

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة امحمد بوقرة بومرداس

Université M'hamed Bougarra de Boumerdes



## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master II

**Domaine:** Sciences de la Nature et de la Vie

**Option :** Biotechnologie

**Spécialité :** Biotechnologie végétale

### THEME

**Isolement et optimisation de la production des  
hydrolases thermostables et halophiles à partir des eaux  
de sebkha**

Présenté par :

AMRAOUI NASER EDDIN

Soutenue devant le jury composé de :

|                                |     |      |                |
|--------------------------------|-----|------|----------------|
| M <sup>me</sup> MAAMRI S.      | MCB | UMBB | Présidente     |
| M <sup>me</sup> MOHAND KACI H. | MCA | UMBB | Examinatrice   |
| M <sup>me</sup> LAHIANI S.     | MCB | UMBB | Promotrice     |
| M <sup>me</sup> AMRAOUI R.     | MCB | EPHT | Co- Promotrice |

**Promotion : 2019/2020**

# Remerciements

*En tout premier lieu je dois remercier **Allah** le tout puissant de m'avoir donnés les ressources morales,*

*Physiques, matériels et intellectuelles pour terminer ce travail*

*Mes profonds remerciements sont adressés à ma promotrice Mme **LAHIANI**. Pour ces qualités d'encadrement. Et également à Mme **AMRAOUI** pour sa disponibilité*

*Mes remerciements sont adressés aux membres du Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :*

*Mme **MAAMRI** qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury*

*Mme **MOHAND KACI** qui a accepté d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Je remercie sincèrement toute personne ayant participé de près ou de loin pour la réalisation de ce projet*

# ***Dédicaces***

*Au nom de Dieu, le clément, le très miséricordieux*

*Je le dédie modeste travailA*

*Ma mère **RABIA** qui a oeuvrée pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous ses sacrifices consentis et ses précieux conseils pour toute son assistance et sa présence dans ma vie .Que dieu la procure bonne santé et longue vie.*

*Mon père **ABDELKADER** qui peut etre fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.*

*Mes chères sœurs **NAZIHA, DJAMILA, FATIMA.***

*Mes frères **MOHAMED, M'HAMED, MOUSTAFA.***

*Et finalement je remercie mes collègues de promotion biotechnologie végétale (**BTV**)*

*A tous ceux qui ont contribués de prés ou de loin pour que ce projet soit possible.*

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

## Liste des Abréviations

---

| Abréviation             | signification                                                               |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>ADN</b>              | Acide désoxyribonucléique                                                   |
| <b>AGPI</b>             | acides gras polyinsaturés                                                   |
| <b>ARN</b>              | Acide ribonucléique                                                         |
| <b>ARNr 16S</b>         | Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | Chlorure de calcium                                                         |
| <b>EC</b>               | Numéro de commission enzymatique                                            |
| <b>HCl</b>              | Acide chlorhydrique.                                                        |
| <b>KCl</b>              | Chlorure de potassium                                                       |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Chlorure de magnésium                                                       |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b> | Sulfate de magnésium                                                        |
| <b>NaCl</b>             | Chlorure de sodium                                                          |
| <b>NaOH</b>             | Hydroxyde de Sodium.                                                        |
| <b>PCR</b>              | <i>Réaction de polymérisation en chaîne</i>                                 |
| <b>PDB</b>              | La banque de données sur les protéines                                      |

# **LISTE DES FIGURES**

| Numéro de la figure | Titre de la figure                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | page |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1                   | Exemples de biotopes naturels des thermophiles. A. Cheminée d'un passage hydrothermique sousmarin du Pacifique ; B. Octopus Spring, parc national de Yellowstone, Etats-Unis ; C. Sources chaudes, Beppu, Kyushu, Chine ; D. Sources chaudes, Krafla, N´amaskard, Islande ; E. Source chaude, Meskhoutine, Guelma, Algérie [A-B ( <i>Ferrera et Reysenbach, 2007</i> ) ; C-D ( <i>Calteau, 2005</i> ) ; E ( <i>la présente étude</i> )]. | 6    |
| 2                   | Structure de la cellulose.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 9    |
| 3                   | Exocellulase CBH I (Cel7A) de <i>Trichoderma reesei</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 13   |
| 4                   | Action mécaniste des chitinases sur la chitine                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 15   |
| 5                   | (a) Structure cristallographique de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 20   |
| 6                   | Localisation de lieu prélèvement (sebkha d'Adrar).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 23   |
| 7                   | A : Production d'enzymes hydrolytiques par des isolats halo-archaïens et bactériens.<br>B : Activités hydrolytiques parmi les représentants des genres <i>Halorubrum</i> , <i>Natrinema</i> et <i>Salicola</i> .                                                                                                                                                                                                                         | 30   |
| 8                   | Arbre phylogénétique basé sur les similitudes des séquences d'ARNr 16S d'isolats archéologiques et ses proches.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 32   |
| 9                   | Arbre phylogénétique basé sur les similitudes des séquences d'ARNr 16S d'isolats bactériens et de ses parents.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 32   |
| 10                  | Activités des enzymes hydrolytiques pendant la croissance des isolats archéologiques.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 33   |
| 11                  | Diagrammes de carte thermique des caractéristiques physiologiques des isolats halophiles.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 37   |

# **LISTE DES TABLEAUX**

## *Liste des tableaux*

---

| <b>Numéro de<br/>tableau</b> | <b>Titre de tableau</b>                                                       | <b>Page</b> |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b>                     | Définitions des lipases extrémophiles utilisées dans ce chapitre              | 19          |
| <b>2</b>                     | Les secteurs d'utilisations des enzymes lipolytiques                          | 22          |
| <b>3</b>                     | propriétés chimique et physique de sebkha                                     | 28          |
| <b>4</b>                     | Caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques des isolats<br>sélectionnés | 34          |
| <b>5</b>                     | Résumé du nombre d'isolats sélectionnés                                       | 36          |
| <b>6</b>                     | Affiliation phylogénétique des souches bactériennes et archéennes<br>étudiées | 38          |
| <b>7</b>                     | Les activités enzymatiques des isolats halophiles                             | 39          |

# **SOMMAIRE**

|                    |    |
|--------------------|----|
| INTRODUCTION ..... | 14 |
|--------------------|----|

## CHAPITRE I: RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| I.1. Environnements salins et hypersalins .....                    | 3  |
| I.1.1 Généralités .....                                            | 3  |
| I.1.2. Les sols salés .....                                        | 3  |
| I.1.3. Les eaux salées .....                                       | 3  |
| I.2 Les microorganismes extrêmophiles .....                        | 4  |
| I.2.1 Microorganismes halophiles .....                             | 5  |
| I.2.2 Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles ..... | 5  |
| I.2.3 Les micro-organismes piézophiles .....                       | 6  |
| I.2.4 Les micro-organismes acidophiles .....                       | 6  |
| I.2.5 Les micro-organismes alcalophiles .....                      | 7  |
| I.3 Intérêt biotechnologique des extrêmophiles .....               | 7  |
| I.4 Les Enzymes .....                                              | 7  |
| I.4.1. Les Cellulases .....                                        | 8  |
| I.4.2. Les Chitinases .....                                        | 14 |
| I.4.3. Les lipases .....                                           | 18 |

## **Sommaire**

---

### **Chapitre II : MATERIEL ET METHODES**

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.1. Echantillonnage .....                                                                  | 23 |
| II. 2. Enrichissement et isolement des microorganismes halophiles .....                      | 23 |
| II. 3.Extraction d'ADN et amplification par PCR .....                                        | 24 |
| II. 4.Analyse de restriction de l'ADN ribosomal amplifié (ARDRA) et analyse statistique..... | 24 |
| II. 5.Séquençage et analyse phylogénétique.....                                              | 25 |
| II. 6.Caractéristiques morphologiques des isolats .....                                      | 25 |
| II. 7.Screening des enzymes hydrolytiques sur plaque d'agar .....                            | 25 |
| II. 8.Cinétique de croissance et production d'enzymes .....                                  | 26 |

### **Chapitre III : RESULTATS**

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.1.Isolement des isolats halophiles de sebkha .....                               | 28 |
| Partie I .....                                                                       | 28 |
| III.I.1.Sélection d'isolats halophiles par ARDRA .....                               | 29 |
| III.I.2.Caractérisation morphologique des halophiles isolats de Chott El Jerid ..... | 29 |
| III.I.3.Screening et caractérisation préliminaire des enzymes halophiles .....       | 29 |
| III.I.4.Analyse phylogénétique .....                                                 | 31 |
| III.I.5.Cinétique de croissance et productions d'enzymes par CEJGTEA101.....         | 33 |
| Partie II.....                                                                       | 36 |
| III.II.1.Isolement et caractérisation phylogénétique du Isolats halophiles.....      | 37 |

## *Sommaire*

---

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.II.2.Screening des enzymes hydrolytiques halophiles actives ..... | 38        |
| <b>Chapitre IV : DISCUSSION .....</b>                                 | <b>40</b> |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVE .....</b>                                | <b>43</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>                               | <b>43</b> |

# INTRODUCTION

### Introduction

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante : pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPa, température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels supérieures à 3-4 % en NaCl jusqu'à saturation (35 % en NaCl). Les environnements extrêmes sont occupés par les principaux groupes d'extrémophiles que sont les psychrophiles, les thermophiles, les acidophiles, les alcaliphiles, les halophiles et enfin les piézophiles.

Ainsi, les sources hydrothermales volcaniques possèdent une étonnante diversité d'organismes à la base d'oasis de vie dans les abysses ([lien vers focus L'écosystème des fumeurs noirs](#)). Les milieux hypersalins comme les grands lacs salés ou la mer morte sont également peuplés de microorganismes qui ne se développent que quand la concentration saline devient intolérable pour toute autre forme de vie. Les environnements glaciaires et polaires abritent aussi de riches populations de microbes. Enfin, il y a d'importantes communautés microbiennes au fond des océans, dans les sédiments et les couches géologiques profondes. On estime que 80% des écosystèmes terrestres sont exposés en permanence à des températures inférieures à 5°C, souvent dans des conditions de hautes pressions. Ainsi, à l'échelle de la planète, les extrémophiles ne peuvent plus être considérés comme des exceptions.

Les enzymes sont des produits naturels qui réalisent des réactions chimiques de manière ultra efficace et non polluante. Dans un contexte de crise alimentaire et environnementale nécessitant le développement d'une économie bio-inspirée, les nouvelles enzymes que l'on trouve dans les génomes des populations de microorganismes extrémophiles (extrêmozymes) présentent un grand intérêt (**Raddadi N et al., 2015**). En effet, leur robustesse, leur capacité à réaliser des réactions chimiques dans des conditions extrêmes et parfois le caractère unique des réactions chimiques qu'elles réalisent les rendent très intéressantes pour de multiples applications. Ainsi les biotechnologies utilisent des extrêmozymes pour la production de biocarburants, de bio-matériaux ou de molécules pharmaceutiques. Les enzymes halophiles sont capables de fonctionner dans des milieux salés, dans les solvants organiques et dans une large gamme de pH. Elles sont utilisées dans les procédés agroalimentaires, dans l'industrie papetière ainsi que dans l'industrie textile.

Au cours des dernières décennies, les études sur les micro-organismes extrémophiles se sont multipliées; cependant, les protéines thermophiles, les protéines piézophiles, les protéines acidophiles et les protéines halophiles ont reçu plus d'attention pour leurs applications biotechnologiques et industrielles (*Cárdenas et al., 2010 ; Yildiz et al., 2015*).

L'objectif de ce présent travail est un screening de souches extrémophiles (halophiles) isolés de la Sebkha situé dans le sud de l'Algérie (wilaya de Adrar, commune de Baouandji) et de leur d'activités hydrolytiques extracellulaires et cela pour la mise en évidence des activités enzymatiques : cellutitique, chitinolitique et lipolytique.

Dans une première partie de ce manuscrit sera proposée une revue bibliographique sur environnements salins et hypersalins et sur les microorganismes extrémophiles, et sur leurs intérêts en biotechnologies, la partie matérielle et méthodes décrit l'échantionnage et les différentes techniques utilisées, la partie résultats expose les résultats obtenus, enfin discussion, et conclusion générale et des perspectives.

**CHAPITRE I**  
**RAPPEL**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre I : Rappel bibliographique**

### **I.1. Environnements salins et hypersalins**

#### **I.1.1 Généralités**

Les habitats hypersalins sont très répandus partout dans le monde, les eaux marines constituent le plus grand biome sur notre planète avec une concentration en sel autour de 35g/l, et les environnements hypersalins ont été définis comme ceux ayant des concentrations salines au-dessus de celle-ci (**Oren, 1999**). La diversité des propriétés des habitats salins et hypersalins sur terre est reflétée par la grande diversité au sein des communautés microbiennes adaptées à la vie sous les conditions dominantes (**Oren, 2002 a; 2006**). Ces propriétés sont principalement définies selon la concentration totale en sel et la composition ionique (**Rodriguez-Valera, 1993; McGenity et al., 2000**).

Deux types d'environnements peuvent avoir le sel comme facteurs agissant sur les populations microbiennes ; le sol et l'eau. L'équilibre de sel dans ces environnements est affecté par la pénurie de la pluie et la forte évaporation en particulier dans les régions semiarides et arides (**Hachicha, 2007**).

#### **I.1.2. Les sols salés**

Les sols sont considérés comme salins lorsqu'ils contiennent un excès en sels solubles, dans la plupart comprenant les chlorures, les sulfates et les bicarbonates de sodium, de calcium et de magnésium, leur salinité est supérieure à 0,2% (p/v) (**Ghassemi et al., 1995**).

#### **I.1.3. Les eaux salées**

Les eaux sont considérées comme salées lorsque leur concentration en sels solubles dépasse 0,3% (p/v) et hypersalées lorsqu'elles présentent des concentrations salines supérieures à celle de l'eau de mer 3,3% (p/v) (**Edgerton et Brimblecome, 1981**). Selon leur origine, ces environnements sont classés en :

#### **A. Les thalassohalines**

Beaucoup d'environnements hypersalins dérivent de l'évaporation d'eau de mer, favorisée par un écoulement restreint, une température élevée, de basses précipitations. De tels

environnements sont appelés thalassohalines. Leurs sels minéraux sont dans les mêmes proportions que celles contenues dans l'eau de mer. Une grande diversité de vie microbienne est observée dans les thalassohalines, seulement quelques halophiles extrêmes peuvent grandir, par exemple *Halobacterium*, *Dunaliella*, et un peu d'espèce bactérienne. Des exemples d'environnements thalassohalins sont représentés par Sebkha Halk El Menzel (Tunisia), et Sebkha El Melah.

### **B. Les athalassohalines**

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

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

## **I.2 Les microorganismes extrêmophiles**

Les microorganismes extrêmophiles peuvent être répertoriés en plusieurs groupes, selon leurs paramètres de croissance et les conditions dans lesquelles ils existent (hautes et basses températures, valeurs extrêmes de pH, hautes concentrations de sel, hautes pressions et radiations).

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante : pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPa, température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels

supérieures à 3-4 % en NaCl jusqu'à saturation (35 % en NaCl).

Nous aborderons donc ici les habitats qui sont occupés par les principaux groupes d'extrémophiles que sont les psychrophiles, les thermophiles, les acidophiles, les alcaliphiles, les halophiles et enfin les piézophiles en insistant sur les connaissances que nous avons d'un point de vue microbiologique dans ce domaine et les possibilités d'applications industrielles en relation avec les enzymes que possèdent ces micro-organismes aussi originaux.

### **I.2.1 Microorganismes halophiles**

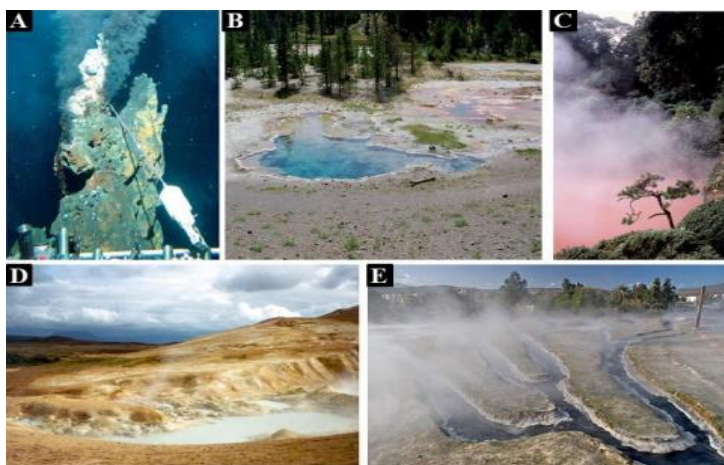
Les microorganismes halophiles sont des organismes qui aiment le sel vivant dans des environnements divers et capables d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement. Le monde des micro-organismes halophiles est très diversifié, car les représentants des trois domaines de la vie, les archées, les bactéries et les eucarya appartiennent à ce monde. Il existe des types halophiles aérobies et anaérobies, hétérotrophes, phototrophes et chimioautotrophes (*Oren 2002b, 2008*).

