

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'état en
Génie Biologique

**ESSAIS D'IDENTIFICATION ET ACTIVITÉ
ANTI-ARCHÉENNE DE SOUCHES
D'ARCHÉES HALOPHILES EXTRÊMES
ISOLÉES À PARTIR DU CHOTT EL BEIDA
AU SUD D'EL EULMA (SÉTIF).**

Présenté par:

BOUALI Nabil
BRAHIMI Samy El Hachemi

Membres du jury:

Président de jury : Mr BENDJEDDOU Kamel

Promoteur : Mme YAHIAOUI Houa

Co-Promoteur : Mr BENABBAS Chaouki

Examineur : Mlle TITELI Fatiha

Université de Béjaïa

Université de Béjaïa

Université de Constantine

Université de Béjaïa

Année Universitaire 2011-2012

Dédicaces

Je dédie ce travail

À ceux qui m'ont donné la vie, qui m'ont élevé et tout appris, qui seront à jamais mes modèles, et que j'aime tant ma mère et mon père

À celui qui est le plus beau à mes yeux, au jeune homme qu'il est devenu et qui inspire joie et bonne humeur, dont je suis fier et que j'aime tant mon frère
Massyl

À ceux qui ont toujours eu une pensée pour moi, à mes tantes et oncles, à mes cousins et cousines que j'aime

À la mémoire de la bienveillante Fatima et à la petite neige Nidja qui auront été sûrement fières de leur petit fils qui les aime fort

À ma seconde famille, ceux qui m'ont encouragé et soutenu, ceux qui ont toujours été là pour moi, ceux qui m'ont offert leur aide quand j'en avais besoin, ceux avec qui j'ai passé de merveilleux moments, à mes amis

Samy El-Hachemi

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ceux qui, grâce à leurs encouragements, leur présence, leurs conseils, leur soutien et leur persévérance j'ai pu dépasser tous les obstacles, à mes très chers parents que je ne saurai remercier

A ceux qui ont toujours été là pour moi, mes frères Rabah et Zoubir et sœurs Fatma et Sihem

A toute ma famille, en particulier mes cousins et cousines qui ont montré une totale disponibilité à chaque sollicitation

A tous mes amis

Nabil

Remerciements

Nous remercions Mr Bendjeddou d'avoir accepté de présider notre jury ainsi que Mlle Titeli d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos plus sincères remerciements à notre promotrice, Mme Yahiaoui Houa pour ses conseils avisés, sa disponibilité, sa confiance et ses encouragements qui nous ont accompagnés tout au long de la réalisation de ce travail au sein du laboratoire de Génie Biologique.

Nous remercions ensuite notre co-promoteur Mr Benabbas Chaouki pour l'aide précieuse et les nombreux efforts qu'il a entrepris afin que nous puissions mener à bien nos recherches.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à Mr Demdoum Abdestam de l'Université de Constantine, pour ses recommandations lors du choix du site de prélèvements, ainsi qu'à Mr Abdelkrim, technicien du laboratoire d'hydrogéologie de Constantine, à Mr Saaou, du laboratoire d'hydrologie de Béjaia et à Mr Saadi technicien du laboratoire de chimie dont l'accueil et le sérieux ont grandement contribué à la bonne marche de ce travail.

Nous tenons aussi à remercier chaleureusement à Mr Benallaoua, Mme Gharout et Mme Benachour du laboratoire de microbiologie appliquée ainsi que Mme Bradai du laboratoire de chimie industrielle, Dr Azouaou de l'hôpital Khelil Amrane pour leurs sollicitudes.

Nos remerciements vont également à Mr Amrouche, Mme Rahmani, Mme Kherbachi ainsi que tout le personnel du laboratoire de Microbiologie, Mme Aklil et Mme Adjiri dont la générosité nous a permis de réaliser nos expérimentations.

Une mention particulière à la doctorante M^{lle} Souhila Mazguene pour son soutien et ses suggestions, ainsi qu'aux étudiants Leila, Saadia et Ahmed du laboratoire de mycologie pour leur aide.

Liste des abréviations

2D : deux Dimensions.

ADN : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique

ADNr : **ADN** ribosomique

ARN : Acide **R**ibonucléique

ATP : Adénosine **T**ri **P**hosphate

CO₃⁻ : carbonates

DSM : **D**eutsche **S**ammlung von **M**ikroorganismen

DSMZ : **D**eutsche **S**ammlung von **M**ikroorganismen and **Z**ellkulturen

DO: **D**ensité **O**ptique

EDTA : Acide **E**thylène **D**iamine **T**étracétique

GPS : **G**lobal **P**ositioning **S**ystem

KCl : chlorure de potassium

kDa : Kilos Dalton

KOH : hydroxyde de potassium

M : molaire

MCAM : **M**olécules de **C**ommunication et **A**daptation des **M**icroorganismes

meq : milliéquivalent

MgSO₄ : sulfate de magnésium

MLSA : **M**ulti **L**ocus **S**equence **A**nalysis

MNHN : **M**uséum **N**ational d'**H**istoire **N**aturelle

NaCl : Chlorure de sodium

ONPG : **O**rtho-**N**itro-**P**hénol-**G**alactopyranoside

PG : **P**hosphatidyl **G**lycérol

PGP-Me : **P**hosphatidyl **G**lycérol **P**hosphate **M**éthyle ester

pH : potentiel hydrogène

SO₄²⁻ : sulfates

Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau I : Composition ionique des environnements hyper-salins.	5
Tableau II : Les halophiles, halotolerants et solutés compatibles.	9
Tableau III : Proportion de phospholipides PGP-Me et PG chez certaines souches d'archées halophiles et d'autres halotolérantes et faiblement halophiles.	15
Tableau IV : Analyses physico-chimiques de l'eau du Chott El Beida.	29
Tableau V : Tableau comparatif des résultats physico-chimiques entre Chott El Beida (Algérie) et le Grand Lac Salé de l'Utah (USA).	29
Tableau VI : Aspect des colonies.	33
Tableau VII : Observation à l'état frais et de la coloration de Gram.	34
Tableau VIII : Résultats des tests anti-archéens.	36
Tableau IX : Résultats des tests d'activité du culot, du surnageant et de la culture elle même.	38
Tableau X : Résultats de quelques tests biochimiques sur les souches sélectionnées.	40

Tableaux en annexe

Titre	Page
Tableau XI : Comparaison des principales caractéristiques des trois domaines du vivant.	3
Tableau XII : Souches sélectionnés, leur abréviation, nom, origine et leur site de prélèvement.	5
Tableau XIII : Résultats de l'activité antagoniste par la méthode des stries croisées.	6-7
Tableau XIV : Résultats du test de sensibilité à certains antibiotiques.	7

Liste des figures

Titre	Page
Figure 1 : Exemples de lacs hyper-salés.	2
Figure 2 : Photographie de Sebkhia Ezzemoul Aïn M'lila (Algérie).	3
Figure 3 : Photographie Satellite du bassin versant d'El Eulma (Algérie).	3
Figure 4 : Arbre du vivant et la distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre.	5
Figure 5 : Schéma représentatif des différents mouvements ioniques à travers la membrane plasmique des archées halophiles aérobies de la famille des <i>Halobacteriaceae</i> .	7
Figure 6 : Quelques solutés compatibles utilisés par les archées pour l'osmoadaptation.	8
Figure 7 : la branche du domaine des Archaea.	10
Figure 8 : Quelques types morphologiques d'haloarchées.	13
Figure 9 : <i>Halobacterium salinarum</i> .	14
Figure 10 : Schéma d'une S-layer.	14
Figure 11 : Diphtanylglycerol diether présent dans la membrane des archées.	15
Figure 12 : Structure de PGP-Me et PG.	16
Figure 13 : Modèle structural d'une Bactériorhodopsine.	18
Figure 14 : Les différents sous-bassins du bassin versant d'El Eulma.	19
Figure 15 : Photographies <i>in situ</i> de Chott El Beida.	20
Figure 16 : Vue satellitaire du site de prélèvement.	20
Figure 17 : Isolement sur Br7, après deux semaines d'incubation, à partir d'échantillons d'eau Zone I (A, B), II (C) et IV (D).	30
Figure 18 : Isolements sur MC7 à partir des solutions mères de terre (A) et de sel (B, C) après deux semaines d'incubation.	31
Figure 19 : Photographie des souches isolées et sélectionnées en culture liquide.	33
Figure 20 : Coloration de Gram pour la BSIII et BWIII ₂ Coccis en chaine Gram(-).	35
Figure 21 : Photographie sous microscope électronique à balayage des souches BSIII BGI et BWIII.	35
Figure 22 : Halos d'inhibition de certaines souches isolées sur des souches d'archées halophiles extrêmes.	37
Figure 23 : Résultats du test des stries croisées.	39
Figure 24 : Photographie de quelques résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques.	40
Figure 25 : Photographie de quelques résultats de dégradation d'amidon (A et B) et de caséine (C et D).	41

Glossaire

Battement ectopique : est un battement supplémentaire qui peut venir de la cavité supérieure (les oreillettes) ou de la cavité inférieure du cœur (le ventricule).

Dolomite : est une espèce minérale formée de carbonate de calcium et de magnésium.

Ecosystème : désigne l'ensemble formé par une association ou communauté d'êtres vivants et leur environnement.

Halite : ce mot vient du grec *hals* = sel, et *lithos* = pierre c'est le minéral composé de NaCl.

Infarctus : est défini par la mort brutale et massive de cellules (nécrose irréversible d'une partie d'un organe), en rapport avec un manque d'oxygène.

Ischémie : est la diminution de l'apport sanguin artériel à un organe. Cette diminution entraîne essentiellement une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organe en dessous de ses besoins (*hypoxie*), et la perturbation, voire l'arrêt de sa fonction.

Latitude : est une coordonnée géographique représentée par une valeur angulaire, expression de la position d'un point sur Terre, au nord ou au sud de l'équateur qui est le plan de référence.

Longitude : est une coordonnée géographique représentée par une valeur angulaire, expression du positionnement est-ouest d'un point sur Terre. La longitude de référence sur Terre est le méridien de Greenwich.

Mio (Miocène) : est l'époque qui s'étend de $23,03 \pm 0,05$ à $5,332 \pm 0,005$ millions d'années. Elle est suivie par le Pliocène. Elle a été nommée ainsi par Charles Lyell à partir du grec *meion* = moins et *kainos* = nouveau, *moins récent* car cette période comporte moins d'invertébrés marins modernes que le Pliocène.

Osiose : est une diffusion des molécules d'eau traversent une membrane semi-perméable qui sépare deux liquides dont les concentrations en produits dissous sont différentes.

Plio (Pliocène) : est l'époque qui s'étend de $5,332 \pm 0,005$ à $2,588 \pm 0,005$ millions d'années, elle a été nommée ainsi par Charles Lyell à partir du grec *pleion* = plus et *kainos* = nouveau, *plus récent* en référence aux mammifères déjà essentiellement modernes.

Quaternaire : il désigne une période géologique récente, qui se poursuit actuellement. Elle est caractérisée par le retour de cycles glaciaires.

Rhomboïde : forme d'un parallélogramme ou en losange.

Saumure : est une solution aqueuse de chlorure de sodium, à une concentration supérieure à celle de l'eau de mer.

Taxonomie : est la science qui a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier puis les nommer et enfin les classer.

Trias : est un système géologique, subdivision de l'ère Mésozoïque comprise entre $-251 \pm 0,4$ et $-199,6 \pm 0,6$ millions d'années, il est précédé par le Permien et suivi par le Jurassique (**Doc.Internet**).

Sommaire

Pages

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

Introduction

1

Revue bibliographique

Chapitre I : Environnements hyper salins

2

I. Généralités

2

II. Caractéristiques physico-chimiques

4

III. La vie en milieux hyper salins

5

IV. Adaptation aux milieux hyper salins

6

Chapitre II : Archées halophiles extrêmes

10

I. Généralité

10

1. Historique

10

2. Taxonomie

10

3. Comparaison entre les trois domaines de la vie

11

II. Définition des archées halophiles extrêmes

11

III. Caractères généraux

12

1. Caractères morphologiques

12

2. Caractères membranaires

14

3. Caractères intracellulaires

16

Sommaire

	Pages
IV. Intérêts biotechnologiques des halophiles extrêmes	17
<u>Partie expérimentale</u>	
<u>Chapitre I : Matériel et méthode</u>	19
I. Matériel	19
II. Echantillonnage	19
1. Lieu de prélèvement	19
2. Les échantillons	21
III. Physico-chimie	22
IV. Isolement et repiquage	23
1. Milieu de culture et solution mère	23
2. Isolement	23
3. Repiquage	24
V. Identification et activité anti-archéenne des souches isolées	25
1. Etude morphologique	25
2. Recherche de l'activité antagoniste	25
3. Sensibilité à quelques antibiotiques	26
4. Identification biochimique	27
<u>Chapitre II : Résultats et discussion</u>	29
I. Physico-chimie	29
II. Isolements et repiquages	30
1. Isolements	30
2. Repiquages	32
III. Identification et activité des souches	33
1. Etude morphologique	33

Sommaire

	Pages
2. Recherche de l'activité anti-archéenne	36
3. Sensibilité aux antibiotiques	39
4. Tests biochimiques	40
<i>Conclusion</i>	43
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	

Il existe dans ce monde, en dehors des conditions de vie « normales », des conditions de vie dites « extrêmes » au sein d'environnements qui hébergent des microflore atypiques particulièrement adaptées à ces milieux. Parmi ces derniers, on peut citer les milieux hyper salins considérés comme étant des environnements extrêmes de par leur concentration très élevée en sel, tel que le Grand Lac Salé de l'Ouest Américain et aussi la Mer Morte.

Dans ce genre d'écosystèmes, on peut isoler une catégorie particulière de microorganismes pouvant croître exclusivement en présence de concentrations salines très élevées (entre 1,5 et 5 M NaCl) et il s'agit, entre autres, des archées halophiles extrêmes.

Les constituants cellulaires et les biomolécules produites par les archées halophiles extrêmes constituent un modèle unique de stabilité aux conditions de vie extrêmes. Cette caractéristique leur confère une qualité supplémentaire pour l'exploitation en biotechnologie en qualité de production de nouvelles molécules actives (halocines, enzymes, etc.) utilisables dans plusieurs domaines. Les halocines sont des composés antimicrobiens de nature protéique produits par des microorganismes halophiles. Ces composés joueraient un rôle dans les compétitions microbiennes des écosystèmes hypersalins.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche ayant pour objectif la recherche et l'étude de nouvelles souches d'archées halophiles productrices de nouvelles halocines.

Cette étude est composée de deux parties :

- Une partie théorique composée d'un chapitre concernant les environnements hyper salins et un autre concernant les archées halophiles extrêmes.
- Une partie expérimentale constituée de la partie méthodologie et résultats.

L'étude expérimentale a pour objectifs :

- Isoler des souches d'archées halophiles à partir de trois sortes d'échantillon : sol, sel et eau et cela à partir d'un nouveau site non exploité et écologiquement non pollué : Chott El Beida, situé au sud de la région de El Eulma, wilaya de Sétif.
- Sélectionner des souches actives, productrices de substances antimicrobiennes grâce aux tests d'antagonisme vis-à-vis de souches connues d'haloarchées.
- Caractériser les souches par quelques testes : morphologiques et biochimiques.

I. Généralités

Les environnements hyper salins sont définis comme étant des milieux contenant des concentrations en sels plus élevées que celles de l'eau de mer. Cependant, pour une définition plus spécifique des environnements hyper salins, on doit tenir compte, mis à part la concentration en sel, de l'origine de l'eau et des types de sels (**DasSarma et Arora, 2001**).

Les environnements hyper-salins peuvent être divisés en deux groupes : les **thalassohalins** qui sont des environnements tenant leur origine de l'évaporation des eaux de mer et par conséquent leur composition ionique est la même ; l'autre groupe correspond aux environnements **athalassohalins** dont la composition ionique diffère complètement de celle de l'eau de mer (**Litchfield, 1998**).

La figure 1 présente un exemple de chaque type d'environnements hyper-salins.



Figure 1 : Exemples de lacs hyper-salés (**Google Earth**).

Les deux plus grands lacs hyper-salés étudiés sont : le Grand Lac Salé à l'Ouest des Etats Unis et la Mer Morte au Moyen Orient qui est la plus profonde avec 340m ayant aussi une grande concentration en magnésium (Mg^{++}) (44 g/l) (**DasSarma et Arora, 2001**).

Outre ces deux principaux lacs, il existe des environnements pouvant faire l'objet d'études. Il s'agit des Chotts et Sebkhass qui sont des vases salées périodiquement inondables surtout pendant la saison des pluies et recouvertes par des croûtes salines pendant la saison sèche (Figure 2).



Figure 2 : Photographie de Sebka Ezzemoul Aïn M'lila (Algérie) (Kharroub, 2007)

Ces Chott et Sebchas sont des cuvettes fermées à l'intérieur d'un Bassin versant qui a une fonction de collecteur : il recueille les précipitations et les transforme en écoulements depuis les sommets des reliefs montagneux, appelés lignes de crêtes, qui le délimitent jusqu'à ces cuvettes et par conséquent les alimente en eau (Demdoum, 2010). La figure 3 montre un exemple de bassin versant. Il s'agit de celui d'El Eulma dans la Wilaya de Sétif (Algérie) regroupant des Chotts et Sebchas.

