

N° d'ordre: 12/2009-M/S.N

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedién

Faculté des Sciences Biologiques



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER
En SCIENCES BIOLOGIQUES
Option : Biotechnologie et Santé

Par: SELAMA Okba

Thème :

Étude des souches thermo-halophiles isolées d'un milieu extrême (Sabkha d'El Goléa)
en vue de la production de bio-molécules.

Soutenue publiquement le 23/11/2009, devant le jury composé de :

M ^{me} TOUIL B. C	Professeur USTHB	Présidente
M. HACENE H	Professeur USTHB	Directeur de thèse
M ^{me} NATECHE M.F	Maître de conférence USTHB	Examinatrice
M. FORAR LAIDI R	Maître de conférence ENS/KOUBA	Examineur

R emerciement

Au nom de Dieu le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

Il me tient à cœur d'adresser, en premier lieu, mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à mes parents pour leur soutien, leurs encouragements et leur confiance indéfectible.

Il va sans dire que je remercie mon directeur de thèse Mr le Professeur Hacène Hocine, pour m'avoir permis de réaliser ce travail, et de m'avoir intégré au sein de son équipe "Microbiologie". Je le remercie chaleureusement pour la confiance qu'il nous a témoigné, pour ses précieux conseils, sa rigoureuse analyse scientifique et sa grande expérience qu'il a bien voulu partager avec nous.

Je remercie vivement le Professeur Touil-Boukoffa Chafia, pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie également le Docteur Forar Laidi Rabah d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail, et d'avoir eu l'amabilité de consacrer un peu de son temps pour nous éclairer avec ses observations.

Je tiens à remercier aussi le Docteur Nateche-Metiaz Farida d'avoir pris de son temps pour examiner ce travail, pour ses encouragements et son enthousiasme.

Merci également aux Professeurs Elizabeth M H Wellington de l'Université de Warwick et à tous les membres de son équipe en particulier Docteur David Porter pour leur collaboration à la réalisation de ce travail.

J'adresse un grand Merci à tous les membres de l'équipe "Microbiologie" : Mme Benmalek, Mr Abderrahmani, Mme Hachaichi, Mme Bouanane, Mr Bouranane, Yamina, Ryma, Lila, Narimane, Linda, Lamia, je les remercie pour leur gentillesse, leur serviabilité et leur appui continu. Je n'oublie pas de remercier du fond du cœur Soumia et Oussama pour leurs aides et leurs gentilleses.

Je salue également tous mes camarades de promotion, qu'ils soient en École Doctorale de Biotechnologie et Santé ou en Magister de Biochimie-Immunologie ainsi que les membres du laboratoire « LBCM » et « Biologie des sols » .

Je remercie également le personnel du service "Microbiologie" de l'Hôpital central de l'armée pour leur soutien et leur aide.

Je termine par remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier Mr Abdellawi et Mme et Mr Toumiat. Merci tout le monde.

Résumé:

Les espèces microbiennes qui se développent dans des milieux extrêmes sont parmi les modèles les plus fascinants pour l'isolement de nouvelles biomolécules fonctionnelles et hautement stables sous des conditions extrêmes (antibiotiques, bactériocines, bactériorhodopsine, osmorégulateurs, enzymes etc...).

L'Algérie, et principalement le Sahara, offre un vaste champ d'investigation pour l'isolement et l'étude de ces microorganismes.

Cette étude a porté sur une catégorie particulière de ces microorganismes à savoir les thermohalophiles.

12 souches ont pu être isolées à partir de la Sebkhia d'El Goléa en raison des deux facteurs de stress imposés dans l'isolement à savoir : la salinité et la température. Certaines d'entre elles ont été caractérisées au niveau de l'espèce par l'application des techniques de microbiologie conventionnelles et autant des techniques de biologie moléculaire et de bioinformatique.

L'étude a révélé que parmi les souches isolées, l'une d'entre elles appartient à la famille des *Halobacteriaceae* désignée H6 halophile extrême pouvant croître à une température de 60 C°. Celle-ci démontre un intérêt important en terme de production de biomolécules (enzymes et anti-fongique).

Une souche désignée B9 rattachée au genre *Piscibacillus* peut croître à une température de 60 C° et en présence de (200 g/l de NaCl).

Une Actinobactérie désignée G2 peut croître à une température de 70 C° et en présence de (250 g/l de NaCl).

Mots clés : Milieu extrême, Sebkhia d'El Goléa, Microorganisme, Thermohalophile, Biomolécule.

Abbreviations:

Do280nm	: Absorbance at 280 nm
ADN	: Acide desoxyribonucléique
ADNr 16S	: ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal
ARNr16S	: Sous unité 16S de l'ARN ribosomal
BSA	: Bovine Serum Albumine
DMSO	: Di methyl sulfoxyde
dNTP	: Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid
Kpb	: Kilos pairs de bases
LB	: Milieu Luria-Bertani
M	: Marquer de taille des fragments ADN (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)
pb	: Paire de base
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RFLP	: Restriction Length Fragment Polymorphism
RPM	: Rotation par minute
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TAE	: Tampon Tris/Amonium/EDTA
TM	: Melting Temperature
TE	: Tampon Tris/EDTA
V/V	: Volume à Volume

Liste des figures :

Figure 1 : Quelques écosystèmes extrêmes.....	8
Figure 2 : Classification des organismes selon leur température de croissance	9
Figure 3 : L'arbre de la vie basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S/18S.....	21
Figure 4 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du clonage moléculaire.	25
Figure 5 : Aspect microscopique de la souche G2 montrant la présence de filaments (microscopie photonique).....	43
Figure 6 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR du gène l'ARNr 16S des souches sélectionnées en utilisant les primers pA/pH. * L'extraction est faite par la méthode classique.	47
Figure 7 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR du gène de l'ARNr 16S des souches sélectionnées en utilisant les primers pA/pH.* L'extraction est faite par un Kit.....	48
Figure 8 : Profil de séquençage sous un format RAW de la souche B5.	51
Figure 9 : Profil de séquençage sous un format RAW de la souche B9.	51
Figure 10 : Boîte de Pétri montrant la croissance des colonies bleues et blanches d' <i>E.coli</i> après transformation.	52
Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR des colonies <i>E.coli</i> transformées (banches) : (A) pour la souche B9, (B) pour la souche H6.	53
Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR en utilisant les couples de primers : (a) le couple (pA/RpA), (b) le couple (FpH/pH).	54
Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR en utilisant les couples de primers : (1) le couple (pA/ RA) , (2) le couple (pM /rpM), (3) le couple (rH/pH).	55
Figure 14 : Représentation des résultats de la recherche sur Genbank en arbre de distance de toutes les séquences disponibles ayant une forte similarité avec la séquence de la souche B9.	56
Figure 15 : Arbre phylogénétique de la souche B9 basé sur la séquence de l'ARN 16S.	57
Figure 16 : L'activité d'antagonisme de souche H6 contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
Figure 17 : Mise en évidence de l'activité de dégradation de l'amidon.	61

Liste des Tableaux :

Tableau I : Mécanismes d'adaptation des organismes extremophiles.	13
Tableau II : Autres composés peuvent être produits par des extremophiles.	18
Tableau III : Le programme d'amplification pour la PCR « Le cycle thermique ».	34
Tableau IV : Paramètres physicochimiques des échantillons des sites des prélèvements.	41
Tableau V : Caractères cultureux et micromorphologie des (12) souches isolées.	42
Tableau VI : Caractères biochimiques des trois souches sélectionnées.	46
Tableau VII : Quantification de l'ADN Génomique par NanoDrop après extraction par la méthode classique.	49
Tableau VIII : Quantification de l'ADN des amplicons par NanoDrop en utilisant la méthode d'extraction classique pour extraire l'ADN génomique.	50
Tableau IX : Quantification de l'ADN des amplicons par NanoDrop en utilisant la méthode d'extraction par Kit pour extraire l'ADN génomique.	50
Tableau X : Caractéristiques distinguant la souche B9 des espèces similaires proches et décrites	58

