

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ABDERRAHMANE MIRA- BEJAÏA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



Ref :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**

Option : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

AZNI Ferhat et HAMMICHE Walid

Thème

**Effet des UV sur la production d'amylase chez des isolats
halophiles extrêmes**

Soutenu le : 27/06/2023

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

M^{me} DJINNI Ibtissem

MCA

Président

M^{me} YAHIAOUI Houa

MAA

Examinatrice

Mr NOURI Hamid

MCA

Encadreur

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

*Nos sincères remerciements s'adressent, d'abord, à notre promoteur **M^r Nouri Hamid***

Nous voudrions présenter nos vifs remerciements pour sa disponibilité, son encadrement efficace, ses remarques et ses conseils précieux, sa compréhension, pour la confiance qu'il nous a toujours témoigné et pour sa grande gentillesse.

Nous tenons à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, à l'éclairage de leur expertise.

*Nous exprimons notre sincère reconnaissance à **M^{lle} Djinni Ibtissam**, Pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant la présidence de jury.*

*Nous exprimons également nos sincères remerciements à **M^{me} Yahiaoui Houa**, pour avoir accepté d'examiner ce travail*

Dédicace

*Je dédie ce travail A mes chers parents
MOHAMED et **AKILA** pour leur patience et leur
bienveillance durant toutes ces années que ça soit
du côté moral, affectif et émotionnelle et financier.*

*A ma très chère sœur qui en chaque instant a été
un pilier de réconfort de par sa sagesse et ça
droiture.*

*A toute la famille **AZNI** et **MANSSOURI***

A Walid et toute sa famille

A Tout mes amis

A toute la promotion Biotechnologie Microbienne

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes très chers parents **Mustapha** et **Zahra** qui m'ont toujours entouré d'Amour et de tendresse qui n'arrête pas de me soutenir, pour leur témoigner de mon immense amour, respect et la reconnaissance pour tous les efforts qu'il ont entrepris et n'arrête pas d'entreprendre à mon égard*

A mes chers grands frères et grandes sœurs qui monts toujours soutenus et encourager à aller de l'avant au quel je souhaite tout le bonheur du monde et la réussite de la vie

*A toute la famille **HAMMICHE** et **ZERROUGUI***

A la mémoire de mes défunts grand parents, que dieu les accueille dans son vaste paradis, qui resteront toujours dans mon cœur

A M.Y

A Ferhat et toute sa famille

A mes très chers amis

A toute la promotion Biotechnologie Microbienne

A toutes les personnes que j'aime et je respecte.

WALID

Liste des abréviations

Milieu Br	milieu Brown
Rayon UV	ultra-violet
NaCl	sel
DO	densité optique

Liste des figures

Figure n°01. Images représentatives des salines imelahen de Feraoun et le marais salin de san Francisco	3
Figure n°2. Représentation schématique des processus cellulaire impliqué dans l'adaptation au sel des microorganisme halophiles (Dutta et al.,2022).....	4
Figure n°3 : Courbe de spectre d'absorbance de L'ADN au UV (Davies, 1995)	11
Figure n°4 : Dimères (DPC) et (PP) (Chatterjee et al.,2017).....	12
Figure n°5 : Diversité des dommages à l'ADN et des mécanismes de tolérance et de réparation correspondants (Houtgraaf et al, 2006).....	14
Figure n°6 : Schéma récapitulatif de la manipulation.....	17
Figure n°7 : schéma récapitulatif du test de mise en évidence.....	18
Figure n° 08 : Boîtes de colonies de microorganismes halophiles extrêmes des isolats 4.8, 7.9 et 10.2 obtenus apres incubation de 7 jours.....	20
Figure n°09 : mutants obtenus après exposition des boites 10-2 à 254 nm sur 30 secondes et 60 secondes.	21
Figure n°10 : Colonies de mutants repiquées (mutant 4.8 à gauche et 7.9 à droite).....	23
Figure n°11 : Colonies de mutants repiquer sur milieu amidon et une incubation de trois jours après ajout du Lugol (mutant 4.8 à gauche et 7.9 à droite).....	23
Figure n°12 : histogramme représentant le sucre produit (mg/ml) par chaque isolat.	25
Figure n°13 : Courbes spectroscopie souche 4.8(gauche) et A1(droite)	26
Figure n°14 : Courbes spectroscopie souche A2(gauche) et A3(droite)	26
Figure n°15 : Courbes spectroscopie souche A9(gauche) et A10(droite)	27
Figure n°16 : Courbes spectroscopie souche 7.9(gauche) et B1(droite)	31
Figure n°17 : Courbes spectroscopie souche B3(gauche) et B5(droite)	31
Figure n°18 : Courbe spectroscopie B1-60S	31

Liste des tableaux

Tableau I : enzymes extraites de microorganisme halophiles et leur utilisation.....	5
Tableau II : Halophiles producteur d' α -Amylase et leurs lieux d'isolement (Kumar et al, 2016).....	7
Tableau III : Enzymes importantes issues d'halophiles et leurs utilités en industrie (Kumar et al, 2016).....	10
Tableau IV : différents types de d'agents mutagènes (Chatterjee et al.,2017).....	10
Tableau V : Nombre de colonies halophiles extrêmes obtenue après dénombrement et ensemencement 10^{-2} et 10^{-3}	20
Tableau VI : Nombre de mutants apparus selon la dilution, la longueur d'ondes et le temps d'exposition.....	21
Tableau VII : Taux de survie des colonie halophiles au rayon UV selon la dilution, la longueur d'ondes et le temps d'exposition.....	22
Tableau VIII : Colonies mutantes produisant de l'amyase des souche 4.8 et 7.9.	23
Tableau IX : Densité optique des isolats.....	24

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	2
I.1 Les microorganismes halophiles extrêmes	2
I.1.1 Définition et habitats des microorganismes halophiles extrêmes	2
I.1.2 Mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles aux conditions environnementales	3
I.1.3 Importance biotechnologique des microorganismes halophiles extrêmes	5
I.2.1 Définition et fonction des amylases.....	6
I.2.2 microorganismes halophiles producteurs d'amylase	6
I.2.3 Caractéristiques des amylases chez les bactéries halophiles extrêmes	7
I.2.4 Paramètres influençant l'activité enzymatique de l'amylase	8
I.2.5 Amylase extraite de halophiles extrêmes et leur utilisation industrielle	9
I.3 rayonnement et leurs effets sur les bactéries halophiles extrêmes	10
I.3.1 agents mutagènes	10
I.3.2 caractéristiques des rayonnements.....	10
I.3.3 Mécanismes de réparation de l'ADN.....	13
I.2.4 conséquences de l'absence de réparation de l'ADN	14
II. Matériels et Méthodes	16
II.1 Matériels.....	16
II.2 Méthodes	16
II.2.1 Culture des isolats 4.8, 7.9, 8.9 et 10.2	16
II.2.2 Dénombrements sur milieu Brown	16
II.2.3 Productions des mutants par mutagenèse aléatoire.....	17
II.2.4 Mise en évidence de l'activité amyliasique sur gélose.....	18
II.2.5 Dosage des sucres totaux.....	18

Principe du dosage des sucres totaux à l'Anthrone.....	18
II.2.6 L'analyse par spectroscopie infrarouge (FTIR).....	19
III Résultat et discussions	20
III.1 Dénombrements sur milieu Brown	20
III.2 Productions des mutants par mutagenèse aléatoire.....	21
III.3 Mise en évidence de l'activité amylasique sur gélose.....	23
III.4 Spectroscopie FTIR (Fourier Transform Infrared).....	26
Conclusion.....	35
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

Les agents mutagènes peuvent être classés en deux groupes selon leur dégât causé à l'ADN : les endogènes qui sont une réaction hydrolytique et oxydative du matériel génétique avec de l'eau et des agents exogènes qui sont divisés en agents chimiques et physiques. Les rayons ultraviolets sont considérés comme un agent mutagène physique, ils sont divisés en trois catégories selon leurs longueurs d'ondes (UVA, UVB et UVC). Tous les microorganismes ont un degré d'absorption de rayons UV précis une fois le seuil passé la cellule meurt mais si l'absorption a lieu une mutation se produit.

Les microorganismes halophiles extrêmes sont des microorganismes représentés dans les trois domaines de la vie, *archaea* tel que *halobacterium*, *bacteria salinobacter ruber*, *eukarya*. Ils sont trouvés dans des milieux hypersalins qui sont répartis à travers le monde tels que les lacs salés, marées salées, mer morte...etc. Ils prolifèrent à des concentrations de NaCl élevées (5M NaCl), des pH et températures élevées.

Ces dernières années le marché des enzymes est un marché lucratif due à leurs utilisations dans différents domaines tel que l'agro-alimentaire, pharmaceutique...etc. Les enzymes produites par des microorganismes ont connu un succès énorme grâce à leurs méthodes de production et la disponibilité des microorganismes et récemment les techniques de mutagenèse. Les amylases sont des enzymes essentielles du marché utilisées dans différents domaines principalement la dégradation de l'amidon et les industriels recherchent sans cesse des moyens d'accroître sa production.

Suite à ces connaissances, nous avons jugé utile et profitable de débiter un travail portant sur la production d'amylase dans des isolats halophiles extrêmes ou nous allons induire des mutations grâce au rayonnement ultra-violet, dans le but d'accroître la production d'amylase de ces derniers. Pour cela le choix de la longueur d'onde et le temps d'exposition au UV est primordial pour induire une bonne croissance de ces microorganismes et une production d'amylase extracellulaire accrue.

Notre travail a donc pour objectifs d'induire des mutations à l'aide d'UV sur des isolats halophiles extrêmes et la sélection de mutants produisant d'amylase pour en déduire les effets des agents mutagènes (rayon UV) sur les isolats et si les mutations sont bénéfiques pour la production d'amylase, pour cela des tests approfondis ont été mis en place tel que le dosage des sucres totaux et l'analyse spectrale par infra-rouge.

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1 Les microorganismes halophiles extrêmes

I.1.1 Définition et habitats des microorganismes halophiles extrêmes

Les microorganismes halophiles sont des organismes extrémophiles composés d'archées, de bactéries et d'eucaryotes capables de proliférer en milieux salins tel que *Haloquadratum walsbyi* en forme de carré et les Nano-haloarchaea faisant partie de archaea et *Salinibacter ruber* qui est une bactérie extrêmement halophile appartenant à l'embranchement des Bacteroidetes (Ghai et al., 2011 ; Narasingarao et al., 2011). Due à leurs propriétés halophiles, plusieurs microorganismes halophiles prolifèrent à des concentrations de pH et de NaCl élevées entre des températures moyennes et élevées ainsi permettant de réaliser des fermentations sans contamination dans des conditions non stériles (Fu et al., 2014). Ils possèdent aussi des caroténoïdes spécifiques et d'autres molécules qui peuvent être utilisées comme biomarqueurs et peuvent être détectées précisément à l'aide de la spectroscopie Raman (Oren 2014). Selon la quantité de sel que ces microorganismes peuvent tolérer, ils peuvent être réparties dans les groupes suivants :

- ❖ Halophiles faibles : entre 0.34 et 0.85 M de NaCl
- ❖ Halophiles modérés entre 0.85 et 3.4 M de NaCl
- ❖ Halophiles extrêmes : entre 3.4 et 5.1 M de NaCl (Abaramak et al., 2020)

Les halophiles peuvent être facilement isolés des lacs de soude hypersalins de Magadi, au Kenya, en Afrique, des bassins salins de la péninsule du Sinaï, en Égypte (Walsby, 1980), et du Grand Lac Salé ou de la Mer Morte dans l'Utah, aux États-Unis. Il existe d'autres exemples de sites hypersalins dans le monde, comme en Algérie où se trouvent les salines de Feraoun à Béjaïa et les salines d'Arzew à Oran (Figure 01).



Saline imelachen Feraoun, Bejaïa, Algérie (©l'Association Assirem Gouraya, 2017).



Le marais salant de la baie de San Francisco, USA, Amérique (2011).

Figure n°01. Images représentatives des salines imelachen de Feraoun et le marais salin de san Francisco

I.1.2 Mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles aux conditions environnementales

Environnements salins

Les microorganismes halophiles ont développé des stratégies pour maintenir la viabilité de leur protoplasme et l'équilibre ionique. Les mécanismes utilisés par les microorganismes tolérants au sel pour résister à l'environnement très salin sont divers et variés :

Salt in/out cytoplasme pour maintenir la balance osmotique et l'accumulation de solutés compatibles ou "organo-osmolytes" tels que la glycine-bétaïne, l'éctoïne et l'hydroxyéctoïne (Oren 2014).

Protection contre les chocs hypo-osmotiques par les aquaporines et les cryoprotecteur (Dutta et al.,2022).

Les concentrations intracellulaires d'ions de sodium et potassium sont régulées par la pompe de chlorure dirigé vers l'intérieur alimenté par la lumière (Yun et al., 2020).

Formation de grosses quantités de soluté organique « Glycérol » : Le glycérol augmente la pression osmotique du cytoplasme en augmentant l'accumulation d'autres solutés cytoplasmiques, empêchant ainsi la perte de fluides (Oren 2020).

Synthèse bibliographique

La réduction de la fréquence des acides aminés hydrophobes et la tendance à former des structures de bobines aléatoires par rapport aux hélices α sont sans aucun doute des facteurs décisifs pour l'adaptation au milieu salin (Elcock *et al.*, 1998).

