n'interfère en aucun cas avec l'activité enzymatique. Peu d'adaptation des protéines cellulaires sont donc nécessaires pour cette stratégie. Le glycérol et d'autres polyalcools sont largement utilisés pour l'adaptation osmotique chez les eucaryotes, les algues et les moisissures halophiles, mais rarement chez les procaryotes halophiles. Dans le domaine des archées, il s'est trouvé quelques solutés compatibles non encore détectés chez les autres halophiles. Les halophiles méthanogènes comme l'espèce de *Methanohalophilus* contiennent, en plus de la glycine bêtaïne, les β -acides aminés (β -glutamine, β -glutamate et N-acetyl- β -lysine) et les dérivés qui sont rarement retrouvés dans d'autres groupes (**Oren, 2008**).

I.5-Les haloarchaea

Les archées halophiles Extrêmes sont un groupe diversifié d'Euryarchaeota qui peuple les environnements hyper salins (3-5 M) tels que les lacs salés, les marais salants et les marais salants marins. Ils sont souvent appelés «*bactéries halophiles*» du nom de l'organisme modèle *Halobacterium salinarum* (**Falb et al., 2008**).

Les archées halophiles cultivables sont regroupées dans la famille *Halobacteriaceae* qui renferme 47 genres et 165 espèces (Oren, 2014).

I.5.1- Ecologie des microorganismes halophiles extrêmes

La plus grande partie de la biosphère est saline. Les eaux des océans et des mers couvrant la plupart de la surface du monde contiennent autour de 35 g/L de sels dissous. Les concentrations de sel les plus élevées sont souvent rencontrées dans les environnements près de rivages tels que les marais salants, les sebkhas et les lagunes, où l'évaporation est rapide et l'échange de l'eau avec la mer ouverte est lent. Des écosystèmes à concentrations de NaCl saturantes et même au-delà, existent, tels que la Mer Morte se trouvant à la frontière entre l'Israël et la Jordanie (340 g/l sels dissous), le Grand Lac de Sel dans Utah (jusqu'à 333 g/l) en 1975. Des environnements à concentrations de sels croissantes sont rencontrés dans les étangs d'évaporation artificielle ou les bassins de cristallisation.

D'autres environnements hypersalins supplémentaires où on peut trouver les microorganismes halotolérants sont les denrées alimentaires salées tels que le poisson salé, les peaux d'animaux traitées avec le sel pour leur conservation, sols salins, et eaux salées souterraines (Oren, 2006).



Figures 02 : Environnements hypersalins: la Mer Morte (A), étang d'évaporation ensoleillé (Atlit, Israël) (B), étang de cristallisation ensoleillé (Eilat, Israël) coloré rouge par communautés d'Archaea et cellules *Dunaliella* (C).

I.5.2- Application

L'importance des halophiles a été enregistré depuis les temps anciens ; les halophiles ont été utilisés traditionnellement dans la production de certaines nourritures fermentées (sauce de soja, sauce de poisson), mais leur application dans l'industrie des produits alimentaires est récente. Les haloarchées ont également un très grand potentiel dans l'application biotechnologique. La bacteriorhodopsine ou la membrane pourpre produit par l'espèce *salinarum Halobacterium* est commercialement disponible (**Kanekar, 2011**). Les autres composés d'intérêt industriel produits par les haloarchées sont les enzymes hydrolytiques extracellulaires, les exopolysaccharides, polyhydroxyalkanoates (PHA) utilisés comme bioplastique et les halocines (**Ventosa, 2006**)

I.5.3-Caractères généraux

I.5.3.1-La morphologie des haloarchées

Les archées et les bactéries sont superficiellement semblables. En plus des bâtonnets (*Halobacterium* et autres) et la forme sphérique (*Halococcus*), il existe des espèces pléomorphes plates comme *Haloferax*, des formes parfaitement carrées ou rectangulaires telles que *Haloarcula japonica* apparaissent sous forme triangulaire ou rhomboïde (**Oren, 2002**).

I.5.3.2-Le type trophique des haloarchées

Tous les haloarchées sont aérobies strictes ou anaérobies facultative, et ont un temps de génération relativement long, 3-4 heures pour *Haloferax volcanii*; 8-12 heures pour *Halobacterium* spp. (MGM, 37°C). Ils sont des chimioorganotrophes et se développent sur des substrats complexes (peptone ou extrait de levure). Beaucoup d'espèces peuvent croître sur des milieux définis avec un sucre simple comme seule source de carbone/énergie (*Haloferax* et *Haloarcula*). *Haloarchaea* sont de vraies halophiles, et sont complètement adaptées aux fortes salinités (**handbook, 2009**).

I.5.3.3-La physiologie des haloarchées

Les protéines associées à la membrane d'haloarchées, telle que la couche protéique de surface (S-Layer), transporteurs, protéines rétiniennes, et les protéines des membranes internes des vésicules à gaz et celles associées aux granules polyhydroxyalkanoate (PHA), contribuent à leur adaptation dans les environnements hypersalins (CAI *et al.*, 2012).

a- la couche S (S-layer protéines)

Ces protéines sont composées d'unités d'oligomériques qui sont ancrées dans la membrane plasmique comme des chandelles étendues qui maintiennent la charge de la surface de la couche poreuse posé à une distance constante au dessus de la surface de la membrane. La s-layer protéine a comme rôle de maintenir ou déterminer la forme cellulaire. Cette couche est riche en résidus acides qui facilitent un fonctionnement correct des protéines dans des conditions de salinité élevée (CAI *et al.*, 2012).

b- les canaux et transporteurs

Les canaux et les transporteurs sont importants pour les haloarchaea pour vivre dans les environnements hyper salins. Ils sont impliqués dans l'entretien de la haute pression osmotique intracellulaire, et le transport d'éléments nutritifs pour un métabolisme actif (CAI *et al.*, 2012).

c- les systèmes de transport de protéines

Il y a deux voies majeures pour transporter les protéines à travers la membrane cytoplasmique. L'une, est la sécrétion générale (Voie secondaire), qui catalyse la translocation transmembranaire des protéines dans leurs conformations déroulées. L'autre est la voie de translocation Tween-Arginine (CAI *et al.*, 2012).

d-les protéines rétiniennes

Au moins quatre protéines rétiniennes de la membrane ont été identifiées chez les haloarchées: bacteriorhodopsines (BR), halorhodopsines (HR), et les rhodopsines sensoriel I et II (SRI et SRII). Toutes les quatre protéines partagent une structure commune de sept hélices membranaires (A, B, C, D, E, F et G) (CAI *et al.*, 2012).

e-les vésicules ou vacuoles gazeuses

Les vésicules gazeuses intracellulaires ont été identifiées dans plusieurs cas d'haloarchées. L'eau est exclue de l'intérieur en conséquence à l'hydrophobicité de la surface interne. Ils

règlent la flottabilité des cellules, leur permettant de flotter à proximité de la lumière et l'oxygène (CAI *et al.*, 2012).

f-le granule Polyhydroxyalkanoate (PHA) a associé protéines

Beaucoup d'haloarchées telles que *Haloferax*, *Halobacterium*, *Haloarcula* et *Haloquadratum* peuvent synthétiser les PHA (Pramanik *et al.*, 2012).

I.5.3.4 Métabolisme des haloarchées

Malgré qu'ils partagent les mêmes environnements hypersalins, les archaea halophiles différents dans leurs exigences nutritionnelles et leurs voie métabolique (Falb, 2008). Il existe des espèces qui utilisent les hydrates de carbone telles que *Haloferax mediterranei*, *Haloarcula marismortis* et *Halococcus saccharolyticus* qui catabolisent les hexoses (glucose, fructose), pentoses (arabinose, xylulose), saccharose et le lactose. D'autres haloarchées telle que *H. salinarum* ne sont pas capables de dégrader les sucres, elles se développent sur les acides aminés et composés typiques des milieux hypersalins. *Haloferax volcanii* est capable de croître sur le glycérol et les acides organiques sécrétés par les halophiles comme *Dunaliella salina* et *Microcoleus chthonoplastes* (Falb, 2008).

I.5.3.5- La pigmentation

La plupart des espèces d'haloarchées de la famille *Halobacteriaceae* sont colorées en rouge rose dû à des pigments caroténoïdes dans leurs membranes cellulaires (Oren, 2009).



Figure3 : la pigmentation des haloarchées vue de bassin de cristallisation d'Israël (Oren, 2009).

I.5.3.6-production d'halocines

La production de peptides ou protéines antibiotiques est un trait universel d'organismes vivants (O'Connor et Shand, 2002). Les archaeocines sont des peptides ou protéines antimicrobiens synthétisés par voie ribosomale par les archées qui appartient à l'ordre

Halobacteriales (Euryarchaeota) (**Alison et al., 2015**) . Bien que beaucoup d'haloarchées sont étudiées, très peu d'halocines ont été caractérisés.

Les halocines sont synthétisés au début de la phase stationnaire, à l'exception de l'halocine H1 dont l'activité est initialement détectable au milieu de la phase exponentielle. Les halocines sont très divers selon leur taille (3 à 35 kDa), leur thermo-stabilité et la dépendance au sel. En général, les halocines de taille > 10 kDa perdent leur activité à température au-dessus de 60 °C et/ou concentration du sel au-dessous de 5%. Les plus petites protéines, connues comme microhalocines, sont habituellement tout à fait robuste et la plupart d'entre elles résistent à l'acide, base et aux solvants organiques. couramment, leur activité est non affectée par la précipitation des sels ou la température; de plus (**Vijay et al., 2015**).

Le spectre d'inhibition des halocines est souvent large, il s'étend d'espèces de différents genres d'un même phylum (Euryarchaeota) à des espèces de différents phylum (Crenarchaeota) (**O'Connor et Shand, 2002**). Le rôle de la production d'halocine dans la compétition entre espèces est encore incertain mais il a été suggéré que ce type d'antimicrobiens peut jouer un rôle dans le maintien de la diversité des espèces des environnements extrêmes (**Atanasova et al., 2013**).

Chapitre II
Matériels et méthodes

II.1-le matériel

II.1.1-matériel biologique

Les microorganismes utilisés dans cette étude sont des archées halophiles isolées de différentes salines d'Algérie (tableau III) qui font partie de la collection de souches du laboratoire Génie biologique.

La souche de référence *Halobacterium salinarum* DSM3754 est utilisée comme germe cible car elle présente une forte sensibilité aux halocines.

Tableau III : les souches d'Archaea utilisées (M^{me} IDRES).

souches	Source	Année d'isolement	Conditions d'isolement	Genre affilié (Gène ARNr 16S)
S1	Sabkha d'Ouargla	1999	37°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S2	Sabkha d'Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Halorubrum tebenquichens</i>
S3	Sabkha d'Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Haloarcula</i>
S4	Sabkha d'Ouargla	2010	40°C, pH7	<i>Halorubrum chaoviator</i>
S5	Sabkha d'Ouargla	2010	40°C, pH7	<i>Halorubrum ezzemoulens</i>
S6	Sabkha d'Ouargla	1999	40°C, pH9	<i>Haloarchée</i>
S7	Saline d'Ichekaben	2003	40°C, pH9	<i>Haloarchée</i>
S8	Sel d'Ichekaben	2009	40°C, pH7	<i>Natrinema</i>
S9	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-
S10	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-
S11	Saline d'oran		40°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S12	Saline d'oran		40°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S13	Saline d'oran		40°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S14	Saline d'oran		40°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S15	Saline de Batna		40°C, pH7	-

S16	Saline de Batna		40°C, pH7	-
-----	-----------------	--	-----------	---

II.1.2-Appareillages et réactifs

Les appareils et les réactifs utilisés sont cités dans l' **Annexe I**.