Sommaire :

Introduction générale:	1
CHAPITRE I: BIBLIOGRAPHIE	3
1) Les milieux extrêmes :	4
2) Organismes extremophiles :	4
3) Classification des environnements extrêmes et des extremophiles :	5
3.1) Environnements hypersalés et halophiles :	5
3.2) Environnements thermaux et thermophiles:	6
3.3) Environnements basiques et alkaliphiles :	7
3.4) Environnements acides et acidophiles :	7
3.5) Environnements froids et psychrophiles :	7
3.6) Fonds de mer et les barophiles /piezophiles :	7
3.7) Environnements exposés aux radiations et les microorganismes radio résistant :	8
4) Organismes Thermohalophiles :	9
4.1) Classification des (micro) organismes selon la température de croissance :	9
4.2) Classification des (micro) organismes selon la concentration requise en sel :	9
4.3) Thermophiles modérés halophiles extrêmes et les Thermophiles halophiles modérés: 10	
4.3.1) Les thermophiles modérés-halophiles extrêmes :	10
4.3.1.1) Les thermophiles modérés-halophiles extrêmes - Taxonomie des haloarchaea: 10	
4.3.2) Les thermophiles-halophiles modérés :	11
5) Mécanismes d'adaptation de certains organismes extremophiles :	12
6.) Intérêts de l'étude des extermophiles :	15
6.1) Aspect fondamental :	15
6.2) Le potentiel technologique et biotechnologie des extrémophiles :	15
6.2.1) Production d'enzymes:	16
6.2.2) Les substances antimicrobiennes :	16
6.2.3) Antitumoraux :	17
6.2.4) Autres composés :	18
7) Phylogénie moléculaire et ARNr 16 S :	19
7.1) ARNr 16S :	19
7.2) Séquençage :	22
7.3) Amplification Enzymatique de l'ADN/ Polymerase Chain Reaction (PCR) :	22
7.4) Le clonage moléculaire (technique de l'ADN recombinant) :	23
7.5) Construction de l'arbre phylogénétique :	25
7.6) Les banques de séquences :	26
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
1) Zone d'étude :	28
1.1) Présentation :	28
1.2) Le Prélèvement des échantillons:	28
1.3) Analyse physicochimique :	29
2) Isolement et purification des souches thermohalophiles:	29
2.1) Isolement:	29
2.2) Purification et conservation des souches isolées :	29
3) Caractérisations des souches isolées :	30
3.1) Etude Morphologique :	30
3.2) Etude physiologique et biochimique :	30
3.2.1) Etude physiologique :	30
3.2.2) Etude biochimique :	31

3.3) La phylogénie moléculaire :.....	32
3.3.1) Le séquençage :.....	32
3.3.1.1) Extraction et purification d'ADN :.....	32
3.3.1.2) Amplification du gène ARN 16S par PCR :.....	34
3.3.1.3) Electrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% :.....	35
3.3.1.4) Purification des amplicons (Extraction de L'ADN du gel) :.....	35
3.3.1.5) Quantification de l'ADN et le degré de pureté :.....	35
3.3.1.6) Séquençage des produits d'amplification :.....	36
3.3.1.7) Recherche de l'homologie :.....	36
3.3.2) Le clonage moléculaire (technique de l'ADN recombinant) :.....	36
3.3.3) La conception des primers :.....	37
3.3.4) La construction de l'arbre phylogénétique :.....	38
3.3.5) Le dépôt de la séquence :.....	38
3.4) La mise en évidence de biomolécules:.....	39
3.4.1) Les activités d'antagonisme :.....	39
3.4.2) Activités enzymatiques (Les amylases) :.....	39
CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION :.....	40
1) Analyses physicochimiques des échantillons :.....	41
2) Isolement des souches Thermohalophiles:.....	41
3) Caractérisation des souches isolées :.....	42
3.1) Etude morphologique :.....	42
3.2) Etude physiologique et biochimique :.....	44
3.2.1) Etude physiologique :.....	44
* Sélection des souches :.....	45
3.2.2) Etude biochimique :.....	46
3.3) La phylogénie moléculaire et le séquençage de l'ARN 16S :.....	47
3.3.1) Séquençage :.....	47
3.3.1.1) PCR et l'électrophorèse :.....	47
3.3.1.2) Quantification de l'ADN par NanoDrop :.....	49
3.3.1.3) Analyse des résultats de séquençage :.....	51
3.3.2) Clonage :.....	52
3.3.2.1) La transformation des cellules compétentes :.....	52
3.3.2.2) Sélection des clones transformés :.....	53
3.3.3) La conception des primers :.....	53
3.3.4) Construction de l'arbre phylogénétique :.....	56
3.3.5) Comparaison de la souche B9 avec les espèces similaires :.....	58
3.3.6) Dépôt de la séquence :.....	59
3.4) La mise en évidence des biomolécules :.....	60
3.4.1) Activités antagonistes :.....	60
3.4.2) Activités enzymatiques (Les amylases) :.....	61
Conclusion et perspective.....	62
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	64

Introduction générale:

Le « screening » et la production de biomolécules représentent le centre d'intérêt des recherches en cours en raison de l'impact de leur utilisation pour des applications dans différents domaines: médical, pharmaceutique, industriel et agroalimentaire...

Dans ce contexte la recherche et l'exploration des organismes extrémophiles vivants dans des écosystèmes extrêmes, facilité par le développement de nouvelles techniques d'investigation des microorganismes, représentent actuellement une source importante en biomolécules actives d'intérêt biotechnologique.

Parmi les environnements les plus extrêmes existants au monde, les écosystèmes hyper-salins et les sources thermales sont les plus connus et étudiés (**Baati *et al.*, 2008**).

Ces habitats extrêmes sont caractérisés par d'autres facteurs, outre leur forte contenance (concentration) en sel et la haute température, ils peuvent limiter la croissance des organismes. Ces facteurs incluent le pH, la pression, l'oxygène, la disponibilité d'éléments nutritifs et les radiations solaires.

Les microorganismes vivant dans de tels environnements sous ces conditions extrêmes sont très intéressants. Outre leur rôle écologique évident mais mal connu, ces microorganismes présentent l'avantage d'être un modèle particulier pour l'étude structurale et fonctionnelle des molécules biologiques telles les protéines en particulier les enzymes et l'étude des mécanismes d'adaptations à ces conditions extrêmes (**Cava *et al.*, 2009 ; Jr et Adams., 2008 ; López-García., 2005**). En plus de cet aspect fondamental, ces microorganismes offrent une multitude d'applications potentielles dans les différents domaines : médical, pharmaceutique, alimentaire, agronomique et industriel avec des biomolécules incluant les enzymes inhabituelles « Extremoenzyme » fonctionnant à des conditions extrêmes de température, de salinité, de pH. L'exemple de l'ADN polymérase et son importance est le plus édifiant. Les antitumoraux et les antibiotiques, en particulier les halocines, les exopolysaccharides constituent d'autres molécules potentiellement importantes.

De nombreuses équipes de recherche dans le monde s'intéressent à ces extrémophiles (**Aguilar *et al.*, 1998**).

Ainsi, les travaux antérieurs du laboratoire de microbiologie sur les microorganismes extrémophiles ont abouti à la mise en évidence de nouvelles espèces et même voir un nouveau genre de *Geosporobacter* (**Benmalek *et al.*, 2009 ; Klouche *et al.*, 2007**), ainsi que la découverte de nouvelles et nombreuses molécules potentiellement intéressantes (**Boutaïba *et al.*, 2006; Hacène *et al.*, 2000; Forar *et al.*, 2007 et 2008**).