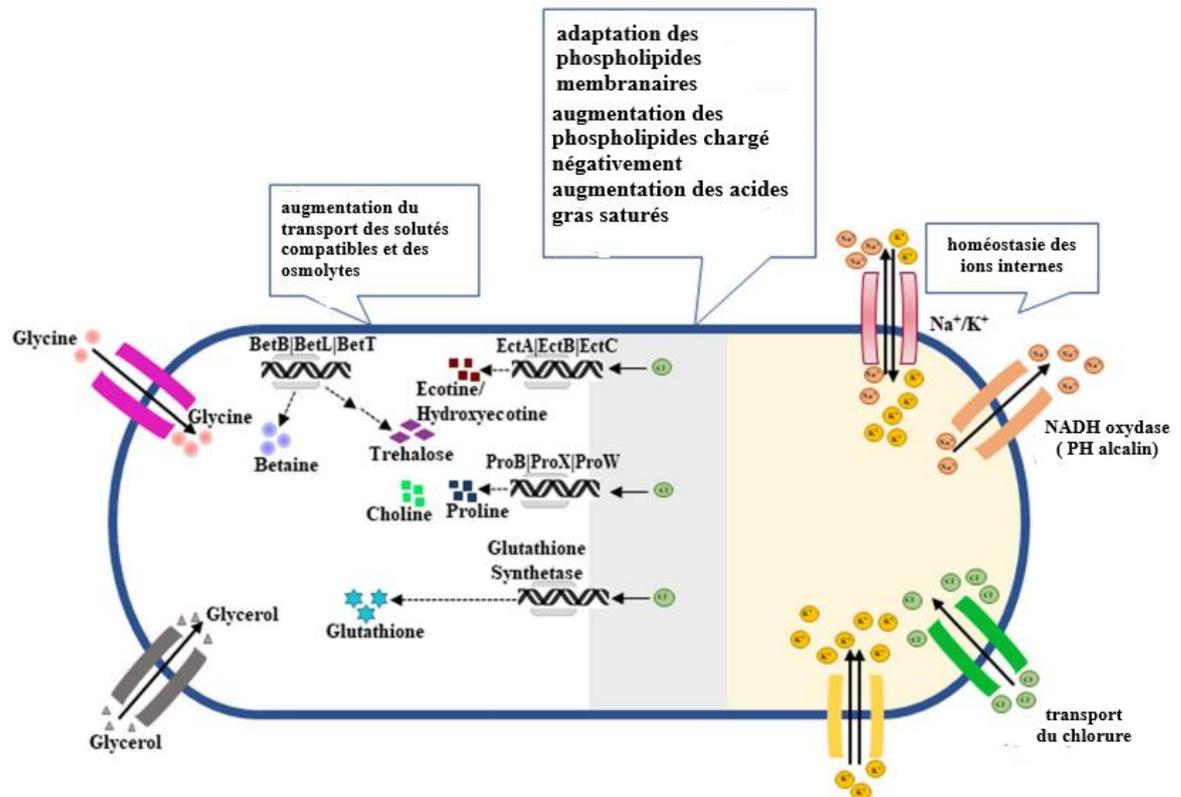


Figure n°2. Représentation schématique des processus cellulaires impliqués dans l'adaptation au sel des microorganismes halophiles (Dutta *et al.*, 2022)

Environnements lumineux

De nombreux membres de la famille peuvent produire la bactériorhodopsine, une protéine violette liée à la membrane, une protéine de 25 kDa qui porte une fraction de rétinol liée comme une base de Schiff à l'un de ses résidus lysine (Oren 2014). La bactériorhodopsine agit comme une pompe à protons commandée par la lumière. Après absorption d'un photon (absorbance maximale à 570 nm), la molécule subit un photocycle complexe au cours duquel la base de Schiff est séquentiellement protonée et déprotonée. Les protons sont prélevés dans le cytoplasme et lors de la déprotonation, libérés dans le milieu extérieur. Un gradient de protons est ainsi établi. Il peut être utilisé pour entraîner la formation d'adénosine triphosphate. La croissance anaérobie sous l'effet de la lumière est donc possible, mais des substrats organiques sont toujours nécessaires comme source de carbone (Hartmann *et al.*, 1980).

I.1.3 Importance biotechnologique des microorganismes halophiles extrêmes

Potentiel biomédical dans le domaine de la neurochirurgie, la thérapie par transplantation de microbiote fécal (FMT) avec des micro-organismes halophiles pourrait être un traitement prometteur de l'autisme (**Evrensel et al., 2016**). Les bactéries halophiles extrêmes produisent également de façon naturelle des halocines qui sont des peptides antimicrobiens qui inhibent l'activité des autres microorganismes (**Rodriguez-Valera et al., 1982**).

Production de biocarburant : Les différentes formes de biocarburants sont le bioéthanol, le biobutanol, le biogaz, l'hydrogène et le biodiesel. Le bioéthanol est le substitut le plus approprié parmi tous les biocarburants et les halophiles sont directement impliqués dans la production d'éthanol et de butanol par la technique de fermentation du sucre (**Amiri et al., 2016**).

Gestion des résidus par biodégradation des hydrocarbures et de plastique (**Wong et al., 2016**).

L'adaptation des protéines à la pression osmotique, pH élevé et à la salinité attire de nombreuses industries à l'utilisation des enzymes halophiles stables comme candidat idéal à la réalisation de tous les objectifs biotechnologiques industriels (**Dutta et al., 2022**).

Tableau I : enzymes extraites de microorganisme halophiles et leur utilisation.

Enzymes	Domaine d'utilisation
Protéase	Traitement du cuir, alimentation, produits laitiers (Gaonkar et al., 2018)
Lipase	Détergents, textiles, produits pharmaceutiques (Hemamalini et al., 2018)
Amylase	Alimentation, textile, brassage (Siroosi et al., 2021)
Estérase	Synthèse d'un composé optique, parfum, antioxydant (Tutuncu et al., 2019)
Uréase	Boissons alcoolisées, hémodialyse (Zhou et al., 2020)
Xylanase	Industrie de la pâte et du papier (Malik et al., 2019)
Chitinase	Gestion des déchets, industrie alimentaire (García-Fraga et al., 2014)

I.2 Amylase chez les microorganismes halophiles extrêmes

I.2.1 Définition et fonction des amylases

Les amylases sont des enzymes industriels essentiel, leurs utilisations en industrie requièrent une stabilité en un fonctionnement optimal dans des environnements extrêmes on peut les classer en α -amylase, β -amylase, and γ -amylase (Tiwari et al., 2015).

Les α -Amylases aussi appelées α -1,4-glucanohydrolases sont un groupe d'amylases qui décomposent les chaînes de carbohydrates tels que l'amidon et le glycogène en chaînes plus courtes constituées de deux ou trois unités de glucose. Les amylases sont des enzymes extracellulaires qui clivent aléatoirement les liaisons α -(1-4) qui lient deux unités adjacentes de glucose dans une chaîne linéaire d'amylose pour finalement aboutir à des unités séparées de glucose, maltose et maltotriose. (Tiwari et al., 2015 ; Mobini-Dehkordi et al., 2012 ; Haki G, 2003).

Les β -amylases sont des exo-hydrolases qui libèrent le maltose à partir de l'extrémité non réductrice des poly-glucanes et oligo-glucanes liés par des liaisons α -1,4 jusqu'à ce qu'elles rencontrent le premier point de ramification α -1,6 le long de la molécule substrat (Ziegler, 1999).

La γ -amylase (gamma-amylase) rompt les dernières liaisons glycosidiques α (1-4) à l'extrémité non réductrice de l'amylose et de l'amylopectine, produisant du glucose. La γ -amylase clive les liaisons α (1-6) -glycosidiques. Contrairement aux autres formes d'amylase, la gamma-amylase fonctionne mieux dans les environnements acides à un pH optimal de 3.

I.2.2 microorganismes halophiles producteurs d'amylase

La course à la recherche de souches halophiles productrices d'amylase a été lancée depuis longtemps. Avant les années 70, une dizaine de souches ont déjà pu être identifiés par Good et Hartman, ils ont rapporté que *Halobacterium salinarum* était la souche la plus productrice d'amylase (Good et Hartman, 1970), Plus tard, Onishi. (Onishi ,1972) a isolé une souche de *Micrococcus* halophile modérée produisant de l'amylase à partir de sel solaire non raffiné. Le même groupe a isolé une souche d'*Acinetobacter* sp. Produisant de l'amylase à partir de sables marins (Onishi et al.,1978).

Depuis plusieurs souches ont pu être criblées et identifiées à travers beaucoup d'écosystèmes.

Tableau II : Halophiles producteur d' α -Amylase et leurs lieux d'isolement (**Kumar et al., 2016**).

Isolat	Lieu d'isolement
<i>Micrococcus</i>	Sel solaire non raffiné, Japon
<i>Natronococcus amylolyticus</i>	Lac Magadi, Kenya
<i>Haloferax mediterranei</i>	Habitat salin d'Espagne
<i>Haloarcula</i> sp. strain S-1	sel solaire français, Commercialement disponible
<i>Haloarcula hispanica</i>	Saline solaire, Espagne
<i>Halorubrum xinjiangense</i>	Lac hypersalin Ourmia, Iran
<i>Halomonas meridiana</i>	Lacs salés de l'Antarctique
<i>Bacillus dipsosauri</i>	Cavité nasale d'un iguane du désert
<i>Halobacillus</i> sp. strain MA-2	Sol salin, Iran
<i>Bacillus</i> sp. strain TSCVKK	Échantillons de sol, Inde
<i>Chromohalobacter</i> sp. TVSP 101	Étang de sel évaporé, Inde
<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	Lac d'Aran-Bidgol, Iran
<i>Thalassobacillus</i> sp. LY18	Sol salin du lac salé de Yuncheng, Chine
<i>Pseudoalteromonas</i> spp	Golfe Persique, Iran
<i>Marinobacter</i> sp. EMB8	Kozhikode, India
<i>Amphibacillus</i> sp. NM-Ra2	Wadi An Natrun, Egypt.

I.2.3 Caractéristiques des amylases chez les bactéries halophiles extrêmes

Les enzymes halophiles, en particulier celles provenant des archées extrêmement halophiles ainsi que les fractions extracellulaires des bactéries modérément halophiles, sont hautement stables et fonctionnelles en présence de sel à des concentrations élevées, sous lesquelles la plupart des enzymes non halophiles ont tendance à s'agréger et à devenir non fonctionnelles (**Kushner 1978, 1985 ; Eisenberg et al., 1992 ; Mevarech et al., 2000**). La composition en acides aminés des enzymes halophiles est généralement caractérisée par une teneur élevée en acides aminés acides (Rao et Argos 1981). Cela conduit à une haute solubilité aqueuse sans agrégation à la fois dans les états natifs et dénaturés, ce qui permet une renaturation efficace des protéines halophiles après un traitement thermique ou dénaturant (**Tokunaga et al., 2004**). On peut résumer les caractéristiques principales des enzymes halophiles en 4 points :

- Des concentrations de sel optimales plus élevées pour l'activité enzymatique.
- Une réversibilité plus élevée aux contraintes de dénaturation.

Synthèse bibliographique

- Une stabilité accrue en présence d'ions de sel.
- La capacité à catalyser dans un milieu à faible teneur en eau ou non aqueux. (Tokunaga *et al.*,2008 ; Madern *et al.*,2000 ; Antranikian *et al.*, 2005).

L'un des points distinctifs des enzymes halophiles est la capacité de se replier de manière hautement réversible après avoir été dénaturées, dans certains cas, tels que la bêta-lactamase, la nucléoside diphosphate kinase et l' α -amylase de *Kocuria varians* (Tounaga *et al.*, 2008 ; Tokunaga *et al.*,2010 ; Yamaguchi *et al.*,2011).

Cette grande réversibilité est due à la grande solubilité des protéines halophiles En raison de leurs propriétés fortement acides et non agrégantes, même dans des conditions dénaturées Ces propriétés permettent aux protéines halophiles de rester solubles et de conserver leur structure fonctionnelle même dans des conditions extrêmes telles que des concentrations élevées de sel (Reed *et al.*,2013).

I.2.4 Paramètres influençant l'activité enzymatique de l'amylase

NaCl le principal effet du NaCl sur les protéines et de ce fait sur les enzymes est l'agrégation de ces dernières.

Les α -amylases provenant d'archées halophiles sont connues pour présenter des activités enzymatiques à un large spectre de concentrations en NaCl, aussi faibles que 0,5M pour (*Haloferax* sp. HA10) et aussi élevées que 5M pour (*Haloarcula* souche 1), avec une activité optimale dans la plage de 2 à 4,3M de NaCl. (Perez-Pomares *et al.*,2003 ; Bajpai *et al.*,2015 ; Hutcheon *et al.*,2005).

(*Haloterrigena turkmenica*) exhibe une activité optimale a 2M NaCl (Santorelli *et al.*,2016). Dans le cas de (*Halococcus* souche GUVSC8) 80% de l'activité de l'amylase a été observée dans la plage de concentration de NaCl de 0,5 à 2M, avec une activité maximale à 2M de NaCl. Une réduction de l'activité de l'amylase a été observée dans la plage de 3 à 5M de NaCl, cependant, l'activité était supérieure à 50% de l'activité maximale. (Bhakti *et al.*,2018).

Température les changements de température dénaturent les protéines et modifient leur structure. La dénaturation des protéines correspond à la perturbation de leur structure secondaire, tertiaire et quaternaire, ce qui entraîne des modifications de leurs caractéristiques physiques, chimiques et biologiques.

Synthèse bibliographique

L'α-amylase issue des haloarchaea présente une stabilité intéressante et désiré en industrie de liquéfaction de l'amidon. La température optimale de l'α-amylase obtenue à partir d'isolats haloarchéens a été rapportée dans la plage de 40°C (*Halorubrum xinjiangense*), 50°C (*Haloarcula hispanica* ; souche Haloarcula 1), 55°C (*Haloterrigena turkmenica* ; *Haloferax* sp. HA10) à 60°C. Dans le cas de (*Halococcus* souche GUVSC8), L'activité enzymatique a été trouvée optimale à 45°C et était de 80% dans la plage de 50 à 70°C. Une diminution constante de l'activité enzymatique a été observée à des températures supérieures à 70°C. Cependant, une activité enzymatique de 69% a été conservée même à 90°C. (**Kanai et al.,1995 ; Good, Hartman ,1970 ; Perez-Pomares et al.,2003 ; Bajpai et al.,2015 ; Fukushima et al.,2005, Hutcheon et al.,2005**).

pH En modifiant l'état de protonation des résidus chargés, le pH affecte la nature détaillée des interactions protéiques, et à mesure qu'il change, la distribution des charges est modifiée.

L'α-amylase de l'isolat halophile (*Halococcus* souche GUVSC8) a été mesurée active dans une large plage de pH, c'est-à-dire pH 6 à 9, avec un pH optimal de 6,0. L'activité relative de l'enzyme a commencé à diminuer à partir du pH 7 jusqu'au pH 9, avec une rétention de l'activité à 64% au pH=8 et 58% au pH=9, par rapport à celle observée à pH 6,0. (**Bhakti et al., 2018**). A ce jour, la souche (*Haloarcula hispanica*) est la seule souche d'Archées halophiles présentant une activité enzymatique optimal a pH acide (pH 5–6) (**Bajpai et al., 2015**).

Une étude récente sur les α-amylases provenant de (*Haloterrigena turkmenica*) a rapporté qu'elles présentent une activité optimale à un pH alcalin de 8,5 (**Hutcheon et al., 2005**).

Il est rapporté que (*Halorubrum xinjiangense*) et (*Haloferax mediterranei*) produisent de l'α-amylase avec une meilleure activité autour d'un pH neutre à alcalin (7-8). (**Fukushima et al.,2005 ; Kanai et al.,1995**).