II.1. 3-Milieus de cultures

➤ milieu pour le développement des souches

Nous avons utilisé des milieux synthétiques et complexes : Brown(Br),

Le milieu (MC), le milieu SG, milieu pour *Haloarcula vallismorti* (**Ronald, 2010**), milieu pour les souches haloalcaliphiles (**Ronald, 2010**), milieu pour *Halobacterium*, et le milieu MC3.

➤ Milieux pour germes cibles

Nous avons utilisé le milieu MH (*H.salinarum*) et pour les autres souches halophiles testées nous avons utilisé le milieu complexe (MC)

La composition des milieux de cultures est mentionnée en **Annexe II**

II.2-Méthodes

II.2.1-Réactivation des souches

Les souches conservées à +4°C ont été revivifiées par repiquage sur milieu liquide (Br) et incubées à 40°C jusqu'au développement des souches.

II.2.2-Culture liquide

◆ Préparation de la pré-culture

A partir des boîtes contenant les souches pures, une colonie a été transférée dans le milieu Br ou MC. Incubation au bain-marie à 40°C et une agitation à 200 rpm jusqu'à avoir un trouble. Deux repiquages successifs ont été réalisés dans les mêmes conditions et la pré-culture est prête.

◆ Culture en milieu liquide

100 µl de la pré-culture ont été inoculés dans le milieu approprié (1 ou 5 ml), les cultures sont réalisées en tube à essai, elles sont incubées à 40°C avec (200 rpm) ou sans agitation selon le cas.

◆ Culture en milieu solide

50 µl de pré culture ont été déposés sur des boîtes pétries pour la réalisation des tests d'activité enzymatique et 40 µl également ont été disposés pour les tests d'activité antibiotique.

II.2.3-Caractérisation des souches d'haloarchaea

II.2.3.1-Caractérisation morphologique

➤ **Caractéristiques macroscopique**

La morphologie des colonies (aspect, pigmentation, contour et diamètre) est observée sur milieu solide.

➤ **Les caractéristiques microscopique**

● **La coloration de Gram**

On a appliqué une solution d'acide acétique à 2% sur les cellules pendant 5 min pour l'exclusion de sel à l'extérieure des cellules suivit d'une coloration par la méthode classique et observer au microscope optique, grossissement 10X100.

II.2.3.2-Caractérisation physiologique des souches

a. La croissance à différents pH

le milieu Brown est ajusté à différents pH allant de 4 à 8 avec des solutions HCl ou NaOH pour les pH 9 et PH 10 ,nous avons utilisé le milieu pour haloarkaliphile (**Ronald, 2010**) et le milieu MC3 respectivement . Pour chaque pH on a réalisé deux essais. Incubé dans le bain marie a 40°C. Les résultats se manifestent par l'apparition des troubles et se confirment par la mesure de la densité optique (DO) par spectrophotometre.

b. La croissance à différentes concentration de NaCl

100 µl du pré culture ont été inoculée dans le milieu MC (1 ml) de 0% à 30% de NaCl, 2 essais ont été utilisés.

c. La croissance à différentes concentration de MgSO₄

Les concentrations de MgSO₄ testées sont 0%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 7.5%, 10%. 2 essais ont été utilisés avec inoculation de 100 µl avec des souches a testé.

- L'incubation à 40°C. la croissance se manifeste avec l'apparition de trouble ainsi que la pigmentation

II.2.3.3-Sensibilité des souches d'haloarchées à certains antibiotiques

On a utilisé un milieu MC semi solide, après solidification on a ensemencé les souches par la méthode d'inondation les différents disques d'antibiotiques ont été disposés, incubation à 40°C.

II.2.4-Utilisation de certains carbohydrates comme seule source de carbone par les souches d'Haloarchaea

25g/l des substrats carbonés (glucose, fructose, saccharose, maltose, glycérol, xylose, amidon, cellobiose, tréhalose, rhamnose, manose, salicine, dextrose) sont ajoutés à la base minérale dépourvus de toute source organique, additionnés de NH_4Cl (20 g/l), de KH_2PO_4 (5 g/l), FeSO_4 (0.2g/l).

2 tubes de milieu de base supplémenté d'extrait de levure utilisés comme témoins positif. Les résultats se manifestent par l'apparition de trouble et pigmentation.

II.2.5-détermination de l'activité enzymatique

a. Détermination de l'activité protéolytique

- **Hydrolyse de la caséine**

Les souches à tester sont ensemencées en spot sur des boites de Pétri contenant le milieu SG modifié additionné de 2% de caséine. Les boites sont ensuite incubées à 40°C. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies.

- **Hydrolyse de la gélatine**

Le milieu SG modifié additionné de 200ml gélatine à 2% pour mettre en évidence la présence de l'activité protéasique (protéase). Les boites sont ensuite incubées à 40°C. La production de la gélatinase se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

b. Détermination de l'activité lipolytique

L'activité est recherchée sur milieu SG modifié additionné de 0.1% de Tween 80 et 0.1% de Tween 20. L'ensemencement des souches est effectué par la méthode des spots. Après incubation à 40°C, le développement d'un précipité autour des touches témoigne la présence d'une lipase.

c. Détermination de l'activité amylolytique

Nous avons utilisé le milieu SG modifié additionné de 1% d'amidon, ensemencé par la méthode des spots. après incubation, les colonies sont inondées avec une solution de lugol, les résultats se manifestent par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

II.2.6- Caractéristiques biochimiques

a. Réduction de nitrate

Pour mettre en évidence la production de gaz nous avons utilisé 16 tube de 20 ml muni des cloches de Durham, puis on a rempli avec 5 ml de milieu SG +0.5% de NaNO_3 inoculé avec 100 μl de souches a testées ensuite incubés a 40°C. Le résultat positif se manifeste par l'apparition des bulles d'air à l'intérieur des cloches.

b. La production d'indole

Nous avons utilisé le milieu exemple d'indole additionné de 1 ml de solution saline inoculé par les souches d'*Haloarchaea*, puis incubé à 40°C. le résultat apparait après l'ajout de 5 gouttes de réactif de KOVACS, l'apparition d'un anneau rouge indique un résultat positif.

c. mannitol mobilité

Nous avons utilisé le milieu SG semi solide modifié additionné de mannitol, l'inoculation se fait par une piqure centrale à l'aide d'une anse de platine. Les résultats se manifestent par l'apparition d'une couleur rouge au jaune lors de dégradation du mannitol et la mobilité par un trouble qui se manifeste dans tout le milieu.

II.2.7- Recherche de l'activité antibiotique

Il s'agit de mettre en évidence la capacité d'une souche à produire ou non des substances antimicrobiennes (halocines) contre la souche de référence *H. salinarum* DSMZ 3754. Le germe cible est cultivé en milieu liquide par repiquage successif jusqu'à obtention d'une DO de 0.6 à 0.8, puis inoculé dans le milieu MH (surfusion) en double couche à une DO_{600} finale de 0.001. Après solidification, des puits sont découpés à l'aide d'un emporte pièce puis remplis de 40 μl de culture. Après incubation à 40°C jusqu'au développement du germe cible, les résultats positifs se manifestent par l'apparition de zones claires autour des puits.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1- Caractéristiques morphologique des souches d'haloarchaea

L'aspect global des colonies, leur diamètre ainsi que la pigmentation varient en fonction des milieux de culture. L'observation macroscopique est effectuée sur un milieu (MC) ou (MA) semi solide après 20 d'incubation à 40°C (tableau 04).

Nous avons remarqué que toutes les souches sont pigmentées en rose, orange, saumon ou en rouge, elles présentent toutes un aspect rond plat ou bombé avec un contour régulier à l'exception de la S7. Le diamètre des colonies varie de 0.01 à 2mm.

Tableau IV : résultats de l'étude morphologique

souches	Gram	Forme	Couleur	Aspect	Contour	Diamètre (mm)	Milieu approprié
S1	-	Pléomorphe	rouge	Rondes plates	régulier	1-2	MC
S2	-	Pléomorphe	saumon	Rondes bombées	régulier	< 2	MC
S3	-	Pléomorphe	rouge	Rondes bombées	régulier	0.1-2	MC
S4	-	Cocci	orange	Rondes plates	régulier	< 1.4	MC
S5	-	Cocci	rouge	Rondes plates	régulier	1-2	MC
S6	-	Pléomorphe	orange	Rondes plates	régulier	0.9-1	MC
S7	-	Bacille	rose	Rondes plates	irrégulier	<1	MC
S8	-	Cocci	rouge	Rondes bombées	régulier	< 0.9	MC
S9	-	Cocci	soumon	Rondes plates	régulier	0.9-2	MC
S10	-	Cocci	Rouge	Rondes bombées	régulier	< 2	MA
S11	-	Pléomorphe	rouge	Rondes bombées	régulier	0.8-2	MC
S12	-	Cocci	rouge	Rondes bombées	régulier	< 1.2	MC
S13	-	Cocci	rouge	Rondes bombées	régulier	1.2-2	MC
S14	-	Cocci	rouge	Rondes plates	régulier	0.5-1.5	MC
S15	-	Pléomorphe	Orange	Rondes bombées	régulier	0.1-1.2	MC
S16	+	Cocci	saumon	Rondes bombées	régulier	<0.1	MA