Le présent travail s'inscrit dans ce contexte. Il a pour objectif principal l'isolement et la caractérisation des souches thermohalophiles en vue de la production de biomolécules.

Cette étude comporte trois parties :

la première partie de ce travail a été consacrée à une recherche et une synthèse bibliographique portant sur les environnements extrêmes, les organismes extremophiles, en particulier les thermohalophiles, les principes et les techniques appliqués au cours d'une identification moléculaire et l'établissement un arbre phylogénétique,

la deuxième partie est un support expérimental qui décrit les méthodes utilisées pour :

- l'isolement des souches thermohalophiles à partir des échantillons des sites de prélèvement,
- la caractérisation physiologique, biochimique, microbiologique et la phylogénie moléculaire en séquençant l'ARN 16S des espèces sélectionnées afin de compléter leur identification,
- la mise en évidence du potentiel enzymatique et le criblage des souches productrices de substances antimicrobiennes.

Enfin, la troisième partie élucide les différents résultats et une conclusion générale qui relate les principaux résultats et perspectives de ce travail.

CHAPITRE I:

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

1) Les milieux extrêmes :

Au cours des trente dernières années et avec le développement de moyens d'investigation en particulier de biologie moléculaire, nous avons assisté à la découverte d'une extraordinaire diversité de microorganismes habitant des milieux que l'on croyait auparavant hostiles à la vie. Aujourd'hui, on sait que la vie microbienne s'étend partout là où on trouve l'eau à l'état liquide, des calottes polaires jusqu'aux sources hydrothermales sous-marines, dans les déserts, dans les lacs hypersalins ou de soude, dans les eaux acides, à l'intérieur de la croûte terrestre...

Un environnement est dit extrême lorsque les paramètres physicochimiques qui le caractérisent s'approchent des limites, là où la vie peut avoir lieu. (**López-García, 2005 ; Seckbach, 2006**).

Les environnements extrêmes incluent différents paramètres extrêmes (**Rothschild et Mancinelli, 2001**) ;

- paramètres physiques : température, radiation, pression, gravité et vide,
- paramètres géochimiques : dessiccation, salinité, pH, oxygène et potentiel rédox.

2) Organismes extremophiles :

Un extrémophile est un organisme qui trouve son optimum de vie dans un environnement extrême où les conditions physico-chimiques sont insoutenables pour le reste des êtres vivants « ordinaires ». Il ne tolère pas uniquement cet environnement mais il requiert ses conditions extrêmes pour sa survie. Il est capable de se développer et d'accomplir la totalité de son cycle de vie sous ces conditions. Ce n'est pas le cas des organismes extremotolérant qui peuvent survivre à des conditions extrêmes mais qui ont des optima de croissance dans des conditions moins extrêmes (**López-García, 2005**).

Les extremophiles sont la plupart pluriextremophiles, s'ils ne le sont pas tous, puisqu'ils vivent dans des habitats où généralement plusieurs paramètres physicochimiques atteignent des valeurs extrêmes à la fois. Par exemple, de nombreuses sources thermales sont acides ou alcalines en même temps et généralement riches en métaux, et plusieurs lacs hypersalés sont alcalins. Les fondes des mers sont généralement froids, oligotrophiques (peu de nutriments) et exposés à des fortes pressions (**López-García, 2005 ; Rainey et Oren, 2006**).

Les extremophiles sont retrouvés dans les trois domaines de la vie : Eubacteria, Eucarya et Archaea. Ce dernier est considéré comme le domaine des extremophiles par excellence (**Rainey et Oren, 2006 ; Seckbach, 2006**).

En fait, l'histoire des extremophiles est très ancienne. Elle commença à la fin du XIXe siècle où une bactérie a été isolée dans un environnement extrême, « la mer morte ». Elle a été apparentée aux groupes des bactéries halophiles (du grec *halos*, sel). Alors que l'on croyait morte et dépourvue de vie (**Wilansky, 1936**). Ces organismes peuvent vivre dans des concentrations de sels très élevées 30-34 % (W/V) jusqu'à 10 fois plus salée que l'eau de mer ordinaire. Les chercheurs ne se sont pas beaucoup intéressés à ces organismes, car les moyens d'investigation de l'époque n'étaient

pas suffisamment développés pour permettre de faire la lumière sur la structure et le fonctionnement de ces microorganismes qui vivent dans du sel. La mise au point du premier thermophile *Thermus aquaticus* d'où on a extrait la Taq polymérase, une enzyme clé de la PCR très stable à haute température, outil privilégié des biologistes moléculaires, a été faite par **Brock et Freeze en (1969)**. Une année après, c'était le moment pour la découverte de la première 'Bactérie' hyperthermophile du genre *Sulfolobus*, qui peut croître à une température avoisinante les 85 °C et un pH (1-5), bouleversant ainsi la règle générale connue depuis l'ère de Pasteur qui stipule que « les bactéries » sont tuées à une température située entre 80-100 °C. C'est que jusqu'à la fin des années 1990 et grâce aux travaux de (**Woese et al, 1990**) qu'on a su que la plupart de ces extremophiles, apparentaient au 3ème domaine du vivant, celui des Archaea.

Ces premières découvertes ont déclenché la recherche d'autres extrémophiles dans d'autres environnements extrêmes, assister par l'important développement des techniques de recherches de biologie moléculaire, qui ont un impact extraordinaire. Ces découvertes ont pour but d'aider la compréhension du fonctionnement de la vie sous ce que nous considérons comme écosystème extrême, mais aussi ils nous apprennent la vie elle-même et les possibles propriétés des premiers organismes qui ont colonisé la planète Terre à une époque où les conditions étaient plus extrêmes que celles tolérées par la plupart des formes de vie habitant notre globe aujourd'hui.

3) Classification des environnements extrêmes et des extremophiles :

Rainey et Oren, (2006) ont regroupé ces milieux et les microorganismes extrêmes en sept groupes:

3.1) Environnements hypersalés et halophiles :

Les environnements hypersalés comportent les sols et les eaux hypersalés. Une eau hypersalée est définie comme toute eau dont sa concentration en sels est supérieure à celle des eaux des mers qui est en moyenne 35 g/l (**Rodriguez-Valera, 1988**). Les sols hypersalés sont cependant mal définis. Selon (**Kaurichev, 1980**), les sols contiennent plus de 0.2% (w/v) en sels solubles doivent être considérés comme des sols salins, ce qui fait que les sols hypersalés sont largement représentés à travers la planète (**Rodriguez-Valera, 1988**).

Comme exemple de ces environnements hypersalés, Le Great Salt Lake, Utah, le Lac Rose au Sénégal, la mer Morte en Palestine, les marais salants des côtes de France et plusieurs sebkhas du Sahara Algérienne (**Figure 1.1**).

Une sebkha :

La Sebkhas se qualifie d'un point de vue pédologique comme zone subdésertique argileuse dont les sols sont très fortement à excessivement salins, avec une texture lourde. La surface, à l'état sec, est couverte par des polygones d'argiles surmontant en surface une structure friable avec de nombreux cristaux individualisés de NaCl. En profondeur, la structure est massive avec des tâches de rouilles et des tâches grises.

Les halophiles constituent un groupe important des organismes extrêmes. Ils appartiennent aux trois domaines de la vie. Ils ont été trouvés dans des niches écologiques

différentes : lacs, sols et même certains aliments mais caractérisées toutes par la présence de fortes concentrations en sels (**Horikoshi et Grant, 1998**). Le groupe prédominant de ces organismes habitant ces milieux sont les bactéries, les archaea halophiles et halophiles modérés.