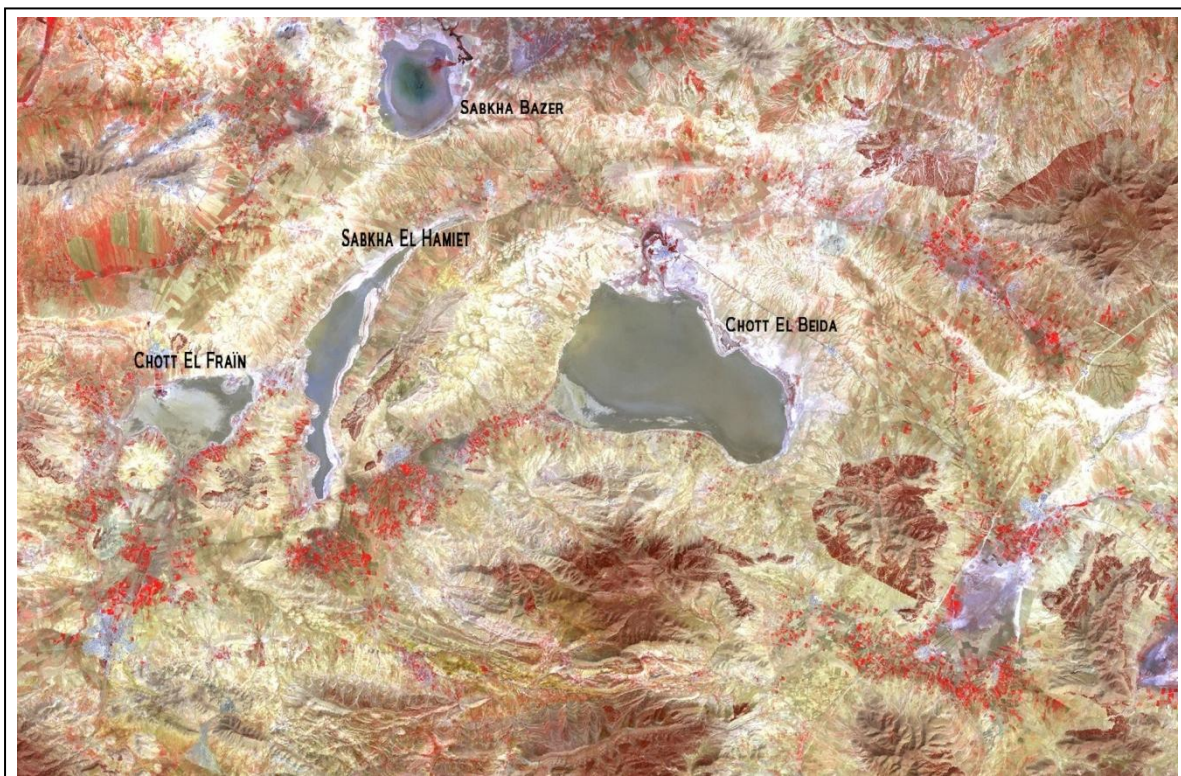


Figure 3 : Photographie Satellite du bassin versant d'El Eulma (Algérie) (Google Earth).

Au niveau des Chotts et Sebkhass, l'évaporation s'exerce sur des eaux pratiquement stagnantes et se traduit par l'apparition de saumures proches de leur point de saturation (**Demdoun, 2010**).

Il y'a aussi le sol où le facteur sel peut agir, les sols ayant une concentration en sels solubles supérieures à 0,2% sont considérés comme milieux salins (**Kharroub, 2007**).

II. Caractéristiques physico-chimiques

La salinité des saumures se définit comme la somme des cations et des anions qu'ils contiennent. Le principal sel, présent en quantité quasi inépuisable est le chlorure de sodium (NaCl). La majorité des eaux hyper salines contiennent 8 à 10 fois plus de sels dissous totaux que l'eau de mer (**Caumette, 1998**).

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

Dans les environnements **athalassohalins**, en plus de l'ion Na^+ , d'autres ions prédominent, comme l'ion Mg^{2+} dans la Mer Morte (**Larsen, 1980**).

Les lacs hyper salés alcalins présentent une autre variation dans la composition ionique. Il y'a prédominance d'anions (carbonates et chlorures), et de cations (Na^+). Le pH des lacs hyper salins est généralement neutre ou légèrement alcalin alors que celui de la Mer Morte est légèrement acide (Tableau I) (**Litchfield, 1998**).

Tableau I : Composition ionique des environnements hyper-salins (Litchfield, 1998)

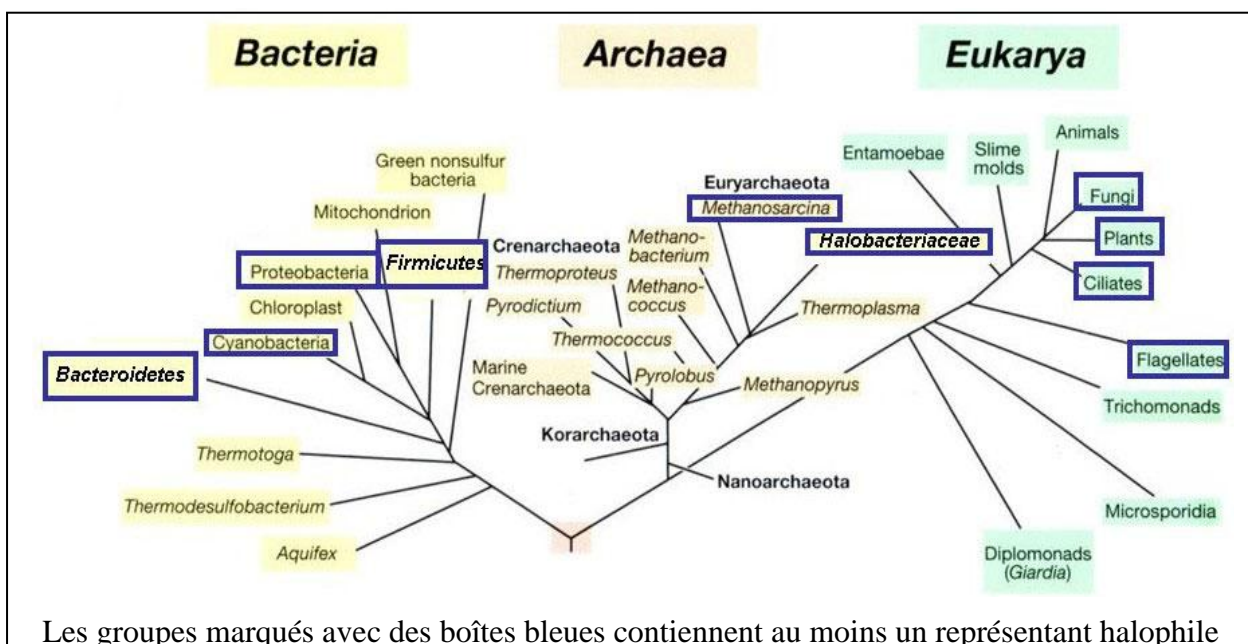
Composition ionique	Concentrations (g/l)					
	Lac Magadi (Kenya)	Lac Naturn Zugm (Egypte)	Grand Lac Salé de l'Utah (USA)	Mer Morte (Moyen Orient)	Eau de mer	Bassin de cristallisation de San Diego (USA)
Na ⁺	46	142	105,4	40,1	10,6	120
K ⁺	0,06	2,3	6,7	7,65	0,8	52
Ca ²⁺	0,0007	0,0	0,3	17,2	0,40	3,01
Mg ²⁺	-	0,0	11,1	44	1,27	14,4
Cl ⁻	14	154,6	181	224,9	18,9	210
CO ₃ ⁻	34,9	67,2	0,27	0,077	0,14	24,5
SO ₄ ²⁻	-	22,6	27	0,45	2,65	-
Azote total	0,038	-	4,3-7,2	-	-	-
pH	10,35	11	7,7	5,9-6,3	8,1	-

(‘-‘ non déterminé)

Dans le cas des Chotts et Sebchas, les ions calcium et magnésium (Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺) proviennent du lessivage des calcaires et dolomites constituant les massifs, l'ion sodium (Na⁺) provient surtout du lessivage des faciès triasiques salifères et des formations récentes Mio-Plio-Quaternaires ce qui explique aussi les grandes concentrations en chlore (Cl⁻) (Demdoum, 2010).

III. La vie en milieux hyper salins

Il est clair que les halophiles sont trouvés dans les trois domaines : *Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya*. La Figure 4 indique que ces domaines contiennent des représentants halophiles.



Les groupes marqués avec des boîtes bleues contiennent au moins un représentant halophile

Figure 4 : Arbre du vivant et la distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre (Oren, 2008).

Dans le domaine *Archaea*, nous trouvons la plupart des microorganismes exigeant en sel dans l'ordre *Halobacteriales*, qui contient une seule famille, *Halobacteriaceae*. L'Halophilisme est répandu dans le règne bactérien : le phylum *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes*. Avec quelques exceptions notables, les microorganismes eucaryotes forment un groupe tristement négligé tant par l'étude de leur distribution dans des environnements hyper-salins que leur adaptation physiologique. Les algues vertes unicellulaires du genre *Dunaliella* sont examinées de façon détaillée. Etant donné qu'ils sont les principaux ou uniques « acteurs » dans beaucoup d'environnements hyper-salins, ils sont devenus un système 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**).

La concentration en sel requise pour la croissance et maximale supportée dépend souvent de la composition du milieu et de la température de croissance. Les définitions les plus utilisées ont été formulées il ya trente ans par Kushner qui distingue des catégories différentes : Halophiles extrêmes (2,5 à 5,2M de NaCl), halophiles modérés (0,5 à 2,5M de NaCl) et les microorganismes qui ne montrent pas d'exigence absolue en sel pour la croissance (**Oren, 2008**).

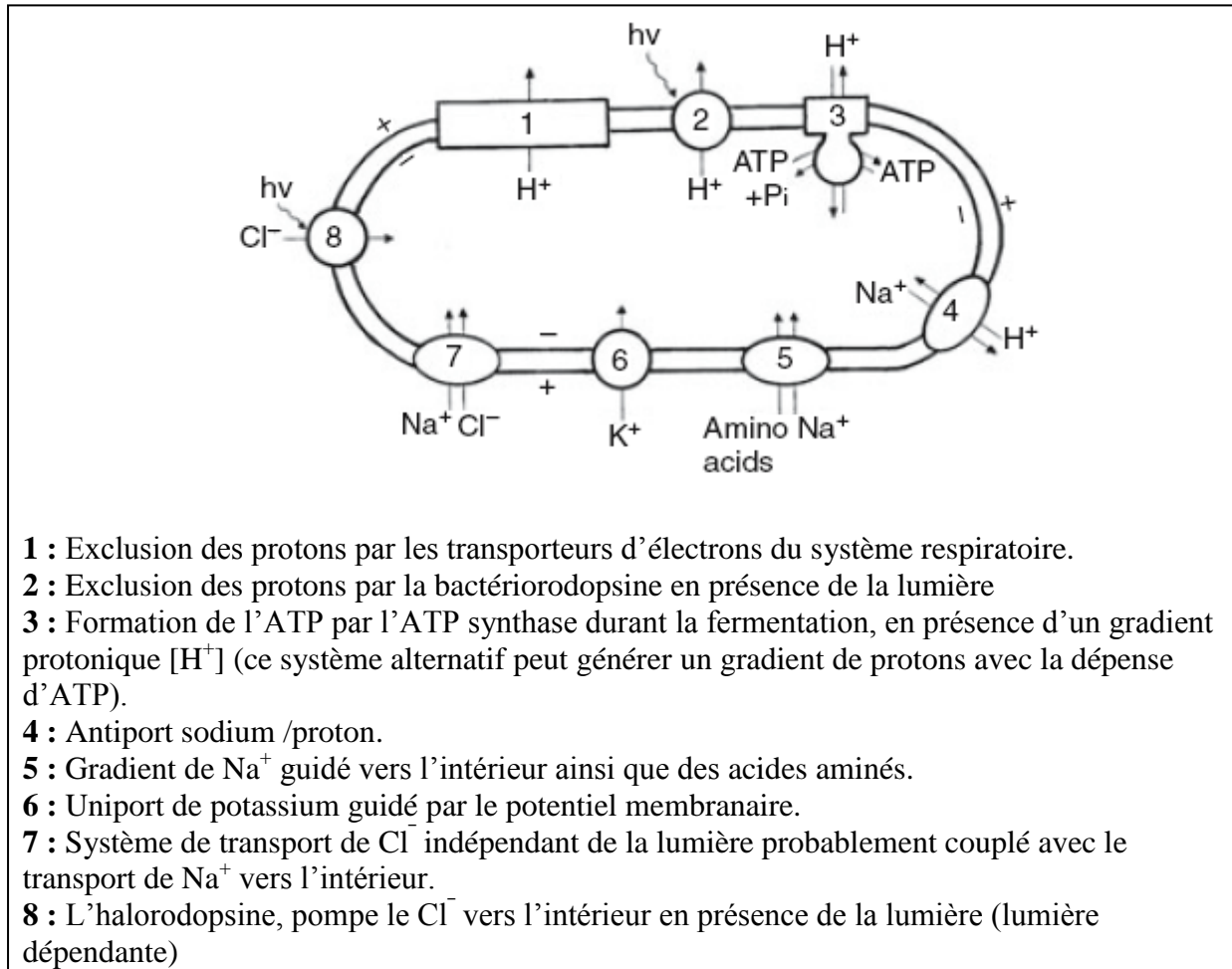
IV. Adaptation aux milieux hyper-salins :

Le fait que le cytoplasme des micro-organismes halophiles soit iso-osmotique avec le milieu environnant 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 (KCl) 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. Ces microorganismes ne peuvent généralement pas survivre dans des milieux à basses concentrations en sels (**Oren, 2008**). Ces différents mouvements ioniques sont illustrés par la figure 5.



- 1 : Exclusion des protons par les transporteurs d'électrons du système respiratoire.
- 2 : Exclusion des protons par la bactériorodopsine en présence de la lumière
- 3 : Formation de l'ATP par l'ATP synthase durant la fermentation, en présence d'un gradient protonique [H⁺] (ce système alternatif peut générer un gradient de protons avec la dépense d'ATP).
- 4 : Antiport sodium /proton.
- 5 : Gradient de Na⁺ guidé vers l'intérieur ainsi que des acides aminés.
- 6 : Uniport de potassium guidé par le potentiel membranaire.
- 7 : Système de transport de Cl⁻ indépendant de la lumière probablement couplé avec le transport de Na⁺ vers l'intérieur.
- 8 : L'halorodopsine, pompe le Cl⁻ vers l'intérieur en présence de la lumière (lumière dépendante)

Figure 5 : Schéma représentatif des différents mouvements ioniques à travers la membrane plasmique des archées halophiles aérobies de la famille des *Halobacteriaceae* (**Oren, 2006**).

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 hautes concentrations 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, nous trouvons 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 trouvée dans la nature, les β-acides aminés (β-glutamine, β-glutamate et Nε-acetyl-β-lysine) et les dérivés qui sont rarement trouvés dans d'autres groupes (Oren, 2008).

La figure 6 résume quelques solutés compatibles utilisés par les archées.

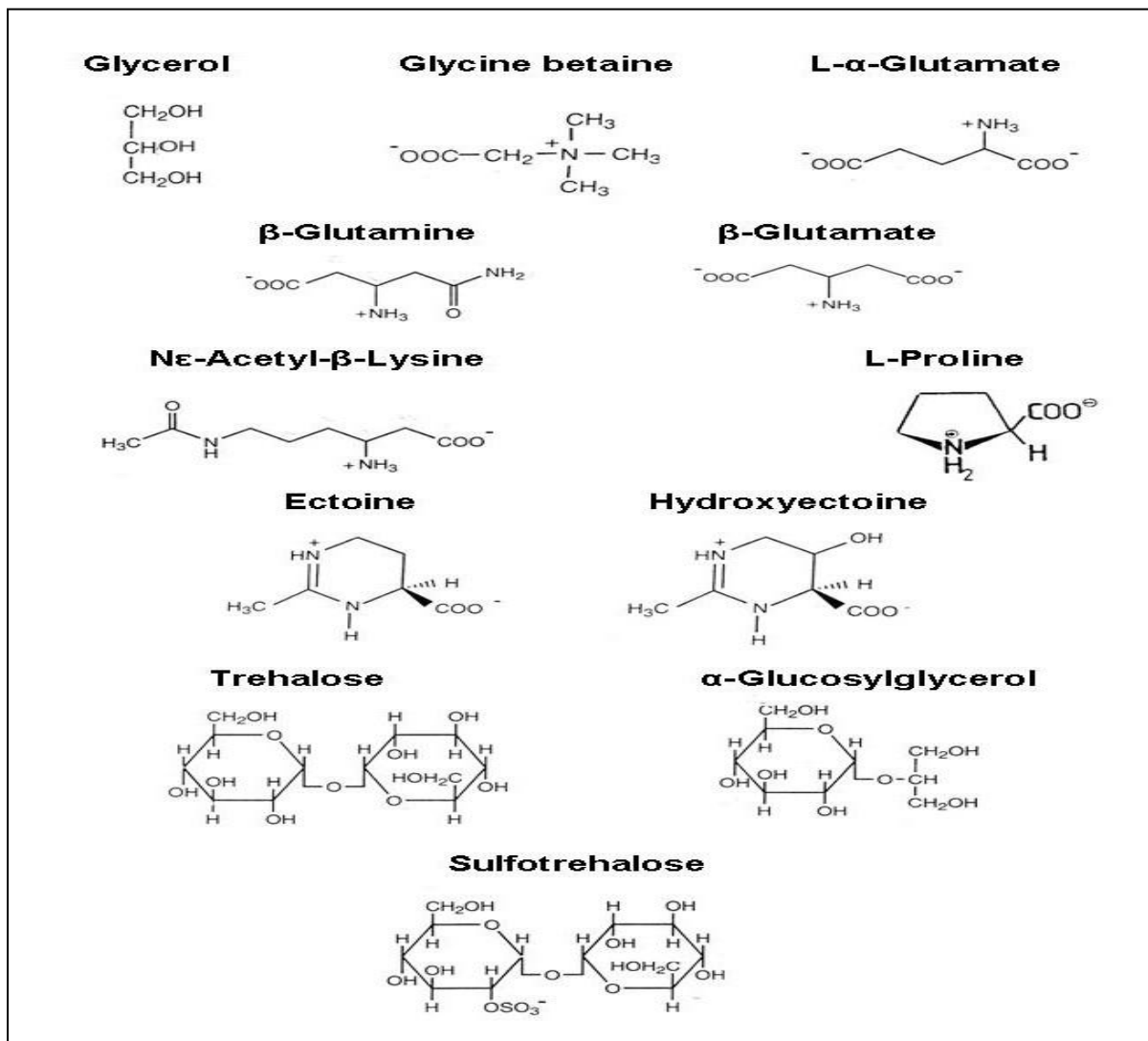


Figure 6 : Quelques solutés compatibles utilisés par les archées pour l'osmoadaptation (Oren, 2008).