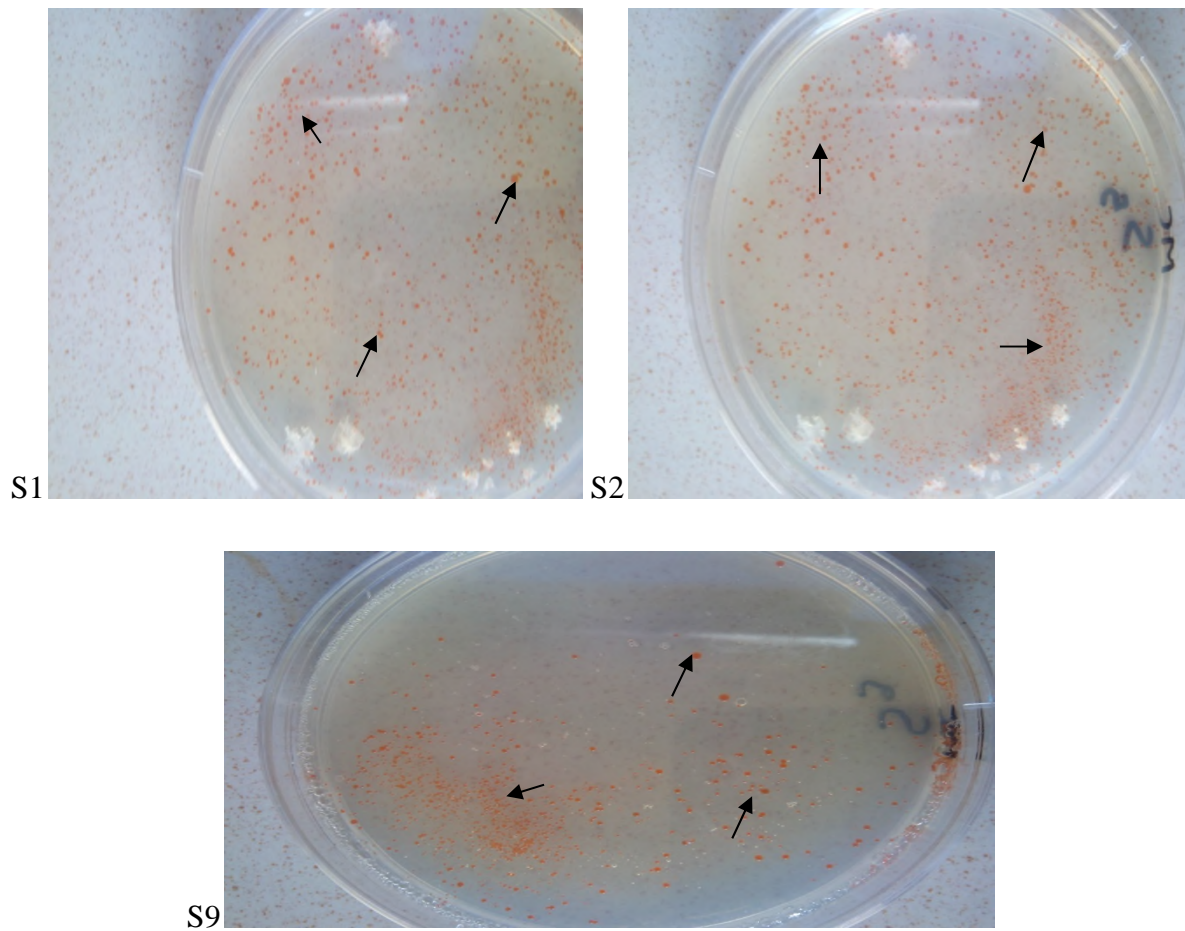


Figure 04 : Aspect et pigmentation de quelques colonies d’haloarchaea sur le milieu MC

Les résultats montrent que la plupart des souches sont des Gram- à part la souche S16 qui est à Gram+ avec une forme cocci et des différentes formes, cocci ou bâtonnet et polymorphes pour les autres souches.

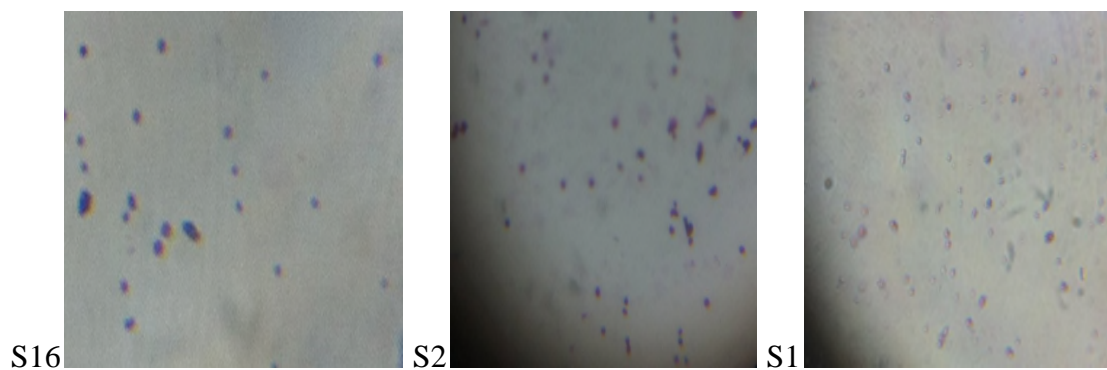


Figure 05 : coloration de Gram des souches S1, S2, et S16 vue au microscopique optique (100X10).

Les principaux types morphologiques d'haloarchaea sont tringles, cocci et formes irréguliers qui sont des cellules principalement plutôt plates. La morphologie d'haloarchaea du non-coccoid peut changer, elle dépend de la concentration du sel dans l'environnement. Avec dilution croissante de sel, il y a l'apparition des forme, enflé et les tringles courbés ou sphériques. la raison de cette polymorphe c'est leurs membrane cellulaire qui ont besoin de haut concentration de cations pour assurer une bonne stabilité (Sergiu *et al.*,2006)

III.2 Caractérisation physiologique des souches

III.2.1-Croissances des souches d'haloarchées à différents pH

La gamme de pH testée pour la croissance des souches d'haloarchaea se situe entre 4 et 10, les résultats montrent (Tableau V en annexe III) qu'il n'y a aucune croissance à pH 4 et 10.

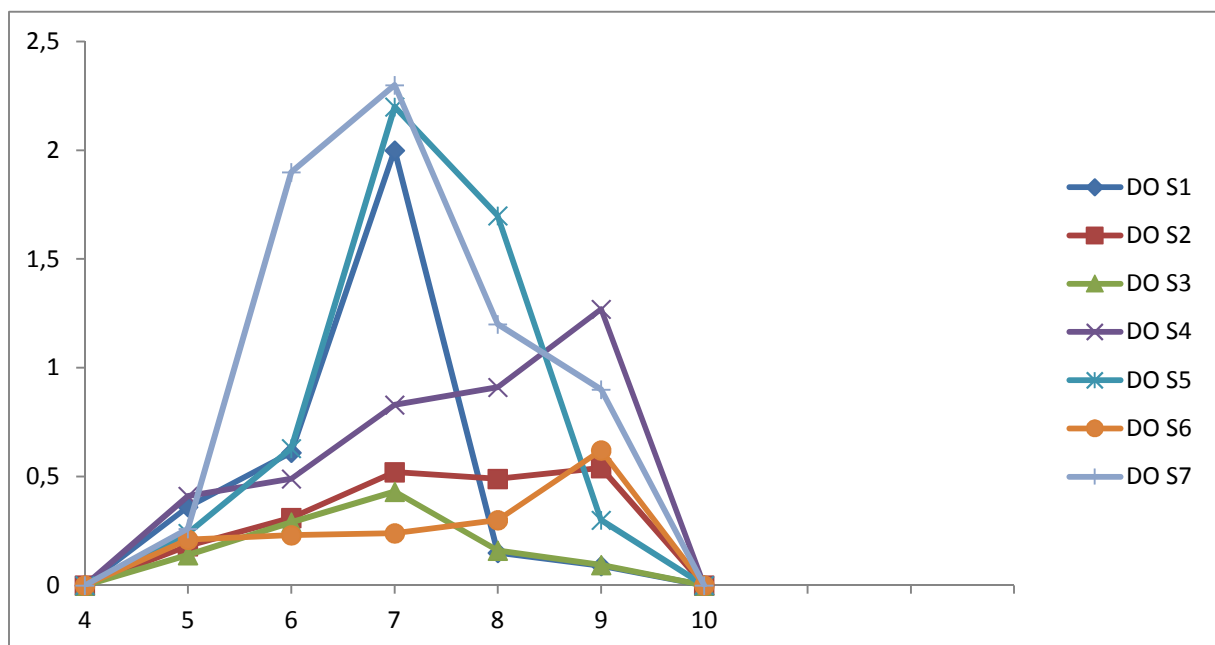


Figure06 : l'absorbance des souches isolées d'Ouargla

L'intervalle de pH optimum des souches isolées de sites d'Ouargla varie d'une souche à l'autre. Un optimum de croissance à pH 7 est remarqué chez les souches S1, S3, S5 et S7 ; les souches S4 et S6 présente un optimum à pH9 donc se sont des souches alkalophiles. Seule la souche S2 a une gamme d'optimum large allant de PH7 à PH9.

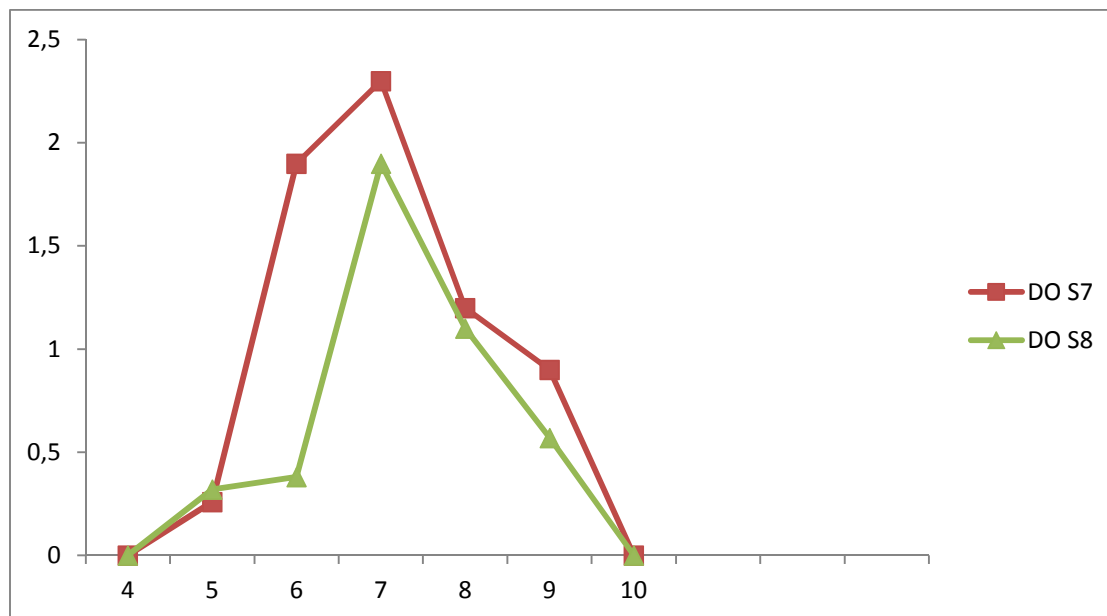


Figure07 : l’absorbance des souches isolées d’Ichekaben

Les deux souches isolées de sites Ichekaben possèdent le pH7 comme leur point optimum de développement.