### **I.2.2 Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles**

Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles vivent à des températures optimales de croissance de l'ordre de 60°C et 80°C, respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives. Ces écosystèmes peuvent avoir une origine :

(i) géothermique terrestre : la nature de l'eau va dépendre des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique ; la température de l'eau in situ sera fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100°C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre. C'est le cas des sources chaudes localisées en Islande, aux Açores ou encore dans le Parc national de Yellowstone (**Figure n°1**) ;

hydrothermale océanique profonde : le fluide hydrothermal jaillit au niveau du plancher océanique au travers de fumeurs noirs où le liquide sort à des températures variant de 20 à 400°C selon la localisation ; pétrolière : certains de ces gisements pétroliers sous-marins et continentaux sont situés entre 1,5 et 4 km de profondeur et présentent des températures allant de 60 à 130°C et des pH généralement neutres.



**Figure n°1:** Exemples de biotopes naturels des thermophiles. **A.** Cheminée d'un passage hydrothermique sousmarin du Pacifique ; **B.** Octopus Spring, parc national de Yellowstone, Etats-Unis ; **C.** Sources chaudes, Beppu, Kyushu, Chine ; **D.** Sources chaudes, Krafla, N'ámaskard, Islande ; **E.** Source chaude, Meskhoutine, Guelma, Algérie [**A-B** (*Ferrera et Reysenbach, 2007*) ; **C-D** (*Calteau, 2005*) ; **E** (*la présente étude*)].

### I.2.3 Les micro-organismes piézophiles

Le terme piézophile (en Grec piezo = pression et philo = aimer) a été introduit officiellement en 1995 pour décrire les microorganismes barophiles (*Yayanos, 1995*). Les premières tentatives pour isoler les micro-organismes adaptés à croître sous des pressions élevées, remontent à 1957 (*Zobell et Morita, 1957*). Ce n'est qu'en 1979, que les premières bactéries barophiles ont été définies comme celles ayant une croissance optimale à des pressions supérieures à 40 MPa (mégapascal) (*Yayanos et al., 1979*).

### I.2.4 Les micro-organismes acidophiles

Les acidophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à un pH de 2,0 (*Morozkina et al., 2010*), et qui existent dans les trois domaines de la vie (*Baker-Austin et Dopson, 2007*). Les acidophiles oxydent le soufre élémentaire (dans les zones volcaniques) ou les minéraux sulfurés pour obtenir de l'énergie, générant ainsi des milieux acides extrêmes (*Rohwerder et Sand, 2007*).

### **I.2.5 Les micro-organismes alcalophiles**

Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent à des valeurs de pH égales ou supérieures à 9,0, avec un pH optimum entre 10 et 12 (**Horikoshi, 1999**). Parmi les lacs de soude les plus stables et productifs se hisse le Lac Magadi au Kenya, avec des valeurs de pH supérieures à 10 atteignant parfois 12 (**Jones et al., 1998**).

### **I.3 Intérêt biotechnologique des extrêmophiles**

Les extrêmophiles ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. Les propriétés singulières de certaines de ces biomolécules suscitent de ce fait l'intérêt des chercheurs (**Quérellou et Guézennec, 2010**).

L'étude des extrêmophiles fournit de nouvelles clefs à la compréhension des processus de la vie dans des conditions extrêmes et démêle les mécanismes développés par les systèmes biologiques afin d'y faire face. Ces connaissances acquises sont par la suite employées pour développer de nouveaux bioproduits et bioprocédés dans divers champs tels que les industries de produits chimiques, pharmaceutiques, de produits de beauté, de textile, de papier et alimentaire (**Antranikian, 2009**).

### **I.4 Les Enzymes**

Enzymes, également appelées biocatalyseurs, produites par les micro-organismes qui peuvent catalyser une réaction particulière ou un ensemble de réactions. Les enzymes sont généralement des protéines, cependant, le ribozyme est une exception. Certaines enzymes ont besoin de cofacteurs ou de coenzymes pour leur activité catalytique. L'utilisation d'enzymes pour différentes applications a été bien explorée. Les technologies se sont améliorées de telle sorte qu'il y a d'innombrables nombre de produits à base d'enzymes. Les enzymes sont également indispensables à la recherche comme la vie moderne. Cependant, ces enzymes ont également certaines limitations. Ils sont si fragiles ils se dénaturent facilement car ils sont principalement composés de protéines. Peu les enzymes ne peuvent être utilisées que dans

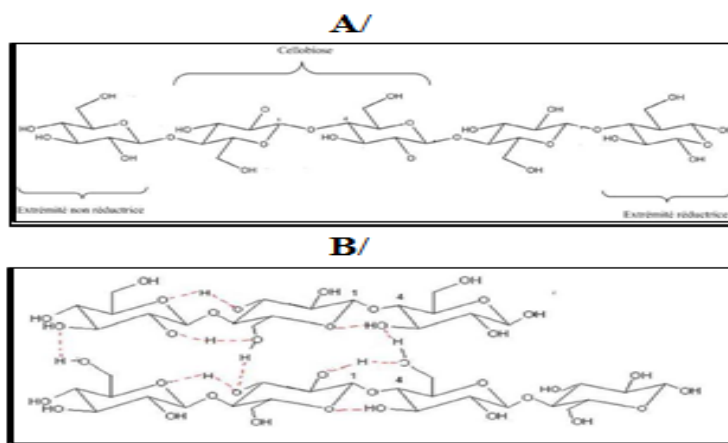
des conditions de fonctionnement très étroites. En outre, la purification des enzymes est un travail fastidieux. L'utilisation d'enzymes extrémophiles peut aider à surmonter certaines des limites (*Rothschild et Mancinelli 2001*).

### **I.4.1. Les Cellulases**

#### **A. La cellulose**

La cellulose, substrat des cellulases, est un polymère glucidique (polysaccharide), formé par l'enchaînement linéaire de monomères de glucose, reliés par des liaisons glycosidiques  $\beta$  1-4 (**Figure n°2**). Dans ce cas, l'association de deux monomères de glucose forme une unité cellobiose. Le nombre de monomères de glucose définit le degré de polymérisation (DP) de la cellulose. Le grand nombre de groupements hydroxyles permet l'établissement de liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires formant ainsi un réseau tridimensionnel rigide et insoluble (*Gandini et Pasquini, 2012*). La molécule de cellulose participe sur sa longueur, à des structures cristallines (représentées par un cristal monocyclique contenant deux unités cellobiose « 4-o- $\beta$ -D-glucopyranosyl-D-glucose » de deux chaînes de cellulose antiparallèles) et amorphes (sans cohésion avec des liaisons hydrogène) (*Levy et al., 2002*).

Par ailleurs, la cellulose est le produit de l'utilisation de l'énergie solaire et du dioxyde de carbone par les végétaux via la photosynthèse. C'est le bio polymère le plus abondant, et la seule source de carbone renouvelable sur terre (*Romero et al., 1999*). Sa décomposition en sucres simples, permettrait de résoudre de nombreux problèmes, comme la pollution de l'environnement (par la bioconversion des déchets urbains, industriels et agroindustriels) ainsi que des problèmes énergétiques (par la production d'énergie : alcool, méthane) (*Roussos et Hannibal, 1984*). Sa biodégradation est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre, assurée par des microorganismes cellulolytiques sécrétant des cellulases (*Lekchiri et al., 2006*).



**Figure n°2:** Structure de la cellulose. **A/** Représentation de la chaîne de cellulose ; **B/** Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose. (*Stryer et al., 2003*).

## B. Définition des cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- $\beta$ -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (*Kader et al., 1999; Korish, 2003*). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo  $\beta$  (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo  $\beta$  (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91),  $\beta$  (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (*Xu, 2002*) :

- L'endo-cellulase (EC 3.2.1.4) casse les liaisons internes pour perturber la structure cristalline de la cellulose et pour exposer différentes chaînes de polysaccharide de cellulose, en diminuant rapidement le degré de polymérisation du substrat (*KlemanLeyer et al., 1994; Davies et Hanrissat, 1995; Harjunpaa et al., 1996; Warren, 1996; Xu et al., 2000*). Les endoglucanases coupent la cellulose aléatoirement au niveau des zones amorphes de la cellulose, générant de nouvelles extrémités de chaînes.
- L'exoglucanase (EC 3.2.1.91) attaque les liaisons  $\beta$  (1-4) glycosidiques des chaînes de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose (*Teeri, 1997; Xu, 2002*).
- La cellobiase (EC 3.2.1.21) hydrolyse les liaisons  $\beta$  (1-4) glycosidiques du cellobiose, pour donner deux molécules de glucose (*Onsori et al., 2005*).

### C. Les différentes origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (*Xu et al., 2000*). Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers, mollusques, insectes etc...(*Odier et Rouau, 1985*). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne.

#### ➤ Origine animale

Plusieurs espèces animales (**omnivores et herbivores**) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (*Smant et al., 1998*). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (*Xu et al., 2000*).

Des cellulases ont été isolées à partir du suc digestif d'escargot comestible *Helix pomatia* (*Rebeyrotte et al., 1976 ; Kubicek., 1981*), de la glande digestive d'une moule verte *Pernaviridis* (*Marchall.,1973*), de la moule bleue *Mytilus edulis* (*Xu et al., 2000*) et du mollusquemarin *Littorina brevicula* (*Purchon, 1977 ; Kiesov, 1982*). De plus, l'amibe *Dictyostelium discoideum* produit une cellulase extra-cellulaire pendant la germination de ses spores (*Blume et Ennis., 1991*). Des cellulases ont également été identifiées dans les glandes de l'œsophage de kyste des nématodes *Globodera restochiensis* et *Heterdora glycines*, parasites obligatoires des plantes (*Smant et al., 1998*).

#### ➤ Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (*Cordonnier et al., 1986*). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (*Riccio et al., 1999*), de l'avocat *Persea americana* (*Blume et Ennis, 1991*), des céréales tels que l'orge (*Dan et al., 2000*) et le riz de la variété *Oryza sativa* (*Xu et al., 2000*).

Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- $\beta$ -glucanases (*Mandels et al., 1976*). Néanmoins, la fabrication d'enzyme végétale est soumise aux contraintes d'approvisionnement de la matière première (caractère saisonnier des récoltes, spéculations dues aux incertitudes économiques et politiques des pays producteurs) (*Joyeau,*

1982).

➤ **Origine microbienne**

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielles d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation (**Rapp et Beerman, 1991**), bien que ces enzymes, peuvent être présentes sur la surface des cellules (**Bond et Stutzenberger, 1989 ; Wachinger et al., 1989**).

Un grand nombre de microorganismes (bactéries, moisissures et levures aérobies et anérobies) sont capables d'attaquer la cellulose en libérant des acides organiques tels que : l'acide formique, l'acide butyrique et l'acide acétique avec dégagement de CO<sub>2</sub> (**Brisou, 1971**). Néanmoins, ce sont les cellulases bactériennes et fongiques qui ont été les plus étudiées notamment en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie (**Odier et Rouau, 1985**).

**D. Mécanisme d'action de la cellulase**

Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons  $\beta$ -osidiques entre les résidus glycosyliques. (**Lynd et al., 2002**).

L'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques s'effectue par un mécanisme acidebase, constitué d'un donneur de proton et d'une base nucléophile (**Sinnott, 1990**). Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Généralement, l'hydrolyse des liaisons glycosidiques b (1-4) de la cellulose se fait avec rétention de la configuration du carbone anomérique (**Gebler et al., 1992**). Les produits d'hydrolyse peuvent avoir comme conséquence l'inversion ou la conservation (double mécanisme de rechange) de la configuration anomérique du carbone-1 à l'extrémité réductrice (**Birsan, et al., 1998 ; Ooshima et al., 1990 ; Withers., 2001**).

La nature insoluble de la cellulose représente un défi pour les systèmes cellulases, pour s'y adapter la plupart des cellulases ont une structure modulaire facilitant la fixation de l'enzyme à la surface de la cellulose, pour amorcer l'hydrolyse de la cellulose. Le système de cellulases montre une activité collective plus élevée que la somme des activités de différentes

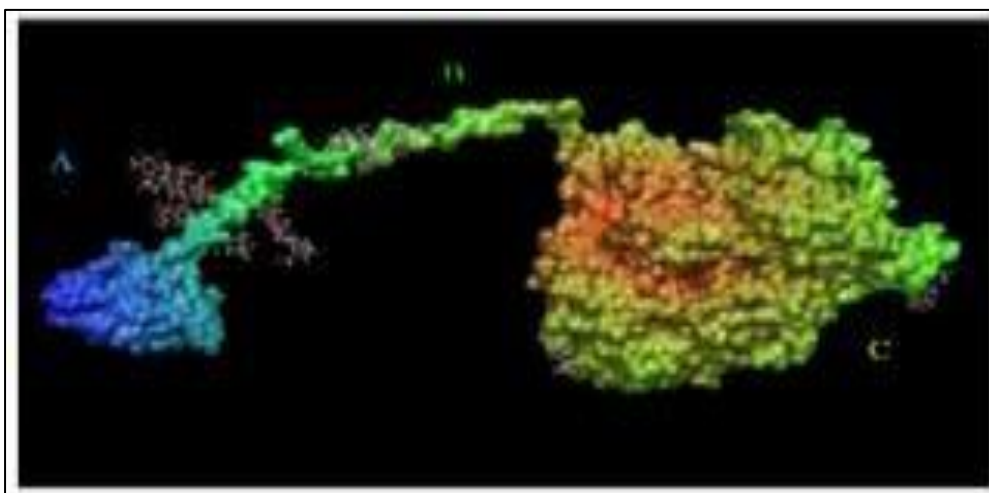
autres enzymes, un phénomène connu sous le nom de synergie (*Lynd et al., 2002*). Quatre formes de synergisme ont été rapportées (*Din et al. 1994 ; Teeri, 1997*) :

- Synergie endo-exoglucanase
- Synergie exo-exoglucanase
- Synergie exoglucanase et b-glucosidase (la cellobiose en tant que produit final)
- Synergie intramoléculaire entre les domaines catalytiques et le « linker ».

#### **E. Structure de la cellulase**

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (*Beldman et al., 1985*) et ne sont pas des métalloprotéines (*Saha et al., 1994*). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : Le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Ser / Pro et Thr appelé « linker » (**Figure n° 3**) (*Cavako-Paulo, 1998 ; Receveur et al., 2002 ; Hasper et al., 2002*). La présence du domaine de fixation est essentielle pour la dégradation de la cellulose cristalline de coton, car elle augmente la concentration de l'enzyme autour du substrat et de ce fait améliore la catalyse enzymatique (*Din et al., 1991 ; Boraston et al., 1998*). Le site actif situé dans le domaine catalytique, a la forme d'un tunnel où la réaction hydrolytique a lieu (*Henrissat et Bairoch, 1996*).

Le domaine de fixation des cellulase fongiques comporte 36 acides aminés et se fixe de façon réversible à la cellulose (*Linker et Teeri., 1996*), grâce à la tyrosine qui joue un rôle important dans la fixation du substrat par une interaction hydrophobe (*Reinikainen, 1994*).



**Figure n° 3 : Exocellulase CBH I (Cel7A) de *Trichoderma reesei* (John et al., 2005) (A : le site de fixation, B : le « linker » glycosylé, C : le site catalytique)**

## **F. Applications industrielles de la cellulase**

L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur et al., 2002) ce qui revoie à différentes applications industrielles.

### **❖ Industries alimentaires**

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes, le plus souvent en association avec les pectinases (Odier et Rouau, 1985) pour la digestion qui précède les extractions (protéines de soja, amidon de pomme de terre ou de maïs, jus de fruits, huiles végétales etc...) (Odier et Rouau, 1985). Elle améliore l'arôme des jus de fruits et du vin (Riccio et al., 1999).

### **❖ Industrie des textiles et des détergents**

Depuis 1990, les textiles et les détergents constituent les plus grands marchés mondiaux pour l'utilisation des cellulases. Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner

l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (**Gusakov et al., 2000**). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (**Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998**) des fibres et dans la préparation de « stone washed jeans » (**Scriban, 1993 ; Gusakov et al., 2000 ; Ando et al., 2002**).

#### ❖ **Papeterie**

Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (**Scriban, 1993**). Elles contribuent également à l'amélioration de la qualité du papier (**Odier et Rouau, 1985**).

#### ❖ **Nutrition animale**

C'est un autre marché qui pourrait s'ouvrir pour ces enzymes utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour volailles ou porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréments) (**Scriban, 1993 ; Gusakov et al., 2000**) et améliore la valeur nutritive de l'aliment (**Kolarova et Farkas, 1981 ; Odier et Rouau, 1985**).

#### ❖ **Domaine thérapeutique**

Certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses comme aides digestives (**Odier et Rouau., 1985 ; Scriban, 1993**). Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viridae* sont utilisées en association avec des  $\alpha$ -amylases fongiques, pour éviter les dysepsies et fermentations intestinales (**Rivière, 1975**).