Grâce à l'application de nouvelles approches taxonomique et phylogénétique, le nombre des microorganismes halophiles reconnus a augmenté considérablement durant ces dernières années (**Kamekura, 1998; Madigan and Oren, 1999; Oren, 2002 ; Goh et al., 2006**) et nous avons su que le monde des halophiles était très divers et hétérogènes composés d'organismes : aérobies, anaérobies, hétérotrophes, fermentatives, sulfito-réducteur, cyanobactéries, et des bactéries photosynthétiques anoxygénique (*Halochromatium*, *Halorhodospira*) (**Oren, 2002**).

Les halophiles extrêmes exigent un optimum qui se situe entre 15-30 % en NaCl et ils sont représentés surtout par des halophiles Aérobie Archaea ou haloarchaea (**Grant et al., 2001**).

L'ordre des Halobacteriales est entièrement composé des espèces qui requérant le sel pour leur croissance. Ces espèces sont généralement pigmentées en rouge dû aux pigments caroténoïdes, des bacteriorhodopsines et des halorhodopsines (**Oren, 2002**).

3.2) Environnements thermaux et thermophiles:

Différents types d'environnements thermaux sont présents sur Terre. Ces environnements sont habités par des organismes bien adaptés aux conditions de température. Plusieurs d'entre eux sont associés aux activités volcaniques. Les sources thermales, les volcans submergés sous les eaux de mer, cheminées noires ou fumeurs noirs étaient des terrains importants pour la recherche de nouveaux types de microorganismes thermophiles (**Figures 1.2, 1.3 et 1.4**). En plus, les environnements thermiques incluent les constructions les installations domestiques et industrielles des systèmes d'eau chaude et les processus industriels à haute température (e.g les machines du traitement du papier et les équipements du traitement des aliments) (**Rainey et Oren, 2006**).

L'augmentation de la température est marquée par la diminution de la richesse en biodiversité. On trouve progressivement peu de groupes de microorganismes qui peuvent résister (**Rainey et Oren, 2006**).

Ainsi, le procaryote le plus tolérant à la chaleur jusqu'à aujourd'hui et le plus documenté est *Pyrolobus fumarii* un archaea isolé d'une cheminée noire au fond de la mer, qui ne peut croître au dessous de 90°C, son optimum de croissance est de 106°C et qui peut croître mais faiblement à 113°C (**Blöchl et al., 1997**).

Kashefi et Lovley, (2003) ont brisé la règle de la température de stérilisation, et rapportent la présence d'une souche d'archaea désignée « Strain 121 » qui peut croître à 121°C.

Ces travaux montre qu'on ignore jusqu'à présent quelle est exactement la vraie température maximale pour la vie. Néanmoins, celle-ci est probablement liée à la stabilité du matériel génétique et les autres molécules biologiques et de la présence d'une forme liquide de l'eau (**Jaenicke et Sterner, 2006 ; Rainey et Oren, 2006**).

Des études d'écologie moléculaire, basées sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S amplifié des environnements thermaux du Parc National Américain de Yellowstone et dans d'autres endroits au monde ont démontré que la diversité dans ces écosystèmes était beaucoup plus importante que celle de la diversité des espèces cultivables (**Rainey et Oren, 2006**).

De tels environnements hébergent des organismes appartenant à de nouvelles familles, ordres, classes, même de nouveaux règnes qui ne sont pas rapportés par les méthodes de cultures conventionnelles (**Barns et al., 1996; Bouanane et al., 2009 ; Hugenholtz et al., 1998**).

3.3) Environnements basiques et alcaliphiles :

La plupart des vraies alcalinophiles sont isolés des lacs alcalins en permanence appelés ("soda lakes") dans lesquels le pH élevé est dû aux propriétés géologiques et géochimiques du lac qu'à le fait d'une activité biologique. Ces lacs sont localisés dans tous les continents. La plupart de ces lacs sont aussi caractérisés par une forte teneur en sels. Ainsi, les organismes habitants ces environnements sont des alcalinophiles et des halophiles.

Les organismes alcalinophiles peuvent être trouvés dans les trois domaines de vie.

3.4) Environnements acides et acidophiles :

Les environnements avec un pH bas ne sont pas très abondants, ils sont généralement associés aux activités volcaniques : les sources thermales soufrées en plus de ces environnements acides naturel, d'autres environnements acides peuvent être trouvés où la diminution du pH du milieu est causée par l'activité biologique des organismes, généralement des microorganismes, chimoautotrophes oxydant le sulfide et le soufre élémentaire.

Les organismes acidophiles peuvent être trouvés dans les trois domaines de vie.

3.5) Environnements froids et psychrophiles :

La plupart des fonds marins et océaniques qui couvrent plus des deux tiers de notre planète ont une température au dessous de 5 °C. Les températures basses sont la règle dans plusieurs pays du nord. Malgré leurs abondances, ils étaient relativement et pendant longtemps négligés et ce n'est que récemment qu'on commence à s'intéresser pour étudier leurs biodiversités, l'éventuelle production de biomolécules et la caractérisation des nouvelles espèces isolées (**Rivkina et al., 2000 ; Cowan et al., 2002 ; Sánchez et al., 2009**).

3.6) Fonds de mer et les barophiles /piezophiles :

La pression hydrostatique augmente au niveau des mers par 1 atmosphère tous les 10 mètres. La moyenne des profondeurs des océans est à peu près de 4 Km équivalant d'une pression de 400 atmosphère ou 40 MPa.

Ces microorganismes « barophiles » sont peu étudiés et cela est dû aux problèmes techniques pour leurs cultures.

3.7) Environnements exposés aux radiations et les microorganismes radio résistant :

Deinococcus radiodurans (bactérie) la plus connue par sa capacité de tolérer des doses importantes de radiation gamma ionisante allant jusqu'à 25 kGy (2.5 Mrad). Pour une simple comparaison, 5 Gy est une dose létale pour l'Homme. Cette bactérie était isolée initialement d'une boîte de conserve de viande irradiée (Anderson *et al.*, 1956).

Les microorganismes résistants au dessiccation sont généralement résistants aux radiations (Mattimore et Battista, 1996 ; Rainey *et al.*, 2005)



Figure 1. 1 : Le lac salé D'El Goléa, Algérie

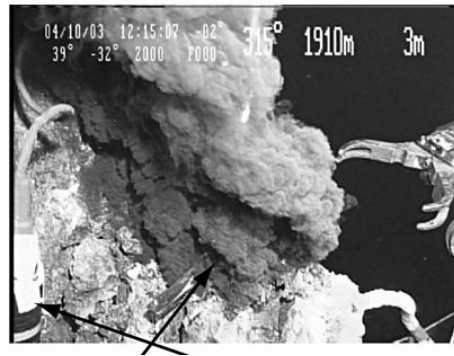


Figure 1. 2 : Un cheminé noir au fond de mer à environ 2Km de profondeur avec une T° : de 300°C.



Figure 1. 3 : Le Parc National Américain de Yellowstone, USA



Figure 1. 4 : Hammam Dbaghe de Guelma, Algérie

Figure 1 : Quelques écosystèmes extrêmes

4) Organismes Thermohalophiles :

Les organismes thermohalophiles ont pour caractéristique de supporter à la fois des hautes températures et des teneurs élevées en sel.

4.1) Classification des (micro) organismes selon la température de croissance :

On considère en général que la vie a lieu entre approximativement : -20°C (certaines bactéries) et $110-120^{\circ}\text{C}$ (certaines Archea). Dans cet intervalle, les êtres vivants sont divisés en différentes catégories et cela en fonction de la température minimale et maximale de croissance (Figure 2) et leur l'optimum de croissance qui se situe entre ces valeurs limitées. (López-García, 2005).