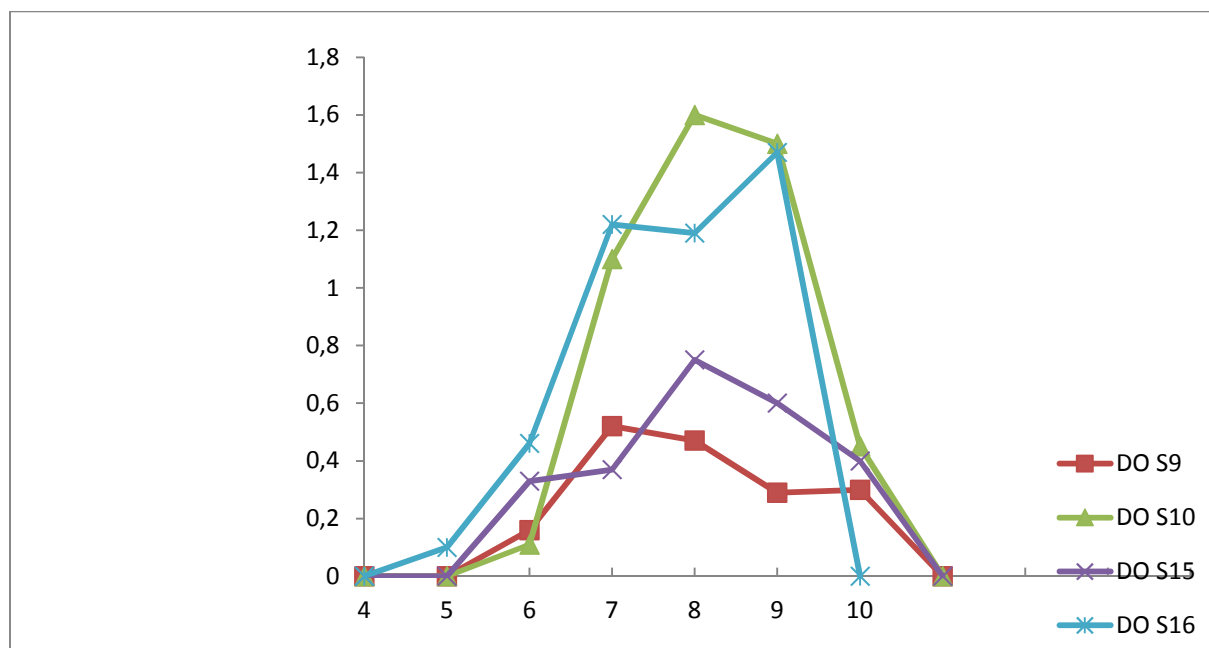


Figure 08 : l’absorbance des souches isolées de Batna

Il est également notable une présence des points différents d’optimum de pH pour les souches isolées de Batna, une gamme optimale remarquable pour la S16 allant de pH6 à pH9 mais avec une croissance beaucoup plus à pH9.les autres souches d’haloarchées présentent une optimisation à des différents points : la S10 et la S15 à pH8, la S9 de pH7 à pH8.

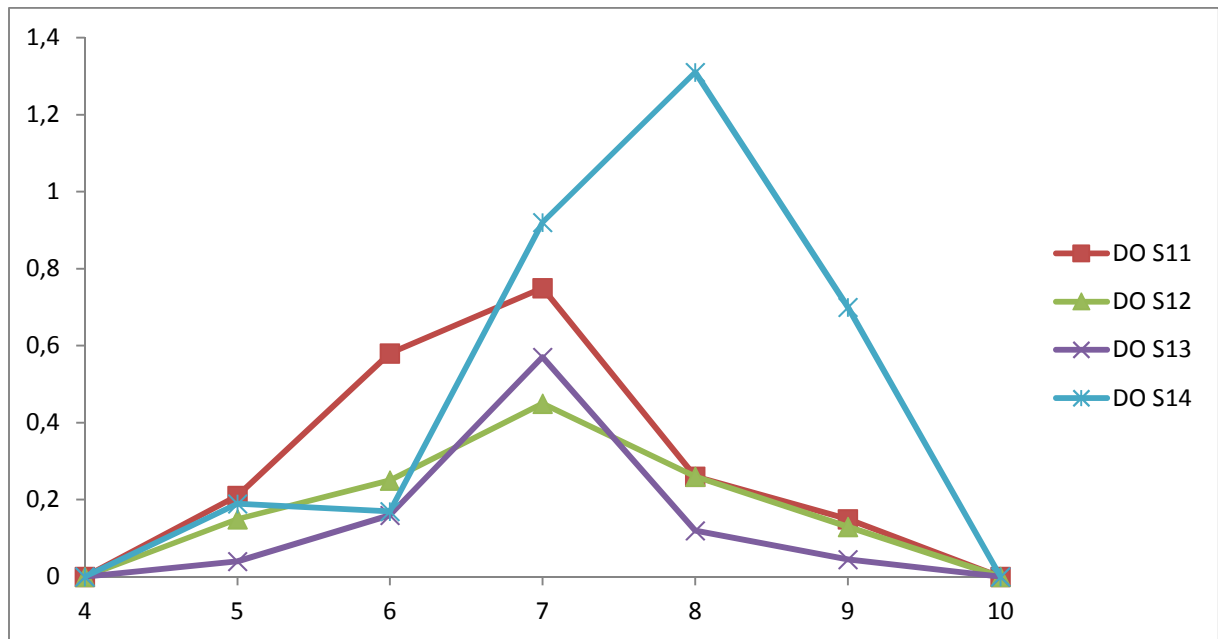


Figure 09 : l'absorbance des souches isolées d'Oran

Pour les souches isolées d'Oran il y a 3 souches qui ont un optimum de croissance à pH7 et une seule à pH8.



Figure 10 : Croissance et la pigmentation de la souche S5 en fonction de pH

III.2.2-Croissance à différentes concentrations de Na Cl

La croissance des souches d'Haloarchées a été testée à des concentrations de Na Cl allant de 0 à 30% sur un milieu synthétique (MC). Après 20 jours d'incubation à 40°C nous constatons qu'aucune des souches ne se développent à 0% de Na Cl, 3 souches (S4, S5, S15) sont capables de croître à partir de 5%, 5 (S1, S2, S3, S10, S11) à partir de 10%, 7 souches (S6,

S7, S9, S12, S13, S14 et S16) à partir de 15% et une souche (S8) est capable de croître à partir de 20% de Na Cl (tableau 06).

Tableau VI : Croissance des souches d'haloarchées à différentes concentration de Na Cl

[Na Cl]	souches	0%		5%		10%		15%		20%		25%		30%	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
S1	T	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	++	++	++	++
S2	T	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++
	P	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+
S3	T	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	+	+	++	+	++	++	+	+/-	++	++
S4	T	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++	++	++
S5	T	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++
S6	T	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++
S7	T	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++
S8	T	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
S9	T	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++

	P	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	++
S10	T	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++
	P	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	++
S11	T	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	+	+	++	++
S12	T	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++	++	++
S13	T	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
S14	T	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+	++
S15	T	-	-	+/-	+/-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	++	++
S16	T	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	+++	+++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++

[Na Cl] : la concentration de Na Cl

T1 : tube 01/ **T2** : tube 02/ **T** : trouble/ **P** : pigmentation

- : absence de trouble ou pigmentation. +/- : présence très faible de trouble ou pigmentation

+

+++ : Meilleure croissance et pigmentation

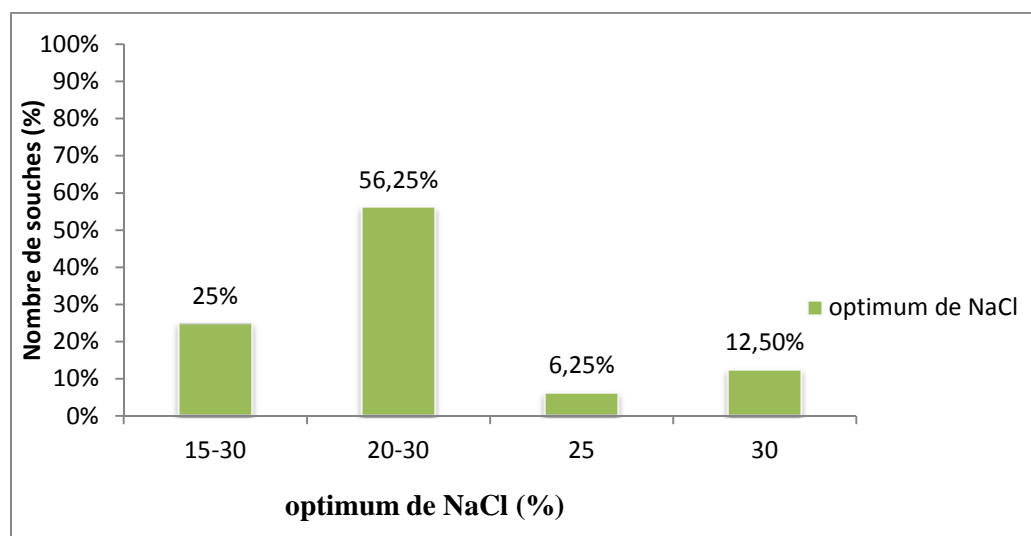


Figure 11 : optimum de croissance des souches d'haloarchées en fonction de la concentration de NaCl

L'optimum de croissance varie en fonction des souches, nous avons remarqué que 56,25, 25, 6,25% et 12,25 des souches possèdent des optima respectivement à : 20 à 30, 15 à 30, 25 et 30% de NaCl.

Les Haloarchées exigent des concentrations élevées de Na Cl pour leurs croissances, elles peuvent maintenir leurs stabilités et leurs fonctionnements à des concentrations saturantes. Dans les solutions de faible salinité, les cellules sont irréversiblement endommagées et elles se lysent (**Dworkin, 2006**).

Les 16 souches sont toutes pigmentées, la pigmentation est généralement observée à partir de 15% sauf pour les souches S1, S2 et S3 qui pigmentent à partir de 10% de NaCl. Une pigmentation maximale est obtenue à forte salinité 20% ou 30% selon les souches.

La plupart des espèces des archées halophiles (famille Halobacteriaceae) sont colorés en rouge rose dû au contenu élevé de pigments du carotenoides dans leur membrane cellulaire. Seulement quelques espèces dans le groupe tel *Natrialba asiatica* ne montre pas de couleur rose. Dans quelques autres espèces l'ampleur de pigmentation dépend de la salinité dont laquelle les cellules ont été développé : *Haloferax mediterranei* est faiblement pigmenté à haute salinité, mais son produit massif de pigments du carotenoid est quand elle est incubé à des concentrations de sel suboptimale (**Oren, 2009**).

III.2.3-Croissance à différentes concentrations de MgSO₄

L'exigence en MgSO₄ a été testée à la concentration en NaCl de 25%. Après 15 jours d'incubation à 40° nous avons obtenues les résultats motionnés dans le tableau suivant.

Tableau VII : croissance des souches à différentes concentration de MgSO₄

[MgSO ₄] souches		0%		0.5%		1%		2%		5%		7.5%		10%	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
S1	T	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++
	P	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
S2	T	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
	P	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+
S3	T	-	-	+	+	+	+	++	++	+++	+++	++	++	++	++
	P	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	++
S4	T	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+
S5	T	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
S6	T	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+
S7	T	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+
	P	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
S8	T	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	++
S9	T	+/-	+/-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

	P	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	+	+	+	+
S10	T	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+or	+	+	+
S11	T	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+	+	++	+	+	+
S12	T	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
S13	T	+	+	+	+/-	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
S14	T	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	P	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
S15	T	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
S16	T	+/-	+/-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	P	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++

[MgSO4] : la concentration de MgSO4

T1 : tube 01/ **T2** : tube 02/ **T** : trouble/ **P** : pigmentation

- : absence. +/- : Faible présence. + : présence. ++ : Bonne. +++ : Meilleure

Nous avons remarqué que la plupart des souches peuvent se développer en absence de MgSO4 à l'exception de la S3 et la S4 qui exigent un minimum de 0.5%. L'optimum de croissance est observé à 5% chez presque toutes les souches, et certaines peuvent même résister jusqu'à 10% de MgSO4.

Le magnésium joue un rôle clé dans la physiologie des cellules d’Haloarchaées, ils jouent un rôle comme un cofacteur pour certaines réactions enzymatiques tel que la hydrolyse de l’amidon (Enache, 2009).

Le MgSO₄ joue également un rôle essentiel dans la morphologie des Haloarchaea d’où il y a une exploitation dans le niveau de différentes concentrations. Les sous-unités de la protéine sont tenues ensemble par les cations bivalents Mg²⁺ (Halohandbook, 2009).