Roberts (2005) propose des exemples d'halophiles et halotolérants pour chaque soluté organique compatible qui sont représentés dans le tableau II.

Tableau II: Les halophiles, halotolerants et solutés compatibles (Roberts, 2005).

Soluté organique compatible	Exemple
Glycine bétaine	<p><u>Halotolerant:</u> <i>Thioalkalivibrio versutus</i>; <i>Actinopolyspora</i> sp.</p> <p><u>Halophile:</u> <i>Actinopolyspora halophila</i>; <i>Halorhodospira halochloris</i> <i>Methanohalophilus portulcalensis</i>; <i>Methanosarcina thermophila</i>; <i>Synechococcus</i> sp.</p>
Ectoïne	<p><u>Halotolerant:</u> <i>Sporosarcina pasteurii</i>.; <i>Brevibacterium epidermidis</i>; <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i>; <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> and <i>V. costociola</i></p> <p><u>Halophile:</u> <i>Chromohalobacter israelensis</i>; <i>Chromohalobacter salexigens</i>; <i>Halorhodospira halochloris</i>; <i>Halomonas</i> <i>elongata</i>, <i>H. variabilis</i> and phylogenetically related organisms; <i>Methylarcula marina</i> and <i>M. terricola</i>; <i>Methylophaga alcalica</i> and <i>Methylophaga natronic</i></p>
Nε-acetyl-β-lysine	<p><u>Halotolerant:</u> <i>Methanosarcina thermophila</i>; <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>; <i>Methanosarcina mazei</i></p> <p><u>Halophile:</u> <i>Methanohalophilus portucalensis</i> ; <i>Methanohalophilus</i></p>
Tréhalose	<p><u>Halotolerant:</u> <i>Pyrobaculum aerophilum</i>; <i>Sulfolobus solfataricus</i> and <i>S. ambivalens</i>; <i>Thermoproteus tenax</i>; <i>Thermoplasma</i> <i>acidophilum</i></p> <p><u>Halophile:</u> <i>Actinopolyspora halophila</i>; <i>Chromohalobacter israelensis</i>; <i>Desulfovibrio</i> <i>halophilus</i>; <i>Rhodothermus obamensis</i>; <i>Natrialba magadii</i></p>

I. Généralités :

1. Historique :

En 1977, Woese et coll, à l'Université de l'Illinois, par leurs analyses de l'ARN ribosomal, ont d'abord reconnu « *Archaea* » comme un domaine à part sur Terre. Woese a donc reclassé les organismes en trois domaines : *Eucarya* , *Archaea* et *Bacteria*. Bien que l'on ait récemment proposé des arrangements taxonomiques alternatifs, le génome entier et d'autres analyses ont tendance à soutenir le concept à trois domaines de Woese (**DeLong, 2003**).

2. Taxonomie

Le domaine des Archaea est divisé en trois règnes (**Kharroub, 2007**) :

- Les Crenarchaeota** qui regroupent les organismes les plus thermophiles, les *Thermoproteales*, les *Pyrodictiales* et les *Sulfolobales* métabolisant le soufre comme source d'énergie.
- Les Korarchaeota** renferment les organismes isolés de sources chaudes mais aucune souche n'a été isolée en culture pure.
- Les Euryarchaeota** (appelées auparavant Eocytes) regroupent les phénotypes variés, *Thermococcales*, les *Methanococcales*, les *Methanobacteriales* et les *Halobacteriales*.

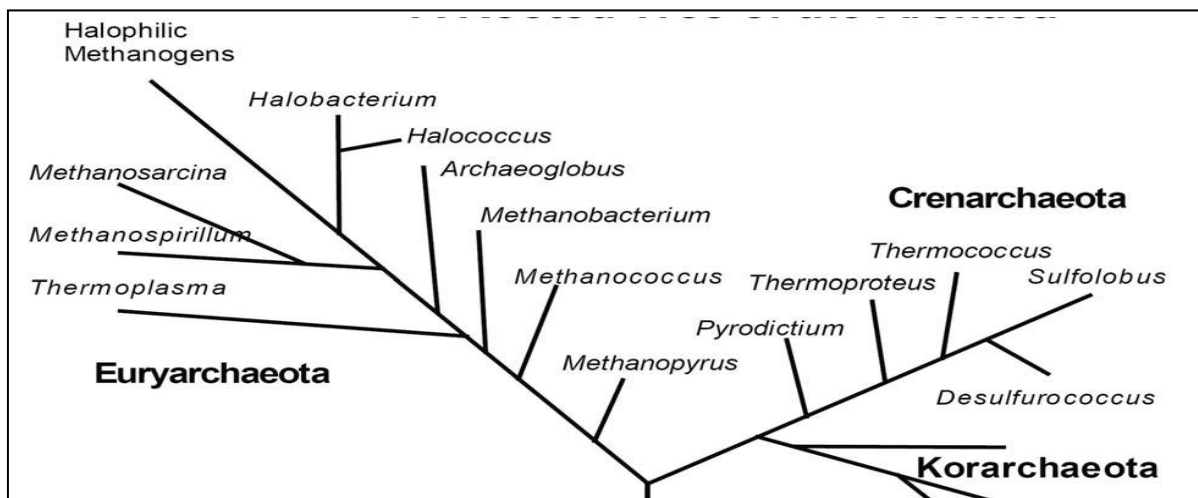


Figure 7 : La branche du domaine des Archaea (**Madigan et al., 1997**).

Les premiers représentants de la famille des *Halobacteriaceae* ont été isolés il ya 100 ans, et actuellement cette famille englobe 36 genres avec 129 espèces (**Arahal et al., 2011**).

La séquence génomique complète d'au moins 12 espèces a été publiée et d'autres devraient suivre prochainement (**Oren, 2012**).

La famille des *Halobacteriaceae* est un excellent groupe pour illustrer les concepts de la taxonomie procaryote. La classification et la nomenclature ont changé depuis l'introduction du genre *Halobacterium* en 1957 par Elazari-Volcani. La taxonomie numérique, la chimio-taxonomie, la phylogénie moléculaire, l'analyse des séquences multilocus (MLSA) et la génomique comparative ont toutes eu un impact sur le regard porté sur la taxonomie de ce groupe. Tout les problèmes liés à la classification de cette famille on été résolus et des idées sur la taxonomie sont en constante évolution (**Oren, 2012**).

DasSarma et DasSarma (2008) ont proposé des changements d'une grande avancée pour la nomenclature et la taxonomie des archées halophiles de l'ordre Halobacteriales et la famille *Halobacteriaceae* qui est « une modernisation de la taxonomie et de la terminologie des haloarchées » afin « de les relier littéralement au domaine qui est le leur (*Archaea*) plutôt que le domaine *Bacteria* ». Les auteurs proposent de rebaptiser le genre *Halobacterium* en « Haloarchaeum », la famille *Halobacteriaceae* en « Haloarchaeaceae » et l'ordre *Halobacteriales* en « Haloarchaeales ». Les auteurs ont déclaré que « ces révisions aideraient à mettre à jour la taxonomie et la terminologie des microorganismes halophiles pour être compatibles avec notre compréhension courante du monde microbien ».

3. Comparaison entre les trois domaines de la vie :

Les archées se distinguent des autres organismes par leur biochimie et biologie moléculaire, en particulier, la structure de la membrane plasmique. Les principales différences sont représentées dans le tableau en **Annexe 3**.

II. Définition des Archées halophiles extrêmes :

Le mot halophile est composé de deux parties « hals » qui veut dire le sel et « phil » qui veut dire aime de ce fait les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes qui requièrent du sel pour leur croissance (**Ebel et al., 2004**).

Les archées halophiles extrêmes sont très fréquentes dans les lacs salés et les salines ou mares préparées pour l'évaporation de l'eau de mer conduisant à l'obtention de sel marin, dans les sédiments salés. Elles peuplent aussi les lacs hypersalés, les lacs alcalins, les sols salés et le sable marin. La plupart des haloarchées sont aérobies, chimio-organotrophes (**Ochsenreiter et al., 2002**).

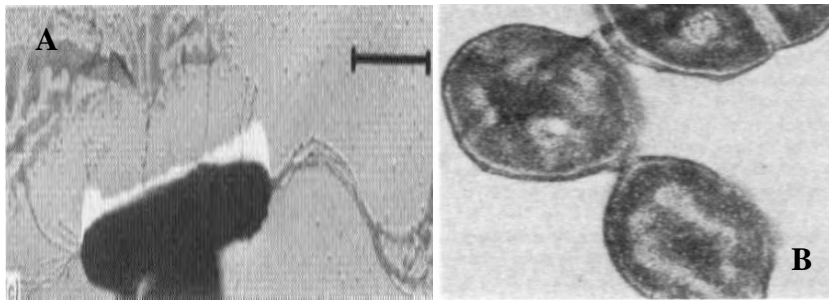
Les haloarchées ne peuvent se développer qu'à des concentrations en NaCl supérieures à 1,5 M. Certaines espèces exigent des pH élevés alors que d'autres des teneurs élevées en magnésium. Ceci reflète leur adaptabilité à leur environnement. Bien que la physiologie des haloarchées soit différente de celle des autres groupes d'archées, certains traits sont communs à la plupart des archées (Kharroub 2007).

III. Caractères généraux :

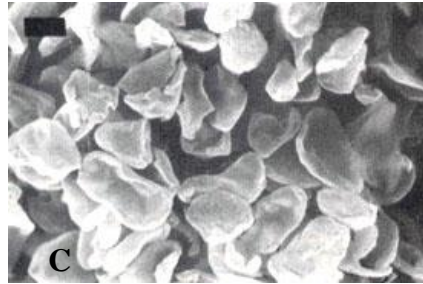
1. Caractères morphologiques :

-La forme :

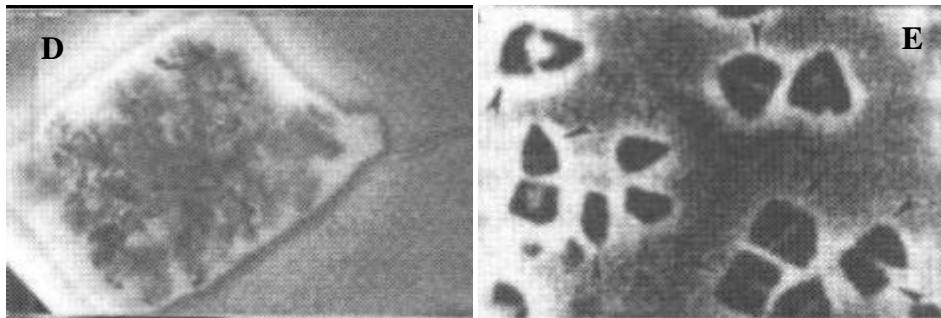
La forme des cellules d'archées, comme chez les autres microorganismes, est déterminée par les propriétés de leur membrane cellulaire. Les espèces de la famille *Halobacteriaceae* apparaissent sous différentes formes. En plus des **bâtonnets** (*Halobacterium* et autres) et la forme **sphérique** (*Halococcus*), il existe des espèces **pléomorphes plates** comme *Haloferax*. Toutefois, des cultures représentatives de cette famille montrent des formes parfaitement **carrées** ou **rectangulaires**. D'autre part, des espèces telles que *Haloarcula japonica* apparaissent sous forme **triangulaire** ou **rhomboïde**. Les archées peuvent apparaître sous des formes inhabituelles à cause des pressions osmotiques (Oren, 2002). La figure 8 montre des exemples d'archées halophiles illustrant les différentes formes observées sous microscopie électronique.



A : *Halobacterium salinarum*, **B** : *Halococcus morrhuae*



C : *Haloferax volcanii*



D: *Haloarcula quadrata*, **E**: *Haloarcula japonica*

Figure 8 : Quelques types morphologiques d'haloarchées (Oren, 2002).

-Le flagelle :

Le flagelle des archées diffère de façon marquée de celui des bactéries, tant en composition qu'en structure et en mode d'assemblage. Ainsi, le filament en lui-même (10 à 14 nm de diamètre) est beaucoup plus **mince** que celui des bactéries (environ 20 nm de diamètre). Les flagelles bactériens tournent dans le sens opposé à celui des aiguilles d'une montre alors que **la rotation** se fait **à droite** chez *Halobacterium salinarum*. Cependant, la composition en acides aminés des deux types de procaryotes est similaire. On note la présence de résidus neutres et peu de résidus basiques. Les flagelles bactériens sont généralement formés d'un seul type de flagelline mais ceux des archées sont constitués de **plusieurs types de flagelline** (Thomas *et al.*, 2001). En outre, chez *Halobacterium salinarum* Les flagellines

sont associées à des oligosaccharides sulfatés. Les flagelles de cette espèce sont plus résistants que ceux des bactéries aux protéases et plus thermotolérants mais ils se dissocient rapidement en solution faiblement saline (**Kharroub, 2007**).

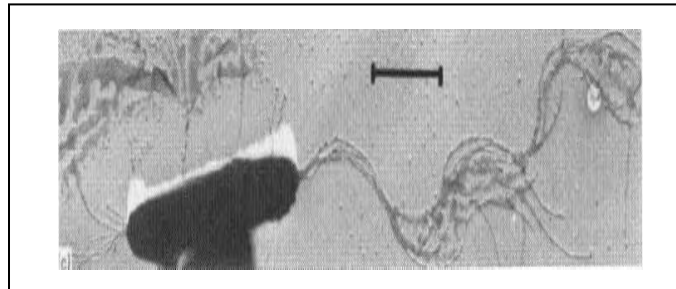


Figure 9 : *Halobacterium salinarum* (**Oren, 2002**).

2. Caractères membranaires :

-Paroi extracellulaire :

Chez beaucoup d'archées, les protéines de la **couche S** ou **S-layer** sont les uniques composants de la paroi cellulaire. Ces protéines de la couche S sont assemblées dans une structure naturelle en 2D avec de très fortes interactions. Chez les archées, qui ne possèdent pas d'autres composants de paroi cellulaire, la couche S doit maintenir l'intégrité cellulaire, stabiliser et protéger la cellule contre des tensions mécaniques et osmotiques ou des conditions de pH extrêmes. Il est aussi noté que la couche S peut maintenir ou même déterminer la forme cellulaire. Toutes les protéines de la couche S d'archées structurellement étudiées jusqu'à présent, portent du N-glycane (**Peyfoon et al., 2010**).

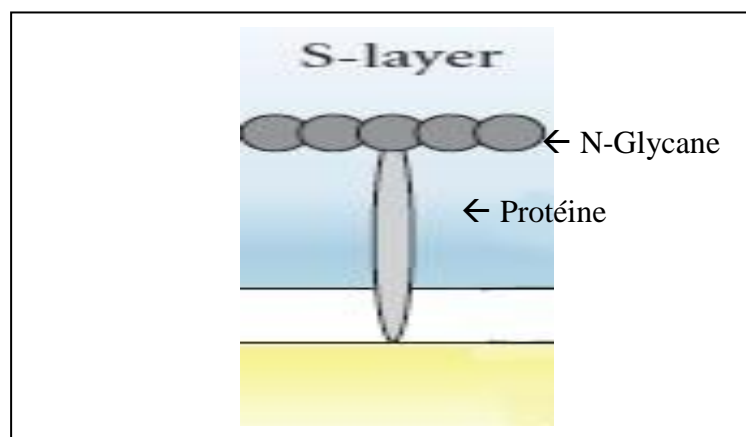


Figure 10 : Schéma d'une S-layer (**Ellen et al., 2010**).

-Membrane cellulaire :

Le caractère le plus distinctif des membranes des archées en général est la nature de leurs lipides. Cependant, ce qui diffère aussi des deux autres domaines, est que les archées possèdent des chaînes hydrocarbonées ramifiées (phytanyl) liées au glycérol par des liaisons **éther** plutôt que des acides gras liés au glycérol par des liaisons **ester**.

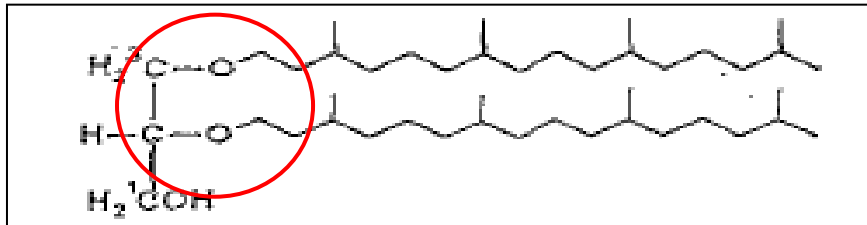


Figure 11 : Diphytanylglycerol diether présent dans la membrane des archées (**Kates, 1993**).

Il existe une multitude de structures des lipides polaires chez les haloarchées (phospholipides et glycolipides) qui servent de marqueurs taxonomiques pour distinguer les genres tels que *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronobacterium* et *Natronococcus* (**Kates, 1993**).

La membrane des archées halophiles extrême est caractérisé par l'abondance de phospholipides diacide, le phosphatidyl glycerolphosphate méthyle ester (PGP-Me) (50-80% des lipides polaires) et l'absence des phosphatidyl choline, éthanolamine, inositol et serine, ce qui leur confère une grande stabilité dans des concentrations élevées en sels (**Tenchov et al., 2006**). Le tableau III montre la proportion de certains de ces lipides.

Tableau III : Proportion de phospholipides PGP-Me et PG chez certaines souches d'archées halophiles et d'autres halotolérantes et faiblement halophiles. (**Tenchov et al., 2006**).