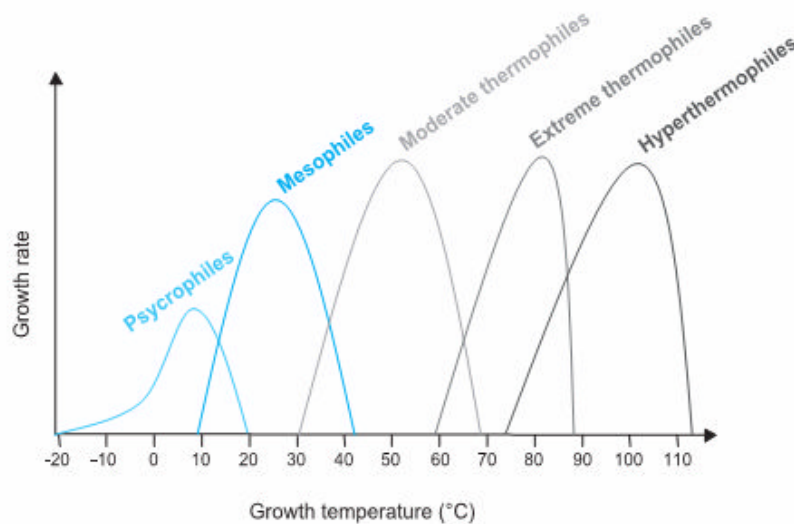


Figure 2 : Classification des organismes selon leur température de croissance (d'après López-García , 2005)

4.2) Classification des (micro) organismes selon la concentration requise en sel :

Plusieurs classifications des êtres vivants en fonction de leurs croissances en présence de sel étaient proposées. L'une de ces classifications est celle de **Larsen, (1986)** qui classe ces êtres vivants en trois groupes.

Groupe 1 : Les organismes légèrement halophiles (optimum se situant entre 2 à 5%),

Groupe 2 : Les organismes halophiles modérées (optimum se situant entre 5 à 20%).

Groupe 3 : Les organismes halophiles extrêmes (optimum se situant entre 20 et 30%).

Toutefois, le terme « Halophile » désigne les micro-organismes nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. Les « Halophiles extrêmes » désignent les micro-organismes qui peuvent croître à des concentrations saturantes en sels mais incapables de croître à des concentrations inférieures à 12% (Larsen, 1986).

Par contre, le terme «halophile modéré» signifie que les microorganismes croissent le mieux en présence d'une concentration <2% mais qu'ils peuvent croître à des concentrations en sel de 10% ou plus (Flannery, 1956). Les organismes nécessitant entre 2-5% de sel pour une croissance optimale sont considérés comme légèrement halophiles.

Ventosa et al., 2008, affina cette classification et proposa cinq classes : (i) les non halophiles requièrent moins de 1%, (ii) halotolérant qui sont des microorganismes non halophiles qui peuvent tolérer des concentrations, dans certain cas jusqu'à 25% NaCl, (iii) les organismes légèrement halophiles qui croissent dans un milieu avec une concentration 1 - 3% NaCl, (iv) les halophiles modérés, leur optimum est entre 3-15 % et pour NaCl (v) les halophiles extrêmes leur optimum se situe entre 15 et 30 % en NaCl.

4.3) Thermophiles modérés halophiles extrêmes et les Thermophiles halophiles modérés:

Les **Thermo-halophiles** en particuliers les (Thermophiles-modérés et halophiles-extrêmes) et les Thermophile-halophiles/modérés sont donc des pluriextremophiles pour les deux caractères thermophilie et halophilie. Ces (micro) organismes peuvent être isolés de certains environnements thermaux qui sont aussi salés mais ils peuvent être aussi isolés des environnements hypersalés tels les sebkhas des zones arides ou sahariens. (**Boutaiba et al., 2006 ; Hacène et al., 2004**)

4.3.1) Les thermophiles modérés-halophiles extrêmes :

Les thermophiles modérés-halophiles extrêmes sont représentés principalement par les Archaea halophiles aérobies ou haloarchaea (**Grant et al., 2001**).

4.3.1.1) Les thermophiles modérés-halophiles extrêmes - Taxonomie des haloarchaea:

4.3.1.2) Caractéristiques de la famille des *Halobacteriaceae* :

Dans la IX édition du Bergey's manual (2001), Les haloarchaea sont classées dans l'ordre des *Halobacteriales* et la famille des *Halobacteriaceae*.

Actuellement cette famille comprend 28 genres (NCBI, taxonomy 2009)

Les Archaeas classées dans cette famille présentent les propriétés suivantes :

- La composition en lipides qui sert de marqueurs chimiques pour leur identification, Ces derniers sont composés de lipides diéther (lipides insaponifiables)
- Leur résistance aux inhibiteurs des Eubactéries (pénicilline et chloramphénicol notamment).
- Leurs exigences à de fortes concentrations en NaCl, elles nécessitent au moins 100 g/l, la plupart poussent bien entre 150 et 250 g/l, d'autres peuvent tolérer jusqu'à 350 g/l.

- La production de la bactériorubrine (pigment caroténoïde C50) et de la bactériorhodopsine.
- Les cellules en forme de bâtonnets pléomorphes, coccis, disques, ou carrés
- Aérobie ou aéro-anaérobie facultative.
- La mobilité, quand elle existe, se fait par un flagelle ou touffe de flagelles polaires.
- Les colonies qu'elles forment sur milieux solides, présentent des formes variables de couleur rouge, rose vermillon ou rouge orangé et rouge mauve, très rarement incolores. La couleur rouge est due à la présence de bactériorubrine (pigment caroténoïde) qui joue le rôle de protecteur des halobactéries contre les rayons solaires,
- La température optimale de croissance se situe entre 35 à 50°C.
- La majorité des isolats sont cultivés sur des milieux à base d'extrait de levure ou de peptone.
- Ils sont chimio-organotrophes utilisant les hydrolysats de protéines comme source de carbone.
- L'osmorégulation est effectuée par accumulation intracellulaire d'une grande concentration de KCl.
- La coloration de Gram nécessite des modifications pour éviter le choc osmotique aux cellules fragiles, comme les bâtonnets. La fixation se fait avec de l'acide acétique pendant 5 minutes.

4.3.2) Les thermophiles-halophiles modérés :

Les Thermophile-halophiles modérés ce sont, en revanche, surtout des bactéries halophiles modérés Gram-positifs et Gram –négatifs. Parmi lesquelles on peut citer: des espèces du genre *Bacillus*, *Filobacillus*, *Geobacillus*, *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Actinopolyspora*, *Saccharomonospora* et *Vibrio*, *Halomonas* (Hacène *et al.*, 2004 ; Ventosa *et al.*, 2008)

Les thermophiles-halophiles des eaux hypersalées sont en prédominance des Gram négatifs alors que dans les sols hypersalins se sont des Gram positifs. (Ventosa *et al.*, 2008).

Taxonomie des Bacillaceae :

La famille des **Bacillaceae** comprend actuellement (NCBI, taxonomy 2009) 36 genres dont le genre *Bacillus*.

Ce genre apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique (le G + C p. cent des diverses espèces varie de 32 à 69) que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi...). L'étude des ARNr 16S et 23S confirme cette hétérogénéité et montre que le genre *Bacillus* doit être scindé en plusieurs genres.

La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant 3 espèces acidophiles et thermophiles. Ultérieurement ont été proposés et validés les genres *Aneurinibacillus* (1996), *Brevibacillus* (1996), *Gracilibacillus* (1999), *Geobacillus* (2001), *Marinibacillus* (2001), *Paenibacillus* (1994), *Salibacillus* (1999), *Ureibacillus* (2001), *Virgibacillus* (1998), *Lysinibacillus* et ***Piscibacillus*** (2007) qui tous rassemblent au moins une espèce initialement incluse dans le genre *Bacillus*. Les genres *Amphibacillus* (1990), *Filobacillus* (2001), *Jeotgalibacillus* (2001) et *Halobacillus* (1996) sont également constitués de bacilles à Gram positif, aérobie ou aéro-anaérobie et aptes à sporuler.

Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes (ou pratiquement rectilignes), à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que dans les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*Bacillus anthracis* et *Bacillus mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase.

La culture de ces germes peut s'avérer difficile car certaines espèces exigent de nombreux facteurs de croissance. L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est extrêmement variable et les phénomènes de dissociation sont fréquents.

Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent et donnent des spores (une seule spore par cellule végétative) souvent très résistantes dans le milieu extérieur. Le phénomène de sporulation, contrairement à ce qui se produit pour les espèces du genre *Clostridium*, n'est pas inhibé par l'oxygène. La sporulation dépend des conditions de culture et, *in vitro*, certaines espèces ne sporulent que dans des milieux spéciaux.

Habitat

Les *Bacillus* sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires.

5) Mécanismes d'adaptation de certains organismes extremophiles :

Des études de biologie moléculaire montrent que ces organismes sont prodigieusement bien adaptés aux conditions extrêmes. Cette remarquable adaptation moléculaire, touchant la structure, les interactions et même les voies métaboliques et physiologiques cellulaires, allant de la membrane plasmique jusqu'à l'ADN en passant par les protéines.

Plusieurs études étaient faites sur ces organismes extremophiles, afin de comprendre cette aptitude de vivre dans ces conditions et de tirer profit d'éventuels mécanismes et biomolécules intéressantes fonctionnant à un tel environnement pour une utilisation probable en biotechnologie. Nous avons résumé dans le tableau I quelques stratégies et mécanismes d'adaptation des organismes extremophiles par comparaison aux organismes non extremophiles.

Tableau I : Mécanismes d'adaptation des organismes extremophiles.

Paramètre physicochimique	Type d'organisme	Optimum de croissance	Adaptation moléculaire
Température	Hyperthermophile	>80 °C	<p>* Stabilisation de l'ADN : Enzymes spécifiques : gyrase reverse, modification de la topologie de l'ADN, des histones like (Hardy et Martin, 2008 ; Jaenicke et Sterner, 2006 ; Orfaniotou et al., 2009).</p> <p>* Lipides : liaison éther au lieu de liaison ester, plus de lipides saturés, organisation des lipides en monocouche, ces lipides sont des dibiphytanyl (formés avec des chaînes en C40 d'isoprenoid) diglycerol tetraéthers, ramifiées, avec des pentacycles ou d'hexoses pour augmenter la stabilité. (De Rosa et al., 1991 ; Lai et al., 2008)</p> <p>* Stabilité des protéines : moins de sous unités, augmentation des interactions ioniques entre les acides aminés chargés (+) et (-), stabilisation par les ions sels et les ponts disulfures, augmentation de l'hydrophobicité et compaction des protéines. (Chakravarty and Varadarajan, 2002 ; Das and Gerstein, 2000 ; Elcock, 1998 ; Sælensminde et al., 2009)</p>
	thermophiles	60-80 °C	<p>* Lipide : augmentation de la taille de la chaîne aliphatique, plus de lipides saturés.</p> <p>- Liaison éther au lieu de liaison ester: diéther lipide.</p> <p>-Augmentation de la proportion des glycolipides au niveau de la membrane plasmide (Yang et al., 2006)</p> <p>* stabilité des protéines par augmentation de l'hydrophobicité (Sælensminde et al., 2009)</p>
	Psychrophiles	<5°C	<p>* Plus de lipides insaturés (Allen et al., 1999).</p> <p>* Protéines : augmentation de la flexibilité moins d'interaction entre les domaines de la protéine, moins d'hydrophobicité, (Sælensminde et al., 2009) forte complémentarité entre l'enzyme et le substrat (augmentation de l'affinité).</p> <p>* Présence de molécules antigelées (Raymond et al., 2008)</p>
pH	Acidophiles	pH <2-3	<p>Adaptation au niveau membranaire : (Konings et al., 2002)</p> <p>* Membrane plasmique peu perméable aux protons.</p> <p>* Pompe d'expulsion de proton.</p> <p>* Création d'un potentielle électrochimique inverse du potassium (négative extracellulaire et positif intracellulaire) par des systèmes internalisation de K+.</p>

	Alcalinophiles	pH>9-10	* Surface externe chargée négativement engendrée par un potentiel électrochimique de sodium (négatif intracellulaire et positif extracellulaire) créé par des systèmes antiport Na ⁺ /H ⁺ couplés H ⁺ généré de la chaîne respiratoire (bactérie aérobie mésophile alcalinophile) (Konings et al., 2002)
Salinité	halophile	Forte concentration plus 20%	* Accumulation d'ions potassium (K ⁺) dans le cytoplasme par des pompes K ⁺ ATP dépendant (Strahl et Greie , 2008). * Protéines spécifiques stables et actives en présence de forte concentration en sel (Madern et al., 2000).
	Halotolérant	Concentration entre 5- 20 %	* Accumulation de solutés organiques osmorégulatrices tels le glycérol dans le cytoplasme (Oren , 1999; Roberts , 2005).
Pression	Barophile Piezophile	Forte pression	* Plus de lipides insaturés (Allen et al., 1999). * Des adaptations spécifiques au niveau des protéines
Radiation	Radio tolérants	Support de forte dose de radiation (ionisante ,U.V... etc)	* Présence de protéines de stabilisation et de détoxification (Tapias et al., 2009). * Présence d'un système de réparation très efficace (Battista , 1997 ; Minton , 1994): * Présence du génome en double triple, N copies (Hansen , 1978). * Présence des systèmes de filtration des radiations (ex : pigments) (Castenholz et Garcia-Pichel, 2000).
Dessiccation	Xérophile	Conditions d'anhydrobiose	* Augmentation d'osmolarité interne (Hincha et Hagemann, 2004). * Stabilité d'ADN : protéines de liaison, système de réparation puissant (Beblo et al., 2009).

Métaux	Métallo tolérant	Support de forte concentration en métaux lourds	<p>* Imperméabilité de la membrane plasmique combinée avec des pompes à efflux multiple. (Perron et al., 2004).</p> <p>* Accumulation sélective du métal (séquestration) interne ou externe de la cellule (Teitzel et Parsek , 2003).</p> <p>* Mécanismes de détoxification spécifique : protéines de liaison et enzymes de transformations (oxydation, réduction, méthylation, and demethylation). (Leedjärvi et al., 2008).</p>
--------	------------------	---	--

6.) Intérêts de l'étude des extremophiles :

Depuis leurs découvertes, les extremophiles ont fasciné et attiré les scientifiques et les industriels de plusieurs domaines et disciplines.

Parmi ces derniers les thermophiles et les halophiles, sont ceux ayant ont reçus le plus d'attention (**Sælensminde et al., 2007**).

6.1) Aspect fondamental :

En effet, ils sont ciblés car ils constituent un bon **modèle biologique** qui permet de comprendre et de répondre à beaucoup de questions sur la vie ici sur Terre et probablement dans d'autres planètes qui auraient des conditions extrêmes similaires (**López-García, 2005**). L'étude de la vie, sous sa forme extrême, avec les différents mécanismes d'adaptation, est bien favorisée pour expliquer plusieurs processus biologiques. En particulier pour l'étude structurale des macromolécules dont les enzymes. Cette étude est très intéressante pour quelle soit faite sur les extremophiles comparés aux mésophiles cela est le fait que leurs protéines sont très résistantes et facilement cristallisables (**Cava, 2009 ; Jr et Adams, 2008**).

En plus de cet aspect fondamental, les extremophiles ont un potentiel biotechnologique très intéressant dans différents domaines : biologie, chimie, pharmacie, santé, agroalimentaire etc.