### **I.4.2. Les Chitinases**

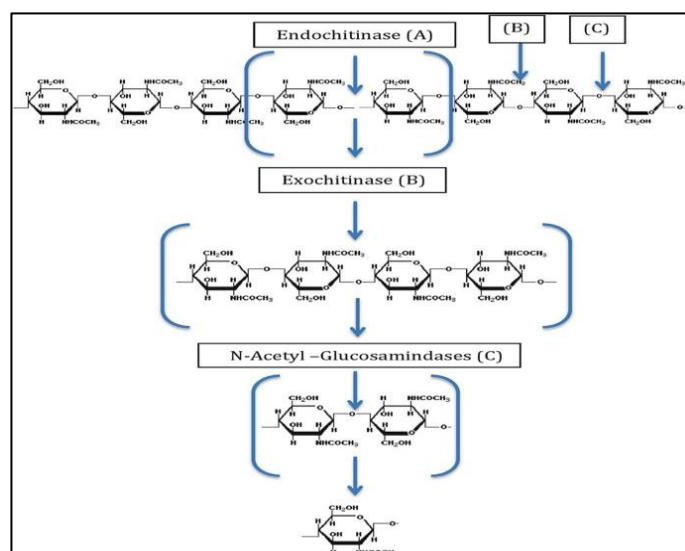
#### **A. Définition des chitinases**

Les chitinases (EC 3.2.1.114) sont des enzymes extracellulaires inductibles qui hydrolysent la liaison  $\beta$ - (1-4) glycosidique entre les C1 et C4 de deux Groupes N-acétylglucosamine produisant des chitooligomères (**Liu et al., 2003**). Elles sont membres du

groupe glycosyl hydrolase, qui est classé en 136 familles, basé sur similitudes de séquence d'acides aminés. La plupart des chitinases appartiennent à la famille des glycosyl hydrolases 18 et 19 (GH 18 et GH 19). GH 18 comprend des chitinases de bactéries, champignons, virus, animaux et quelques plantes. Ils sont endo-agissant non catalytiques et catalytique avec des préférences de liaison exo et endo produisant du chitobiose comme principal produit. Cependant, certaines chitinases endoactives ne sont pas capables de cliver les trimères et tétramères donnant des produits plus longs. En revanche, GH 19 comprend presque exclusivement des chitinases végétales (*Tanaka et al., 1999*).

Les enzymes hydrolysant la chitine sont classées en trois catégories (endochitinases, exochitinases et N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidases-GlcNAc) sur la base du clivage mécanisme (*Dahiya et al.2006 ; Neeraja et al.2010* ) (Figure n° 4).

1. Les endochitinases clivent au hasard les liaisons  $\beta$ - (1-4) glycosidiques de la chitine
2. Les exochitinases coupent la chaîne de l'extrémité non réductrice pour former du diacétylchitobiose (GlcNAc<sub>2</sub>).
3. Les N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidases hydrolysent GlcNAc<sub>2</sub> en GlcNAc ou produisent
4. GlcNAc de l'extrémité non réductrice des N-acétyl-chitoooligosaccharides.



**Figure n° 4 :** Action mécaniste des chitinases sur la chitine (A) agit sur les extrémités non réductrices de la chitine donnant oligochitomères; (B) agit sur l'extrémité non réductrice pour former le chitobioside (GlcNAc)<sub>2</sub> et (C) agit dans le (GlcNAc)<sub>2</sub> pour produire GlcNAc.

**B. Sources des chitinases****- Chitinases bactériennes**

Les chitinases bactériennes et les protéines de liaison à la chitine jouent un rôle fondamental dans la dégradation de la chitine biopolymère omniprésente, et les produits de dégradation constituent une importante source de nutriments pour les bactéries marines et du sol. Les chitinases bactériennes sont produites à la fois par les trois domaines: bactéries, archées, et eucaryotes.

Les chitinases bactériennes ont un poids moléculaire d'environ 20 à 60 kDa comparable à celui des chitinases obtenues à partir d'espèces végétales (40–85 kDa). Des chitinases bactériennes ont été rapportées divers genres dont *Serratia*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus* et *Aeromonas* (**Bhattacharya et al., 2007**).

La température et le pH optimaux pour les chitinases bactériennes peuvent varier avec la bactérie espèces dans les mêmes genres.

**- Chitinases fongiques**

La paroi cellulaire de certains champignons est composée de chitine, qui est insoluble dans l'eau. Il est donc très essentiel de décomposer la chitine en son composant précurseur, qui peut ensuite être utilisés par les champignons pour la croissance. Les chitinases peuvent décomposer efficacement la chitine en composants précurseurs, qui peuvent alors être utilisé par les champignons pour la croissance des hyphes, l'extension des hyphes, la fusion des hyphes, l'autolyse, etc. Les chitinases fongiques appartiennent principalement à la famille GH 18 et présentent des acides aminés élevés homologie avec les chitinases végétales de classe III (**Takaya et al., 1998; Dahiya et al., 2006**).

La température optimale de la chitinase fongique est de 40 à 50 ° C. les espèces fongiques sont connues comme des toprducechitinases, qui peuvent fonctionner à une température et pH (**Li et al., 2010; Karthik et al., 2014**).

**- Chitinases végétales**

Les chitinases se trouvent dans les monocotylédones et les dicotylédones de plantes supérieures. Ils jouent un rôle impératif dans le mécanisme défensif des plantes et sont également inclus dans la classe de protéines liées aux agents pathogènes. Sur la base des

séquences d'acides aminés, les chitinases végétales ont été classées en 5 ou 6 classes. La structure clé des enzymes de classe I, II et IV comprennent une unité structurale principale composée de deux domaines globulaires. Alors que 8 hélices  $\alpha$  et 8 brins  $\beta$  forment la plante de classe III et V les chitinases. Le premier effectue l'hydrolyse de la liaison  $\beta$ -1, 4-glycosidique par moyen d'un mécanisme d'inversion, et ce dernier par un mécanisme de retenue (**Tamo et al., 2003**). Les chitinases d'origine végétale ont généralement un poids moléculaire de 25 à 36 kDa et peut être acide ou basique selon les acides aminés présent (**Punja et Zhang 1993**). La plupart des chitinases obtenues à partir de plantes sont actives dans température et pH modérés.

#### - Chitinases d'insectes

La chitine constitue un composant crucial de l'endosquelette d'insecte et son niveau approprié doit être maintenu pour le maintien de la croissance des insectes. Les chitinases d'insectes ont une gamme de poids moléculaire de 40 à 85 kDa. Ceux-ci jouent des rôles importants en tant que dégradants enzymes pendant l'ecdysis où les endochitinases cassent au hasard la cuticule pour les chitooligosaccharides qui sont ensuite hydrolysés par des exoenzymes en N-acétyl-glucosamine. Les monomères sont réutilisés pour une nouvelle synthèse de cuticules (**Kramer et al., 1993; Koga et al., 1997**).

#### C. Applications des chitinases

La chitinase Chi18H8 isolée du sol a montré une activité antiphytopathogène contre *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum* (**Hjort et al., 2014**). En raison de l'absence de chitine dans les tissus végétaux, les chitinases sont mieux adaptées au contrôle phytopathogène que les autres glucanases (**Neeraja et al., 2010**).

La chitinase produite par *Enterobacter* sp. NRG4 montre une activité antifongique vers *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxi* et *Rhizopus nigricans* (**Dahiya et al., 2005**).

Les chitinases ont également trouvé une application dans le contrôle de la morphogénèse chez moustiques et donc contrôler les maladies transmises par eux. Chitinases obtenu à partir d'un champignon saprophyte *Myrothecium verrucaria* peut contrôler la propagation d'*Aedes aegypti*, un vecteur de la fièvre jaune et de la dengue (**Mendonsa et al., 1996**).

Produits d'hydrolyse de la chitine, chitooligosaccharides, glucosamines et GlcNAc sont utilisés dans différents produits pharmaceutiques. Chitopentose et chitoheptose ont montré activités antitumorales. Hydrolysats produits par une solution enzymatique brute de *Bacillus amyloliquefaciens* V656 avait (GlcNAc) 6 a montré une activité antitumorale plus élevée. Les hydrolysats de chitosane soluble dans l'eau ont inhibé le taux de croissance des cellules CT26 et taux de survie à 34% en 1 jour (**Liang et al., 2007**).

La chitinase de *Paenibacillus* sp. D1 peut donc être utilisé dans la lutte intégrée contre les ravageurs pour lutter contre les phytopathogènes fongiques du sol (**Singh et Chhatpar 2011**).

### **I.4.3. Les lipases**

#### **A. Définition des lipases**

Les lipases sont des hydrolases d'esters de triacylglycérol (E.C. 3.1.1.3). Ils sont l'un des plus classes importantes de biocatalyseurs qui agissent sur une gamme de substrats différents, catalysant l'hydrolyse, l'estérification, l'alcoolyse, l'acidolyse, l'intérétérification, aminolyse et autres réactions (**Daiha et al., 2015**). Quelques marchés importants pour les lipases comprennent les industries et les applications des produits alimentaires, des boissons et des produits de nettoyage qui impliquent la synthèse organique. La demande mondiale pour ces enzymes est devrait croître de 6,2% par an jusqu'en 2017, à près de 345 millions de dollars américains (**Groupe Freedonia 2015**).

#### **B. Structure et mécanisme catalytique des lipases**

La première structure d'une lipase a été déterminée en 1990. Depuis, plus de lipase structures ont été déterminées, et 147 structures classées comme triacylglycérol les lipases (E.C. 3.1.1.3) sont actuellement déposées dans la Protein Data Bank (PDB), toutes les utiliser en utilisant des méthodologies de cristallographie et de diffraction des rayons X. Malgré cela apparemment grand nombre, il y a encore peu d'informations structurelles disponibles niveau atomique sur les lipases d'organismes extrémophiles. Seulement 55 de ces structures sont se trouve dans la PDB, correspondant à dix lipases différentes de l'extrémophile organismes (**Tableau n°1**).

**Tableau n°1** Définitions des lipases extrémophiles utilisées dans ce chapitre(a) Critères basés sur *Madigan et al., (2000)* et *Schreck et Grunden (2014)*.

| Types de lipases extrémophiles | Conditions de croissance optimales (a)                                                                                                        |                                                  |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Alcaliphile                    | pH compris entre 10 et 11                                                                                                                     |                                                  |
| Acidophile                     | pH de 5 ou moins                                                                                                                              |                                                  |
| Thermophile                    | Températures entre 45 et 80 ° C (les organismes qui poussent à des températures supérieures à 80 ° C sont considérés comme hyperthermophiles) |                                                  |
| Psychrophile                   | Température inférieure à 15 ° C                                                                                                               |                                                  |
| Halophile                      | Concentration de NaCl                                                                                                                         | 1-6%: faible<br>6-15%: modéré<br>15-30%: extrême |

A partir de ces structures cristallines, les lipases ont été classées comme appartenant à la famille structurale des  $\alpha / \beta$  hydrolases. En plus des lipases, les autres membres de cette famille sont les estérases, les protéases, les déhalogénases, les peroxydases et les époxydes hydrolases (*Anobom et al., 2014*).

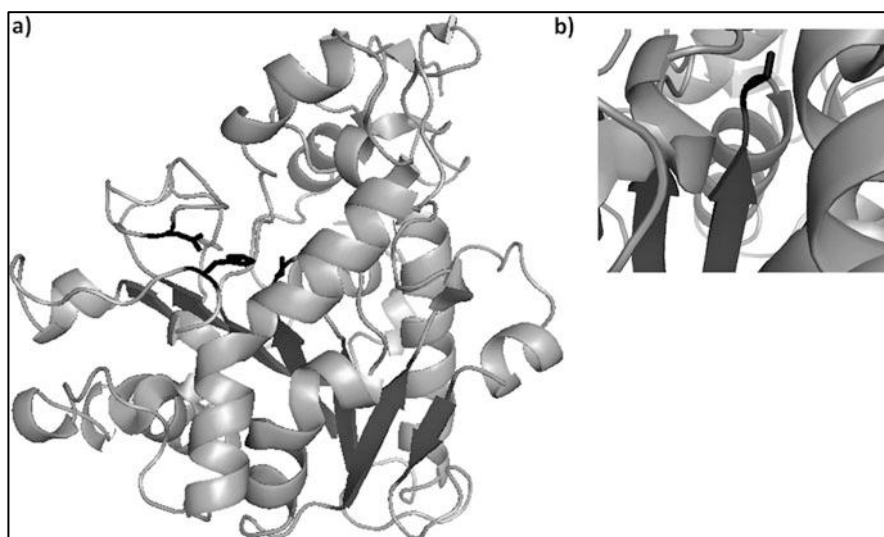
#### ❖ Pli $\alpha / \beta$ -hydrolase

Les domaines  $\alpha / \beta$  sont composés d'une feuille  $\beta$  parallèle ou mixte entourée d'un  $\alpha$ -hélice et sont répandus dans la nature. Une sous-classe de ce pli a été identifiée en 1992 en comparant les structures de différentes enzymes hydrolytiques. Bien que ces enzymes n'ont pas de similitude de séquence et présentent une spécificité pour différents types des substrats, ils présentent une similitude structurelle et des résidus catalytiques conservés, suggérant qu'ils ont évolué à partir d'un ancêtre commun. L' $\alpha / \beta$ -hydrolase canonique fold présente une feuille  $\beta$  centrale composée de sept brins  $\beta$  parallèles ( $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ) et un brin  $\beta$  antiparallèle ( $\beta 2$ ). Les brins  $\beta 3$  à  $\beta 8$  sont reliés par six Hélices  $\beta$  qui entourent cette feuille  $\beta$  centrale. D'un côté se trouvent les hélices  $\alpha A$  et  $\alpha C$ , et de l'autre, les hélices  $\alpha B$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$  et  $\alpha F$  (**Figure n° 5 a**) (*Nardini et Dijkstra 1999; Anobom et al., 2014*).

Le site actif est composé d'un résidu nucléophile, d'un résidu acide (**Asp ou Glu**) et un résidu histidine, qui forment la triade catalytique. Dans les lipases, le résidu nucléophile a jusqu'à présent été caractérisé comme une sérine. Ce résidu est situé dans un pentapeptide hautement conservé appelé le coude nucléophile, qui affiche la séquence Sm-X-S-X-Sm (Sm

est un petit résidu, généralement une glycine; X est un résidu quelconque; et S est la sérine) (Nardini et Dijkstra 1999; Anobom et al., 2014).

Le pentapeptide forme un tour  $\gamma$  serré après le brin- $\beta 5$ , en hélice brin-boucle motif, et induit le résidu nucléophile à adopter une conformation des angles  $\phi$  et  $\psi$  de la chaîne principale, imposant des contraintes stériques sur les résidus situés à sa proximité (**Figure n° 5 b**). Le résidu acide peut être un acide aspartique ou résidu d'acide glutamique, et se trouve généralement après le brin- $\beta 7$ , mais dans certaines structures ce résidu a été trouvé après le brin- $\beta 6$ . Le résidu histidine a été trouvé dans la région de la boucle après le dernier brin  $\beta$  (Nardini et Dijkstra 1999; Anobom et al., 2014).



**Figure n° 5 :** (a) Structure cristallographique de la lipase B de *Candida antarctica* (Uppenberg et al., 1994 - PDB ID 1TCC).

Montrant le pli  $\alpha / \beta$ -hydrolase caractéristique. Les hélices  $\alpha$  et les boucles non structurées sont en gris clair, les brins  $\beta$  sont gris foncé et les résidus de triade catalytique sont noirs (Ser 105, Asp 187, His 224). (b) Détail montrant la sérine catalytique (représentée par un bâton noir) dans le coude nucléophile, en motif brin-tour-hélice.

La conformation du coude nucléophile contribue à la formation du trou d'oxyanion, nécessaire pour stabiliser l'état de transition chargé négativement qui se produit pendant l'hydrolyse. Le trou d'oxyanion est normalement formé par deux azotes atomes situés au niveau du squelette protéique. Le premier est toujours situé au niveau du résidu immédiatement après le nucléophile, tandis que le second se trouve généralement entre brin

$\beta 3$  et hélice  $\alpha A$  (Nardini et Dijkstra 1999).

Les structures cristallographiques des enzymes appartenant à l' $\alpha / \beta$  hydrolase indiquent que ce pli peut présenter une variabilité considérable. Cependant, la présence de la triade catalytique, le coude nucléophile après le brin canonique  $\beta 5$ , et la présence d'au moins cinq brins parallèles dans la feuille  $\beta$  centrale sont des caractéristiques communes à toutes ces structures (Nardini et Dijkstra 1999).

Plusieurs lipases peuvent présenter un sous-domaine amphipathique mobile appelé couvercle, qui contrôle l'accès des molécules de substrat au site actif. En présence d'une interface eau-lipide, le couvercle s'ouvre et l'activité enzymatique est augmentée un phénomène appelé activation interfaciale. La complexité et la taille du couvercle des différents lipases dont les structures ont été déterminées varient considérablement et peuvent se former par une région en boucle, ou par une ou plusieurs hélices  $\alpha$  (Anobom et al., 2014).

### C. Applications des Lipases

La lipase joue un rôle important dans divers secteurs notamment les détergents (le plus important commercialement), les dégraissants (Catherine, 2009). Le Tableau II résume les différents domaines d'application des lipases.