Espèce	Halophilité	PGP-Me (% g/g)	PG (% g/g)
<i>H. halobium</i>	Extrême	78±3	9±4
<i>H. salinarum</i>	Extrême	62±5	23±4
<i>N. magadii</i>	Extrême	36±14 21±4	32±13 11±6
<i>H. volcanii</i>	Extrême	43±2 44±3	35±2
<i>H. minutum</i>	Extrême	61±3 14±5	8±2 3±2
<i>Halococcus morrhuae</i> 14039	Extrême	50±2	15±1
<i>M. mazei</i>	Modérée	0	19±10
<i>M. jannaschii</i>	Modérée	0	0
<i>M. smithii</i>	Faible	0	0
<i>Thermoplasma</i>	Faible	0	Minime

<i>acidophilum</i>			
% g/g du poids total des lipides. PGP-Me et PG avec C20-C25 chaînes alkyl, au lieu des chaînes de C20-C20.			

La figure 12 montre la structure des PGP-Me et PG

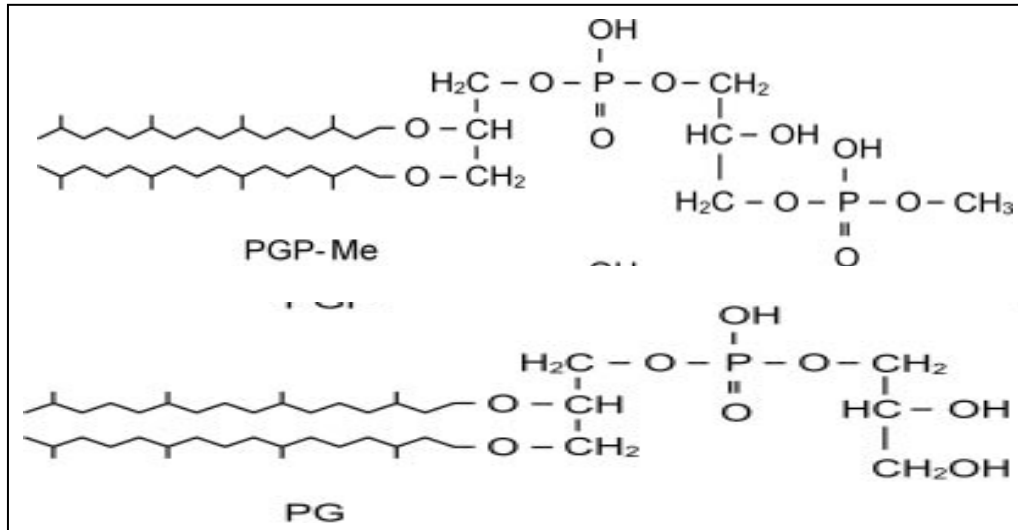


Figure 12: Structure de PGP-Me et PG (Tenchov *et al.*, 2006)

3. Caractères intracellulaires :

-Vésicules à gaz :

Les vésicules à gaz sont des moyens de flottaison produites par certains groupes d'archées et de bactéries. Cela leur permet de rester à la surface de leur milieu aquatique et ainsi capter l'oxygène et la lumière. Ces vésicules ont généralement une forme sphérique ou cylindrique de 0,2µm de diamètre, entourées d'une enveloppe protéique (Pfeifer *et al.*, 2002).

-Matériel génétique :

Le chromosome des archées est circulaire comme le chromosome bactérien, mais il comporte des gènes mosaïques similaires à ceux des eucaryotes. De plus, le chromosome est associé à des protéines homologues aux histones eucaryotes. Les ARN polymérase ADN-dépendantes des archées, copiant l'ADN pour donner l'ARN messenger, sont plus complexes que celles des bactéries, et similaires à celles des eucaryotes. Les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN sont également plus proches de celles des eucaryotes que de celles des bactéries (Briffotiaux, 2008).

IV. Intérêt biotechnologique des Halophiles Extrêmes :

La capacité des microorganismes à vivre dans des milieux hyper-salés ainsi que leurs propriétés structurales et fonctionnelles leur a donné un important potentiel biotechnologique. Ainsi, les halophiles renferment quelques structures d'intérêt essentiel. Dans ce qui suit, on s'est intéressé à la description de certaines bio-structures évoquant d'une part, leurs propriétés et d'autre part, l'intérêt de leur application.

Les microorganismes qui se développent dans des conditions extrêmes sont considérés comme une source importante d'enzymes stables et de grande valeur. Ces dernières appelées parfois « **Extrêmozymes** » assurent les mêmes fonctions de catalyse enzymatique que leurs homologues non-extrêmes, mais ils peuvent catalyser les même réactions dans des conditions qui inhibent ou dénaturent les formes moins extrêmes. Une partie de ces extrêmozymes peuvent être polyextrémophiles et afficher une activité dans plus d'une condition extrême par exemple à basse température, en milieu alcalin etc. La compréhension de la stabilité de fonctionnement de ces extrêmozymes constitue une base importante pour les innovations en matière de biotechnologie (**Karan et al., 2012**).

Les halocines sont un groupe d'antibiotiques peptidiques potentiellement intéressant qui inhibent les haloarchées phylogénétiquement liées, ceci est donc une caractéristique universelle des souches haloarchéennes (**Litchfield, 2011**).

Le potentiel des halocines, comme agent chimio-thérapeutique contre des agents pathogènes vis-à-vis de l'Homme ou l'animal, n'est pas mis en évidence mais reste prometteur étant donné la centaine d'halocines probablement existantes alors que près d'une dizaine seulement sont connues. Il a été démontré que l'halocine H6 est inhibitrice de l'antiport Na^+/H^+ chez les archées et les mammifères (**Meseguer et al., 1995**). Les résultats des tests effectués sur les mammifères sont significatifs du fait que cette halocine peut servir comme traitement pour réduire les ischémies lors d'une transplantation d'organe, en réduisant par exemple la taille de l'infarctus et le nombre de battements ectopiques d'un cœur nouvellement transplanté. La base de l'application biomédicale de l'halocine H6 est la découverte de son mécanisme d'action (**Shand et al., 2007**).

La **bactériorhodopsine** est une protéine de 25 kDa qui porte un groupe rétinol lié à la lysine-216. Elle sert de pompe à protons à lumière-dépendante (**Oren, 2010**).

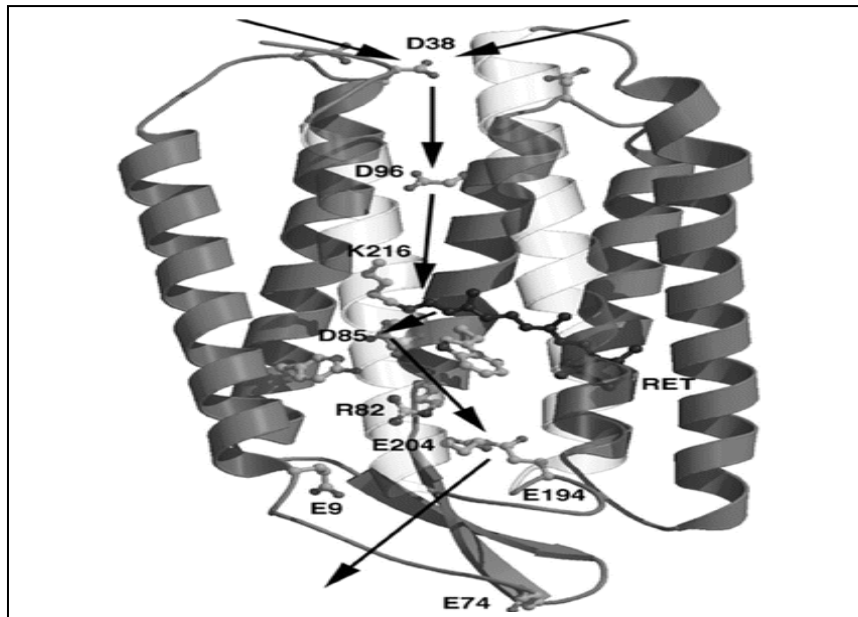


Figure 13: Modèle structural d'une bactériorhodopsine (**Haupts et al., 1999**).

La bactériorhodopsine est une protéine très inhabituelle au sein des protéines d'*Halobacterium*. Cependant, elle est stable en absence de sels, et conserve ses propriétés photochimiques sur de longues périodes, elle résiste à la digestion par la plupart des protéases. La bactériorhodopsine est fabriquée commercialement sous la forme de membrane plane pourpre préparé à partir de *Halobacterium salinarum*. Certaines de ces utilisations potentielles sont basées sur la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, les applications possibles sont la génération d'ATP, la conversion de la lumière du soleil en électricité et de dessalement de l'eau de mer (**Oren, 2010**).

Quelques applications possibles sont les suivantes:

- Construction d'éléments « bioélectroniques » de mémoires d'ordinateurs car une haute densité de stockage est possible par la bactériorhodopsine.
- Détection de lumière ultra-rapide, la construction de la rétine artificielle, la détection de mouvement.
- Les applications des nano-technologies telles que la construction de transistors moléculaires, les moteurs moléculaires, des rétines artificielles et des capteurs moléculaires (**Oren, 2010**).

I. Matériel

Le matériel utilisé est mentionné en **Annexe 1**.

II. Echantillonnage

1. Lieu de prélèvement :

Au Sud d'El Eulma, on peut observer dans les plaines des dépressions fermées, qui sont : La Sebkheth Bazer, la Sebkheth El Hamiet, le Chott El Fraïn et le Chott El Beida (Figure 14).

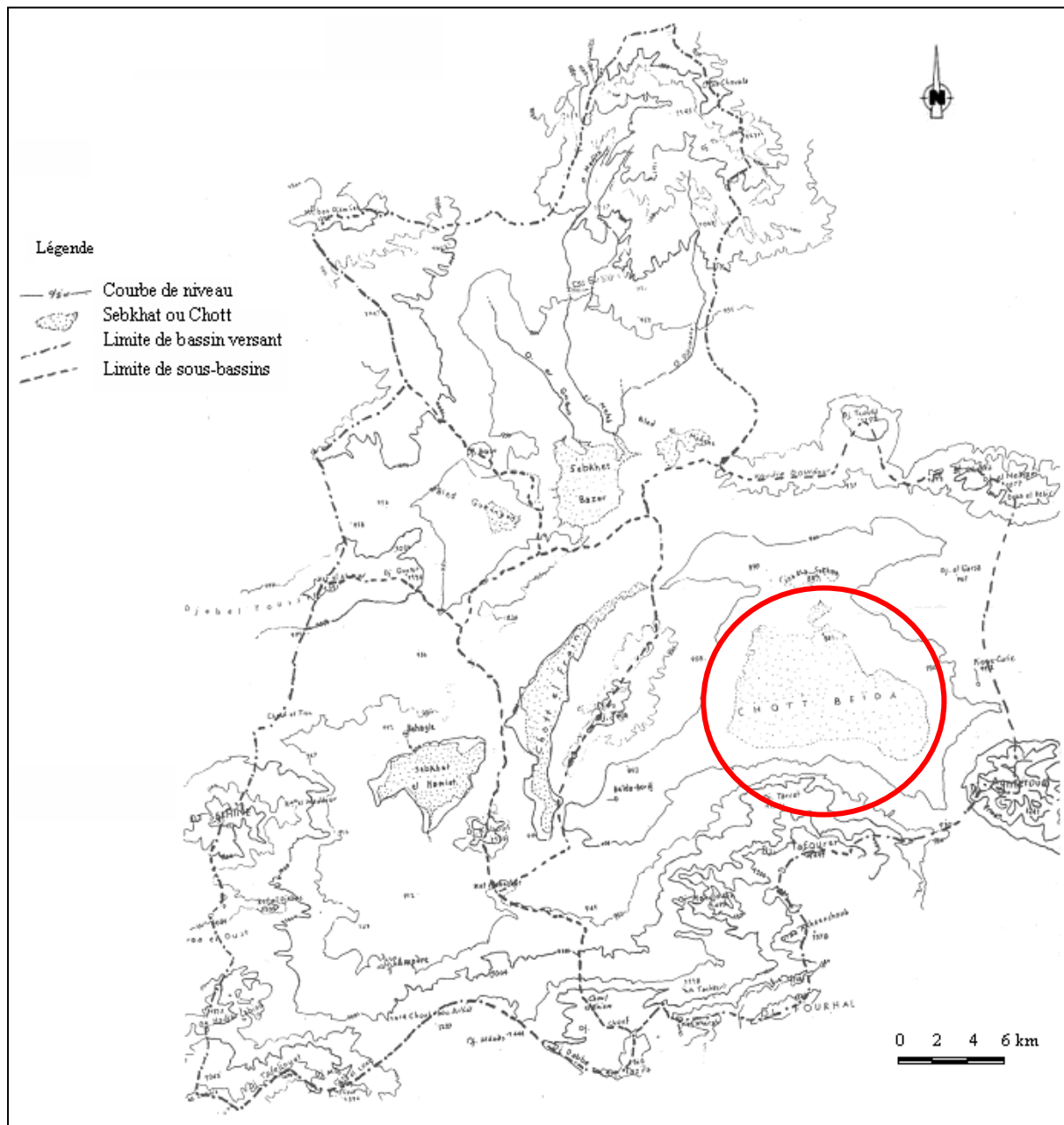


Figure 14 : Les différents sous-bassins du bassin versant d'El Eulma (Demdoum, 2010).

Le site de prélèvement est celui de Chott El Beida.



Figure 15 : Photographies *in situ* de Chott El Beida

Le sous bassin du Chott El Beida est le plus large en surface (584,5 km²) mais la surface de la zone d'eau en elle-même est de 62 km² à contours ramassés.

La figure 16 montre l'emplacement exact où nous avons effectué les prélèvements.



Figure 16 : Vue satellitaire du site de prélèvement (Google Earth).

Grâce à un GPS mis à notre disposition par le laboratoire de Géologie et Environnement, de l'Université Mentouri de Constantine, nous avons pu relever les positions géographiques exactes des prélèvements.

Pour l'eau : (Latitude N 35° 54' 11.5''- Longitude E 005° 47' 37.1''- Elévation 874m) profil de l'intérieur du Chott vers la rive de ce dernier.

Pour le sol : Profil Sud-Nord (Latitude N 35° 54' 10.7''- Longitude E 005° 47' 35.9''- Elévation 876m → Latitude N 35° 54' 11.6''- Longitude E 005° 47' 36.4''- Elévation 873m) de l'extérieur vers l'intérieur du Chott en quatre zones espacées de 10 mètre chacune, la cinquième est en profondeur de la Zone IV.

Pour le sel : Profil Sud-Est Sud-Ouest au niveau de la rive en cinq zones la dernière est en profondeur.

2. Les échantillons :

Nous avons effectué les prélèvements le 14 Mars 2012 à 11H30.

Pour l'eau : Le prélèvement a été effectué à l'aide de seringues stériles (de 60ml) puis répartis dans 5 tubes de 20ml pour chaque zone

Zone I : à l'intérieur du Chott

Zone II : loin de la rive

Zone III : proche de la rive

Zone IV : très proche de la rive

Pour le sol : Le prélèvement a été effectué à l'aide d'une grande spatule, préalablement stérilisée au four Pasteur, et répartis dans des sacs en plastique à fermeture hermétique pour Cinq zones différentes, les quatre premières vont de l'extérieur du Chott vers l'intérieur espacées d'environ 10 mètres, la Cinquième est une zone de profondeur de 15cm de la zone IV.

Pour le sel : Le prélèvement a été effectué à l'aide d'une grande spatule, préalablement stérilisée. Les échantillons sont répartis dans des sacs en plastique à fermeture hermétique pour cinq zones différentes, dont une en profondeur

Zone I : sel semi sec

Zone II : sel de la rive

Zone III : sel sec

Zone IV : sel humide en formation

Zone V : sel en profondeur

III. Physico-chimie : (Rodier, 2009)

Pour la détermination des paramètres physico-chimiques de l'eau du site, nous avons utilisé trois méthodes différentes à savoir : la méthode colorimétrique, la spectrométrie à absorption atomique (SAA) et la spectrométrie à flamme (SF).

Le pH et la température de l'eau sont déterminés à l'aide d'un pH mètre. La conductivité est déterminée grâce à un conductimètre.

-Concentration des bicarbonates (HCO_3^-) :

Pour calculer la concentration des bicarbonates, on doit déterminer le titre alcalin complet (TAC).

Mode opératoire :

Exemple des eaux naturelles : si leur pH > 8,3 => on calcule le TA (titre alcalin), si leur pH < 8,3 => le TA=0. L'échantillon faisant l'objet de l'étude ayant un pH de 7,1 donc automatiquement le TA=0.

Pour 100ml d'échantillon (cas de l'eau naturelle) on ajoute quelques gouttes de phénolphthaléine (0,5%), s'il n'y a pas de virage de couleur => TA=0, ensuite on ajoute quelque gouttes de méthyle orange et on procède au titrage par l'acide sulfurique (0,02N) jusqu'à obtenir un virage de couleur :

TAC = (V-1)/5 V = Volume de titrage (Acide sulfurique de la burette)

$[\text{HCO}_3^-] = \text{TAC (meq)} \cdot M$ M = Masse molaire = 61 g/mole

-Concentration du calcium (Ca^{++}) :

On prend 10ml de l'échantillon dilué dans 40ml d'eau distillée (dilution 5 fois), on ajoute 5ml de KOH (2N), une petite pincée de murexide et on titre avec de l'EDTA (0,02N) jusqu'au virage de la couleur au bleu : $[\text{Ca}] = V \cdot 20 \cdot 0,4008$ V = Volume de l'EDTA

-Concentration du (Mg^{++}) :

Pour trouver cette concentration, nous avons utilisé un spectromètre à absorption atomique. Au préalable, une courbe d'étalonnage est réalisée sur l'appareil, ensuite on teste l'échantillon dilué 200 fois.

-Concentration du (Na⁺) et (K⁺):

Pour trouver la concentration en Na⁺ et K⁺ de l'eau, nous avons utilisé un spectromètre à flamme. Au préalable, il ya lieu de réaliser une courbe d'étalonnage, ensuite on mesure l'absorbance de l'échantillon dilué 20 fois et on trouve les concentrations (g/l).