6.2) Le potentiel technologique et biotechnologie des extrémophiles :

L'utilisation des extremophiles ou l'un de leurs composants cellulaires est très intéressante puisque ces derniers résistent aux différentes conditions hostiles caractérisant une grande majorité des processus industriels et biotechnologiques pour lesquelles leurs organismes similaires « dits : normaux » ne peuvent pas s'y adapter et/ou trouvent des difficultés « dénaturation, contamination, problèmes de diffusion des substances... »

Parmi les produits intéressants des extremophiles, on peut citer:

6.2.1) Production d'enzymes:

Les Enzymes provenant des microorganismes extremophiles offrent une variété d'applications industrielles dû fait de leur stabilité remarquable sous les conditions extrêmes de pH, température, salinité et sous la présence d'agent chimique dénaturants ces derniers caractérisant de nombreux processus industriels et biotechnologiques. Ce qui est aussi intéressant, leur résistance aux fluctuations de ces paramètres ; la présence de tel caractère optimise des procédés existants ou bien encore le développement d'autres. Cela améliore l'usage et le traitement de la matière première et diminuant le coût du produit final. Comme toutes autres enzymes, leurs biodégradabilités, après leur utilisation, leurs confère une bonne position écologique, favorise ainsi leur utilisation comme alternative des produits chimiques actuels dans certains domaines. (Antranikian, 2008 ; Rohban *et al.*, 2009)

Plusieurs types d'enzymes ont été isolés et caractérisés à partir des espèces extremophiles :

6.2.1.1) DNA polymérase:

Taq polymérase était parmi les premières enzymes des extremophiles qui a trouvé son utilisation dans ces domaines là, isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*. Elle a été de grande utilité. Le fait qu'elle a remplacé Klenow fragment de *E. coli* DNA polymerase I thermo labile au niveau de la PCR et qui devait être remplacée à chaque cycle.

Plusieurs polymérases d'autres espèces d'archaea *Pyrococcus* or *Thermococcus* étaient caractérisés Pwo pol de *P. woesei*, Pfu pol de *P. furiosus*, Deep Vent™ pol de *Pyrococcus* Vent™ pol de *T. litoralis* et TthiPolB isolé de *Thermococcus thio-reducens* et Tma polymerases DNA isolée de *Thermococcus marinus* avec un taux d'erreur dix fois inférieur à celui de Taq polymérase (cela en raison du manque de activité 3' → 5' exo-nucléase de correction de Taq polymérase) (Antranikian 2008 ; Bae *et al.*, 2009 ; Marsic *et al.*, 2008).

6.2.1.2) Hydrolases :

De nombreux processus industriels du textile, de papiers, de l'agroalimentaires, pharmaceutiques et chimiques (en particulier chimie fine) utilisent une panoplie d'enzymes catalysant des réactions d'hydrolyse. Parmi, ces enzymes utilisées, nous citons : les amylases, les cellulases, les endoglucanases, les lipases, les protéases, les DNases et les pectinases etc. L'application des extremozymes, en remplacement des enzymes actuelles, est importante pour la diminution des risques de contamination, l'amélioration du taux de transfert, la diminution de la viscosité et l'augmentation de la solubilité des substrats. (Aguilar *et al.*, 1998 ; Antranikian, 2008 ; Hess *et al.*, 2008 ; Leow *et al.*, 2007 ; Lin *et al.*, 2008 ; Maurelli *et al.*, 2008 ; Ng *et al.*, 2009 ; Rohban *et al.*, 2009).

6.2.2) Les substances antimicrobiennes :

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques connus et le problème de la multi-résistance de certains germes pathogènes telque *Mycobacterium tuberculosis* et la difficulté de la détection de nouveaux composés des environnements naturels et en démarrant de l'idée qu'un environnement « anormale » est corrélé dans certain cas par la synthèse des composés

« anormaux : nouveaux » a encouragé les chercheurs à explorer ces environnements extrêmes afin de satisfaire ce besoin urgent, en nouveaux antibiotiques plus efficaces (**Sánchez et al., 2009 ; Zhao et al., 2008**).

D'autres catégories particulières d'antibiotiques sont recherchées pour répondre à des situations non encore résolues, se sont les halocines.

Les halocines sont des substances antibactériennes de nature protéique produites par des archaéa halophiles (**Rodriguez-Valera et al., 1982**) et elles n'agissent que sur les microorganismes phylogénétiquement proches des souches productrices. Ces substances ont une application notamment dans le domaine alimentaire, comme dans la conservation par salaison des produits alimentaires (viandes, poissons) (**BenAmotz et Avron, 1989**) ou non alimentaires (pour éviter les dommages provoqués par les microorganismes halophiles dans l'industrie du cuir par exemple (**Birbir et Eryilmaz, 2005**).

De nos jours, plusieurs halocines ont été découverts (**Li et al., 2003**). En 2000, **Prangishvili et al., (2000)** ont mis en évidence une activité sulfolobicine produite par le genre *Sulfolobus* (archaea). Avec cette découverte, **O'Connor and Shand en 2002** ont attribué le nom archaeocine pour regrouper toutes les protéines ou peptides doués d'une activité antimicrobienne et produites par des Archaea .

6.2.3) Antitumoraux :

Ces dernières années, on s'intéresse de plus en plus à l'isolement des molécules antitumorales en utilisant comme cible des Archaea halophiles. À la suite des travaux de (**Sioud et al, 1987**). Notre laboratoire a conçu et sélectionné des souches constituant une cible spécifique pour des molécules anti-DNA qui ouvrant des perspectives très prometteuses dans la recherche des molécules antitumorales.

6.2.4) Autres composés :

Nous avons cité d'autres composés qui peuvent être produits par les extremophiles dans le **tableau II**

Tableau II : Autres composés peuvent être produits par des extremophiles.

Composé	Rôles	Applications	Référence(s)
Biopolymers			
Les exopolysaccharides et Biosurfactants :	agents émulsifiants et surfactants	Alimentaire, pharmaceutique, dépollution	Margesin et Schinner, 2001 Yakimov <i>et al.</i>, 1995 ; Gana <i>et al.</i>, 2009
Bioplastiques :	Remplacer le plastique actuel difficilement dégradable.	industries alimentaires, médicales.	Steinbüchel <i>et al.</i>, 1997
Les acides gras polyinsaturés	Important à la physiologie Humaine	Agroalimentaire,	Allen <i>et al.</i>, 1999
Les solutés compatibles	stabilisation des molécules	Agroalimentaire, pharmaceutiques	Sauer et Galinski, 1998.
β-Carotène	utilisé comme colorant, Comme précurseur de vitamine A	Cosmétiques pharmaceutiques	Asker and Ohta 1999
Genès	OGM	Agroalimentaire, pharmaceutiques	Herbert , 1992
H ₂ , ATP, éthanol	bio-énergétique	industries	Maurelli <i>et al.</i>, 2008 ; Antranikian, 2008

Comme la classification des (micro) organismes extremophiles, dont la plupart sont incultivable et en particulier plusieurs espèces d'Archaea, repose sur la biologie moléculaire nous avons jugé utile de consacrer une partie de la bibliographie à certaines notions, méthodes et techniques de cette discipline.

7) Phylogénie moléculaire et ARNr 16 S :

7.1) ARNr 16S (*The Nobel Prize in chemistry 2009*):

7.1.1 Acide ribonucléique ribosomique (ARNr) :

Acide ribonucléique ribosomique (ou ARNr) est le constituant principal des ribosomes auxquels il donne leur nom (*ribo-some*, particule contenant de l'acide ribo-nucléique).

Les différents ARNr sont à la fois l'ossature et le cœur du ribosome, un organite cellulaire servant à la traduction de l'information génétique codée sur un ARN messager (ARNm), lui-même issu de la transcription d'une portion du génome, à partir de laquelle il synthétise les protéines au sein de la cellule. En plus des ARNr, le ribosome est constitué d'une cinquantaine de protéines appelées protéines ribosomiques.