**Tableau n°2:** les secteurs d'utilisations des enzymes lipolytiques (**Amélie, 2010**).

| <b>Industries</b>                   | <b>Exemples d'applications</b>                                                                                                                            |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agro-alimentaire</b>             | -Développement de saveurs dans les fromages.<br>-Transformation/production d'huiles et matières grasses.<br>-Fermentation (saucissons, thé noir, etc...). |
| <b>Pharmaceutique et biomédical</b> | Production d'énantiomères spécifique. -<br>Biomarqueurs / indicateurs pour diagnostiquer certaines maladies. -Acide à la digestion.                       |
| <b>Produits nettoyants</b>          | Détergents pour éliminer les dépôts gras sur le linge et dans les tuyaux.<br>-Transformation d'acide gras pour la production de savon.                    |
| <b>Environnement</b>                | Traitement des eaux usées.<br>-Production de biopolymères.                                                                                                |
| <b>Pâtes et papiers</b>             | Améliorer le blanchissement du papier.                                                                                                                    |
| <b>Cosmétiques</b>                  | -Synthèse d'émollient pour des crèmes et huiles de bains                                                                                                  |
| <b>Industrie du textile</b>         | Dégraissage de peaux animales.<br>-Modification de fibres synthétiques.                                                                                   |

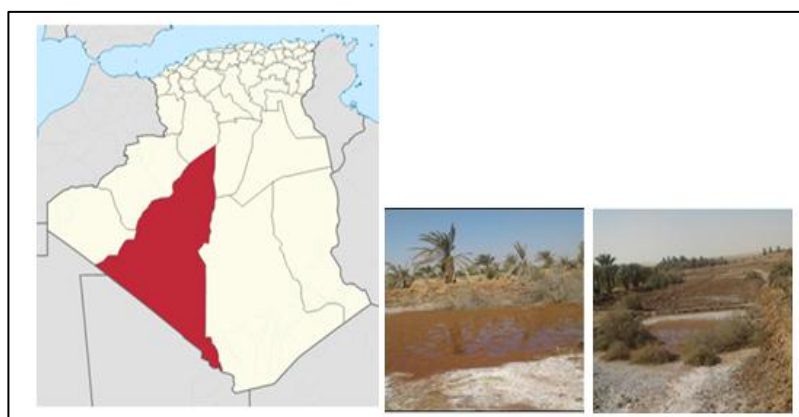
**CHAPITRE II**  
**MATERIELE ET**  
**METHODES**

## Chapitre II : Matériels et méthodes

### II.1. Echantillonnage

#### A.Biotope de prélèvement

Afin d'obtenir des souches extrêmes, productrice des enzymes adaptés aux conditions extrêmes, des « sebkhas » situés dans le sud de l'Algérie (wilaya d'Adrar, commune de Baouandji) ont été choisis comme site d'échantillonnage. **(Figure n°6).**



**Figure n°6 :** Localisation de lieu prélèvement (sebkha d'Adrar).

#### B.Méthodes de prélèvement et analyse physico-chimique

L'échantillonnage va être effectué à partir d'une sebkha salée. L'échantillon S1–10, un mélange d'eaux salées saturées et de sédiments, va être prélevé pendant la saison sèche (octobre 2020), par profondeur de 10 à jusqu'à 20 cm sous la surface de la croûte de sel. La température, la salinité et le pH de l'échantillon d'eau ont été décrits précédemment. Les échantillons ont été collectés dans des tubes stériles et conservés de manière aseptique à 4 ° C jusqu'à l'analyse.

### II. 2. Enrichissement et isolement des microorganismes halophiles

Cultures d'enrichissement et isolement des halophiles aérobies les procédures relatives aux microorganismes vont être effectuées en milieu contenant (par litre): NaCl, 250 g; KCl, 4 g;  $MgC_2 \cdot 6H_2O$ , 10 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1 g;  $NaHCO_3$ , 0,5 g, extrait de levure, 5 g; tryptone, 10 g; et glucose, 7 g. Le pH va être ajusté à 6,8 avant l'autoclavage. Les milieux solides vont être préparés en ajoutant 20 g d'agar-1. Les souches vont être cultivées dans 100 ml de milieu dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml dans un agitateur rotatif sous

Agitation à 100 tr / min pendant 3 semaines. Des aliquotes (100 µl) de dilutions vont être étalées sur du milieu gélose. Après 2 semaines d'incubation à 37 ° C, des colonies rouges, orange-rouge, roses et jaunâtres vont être obtenues. Différentes colonies vont être prélevées et redistribuées plusieurs fois pour obtenir des cultures pures. Les cultures microbiennes vont être conservées à -80 ° C dans le milieu d'isolement additionné de 30% de glycérol.

## **II. 3.Extraction d'ADN et amplification par PCR**

L'ADN génomique de tous les isolats va être extrait à l'aide d'un assistant Kit de purification d'ADN génomique tel que décrit précédemment (**Karray et al., 2016**). Les gènes ARNr 16S bactériens et archéens vont être amplifiés en utilisant les jeux d'amorces FD1 / 1492R et 21F / 1492R, respectivement. L'amplification par PCR va être réalisée dans un volume total de 50 µl de mélanges contenant 1 × tampon Taq, 0,2 mmol chacun dNTP, 0,2 µmol de chaque amorce, 50 ng de matrice d'ADN et 1,25 U d'ADN polymérase Taq (Fermentas). Archéen Les conditions d'amplification par PCR étaient les suivantes: 5 min à 94 ° C, suivi de 30 cycles (1 min de dénaturation à 94 ° C, 1 min de recuit à 55 ° C et 2 min d'extension à 72 ° C) et une étape finale d'extension de 10 min à 72 ° C. Les conditions d'amplification bactérienne par PCR étaient les suivantes: 5 min à 94 ° C, suivi de 30 cycles (45 s de dénaturation à 94 ° C, 45 s de recuit à 58 ° C, et 1 min 45 s d'extension à 72 ° C) et une dernière étape d'extension de 10 min à 72 ° C. L'amplification va être réalisée à l'aide d'un GeneAmp Système PCR 9700 (Biosystèmes appliqués).

## **II. 4.Analyse de restriction de l'ADN ribosomal amplifié (ARDRA) et analyse statistique**

Le gène de l'ARNr 16S (1,5 kb) amplifié par PCR va être soumis à une digestion de restriction en utilisant HaeIII (8 U), AluI, enzymes de restriction MobI et Bstul (10 U), selon la recommandation du producteur d'enzymes (Life Technologies). Le mélange réactionnel de 20 µl contenait 12 µl de Produit PCR, 10 ou 8 U d'enzyme de restriction et 2 µl de tampon approprié. L'analyse de restriction de l'ADN ribosomique amplifié (ARDRA) va être effectuée en utilisant la même condition comme décrit précédemment (**Karray et al., 2016**). Les profils ARDRA étaient analysés à l'aide du logiciel PyElph 1.4 (**Pavel et al., 2012**). Présence ou absence de bandes dans chaque voie du gel DGGE va être converti en une matrice binaire. Le coefficient Jaccard va être utilisé pour estimer la similitude entre les modèles et un dendrogramme va être obtenu par la méthode de l'UPGMA (moyenne arithmétique des groupes de paires non pondérées) en utilisant le logiciel Past 3 (**Hammer et**

*al., 2001*). Les profils ARDRA vont être analysés et des isolats représentatifs vont être sélectionnés pour la séquence nucléotidique détermination.

## **II. 5. Séquençage et analyse phylogénétique**

Les produits de PCR vont être séquencés de la même manière que précédemment décrite (*Karray et al., 2016*). De plus, l'analyse phylogénétique de toutes les séquences des gènes de l'ARNr 16S vont être réalisées comme indiqué précédemment (*Karray et al., 2016*). Les séquences nucléotidiques déterminées dans cette étude vont être soumises à la GenBank et attribués aux numéros d'accès KY129979 à KY129984 pour les séquences bactériennes et KY129959 à KY129978 pour les séquences archéennes.

## **II. 6. Caractéristiques morphologiques des isolats**

Les caractéristiques morphologiques des souches isolées vont être examinées sur la forme des colonies, la morphologie cellulaire et la motilité. La morphologie cellulaire et la motilité des cultures liquides à croissance exponentielle vont être examinées sur des supports humides fraîchement préparés par microscopie optique.

## **II. 7. Screening des enzymes hydrolytiques sur plaque d'agar**

Un criblage qualitatif va être réalisé pour étudier les diversités de micro-organismes produisant des enzymes hydrolytiques utilisant des milieux agar complétés par des substrats spécifiques pour les enzymes d'intérêt. Trente microlitres de culture en phase de latence de chaque isolat vont être déposés sur 9 mm de diamètre de disque stérile. Les disques inoculés vont être placés au centre de plaques moyennes dans lesquelles des substrats spécifiques vont être incorporé. Les plaques vont être incubées à 37 ° C pendant 3 semaines en double exemplaire.

### **❖ Déterminaton de l'activité lipolytique**

Pour détecter la production de lipase, les souches vont être cultivées sur des plaques d'agar à la rhodamine B. Le milieu stérilisé était supplémenté avec 2,5% (v / v) d'huile d'olive et 0,001% (p / v) solution de rhodamine B avant de verser les plaques. Le dépistage de l'activité lipolytique va être suivi sous lumière UV à 365 nm et les colonies avec des zones de couleur orange vont être prélevées comme preuve de l'activité lipase (*Kouker et al., 1987*;

*Bhatnagar et al., 2005 ).*

#### ❖ Déterminaton de l'activité cellulitique

Pour le criblage des activités cellulolytiques, les isolats vont être cultivés sur des plaques d'agar contenant de la carboxyméthylcellulose (CMC) à 0,5% (p / v). Après incubation, les plaques vont être inondées avec une solution de rouge congo à 0,1% puis lavées avec 1 mole de NaCl. La zone de halo incolore entourant les colonies a prouvé la présence de cellulolytique (*Teather et al., 1982*).

#### ❖ Déterminaton de l'activité chitinasique

Afin de détecter la production de chitinase, les isolats vont être cultivés sur des plaques de milieu colloïdal gélosé à la chitine (1%). Des halos clairs autour des colonies indiquaient une activité chitinase (*Park et al., 2000*). La capacité des souches halophiles extrêmes à produire une activité ABTSoxydante extracellulaire va être déterminée en utilisant 0,35 g d'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) (Sigma) complété par du sulfate de cuivre (II) comme inducteur (*Niku-Paavola et al., 1988*).

### **II. 8.Cinétique de croissance et production d'enzymes**

Des dosages quantitatifs pour les enzymes hydrolytiques vont être réalisés en utilisant le milieu de production, tel que décrit ci-dessus, complété avec un substrat spécifique pour l'enzyme d'intérêt et inoculé avec la souche correspondante. Les flacons (en double) vont être incubés dans un agitateur rotatif à 180 tr / min et 37 ° C. Après 24 h d'intervalle, la cinétique de la croissance des archéens et la production d'enzymes vont être étudiées. La densité optique (DO) va être mesurée par une méthode spectrométrique à 600 nm (spectromètre UV / Vis T70 +). Pour les dosages enzymatiques, le contenu était centrifugé à 10 000 tr / min pendant 20 min à 4 ° C et le surnageant de culture obtenu va être utilisé comme source d'enzyme brute.

#### ➤ Dosages de cellulase

L'activité cellulase va être mesurée en utilisant 2% de carboxyméthylcellulose (CMC) comme substrats dissous dans un tampon de citrate de sodium 50 mM (pH 4,8). Un volume de 3 ml de DNS va ensuite être ajouté dans le tube à essai pour arrêter la réaction et l'a placé dans un bain d'eau bouillante pendant 10 min avec le témoin.

Dans le contrôle, l'enzyme va être ajoutée après l'ajout du réactif DNS. Enfin, le contenu va être refroidi et dilué 5 fois avec de l'eau distillée puis vortexé. Tous les tests vont être réalisés en double. L'absorbance va être mesurée en utilisant le spectromètre UV / Vis T70 + à 550 nm. L'activité cellulase va être définie comme la quantité d'enzyme produite 1 umole de sucres réducteurs par minute et par ml dans les conditions de test.

➤ **Test d'activité lipolytique**

En flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu complété avec 1% (V / V) d'huile d'olive. L'activité lipase va être déterminée en mesurant les acides gras libres libérés à l'aide de NaOH 0,1 N avec un pH-stat (Metrohm, Swiss). L'activité lipase va être mesurée par titrimétrie à pH 8 et 37 ° C en utilisant une émulsion d'huile d'olive obtenue en mélangeant (3 x 30 s dans un blender Waring), 10 ml d'huile d'olive (Sfax-huile, Tunisie) dans 90 ml de 10% GA (La gomme arabique). Une unité d'activité lipasique correspond à 1  $\mu$ mol d'acide gras libéré par minute (***Cherif et al., 2011***).

# **CHAPITRE III**

## **RESULTATS**

## Chapitre III : Résultat

Vu la pandémie du COVID-19, nous n'avons pas pu réaliser des travaux pratiques sur des échantillons d'eau salés (en Algérie) pour l'étude de la biodiversité microbienne ainsi que l'évaluation de l'efficacité des enzymes exprimés par ces microorganismes. Ce chapitre concernera donc la discussion des résultats rapportés dans la littérature par des auteurs qui travaillent sur ce domaine d'étude.

### III.1. Isolement des isolats halophiles de sebkha

#### ➤ Analyse physico-chimique des échantillons

Les valeurs de salinité et température et de pH enregistrées pour l'eau de l'échantillon (S1-10) étudiées sont notées dans le **tableau n°3**.

**Tableau n°03** : propriétés chimique et physique de sebkha

| des échantillons | salinité | température | pH   |
|------------------|----------|-------------|------|
| (S1-10)          | Nd       | 52°C        | 7,74 |

Nd : non déterminé.

### Partie I

Chott El Jerid est un lac hypersalin situé au sud de Tunisie. La diversité de l'activité hydrolytique production de microorganismes archéologiques et bactériens isolés de ce l'écosystème.

Un mélange d'eaux salées saturées et de sédiments de cet échantillon a été utilisé pour inoculer différentes cultures d'enrichissement à diverses sources de carbone afin d'étudier l'effet des sources de carbone sur la composition des communautés bactériennes et archéennes.

Quatre conditions de cultures d'enrichissement différentes ont été effectuées; (1) extrait de levure (E); (2) tryptone (T); (3) extrait de levure + tryptone + glucose (E + T + G); et (4) extrait de levure + tryptone (E + T). Un total de 68 isolats extrêmement halophiles, cultivés à 25% de sel, ont été obtenus à partir des quatre tests de cultures d'enrichissement. 36, 22, 3 et 7 isolats ont été obtenus à partir des tests d'enrichissement T, E, G + T + E et T + E, respectivement (**Tableaux n° 4, 5**).

### III.I.1.Sélection d'isolats halophiles par ARDRA

L'ADN génomique a été extrait de toutes les souches, et le 16S Le gène de l'ARNr a été amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour les bactéries et les archées comme décrit ci-dessus. Il a été confirmé que 21 et 47 isolats étaient des bactéries et des archées, respectivement. Une représentation des modèles ARDRA après digestion complète avec HaeIII, AluI, MobI et BstUI, enzymes de restriction du gène de l'ARNr 16S de 68 isolats a été comparée. Les dendrogrammes ont montré les relations entre les profils ARDRA de chaque culture d'enrichissement. L'analyse de clustering des profils ARDRA archaeal a indiqué trois, sept et un groupe de grappes de tryptone, extrait de levure et tryptone + extrait de levure + glucose respectivement.

Cependant, les profils ARDRA bactériens ont présenté un cluster de chaque type de cultures d'enrichissement. Sur les 47 clones d'archéologie analysés, 11 profils ARDRA différents ont été identifiés. Cependant, la digestion de 21 séquences bactériennes n'a donné lieu qu'à quatre modèles différents (**Tableau n° 5, page 36**).

### III.I.2.Caractérisation morphologique des halophiles isolats de Chott El Jerid

Sur la base des résultats des profils de digestion enzymatique obtenu et pigmentation de couleur coloniale, 35 isolats ont été sélectionné pour déterminer avec précision la caractérisation morphologique. En fait, les morphologies de tous les isolats étaient pléomorphes, bâtonnets courts ou longs. Les dimensions approximatives des cellules étaient de  $0,1 \times 4-7 \mu\text{m}$  (**Tableau n°4**). De plus, la plupart d'entre eux étaient non mobile. Pigmentation coloniale de tous les isolats archéologiques Allait du rouge sang au rose pâle. Cependant, toutes les bactéries les colonies étaient de couleur jaune. Aucune croissance n'a été observée à NaCl concentrations inférieures à 15% (p / v) pour tous les isolats (**Tableau n°4**). Ces résultats suggèrent que tous les isolats doivent être considérés comme extrêmement halophiles selon la définition de (*Ventosa et al., 1998*).