-Concentration en (NaCl) :

Connaissant la teneur en Na⁺ (trouvée grâce au spectromètre à flamme) on peut déduire la concentration en NaCl, sachant qu'une mole de ce dernier donne une mole de Na⁺, suivant la relation : $m_{\text{NaCl}} \text{ (g/l)} = [m_{\text{Na}} \text{ (g/l)} \cdot M_{\text{NaCl}} \text{ (g/mol)}] / M_{\text{Na}} \text{ (g/mol)}$.

IV. Isolements et repiquages

1. Milieux de culture et solution mère :

Les milieux que nous avons utilisé sont conçus pour l'isolement des souches halophiles répondant à leurs exigences nutritionnelles. Ils contiennent des concentrations appropriées en NaCl et MgSO₄, ces milieux sont :

a)-Milieu Brown

b)-Milieu Complexe

Le milieu Complexe est préparé à pH=7. Le milieu Brown est préparé aux deux pH=7 et pH=9. Ces deux milieux sont réalisés sous deux formes : liquide et solide

Le milieu Brown à pH=7 (Br7) est aussi préparé avec une concentration en sel de 30% correspondant à la saturation.

La composition des milieux est mentionnée en **Annexe 2**.

Pour la préparation des solutions mère de sol et de sel, on prélève 1g de l'échantillon que l'on mélange avec 10ml d'une solution saline à 25% d'NaCl dans un tube de 20ml stérile Pour ce qui est des échantillons d'eau, ils n'ont pas fait l'objet de préparation de solutions salines car ces derniers ont été utilisés directement.

2. Isolements :

Les cultures **solides** sont incubées à **37° C**, alors que les cultures **liquides** sont incubées dans un bain marie avec agitation à **40° C** et le temps d'incubation va de 2 à 3 semaines.

-Isolement direct :

L'isolement s'est fait par étalement de 0,1ml des échantillons d'eau de sol et de sel sur boîte de Petri contenant le milieu Brown et le milieu Complexe (pH=7). Nous avons obtenu en tout :

30 boîtes sur Milieu Brown dont 5 boîtes pour les échantillons de sel, 5 boîtes pour les échantillons de sol, 20 boîtes pour les échantillons d'eau (4 zones avec 5 boîtes chacune). Nous avons procédé de la même manière pour le milieu Complexe.

-Isolement indirect :

Pour ce type d'isolement on doit passer, au préalable, par une étape d'enrichissement sur milieu liquide. Pour ce faire, 0,1ml de l'échantillon d'eau de sol et de sel sont ajoutés à 5ml du milieu (Brown et Complexe) dans des tubes de 20ml stériles. Nous avons obtenu donc 14 tubes pour chaque milieu utilisé :

5 tubes pour l'enrichissement des échantillons de sol, 5 tubes pour celles du sel et 4 tubes pour l'eau (1 tube pour chaque zone).

Nous avons aussi réalisé un enrichissement sur milieu Brown pH=9 (Br9) pour les échantillons de sol et de sel.

3. Repiquage :

- Les souches de référence, qui vont servir de souches cibles pour les tests d'activités, *Haloferax mediterranei* (DSM1411), *Halobacterium salinarum* (DSM 3754) nous ont été fournies par le laboratoire MCAM du MNHN de Paris. Elles sont habituellement mises en culture dans le milieu préconisé par DSMZ pour les haloarchées (M372). Les souches A9, SH, 1Z, 2Z et 3Z sont des souches locales identifiées et affiliées au genre *Natrinema* ont été repiquées sur milieu Brown (Br7).
- Les souches poussées suite aux isollements et présentant une pigmentation ont fait l'objet de repiquages afin d'avoir des souches pures.
- Les souches poussées sur milieu Br9 liquide ont fait l'objet d'un repiquage sur boîte du même milieu. Quant à celles poussées sur Br7 liquide de 25% de NaCl, elles ont été repiquées sur boîtes Br7 à 30% de NaCl.

V. Identification et activité anti-archéenne des souches isolées

Suivant **Oren *et al.*, (1997)** qui propose les normes minimales pour la description d'un nouveau taxon d'halobactériales, nous avons réalisé certains de ces tests selon la disponibilité des réactifs.

Après croissance des souches qui ont fait l'objet de repiquage, nous avons sélectionné 14 souches, sur la base de leur pigmentation et le temps d'incubation (plus de 2 semaines) nécessaire à leur croissance. Ces souches sont :

BWI₂, BWI₅, BWII₂, BWII₃, BWIII₂, BWIV₂, BWI_B, BWII_B, BWIII_B, BGI, BGIII, BGIV, BSII, BSIII (**Annexe 4**).

1. Etude morphologique :

-Aspect des colonies :

Les colonies ont été observées à l'aide d'une loupe et l'aspect décrit suivant six caractères suivants : la couleur, l'opacité, le contour, l'élévation, la surface et la brillance.

-Morphologie des cellules :

- Les souches sélectionnées plus les souches d'haloarchées de référence ont fait l'objet d'une observation à l'état frais entre lame et lamelle.
- Certaines d'entre elles sont utilisées pour la coloration de Gram selon la technique modifiée par **Dussault (1955)** par application, après fixation, d'une solution d'acétate à 2 % (v/v) pendant 5 minutes.
- La BWII_B, BSII, BSIII, BGI, BWIII₂, DSM 3754 et DSM 1411 ont été retenues pour une observation au microscope électronique à balayage (FEI Quanta 200) Laboratoire de Chimie Industrielle (UAMB).

2. Recherche de l'activité antagoniste :

Il s'agit de mettre en évidence la capacité d'une souche à produire ou non des substances antimicrobiennes (halocines) contre d'autres souches et donc souligner l'activité d'antagonisme. Pour ce faire, nous avons utilisé deux méthodes qui sont :

-Méthode de diffusion en double couche : (Meseguer *et al.*, 1986 modifiée)

Une couche de milieu solide est coulée au préalable sur une boîte de Petri. Après solidification, elle est additionnée de 5ml du même milieu semi-solide (8g d'agar/l)ensemencé par un volume du germe cible de façon à avoir une charge de 10^7 cellules. Le volume prélevé est calculé comme suit (protocole du Laboratoire MCAM) :

Facteur de Dilution (FD) = abs (à 600nm) / 0,001

Volume à prélever (Vp) = Volume gélose molle / FD

Ceci est possible en maintenant le milieu semi-solide en surfusion à 50°C.

Après solidification, le germe test est ensemencé en spots (5µl) sur la boîte incubée à 37° C pendant 2 semaines.

Le résultat positif se manifeste par l'apparition de zones claires ou halos autour du spot.

-Culot-Surnageant : Cette méthode permet de savoir si la substance est intra ou extracellulaire. 1ml de la souche test est centrifugé dans des Eppendorfs à 10000 rpm (SIGMA) pendant 10min afin de séparer le culot du surnageant. Le culot est re-suspendu dans du milieu neuf (pour servir au test de spot), le surnageant est mis dans un nouvel Eppendorf stérile. La préparation est la même que le test précédent sauf que le culot et surnageant sont ensemencés en spots en plus de la culture elle-même.

-Méthode de stries croisées :

Les souches test (BWI₂, BWI₅, BWII₂, BWII₃, BWIII₂, BWIV₂, BGI, BGIII, BGIV, BSII, BSIII, SH, 1Z, 2Z, 3Z, DSM 1411) sont ensemencées en une seule strie centrale sur des boîtes. Certaines contiennent du Br7 d'autres MC7, elles sont incubées par la suite à 37°C pendant une semaine. Après cela, les souches cibles (BWI₂, BWI₅, BWII₂, BWII₃, BWIII₂, BWIV₂, BGI, BGIII, BGIV, BSII, BSIII, A9, DSM 1411, DSM 3754) sont ensemencées en stries perpendiculaires à la souche cible. Les boîtes sont ré-incubées à 37°C pendant encore une semaine.

3. Sensibilité à quelques antibiotiques :

-Par écouvillon :

Pour cette étape, les souches (BSIII, BGI et BWIII₂) ont été ensemencées à l'aide de l'écouvillon en stries rapprochées sur toute la surface de la boîte contenant le milieu de croissance. On dépose ensuite les disques d'antibiotique et on laisse diffuser à température

ambiante pendant 2h. Ensuite, on incube à 37°C pendant une semaine. La sensibilité se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition dépassant 2mm de diamètre autour du disque (**Kharroub, 2007**).

Les antibiotiques utilisés sont :

- Cephotaxine (CE10) 10µg/disque
- Oxacilline (OX5) 5µg/disque
- Erythromycine (E15) 15µg/disque
- Cefoxitine (FOX30) 30µg/disque
- Cephalexine (CP30) 30µg/disque

-Par gélose molle : (**Kis-Papo et Oren, 1999 modifiée**)

Dans cette méthode nous procédons par ajout de 100µl (10^7 cellules) de la souche test (BSII, BSIII, BGI, BWIII₂, BWII_B) dans 5 ml de gélose molle (Br7) qui sera versée sur boîte contenant le même milieu. Les disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la gélose molle solidifiée, les boîtes sont incubées à 37°C après diffusion de 2h à température ambiante. Les antibiotiques suivants ont été choisis pour bien distinguer les bactéries qui y sont sensibles des archées qui y sont résistantes suivant **Sezonov (2009)**.

Les antibiotiques utilisés sont :

- Streptomycine (S10) 10µg/disque
- Doxycycline (DO30) 30µg/disque (substituée de la Tétracycline)
- Chloramphenicol (C30) 30µg/disque
- Kanamycine (K30) 30µg/disque
- Ampiciline (AM10) 10µg/disque

4. Identification biochimique :

-Test de la catalase :

La révélation de la catalase se fait par l'addition de quelques gouttes de l'eau oxygénée (H₂O₂) sur des colonies étalées sur une lame, le résultat positif se traduit par l'apparition de bulles de gaz (effervescence).

-Test de l'activité de la β-Galactosidase :

La recherche de cette activité se fait par ajout de disques d'ONPG aseptiquement dans des tubes de culture liquide (milieu Brown) pendant 72 heures à 40°C, sachant que l'ONPG

« Ortho-Nitro-Phénol -Galactopyranoside» est un analogue du Lactose. Les produits d'hydrolyse donnent une coloration jaune du milieu.

-Test d'hydrolyse de l'amidon :

Les souches à tester sont prélevées de leur suspension puisensemencées en spot sur des boîtes de Petri contenant le milieu de croissance gélosé additionné de 1% d'amidon. Ces boîtes sont incubées pendant 14 jours à 37°C. La révélation de la dégradation se fait par ajout du réactif iodo-ioduré (Lugol) qui colore l'amidon en bleu foncé. Par conséquent, le résultat positif se manifestera par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

-Test d'hydrolyse de la caséine :

Les souches à tester sont prélevées de leur suspension et sontensemencées en spot sur des boîtes de Petri contenant leur milieu de croissance additionné de lait écrémé (10%). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C et le résultat positif se manifestera par l'apparition d'une zone claire autour de la soucheensemencée.

-Test de l'uréase :

On utilise de l'urée indole modifié par ajout de quantités appropriées de NaCl (250g/l) et de MgSO₄ (20g/l) dans les tubes urée indole. Onensemence par la suite les souches tests et onincube à 40°C pendant 5 jours. Un virage de couleur en rouge violacé ou rose indique un résultat positif.

-Test de production d'indole :

Pour cela, on utilise le milieu d'eau peptonée exempte d'indole modifié par ajout de quantités appropriées de NaCl (25g/l) et de MgSO₄ (20g/l) dans les tubes. On inocule par la suite la souche et onincube à 40°C pendant 72h. La révélation se fait par ajout de quelques gouttes du réactif KOVACS et l'apparition d'un anneau rouge en surface indique un test positif.

I. Physico-chimie

Les résultats de l'analyse physico-chimique de l'eau du Chott El Beida sont représentés dans le tableau IV :

Tableau IV : Analyses physico-chimiques de l'eau du Chott El Beida

	TA	TAC	HCO ₃ ⁻	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	NaCl	pH
L'eau	0	1,7 (meq)	0,103 (g/l)	0,769 (g/l)	0,243 (g/l)	112,76 (g/l)	9,45 (g/l)	286,80 (g/l)	7,1

L'alimentation du Chott en eau, venant de l'écoulement des précipitations depuis les lignes de crêtes, montre que l'environnement étudié est **athalassohalin**. De plus, ma concentration en NaCl étant de **286,80 g/l**, le Chott est donc hypersalin (**Litchfield, 1998**).

En comparant les résultats obtenus dans cette étude à ceux rapportés par **Litchfield (1998)**, on remarque une certaine similitude avec la composition ionique du Grand Lac Salé de l'Utah (USA) (Tableau V).

Tableau V : Tableau comparatif des résultats physico-chimiques entre Chott El Beida (Algérie) et le Grand Lac Salé de l'Utah (USA).

Composition ionique	Concentrations (g/l)	
	Grand Lac Salé de l'Utah (USA)	Chott El Beida (Algérie)
Na ⁺	105,4	112,76
K ⁺	6,7	9,45
Ca ⁺⁺	0,3	0,769
pH	7,7	7,1

II. Isolements et repiquages

1. Isolements :

Les résultats des isolements obtenus sur l'ensemble des échantillons sont résumés comme suit.

-Isolement direct :

- Sur milieu Brown pH 7 (Br7) :
- ❖ Après une semaine d'incubation à 37°C :

Observation de colonies sur toutes les boîtes d'échantillons d'eau et pour les échantillons de solution mère de sel et de sol (sauf la Zone III de terre) avec des pigmentations différentes (rouge, jaune, crème).

- ❖ Après deux semaines d'incubation :

Il ya augmentation du nombre de colonies avec cette fois-ci une croissance pour l'échantillon de la Zone III de la solution mère de sol.

Les résultats obtenus pour les échantillons d'eau sont représentés dans la figure 17.

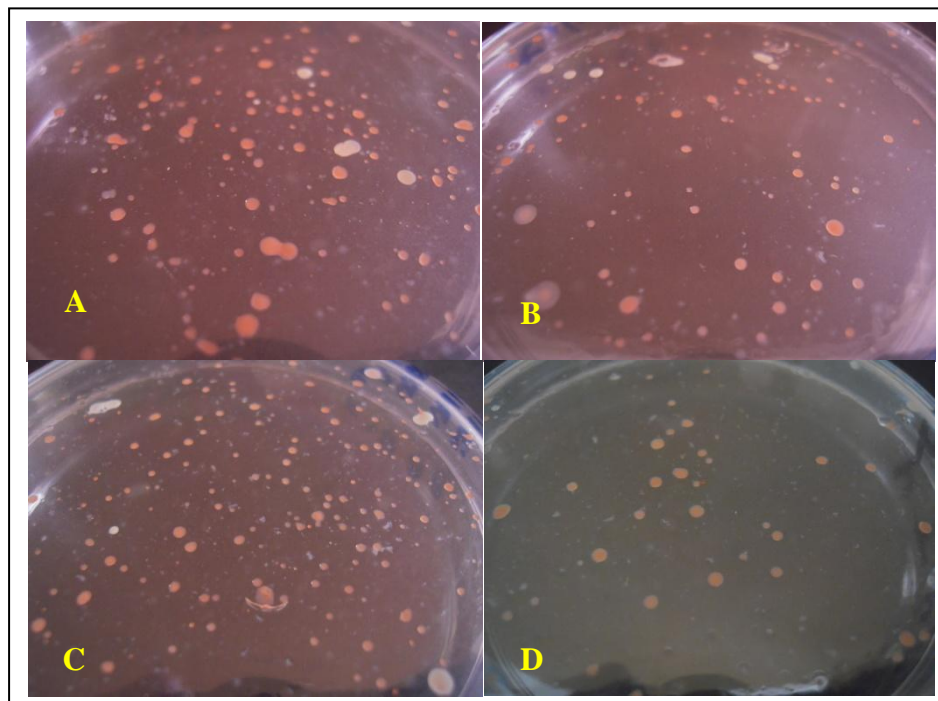


Figure 17 : Isolement sur Br7, après deux semaines d'incubation, à partir d'échantillons d'eau Zone I (A, B), II (C) et IV (D).

➤ Sur milieu Complexe pH 7 (MC7) :

En ce qui concerne ce milieu, ce n'est qu'après 4 semaines d'incubation à 37°C que nous avons eu une bonne croissance sur toutes les boîtes des échantillons d'eau et des solutions mères de sol et de sel avec des pigmentations rouges.

La figure 18 montre quelques résultats des isolements sur MC7.

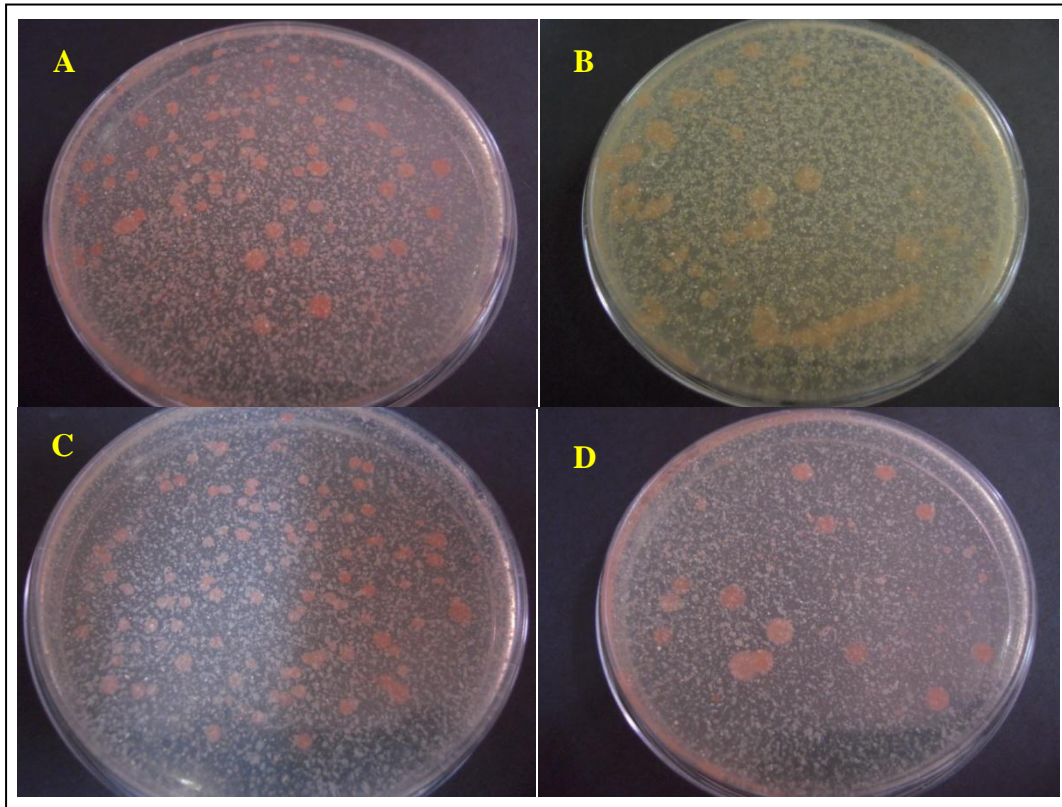


Figure 18 : Isolements sur MC7 à partir des solutions mères de sol (A,B) et de sel (C, D) après deux semaines d'incubation.