La pigmentation est également influencée par les teneurs en MgSO₄, en effet, elle ne commence à apparaître qu’à partir de 0.5% de MgSO₄ et la pigmentation optimale est remarquée généralement entre 2 à 5% selon les souches.

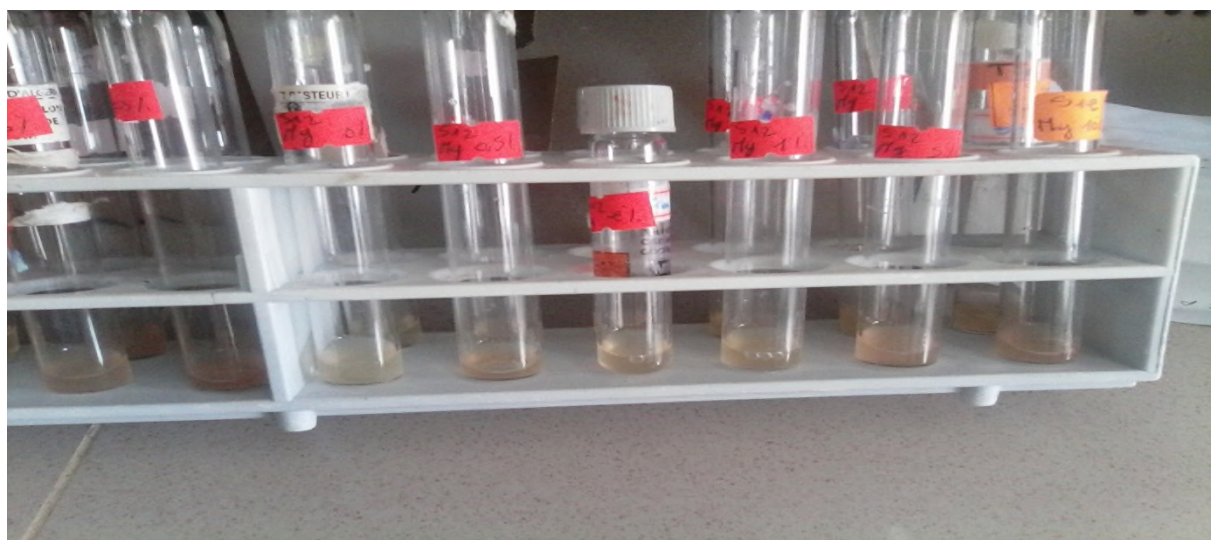


Figure 12 : Croissance de la souche S12 sur MgSO₄

III.3-Sensibilité des souches d’Haloarchées à certains antibiotiques

Tableau VIII : Sensibilité des souches d’Haloarchées aux antibiotiques.

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
ATB																
AMO	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
OXA	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TICA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
CIFOX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

PIPE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEFT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
RIFA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
VANC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CIFOT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ERYT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMIC	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R

Nous remarquons que perèsques toutes les souches présentent une résistance pour les disques d’ATB à l’exception des souches S3 qui sensible à l’Amoxyciline, la S11 à l’Amoxyciline et l’Oxacycline, la S14 à l’Amoxyciline et la S11 au Rifanpicin et la S5 et la S9 qui sont sensibles à l’Amicacine.

III.4- la croissance sur certains carbohydrates comme seule source de carbone.

Certains carbohydrates ont été testés sur la croissance des souches d’haloarchées en présence d’extrait de levure comme témoin. Après 20 jours d’incubation à 40°C, nous avons obtenu les résultats (tableau IX en annexe IV)illustrées dans l’histogramme ci-dessus.

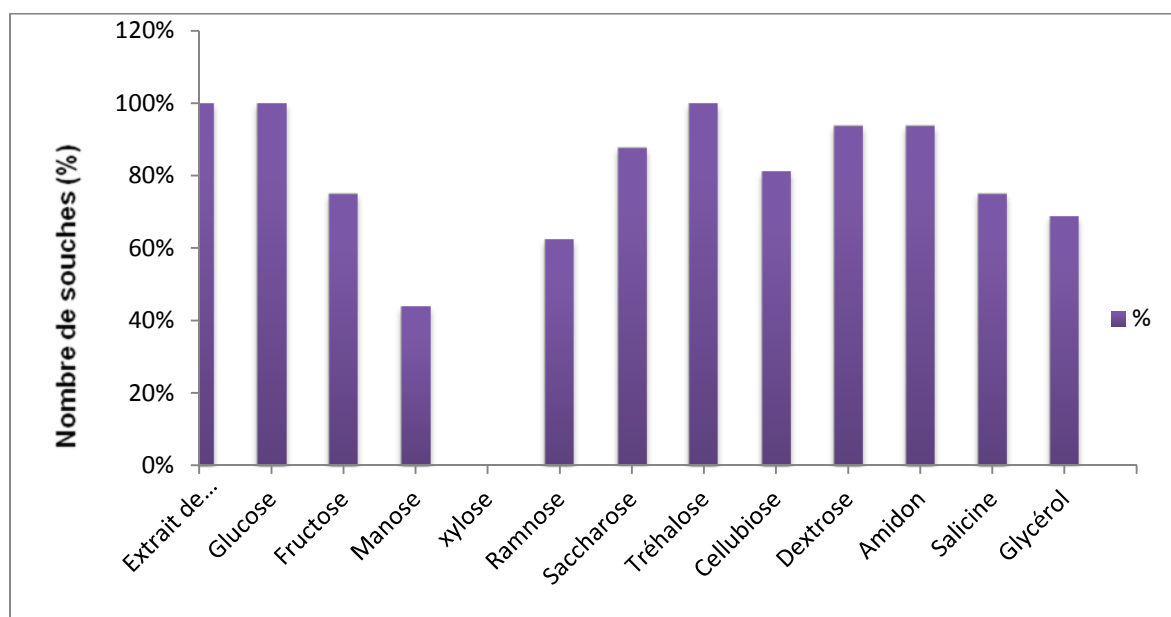


Figure 13: Croissance des souches d’haloarchées sur différentes sources de carbone

Nous avons remarqué que les souches utilisent des substrats carbonés que se soit des monosaccharides, des disaccharides, des polysaccharides, des acides organiques ou des alcools. 100% de souches ou presque dégradent l'extrait de levure, le glucose, le tréhalose, dextrose et l'amidon. Cependant que 43.7% de souches dégradent le mannose par contre 0% pour la xylose. Une exploitation de l'alcool (Glycérol) est différentes vis-à-vis des souches, nous avons constaté que les souches isolées de site Ouargla ont une faible utilisation de glycérol à l'exception de la souche S6 ; une bonne utilisation de glycérol par d'autres souches d'Haloarchées isolées d'Ichekaben, Batna et Oran. Nous avons remarqué qu'il y a certains souches qui présentent une excellente exploitation de certains de ces substrats exemple la souche S5, S9, S8 se croient mieux avec la présence de Saccharose, Glucose et l'Amidon respectivement comme seule source de carbone.

La pigmentation est présente ou les souches se poussent bien et elle varie d'une souche à l'autre selon la source de carbone exploitée.



Figure 14 : Utilisation de certains carbohydrates pas la souche S8

III.5- détermination de l'activité enzymatique

La caractérisation des enzymes produites par des souches d'haloarchées est réalisée sur le milieu SG modifié. L'activité enzymatique vis-à-vis des substrats (tableau X en annexe V) est illustrée dans l'histogramme ci-dessus.

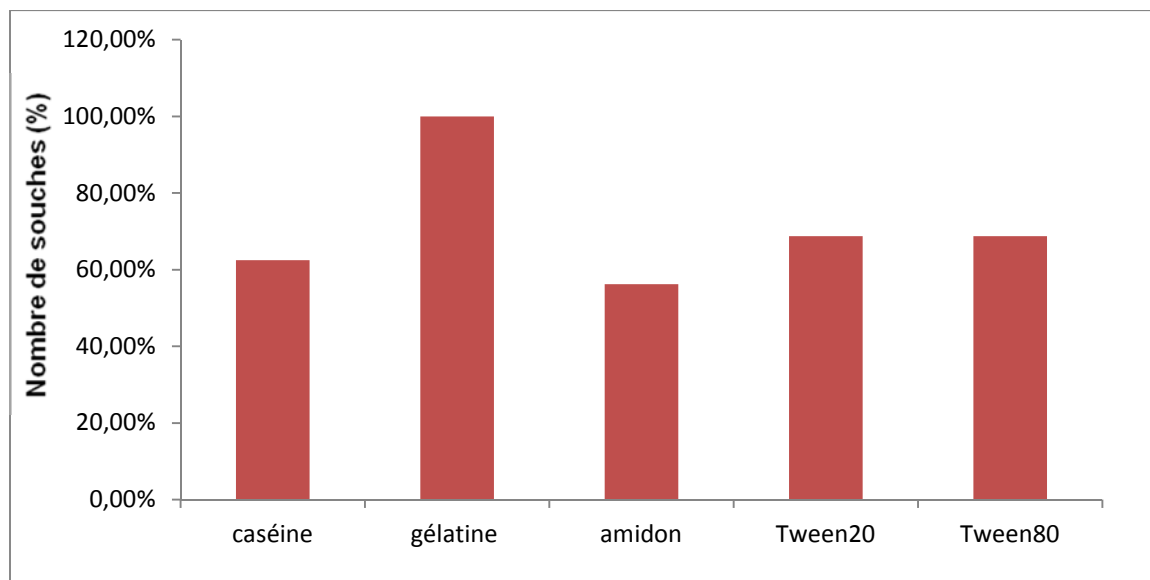


Figure 15 : Caractérisation des enzymes produites par des souches d'haloarchées

Nous avons observé que toutes les souches présentent une activité protéolytique avec une dégradation notable pour la gélatine, on remarque que les souches S1, S2, S3, S4 et S16 présente une forte activité protéolytique sur la gélatine. L'activité amylolytique est observée chez certaines souches et les autres souches telles que S4, S6, S13, S14 et S16 n'hydrolysent pas l'amidon. L'hydrolyse de Tween 20 et Tween 80 est observée chez presque toutes les souches à l'exception de la souche S4 qui n'hydrolyse pas le tween 20 et la souche S16 n'hydrolyse pas le Tween 80.

III.6-Caractéristiques biochimiques

III.6.1- la réduction de nitrate et production de gaz

Tableau XI : Réduction de nitrate par les souches d'haloarchées

souches	croissance	Réduction de nitrate	Production de gaz	Pigmentation
S1	+	-	+	+ rose
S2	++	-	++	+ rose
S3	+	-	++	+++ rouge
S4	++	-	++	+ orange
S5	++	-	++	+ rouge bourdon
S6	++++	-	+++	++ rouge foncé
S7	+/dépôt au fond	-	+/-	+ marron
S8	+++	-	+++	+ rose
S9	++	+	-	+ rose
S10	++	-	+	++ rose
S11	++	-	+	+ rose claire
S12	++	-	+	+ rose
S13	++	-	+	+ rouge
S14	+++	-	+++	++ rouge
S15	++	-	++	+ orange
S16	+	-	+	+ rose

+ : présence. - : absence

Toutes les souches produisent le gaz à l'exception de la S9 qui est la seule capable de réduire les nitrates en nitrites, cela indique la présence du nitrate réductase NR+, alors que pour les autres souches possèdent une NR++++, puisque la réduction va au-delà des nitrites pour produire le N₂.