I.2.5 Amylase extraite de halophiles extrêmes et leur utilisation industrielle

Les enzymes produites par les organismes halophiles sont stables dans une variété de conditions extrêmes. Par conséquent, elles sont recommandées comme catalyseurs de choix pour les applications suivantes : (1) traitement des déchets hypersalins, (2) synthèse de peptides, (3) détergents, (4) industrie textile, (5) produits pharmaceutiques et (6) industrie alimentaire. (**Oren, 2010 ; Delgado-Garcia et al.,2012 ; Reed et al.,2013**)

Synthèse bibliographique

Le tableau suivant résume ces dites propriétés ainsi que l'utilisation de ces enzymes dans différentes industries (**Kumar et al, 2016**).

Tableau III : Enzymes importantes issues d'halophiles et leurs utilités en industrie (**Kumar et al, 2016**).

α-Amylases	<i>Amphibacillus</i> sp. NM-Ra2	Stable au sel, aux alcalis, à la température, aux solvants et aux tensioactifs
	<i>Exiguobacterium</i> sp	Stable aux solvants / industrie de la boulangerie
	<i>Marinobacter</i> sp. EMB8	Stabilité aux solvants / synthèse de maltooligosaccharides
	<i>Saccharopolyspora</i> sp. A9	Formulation de détergents
	<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	Hydrolyse de l'amidon
Cellulases	<i>Aspergillus terreus</i> UniMAP AA-6	Tolérance aux liquides ioniques / saccharification de la lignocellulose
	<i>Thalassobacillus</i> sp. LY18	Stable au sel, aux solvants
	<i>Marinobacter</i> sp. MSI032	Stable au pH alcalin
Proteases	<i>Bacillus</i> sp. EMB9	Stabilité aux solvants / formulations de détergents
	<i>Geomicrobium</i> sp. EMB2	Stabilité aux solvants / formulations de détergents
	<i>Halobacterium</i> sp	Stable aux alcalins et aux sels / préparation de la sauce de poisson
	<i>Halobacterium halobium</i>	Stable aux solvants / synthèse de peptides

I.3 rayonnement et leurs effets sur les bactéries halophiles extrêmes

I.3.1 agents mutagènes

On peut diviser les dommages à l'ADN en deux catégories principales selon leur origine : les dommages endogènes et les dommages exogènes (Chatterjee et al.,2017). La majeure partie des dommages de l'ADN endogène résulte des réactions hydrolytiques et oxydatives du matériel génétique chimiquement actif avec l'eau et les espèces réactives de l'oxygène naturellement présentes dans les cellules. De telles réactions intrinsèquement prédisposées de l'ADN avec les molécules de son environnement immédiat alimentent le développement de maladies héréditaires et de cancers sporadiques (Reuter et al., 2010 ; Perrone et al., 2016). Les dommages exogènes, en revanche, se produisent lorsque des agents environnementaux, physiques et chimiques endommagent l'ADN (Chatterjee et al.,2017).

Tableau IV : différents types de d'agents mutagènes (Chatterjee et al.,2017).

Agents endogènes	Agents exogènes	
	Agents chimiques	Agents physiques
Erreurs de réplication, mésappariement de bases d'ADN	Agents alkylants	Radiation ionisante
Désamination spontanée des bases	Amines aromatiques	Radiation Ultraviolet (UV)
Sites abasiques (apurinique/apyrimidique)	Hydrocarbure aromatique polycyclique	
methylation ADN		
Les dommages oxydatifs		

I.3.2 caractéristiques des rayonnements

Le rayonnement est une énergie qui se déplace d'un point à un autre sous une forme que l'on peut décrire comme des ondes ou des particules, les rayonnements sont scindés en deux groupe ionisant et non-ionisant, les UV font partie des rayonnements ionisant.

On peut séparer les UV en trois catégories selon leurs longueurs : UV-C (190–290 nm), UV-B (290–320 nm) et UV-A (320–400nm). Les rayonnements solaires sont composés de 5.1% UV-A, 0.3% UV-B, 62.7% de lumière visible et 31.9% infrarouge et pour le cas des UV-C ils sont généralement absorbée par la couche d’ozone (Davies, 1995).

Les rayons UV et leurs effets sur l’ADN

Les rayons UV peuvent endommager l’ADN de deux manières. Dans le cas où les rayons UV sont absorbés, cela entraîne une altération photochimique des molécules d’ADN. En revanche, si les rayons UV ne peuvent pas être absorbés directement, ils peuvent transférer de l’énergie à des molécules proches, appelées photosensibilisateurs, ce qui affecte indirectement l’ADN. (Chatterjee et al., 2017)

L’ADN absorbe à un maximum de 260nm au-delà de cette longueur d’ondes l’absorption diminue de manière drastique. UV-C est généralement le type de rayon utilisé en laboratoire du fait que l’absorbance maximale de L’ADN est à 260nm (Davies, 1995).

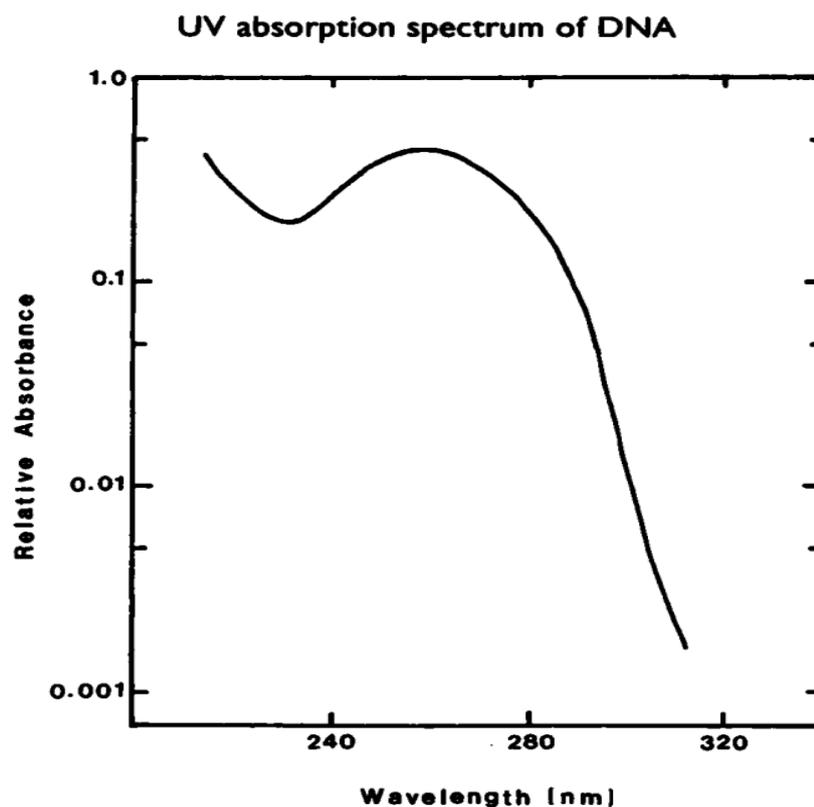


Figure n°3 : Courbe de spectre d’absorbance de L’ADN au UV (Davies, 1995)

Synthèse bibliographique

Les études menées en laboratoire montrent que les deux principaux produits de la photoaltération de l'ADN sont les dimères de pyrimidine cyclobutane (DPC) et les photoproduits de pyrimidone (6-4) de pyrimidine (PP) (Kiefer, 2007). Les adduits (6-4) PP sont générés par la cyclisation entre la liaison C5-C6 d'une pyrimidine et les groupes carbonyle ou imino de la position C4 (pour la thymine ou la cytosine, respectivement) de son voisin 3'. Les produits d'oxétane et d'azétidine qui en résultent sont instables et se réarrangent rapidement pour donner les adduits (6-4) PP, dans lesquels le groupe carbonyle ou imino de la base 3' est transféré à la position C5 de la base 5' (Pattison et al., 2006)

Dans les (DPC), Une chaîne de cyclobutane relie de manière covalente les deux pyrimidines adjacentes. Dans le cas du (6-4) PP, la position C6 d'une pyrimidine est liée de manière covalente à la position C4 de la pyrimidine adjacente. (Kiefer, 2007)

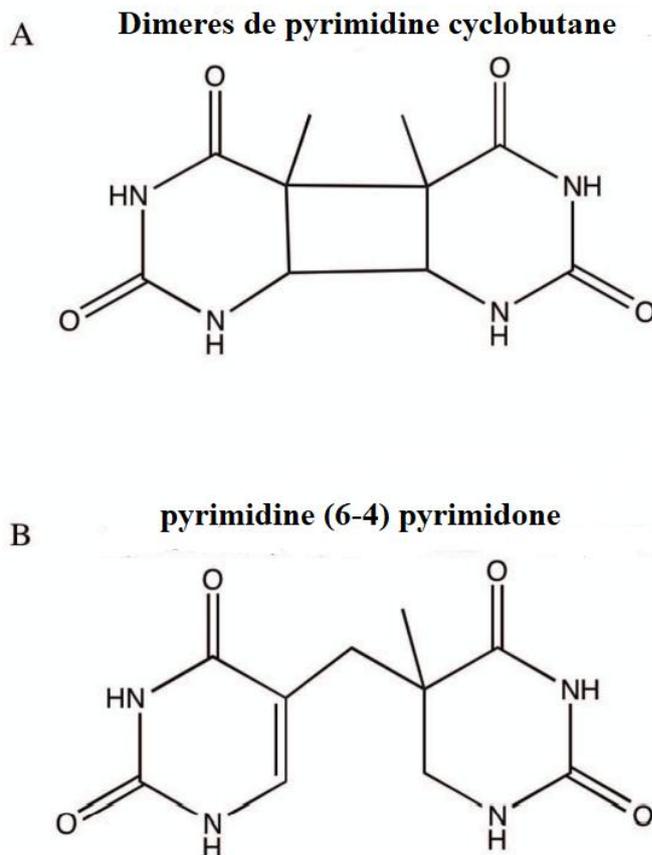


Figure n°4 : Dimères (DPC) et (PP) (Chatterjee et al., 2017).

Ces dimères impactent l'ADN en déformant l'hélice, mais aussi durant la réplication car nécessitant des polymérases TLS (Translesion Synthesis polymerases) ou (polymérases de

synthèse trans-lésionnelle) pour répliquer au-delà d'eux, contribuant ainsi à la mutagénicité. Par exemple, les mutations de transition C:G→T:A, T:A→C:G et de la paire de bases CC→TT résultent des dimères de pyrimidine. [Chan et al., 1985 ; Dumaz et al., 1993 ; Gentil et al., 1996 ; Naegeli, 1997].

Les mutations de transition C:G→T:A et T:A→C:G se produisent lorsque la base de pyrimidine endommagée (C ou T) est remplacée par une autre base de pyrimidine (T ou C), respectivement. Cela se produit car lors de la réplication de l'ADN, la polymérase TLS insère une base incorrecte en face de la base endommagée. Dans le cas de la mutation de transition C:G→T:A, la cytosine endommagée est souvent répliquée avec une adénine (A), tandis que dans la mutation de transition T:A→C:G, la thymine endommagée est souvent répliquée avec une guanine (G).

I.3.3 Mécanismes de réparation de l'ADN

Réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotides est la voie privilégiée pour éliminer les lésions volumineuses telles que les dimères de cyclobutane pyrimidine (CPD) et les dimères de (6-4) pyrimidine-pyrimidone ((6-4) PP) causées par les rayonnements ultraviolets, les adduits de benzo[a]pyrène ou les dommages causés par des agents chimio-thérapeutiques. Cependant, la réparation par excision de nucléotides (NER) (**Lin et al., 2006 ; Hubert et al., 2011 ; Dion, 2014**).

Mismatch repair (MMR)

MMR est une voie de réparation post-réplivative conservée au cours de l'évolution qui contribue à la fidélité de la réplication par au moins 100 fois (**Kunkel, 2009 ; Arana et Kunkel, 2010**). Les substrats typiques de la voie MMR sont les mésappariements de bases qui se sont produits pendant la réplication et les boucles d'insertion-délétion (IDL) au sein de séquences d'ADN répétitives qui ont résulté d'événements de dérapage de brin (**Errol C. Friedberg, 2005 ; Jiricny, 2006**)

La synthèse translesion (TLS)

La synthèse translesion est réalisée par des polymérases TLS hautement conservées. Les polymérases TLS sont des polymérases d'ADN spécialisées qui peuvent répliquer de manière relativement moins fidèle les lésions de l'ADN de manière opposée et au-delà par rapport aux polymérases d'ADN réplificatives [Sale, 2013]. Si des nucléotides incorrects sont

Synthèse bibliographique

incorporés par les polymérase TLS, ils deviennent des mutations lors du cycle de réplication suivant, ce qui favorise la tumorigènes et les maladies, mais peut également contribuer à la forme physique globale et à l'évolution des organismes.