-Isolements indirects :

➤ Sur milieu Brown pH 7 (Br7) :

Après deux semaines d'incubation à 40°C, nous avons obtenu des troubles indiquant une croissance sur l'ensemble des échantillons d'eau et pour les solutions mères de sel sauf la Zone V, mais un seul échantillon pour les solutions mères de sol a montré un trouble (Zone IV).

➤ Sur milieu Complexe pH 7 (MC7) :

Après une dizaine de jours d'incubation à 40°C, l'ensemble des échantillons d'eau et de solution mère de sel et de sol ont donné une croissance qui s'est manifestée par l'apparition d'un trouble.

- Sur milieu Brown pH 9 (Br9) :

Après deux semaines, tous les tubes de Br9 additionnés de solutions mères de sol et de sel ont donné des troubles.

Pour les isolements, on remarque qu'il ya croissance aussi bien sur milieu Brown que sur milieu Complexe (solide, liquide). Il n'y a donc pas d'exigences particulières pour la croissance ni besoin en facteur de croissance, tel remarqué par **Rodriguez Valera et coll (1980)**.

D'après **Kamekura et Dyall-Smith (1995)**, la pigmentation rose à rougeâtre est une caractéristique commune à la famille des *Halobacteriaceae*, or la majorité des colonies obtenues montre une pigmentation rougeâtre donc les isolats peuvent appartenir à cette même famille.

En testant à pH 9, les échantillons de sel et de sol, nous avons eu une croissance donc existence de souches alcalo-tolérantes.

2. Repiquage :

- Les souches de référence *Haloferax mediterranei* (DSM 1411), *Halobacterium salinarum* (DSM 3754), ainsi que les souches d'archées locales (A9, SH, 1Z, 2Z, 3Z) ont pu croître sur Br7 au bout d'une semaine d'incubation à 37°C, et même lors de leurs enrichissements sur Br7 liquide.
- Les souches poussées sur boîte Br7 (échantillons d'eau et solutions mères de sel et de sol) après repiquages sur le même milieu ont donné des résultats positifs après une semaine d'incubation à 37°C.
- Après 3 semaines d'incubation à 37°C, les souches poussées sur milieu Br9 liquide et repiquées sur milieu Br9 solide ont donné des tapis sans colonies distinctes pour les solutions mères de sel (Zone III, V) et de sol (Zone I, III, IV, V). Cependant de petites colonies pigmentées en rouge sont apparues pour la solution mère de sol Zone II et pour les solutions mères de sel (Zone I, II, IV).
- Parmi les 14 souches sélectionnées et repiquées sur milieu Br7 à 30% de NaCl, 12 d'entre elles ont pu croître après 2 semaines d'incubation à 37°C en donnant la même caractéristique de pigmentation que sur milieu à 25% de NaCl.

La croissance des isolats sur milieu à 30% de NaCl qui correspond à la saturation, confirme que nous avons des souches halophiles extrêmes (**Kushner, 1993**).

III. Identification et activité des souches

L'ensemble des souches sélectionnées pour effectuer les tests qui suivent sont résumés en **Annexe 4**.

La figure 19 montre toutes les souches sélectionnées en suspension.

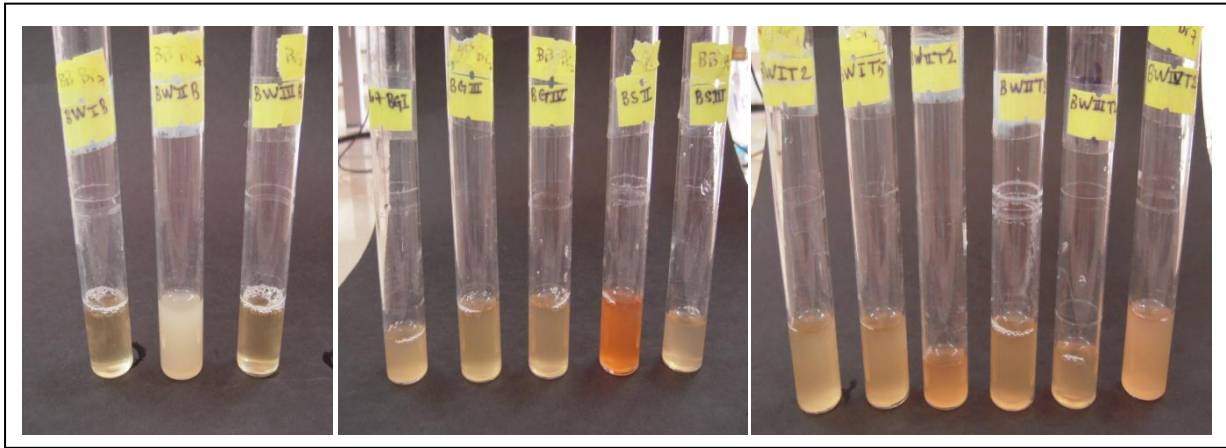


Figure 19 : Photographies des souches isolées et sélectionnées en culture liquide (Br7).

1. Etude morphologique

-Aspect des colonies :

Après observation des colonies à la loupe, nous avons résumé les résultats dans le tableau VII.

Tableau VI : Aspect des colonies.

Souche	Origine	Milieu de culture	Couleur	Opacité	Contour	L'élévation	Surface	Brillance
BGI	Sol	MC7	Orange	Translucide	Régulier	Peu bombée	Lisse	+
BGIII	Sol	MC7	Orange	Translucide	Régulier	Peu bombée	Lisse	+
BGIIV	Sol	MC7	Orange	Translucide	Régulier	Peu bombée	Lisse	+
BSII	Sel	MC7	Orange	Translucide	Régulier	Peu bombée	Lisse	+
BSIII	Sel	MC7	Orange	Translucide	Régulier	Peu bombée	Lisse	+
BWI ₂	Eau	Br7	Rouge	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWI ₅	Eau	Br7	Rouge	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWII ₂	Eau	Br7	Rouge	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWII ₃	Eau	Br7	Rouge	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWIII ₂	Eau	Br7	Rouge	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWIV ₂	Eau	Br7	Rouge	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWI _B	Eau	Br7	Rose	Opaque	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWII _B	Eau	Br7	Crème	Opaque	Régulier	Bombée	Lisse	+
BWIII _B	Eau	Br7	Crème	Opaque	Régulier	Bombée	Lisse	+

L'aspect des colonies correspond bien à l'observation des souches de la famille *Halobacteriaceae* selon **Oren et coll. (2009)**.

-Morphologie des cellules :

L'observation à l'état frais est réalisée sur une culture liquide.

Tableau VII : Observation à l'état frais et de la coloration de Gram.

Tests Souches	Etat frais		Coloration de Gram
	Forme	Mobilité	
BGI	Bâtonnet	+	-
BGIII	Bâtonnet	+	-
BGIV	Bâtonnet	+	-
BSII	Bâtonnet	+	-
BSIII	Bâtonnet	+	-
BWI ₂	Bâtonnet arrondis	+	-
BWI ₅	Bâtonnet	+	-
BWII ₂	Bâtonnet arrondis	+	-
BWII ₃	Bâtonnet arrondis	+	-
BWIII ₂	Bâtonnet	+	-
BWIV ₂	Bâtonnet arrondis	+	-
BWI _B	Bâtonnet	+	-
BWII _B	Cocci	-	-
BWIII _B	Cocci	-	-
DSM3754	Bâtonnet	+	-
DSM1411	Cocci	-	-
A9	Cocci	-	ND
1Z	Cocci	-	ND
2Z	Pléomorphe	-	ND
3Z	Bâtonnet	+	ND
SH	Cocci	-	-

(ND : non déterminé)

Les résultats obtenus montrent une diversité au niveau de la forme des cellules, certaines sont en bâtonnets, d'autres en Cocci.

La plupart des souches sont mobiles (surtout pour la forme bâtonnet) et à Gram négatif. Ces résultats sont compatibles avec la description de la famille des *Halobacteriaceae* par **Oren et coll. (2009)**.

La Figure 20 montre deux exemples de souches à Gram négatif.

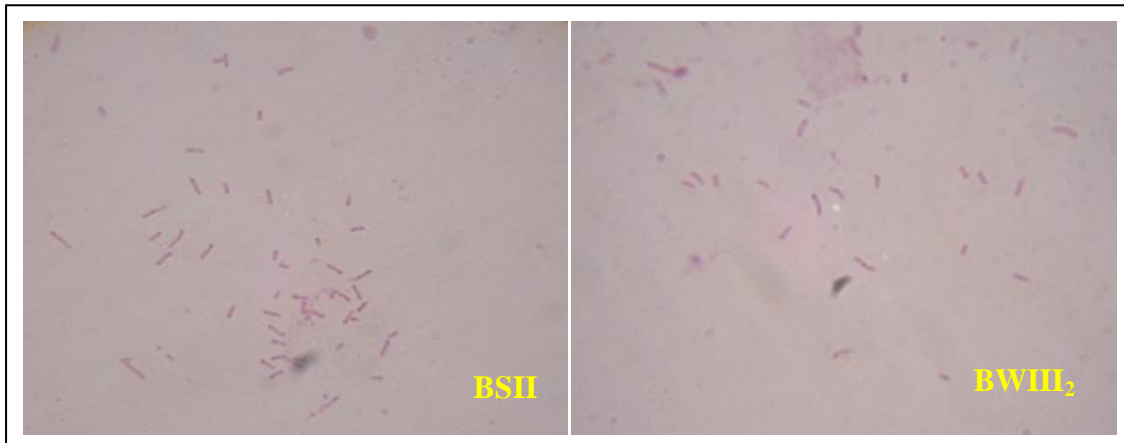


Figure 20 : Coloration de Gram pour la BSIII et BWIII₂ Cocci en chainettes Gram⁻.

Lors de l'observation au microscope électronique à balayage de colonies récupérées à partir de milieu solide, nous avons pu voir l'aspect des cellules de certaines souches : Cocci pour 3 souches sélectionnées pour la microscopie électronique.

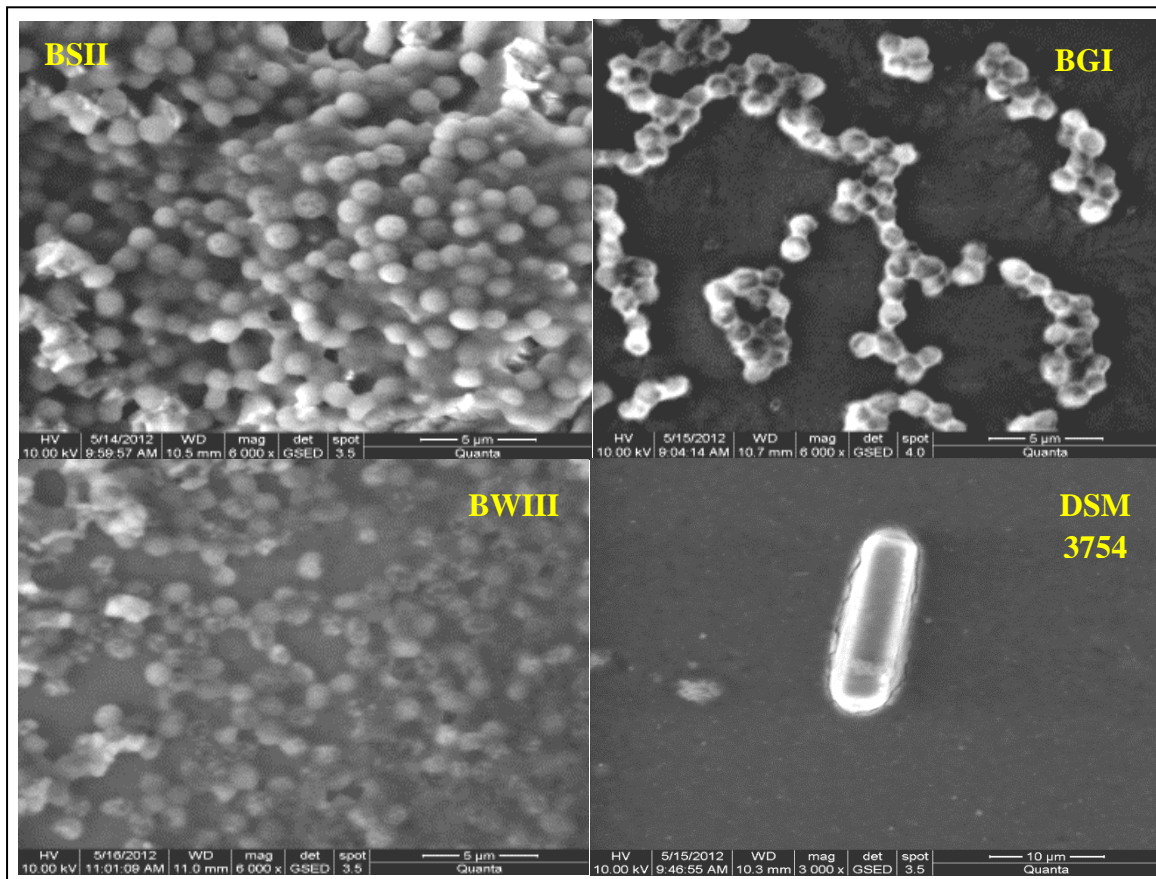


Figure 21 : Photographies sous microscopie électronique à balayage des souches BSII, BGI, BWIII et DSM 3754.

2. Recherche de l'activité anti-archéenne

-Diffusion sur gélose en double couche

➤ Méthode des spots :

Les résultats des tests anti-archéens obtenus sur les différentes souches indicatrices (souches cibles) sont indiqués dans le tableau IX.

Tableau VIII : Résultats des tests anti-archéens.

Les souches tests (productrices)	Les souches cibles (indicatrices)						
	DSM3754	DSM1411	1Z	2Z	3Z	SH	A9
BGI	27mm	00mm	22mm	22mm	20mm	20mm	20mm
BGIII	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BGIV	35mm	ND	15mm	15mm	15mm	00mm	00mm
BSII	20mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm
BSIII	40mm	00mm	20mm	17mm	00mm	20mm	22mm
BWI ₂	20mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm
BWI ₅	35mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm
BWII ₂	27mm	8mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm
BWII ₃	25mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm
BWIII ₂	35mm	15mm	10mm	00mm	00mm	10mm	10mm
BWIV ₂	22mm	8mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm
BWI _B	00mm	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BWII _B	45mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm	00mm
BWIII _B	00mm	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(ND : non déterminé)

La figure 22 montre quelques halos d'inhibition du test d'antagonisme.

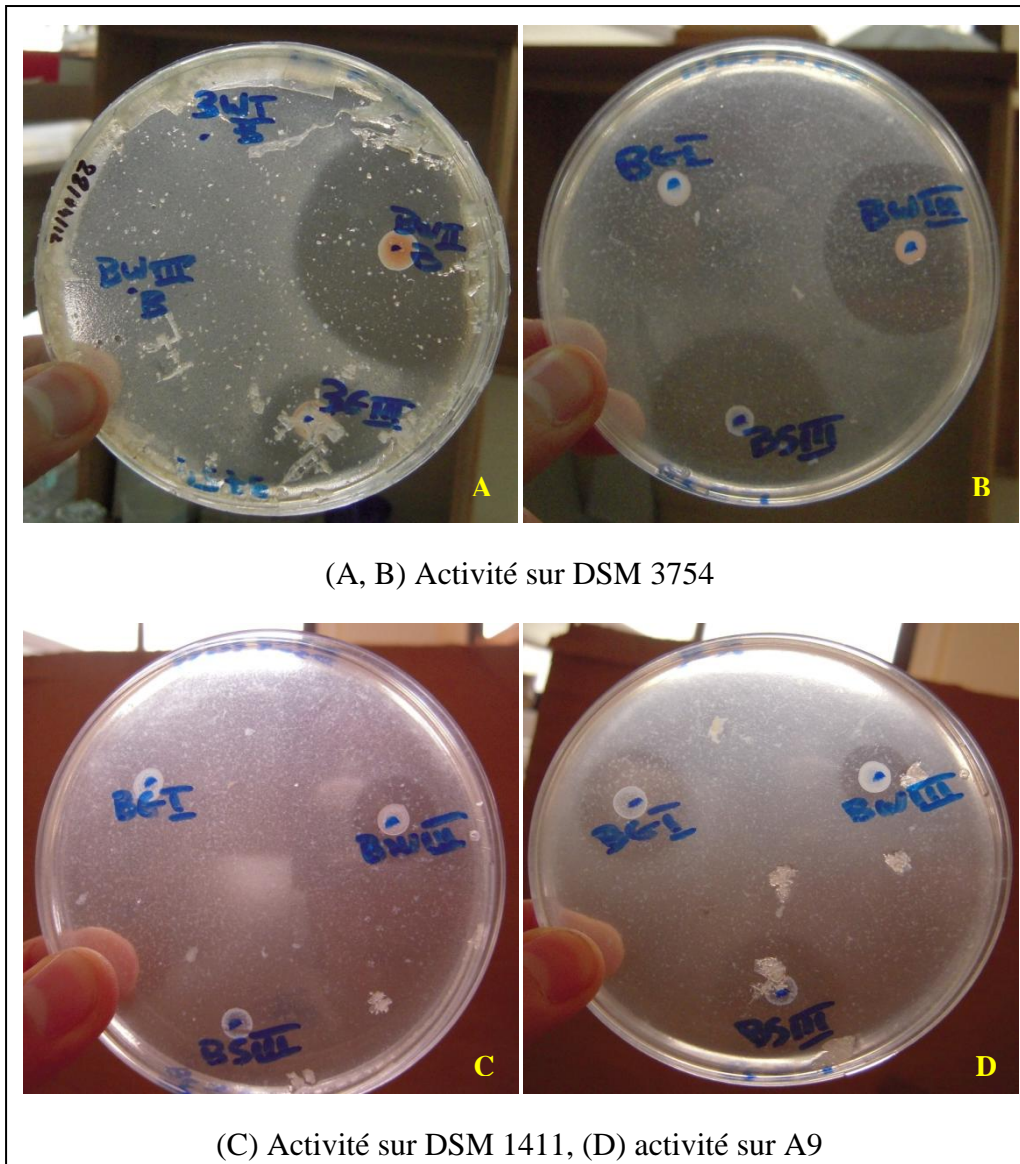


Figure 22 : Halos d'inhibition de certaines souches isolées sur des souches d'archées halophiles extrêmes

Les résultats obtenus montrent que 11 (BWI₂, BWI₅, BWII₂, BWII₃, BWIII₂, BWIV₂, BWII_B, BGI, BGIV, BSII, BSIII) des souches isolées sont actives contre au moins une souche d'haloarchées avec des diamètres d'inhibition allant de faible (10mm pour BWIII₂) à très large (45mm pour BWII_B).