Toutes les souches présentées une pigmentation qui vari de rose au rouge bourdant.

III.6.2- la production d'indole

Tableau XII : Détermination de la production d'indole par les souches d'haloarchées

souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nous avons remarqué qu'il y a une croissance pour toutes les souches mais elles sont toutes données un résultat négatif pour l'indole et cela explique que les souches ne dégradent pas le tryptophane.

III.6.3- Mannitol mobilité

Tableau XIII : Détermination de la dégradation du mannitol et la mobilité des souches d'haloarchées.

souches	Tube01		Tube02	
	mannitol	mobilité	mannitol	Mobilité
S1	++	+	++	+
S2	+	+	+	+
S3	+	+	+	+
S4	+	+	+	+
S5	+	+	+	+
S6	+	+	+	+
S7	+	+	+	+

S8	+/-	+	+/-	+
S9	+	+	+	+
S10	+/-	+	+/-	+
S11	+	+	+	+
S12	+	+	+	+
S13	+/-	+	+/-	+
S14	+/-	+	+/-	+
S15	-	+	-	+
S16	+/-	+	+/-	+

- : absence de dégradation ou mobilité. +/- : faible. + : présence de dégradation ou mobilité

Les résultats montrent que toutes les souches fermentent le mannitol à l'exception de la souche S15.

Toutes les souches sont mobiles.



Figure 16: Fermentation de mannitol par quelques souches d'haloarchées.

III.7-Recherche de l'activité antibiotique

• Recherche d'activité antibiotique dans les différentes cultures

Les cultures présentant une bonne croissance ont été testées pour la production d'antibiotiques. Les résultats montrent (tableau 12) que sur la plupart des cultures l'activité antibiotique est absente. C'est probablement dû à la culture en tube qui ne favorise pas une bonne diffusion d'oxygène. Néanmoins, certaines souches produisent l'activité antibiotique que dans l'extrait de levure comme source de carbone (S15, S10), d'autres en présence d'extrait de levure ou un carbohydrate (S16 , S9) et la S2 produit l'activité antibiotique uniquement en présence de dextrose.

Tableau XIV : la production d'ATB dans différentes cultures

souche	Culture testée	Diamètre
S2	Dextrose	15mm
	Témoin	/
	saccharose	/
S4	Saccharose	/
	Fructose	/
	Glycérol	/
	témoin	/
S5	Saccharose	/
	Témoin	/
S6	Saccharose	/
S9	Saccharose	/
	Glucose	14mm
	Dextrose	/
	Témoin	12mm
	Amidon	/
S10	Glucose	/

	Dextrose	/
	Témoin	18mm
S15	Amidon	/
	témoin	28mm
	glucose	/
S16	Témoin	12mm
	Fructose	10mm
	glucose	/

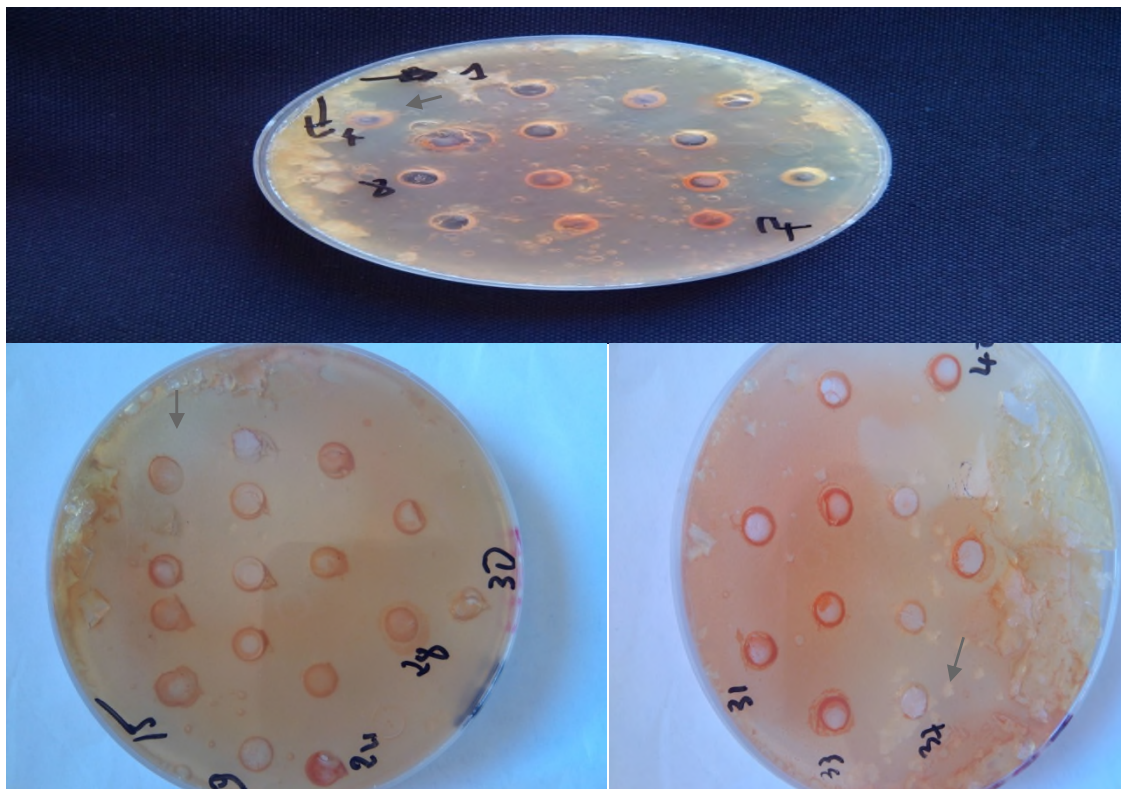


Figure 17 : Production d'antibiotiques par quelques souches d'Haloarchaea.

Tableau 15 : Affiliation des souches étudiées à quelques souches de référence.

III.8-Affiliation des souches d'Haloarchées à certaines souches de référence

A partir des résultats qu'on a obtenu comparé les souches étudiées aux souches édentifiées dans(**Oren, 2014. Gonzalez et al., 2009. Oren et al., 1990. Mancinelli et al., 2009. Pathak et al., 2012. Kharoub et al., 2014**).

Tableau XV : Affiliation des souches d'Haloarchées à certaines souches de référence

Souches affiliées	85% <i>Halorcula salaria</i>	88% <i>Hrr. tebenquichense</i>	76% <i>Haloarcu. Marismortuis</i>	<u><i>Halorubrum chaoviator</i></u>	95% <i>Hrrr chaoviator</i>	91% <i>Hrr. ezzemoulense</i>	<i>Halococcus sp</i>	<i>Halococcus sp</i>
souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
pigmentation	rouge	soumon	rouge	orange	rouge	orange	rose	rouge
Forme	Ronde plate	Rondes plates	Ronde bombée	Rondes plates	Ronde plate	Ronde plate	Rondes plates	Rondes bombées
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Morphologie cellulaire	pléomorphe	pléomorphe	pléomorphe	cocci	cocci	pléomorphe	bacille	cocci
Minimum NaCl(%)	10	10	10	5	5	15	15	20
Minimum Mg %	0	0	0.5	0.5	0	0.5	0	0
Optimum de NaCl(%)	15 -30	25	15 - 30	20 - 30	15 - 30	20 - 30	20 -30	20 - 30
Gamme de pH	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9
PH optimum	7	7à9	7	9	7	9	7	7
d'indole	-	-	-	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	F
mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de gaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Amylase	+	+	+	-	-	-	+	+
Caséinase	-	+	-	+	+	-	-	-
Gélatinase	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween80	+	+	-	+	+	+	+	+
Tween20	+	+	-	+	+	+	+	+
Réduction de nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentation	+	+	+	+	+	+	+	+
Extrait de levure	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+

Saccharose	+	f	+	+	+	+	+	+
Fructose	F	+	+	+	-	+	+	+
Amidon	+	-	+	+	+	+	+	+
Dextrose	+	+	+	-	+	+	+	+
Glycerole	+	-	+	F	F	+	+	+
Salicine	-	+	+	+	+	+	F	+
Manose	+	+	F	F	+	-	F	+
Ramnose	+	+	+	+	+	+	F	F
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellubiose	+	+	+	+	F	F	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	-	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxiciline	R	R	S	R	R	R	R	R
Oxacycline	R	S	R	R	R	R	R	R
Ticarcline	R	R	R	R	R	R	R	R
Cifoxin	R	R	R	R	R	R	R	R
Pepiraciline	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidine	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicin	R	R	R	R	R	R	R	R
Vancamycin	R	R	R	R	R	R	R	R
Cifotaxim	R	R	R	R	R	S	R	R
Erytromycine	R	R	R	R	R	R	R	R
Amycacine	R	R	R	R	S	R	R	R

Souches affiliées	haloarchea	haloarchea	77%haloarcuala quardarta	72% haloarcuala tendis	Haloarcuala sp	70% haloarcuala argentinensis	haloarchea	77% Natronococcus sp
souches	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
couleur	saumon	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	Orange	saumon
Forme	Ronde plate	Rondes bombées	Rondes bombées	Rondes bombées	Ronde bombée	Ronde plate	Rondes bombées	Rondes bombées

Gram	-	-	-	-	-	-	-	+
Morphologie cellulaire	cocci	cocci	pléomorphe	cocci	cocci	cocci	pléomorphe	cocci
Salinité(%)	15	10	11	15	15	15	5	15
Minimum Mg(%)	0	0	0	0	0	0	0	0
salinité(%) optimal	20 -30	30	20 - 30	20 - 30	20 - 30	20 - 30	15 - 30	30
Gamme de pH	4 - 9	49	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9	4 - 9
pH optimum	7	8	8	7	7	8	8	6à9
Production d'indole	-	-	-	-	-	-	-	-
mannitol	+	F	+	+	F	F	+	F
mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de gaz	-	+	+	+	+	+	+	+
amylase	+	+	+	+	-	-	-	+
caséinase	+	+	+	+	+	-	+	+
gélatinase	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20	+	+	+	+	+	+	+	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	-
Réduction de nitrate	+	-	-	-	-	-	-	-
pigmentation	+	+	+	+	+	+	+	+
Extrait de levure	+	+	+	+	+	+	+	+

F : faible. R : résiste. S : sensible.