I.2.4 conséquences de l'absence de réparation de l'ADN

Les différentes lésions de l'ADN sont causées par une grande variété d'agents. Si elles sont toujours présentes au cours de la réplication, des mécanismes de tolérance peuvent être mis en place. Pour chaque type de lésion, des mécanismes spécifiques de réparation existent. Si ces mécanismes ne sont pas mis en place, les conséquences cellulaires sont variables selon le type de dommage (**Houtgraaf et al, 2006 ; Branzei et Foiani, 2010**)

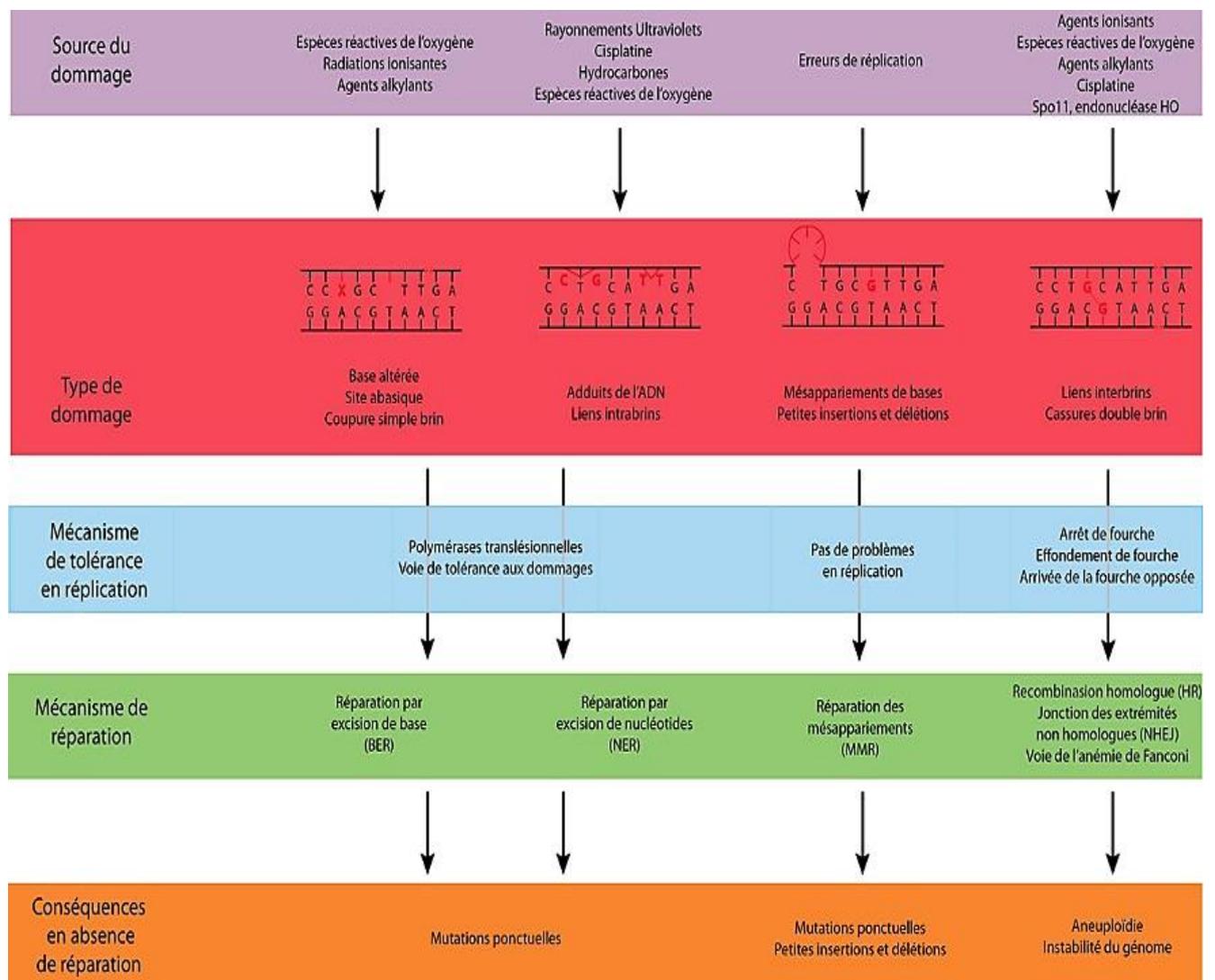


Figure n°5 : Diversité des dommages à l'ADN et des mécanismes de tolérance et de réparation correspondants (**Houtgraaf et al, 2006**)

Matériels et méthodes

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

La partie expérimentale est réalisée au niveau du laboratoire de génie biologique de la faculté des sciences de vie et de la nature de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia où nous avons été mis à disposition le matériel suivant. Les isolats d'halophiles extrêmes étudiés ont été fournis par notre encadreur NOURI HAMID, ces isolats ont été isolés à partir des salines de M'cisna (Sedouk, Bejaia) et Ait Rzine (Akbou, Bejaia) et font partie de la collection du laboratoire de microbiologie appliqué. Ils ont fait l'objet d'une caractérisation partielle. Ces isolats sont au nombre de 4 et ont été cultivés sur milieu Br (Brown) (annexe 01) à 37 ° pendant 4 jours puis conservés à température ambiante. Notre stage a duré 45 jours.

Verrerie : bécher, tubes à essai, pipette pasteur, erlenmeyers, éprouvettes, fiole jaugée.

Autre matériel : micropipettes (p1000 et p200), embouts, boîtes de pétri en plastique, spatule

II.2 Méthodes

II.2.1 Culture des isolats 4.8, 7.9, 8.9 et 10.2

Dans cette étude, plusieurs échantillons portant les noms 4.8, 7.9, 8.9 et 10.2 sont utilisés pour préparer des solutions mères qui seront utilisées tout au long du travail. Pour cela, nous prélevons à l'aide d'une micropipette 1000µl de chaque échantillon, que nous transférons ensuite dans trois tubes à essai contenant 9 ml de milieu Br. Ces tubes sont ensuite placés dans un Bain-marie shaker à une température de 37°C, et incubés pendant une période de 72 heures.

II.2.2 Dénombrements sur milieu Brown

Pour effectuer les dilutions des solutions mères préalablement préparées, nous utilisons la méthode de dilution en série jusqu'à atteindre une dilution de 10^{-3} . Pour cela, nous prélevons 1000µl de la solution mère et l'ensemencions dans un tube contenant 9 ml de milieu Br. Ensuite, après homogénéisation à l'aide d'un vortex, nous prélevons à nouveau 1000µl de cette première dilution et l'ajoutons à un autre tube contenant 9 ml de milieu Br. Nous répétons cette procédure une fois de plus pour obtenir une dilution de 10^{-3} . Par la suite, nous prélevons 100µl de chaque dilution obtenue et les étalons sur des boîtes de Petri contenant 20 ml de milieu Br solide l'expérience sera faite en duplicata avec des témoins non exposés. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 40°C pendant une période de 7 jours. À

Matériels et méthodes

l'issue de l'incubation, des colonies microbiennes se forment dans chaque boîte, avec des charges microbiologiques différentes.

II.2.3 Productions des mutants par mutagenèse aléatoire

Nous utilisons un dispositif en carton qui permet de focaliser la lumière UV émise par une lampe UV de 24 watts. La surface éclairée par ce dispositif est de 0.4m^2 , ce qui donne un éclairage énergétique de 60watts/m^2 . Pour déterminer la durée d'exposition, nous nous sommes basés sur les travaux et les résultats obtenus par (Fendrihan et al,2009) dans leur étude intitulée "Investigating the effects of simulated Martian ultraviolet Radiation on *Halococcus dombrowskii* and other extremely halophilic archaeobacteria". Ils ont observé des mutants survivants après une exposition aux UV à une dose de 5kJ/m^2 . Dans notre cas, une durée d'exposition de 30 secondes fournit une dose UV de 1.6kJ/m^2 , tandis que 60 secondes d'exposition fournissent une dose UV de 3.6kJ/m^2 . Pour chaque isolat, nous exposons les deux boîtes précédemment ensemencées aux UV pendant 30 et 60 secondes respectivement. Ensuite, nous les plaçons en incubation à une température de 40°C pendant une période de 7 jours.

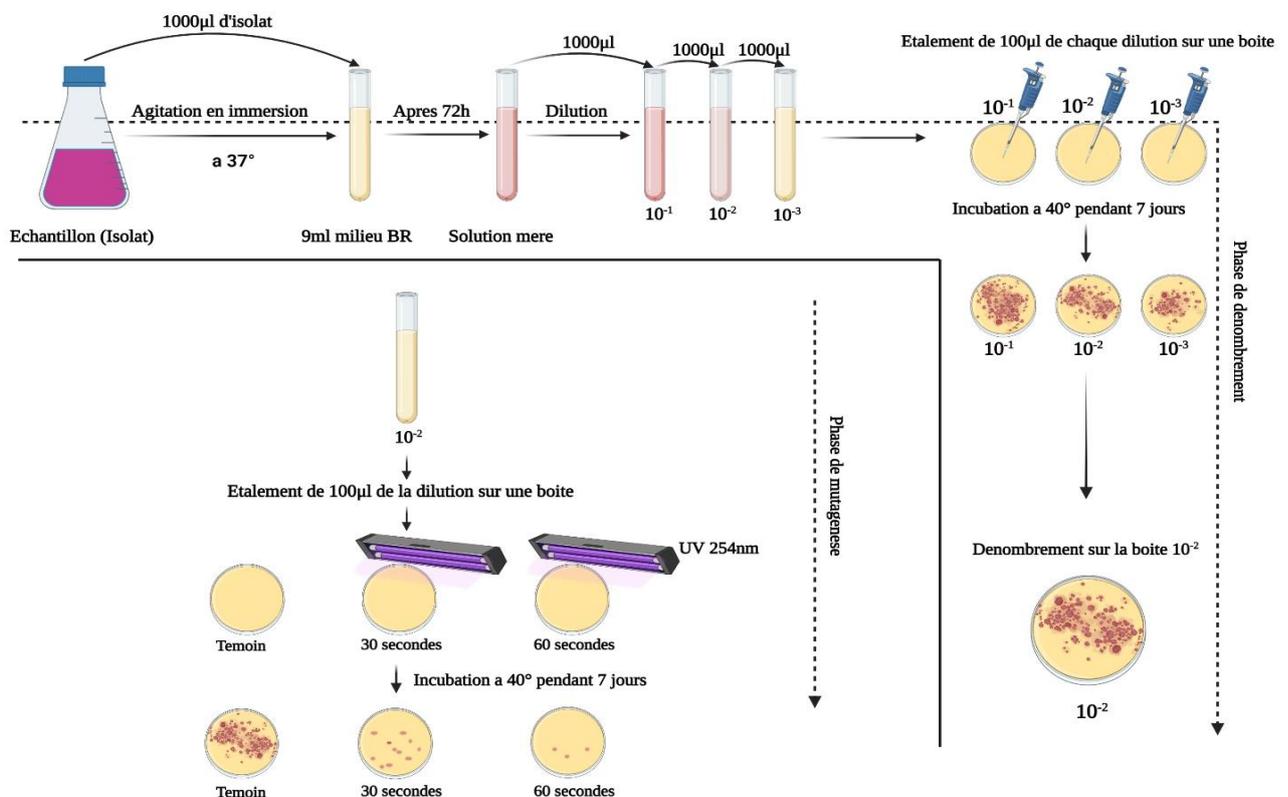


Figure n°6 : Schéma récapitulatif de la manipulation.

Matériels et méthodes

coloré. La quantité de complexe formé est ensuite mesurée sur un spectrophotomètre à une DO de 625nm, ce qui permet de déterminer la concentration des sucres totaux dans l'échantillon (preston,2007).

Préparation de solution d'anthrone La solution d'anthrone a été préparée en dissolvant 2g d'anthrone dans 100ml d'acide sulfurique concentré.

Mesure de la DO L'amylase étant une enzyme extracellulaire, la centrifugation des tubes fermentés nous permettra de séparer les tubes en deux phases distincts (culot + surnageant) pour extraire le surnageant se taire notre enzyme, l'extrait issue de chaque tube sera additionné de 2ml de réactif anthrone, puis mis à chauffer dans un bain marie a100°C, puis mis à refroidir dans un bain glacé.la mesure de la densité optique se fait directement après la sorti du bain dans un spectrophotomètre à une Do de 625nm.

Dosage par anthrone Le dosage des sucres totaux par méthode d'anthrone consiste à faire réagir l'anthrone, un composé organique, avec les sucres présents dans l'échantillon pour former un complexe coloré. La quantité de complexe formé est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, qui permet de déterminer la concentration des sucres totaux dans l'échantillon. Cette méthode est couramment utilisée en biochimie pour mesurer la teneur en sucres dans des échantillons tels que des extraits de plantes ou des solutions de culture de cellules.

II.2.6 L'analyse par spectroscopie infrarouge (FTIR)

Pour la manipulation, nous avons analysé les cultures de fermentation précédente faites que nous sélectionnons à partir du dosage par anthrone et qui sont prise selon leur DO. Une cellule à fenêtre en KBr transparente dans la région infrarouge est utilisée pour la mesure. L'échantillon est placé dans la cellule de mesure et l'analyse est effectuée. Les données spectrales obtenues sont analysées pour identifier les pics dans la région infrarouge et comparer les profiles des mutants au profile des souches. Les surnagent de culture pris pour l'analyse FTIR sont la 4.8 et ses mutants A1, A2, A3, A9, A10 et la 7.9 et ses mutants B1, B3, B5, B1-60.

Résultats et Discussions

III Résultat et discussions

III.1 Dénombrements sur milieu Brown

La figure 8 montre la charge microbienne des différents isolats avec lesquels nos expérimentations ont été conduite et le Tableau V montre le dénombrement des colonies halophiles à diverses dilutions.

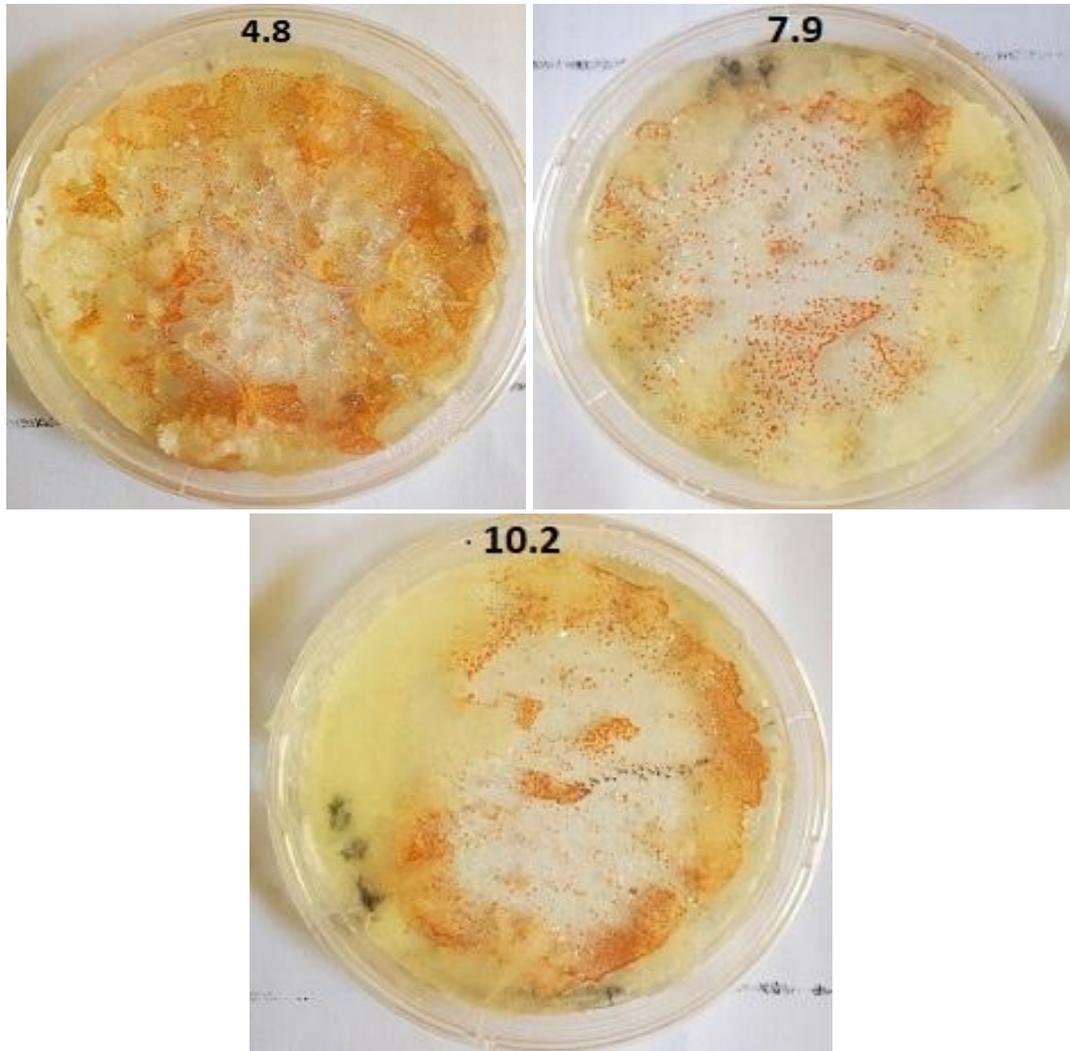


Figure n° 08 : Boites de colonies de microorganismes halophiles extrêmes des isolats 4.8, 7.9 et 10.2 obtenus après incubation de 7 jours.