Ces résultats montrent que les souches secrètent des agents qui inhibent d'autres archées halophiles. Selon **Litchfield (2011)**, il n'y a que les haloarchées phylogénétiquement proches qui peuvent entrer en compétition. On peut donc déduire que les souches peuvent être des haloarchées.

La majorité des souches actives donnent des halos d'inhibition d'un diamètre de plus de 20mm. Par exemple, les souches BSIII, BWIII₂, BWI₅ et BWII_B ont un diamètre d'inhibition variant de 35mm à 45mm contre *Halobacterium salinarum* (DSM 3754). Ce qui les rend vraiment **intéressantes**.

D'après les résultats de **Kis-papo et Oren (1997)**, on remarque que leurs tests d'activité réalisés sur 4 souches cibles, parmi elles *Haloferax mediterranei* (DSM 1411), sont négatifs. Par contre, 3 des souches isolées du Chott El Beida : BWII₂, BWIII₂ et BWIV₂ montrent des diamètres d'inhibition respectivement de 8mm, 15mm et 8mm sur *Haloferax mediterranei* (DSM 1411). L'importance de ces diamètres fait de ces souches, des souches **très intéressantes**.

➤ Culot surnageant :

Nous avons voulu rechercher si l'activité anti-archéenne est dans le culot ou le surnageant, et les résultats sont mentionnés dans le tableau X.

Tableau IX : Résultats des tests d'activité du culot, du surnageant et la culture elle-même.

Souches test	Culot (C)-Surnageant (SN)	Sur DSM3754
BSIII 30mm	SN	25mm
	C	30mm
BGI 30mm	SN	20mm
	C	35mm
BWIII ₂ 35mm	SN	30mm
	C	35mm

Les résultats confirment que les souches ont une activité anti-archéenne mais ne nous permettent pas de dire si l'activité est secrétée ou non.

-Méthode des stries croisées :

Par la méthode des stries croisées, nous avons pu avoir aussi des inhibitions de croissance (Figure 23).

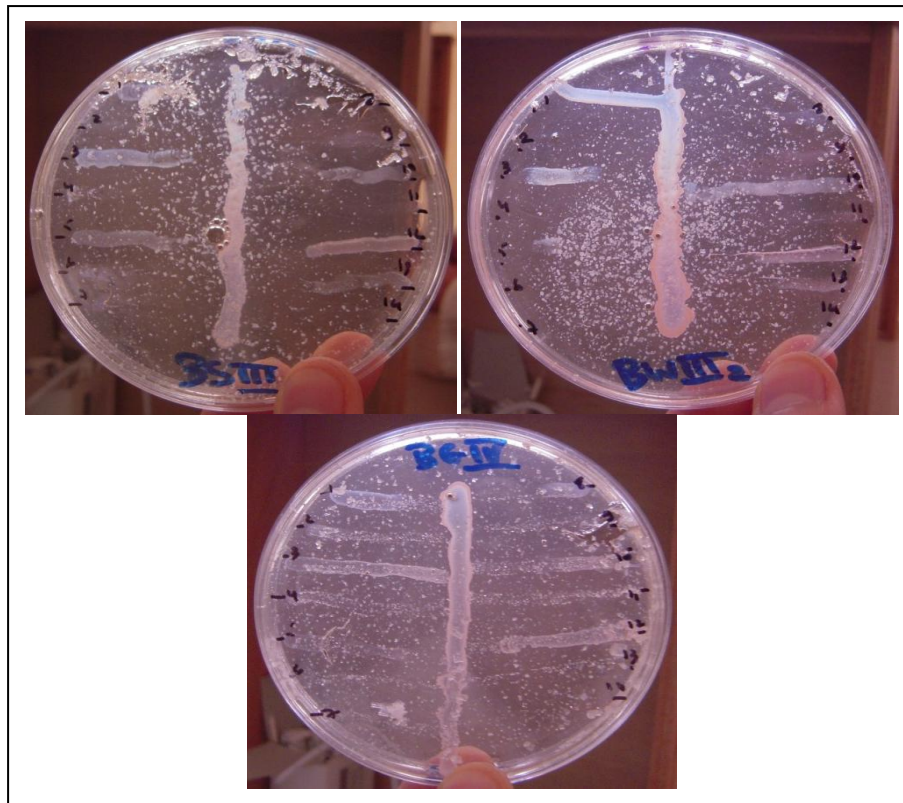


Figure 23 : Résultats du test des Stries croisées.

Le premier temps d'incubation a permis la croissance de germe test et une production de substances anti-archéennes dans le milieu. Dans un second temps, l'ensemencement des germes cibles nous a permis de voir quelle souche est inhibée par ces substances produites. Le tableau des résultats est en **Annexe 5**.

3. Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats montrent que la plupart des souches sont résistantes aux antibiotiques traditionnellement actifs contre les bactéries (Ampicilline et Streptomycine). Cependant, nous remarquons que quelques souches sont sensibles vis à vis des antibiotiques : Erythromycine et Chloramphénicol. Ces résultats sont compatibles avec ceux rapportés par **Bardavid et Oren (2008)**. Le tableau des résultats se trouve en **Annexe 6**.

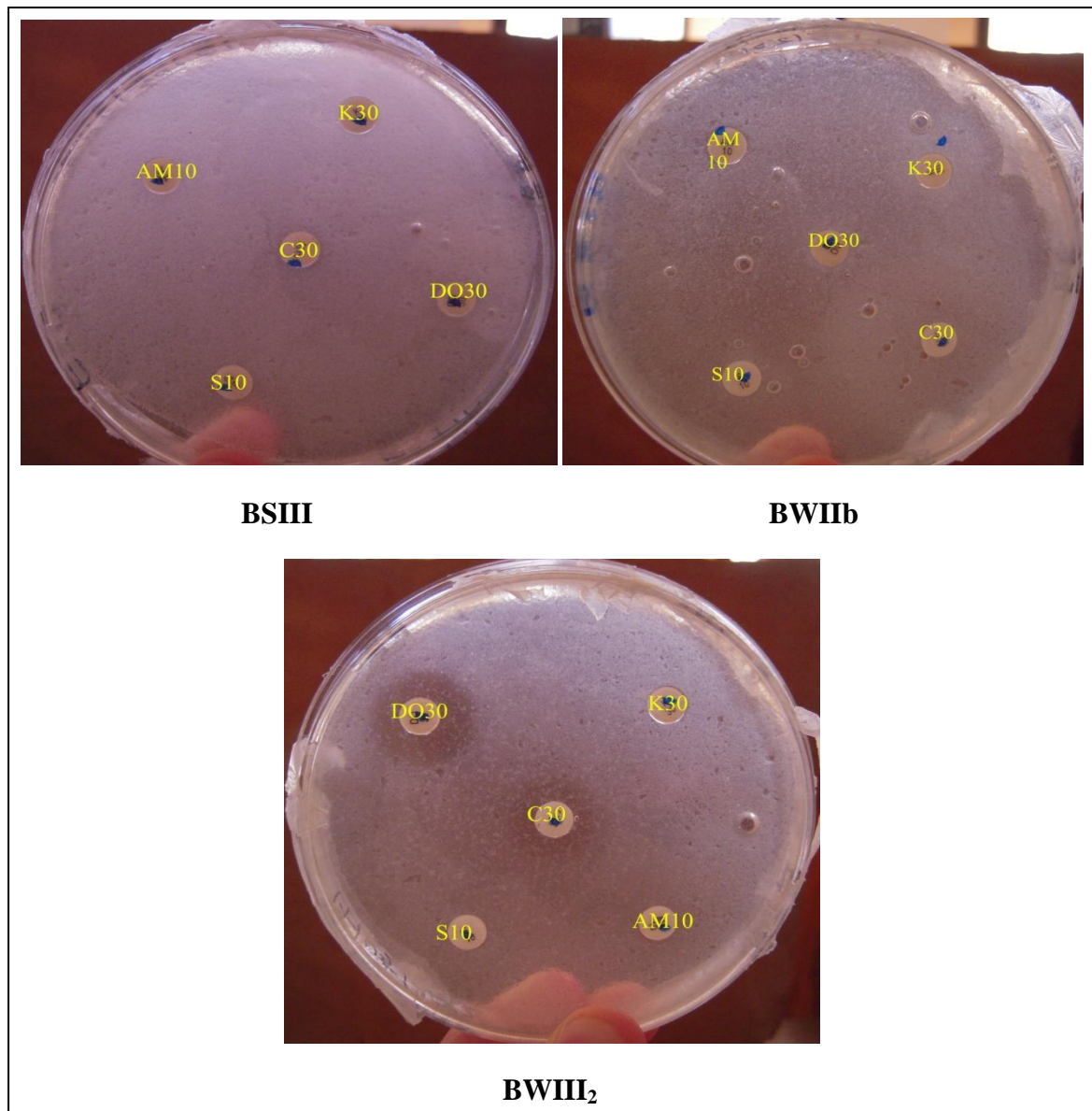


Figure 24 : Photographies de quelques résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques (Streptomycine (S10), Doxycycline (DO30), Ampiciline (AM10), Kanamycine (K30) et Chloramphenicol (C30)).

4. Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont rapportés dans le tableau XI.

Tableau X : Résultats de quelques tests biochimiques réalisés sur les souches sélectionnées

Tests Souches	Catalase	Production d'indole	Hydrolyse d'amidon	Hydrolyse de la caséine	Uréase	β - Galactosidase
BGI	-	+	-	-	+	+
BGIII	+	ND	-	-	+	ND
BGIV	+	+	ND	-	+	ND
BSII	+	-	+	+	+	ND
BSIII	+	-	-	+	+	+

BWI ₂	+	+	-	+	+	ND
BWI ₅	+	+	-	-	+	ND
BWII ₂	+	+	-	+	+	ND
BWII ₃	+	+	-	-	+	ND
BWIII ₂	+	+	-	+	+	+
BWIV ₂	+	-	-	+	+	ND
BWI _B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BWII _B	+	-	ND	+	+	+
BWIII _B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DSM1411	+	ND	+	ND	ND	ND
DSM3754	+	-	+	ND	+	ND
1Z	+	ND	ND	ND	ND	ND
2Z	+	ND	ND	ND	ND	ND
3Z	+	ND	ND	ND	ND	ND
SH	+	ND	-	ND	ND	ND
A9	+	ND	ND	ND	ND	ND

(ND : non déterminé, + : résultat positif, - : résultat négatif)

La figure 25 montre des résultats obtenus pour les tests de dégradation d'amidon et de caséine.

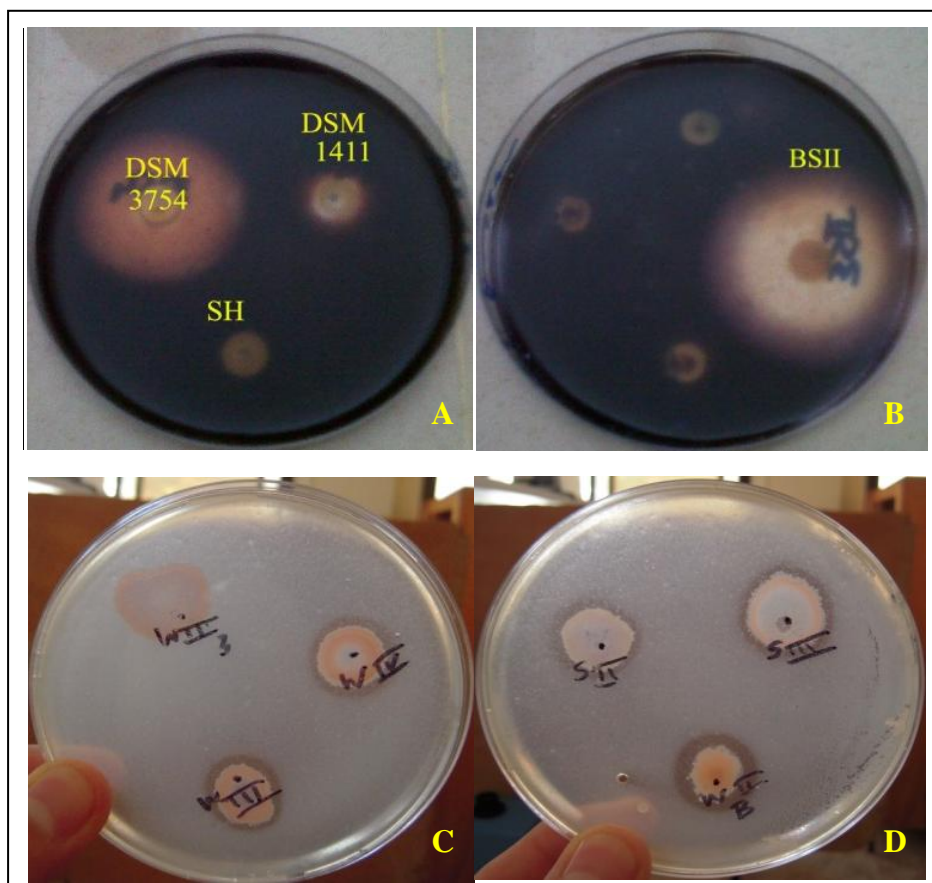


Figure 25 : Photographies de quelques résultats de dégradation de l'amidon (A et B) et de la caséine (C et D).

Nous n'avons pas pu effectuer tous les tests standards recommandés par **Oren et coll. (1997)** pour la description d'un nouveau taxon de la famille des *Halobacteriaceae*. Cependant, quelques tests ont été effectués pour 12 souches isolées en plus de certaines souches d'haloarchées.

Les résultats obtenus ne nous permettent pas d'affilier avec certitude nos isolements à un genre d'*Haloarchaea* mais peuvent quand même nous orienter vers la famille des *Halobacteriaceae* en comparant nos résultats à ceux d'**Oren et coll. (2009)**.

Dans cette étude, nous avons isolé des souches d'archées halophiles extrêmes à partir d'un nouveau site non exploité et écologiquement non pollué qui est Chott El Beida au Sud d'El Eulma dans la wilaya de Sétif. L'analyse des échantillons d'eau, de sel et de sol prélevés *in situ*, a abouti à l'isolement d'une trentaine de souches se développant à une concentration en NaCl de 25%.

14 souches ont été sélectionnées sur la base de leur pigmentation. Les tests antimicrobiens ont montré que 12 des souches sélectionnées sont actives contre au moins une souche d'archées halophiles extrêmes. Les halos d'inhibition sont parfois importants allant jusqu'à 45mm de diamètre. Certaines souches présentent une activité contre une souche de référence *Haloferax mediterranei*, considérée comme étant résistante aux halocines. Les souches que nous avons sélectionné sont donc potentiellement productrices d'halocines.

Des essais de croissance pour les échantillons de sel et de terre à pH 9 ont indiqués l'existence de souches alcalotolérantes. Par ailleurs, les souches isolées poussent à 30% de NaCl, elles sont donc halophiles extrêmes.

L'ensemble des résultats obtenus ont permis d'affilier les souches à la famille des *Halobacteriaceae*.

Pour la poursuite de notre étude, des travaux d'approfondissement sont à faire concernant les souches isolées et les produits secrétés.

Il s'agit d'identifier les souches actives par le séquençage de l'ADNr 16S afin de les affilier à un Genre ensuite à l'espèce.

Concernant les substances éventuellement produites, il faut déterminer leur nature par le test Protéases. Suite à cela, il faut optimiser les conditions de croissance et de production (pH, température...), ensuite extraire et purifier ces substances. Selon leur nature et leur mécanisme d'action, on pourra connaître leurs applications biotechnologiques.

Références bibliographiques

A

Arahal D.R., Oren A., et Ventosa A. (2011). Taxonomie of *Halobacteriaceae* and taxonomie of *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiologie*. **61**:2792-2795.

B

Bardavid R.E., et Oren A. (2008). Sensitivity of *Haloquadratum* and *Salinibacter* to antibiotics and other inhibitors: implication for the assessment of the contribution of Archaea and Bacteria to heterotrophic activities in hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol*, **63**:309-315.

Blatt H., Middleton G., et Murray R. (1980). Evaporites and native sulphur. In *Origin of Sedimentary Rocks*. Ed. H. Blatt, G. Middleton & R. Murray. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 782p.