### III.I.3.Screening et caractérisation préliminaire des enzymes halophiles

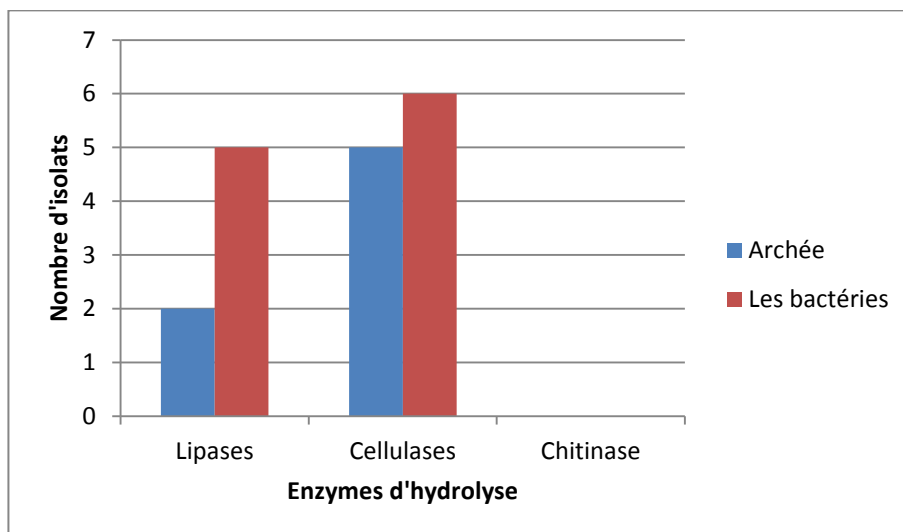
Identifier et caractériser les capacités enzymatiques de les souches isolées sélectionnées (35 isolats), certains tests biochimiques ont été réalisés (**Tableau n°4**). Les isolats bactériens et archéens ont été testés qualitativement pour leur capacité à produire 3 hydrolases extracellulaires différentes (**Figure n°7a**). Selon la taille des halos révélés dans le test de plaque spécifique, isolats halophiles capables de produire de la lipase, de la cellulase, (**Figure n°7a**). Aucun n'a pu produire une activité chitinase.

➤ **Dans le domaine Archaea**

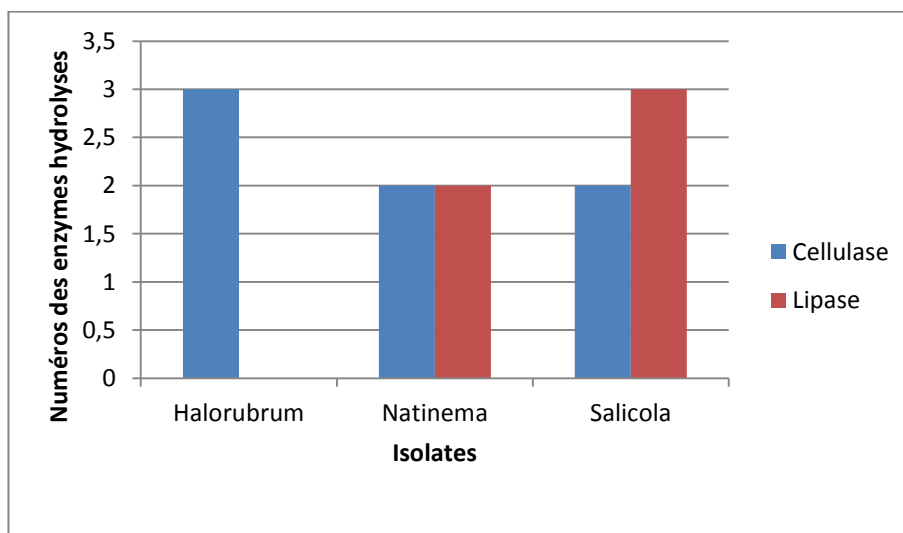
Il a été indiqué que les souches archéennes produisaient deux types d'enzymes comprenant la cellulase et la lipase (**Figure n°7a**).

➤ **Dans le domaine Bactéries**

Nos recherches ont montré deux activités enzymatiques comprenant la lipase, la cellulase (**Figure n°7a**).



**Figure n°7a:** Production d'enzymes hydrolytiques par des isolats halo-archaïens et bactériens.



**Figure n°7b :** Activités hydrolytiques parmi les représentants des genres Halorubrum, Natrinema et Salicola.

#### III.I.4. Analyse phylogénétique

Sur la base de la caractérisation morphologique, des profils de digestion enzymatique obtenus et des tests d'activité enzymatique, 26 bactéries et archées représentatives ont été choisies pour des études taxonomiques et phylogénétiques. La position phylogénétique des souches archéales et bactériennes a été déterminée sur la base du séquençage du gène de l'ARNr 16S. Les arbres illustrant la relation phylogénétique des parents du placard ont été représentés sur les (**Figure n°8 et 9**).

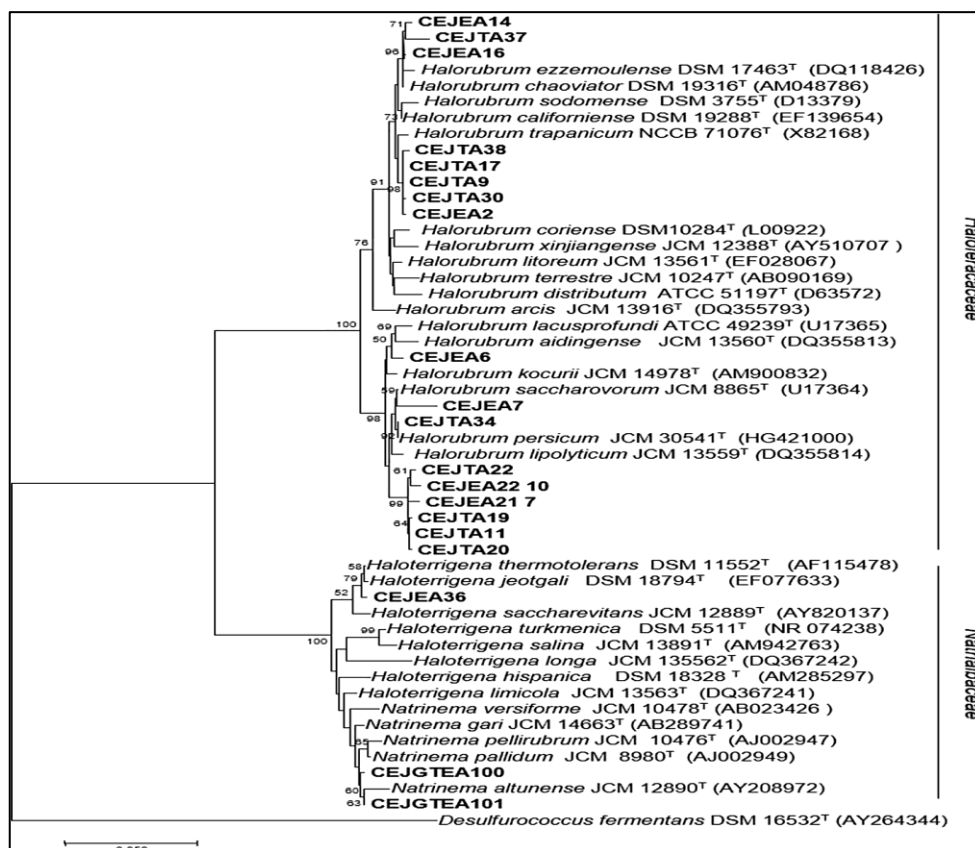
- **Archéens**

Les isolats archéens appartenaient au phylum euryacaryota des genres suivants: Halorubrum, Natrinema et Haloterrigena. Cette étude a présenté Halorubrum comme le genre prédominant parmi les isolats présentant des similitudes considérablement élevées (> 99%) (**Tableau n°4, page 34**). Les isolats d'archaea sont présentés par 4 espèces différentes du genre Halorubrum, une espèce du genre Natrinema et une espèce du genre Haloterrigena. 3 groupes différents sont identifiés dans notre étude. Ces groupes ont montré une forte similitude (98–99%) avec Halorubrum chaoviator, Halorubrum lipolyticum, Halorubrum saccharovorum et Halorubrum terrestre.

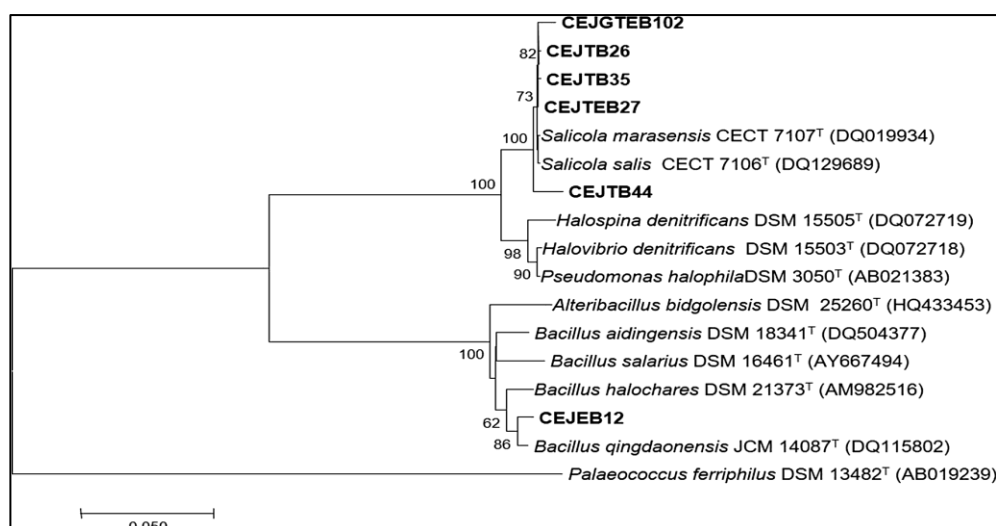
Deux isolats, CEJGTEA100 et CEJGTEA101, présents 99% de similitude avec Natrinema altunense, archéon extrêmement halophile isolé d'un Chott El Jerid dans la montagne Altun au Xinjiang, Chine (**Xu et al., 2005**). Le CEJEA36 était lié à Haloterrigena jeotgali isolé à partir d'aliments traditionnels fermentés au sel de Corée (**Roh et al., 2009**).

- **Bactéries**

Les isolats de bactéries ont été identifiés comme membres de la Classe gammaprotéobactéries et bacilles des suivants genres Salicola et Bacillus, respectivement avec la dominance du genre Salicola (**Figure n°9; Tableau n°4**). L'isolat CEJB12 était lié à Bacillus qingdaonensis, une bactérie modérément haloalcaliphile isolée à partir d'un échantillon de sel marin brut collecté près de Qingdao dans l'est de la Chine (**Wang et al., 2007**). Ce résultat a montré la présence de bactéries haloalcaliphiles dans la Chott El Jerid qui, conformément aux études d'El Hidri et al. (**El Hidri et al., 2013**), salines solaires au Pérou (**Maturrano L et al., 2006**) et d'Ezzemoul sabkha en Algérie (**Kharroub et al., 2006**), respectivement.



**Figure n°8:** Arbre phylogénétique basé sur les similitudes des séquences d'ARNr 16S d'isolats archéologiques et ses proches. L'arbre est basé sur le modèle Juke-Cantor et la méthode Neighbor-Joining. La séquence de *Desulfurococcus fermentans* a été utilisée comme groupe externe. Les valeurs Bootstrap basées sur 100 répliques sont affichées.



**Figure n°9:** Arbre phylogénétique basé sur les similitudes des séquences d'ARNr 16S d'isolats bactériens et de ses parents. L'arborescence est basée sur le modèle JukeCantor et la méthode Neighbor-Joining. La séquence de *Palaeococcus ferriphilus* a été utilisée comme exogroupe. Les valeurs Bootstrap basées sur 100 répliques sont affichées.

### III.1.5. Cinétique de croissance et productions d'enzymes par CEJGTEA101

A partir de 23 souches positives obtenues à partir de la méthode de criblage primaire pour la mesure des productions d'enzymes basée sur les zones d'hydrolyse sur des dosages sur plaque de gélose, isolat d'archéologie (CEJGTEA101) ont été sélectionnés pour les productions d'enzymes en milieu liquide. *Natrinema altunense* (CEJGTEA101) a été sélectionné pour ses activités cellulase et lipase.

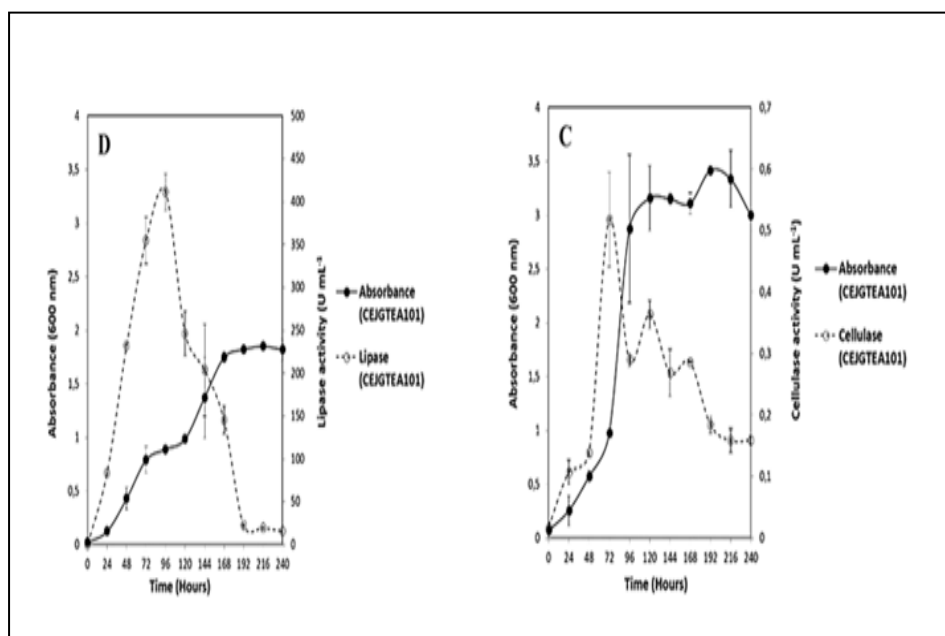
#### - Activités cellulase.

Les observations de la courbe de croissance et la mesure des résultats de production d'enzymes sont données sur la **figure n°10**.

L'activité cellulase maximale (0,5 U ml<sup>-1</sup>) a été produite par l'isolat CEJGTEA101 conformément à la croissance.

#### - Activités lipase

Cet isolat CEJGTEA101 était évidemment un producteur de lipase avec une activité de 432 U ml<sup>-1</sup> après 96 h d'incubation.



**Figure n°10 :** Activités des enzymes hydrolytiques pendant la croissance des isolats archéologiques. La croissance cellulaire a été déterminée à DO600 nm. Activités cellulase (c) et lipase (d) de l'isolat CEJGTEA101.