Tableau V : Nombre de colonies halophiles extrêmes obtenue après dénombrement et ensemencement 10^{-2} et 10^{-3} .

Dilution	Isolats	4.8	7.9	10.2	8.9
10^{-2}		2360	1200	1152	/
10^{-3}		720	269	/	1

III.2 Productions des mutants par mutagenèse aléatoire

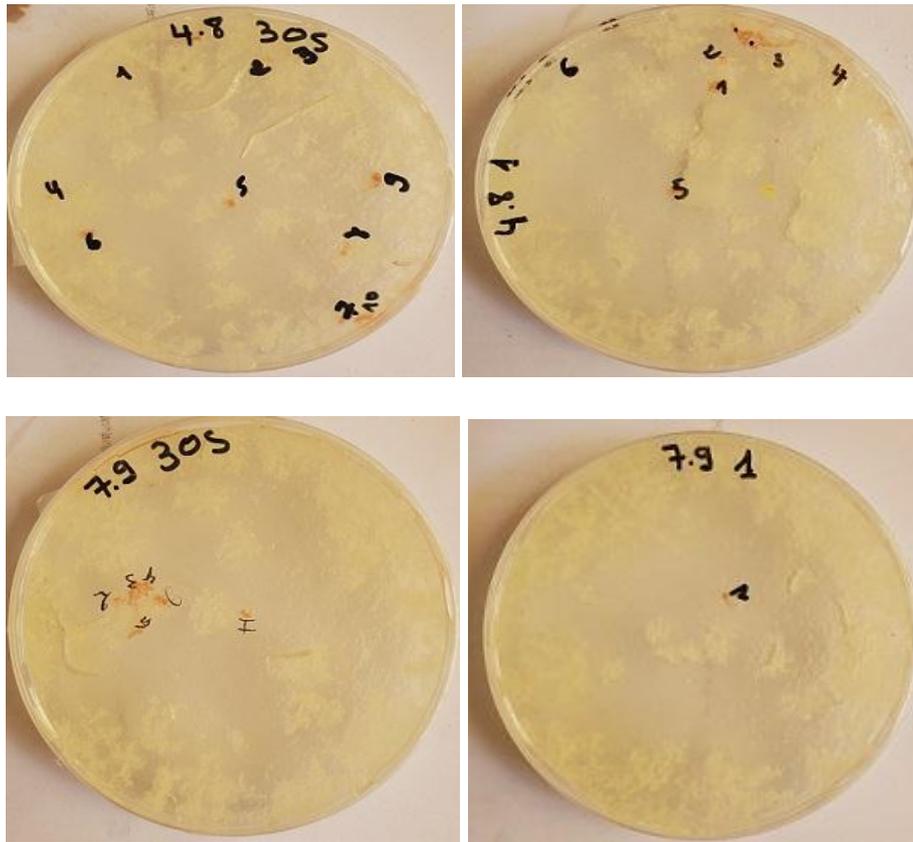


Figure n°09 : mutants obtenus après exposition des boites 10-2 à 254 nm sur 30 secondes et 60 secondes.

Dénombrement des colonies de mutants

Tableau VI : Nombre de mutants apparus selon la dilution, la longueur d'ondes et le temps d'exposition.

/	10^{-2}		10^{-3}	
	Mutants après exposition de 30 seconde à 254 nm	Mutants après exposition de 60 seconde à 254 nm	Mutants après exposition de 15 seconde à 254 nm	Mutants après exposition de 15 seconde à 365 nm
4.8	14	13	67	240
7.9	7	1	28	72
10.2	0	0	/	/
8.9	/	/	0	1

Résultats et discussions

Calcul du taux de survie :

En utilisant l'équation $\frac{n}{N} \times 100$ dont n = le nombre de mutant obtenu et N = le nombre de colonies après dénombrement. On obtient le taux de survie de chaque souche indiquée dans le tableau suivant

Tableau VII : Taux de survie des colonies halophiles au rayon UV selon la dilution, la longueur d'ondes et le temps d'exposition.

Isolats	10⁻²	
	Taux de survie après exposition de 30s à 254 nm	Taux de survie après exposition de 60s à 254 nm
4.8	0.59 %	0.55 %
7.9	0.58 %	0.08 %
10.2	0 %	0 %

La souche 4.8 a montré une survie significativement plus élevée des colonies après une exposition aux UV par rapport aux souches 7.9 et 10.2, pour toutes les dilutions testées. Cette différence était particulièrement notable après une exposition de 60 secondes, équivalente à une dose de rayonnement de 3,6 kJ/m². De plus, les boîtes de culture de la souche 4.8 présentaient une pigmentation plus intense, ce qui suggère une possible relation entre l'intensité de la pigmentation et la résistance aux UV. Des études antérieures ont montré que la plupart des halophiles extrêmes sauvages présentent une coloration prononcée, généralement en rouge ou en rose, en raison de la présence de pigments caroténoïdes. Cependant, une étude réalisée par Sharma a montré la résistance aux UV de différentes souches d'halophiles extrêmes, en comparant des souches sauvages à des mutants incolores. Les résultats de cette étude ont révélé un taux de survie similaire de 0,35% pour les deux types de souches, indiquant l'absence de corrélation entre la résistance et la pigmentation (**Sharma, 1984**). En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que la souche 4.8 présente une meilleure résistance aux UV par rapport aux souches 7.9 et 10.2, indépendamment de sa pigmentation intense. Cela suggère que d'autres mécanismes de protection peuvent être à l'œuvre pour conférer une plus grande résistance aux UV chez la souche 4.8.

III.3 Mise en évidence de l'activité amylasique sur gélose

Les figures 10 et 11 montrent les colonies ayant une activité amylasique repiqués sur gélose et l'ajout de Lugol met celles-ci en évidence tel que montré par la figure 3.4. Le tableau VII montre les résultats les colonies mutantes produisant de l'amylase des isolats 4.8 et 7.9



Figure n°10 : Colonies de mutants repiquées (mutant 4.8 à gauche et 7.9 à droite).

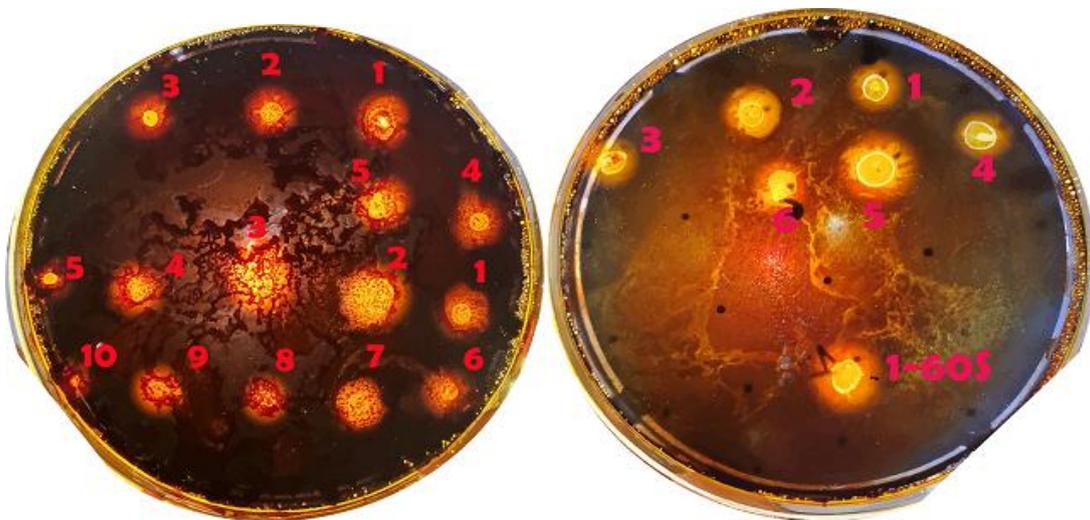


Figure n°11 : Colonies de mutants repiquer sur milieu amidon et une incubation de trois jours après ajout du Lugol (mutant 4.8 à gauche et 7.9 à droite).

Tableau VIII : Colonies mutantes produisant de l'amylase des souche 4.8 et 7.9.

Isolat	Nb de souche produisant de l'amylase après exposition	
	30 secondes	60s
4.8	10	5
7.9	6	1

Résultats et discussions

Après exposition aux UV, la majorité des souches repiquées ont montré une activité amylasique, Ce qui se manifeste par des zones claires autour des biomasses microbiennes, indiquant l'hydrolyse de l'amidon. Cependant, dans le cas de l'isolat 4.8, seule la colonie n°6 ne présentait pas d'activité amylasique. En revanche, toutes les colonies repiquées de la souche 7.9 ont montré une activité amylasique. En résumé, la plupart des souches repiquées ont présenté une activité amylasique après exposition aux UV, sauf pour une colonie spécifique de l'isolat 4.8. Toutes les colonies repiquées de la souche 7.9 ont montré cette activité. Le choix des cultures pour le dosage des sucres totaux a été effectué en se basant sur les caractéristiques visuelles des colonies sous Lugol, où des zones de blanc intense étaient observées. La majorité des souches repiquées présentent une activité amylasique après l'exposition au UV, Ce qui se traduit par des zones claires autour des biomasses microbiennes correspondant à l'hydrolyse d'amidon Pour l'isolat 4.8 seul la colonies n°6 ne présente pas d'activité amylasique. Quant à la souche 7.9, toutes les colonies repiquées présentent une activité amylasique.

III.4 Dosage des sucres totaux

Le tableau X nous indique les différentes moyennes des DO et quantité de sucre produite par chaque isolat. La figure n°13 illustre l'histogramme représentant le sucre produit (mg/ml) par chaque mutant producteur d'amylase.

Tableau IX : Densité optique des isolats.

Mutant	Absorbance	Sucre produit (mg/ml)
A1	0,93	12.88
A2	0,90	12.26
A3	0,88	11.96
A4	0,72	9.62
A5	0,762	10.32
A9	1,05	20.78
A10	1,44	39.76
B1	1,00	17.3
B2	0,73	9.36
B3	0,81	11.14

Résultats et discussions

B4	0,79	10.94
B5	0,86	12.08
B1-60S	1,08	23.16
S4,8	0,90	12.32
S7,9	1,04	20.28

Une représentation graphique par histogramme nous montre un comparatif visuel des mutants et des isolats 4.8 et 7.9:

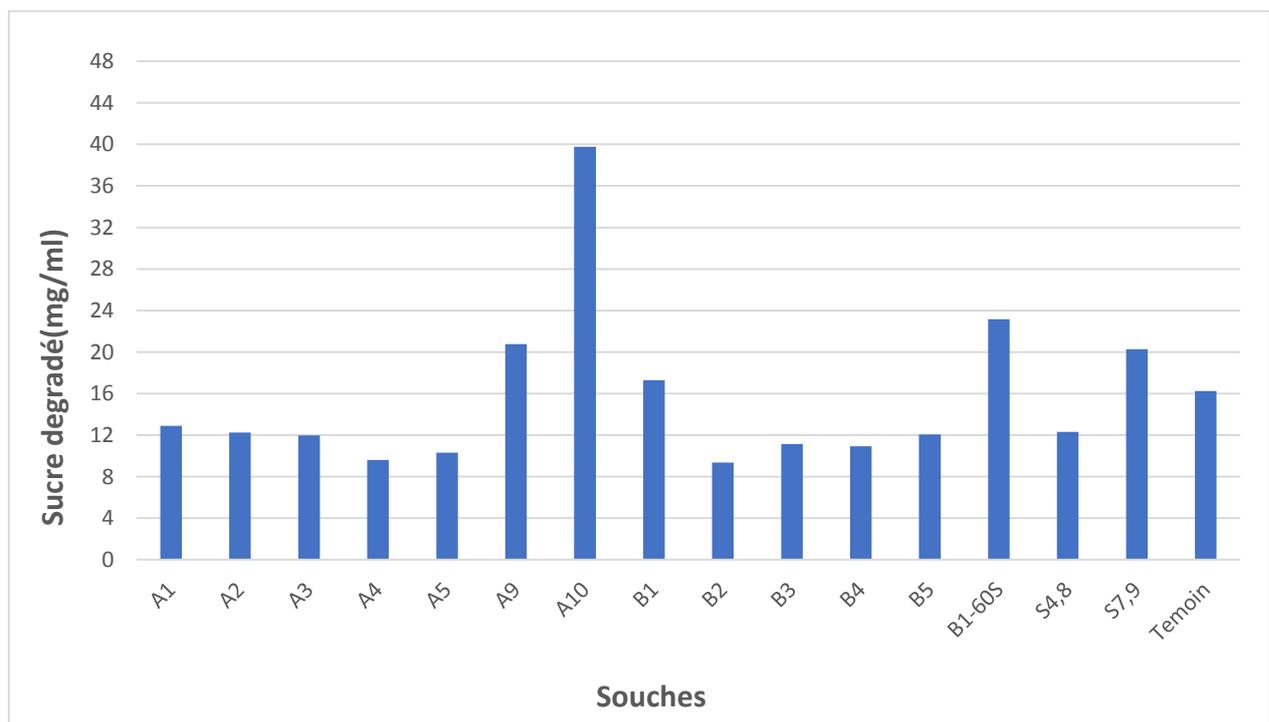


Figure n°12 : histogramme représentant le sucre produit (mg/ml) par chaque isolat.