Appareillage

- ◆ Autoclave ALFA-10-plus (PBIInternational)
- ◆ Balance de précision
- ◆ Bain marie
- ◆ Bain marie HS-B20 digital, IKA labortechnik, Allemagne
- ◆ Centrifugeuse : SIGMA 1-14
- ◆ Etuve vnticell MMM
- ◆ Four paster RADE RAYPA
- ◆ Microscope optique
- ◆ PH-mètre Eutech ph 700
- ◆ Plaque chauffante et agitation magnitiquenTRDE Raypa AG-2 et AG-5
- ◆ Plaque agitatrice VBRAMAX 100
- ◆ Réfrigérateur
- ◆ Spectrophotomètre UV mini 1240 SHIMADZU
- ◆ Vortex VELP SCIENTIFIC, Italy

Petit matériels

- ◆ Anse de platine
- ◆ Boreaux magnétiques
- ◆ bec benzen
- ◆ bechers
- ◆ Boites pétri
- ◆ embouts
- ◆ Epreuvettes graduées
- ◆ Erlenmayer
- ◆ fioles
- ◆ Flacons
- ◆ Lames et lamelles
- ◆ Micropipettes
- ◆ Pipettes Paster
- ◆ Pince en boit
- ◆ Portoirs de tubes
- ◆ Tubes à essai (10 et 20ml)
- ◆ spatule
- ◆ Seringues

Les produits utilisés

- ◆ Acide acétique (2%)
- ◆ Acide sulfurique (**H₂SO₄**)
- ◆ alcool
- ◆ Ethanol (70%)
- ◆ Chlorure de calcium (**CaCl₂**)
- ◆ Chlorure d'hydrogène (**HCl**)
- ◆ chlorure de potassium (**KCl**)
- ◆ Chlorure de sodium (**NaCl**)
- ◆ COVACS
- ◆ Hydroxyde de sodium (**NaOH**)
- ◆ Réactif KOVACS
- ◆ trishydroxyméthylaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (**Tris**)
- ◆ sulfate de magnésium (**MgSO₄**)

Les Colorants

- ◆ Fuschine
- ◆ Iodo-ioduré (**Lugol**)
- ◆ Violet de gentiane

La composition des milieux de culture

Milieu Brown (Br)

Pour 1L à pH 7.2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2 g
▪ MgSo4, 7H2O	20g
▪ extrait de levure	5g
▪ citrate trisodique	3g

la stérilisation :autoclavage à 120°C pendant 30min

Milieu complexe (MC)

Pour 1L à pH 7.2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSo4, 7H2O	20g
▪ extrait de levure	5g
▪ citrate trisodique	3g
▪ peptone	5g
▪ extrait de viande	2g

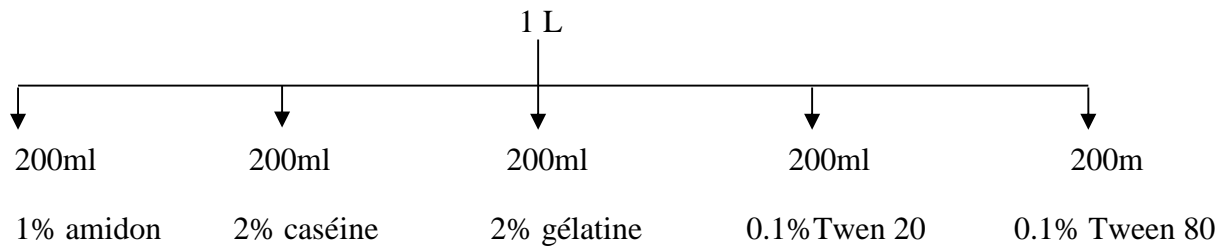
la stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

Milieu SG modifier

Pour 1L à pH 7.2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSo4 , 7H2O	20g
▪ FeCl2	0.023g
▪ citrate trisodique	3g
▪ Amidon	2g
▪ Caséine	4g
▪ gélatine	0.2g
▪ Tween 20	0.2g
▪ Tween 80	0.2g

Annexe 02



Stérilisation : autoclavage à 120°C pendant 30min

Milieu SG +0.5% de NaNO₃

Par 1L à pH 7.5

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSO ₄ , 7H ₂ O	20g
▪ FeCl ₂	0.023g
▪ NaNO ₃	5g
▪ extrait de levure	10g
▪ citrate trisodique	3g
▪ peptone caseine	7.5g

Stérilisation : autoclavage à 120°C pendant 30 min

Milieu pour haloarcula

Par 1029 ml à pH 7.5

▪ Solution saline	1L
▪ La solution de chaque sucre	20ml
▪ La solution de NH ₄ Cl	5ml
▪ La solution de FeSO ₄ (6H ₂ O)	2ml
▪ La solution de K ₂ HPO ₄	2ml

➤ Composition de la solution saline :

NaCl	200g
KCl	4g
MgSO ₄ (H ₂ O)	36g
CaCl ₂ (H ₂ O)	1g
Tris	4g

➤ La composition de la solution de FeSO₄ (6H₂O) : 100ml

Annexe 02

FeSO₄ (6H₂O) 0.2g

HCl 1ml

➤ **La composition de la solution K₂HPO₄ :100ml**

K₂HPO₄ 5g

➤ **La composition des solution NH₄Cl : par 100ml**

NH₄Cl 20 g

➤ **La composition des solutions de sucres**

- **Amidon** : pour 100 ml

amidon 25g

Stérilisation : par filtration

- **Extrait de levure** : pour 100ml

Extrait de levure 25g

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

- **Fructose** : pour 100ml

Fructose 25g

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

- **Glucose** : pour 100ml

Glucose 25g

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

- **Glycérol** : pour 100ml

Glycérol 25g

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

- **Saccharose** : pour 100ml

Saccharose 25g

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

Milieu pour Haloalkaliphiles

Solution A :

Pour g/ 900ml

NaCl	200g
KCl	2g
MgSo4	1g
FeSO4 (7H2O)	0.05g
Extrait de levure	10g
Citrate de sodium (4H2O)	3g

Solution B:

Pour g/100ml

Na2CO3 (10H2O)	5g
----------------	----

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

Milieu pour Halobacterum

Pour g/L

NaCl	250g
KCl	5g
MgSo4	10g
CaCl2	0.2g
Extrait de levure	1g
Peptone pancréatique	2.5g
Agar	10g

Stérilisation : autoclavage à 120°C pendant 30min

Milieu SG + mannitol mobilité

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSo4, 7H2O	20g

Annexe 02

▪ FeCl ₂	0.023g
▪ Citrate tri sodique	3g
▪ mannitol	22g

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

Milieu SG + Indole

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSo ₄ , 7H ₂ O	20g
▪ FeCl ₂	0.023g
▪ Citrate tri sodique	3g
▪ indole	15g

Stérilisation : Autoclavage à 120°C pendant 30min

Annexe V

Tableau X : les résultats de tests d'activité enzymatique

Souches	caséine	gélatine	amidon	Tween20	Tween80
S1	-	+++	++	++	+
S2	+	+++	++	+	++
S3	-	+++	++	-	-
S4	+	+++	-	++	++
S5	+	+	-	+	+++
S6	-	++	-	++	++
S7	-	++	++	++	++
S8	-	++	++	+++	++
S9	+	++	++	+++	++
S10	+++	++	++	+++	++
S11	-	++	++	++	++
S12	+	+	++	+	++
S13	+	++	-	++	++
S14	+	+++	-	++	++
S15	+	++	-	+	++
S16	+	+++	+	-	-

- : absence de l'activité enzymatique

+/- : faible présence. + : présence de l'activité enzymatique. ++ : Bonne activité enzymatique.

+++ : Très bonne activité enzymatique.

Annexe III

Tableau V : Densité optique des cultures à différents pH

PH souches	PH4	PH5	PH6	PH7	PH8	PH9	PH10
S1	/	0.36	0.61	2.00	0.15	0.09	/
S2	/	0.18	0.31	0.52	0.49	0.54	/
S3	/	0.14	0.29	0.43	0.16	0.094	/
S4	/	0.41	0.49	0.83	0.91	1.27	/
S5	/	0.24	0.63	2.2	1.7	0.3	/
S6	/	0.21	0.23	0.24	0.30	0.62	/
S7	/	0.26	1.9	2.3	1.2	0.90	/
S8	/	0.32	0.38	1.9	1.1	0.57	/
S9	/	0.16	0.52	0.47	0.29	0.30	/
S10	/	0.11	1.1	1.6	1.5	0.45	/
S11	/	0.21	0.58	0.75	0.26	0.15	/
S12	/	0.15	0.25	0.45	0.26	0.13	/
S13	/	0.04	0.16	0.57	0.12	0.045	/
S14	/	0.19	0.17	0.92	1.31	0.70	/
S15	/	0.33	0.37	0.75	0.60	0.40	/
S16	/	0.10	0.46	1.22	1.19	1.47	/

/ : Absence de croissance

Annexe IV

Tableau IX : Résultats de la croissance sur certains carbohydrates

souches		Extrait de levure		Glucose		Saccharose		Fructose		Amidon		Dextrose		Glycérol	
		C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
S1	T1	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	++	+	+	-	+	+
	T2	+	+	+	++	+	+/-	+/-	-	++	+	+	-	+	+
S2	T1	++	+	++	+	+/-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	T2	++	++	++	+	+/-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
S3	T1	+	-	+	++	++	+	+	-	+	+	+	-	+	+/-
	T2	+	-	+	++	++	+	+	-	+	+	+	-	+	+/-
S4	T1	++	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	-	+/-	-
	T2	++	-	+	-	++	++	++	+	+	+	-	-	+/-	-
S5	T1	++	+/-	++	+	+++	+++	-	-	+	-	++	-	+/-	-
	T2	++	+/-	++	+	+++	+++	-	-	+	-	++	-	+/-	-
S6	T1	++	+/-	++	-	++	+	++	-	++	+	++	-	++	+/-
	T2	++	+/-	++	-	++	+/-	++	-	++	+	++	-	++	+/-
S7	T1	+	-	++	+	++	+	++	-	++	+	++	-	+++	++
	T2	+	-	++	+	++	+	+	-	++	+	+	-	+++	+
S8	T1	+++	-	++	+/-	++	+	++	+/-	+++	+	+	-	++	+/-
	T2	+++	-	++	+/-	++	+	++	+/-	+++	+	+	-	++	+/-
S9	T1	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+/-
	T2	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+/-
S10	T1	++	++	++	++	++	+++	+	-	++	-	++	+	++	+
	T2	++	++	++	++	++	+++	+	-	++	-	++	+	++	+
S11	T1	+	-	+	+	+	+	++	+/-	+	-	+	-	+	++
	T2	+	-	+	+	+	+	++	+/-	+	-	+	-	+	++
S12	T1	+	+/-	++	++	+	+	+	+	+	-	+	+	++	+
	T2	+	+/-	++	++	+	+	+	+	+	-	+	+	++	+
S13	T1	+	+	++	++	+	+	+/-	-	+	-	+	-	++	+/-
	T2	+	+	++	++	+	+	+/-	-	+	-	+	-	++	+/-
S14	V	+	+	++	+	+	+	-	-	++	++	++	+	++	+/-
	T2	+	+	++	+	+	+	-	-	++	++	++	+	++	+/-
S15	T1	++	++	++	+/-	+/-	+/-	+	-	++	+/-	++	-	++	-
	T2	++	++	++	+/-	+/-	+/-	+	-	++	+/-	+	-	++	-
S16	T1	++	+	+++	+++	++	+	++	+	+	+	++	+	+++	++
	T2	++	+	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+/-	+++	++