Tableau n°4: Caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques des isolats sélectionnés

| Domaine       | Enrichissement culture                | Souches | Pigmentation | Morphologie cellulaire | Taille de cellule; largeur et longueur (µm) | Mobilité | 0 g l <sup>-1</sup> | 150 g l <sup>-1</sup> | Phylogénétique le plus proche relative/adhésion nombre/similarité% |
|---------------|---------------------------------------|---------|--------------|------------------------|---------------------------------------------|----------|---------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Les bactéries | Tryptone                              | I24     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.2×2–6                                     | +        | -                   | +                     |                                                                    |
|               |                                       | I26     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.2×2–6                                     | +        | -                   | +                     | <i>Salicola salis</i> LMG23122/(DQ129689)/99                       |
|               |                                       | I35     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.2×2–6                                     | +        | -                   | +                     | <i>Salicola marasensis</i> CECT7107/(DQ019934)/99                  |
|               |                                       | I44     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.2×2–6                                     | +        | -                   | +                     | <i>Salicola marasensis</i> CECT7107/(DQ019934)/98                  |
|               | Extrait de levure                     | I12     | Crème jaune  | Tige courte            | 0.4× 4                                      | +        | -                   | +                     | <i>acillus qingdaonensis</i> JCM14087/(AB571874)/98                |
|               | Tryptone + extrait de levure          | I26     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.1× 2–5                                    | +        | -                   | +                     |                                                                    |
|               |                                       | I27     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.1 ×2–5                                    | +        | -                   | +                     | <i>Salicola salis</i> LMG23122/(DQ129689)/99                       |
|               |                                       | I29     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.1× 2–5                                    | +        | -                   | +                     |                                                                    |
|               |                                       | I40     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.1× 2–5                                    | +        | -                   | +                     |                                                                    |
|               |                                       | I42     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.1× 2–5                                    | +        | -                   | +                     |                                                                    |
|               |                                       | I43     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.1× 2–5                                    | +        | -                   | +                     |                                                                    |
|               |                                       | I44     | Crème jaune  | Longue tige            | 0.1× 2–5                                    | +        | -                   | +                     |                                                                    |
|               | Tryptone+ extrait de levure + Glucose | I102    | Crème jaune  | Longue tige            | 0.2×2–6                                     | +        | -                   | +                     | <i>Salicola marasensis</i> CECT 7107/(DQ019934)/97                 |

Tableau n°4 (suite)

| Domaine | Enrichissement culture | Souches | Pigmentation | Morphologie cellulaire | Taille de cellule; largeur et longueur (µm) | Mobilité | 0 g l <sup>-1</sup> | 150 g l <sup>-1</sup> | Phylogénétique le plus proche relative/adhésion nombre/similarité% |
|---------|------------------------|---------|--------------|------------------------|---------------------------------------------|----------|---------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Archée  | Tryptone               | I9      | rouge        | Longue tige            | 0.2× 2–5                                    | -        | -                   | +                     | <i>Halorubrum terrestre</i> JCM 10247/(AB090169)/99                |
|         |                        | I11     | Orange       | Longue tige            | 0.1× 4–7                                    | -        | -                   | +                     | <i>Halorubrum saccharovororum</i> JCM 8865 (U17364)/99             |
|         |                        | I17     | rouge        | Longue tige            | 0.2× 2–5                                    | -        | -                   | +                     | <i>Halorubrum terrestre</i> JCM 10247/(AB090169)/99                |
|         |                        | I19     | Orange       | Longue tige            | 0.1× 4–7                                    | +        | -                   | +                     | <i>Halorubrum saccharovororum</i> JCM 8865 (U17364)/99             |
|         |                        | I20     | Orange       | Longue tige            | 0.1× 4–7                                    | +        | -                   | +                     | <i>Halorubrum saccharovororum</i> JCM 8865 (U17364)/99             |
|         |                        | I22     | Orange       | Longue tige            | 0.1× 4–7                                    | -        | -                   | +                     | <i>Halorubrum terrestre</i> JCM 10247/(AB090169)/99                |
|         |                        | I30     | rouge        | Longue tige            | 0.2× 2–5                                    | -        | -                   | +                     | <i>Halorubrum terrestre</i> JCM 10247/(AB090169)/99                |
|         |                        | I34     | rouge        | Tige courte            | 0.1× 2–4                                    | +        |                     | +                     | <i>Halorubrum saccharovororum</i> JCM 8865 (U17364)/99             |
|         |                        | I37     | rouge        | Longue tige            | 0.2× 2–5                                    | -        | -                   | +                     | <i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316 (AM048786)/99               |
|         |                        | I38     | rouge        | Longue tige            | 0.2× 2–5                                    | -        | -                   | +                     | <i>Halorubrum terrestre</i> JCM 10247/(AB090169)/99                |
|         | Extrait de levure      | I2      | rouge        | Longue tige            | 0.1×2–5                                     | +        | -                   | +                     | <i>Halorubrum terrestre</i> JCM 10247/(AB090169)/99                |

Tableau n°5: Résumé du nombre d'isolats sélectionnés

| Domaine       | Culture d'enrichissement                                                             | Tryptone (T) | Extrait de levure (E) | Tryptone + extrait de levure (T + E) | Tryptone+ Extrait de levure + Glucose (T+ E + G) | Totale |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|--------|
| Les bactéries | Nombre d'isolats                                                                     | 12           | 1                     | 7                                    | 1                                                | 21     |
|               | Isolats sélectionnés pour la caractérisation phénotypique et l'activité hydrolytique | 4            | 1                     | 7                                    | 1                                                | 13     |
|               | Numéros des profils ARDRA                                                            | 1            | 1                     | 1                                    | 1                                                | 4      |
|               | Isolats sélectionnés pour le séquençage                                              | 3            | 1                     | 1                                    | 1                                                | 6      |
| Archée        | Nombre d'isolats                                                                     | 24           | 21                    | -                                    | 2                                                | 47     |
|               | Isolats sélectionnés pour la caractérisation phénotypique et l'activité hydrolytique | 10           | 10                    | -                                    | 2                                                | 22     |
|               | Numéros des profils ARDRA                                                            | 3            | 7                     | -                                    | 1                                                | 11     |
|               | Nombre d'isolats pour le séquençage                                                  | 10           | 8                     | -                                    | 2                                                | 20     |

## Partie II

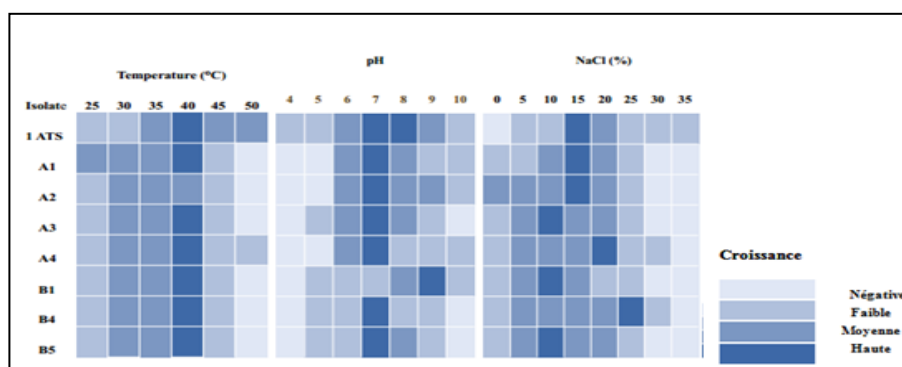
Chott Tinsilt (Biskra) et de Sebkha El Malah(Medea) sont des lacs hypersalin situé au le nord-est du Sahara algérien. La diversité de l'activité hydrolytique production de microorganismes archéologiques et bactériens isolés de ce l'écosystème.

### III.II.1. Isolement et caractérisation phylogénétique du Isolats halophiles

Ces dernières années, les procaryotes halophiles ont été largement explorés et ont été trouvés dans un large éventail d'environnements salins. Pour leur biotechnologie applications, bactéries halophiles extrêmes et modérées ont reçu une grande attention (*Edbeib et al., 2016; Margesin et Schinner 2001; Oren, 2002 c*). cependant, les méthodes basées sur la culture restent une approche essentielle obtenir de nouveaux microbes qui offrent l'application de nouveaux potentiels et une compréhension de leur écophysiologie et les fonctions environnementales (*Menasria et al., 2018*). Tout au long de ce travail, nous avons caractérisé sept halophiles modérés et un isolat halophile extrême. Les isolats ont été nommés (ATS1, A1, A2, A3, A4, B1, B4 et B5). La couleur des colonies allait du rose pâle au rouge-orange. Les cellules étaient à Gram négatif bâtonnets ou coccus polymorphes et courts. Tous les Gram colorés négatifs et positifs à la catalase et à l'oxydase.

Tous les isolats étaient halophiles, avaient un sel concentration pour la croissance d'au moins 5% (p / v) de NaCl et peut tolérer une concentration de sel jusqu'à 20-25% (p / v) NaCl. Les isolats ont le mieux poussé entre 30 et 45 ° C et pH de 6 à 8, à l'exception de certains isolats ont montré une croissance à 50 ° C et pH jusqu'à 9. Dans l'ensemble, les isolats montrant une large gamme de températures de croissance de 25 ° C à 50 ° C (**Figure n°11**).

Séquençage des gènes ARNr 16S et phylogénétique l'analyse des 8 souches sélectionnées a permis de identification de 6 genres: Haloferax, Halomonas, Staphylococcus, Salinivibrio, Halobacillus et Planococcus (**Tableau n°6**). Les isolats révélés degré élevé de similitude, avec le plus proche décrit espèces en termes de colonie, de morphologies cellulaires et caractéristiques physiologiques.



**Figure n°11** : Diagrammes de carte thermique des caractéristiques physiologiques des isolats halophiles.

**Tableau n°6:** Affiliation phylogénétique des souches bactériennes et archéennes étudiées

| Isole | Genre        | Espèces apparentées       | Similarité% | Numéro d'accès |
|-------|--------------|---------------------------|-------------|----------------|
| A1    | Halomonas    | Halomonas venusta         | 96          | AY553074       |
|       |              | Halomonas janggokensis    | 96          | NR_04248       |
|       |              | Halomonas variabilis      | 96          | AM945682       |
|       |              | Halomonas subterranean    | 96          | NR_04411       |
| A2    | Halomonas    | Halomonas venusta         | 97          | AY553074       |
|       |              | Halomonas variabilis      | 97          | AY505527       |
|       |              | Halomonas janggokensis    | 97          | KM488473       |
| A3    | Staphylococc | Staphylococc arlettae     | 95          | JX188021       |
| A4    | Halomonas    | Halomonas aquamarina      | 97          | EU624431       |
|       |              | Halomonas venusta         | 96          | KF933652       |
| B1    | Salinivbrio  | Salinivbrio costicola     | 96          | X95531         |
|       |              | Salinivbrio proteolyticus | 94          | JX501730       |
| B3    | Halobacillus | Halobacillus karajensis   | 99          | HG931925       |
|       |              | Halobacillus dabanensis   | 99          | HG931924       |
|       |              | Halobacillus trueperi     | 99          | HG931926       |
| B4    | Planococcus  | Planococcus rifietoensis  | 96          | HE573181       |
|       |              | Planococcus citreus       | 96          | NR_11381       |
| B5    | Halobacillus | Halobacillus karajensis   | 98          | HG931925       |
|       |              | Halobacillus dabanensis   | 98          | HG931924       |
|       |              | Halobacillus trueperi     | 98          | HG931926       |
| ATS1  | Haloferax    | Haloferax mediterranei    | 98          | MF353936       |

### III.II.2.Screening des enzymes hydrolytiques halophiles actives

La production enzymatique de microorganismes halophiles est peu exploitée commercialement. L'un des avantages de ces enzymes est sa capacité à catalyser des réactions dans des conditions extrêmes, principalement à des concentrations de sel élevées,

mais aussi à des valeurs de pH et des températures élevées ou basses (*Enache et Kamekura 2010; Mesbah et Wiegel, 2012*).

Ces propriétés leur permettent d'être utilisées dans des procédés industriels utilisant des conditions physico-chimiques rigoureuses (*Setati, 2009; Oren, 2010*). Ces enzymes sont appelées halozymes, des enzymes qui présentent une activité catalytique tolérante ou dépendant du sel (*Gupta et al., 2016*).

Tous les huit isolats ont été testés pour l'extracellulaire activité de production d'hydrolase par dosage sur plaque Carboxyméthylcellulose (CMC), huile d'olive, chitine colloïdale plaques d'agar pour Cellulose (CMC), Lipase (Lip), Chitinase (Chit) respectivement.

Screening des enzymes halophiles extracellulaires ont montré que la majorité des isolats produisaient Lipases.

Screening des enzymes halophiles extracellulaires ont montré que des isolats (A1, A2, A4, B4, B5) produisaient cellulases faibles et des isolats (A3, B1) pas produisaient cellulases et isolate (ATS1) produit cellulase Moyenne.

Screening des enzymes halophiles extracellulaires ont montré que des isolats (A1,A2, A4,B1,B5) produisaient Chitinase faibles et des isolats(ATS1,A3,B4) pas produisaient Chitinase (**Tableau n°7**).

**Tableau n°7:** les activités enzymatiques des isolats halophiles

| Production d'enzymes / Isolate | CMC              | Chit            | Lip             |
|--------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| I                              | Activité moyenne | Aucune activité | Activité élevée |
| I 1                            | Activité faible  | Activité faible | Activité élevée |
| I 2                            | Activité faible  | Activité faible | Activité élevée |
| I 3                            | Aucune activité  | Aucune activité | Activité élevée |
| I 4                            | Activité faible  | Activité faible | Activité élevée |
| I'1                            | Aucune activité  | Activité faible | Activité élevée |
| I'3                            | Activité faible  | Aucune activité | Activité élevée |
| I'4                            | Activité faible  | Activité faible | Activité élevée |

# **CHAPITRE IV**

## **DISCUSSION**

## Chapitre IV : Discussion

Vu la pandémie du COVID-19, nous n'avons pas pu réaliser des travaux pratiques sur des échantillons d'eau salés (en Algérie) pour l'étude de la biodiversité microbienne ainsi que l'évaluation de l'efficacité des enzymes exprimés par ces microorganismes. Ce chapitre concernera donc la discussion des résultats rapportés dans la littérature par des auteurs qui travaillent sur ce domaine d'étude.

Chott El Jerid est un lac hypersalin situé au sud de Tunisie. La diversité de l'activité hydrolytique production de microorganismes archéologiques et bactériens isolés de ce l'écosystème. La combinaison de trois substrats différents dans des cultures d'enrichissement a conduit à l'isolement de 68 micro-organismes extrêmement halophiles de Chott El Jerid. Les isolats 21 et 47 sont identifiés comme des bactéries et des archées avec l'amplification par PCR et des amorces spécifiques, respectivement. Sur la base des résultats de l'ARDRA, 35 isolats ont été choisis pour déterminer leurs caractéristiques morphologiques et leurs activités hydrolytiques. La capacité à produire hydrolases différentes a été testée parmi les isolats. Un total d'isolats halophiles était capable de produire de la lipase, de la cellulase. Aucune activité chitinase n'a été détectée parmi les 35 isolats. Ont montré les activités hydrolytiques des bactéries halophiles et des isolats d'archées.

Activités hydrolytiques comprenant la cellulase et la lipase ont été observées chez archées extrêmement halophiles. Dans des études similaires, Makhdoumi Kakhki et al. Ont montré l'abondance de trois enzymes hydrolytiques, y compris la lipase la cellulase, la chitinase par des isolats archés du lac Aran-Bidgol Hypersaline en Iran (*Makhdoumi Kakhki et al., 2011*). Birbir et coll. déterminé la lipase, la cellulase, parmi les souches halophiles archéennes isolées de la mine de sel de Tuzkoy en Turquie (*Birbir et al., 2004*). Ces résultats soutiennent des études antérieures sur d'autres habitats hypersalins, à l'exception d'une activité hydrolytique, notamment la chitinase, qui n'a pas été détectées par des isolats d'archéologie.

Les bactéries halophiles ont montré un potentiel de production plus élevé lipase, cellulase. Ces données sont en accord avec d'autres résultats précédemment rapportés. Rohban et al. A élucidé la production d'enzymes hydrolytiques par des souches modérées et extrêmement bactériennes isolées de différentes régions de Howz Soltan playa (Iran). Ils ont montré la sécrétion de lipase, cellulase, (*Rohban et al., 2009*). De plus, Sánchez-Porro et al. Ont étudié la diversité des bactéries modérément halophiles, producteur de lipase à partir de salines situées à Almeria, Cadix et Huelva (Espagne) (*Sánchez-Porro et al., 2003*). Cojoc

et al. Ont montré la capacité d'isolats bactériens recueillis à partir d'un cristal de sel gemme souterrain (Roumanie) à hydrolyser carboxyméthylcellulose (*Cojoc et al., 2009*).

De Lourdes Moreno et al. A montré l'abondance hydrolase la lipase, produite par des halophiles extrêmes dans des étangs de cristallisation de deux salines solaires dans le sud de l'Espagne (*De Lourdes Moreno et al., 2009*). Les bactéries modérément halophiles, isolées de la plus grande playa hypersaline Aran-Bidgol en Iran, ont pu produire une grande variété d'enzymes, notamment la la lipase, la chitinase, la cellulase (*Babavalian et al., 2013*). Issu du même écosystème, Chott El Jerid, extrêmement les bactéries haloalkalitolérantes ont été isolées et identifiées comme Halobacillus, Halomonas, Piscibacillus, Nesterenkonia, producteur de lipase, (*El Hidri et al., 2013*). Selon les études mentionnées ci-dessus, les activités lipolytique étaient des isolats prédominants parmi les isolats. Cependant, nos isolats ont montré un taux élevé d'Activités cellulase, lipase. Les producteurs de chitinase n'ont pas été détectés parmi nos isolats bactériens.

Enfin, parmi 35 isolats, 26 ont été génétiquement identifiés et analysés phylogénétiquement. Selon 16S analyse génique de l'ARNr, l'archaée extrêmement halophile les isolats appartenait aux genres Natrinema, Halorubrum, Haloterrigena et isolats bactériens de Salicola et Bacillus. Halorubrum, Natrinema et Haloterrigena ont été caractérisés comme des archéons extrêmement halophiles. Le genre Halorubrum est largement répandu dans les environnements hypersalins (*Makhdoumi Kakhki et al., 2011*). 17 isolats étaient affiliés à Halorubrum spp. (**Tableau n°4**). Ces isolats présentent hydrolytique activité les enzymes cellulase (**Figure n°10b**). (*Makhdoumi Kakhki et al., 2011*) ont montré que le genre Halorubrum présentait le taux élevé de production de lipase.

Une activité chitinase, lipase ont été observée dans le genre Natrinema (*Makhdoumi Kakhki et al., 2011*). Le genre Natrinema présente une activité lipase élevée (*Makhdoumi Kakhki et al., 2011*). Dans le présent travail, l'isolat CEJGTEA101, affilié à Natrinema altunense, a montré activités hydrolytiques comprenant la lipase, la cellulase. Cette souche était capable de produire de la lipase ( $432 \text{ U ml}^{-1}$ ), de la cellulase ( $0,5 \text{ U ml}^{-1}$ ) sous haute salinité (25% NaCl). La caractérisation la cellulase a été étudiée à partir d'archéon extrêmement haloalcaliphile Natrinema sp ssbjup-1, isolé du lac Lonar (*Patil et al., 2014*).