Les souches A1 à A10 ont été obtenues après exposition aux UV de l'isolat 4.8, tandis que les souches B1, B2, B3, B4, B5 et B1-60S sont issues de la souche 7.9. Les résultats obtenus indiquent une diminution globale de la formation de glucose dans toutes les souches testées dérivées de la souche 7.9, ce qui suggère une réduction de la production d'amylase par les souches exposées aux UV issues de la souche 7.9. Cependant, une légère augmentation de la formation de glucose a été observée dans le cas de la souche B1-60S. Pour les souches marquées de A1 à A5, la différence dans la formation de glucose est négligeable par rapport au taux de glucose formé dans le tube S4.8 contenant la souche sauvage non exposée aux UV. Une différence très marquée a été observée dans le tube A9, où la formation de glucose était deux fois plus élevée que celle de la souche sauvage. Cependant, l'amélioration la plus remarquable a été observée dans le tube A10, où la quantité de glucose formé était plus de

Résultats et discussions

trois fois supérieure à celle de la souche sauvage. Pour mieux comprendre la nature et la source de ces changements, des tests plus approfondis sont nécessaires, en particulier pour les souches A9 et A10, où il est possible que nous soyons en présence d'une mutation affectant le gène responsable de la production d'amylase dans ces souches.

III.4 Spectroscopie FTIR (Fourier Transform Infrared)

Les courbes de la spectroscopie des souches 4.8, A1, A2, A3, A9 et A10 sont respectivement représentées sur les figures n°13, 14 et 15. Les courbes de la spectroscopie des souches 7.9, B1, B3, B5 et B1-60s sont respectivement représentées sur les figures n°16, 17 et 18.

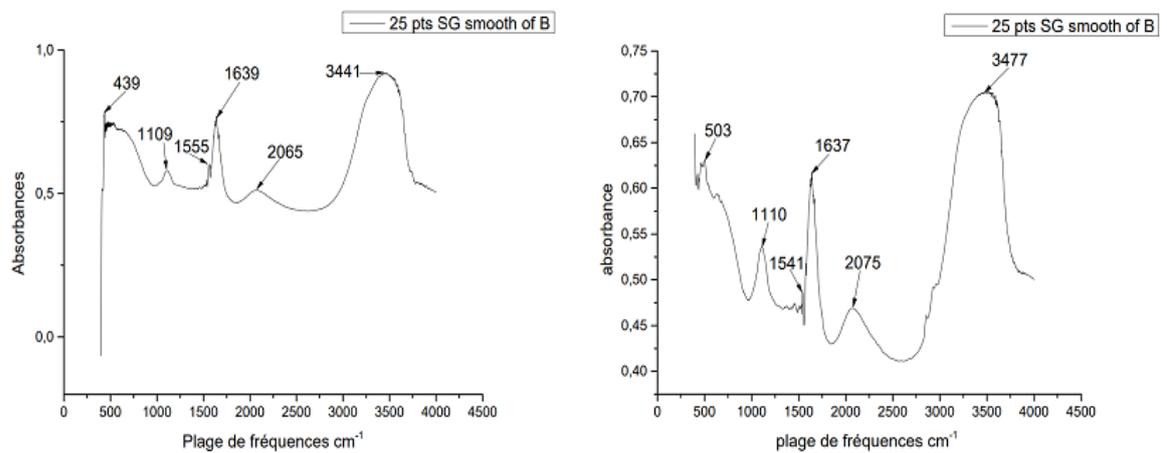


Figure n°13 : Courbes spectroscopie souche 4.8(gauche) et A1(droite)

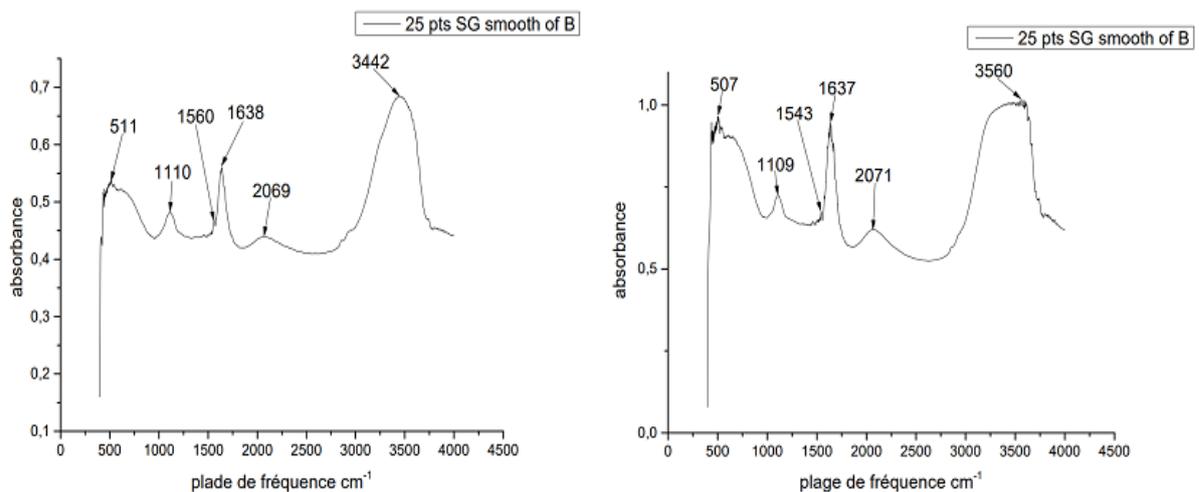


Figure n°14 : Courbes spectroscopie souche A2(gauche) et A3(droite)

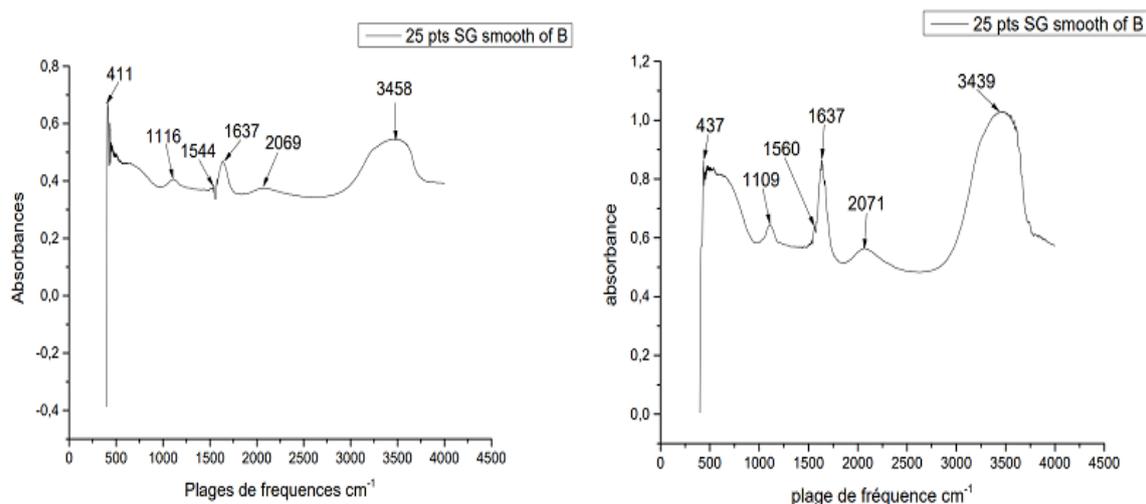


Figure n°15 : Courbes spectroscopie souche A9(gauche) et A10(droite)

Souche 4.8

439cm⁻¹ Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métal ligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1109cm⁻¹** Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1555cm⁻¹** Ce pic pourrait être attribué à une bande d'étirement de la liaison C=C dans des composés insaturés, alcènes ou des aromatiques. Il est possible qu'il soit attribué à des composés présents dans l'extrait de levures. **1639cm⁻¹** Ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C=O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2065cm⁻¹** Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3441cm⁻¹** Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

A1

503cm⁻¹ Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métal-ligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1110cm⁻¹** Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de

Résultats et discussions

ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1541cm⁻¹** Ce pic pourrait être attribué à une bande d'étirement de la liaison C=C dans des composés insaturés, alcènes ou des aromatiques. Il est possible qu'il soit attribué à des composés présents dans l'extrait de levures. **1637cm⁻¹** Ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2075cm⁻¹** Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C≡N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3477cm⁻¹** Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

A2

511cm⁻¹ Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métal-ligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1110cm⁻¹** Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1560cm⁻¹** Ce pic pourrait être attribué à une bande d'étirement de la liaison C=C dans des composés insaturés, alcènes ou des aromatiques. Il est possible qu'il soit attribué à des composés présents dans l'extrait de levures. **1638cm⁻¹** ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2069cm⁻¹** Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3442cm⁻¹** Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

A3

507cm⁻¹ Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métal-ligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le

Résultats et discussions

milieu de culture. **1109cm⁻¹** Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1543cm⁻¹** Ce pic pourrait être attribué à une bande d'étirement de la liaison C=C dans des composés insaturés, alcènes ou des aromatiques. Il est possible qu'il soit attribué à des composés présents dans l'extrait de levures. **1637cm⁻¹** ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2071cm⁻¹** Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3560cm⁻¹** Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

A9

411cm⁻¹ Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métal-ligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1116cm⁻¹** Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1544cm⁻¹** Ce pic pourrait être attribué à une bande d'étirement de la liaison C = C dans des composés insaturés, alcènes ou des aromatiques. Il est possible qu'il soit attribué à des composés présents dans l'extrait de levures. **1637cm⁻¹** Ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2069cm⁻¹** Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3458cm⁻¹** Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

A10

Résultats et discussions

437cm⁻¹ Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métal-ligand. Du à la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1109cm⁻¹** Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1560cm⁻¹** Ce pic pourrait être attribué à une bande d'étirement de la liaison C = C dans des composés insaturés, alcènes ou des aromatiques. Il est possible qu'il soit attribué à des composés présents dans l'extrait de levures. **1637cm⁻¹** : ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2071cm⁻¹** : Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3439cm⁻¹** Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

Les souches montrent des variations dans les pics correspondant au halogènes **411 – 511cm⁻¹**, Les différences peuvent indiquer des variations dans les types liaisons métal-ligand et de liaisons C-O présents dans chaque souche. Ces variations peuvent être attribuées à des différences dans la composition chimique et la structure des souches. Les souches présentent des similitudes dans les pics observés à **1109 – 1116cm⁻¹**, confirmant une activité enzymatique dans chaque souche. Les souches présentent des similitudes dans les pics observés à **1541 – 1560cm⁻¹** correspondent à une bande d'étirement de la liaison C = C, ce qui suggère la présence de composés insaturés dans chaque souche. Cela peut indiquer une similarité dans les composés contenant des composés insaturés. Les souches présentent des similitudes dans les pics observés à **1637 – 1639cm⁻¹** correspondent tous à des bandes d'étirement de la liaison C = O, indiquant une activité catalytique similaire chez les souches.

Résultats et discussions

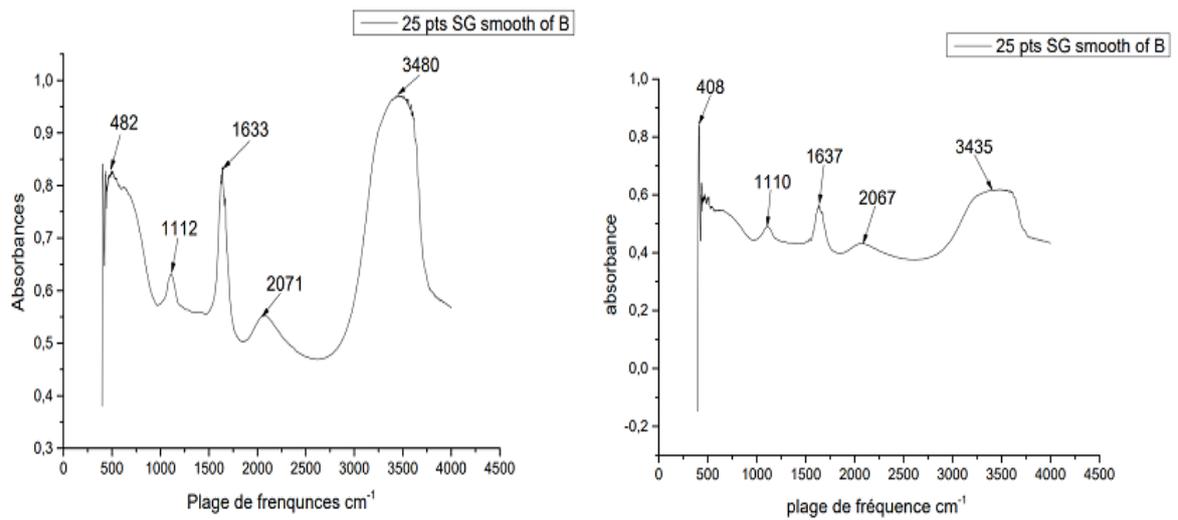


Figure n°16 : Courbes spectroscopie souche 7.9(gauche) et B1(droite)

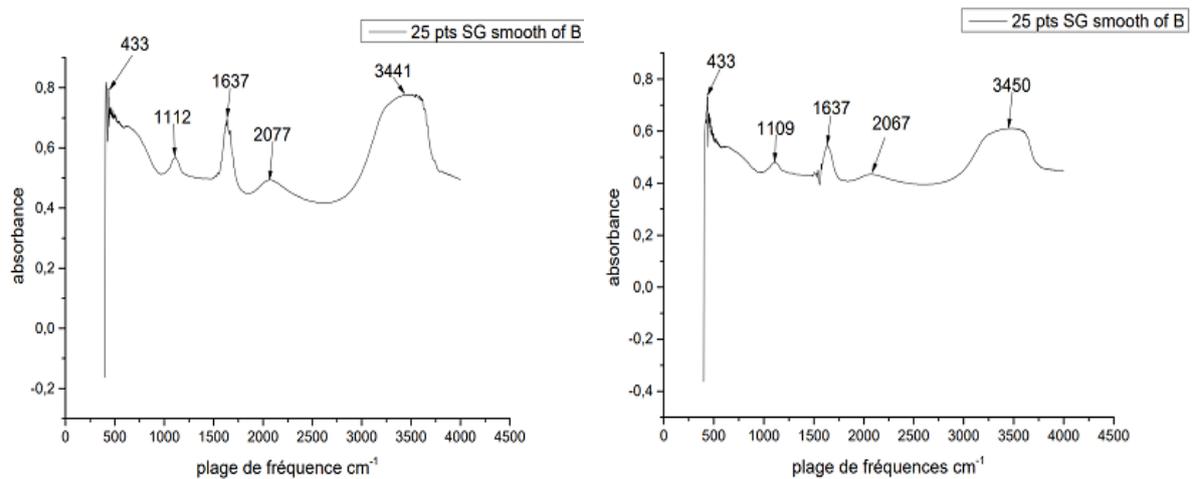


Figure n°17 : Courbes spectroscopie souche B3(gauche) et B5(droite)