Briffotiaux J. (2008). Maintenance génomique chez l'archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* : découverte de nouvelles interactions physiques et caractérisation fonctionnelle. Thèse pour l'obtention du Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale en Microbiologie, Brest, France, 195p.

C

Caumette P. (1998). Les bactéries halophiles : la vie dans les conditions extrêmes de salinité. *CR Acad Agric Fr* **84**,11-21.

D

DasSarma P et DasSarma S. (2008). On the origin of prokaryotic "species": the taxonomy of halophilic *Archaea*. *Saline Systems*, **4**:1-5

DasSarma S et Arora P. (2001). Halophiles. *Encyclopedia Of Life Sciences*:1-9.

DeLong E.F. (2003). Oceans of *Archaea*. *American Society of Microbiology News*, **69**(10); 503-511.

Demdoum A. (2010). Etude hydrogéochimique et impact de la pollution sur les eaux de la région d'El Eulma. Thèse de Doctorat d'état en Géologie. Université Mentouri Constantine,

Faculté des Sciences de la Terre, de la Géographie et de l'Aménagement du Territoire,
Département des Sciences de la Terre, Université de Constantine, Algerie, 231p.

Dussault H.P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal Of Bacteriology*. **70** (4):484.

E

Ebel C., Madern D., et Zaccai G. (2004). Molecular adaptation of halophilic proteins. *Extremophiles* **2**:1-7.

Ellen A.F., Zolghadr B., Driessen A.M.J., et Albers S.V. (2010). Shaping the Archaeal Cell Envelope. *Archaea* **2010**, 13p.

H

Haupts U., Tittor J., et Oesterhelt D. (1999). Closing in on Bacteriorhodopsin : Progress in Understanding the Molecule. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **28**:367-399.

K

Kamekura M., et Dyall-Smith M.L. (1995). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrabacterium* and *Natrialba*. *Journal of General Applied Microbiology*. **41**: 333-350.

Karan R., Capes1 M.D, et DasSarma S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic Biosystems*, **8**:1-4.

Kharroub K. (2007). Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine, Algerie, 194p.

Kis-Papo T et Oren A. (1999). Halocins : Are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds ?. *Extremophiles*, **4**:35-41.

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

L

Larsen, H. (1980). Ecology of hypersaline environments. In *hypersaline Brines and Avaporitics environments*. Ed. A. Nissenbaum. pp. 23-60. Elsevier Amsterdam, Netherlands.

Litchfield C.D. (1998). Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. Meteoritical Society. *Meteoritics & Planetary Science* **33**,813-819.

Litchfield C.D. (2011). Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**:1635–1647.

M

Madigan M.T., Markinto J.M., et Parker J. (1997). Brock's Biology of Microorganisms, 8th ed. Upper Saddle River NJ: Prentice Hall, p743.

Meseguer I., Rodriguez-Valera F., et Ventosa A. (1986). Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS Microbiological Letters*. **36**: 177-182.

Meseguer I., Torrenblanca M., et Konishi T. (1995). Specific Inhibition of Halobacterial Na⁺/H⁺ Antiporter by Halocin H6. *The Journal Of Biological Chemistry*. **270**(12):6450-6455.

Mongkol Y. (2009). Carotenoid Production by Halophilic Archaea and Its Applications. Thèse de Doctorat en Technologie alimentaire. Université Prince of Songkla Thailand, 159p.

O

Ochsenreiter T., Pfeifer F., et Schleper C. (2002). Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles* **6**:267-274.

Oren A., Arahall D.R., et Ventosa A. (2009). Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**:637-642.

Oren A., Ventosa A., et Grant W.D. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, **47**(1):233-238.

Oren A. (2002). Hypersaline Environments and their Biota. In : Halophilic Microorganisms and their Environments. Edition : Kluwer Academic Publishers Jerusalem,393-395.

Oren A. (2002). The Cellular Structure Of Halophilic Microorganisms. In Halophilic Microorganisms and their Environments. Edition : Kluwer Academic Publishers Jerusalem, 69-74.

Oren A. (2006). Life at High Salt Concentrations. *Procarvotcs* **2**:263-282.

Oren A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, **4**(2):1-13.

Oren A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*. **31**(8,9) 825–834.

Oren A. (2012). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae*: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62**, 263-271.

P

Peyfoon E., Meyer B., Hitchen P.G., Panico M., Morris H.R., Haslam S.M., Albers S.V., et Dell A. (2010). The S-Layer Glycoprotein of the Crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius* Is Glycosylated at Multiple Sites with Chitobiose-Linked N-Glycans. *Archaea* **2010**, 10p.

Pfeifer F., Gregor D., Hofacker., PlöBer P., et Zimmermann P. (2002). Regulation of Gas Vesicle Formation in Halophilic Archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, **4**(3):175-181.

R

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

Rodier J. (2009). L'analyse de l'eau. Edition: DUNOD. Paris. 1526p.

Rodriguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. (1980). Isolation of Extremely Halophilic Bacteria Able to Grow in Defined Inorganic Media with Single Carbon Sources. *Journal Of General Microbiology*, **119**:535-538.

Rodriguez-Valera F., Ventosa A., Juez G., et Imhoff J.F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-ponds saltern. *Microbial Ecology* **11** : 107-115.

S

Sezonov G. (2009). Les Archaea: le troisième domaine du vivant. <<http://tinyurl.com/coursARCHAEA>>.

Shand R.F et Leyva K J. (2007). Peptide and Protein Antibiotics from the Domain *Archaea*: Halocins and Sulfolobocins. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, ed. by M.A. Riley and M.A Chavan Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 93-109.

T

Tenchov B., Vescio E.M., Sprott G.D., Zeidel M.L., et Mathai J.C. (2006). Salt Tolerance of Archaeal Extremely Halophilic Lipid Membranes. *The Journal Of Biological Chemistry*. **281**(15):10016–10023

Thomas N.A., Brady S.L., et Jarell K.F. (2001). The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiology Reviews* **25**:147-174.

Annexe 1 : Matériel utilisé

- Microscope électronique à balayage (FEI Quanta 200)
- Spectromètre à absorption atomique (Thermo-Scientific ICE 3500)
- Spectro à flamme
- Autoclave ALFA-10-PLUS (PBIInternational)
- Spectrophotomètre (SHIMADZU)
- GPS (GARMIN)
- Four Pasteur (RAYPA)
- Etuve (MEMMERT)
- pH mètre combiné thermomètre pH700 (EUTECH Instruments)
- Bain marie agitateur (IKA Labortechnik)
- Bain marie (RAYPA et Julabo TW12)
- Centrifugeuse (SIGMA 1-14)
- Vortex ZX3 (VELP Scientifica)
- Plaque chauffante agitatrice (RAYPA)
- Balance électronique CS200 (OHAUS)
- Microscope Optique (ZEISS)
- Réfrigérateur
- Becs Benzène
- Portoirs de tubes
- Tubes à essai (20ml)
- Tubes de culture en plastique stériles (10ml)
- Boîtes Pétri
- Erlenmayer
- Becher
- Fiole graduée
- Eprouvette graduée
- Flacons
- Seringues (60ml)
- Pipettes (5ml et 10ml)
- Pipettes Pasteur
- Micropipettes (ACCUMAX)
- Embouts jaunes
- Embouts bleus
- Eppendorfs
- Anse de platine

- Anses en plastique jetables
- Lames et lamelles
- Spatule

Produits utilisés :

- Acide acétique (2%)
- Ethanol (70%)
- Fuschine
- Violet de gentiane
- Chlorure d'hydrogène (HCl) (2N)
- Hydroxyde de sodium (NaOH) (2N et 1N)
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- Phosphate de potassium (KPO₄)
- Chlorure de calcium (CaCl₂)
- Acide sulfurique (H₂SO₄)
- Iodo-ioduré (Iugol)
- Phénolphtaléine
- Méthyle orange
- Murexide
- EDTA
- Réactif KOVACS

Souches utilisées :

- *Halobacterium salinarum* (DSM 3754)
- *Haloferax mediterranei* (DSM 1411)
- SH : *Haloarcula sp.*
- A9 : Sol Ichakaben Béjaïa, 2009
- 1Z : Eau de source salée, Iadnanen Béjaïa 2007
- 2Z : Sol+sel, Iadnanen 2007
- 3Z : Sol à l'intérieur de la source Iadnanen 2007

Annexe 2 : Milieux de culture (en g/l)

- Milieu BROWN : (pH=7)
- NaCl.....250
- Extrait de levure.....5
- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....3
- MgSO₄.....20
- Agar.....20
-
- Milieu BROWN 30% : (pH=7)
- NaCl.....300
- Extrait de levure.....5
- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....3
- MgSO₄.....20
- Agar.....20
-
- Milieu Complexe : (pH=7)
- NaCl.....250
- Extrait de levure.....5
- Extrait de viande.....2
- Peptone.....5
- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....18
- MgSO₄.....20
- Agar.....20
-
- Milieu à base d'amidon : (pH=7)
- NaCl.....250
- Extrait de levure.....5
- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....3
- MgSO₄.....20
- Amidon.....10
- Agar.....20
-
- Milieu à base de lait : (pH=7)
- NaCl.....250
- Extrait de levure.....5

- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....3
- MgSO₄.....20
- Agar.....2
- Lait écrémé.....10

Annexe 3 : Comparaison entre les trois domaines**Tableau IX** : Comparaison des principales caractéristiques des trois domaines du vivant
(In Briffotiaux, 2008).

Taille typique	Archaea 1 à 4 µm	Bacteria 1 à 4 µm	Eucarya Supérieure à 5 µm
Caractéristiques physiologiques	Aérobie et anaérobie	Aérobie et anaérobie, chlorophyllienne	Très largement aérobie, chlorophyllienne
Matériel génétique	Petit chromosome circulaire, plasmides et virus ; génome associé avec des histones	Petit chromosome circulaire, plasmides et virus ; pas d'histones	Noyau complexe avec plus d'un chromosome linéaire, virus ; génome associé avec des histones
Différenciation	Généralement unicellulaire, différenciation cellulaire rare	Généralement unicellulaire, différenciation cellulaire rare	Unicellulaire et pluricellulaire, différenciation cellulaire fréquente
Paroi cellulaire	Protéine, glycoprotéine, pas de paroi mais une couche S (S-layer)	Peptidoglycane (muréine) et LPS, rarement formé de protéines, formes sans parois rares	Grande variété, absence de peptidoglycane
Membrane cytoplasmique	Ether de glycérol et d'isoprénoïdes, site de la biosynthèse d'énergie	Ester du glycérol et des acides gras, site de la biosynthèse de l'énergie	Esters du glycérol et des acides gras, cholestérol fréquent
Membranes intracytoplasmiques	Généralement absentes	Généralement absentes ; quand présentes, contiennent de grandes quantités de protéines	Fréquentes dans les organites comme les mitochondries et les chloroplastes, le noyau, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les vacuoles ; site de la biosynthèse de l'énergie
Locomotion	Flagelle simple, plusieurs types de flagelline	Flagelle simple, glissement, un seul type de flagelline	Flagelles complexes, cils, pattes, nageoires, ailes
Traduction			

Synthèse protéique	Ribosome 70S, insensible au chloramphénicol et au cycloheximide, diphtamide présente dans le facteur d'élongation	Ribosome 70S, sensible au chloramphénicol, insensible au cycloheximide, diphtamide absente dans le facteur d'élongation	Ribosome 80S et 70S (organites), insensible au chloramphénicol (80S), sensible au cycloheximide (80S), diphtamide présente dans le facteur d'élongation
ARNr	5S, 16S, 23S	5S, 16S, 23S	5,8S, 18S, 28S
Séquence Shine Dalgarno	Présence	Présence	Absence
Transcription			
ARN polymérase	Complexe (1 type, 12 sous-unités)	Simple (1 type, 4 sous-unités)	Complexe (3 types, nombreuses sous-unités)
Mode de fixation de l'ARN Pol sur le promoteur	Protéine TBP (TATA binding protein) Promoteur : séquence TATA située à -25 pb du site d'initiation	Facteur σ Promoteur : séquences situées à -35 pb et -10 pb du site d'initiation	Protéine TBP Promoteur : séquence TATA située à -25 pb du site d'initiation
Réplication de l'ADN			
Origine de réplication	Une ou plusieurs origines de réplication selon les espèces	Une seule origine de réplication <i>Ori C</i>	Plusieurs origines de réplication impliquant le complexe ORC
Hélicase	MCM (Minichromosome maintenance complexe)	DnaB	MCM (Minichromosome maintenance complexe)
ADN Polymérases	Famille B et D pour les <i>Euryarchaeota</i> , Famille B pour les <i>Crenarchaeota</i>	Pol I (famille A), Pol II (famille B), Pol III (famille C)	Principales ADN Pol : Pol α , Pol δ , Pol ϵ (famille B)
Facteur de processivité	PCNA	β clamp	PCNA

Annexe 4 : Correspondance des souches sélectionnées :**Tableau X :** Souches sélectionnées, leur abréviation, nom, origine et leur site de prélèvement.

Abréviations	Nom complet	Origine	Site
B W I ₂	Beida Water zone I tube 2	Eau	À l'intérieur du Chott El Beida
B W I ₅	Beida Water zone I tube 5	Eau	À l'intérieur du Chott El Beida
B W II ₂	Beida Water zone II tube 2	Eau	Loin de la rive du Chott El Beida
B W II ₃	Beida Water zone II tube 3	Eau	Loin de la rive du Chott El Beida
B W III ₂	Beida Water zone III tube 2	Eau	Proche de la rive du Chott El Beida
B W IV ₂	Beida Water zone IV tube 2	Eau	Très proche de la rive du Chott El Beida
B W I _B	Beida Water zone I souche blanchâtre	Eau	À l'intérieur du Chott El Beida
B W II _B	Beida Water zone II souche blanchâtre	Eau	Loin de la rive du Chott El Beida
B W III _B	Beida Water zone III souche blanchâtre	Eau	Proche de la rive du Chott El Beida
B G I	Beida Ground zone I	Sol	A l'extérieur du Chott el Beida zone sèche
B G III	Beida Ground zone III	Sol	A l'intérieur du Chott El Beida zone humide
B G IV	Beida Ground zone IV	Sol	A l'intérieur du Chott El Beida zone humide
B S II	Beida Salt zone II	Sel	Au niveau de la rive du Chott El Beida sel humide
B S III	Beida Salt zone III	Sel	Au niveau de la rive du Chott El Beida sel sec

Annexe 5 : Résultats de l'activité antagoniste par stries :**Tableau XI :** Résultats de l'activité antagoniste par la méthode des stries croisées

(-) aucune inhibition, (+) inhibition, (ND) non déterminé.

Souches	BGI(1)	BGIII(2)	BGIV(3)	BSII(4)	BSIII(5)	BWI ₂ (6)	BWI ₅ (7)	BWII ₂ (8)	BWII ₃ (9)	BWIII ₂ (10)	BWIV ₂ (11)	A9(12)	DSM1411(13)	DSM3754(14)
BGI	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BGIII	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
BGIV	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BSII	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
BSIII	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BWI ₂	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
BWI ₅	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
BWII ₂	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
BWII ₃	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
BWIII ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
BWIV ₂	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+

DSM1411	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Annexe 6 : Résultats de la sensibilité aux antibiotiques :

Tableau XII : Résultats du test de la sensibilité à certains antibiotiques

(S) sensible, (R) résistante, (ND) non déterminé, (-) résultat annulé.

Antibiotiques	Céfotaxime (CE10)	Oxacilline (OX5)	Erythromycine (E15)	Céfoxitine (FOX30)	Céphalexine (CP30)	Ampicilline (AM10)	Doxycycline (DO30)	Kanamycine (K30)	Streptomycine (S10)	Chloramphenicol (C30)
Souches										
BSIII	R	R	S (20mm)	R	R	R	R	R	R	R
BSII	ND	ND	ND	ND	ND	R	S (10mm)	R	R	R
BGI	R	S (40mm)	S (10mm)	S (40mm)	R	R	S (10mm)	R	R	R
BWIII ₂	R	R	S (20mm)	R	R	R	S (15mm)	R	R	S (10mm)
BWII _B	ND	ND	ND	ND	ND	R	R	R	R	R
DSM3754	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Résumé

Notre travail porte sur l'isolement et la caractérisation de souches d'archées halophiles extrêmes. Notre choix, pour la collecte des échantillons lors des prélèvements, s'est porté sur un Chott non exploité et écologiquement non pollué à savoir le Chott El Beida de la région d'El Eulma dans la wilaya de Sétif. Des échantillons à partir du sol, du sel et de l'eau ont abouti à une trentaine d'isollements. Ces derniers peuvent croître à pH neutre (pH 7) et alcalin (pH 9). Les tests antimicrobiens effectués ont montré que 12 des souches isolées sont actives vis-à-vis d'une ou de plusieurs souches d'halo-archées. Elles sont donc potentiellement productrices d'halocines. Ces 12 souches ont fait l'objet d'un essai d'identification morphologique et biochimique et aussi de croissance à 30% d'NaCl donnant des résultats plutôt concluants pour une éventuelle affiliation taxonomique.

Mots clés : Environnements hyper salins, Chott El Beida, Isolements, Archées halophiles extrêmes, Halocines.

Abstract

Our work focuses on the isolation and characterization of strains of extreme halophilic archaea. Our choice, for the collection of the samples, fell on a no exploited and ecologically unpolluted saline lake which is Chott El Beida in the region of El Eulma, Wilaya of Setif. Samples from soil, salt and water reached to around thirty isolates. These isolates can grow at neutral and alkaline pH (7 and 9). The antimicrobial tests showed that 12 strains isolated are active against one or more strains of halo-archaea. Therefore these strains are potentially producers of halocins. These 12 strains were tested for morphological and biochemical identification and also growth at 30% of NaCl. The overall results are conclusive for a possible taxonomic affiliation.

Key words : Hyper saline environments, Chott El Beida, Isolation, Extreme halophilic archaea, Halocins.