Il a été rapporté précédemment que l'activité lipolytique était criblée dans 35 haloarchaea de la collection de cultures Algériennes et le meilleur producteur de souche TC6 était apparenté à Natronococcus (*Bhatnagar et al., 2005*). Les activités lipases extracellulaires

sont assez fréquentes parmi les archées halophiles ( $0,053\text{--}0,571\text{ U ml}^{-1}$ ) (*Ozcan et al., 2012 ; Ozcan et al., 2009*) y compris le genre *Natrinema* ( $0,062\text{ U ml}^{-1}$ ) (*Ozcan et al., 2012*). Une activité lipase a été rapportée chez *Natronococcus* sp. (*Boutaiba et al., 2006*), *Haloarcula marismortui* (*Camacho et al., 2009*) et *Haloarcula* sp. G41 (*Li X et al., 2014*). *Haloarcula marismortui* synthétise les lipases par voie intracellulaire ( $490\text{ U ml}^{-1}$ ) et extracellulaire ( $260\text{ U ml}^{-1}$ ) (*Camacho et al., 2009*).

L'isolat CEJEA36 lié au genre *Haloterrigena* n'est capable de produire qualitativement aucune activité hydrolytique.

D'autre part, les isolats bactériens CEJTB26, CEJTB35, CEJTB44, CEJTEB27 et CEJGTEB102, liés à la genre *Salicola*, étaient capables de produire des activités lipase, cellulase à l'exception de CEJTB26. Il a été rapporté que les espèces de ce genre prospèrent abondamment et rivalisent avec les membres d'archaea dans les étangs de cristallisation de différentes salines solaires (*Maturrano et al., 2006*). Il est important de noter que cette bactérie *Salicola marasensis* IC10 a produit une lipase intracellulaire (LipL) qui ont montré des propriétés intéressantes pour une utilisation dans différentes industries (*De Lourdes Moreno et al., 2009 ; De Lourdes Moreno et al., 2013*). L'isolat CEJEB12, attribué au genre *Bacillus*, n'a montré aucune activité hydrolytique. Cependant, la bactérie halophile modérée isolée de divers (*Babavalian et al., (2013 ; De Lourdes Moreno et al., 2013)*). De Guzmán et al. (*De Guzmán et al., 2008*) ont démontré la production de lipase extracellulaire par la souche LV01 liée au genre *Bacillus* avec  $0,079\text{ U ml}^{-1}$ .

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVE**

### **Conclusion et perspective**

Les procaryotes montrent une extraordinaire capacité d'adaptation aux conditions physicochimiques drastiques régnant dans certains environnements dits "extrêmes" tant en termes de température, de salinité, de pH que de pression hydrostatique. Dans de tels écosystèmes, on retrouve des chimio-lithotrophes, mais également des chimio-hétérotrophes pouvant croître en présence ou en absence d'oxygène et appartenant aux trois domaines du vivant (Bacteria, Archaea, Eucarya) selon les cas. Les enzymes de ces micro-organismes trouvent, d'ores et déjà, des applications en biotechnologie et l'on peut penser que cette gamme d'applications devrait s'élargir à court terme. Grâce aux approches microbiologiques et moléculaires, le biofonctionnement de niches écologiques qu'occupent ces extrémophiles est de mieux en mieux appréhendé, mais il reste encore de grandes inconnues biogéomicrobiologiques, notamment dans le domaine de la biosphère profonde où un certain nombre d'évènements métaboliques n'ont toujours pas été complètement élucidés (biodégradation anaérobie des hydrocarbures par exemple, importance de la sulfato-réduction par rapport à la ferro-réduction, la méthanogénèse ou l'homoacétogénèse etc...). Cependant, c'est très certainement en continuant d'étudier ces micro-organismes aussi particuliers que nous pourrions améliorer les conditions de vie sur notre planète en passant à une chimie "verte" plus en adéquation avec notre environnement, mais également apporter des réponses à la possible existence de vie sur d'autres planètes ?

En conclusion, la diversité de la production d'activité hydrolytique à partir de microorganismes archéens et bactériens isolés de Chott El Jerid a été étudiée dans cette étude. 35 isolats halophiles étaient capables de produire de la lipase, de la cellulase. Aucun n'a pu produire une activité chitinase. Des isolats archéologiques extrêmement halophiles étaient affiliés à *Natrinema*, *Halorubrum*, *Haloterrigena* et des isolats bactériens aux genres *Salicola* et *Bacillus*, dont plusieurs souches pouvaient produire des enzymes hydrolytiques. Cette étude a rapporté *Halorubrum* et *Salicola* comme genres prédominants. Les genres *Halorubrum*, *Natrinema* et *Salicola* ont montré l'activité la plus enzymatique. Une activité hydrolytique combinée a été observée dans les genres *Natrinema* et *Salicola*. D'après les résultats, il est suggéré que les genres *Natrinema* et *Salicola* sont d'excellents candidats pour la production des enzymes hydrolytiques. L'activité lipolytique produite par *Natrinema* dans des conditions de salinité élevée pourrait faire de cette souche un candidat intéressant pour de futures recherches. Ces isolats extrêmement halophiles ont été sélectionnés pour d'autres études pour leurs grandes applications biotechnologiques en ce qui concerne leur capacité à produire différentes hydrolases. Il serait plus constructif que ces enzymes soient purifiées à partir des isolats puis caractérisées, ce qui est la prochaine étape des travaux actuels.

**REFERENCE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Acharya, S., Chaudhary, A., 2012. Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India. *Afr J Microbiol Res* 6 (26), 5453-5458.
2. Aehle, W., 2007. *Enzymes in Industry: Production and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA.
3. Amélie, C., 2010. Identification et caractérisation de nouvelles enzymes lipolytiques thermostables provenant d'une banque métagénomique. Mémoire de magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. 38p.
4. Ando, S., Ishia, H., Kosugi, Y., Ishikawa, K., 2002. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and environmental Microbiology* 68(1), 430-433.
5. Anitori, R.P (ed). 2012. *Extremophiles: microbiology and biotechnology*. Caister Academic Press, Norfolk. ISBN: 978-1-904455-98-1.
6. Anobom, C.D., Pinheiro, A.S., De-Andrade, R.A., Aguiéiras, E.C., Andrade, G.C., Moura, M.V., Almeida, R.V., Freire DM., 2014. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *Biomed Res Int* 2014:1-11.
7. Antranikian, G., 2009. Extremophiles and biotechnology in: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; P: 1-5.
8. Babavalian, H., Amoozegar, M.A., Pourbabae, A.A et al., 2013. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology* 82,466-474.
9. Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., 2006. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Canadian journal of microbiology* 52, 373-382.
10. Baker-Austin, C., Dopson, M., 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology* 15,165-171.
11. Barnett, C.C., Berka, R.M., Fowler T., 1991. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology* 9, 562-567.
12. Batista-García, R.A., Sutton, T., Jackson, S.A., Tovar-Herrera, O.E., Balcázar-López, E., del Rayo Sanchez-Carbente, M., Sánchez-Reyes, A., Dobson, A.D., Folch-Mallol, J.L., 2017. Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. *PLoS ONE* 12, e0173750.
13. Ben Abdallah M., Karray F., Mhiri N et al., 2016. Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid. *Extremophiles* 20,125-138.

14. Béguin, P., 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44 , 219-248.
15. Bèguin, P., Aubert, J. P., 1994. The biological degradation of cellulose, *fems, microbiol. Rev* 13, 25-58.
16. Bekhouche, F., 1991. Recherche de champignons cellulolytiques du sol des zone arides du Sahara algérien. Etude comparée des cellulases de *Lasiobolidium Orbiculoides* et *Aspergillus Terreus*. Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies Agro-alimentaire. Costantine.
17. Beldman, G., Searle-Van Leewen, M.F., Rombouts, F.M., Voorzangen, F.G.J., 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. purification, characterisation and comparaison of al detectable endoglucanases, exoglucanases and  $\beta$ -glucosidases. *Eur. J. Biochem* 146, 301-308.
18. Bhatnagar, T., Boutaiba, S., Hacene H et al., 2005. Lipolytic activity from Halobacteria: screening and hydrolase production. *FEMS microbiol Lett* 248,133-140.
19. Bhat, M. K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv* 18, 355-383.
20. Bhushan, B., Hoondal, G.S., 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnol Lett* 20,157-159.
21. Birbir, M., Ogan, A., Calli, B., Mertoglu, B., 2004. Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World J microbiol biotechnol* 20,613-621.
22. Birsan, C., Johnson, P., Joshi, M., Macleod ,A., Mcintosh ,L., Monem ,V., Nitz ,M., Rose, D.R., Tull ,D., Wakarchuck ,W. W., Wang, Q., Warren ,R. A. J., White ,A., and Withers S.G., 1998. Mechanisms of cellulases and xylanases. *biochem. Soc. Trans* 26,156-160.
23. Blume ,J.E., Ennis, H.L., 1991. A dictistelium dicoideum cellulose is a member of a spore germination-specefic gene family. *J. Biol. Chem.* 266 (23), 15432-15437.
24. Bok, J.D., Yrnool, D.A., Eveleigh, D.E., 1998. Purification, characterisation and molecular analysis of thermostable cellulases Cel A and Cel B from *Termotoga neapolitana*. *Applied and environmental microbiology*: 64 (12),4774-4781.
25. Bond, K., and Stutzenberger, F., 1989. A note on the localization of cellulosome formation in *thermomonospora curvata*. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 605-609.
26. Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H et al., 2006. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *J Mol Catal B* 41, 21-26.

27. Brameld, K.A., Goddard, W.A III., (1998b). The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120, 4276-4281.
28. Brissou, J., 1971. *Technique d'enzymologie bactérienne*. Edition Masson et CIE, Paris. P : 94.
29. Camacho, R.M., Mateos, J.C., González-Reynoso, O et al., 2009. Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *J Ind microbiol biotechnol* 36, 901-909.
30. Cárdenas, J.P., Valdés, J., Quatrini, R., Duarte, F., Holmes, D.S., 2010. Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 86, 605-620.
31. Carlile, M. J., and Watkinson, S. C., 1997. The fungi, p: 269-275. Academic press, New York, N.Y.
32. Catherine, M., 2009. Isolement et caractérisation d'enzymes lipolytiques par criblage d'une banque métagénomique. Mémoire de magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. 27p.
33. Cayol, J.L., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Prensier, G., Guezennec, J., Gracia, J.L., 1994. Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov, sp. nov, a halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 44, 534-540.
34. Chen, C.M., Gritzali, M., Stafford, D.W., 1987. Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Bio/technology* 5, 274-278.
35. Chen, W., Chen, C., Jiang, S., 2013. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *J Mar Sci technol* 21, 361-366.
36. Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F et al., 2011. Strategy for improving extracellular lipolytic activities by a novel thermotolerant *Staphylococcus* sp. strain. *Lipids Health Dis* 10, 209.
37. Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G et al., 2009. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Rom biotechnol lett* 14, 4658-4664.
38. Cordonnier, R.E., Bayonone, C.L., Baumes, R.L., 1986. Données récentes sur les précurseurs d'arômes du raisin, perspectives de leurs exploitations en vinification. *Rev. Fr. Oenol.* 102, 29-41.
39. Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S., 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl microbiol biotechnol* 71, 773-782.
40. Daiha, K.G., Angeli, R., Oliveira, S.D., Almeida, R.V., 2015. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. *PLoS One* 10, e0131624.

41. Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. structure. 3, 853-859.
42. Das Sarma, P., Coker, J.A., Huse, V., Dassarma, S., 2010. Halophiles, industrial applications. Encyclo Ind biotechnol: Bioprocess, Bioseparation, and cell technology 1-43. detectable endoglucanases, exoglucanases and  $\alpha$ -glucosidases. Eur J biochem 146, 301-308.
42. De Guzmán, M.N., Vargas, V., Antezana, H., Svoboda, M., 2008. Lipolytic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganisms isolated from Laguna Verde, Bolivia. Rev Boliv Quim 25,14-23.
43. De Lourdes Moreno, M., García, M.T., Ventosa, A., Mellado, E., 2009. Characterization of Salicola sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile. FEMS microbiol Ecol 68, 59-71.
44. De Lourdes Moreno, M., Pérez ,D., García, M.T, Mellado, E., 2013. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. Life 3, 38-51.
45. Din, N., Jilkes, N., Tekant, B., Miller, R., Warren, A., Kilburn, D., 1991. Non hydrolytic disruption of cellulose fibers by the binding of a bacterial cellulase . Bio/Technology 9, 1096-1099.
46. Din, N., Damude, H. G., Gilkes, N. R., Miller, R. C., Warren, R.A. J., and Kilburn, D. G., 1994. C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1083-11387.
47. Eastmond, P.J., 2004. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. J Biol Chem 279(44), 45540-45545.
48. Edbeib, M.F., A.W. Roswanira and F. Huyop., 2016. Halophiles: biology, adaptation and their role in decontamination of hypersaline environments. World J. Microbiol. Biotechnol., 32, 135-135.
49. Edgerton, M. E. and Brimblecome, P., 1981. Thermodynamics of halobacterial environments. Can. J. Microbiol 27, 899-909.
50. El Hidri, D., Guesmi, A., Najjari, A et al., 2013. Cultivation dependant assessment, diversity, and ecology of haloalkaliphilic bacteria in arid saline systems of southern Tunisia. Biomed Res Int 2013.
51. Enache, M. M., Kamekura, 2010. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. Romanian biotechnol. Lett 47,47-59.
52. Freedonia Group., 2015. World enzymes report.
53. Gandini, A., Pasquini, D., 2012. The impact of cellulose fibre surface modification on some physicochemical properties of the ensuing papers. Industrial Crops and Products 35, 15-21.

54. Gebler, J., Gilkers, N.R., Claeysens, M., Wilson, D.B., Beguin, P., Wakarchuk, W.W., 1992. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related  $\beta$ -1,4-glucanases and  $\beta$ -1,4-xylanases. *J. Biol. Chem.* 267. P : 12559-12561.
55. Ghassemi, F., Jakeman, A. J., Nix H. A., 1995. Salinisation of land and water resources. (Eds.). Wallingford Oxon: CAB International.
56. Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Arnaud, A., Galzy, P., 1990. Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molishiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$  glucosidases. *J. Sci. Food Agric* 50, 499-509.
57. Guo, R.F, Li, D.C, Wang, R., 2005. Purification and properties of a thermostable chitinase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Acta Microbiol Sin* 45,270-274.
58. Gupta, S.P., Sharma, K., Dev and A. Sourirajan., 2016. Halophilic bacteria of lunsu produce an array of industrially important enzymes with salt tolerant activity. *Biochem. Res. Int.*
59. Gusakov, A.V., Sinitsyn, A.P., Markov, A.V., Skomarovsky, A.A., Sinitsyna, O.A., Berlin, A.G., Ankudimova N.V., 2000. Indigo-binding domain in cellulase molecule. *Biocatalysis fundamantals and applications.*
60. Guy, J.E., Isupov, M.N., Littlechild, J.A., 2003. The structure of an alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic Archaeon *aeropyrum pernix*. *J mol biol* 331,1041-1051.
61. Hachicha, M., 2007. Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. *Sécheresse*, 18 (1), 45-50.
62. Harjunpaa, V., Teleman, A., Koivula, A., Ruohonen, L., Teeri, T.T., Teleman, O. Drakenderg, T., 1996. Cello-oligosaccharides hydrolysis by cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* - Association and rate constants derived from an analysis of progress curves. *Eur J Biochem.* 240, 584-591.
63. Hasper, A.A., Dekkers, E., Mil, M.V., Van de Vondervoort, P.j.i., De Graaff, L.H., 2002. Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus Niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4),1556-1560.
64. Hebraud, M., 1988. Production et caractérisation des hydrolases secrétées par les champignons anaérobies du rumen .Thèse de doctorat, Université Claud Bernard, Lyon1.
65. Henrissat, B., Bairoch, A., 1996. Up dating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316, 695-696.
66. Henrissat, B., 1999. Classification of chitinases modules In: Jolles P et Muzzarelli RAA, *Chitin and chitinases* Birkhauser Verlag, Basel.
67. Hjort, K., Prest, I., Elvang, A et al., 2014. Bacterial chitinase with phytopathogen control

capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics. *Appl. Microbiol Biotechnol* 98, 2819-2828.

68. Horikoshi, K., 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. *Agric. Biol. Chem.* 35,1407-1414.

69. Horikoshi, K., (1999a). Alkaliphilic: Some applications of their products for biotechnology. *Microbe and molecule biol rev* 63, 735-750.

70. Ibrahim, A.S., Al- Salamah, A.A., Elbadawin, Y.B., El-Tayeb, M.A., Ibrahim, S.S.S., 2015. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic journal of biotechnology* 18,236-243.

71. John, W. B., Michael, E. H., Linghao, Z., Michael, F. C., Mark R. N., 2005. Towards Understanding the action of cellulases: molecular dynamics simulation of *T. reesei* cellobiohydrolase I and crystalline cellulose. Department of food science.