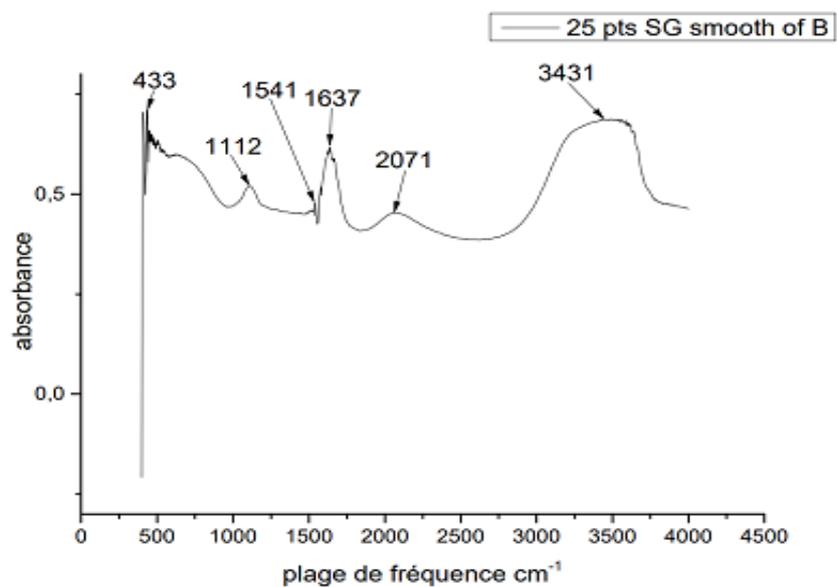


Figure n°18 : Courbe spectroscopie B1-60S

Résultats et discussions

Souche 7.9

482cm⁻¹ : Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métalligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1112cm⁻¹** : Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1633cm⁻¹** : ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2071cm⁻¹** : Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3480cm⁻¹** : Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

B1

408cm⁻¹ : Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métalligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1110cm⁻¹** : Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1637cm⁻¹** : ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2067cm⁻¹** : Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3435cm⁻¹** : Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche. Souche

B3

433cm⁻¹ : Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métalligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1112cm⁻¹** : Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans

Résultats et discussions

les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1637cm⁻¹** : ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2077cm⁻¹** : Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3441cm⁻¹** : Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

B5

433cm⁻¹ : Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métalligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1109cm⁻¹** : Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1637cm⁻¹** : ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2067cm⁻¹** : Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3450cm⁻¹** : Ce pic est situé dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

B1-60S

433cm⁻¹ : Ce pic peut être associé à des vibrations de liaison métalligand. Du a la présence des ions métalliques, tels que le magnésium (Mg) provenant du MgSO₄, dans le milieu de culture. **1112cm⁻¹** : Ce pic peut être attribué aux vibrations de la liaison C-O-C dans les glycosides, ce qui suggère la présence d'amidon dans le milieu de culture, la détection de ce pic peut être liée à la dégradation de l'amidon par l'enzyme. **1544cm⁻¹** : Ce pic pourrait être attribué à une bande d'étirement de la liaison C = C dans des composés insaturés, alcènes ou des aromatiques. Il est possible qu'il soit attribué à des composés présents dans l'extrait de

Résultats et discussions

levures. **1637cm⁻¹** : ce pic correspond à une bande d'étirement de la liaison C = O, indiquant la présence d'un groupe carbonyle potentiel, (cétones, aldéhydes, esters, etc.), il peut être associé à la présence de produits de dégradation de l'amidon par l'amylase produite par la souche. **2071cm⁻¹** : Ce pic pourrait être associé à une bande d'étirement de la liaison C ≡ N, suggérant également la présence d'un groupe nitrile. Sa présence peut être liée à des composés organiques présents dans l'extrait de levures ou à d'autres produits métaboliques produits par la souche. **3441cm⁻¹** : Ce pic est dans la région des groupes hydroxyle (OH), ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle, tels que l'amylase produite dans cette souche.

Les souches montrent des variations dans les pics correspondant au halogènes **408–482cm⁻¹**, Les différences peuvent indiquer des variations dans les types liaisons métal-ligand et de liaisons C-O présents dans chaque souche. Ces variations peuvent être attribuées à des différences dans la composition chimique et la structure des souches. Les souches présentent des similitudes dans les pics observés à **1109 – 1112cm⁻¹** correspondent à une bande d'étirement de la liaison C-O, ce qui suggère la présence d'un groupe alcool ou éther dans chaque souche. Cela peut indiquer une similarité dans les composés contenant des groupes alcool ou éther. Les souches présentent des similitudes dans les pics observés à **1633 – 1637cm⁻¹** correspondent tous à des bandes d'étirement de la liaison C = O, indiquant une activité catalytique similaire chez les souches.

En résumé, les pics observés à **1637-1639 cm⁻¹** suggère qu'il n'y a pas de modifications abruptes dans l'activité amylolytique des mutants. Cela suggère que les souches mutantes présentent une activité amylolytique similaire à celle de la souche sauvage ou de référence.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Cette étude a permis d'explorer les réponses des isolats d'halophiles extrêmes aux rayonnements UV, en mettant en évidence leur résistance, leur capacité à produire de l'amylase et leur composition chimique. Les résultats obtenus démontrent que ces microorganismes possèdent des mécanismes de défense efficaces face aux rayons UV. Ce qui leur permet de survivre dans des environnements extrêmement salins et exposés à un fort rayonnement solaire.

L'évaluation du taux de survie des microorganismes exposés aux rayons UV a révélé des différences significatives en fonction de la longueur d'onde et de la durée d'exposition. Les souches étudiées ont montré une capacité variable à résister à ces conditions stressantes, suggérant une certaine diversité génétique au sein de la population microbienne.

L'étude des effets mutagènes des rayons UV a permis d'obtenir des souches mutantes présentant une activité amylolytique accrue. Ces souches pourraient être exploitées dans des applications industrielles nécessitant la production d'amylase, telle que l'industrie alimentaire ou la production de biocarburants.

En somme, cette étude met en évidence l'importance des microorganismes halophiles extrêmes dans les écosystèmes salins et leur potentiel pour des applications industrielles. Les informations recueillies permettent d'enrichir nos connaissances sur leur adaptation aux conditions environnementales extrêmes et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche pour explorer leur diversité génétique, leurs mécanismes de résistance et leurs capacités enzymatiques.

Les résultats obtenus pourraient également servir de base à des études ultérieures visant à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux rayonnements UV chez les microorganismes halophiles extrêmes, ainsi qu'à développer des stratégies de bio-ingénierie pour améliorer leur performance et leur exploitation dans des applications biotechnologiques.

Des tests plus précis et approfondies permettraient de caractériser les enzymes des souches mutées tel que le test des sucres réducteurs (liqueur de Fehling), électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes « SDS-PAGE », Zymogramme ainsi que les tests de température et ph optimal pour l'activité enzymatique. Pour pouvoir mieux différencier entre les amylases produites par des souche sauvage et celle des mutant et ainsi

Conclusion

déterminée plus spécifiquement les effets des UV sur les la production d'amylase chez des isolats halophiles extrêmes.

En définitive, cette étude contribue à l'élargissement de nos connaissances sur la biodiversité et l'adaptation des microorganismes aux conditions extrêmes, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour l'exploitation durable des ressources microbiennes dans un contexte de développement technologique et environnemental.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abaramak G, Kirtel O, Öner ET (2020) Fructanogenic halophiles: A new perspective on extremophiles. In: Salwan, Sharma (eds) *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. Academic Press, pp. 123-130.

Aguilar-Gonzalez CN, Delgado-Garcia M, Valdivia-Urdiales B. (2012) Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J Sci Food Agric* 92: 2575–2580.

Amiri H, Azarbaijani R, Yeganeh LP (2016) *Nesterenkonia* sp. strain F, a halophilic bacterium producing acetone, butanol and ethanol under aerobic conditions. *Sci Rep* 6:1–10.

B

B. Bajpai, M. Chaudhary, J. Saxena, *Food. Technol. Biotech.* 2015, 53, 11.

E

Eisenberg, H., Mevarech, M., and Zaccai, G. 1992. Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Adv. Protein Chem.* 43: 1–62.

Elcock AH, McCammon JA (1998) Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J Mol Biol* 280:731–748

Evrensel A, Ceylan ME (2016) Fecal microbiota transplantation and its usage in neuropsychiatric disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 14:231–237. [1](#)

F

Fu XZ, Tan D, Aibaidula G, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals. *Metab Eng* 2014;23:78–91.

G

G. W. Hutcheon, N. Vasisht, A. Bolhuis, *Extremophiles*. 2005, 9, 487.

Gaonkar SK, Furtado IJ (2018) Isolation and culturing of protease-and lipase-producing *Halococcus* agarilyticus GUGFAWS-3 from marine *Haliclona* sp. inhabiting the rocky intertidal region of Anjuna in Goa. *India Ann Microbiol* 68:851–861.

Références bibliographiques

García-Fraga B, Da Silva AF, López-Seijas J, Sieiro C (2014) Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2133–2143.

Ghai R, Pašić L, Fernández AB, Martín-Cuadrado AB, Megumi C (2011) New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* 1:135.

Good WA, Hartman PA (1970) Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* 104: 601–603.

H

H. Kanai, T. Kobayashi, R. Aono, T. Kudo, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1995, 45, 762.

Haki G, Rakshit S Developments in industrially important ther mostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.* 2003;89:17.

Hartmann R, Sickinger H-D, Oesterhelt D. 1980 Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77, 3821–3825. (doi:10.1073/pnas.77.7.3821)

Hemamalini R, Khare SK (2018) Halophilic lipase does forms catalytically active aggregates: evidence from *Marinobacter* sp. EMB5 lipase (LipEMB5). *Int J Biol Macromol* 119:172–179.

K

Kumar, S., Grewal, J., Sadaf, A., Hemamalini, R., & Khare, S. K. (2016). Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2(1), 1-26.

Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: Halophilic bacteria. In *Microbial life in extreme environments* (ed. D.J. Kushner), pp. 317–368. Academic Press, San Diego, CA.

Kushner, D.J. 1985. The Halobacteriaceae. In *The bacteria* (eds C.R. Woese and R.S. Wolfe), Vol. 8, pp. 171–214. Academic Press, Orlando, FL.

M

Madern, D., Ebel, C., and Zaccari, G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4: 91–98.

Références bibliographiques

Malik AD, Furtado IJ (2019) Cellulase-free xylanase by *Halococcus thailandensis* GUMFAS7 and *Halorubrum saccharovororum* GUMFAS1—bionts of a sponge *Cinachyrella cavernosa*. *Microbiology* 88:212–219.

Mevarech, M., Frolow, F., and Gloss, L.M. 2000. Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86: 155–164.

Mobini-Dehkordi M, Javan FA Application of alpha-amylase in biotechnology. *J Biol Today's World.* 2012;1:15–20.

Movahedpour, A., Asadi, M., Khatami, S. H., Taheri- Anganeh, M., Adelipour, M., Shabaninejad, Z., ... & Mousavi, P. (2022). A brief overview on the application and sources of α - amylase and expression hosts properties in order to production of recombinant α - amylase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), 650-659.

N

Narasingarao P, Podell S, Ugalde JA, Brochier-Armanet C, Emerson JB (2011) De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *ISME J* 6: 81–93.

O

Onishi H (1972) Halophilic amylase from a moderately halophilic *Micrococcus*. *J Bacteriol* 109: 570–574.

Onishi H, Hidaka O (1978) Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *Acinetobacter* sp. *Can J Microbiol* 24: 1017–1023.

Oren A (2010) Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol* 31: 825–834.

Oren A (2020) The microbiology of red brines. *Adv Appl Microbiol* 113:57–110.

Oren A. 2014 Halophilic archaea on Earth and in space: growth and survival under extreme conditions. *Phil. Trans. R. Soc. A* 372: 20140194.

Références bibliographiques

P

Perez-Pomares, V. Bautista, J. Ferrer, C. Pire, F. C. MarhuendaEgea, M. J. Bonete, Extremophiles. 2003, 7, 299.

R

Rao, J.K.M. and Argos, P. 1981. Structure stability of halophilic proteins. Biochemistry 20: 6536–6543.

Reed CJ, Lewis H, Trejo E. (2013) Protein adaptations in archaeal extremophiles. Archaea 2013: 373275.

Rodriguez-Valera F, Juez G, Kushner DJ (1982) Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. Can J Microbiol 28:151–154.

S

Santorelli, M., Maurelli, L., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Squillaci, G., La Cara, F., & Morana, A. (2016). Isolation and characterisation of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *International journal of biological macromolecules*, 92, 174-184.

Siroosi M, Borujeni FB, Amoozegar MA et (2021) Halophilic amylase production and purification from *Haloarcula* sp. strain D61. *Biointerface Res Appl Chem* 11:7382–7392.

T

T. Fukushima, T. Mizuki, A. Echigo, A. Inoue, R. Usami, Extremophiles. 2005, 9, 85.

Tiwari S, Srivastava R, Singh C, Shukla K, Singh R, Singh P Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J Global Biosci.* 2015;4:1886–901.

Tokunaga, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2008). Engineering of halophilic enzymes: two acidic amino acid residues at the carboxy- terminal region confer halophilic characteristics to *Halomonas* and *Pseudomonas* nucleoside diphosphate kinases. *Protein Science*, 17(9), 1603-1610.

Références bibliographiques

Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arakawa, T., and Tokunaga, M. 2004. Highly efficient renaturation of b-lactamase isolated from moderately halophilic bacteria. *FEBS Lett.* 558: 7–12.

Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arisaka, F., Arai, S., Kuroki, R., Arakawa, T., and Tokunaga, M. 2008. Residue 134 determines the dimer–tetramer assembly of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacteria. *FEBS Lett.* 582: 1049–1054.

Tutuncu HE, Balci N, Tuter M, Karaguler NG (2019) Recombinant production and characterization of a novel esterase from a hypersaline lake, Acıgöl, by metagenomic approach. *Extremophiles* 23:507–520.

W

Walsby AE (1980) A square bacterium. *Nature* 283:69–71

Wong HL, Ahmed-Cox A, Burns BP (2016) Molecular ecology of hypersaline microbial mats: current insights and new directions. *Microorganisms* 4:6.

Y

Yamaguchi R, Tokunaga H, Ishibashi M (2011) Salt-dependent thermo-reversible alpha amylase: cloning and characterization of halophilic alpha-amylase from moderately halophilic bacterium, *Kocuria varians*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 673–684.

Yun JH, Ohki M, Park JH et (2020) Pumping mechanism of NM-R3, a light-driven bacterial chloride importer in the rhodopsin family. *Sci Adv* 6:eaay2042.