Annexe IV

souches		Salicine		Mannose		Ramnose		Tréhalose		cellobiose		maltose		xylose	
		C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
S1	T1	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	++	+	-	-
	T2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	++	+	-	-
S2	T1	+	+	+	+/-	++	+/-	++	++	+	-	++	++	-	-
	T2	+	+	+	+/-	++	+/-	++	++	+	-	++	++	-	-
S3	T1	+	+/-	+/-	-	+	+	++	++	++	+	++	+	-	-
	T2	+	+/-	+/-	-	+	+	++	++	++	+	++	+	-	-
S4	T1	+	+	+/-	-	+	+	++	+	+	+/-	+	-	-	-
	T2	+	+	+/-	-	+	+	++	+	+	+/-	+	-	-	-
S5	T1	+	+/-	++	+/-	+	-	++	+	+/-	+/-	++	++	-	-
	T2	+	+/-	++	+/-	+	-	++	+	+/-	+/-	++	++	-	-
S6	T1	+	-	-	-	+	+/-	++	++	+/-	+/-	-	-	-	-
	T2	+	-	-	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-
S7	T1	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	++	+	++	++	++	++	-	-
	T2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	++	+	++	++	++	++	-	-
S8	T1	+	+/-	+	+/-	+/-	-	++	++	++	++	++	++	-	-
	T2	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+	+	++	++	+	+	-	-
S9	T1	+	+	+	+/-	+	+/-	++	++	++	++	++	+++	-	-
	T2	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	++	++	+	++	-	-
S10	T1	+/-	-	+/-	-	+/-	-	++	+	+	+	++	++	-	-
	T2	+/-	-	+/-	-	+/-	-	++	+	+	+	+	+	-	-
S11	T1	++	++	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	+	++	++	-	-
	T2	+	+	-	-	+/-	+/-	++	++	++	+	+	+/-	-	-
S12	T1	+	+	+/-	-	++	+	++	++	++	+	+++	+	-	-
	T2	+	+	+/-	-	++	+	++	+	++	+	+++	+	-	-
S13	T1	+	+	-	-	+/-	-	++	++	+	+	++	+	-	-
	T2	+	+	-	-	+/-	-	++	++	+	+	++	+	-	-
S14	T1	++	+/-	-	-	-	-	++	+/-	+	+/-	++	++	-	-
	T2	++	+/-	-	-	-	-	++	+/-	+	+/-	++	++	-	-
S15	T1	+/-	+/-	++	+	+	-	++	+	-	-	++	+	-	-
	T2	+/-	+/-	++	+	+	-	++	+	-	-	++	+	-	-
S16	T1	+	+	+	-	+	-	++	+	+	+/-	++	+/-	-	-
	T2	+/-	+/-	+	-	+	-	++	+	+	+/-	++	+/-	-	-

- : absence d'utilisation +/- : faible utilisation. + : utilisation. ++ : bonne utilisation

C : croissance. **P** : pigmentation

References Bibliographiques

A

- ❖ **Alison Besse, Jean Peduzzi, Sylvie Rebuffat, Alyssa Carr_e-Mlouka.**(2015). Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins.journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi. *Biochimie* 118 (2015) 344e355.
- ❖ **Atanasova, N. Pietilä, M. Oksanen, M.** (2013). Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier. *MicrobiologyOpen* published by John Wiley & Sons Ltd. 2013.

B

- ❖ **Bharti, P. & Apaxa, A.** (2012). Diversity of Halophilic Archaea at Salt Pans Around Bhavnagar Coast, Gujarat. *The National Academy of Sciences, India* 2012.

C

- ❖ **CAI, Lei, Jing, H., Feng,C., Priya, D. & Hua, X.** (2012). Cellular and organellar membrane-associated proteins in haloarchaea: Perspectives on the physiological significance and biotechnological applications. 404–414, doi: 10.1007/s11427-012-4321-z.

D

- ❖ **Dworkin Martin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt.** (2006). *The Prokaryotes*. © 2006 Springer Science+Business Media, LLC.

E

- ❖ **Enache, M., Popescu, G., Dumitru, L. et Kamekura M.** (2009). The effect of Na⁺/Mg²⁺ ratio on the amylase activity of haloarchaea isolated from tichirghiol lake, Romania, a low sal environment. *Biology*.
- ❖ **Evrin Yildiz, Birgül OZCAN et Mahmut CALISKAN.** (2012). Isolation, characterization and phylogenetic Analysis of the halophilic Archaea from a mine of salt in central Anatolia (Turkey). *Polish Newspaper of microbiology*. 2012, Vol.61, n° 2, 111-117.

F

- ❖ **Falb, M. et al.** (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Springer* link.

J

H

References Bibliographiques

- ❖ **Handbook.** (2009). Protocols for haloarchaeal genetics. springlink
- ❖ **Henriet,O., Fourmentin, J., Delincé, J., Mahillon, j.** (2014). Exploring the diversity of extremely halophilic archaea in food-grade salts. Copyright © 2016 Elsevier B.V. or its licensors or contributors. ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.2016.

I

G

- ❖ **George W., Hutcheon, Nishi Vasisht, Albert Bolhuis.** (2005). Characterisation of a highly stable *a*-amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. DOI 10.1007/s00792-005-0471-2.
- ❖ **Gonzalez1, R. et al .**(2009). Archaeosomes made of *Halorubrum tebenquichense* total polar lipids: a new source of adjuvancy. licensee biomed central ltd. 1472-6750-9-71.
- ❖ **Gribaldo,S. Fortere, P., Armanet,C., B.** (2008). Les *Archaea* : Evolution et diversité du troisième domaine du vivant. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*, 23, (3), 2008.

K

- ❖ **Kanekar, P.,P., S. P. Kanekar, Kelkar, A., S. Dhakephalkar P., K.** (2012). Halophiles- Taxonomy, diversity, physiology and applications. DOI 10.1007/978-94-007-2229-3_1, © Springer Science+Business Media B.V. 2012
- ❖ **Kharoub, K., Gomri, M., A., Aguilera, M., A., Aguilera, M. et samchez, M.** (2014). Africanjournal of microbiology research.PP3992-4001
- ❖ **Kozubal,M. Romine,M, Jennings,M.Jay,Z. Tringe,S.Rusch,D. Beam,P. Lee Ann McCue,L& Inskeep,W.** (2013). Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. *The ISME Journal* (2013) 7, 622–634; doi:10.1038/ismej.2012.132; published online 15 November 2012.

L

- ❖ **Lithfield,C.**(2011).potential for industrial products from the halophilic archaea. *J ind microbial biotechnol.*38:1635-1647.

M

References Bibliographiques

- ❖ **Mancinelli, L., R. et al.** (2009). *Halorubrum chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1908–1913.

N

- ❖ **Nunoura, T. et al.** (2010). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Oxford University Press* 2010.

O

- ❖ **O'Connor, E., M., et Shand, R., F.** (2002). Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2002) 28, 23–31.
- ❖ **Okafor, N.** (2011). *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- ❖ **Oren, A., Ginzburg, M., Ginzburg, Z., B., Hochstein, L., I. et Volcan, B., E.** (1990). *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov. nom. rev. An Extremely Halophilic Bacterium from the Dead Sea. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, p. 209-210
- ❖ **Oren, A.** (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 56–63.
- ❖ **Oren, A.** (2002). Intracellular salt concentrations and ion metabolism in halophilic microorganisms. *SpringerLink*
- ❖ **Oren, A.** (2006). Life at high salt concentration. *prokaryotes*, 2, 263-282.
- ❖ **Oren, A.** (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Licensee BioMed Central Ltd. *Saline Systems* 2008, 4:2 doi:10.1186/1746-1448-4-2.
- ❖ **Oren, A.** (2009). Microbial diversity and microbial abundance in salt-saturated brines: Why are the waters of hypersaline lakes red? *Digital Commons@USU*, 2009.
- ❖ **Oren**

References Bibliographiques

- ❖ **Oren,A.**(2014). The Family Halobacteriaceae. The Prokaryotes – Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea, DOI 10.1007/978-3-642-389542_313, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014
- ❖ **Oren,A.**(2014). Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles* 18:825–834.
- ❖ **Oren,A.**(2015). Pyruvate: A key Nutrient in Hypersaline Environments?. *Microorganisms*.ISSN 2076-2607 .www.mdpi.com/journal/microorganisms.

P

- ❖ **Pathak, A., P. et Gsardar, A.** (2012).isolation and characterization of caroteniod producing haloarchaea from solar salterm of mulund, mumbia,india.indian. *journal of naturel products and resource*.PP.484-488.
- ❖ **Pramanik,A et al.** (2012). Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by Haloarcula marismortui. *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic*, v.v.i. 2012.

Q

R

S

- ❖ **Sergiu Fendrihan, Andrea Legat, Marion Pfaffenuemer , Claudia Gruber, Gerhard Weidler , Friedrich Gerbl, Helga Stan-Lotter.** (2006). Extremely halophilic archaea and issue of long-term microbial survival. © Springer Science+Business Media B.V. Correspondence to: Helga Stan-Lotter. pp 125-140.

T

V

- ❖ **Ventosa,A.**(2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats:hypersaline Environments. Cambridge *University Press*. ISBN 0 000 00000 0 ©SGM 2006.
- ❖ **Ventosa,A.** (2014). Archaea. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014
- ❖ **Ventosa,A . Habar,R . Porro,C.& Papke,T.** (2015). Microbial diversity of hypersaline environements : a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology* 2015, 25:80–87.

References Bibliographiques

- ❖ **Vijay Kumar, Jyoti Saxena, Santosh Kumar Tiwari.** (2015) . Description of a halocin-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. Arch Microbiol (2016) 198:181–192 DOI 10.1007/s00203-015-1175-3.

W

X

Y

- ❖ **Yanhe Ma, Erwin A., Galinski, William D., Grant, Aharon Oren, et Antonio Ventosa.**(2010). Life in Saline Environments. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2010, p. 6971–6981 210099-2240/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.01868-10 Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Z

Résumé

Les microorganismes extrêmophiles dont les *Haloarchaea* ont une remarquable adaptation à des environnements hypersalins. Leurs variabilités physiologiques et métaboliques et leurs potentiels biotechnologiques ont suscité l'intérêt des chercheurs.

Notre travail porte sur la caractérisation morphologique, physiologique et métabolique de quelques souches d'haloarchées isolées de la sebkha d'Ouargla, des salines de Batna, Ichekaben et Oran.

La croissance en fonction de certains facteurs clés (concentrations de Na Cl et de MgSO₄, l'intervalle de pH) a été étudiée. La source de carbone métabolisée, la production d'enzymes hydrolytiques et d'halocines ont été déterminées.

Les résultats montrent que les souches utilisent toutes les sources de carbones testées à l'exception du xylose. Toutes les souches sont caractérisées par de fortes activités enzymatiques : amylolytique, protéolytique, lipolytique et surtout gélatinolytique. 05 des souches étudiées sont actives contre *Halobacterium salinarum* DSMZ3754, avec une inhibition de 10 jusqu'à 28mm de diamètre. Elles sont donc potentiellement productrices d'enzymes hydrolytiques et d'halocines.

Mots clé : Métabolisme, Physiologie, halophiles extrêmes, croissance, source de carbone, Enzymes hydrolytiques, Halocine.

Abstract

The extremophile microorganisms who are *Haloarchaea* have a remarkable adaptation to hypersaline environments. Their physiological and metabolic variability and their biotechnological potential have attracted the interest of researchers.

Our work focuses on the morphological, physiological and metabolic characterization of some haloarchaeal strains isolated from sebkha of Ouargla and brine of Batna, Ichekaben and Oran. Growth based on certain key factors (concentrations of NaCl and MgSO₄, the pH range) were studied. The metabolized carbon source, production of hydrolytic enzymes and halocines were determined. The results show that the strains use all the carbon sources tested with the exception of xylose. All strains are characterized by high enzymatic activities: amylolytic, proteolytic, lipolytic and especially gelatinolytic. 05 of the strains studied are active against *Halobacterium salinarum* DSMZ3754, with an inhibition diameter of 10 to 28mm. They are therefore potentially producing hydrolytic enzymes and halocines.