72 Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W., Owenson, G. G., 1998. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2, 191-200.

73. Joyeaux, A., 1982. Les préparations industrielles d'enzymes. p : 22-46. In : Durant G., Monsan. (ed.), les enzymes production et utilisations industrielles. Edition GautierVillars. Paris.

74. Kader, A. J., Omar, O., Feng, L. S., 1999. Isolation of cellulolytic fungi from the barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of biodiversity and environmental Conservation.

75. Karray, F., Mezghani, M., Mhiri, N et al., 2016. Scale-down studies of membrane bioreactor degrading anionic surfactants wastewater: isolation of new anionic-surfactant degrading bacteria. *Int biodeterior biodegrad* 114, 14-23.

76. Kaur, B., Sharma, M., Soni, R., Oberoi, H.S., Chadha, B.S., 2013. Proteome-based profiling of hypercellulase – producing strains developed through interspecific protoplast fusion between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus tubingensis*. *Appl biochem biotechnol* 169,393-407.

77. Khallef, S., Lestini, R., Myllykallio, H., Houali, K., 2018. Isolation and identification of two extremely halophilic archaea from sebkhas in the Algerian Sahara. *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)* 64.

78. Kharroub, K., Aguilera, M., Quesada, T et al., 2006. *Salicola salis* sp. Nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *Int J Syst Evol microbiol* 56, 2647-2652.

79. Kiesov, A.A., 1982. Enzymatic hydrolysis of cellulose, 5. Cellulase complexes in marine

organisms from the sea of Japan. *Bioorgan. Khim* 8, 1490-1496.

80. Kleman-Leyer, K.M., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Kirk, T. K., 1994. Changes in the molecular size distribution of insoluble cellulose by the action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. *biochem J* 302, 463-469.

81. Koga, D., Sasaki, Y., Uchiumi, Y et al., 1997. Purification and characterization of *Bombyx mori* chitinases. *Insect biochem mol biol* 27,757-767.

82. Kolarova, N., Farkas, V., 1981. Sensitivity of various yeasts to crude cellulolytic enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. *Euro. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 13, 184-187.

83. Korish, M., 2003. Production, Purification, Properties and application of the cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of biology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany.

84. Kouker, G., Jaeger, K.E., 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl environ microbiol* 53,211-213.

85. Kramer, K.J., Corpuz, L.M., Choi, H., Muthukrishnan, S., 1993. Sequence of a c-DNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect biochem mol biol* 23,691-701.

86. Kubicek, C.P., 1981. Release of carboxymethyl-cellulase and  $\beta$ -glucanases from cell walls of *Trichoderma reesei*. *European J. Appl. Microbiol. Biotrechnol* 13, 226-291.

87. Kuo, C.J., Liao, Y.C., Yang, J.H et al., 2008. Cloning and characterization of an antifungal class III chitinase from suspension-cultured bamboo (*Bambusa oldhamii*) cells. *J Agric Food Chem* 56,11507-11514.

88. Kuzu, S.B., Güvenmez, H.K., Denizci, A.A., 2012. Production of a thermostable and alkaline chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HBK-51. *biotechnol Res Int* 2012:135498.

89. Lekchiri, S., Moueqqit, M., Lekchiri, A., 2006. Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.

90. Levy, I., Shani, Z., Shoseyov, O., 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1, 4- $\beta$ -glucanase and cellulose binding domains. *Biomolecular Engineering* 19, 17- 30.

91. Li, A.N., Yu, K., Liu, H.Q et al., 2010. Two novel thermostable chitinase genes from thermophilic fungi: cloning, expression and characterization. *Bioresour technol* 101,5546-5551.

92. Li, X., Yu, H.Y., 2014. Characterization of an organic solventtolerant lipase from

- Haloarcula sp. G41 and its application for biodiesel production. *Folia microbiol* 59:455–463.
93. Liang, T.W., Chen, Y.J., Yen, Y.H., Wang, S.L., 2007. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. *Process Biochem* 42(4), 527-534.
94. Linker, M., Teeri T., 1996. The cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc. Nat. Acad. Sci* 93, 12251-12255.
95. Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbial and molecular biology Reviews*. 66(3), 506-577.
96. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P., 2000. *Brock biology of microorganisms*, 9<sup>th</sup> edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
97. Makhdoumi Kakhki, A., Amoozegar, M.A., Mahmodi Khaledi, E., 2011. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *Int J Environ Sci technol* 8, 705-714.
98. Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., 1976. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Sump* 6, 21-33.
99. Marchall, J.J., 1973. Preliminary report on the digestive enzymes present in the digestive gland of *Perna viridis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 44, 981-988.
100. Margesin, R. F., Schinner, ., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, 73-83.
101. Maturrano, L., Valens-vadell, M., Rosello-Mora, R., Anton, J., 2006. *Salicola marasensis* gen. Nov., sp. Nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1685-1691.
102. Maurer, K., 1997. Developpement of new cellulases. In : Eeje, Misset O., Baas E.J., editors . *Enzymes in tetergency. Surfactant science series*. 69, 175-202.
103. Maturrano, L., Valens-vadell, M., Rosello-Mora, R., Anton, J., 2006. *Salicola marasensis* gen. Nov., sp. Nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. *Int J Syst Evol microbiol* 56, 1685-1691.
104. McCormack, J., Hackett, T.J., Tuohy, M.G, Coughlan, M.P., 1991. Chitinase production by *Talaromyces emersonii*. *Biotechnol Lett* 13, 677-682.
105. Mcgenity, T.J., Gemmell, R.T., Grant, W.D., Stan-Lotter, H., 2000. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ microbiol* 2, 243-250.
106. Menasria, T.M., Aguilera, H., Hocine, L., Benammar and A. Ayachi et al., 2018. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and

- semi-arid wetland ecosystems for halophilic active hydrolytic enzymes. *Microbiol. Res* 207, 289-298.
107. Mendonsa, E.S., Vartak, P.H., Rao, J.U., Deshpande, M.V., 1996. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. *Biotechnol Lett* 18(4),373-376.
108. Mesbah, N. M., Wiegel, J., 2012. Life under multiple extreme conditions: Diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Applied Environ. Microbiol* 78, 4047-4082.
109. Morozkina, E.V., Slutskaya, E.S., Fedorova, T.V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I., Koroleva, O.V., 2010. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied biochemistry and microbiology* 46, 1-14.
110. Nardini, M., Dijkstra, B.W., 1999.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9(6), 732-737.
111. Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P et al., 2010. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit Rev biotechnol* 30,231-241.
112. Ni, J., Tokuda, G., 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnol Adv* 31,838-850.
113. Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P., Raunio, V., 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem J* 254,877-884.
114. Odier, E., Rouau, X., 1985. Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. p:199-214. Edition Gauthier-Villard, Paris.
115. Onaga, S., Chinen, K., Ito, S., Taira, T., 2011. Highly thermostable chitinase from pineapple: cloning, expression, and enzymatic properties. *Process Biochem* 46,695-700.
116. Onori, H., Zamani, M.R., Motallbei, M., Zarghami, N., 2005. Identification of over producing strain of endo- $\beta$ -1, 4-glucanase in *Aspergillus* species: characterization of crude carboxymethyl cellulose. *African Jour. Biotechnol.* 4 (1), 26-30.
117. Ooshima, H., Burns, D.S., Converse, A.O., 1990. Adsorption of cellulase from.
118. Oren, A., 1999. Microbiology and biogeochemistry of halophilic microorganisms. In *microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. Ed, A Oren, CRC Press. Boca Raton London New York Washington, DC, pp. 1-9.
119. Oren, A., (2002a). Diversity of halophilic microorganisms: environments, physiology and applications. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* 28, 56 - 63.
120. Oren, A., (2002b). *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer, Dordrecht
121. Oren, A., (2002c). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J. industrial microbiol. Biotechnol* 28, 56-63.

119. Oren ,A., 2006. The order halobacteriales. The prokaryotes 3, 113-164.
120. Oren, A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Syst 4,2
121. Oren, A., 2010. Industrial and environmental application of halophilic microorganisms. Environ. Sci. Technol 31, 825-834.
122. 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.
123. Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cihan, A et al., 2012. Phylogenetic analysis and characterization of lipolytic activity of halophilic archaeal isolates. microbiology 81,186-194.
124. Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M., 2009. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. J Ind microbiol biotechnol 36,105-110.
125. Park, S.H., Lee, J., Lee, H.K., 2000. Purification and characterization of chitinase from a marine, *Vibrio* sp. 98CJ11027. J microbiol 38,224-229.
126. Patil, R.S., Ghormade, V., Deshpande, M.V., 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enz microbial Techn 26, 473-483.
127. Patil, J., Bajekal, S., 2014. Characterization of xylanase and cellulase from extremely haloalkaliphilic archaeon *Natrinema* sp. SSBJUP-1 isolated from Lonar Lake. Int J Pharma Bio Sci 5,553-559.
128. Patrick, A.D., Lake, B.D., 1969. Deficiency of an acid lipase in wolman's disease. Nature 222, 1067- 1068.
129. Pavel, A.B., Vasile, C.I., 2012. Pyelph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. BMC bioinform 13,9.
130. Pentilla, M.E., Andre, E.L., Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Knowles, J.K., 1987. Expression of two *Trichoderma reesei* endo-glucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast.3 p 175-785.
131. Purchon, R.D., 1977. The biology of the mollusca, 2 nd ed. Pergamon Press, Oxford.
132. Quadri, I., Hassani, I.I., l' Haridon, S., Chalopin, M., Hacène ,H., Jebbar, M., 2016. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environment of the Algerian Sahara . Microbiological research 186, 119-131.
133. Quérellou, J., Guézennec, J., 2010. Biotechnologie des extrêmophiles. Editions Tech. Ing. BIO580; P: 1-13.
134. Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., Fava, F., 2015. Applied microbiology and biotechnology 99, 7907-7913.

135. Rapp, P., Beerman A., 1991. Bacterial cellulases. P: 535-595. In C. H. Haigler and P. J. Weimer (ed.), Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
136. Rebeyrotte, P., Dupin, F., Jayle, M.F., 1976. Contribution à l'étude d'une cellulose extraite du suc digestif d'*Helix pomatia*. Bull. Soc. Chim. Biol. Paris. 49, 1247-1256.
137. Receveur, V., Czejek, M., Schulein, M., Panine, P., Henrissat B., 2002. Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. The journal of biological chemistery 277 (43), 40887-40892.
138. Reinikainen, T., 1994. The cellulose binding domaine of cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei*. Espoo, Finland : VTT Publications 206. Ph .D. Thesis .
139. Riccio, P., Rossano, R., Vinella, M., Domizio, P., Zito, F., Sansevrino, F., D'elis, A., Rosi, I., 1999.Extraction and immobilisation in one step of two  $\beta$ -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hanssenii*. Enzyme and microbiol technology 24, 123-129.
140. Rivière, J., 1975. Les applications industrielles de la microbiologie. p : 31-195. Collection sciences agronomiques. Masson et Cie (éd.).
141. Rohban, R., Amoozegar, M.A., Ventosa, A., 2009.Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. J Ind microbiol biotechnol 36,333-340.
142. Roh, S.W., Nam, Y.D., Chang, H.W et al., 2009. Haloterrigena jeotgali sp. nov., an extremely halophilic archaeon from saltfermented food. Int J Syst Evol microbiol 59,2359-2363.
143. Rohwerder, T., Sand, W., 2007. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. Engineering in life sciences 7,301-309.
144. Romero, M.D., Aguado, J., Gonzalez, L., Ladero, M., 1999. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. Enzyme and microbial technology 25, 244-250.
145. Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments. Nature 409(6823),1092- 1101.
146. Roussel, E.G., Cambon Bonavita, M.A., Querellou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D., Parkes, R.G., (2008). Extending the subsea-floor biosphere. Science 320 (5879), 1046.
147. Roussos, S., Hannibal, L., 1984. Valorisation biotechnologique de la bagasse par la production au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques. Compte Rendu final d'une recherche financée par le CORDET 83. Laboratoire de biotechnologie et de microbiologie appliquée. Edition de l'ORSTOM. Institut Français de recherche scientifique pour le développement en coopération. France.
148. Saha, B.C., Freer, S.N., Bothast, R.J., 1994. Production, purification and proprieties of a

thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10), p: 3774-3780.

149. Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E., Ventosa, A., 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 94:295-300.

150. Sandhya, C., Adapa, L.K., Nampoothiri, K.M., Binod, P., Szakacs, G., Pandey, A., 2004. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *J Basic microbiol* 44(1), 49-58.

151. Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S. K., Gupta, V., Gupta, S., 2011. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38,769-790.

152. Schwarz, W.H., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl microbiol biotechnol.* 56, p: 634-649.

153. Scriban, R., 1993. *Biotechnologie*. 4<sup>ème</sup> édition. Technique et documentation – Lavoisier, Paris. P: 40.

154. Setati, E.M., 2009. Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African J. biotechnol* 9, 1555-1560.

155. Shekhar, N., Bhattacharya, D., Kumar, D., Gupta, R.K., 2006. Biocontrol of wood-rotting fungi using *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Can J microbiol* 52,805–808.

156. Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myamlo, K., Innis M., 198. Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/ Technology*. 1. P: 691-695.

157. Singh, A.K., Chhatp, H.S., 2011. Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus* sp. D1. *Appl biochem biotechnol* 164,77-88.

158. Sinnott, M.L., 1990. Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 90, 1171-1202.

159. Smant, G., Stokkermans, J.P.W.G., Yan, Y., De Boer, J.M., Baum, T.J., Wang, X., Hussey, R.S., Gommers, F.J., Henrissat, B., Davis, E.L., Helder, J., Schots, A., Bakker, J., 1998. Endogenous cellulases in animals: Isolation of  $\beta$ -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Biochemistry* 95(9),4906-4911.

160. Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2003. *Biochimie*. 5<sup>ème</sup> édition. Médecine-Sciences. Flammarion. Paris. P: 303.

161. Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H et al., 1998. Cloning and characterization of a chitinase encoding gene (ChiA) from *Aspergillus nidulans*, disruption of that decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci biotechnol biochem* 62,60-65.

162. Tamo, F., Chiye, S., Masahiro, T., 2003. Structure-plant chitinases: structure - function

relationships and their physiology. *Foods food ingredients J Jpn* 208,631-632.

163. Tamura and Takeichi K. Y., Otozai, K., Yamasaki, M., Yamazaki, G. H., Ohmura, K. A., Nakayama, Y., 1983. Alpha-amylase genes (amy R2 and amy E+) from an alphaamylase hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: nucleotide sequences and. molecular cloning *J. Bacteriol.*, 156 (1), P: 327.

164. Tanaka, T., Fukui, T., Imanaka, T.,2001. Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Biol Chem* 276, 35629-35635.

165. Teather, RM., Wood, P.J., 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl environ microbiol* 43,777-780.

166. Teeri, T. T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends biotechnol.* 15,160-167.

167. Tsujibo, H., Minoura, K., Miyamoto, K et al., 1993. Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl environ microbio* 159,620-622.

168. Tuncer, M., Balli, A.S., Rob, A., Wilson, M.T., 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a termophilic actinomycete *Termomonospora fusca* BD25. *Enzyme and micribiol technology.*25, 38-47.

169. Tyndall, J.D., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L.A., Taylor, P., Walkinshaw, M.D., 2002. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J Mol Biol* 323 (5),859-869 .

170. Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A., 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2 (4),293-308.

171. Vahed, M., Motalebi, E., Rigi, G et al., 2013. Improving the chitinolytic activity of *Bacillus pumilus* SG2 by random mutagenesis. *J microbiol biotechnol* 23,1519-1528.

172. Vidaud, C., 1984. Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulasique de *Trichoderma* sp par utilisation d'analogue de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de Grenoble.

173. Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol mol biol rev* 62,504-544.

174 Wachinger, G., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W. L., Schrempf, H., 1989. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol* 55,2653-2657.

175. Wang, S.Y., Moyne, A.L., Thottappilly, G et al., 2001. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme microb technol* 28, 492-498.
176. Williams, A.C., Orpin, C.G., 1987. B-glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stage of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. *Canned J Microbiol* 33, 427-434.
177. Withers, S. G., 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses. *Carbohydr. Polym* 44, 325-337.
178. Xu, B., Hellman, U., Ersson, B., Janson J.C., 2000. Purification, characterisation and amino acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- $\beta$ -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Euro. J. biochem* 267, 4970-4977.
179. Xu, B., 2002. Endoglucanase and mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, characterization, Gene and Three dimensional structure. Thèse de doctorat. Faculty of science and technology, Uppsala University, Sweden.
180. Xu, X.W., Ren, P.G., Liu, S.J et al., 2005. *Natrinema altunense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake in Altun Mountain in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1311-1314
181. Yayanos, A. A., Dietz, A. S., Van, Boxtel, R., 1979. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* 205, 808-810.
182. Yayanos, A. A., 1995. Microbiology to 10,500 m in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol* 49, 777-805.
183. Yildiz, S.Y., Radchenkova, N., Arga, K.Y, Kambourova, M., Toksoy, O.E., 2015. Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 2277-2289.