Z

Zhou Y, Tang K, Wang P et (2020) Identification of bacteria-derived urease in the coral gastric cavity. *Sci China Earth Sci* 63:1553–1563

Annexe

Annexe

Annexe 01

Réactif : Chlorure de sodium (NaCl), sulfate de magnésium (MgSO₄), chlorure de potassium (KCL), hydroxyde de sodium (NaOH), sulfate tri-sodique, amidon, extrait de levure, peptone, agar.

Appareillage : Bain marie (FISHER SCIENTIFIC), Autoclave (), Etuve à 37° et 40° (POL-EKO APARATURA), Spectrophotomètre (), Balance de précision (OHAUS ADVENTURER), Ph mètre (BANTE INSTRUMENT), Centrifugeuse (), Becs benzène, Lampe UV (VILBER LOURAT), Bain marie agitateur (MEMMERT).

Annexe 02 : Milieu Brown liquide

Extrait de levure	NaCl	KCL	MgSO ₄	Citrate trisodique	Eau distillée
5g	250g	2g	20g	3g	1000 ml

On utilise les mêmes composants et doses pour le milieu solide en ajoutant seulement 20 g d'agar.

Annexe 03 : Milieu amidon

Extrait de levure	NaCl	KCL	MgSO ₄	Citrate trisodique	Eau distillée
1g	250g	2g	20g	1 g	1000 ml

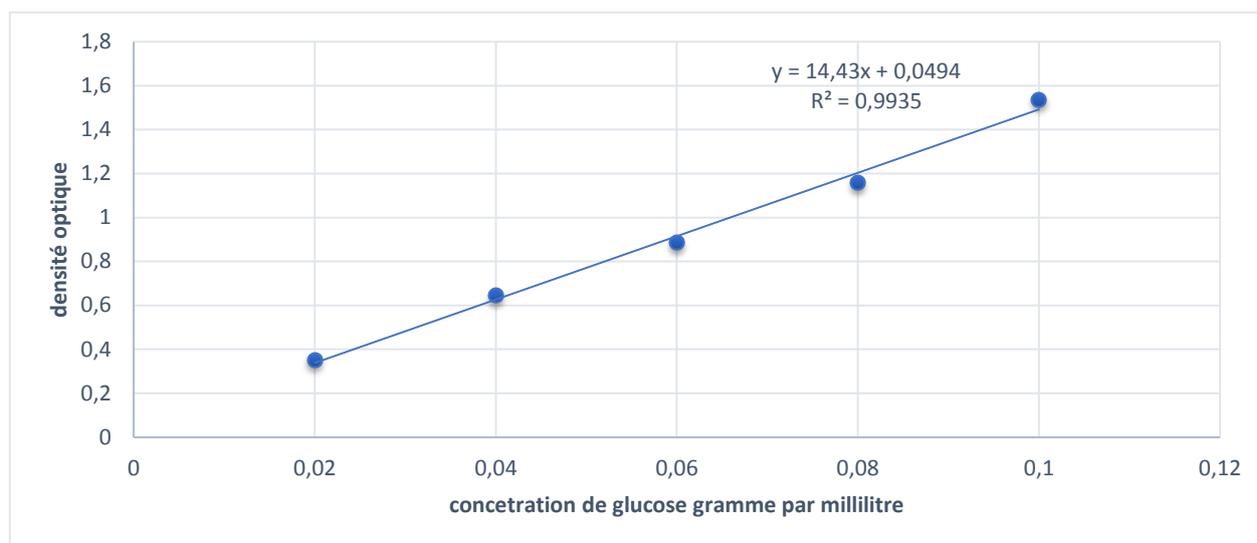
Annexe 04 :

Densité optique par concentration de glucose.

Concentration glucose	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Densité optique	0.351	0.644	0.866	1.158	1.537

Les résultats de la mesure de la densité optique du glucose nous donnent la figure suivante :

Annexe



Courbe d'étalonnage

Annexe 05 : principe du Ftir

Le Principe de l'analyse par spectroscopie infrarouge est de mesurer l'absorption d'ondes électromagnétiques infrarouges par un échantillon, ce qui permet d'obtenir des informations sur la structure moléculaire de l'échantillon. Cette technique est basée sur le fait que les molécules absorbent de l'énergie dans des régions spécifiques du spectre infrarouge en raison des vibrations de liaison moléculaire qui génèrent des moments dipolaires variables. Les spectres infrarouges sont comparés à des spectres de référence pour identifier les groupes fonctionnels présents dans l'échantillon (**Griffiths et de Haseth, 2007**).

Table FTIR

Liaison	Vibration	Nombre d'onde	Intensité	Commentaires
Liaison C-H	ν Csp ³ -H	de 2850 à 3000 cm ⁻¹	F	Plusieurs bandes
	δ Csp ³ -H dans le plan	autour de 1400 cm ⁻¹	F	Plusieurs bandes
liaison C-H de CH ₂	δ Csp ³ -H hors du plan	vers 730 cm ⁻¹	M	si chaîne de CH ₂ supérieure à 4
double liaison C=C	ν Csp ² - ν Csp ²	vers 1650 cm ⁻¹	M	
double liaison C=C aromatique	ν Csp ² - ν Csp ²	2 bandes vers 1600 cm ⁻¹ et 1 bande vers 1500 cm ⁻¹	M	

Annexe

Liaison	Vibration	Nombre d'onde	Intensité	Commentaires
liaison C-H	$\nu\text{Csp}^2\text{-H}$	vers 3050 cm^{-1}	M	si 1 on a un proton sur un Csp^2
liaison C-H	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	$985\text{ et }910\text{ cm}^{-1}$	M à F	2 bandes
liaison C-C	$\nu\text{Csp}^3\text{-}$ νCsp^3		faible	
triple liaison $\text{C}\equiv\text{C}$	$\nu\text{Csp-}$ νCsp	2100 cm^{-1}	M	alcynes vrai
triple liaison $\text{C}\equiv\text{C}$	$\nu\text{Csp-}$ νCsp	2200 cm^{-1}	M	Alcyne
liaison $\equiv\text{C-H}$	$\nu\text{Csp-H}$	3250 cm^{-1}		uniquement CH de l'alcyne vrai
liaison $\equiv\text{C-H}$	$\delta\text{Csp-H}$	entre $600\text{ et }700\text{ cm}^{-1}$	F	uniquement CH de l'alcyne vrai
liaison C-H aromatique	$\nu\text{Csp}^2\text{-H}$	entre $3000\text{ et }3100\text{ cm}^{-1}$	M	plusieurs bandes
liaison C-H aromatique monosubstitué, benzène	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	1ère bande entre 670 et 720 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 730 et 780 cm^{-1}	F	
liaison C-H aromatique disubstitué ortho	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	vers 750 cm^{-1}	F	1 seule bande
liaison C-H aromatique disubstitué méta	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	1ère bande entre 670 et 730 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 750 et 810 cm^{-1}	F	
>		3ème bande entre 860 et 900 cm^{-1}	M	
liaison C-H aromatique disubstitué méta	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	entre $800\text{ et }860\text{ cm}^{-1}$	F	1 seule bande
liaison C-H aromatique trisubstitué vicinal	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	1ère bande entre 680 et 750 cm^{-1}	M	
		2ème bande entre 750 et 800 cm^{-1}	F	
liaison C-H aromatique trisubstitué	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	1ère bande entre 800 et 860 cm^{-1}	F	

Annexe

Liaison	Vibration	Nombre d'onde	Intensité	Commentaires
asymétrique				
		2ème bande entre 850 et 900 cm^{-1}	M	
liaison C-H aromatique trisubstitué symétrique	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	1ère bande entre 670 et 730 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 800 et 860 cm^{-1}	F	
		3ème bande entre 860 et 900 cm^{-1}	M	
liaison O-H libre	$\nu\text{O-H}$	Entre 3500 et 3700 cm^{-1}	M	bande fine
liaison O-H liée (liaison hydrogène)	$\nu\text{O-H}$	Entre 3100 et 3500 cm^{-1}	F	bande large
liaison O-H alcool primaire	$\delta\text{O-H}$	entre 1260 et 1350 cm^{-1}	M	
liaison O-H alcool secondaire	$\delta\text{O-H}$	entre 1260 et 1350 cm^{-1}	M	
liaison O-H alcool tertiaire	$\delta\text{O-H}$	entre 1310 et 1420 cm^{-1}	M	
liaison O-H alcool aromatique	$\delta\text{O-H}$	entre 1300 et 1400 cm^{-1}	M	
liaison C-OH alcool primaire	$\nu\text{C-O}$	entre 1000 et 1080 cm^{-1}	F	
liaison C-OH alcool secondaire	$\nu\text{C-O}$	entre 1050 et 1160 cm^{-1}	M	
liaison C-OH alcool tertiaire	$\nu\text{C-O}$	entre 1110 et 1220 cm^{-1}	F	
liaison C-OH alcool aromatique	$\nu\text{C-O}$	entre 1150 et 1300 cm^{-1}	F	
liaison C-O des éthers aliphatiques	$\nu\text{C-O}$	entre 1050 et 1170 cm^{-1}	F	
liaison C-O des éthers aromatiques (Ph-O-)	$\nu\text{C-O}$	entre 1170 et 1300 cm^{-1}	F	

Annexe

Liaison	Vibration	Nombre d'onde	Intensité	Commentaires
liaison C=O des cétones aliphatiques	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1650 et 1740 cm^{-1}	F	
	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1070 et 1220 cm^{-1}	M	bande permettant de différencier des esters (intensité forte) et des cétones aromatiques
liaison C=O des cétones aromatique	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1650 et 1725 cm^{-1}	F	
	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1210 et 1325 cm^{-1}	M	
liaison C=O des aldéhydes aliphatiques	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1650 et 1740 cm^{-1}	F	d'autres bandes d'intensité moyennes de 1450 à 800 cm^{-1}
liaison C=O des aldéhydes aromatiques	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1650 et 1725 cm^{-1}	F	d'autres bandes d'intensité moyennes de 1450 à 800 cm^{-1}
liaison C-H de CHO	$\delta\text{Csp}^2\text{-H}$	entre 2700 et 2900 cm^{-1}	M	
liaison O-H des acides carboxyliques	$\nu\text{O-H}$	entre 2900 et 3300 cm^{-1}	F	bande large
liaison C=O des acides carboxyliques	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1660 et 1740 cm^{-1}	F	
liaison C-O des acides carboxyliques	$\nu\text{C-O}$	entre 1200 et 1320 cm^{-1}	F	
liaison O-H des acides carboxyliques	$\delta\text{O-H}$	entre 1350 et 1450 cm^{-1}	M	1 bande supplémentaire entre 850 et 950 éventuellement
acides carboxyliques ionisés	$\nu\text{C}=\text{O}$	1ère bande entre 1550 et 1630 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 1400 et 1450 cm^{-1}	F	
liaison C=O des esters	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1700 et 1750 cm^{-1}	F	
liaison C-O des esters	$\nu\text{C-O}$	1ère bande entre 1210 et 1260 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 1080 et 1150 cm^{-1}		pas toujours visible mais forte pour les esters benzénique
liaison C=O	$\nu\text{C}=\text{O}$	entre 1785 et 1815 cm^{-1}	F	

Annexe

Liaison	Vibration	Nombre d'onde	Intensité	Commentaires
des halogénures d'acides		¹		
liaison C=O des anhydrides d'acide	$\nu\text{C=O}$	1ère bande entre 1775 et 1850 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 1710 et 1780 cm^{-1}	F	
	$\nu\text{C-O}$	3ème bande 1040 et 1175 cm^{-1}	F	
liaison C=O des anhydrides d'acide cycliques	$\nu\text{C=O}$	1ère bande entre 1810 et 1870 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 1760 et 1810 cm^{-1}	F	
	$\nu\text{C-O}$	3ème bande 1200 et 1310 cm^{-1}	F	
liaison N-H des amides	$\nu\text{N-H}$	entre 3050 et 3500 cm^{-1} ¹	M	2 bandes larges
liaison N-H des amides substituées	$\nu\text{N-H}$	entre 3050 et 3400 cm^{-1} ¹	M	1 seule bande large
liaison C=O des amides	$\nu\text{C=O}$	entre 1630 et 1710 cm^{-1} ¹	F	
liaison N-H des amides	$\gamma\text{N-H}$	entre 600 et 700 cm^{-1}	M à F	1 bande large
liaison N-H des amides	$\delta\text{N-H}$	vers 1640 cm^{-1}		recouverte par celle du C=O
liaison C-N	$\nu\text{C-N}$	entre 1020 et 1220 cm^{-1} ¹	M	
liaison N-H des amines primaires	$\nu\text{N-H}$	1ère bande entre 3300 et 3500 cm^{-1}	M	
		2ème bande entre 3200 et 3400 cm^{-1}	M	
liaison N-H des amines secondaires	$\nu\text{N-H}$	entre 3100 et 3500 cm^{-1} ¹	M	
liaison N-H des amines primaires	$\delta\text{N-H}$	1ère bande entre 1550 et 1650 cm^{-1}	F	
		2ème bande entre 650	M	bande large

Annexe

Liaison	Vibration	Nombre d'onde	Intensité	Commentaires
		et 900 cm^{-1}		
liaison N-H des amines secondaires	$\delta\text{N-H}$	1ère bande entre 1500 et 1600 cm^{-1}		pas toujours visible
		2ème bande entre 650 et 900 cm^{-1}	M	bande large
amines aromatiques		entre 1250 et 1350 cm^{-1}		
triple liaison des nitriles		entre 2200 et 2400 cm^{-1}		
groupement nitro (NO_2)		1ère bande entre 1500 et 1570 cm^{-1}		
		2ème bande entre 1300 et 1370 cm^{-1}		

Résumé

Le mémoire « effets des UV sur la production d'amylase chez les isolats halophiles extrêmes » présente une étude approfondie sur la mutagenèse aléatoire et la production de l'amylase. L'objectif de ce travail consiste à développer un moyen d'augmenter la production d'amylase chez certains isolats halophiles extrêmes en effectuant une mutagenèse aléatoire à l'aide de rayon UV et tester l'activité amylasique des mutants effectués par un dosage des sucres totaux et une analyse spectrale par FTIR. Ce mémoire contribue à la compréhension de l'effet des mutations sur la production des amylases chez les microorganismes halophiles extrêmes.

Abstract

The thesis titled "Effects of Mutagenic Agent on Amylase Production in Extreme Halophilic Isolates" presents a comprehensive study on random mutagenesis and amylase production. The objective of this work is to develop a means of increasing amylase production in certain extreme halophilic isolates through random mutagenesis using UV radiation, and to test the amylase activity of the mutants through measurement of total sugars and spectral analysis using FTIR. This thesis contributes to the understanding of the effect of mutations on amylase production in extreme halophilic microorganisms.