Les ARN ribosomiques ou ARNr sont eux-mêmes produits à partir de gènes codés dans l'ADN. Ils sont transcrits sous forme de précurseurs plus longs qui sont ensuite clivés pour donner les différents ARNr. Dans le ribosome, les ARNr sont repliés sur eux-mêmes, formant une structure tridimensionnelle compacte. Cette structure protège les ARNr qui sont très stables, par opposition aux ARN messagers qui ont en général une durée de vie courte.

7.2.2 ARNr et antibiotiques :

Les ARN ribosomiques des procaryotes sont la cible d'un grand nombre d'antibiotiques utilisés en thérapie humaine ou vétérinaire : aminoglycosides (gentamicine, amikacine, iséпамycine), Tétracyclines, phénicolés. Ces antibiotiques, agissent soit en bloquant la traduction, soit en provoquant des erreurs au ribosome.

7.1.3 ARNr (16S) de la petite sous-unité (30S):

Cet ARNr d'une taille d'environ 1500 nucléotides est impliqué dans la lecture de l'ARN messager. C'est lui qui vérifie que l'interaction entre le codon situé dans le site A du ribosome et l'anticodon de l'ARNt est correcte. L'ARN de la petite sous-unité est donc le contrôleur de la fidélité de la traduction du message génétique en protéine.

La structure secondaire de ARNr 16S fait apparaître une structure riche en épingle à cheveux (**Woese *et al.*, 1983**) (voir Annexe).

Son homologue chez les eucaryotes est l'ARN 18S composé de 1900 nucléotides.

7.2.4 ARNr et la phylogénie moléculaire :

C'est grâce aux travaux de **Woese *et al.*, (1990)** sur le gène de la petite sous unité ribosomal (ARNr16S) que les procaryotes pourraient être encore subdivisés en deux groupes à savoir les Eubacteria et les Archea et en 1990 **Woese *et al.***, introduisent la notion du « domaine »

et proposent une nouvelle classification du monde vivant en trois domaines : Eubacteria, Eucarya et Archea. (**Figure 3**)

Le gène codant la petite sous unité ribosomale 16S n'est plus l'outil moléculaire de la chronologie de l'évolution, l'identification et la classification des êtres vivants. Aujourd'hui, il est devenu un outil incontournable pour caractériser les différentes populations d'un écosystème afin de comprendre et évaluer le dynamisme et la biodiversité globale ou d'une population particulière (bactéries, archea, algues, champignon...etc) d'un écosystème naturel (Case *et al.*, 2007) et en particulier des environnements dites extrêmes Baati *et al.*, 2008 ; Clementino *et al.*, 2008 ; Maugeri *et al.*, 2009 ; Portillo *et al.*, 2009 ; Takishita K *et al.*, 2007 ; Voordeckers *et al.*, 2008).

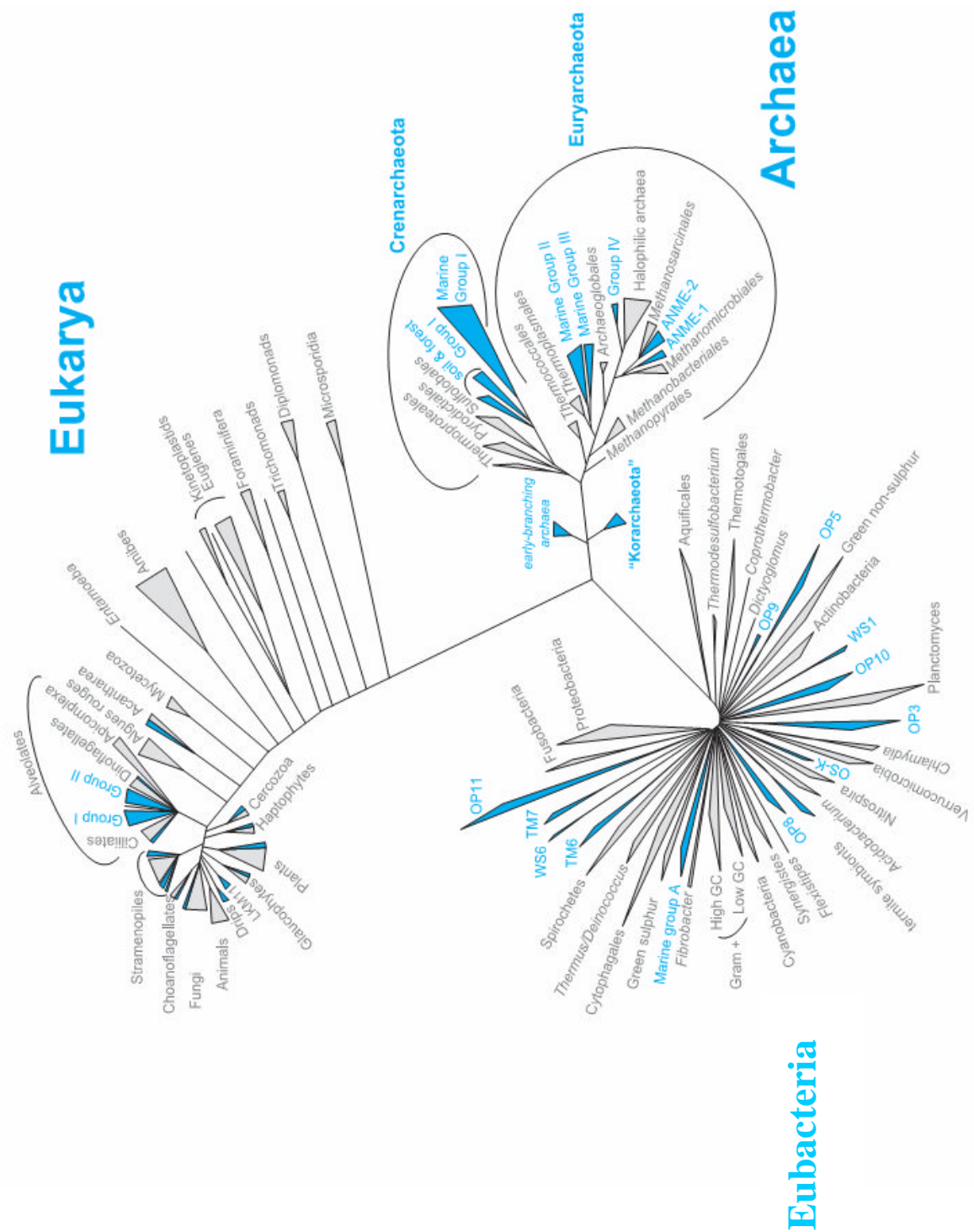


Figure 3 : L'arbre de la vie basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S/18S. Les triangles bleus représentent des lignées pour les quelles aucun membre cultivé n'est encore connu (Woese *et al.*, 1990; López-García, 2005).

7.2) Séquençage :

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre linéaire des composants d'une macromolécule (les acides aminés d'une protéine, les nucléotides d'un acide nucléique comme l'ADN, les monosaccharides d'un polysaccharide, etc.). Le séquençage d'ADN est devenu un outil essentiel en biologie moléculaire tant en médecine que dans de nombreuses autres disciplines des sciences de la vie. L'histoire du séquençage commença il y a un demi de siècle avec les travaux de Sanger sur l'insuline qui a démontré l'importance d'une séquence dans la biologie d'une macromolécule (**Sanger and Tuppy, 1959 ; Sanger, 1959**).

Le séquençage de l'ADN a été décrit plus tard il y a environ 30 ans (**Maxam et Gilbert, 1977 ; Sanger et al., 1977**) et n'a cessé d'évoluer depuis. Le séquençage est devenu une technique courante dans les laboratoires de biologie moléculaire. Actuellement, les techniques les plus utilisées pour séquencer l'ADN qu'il soit humain, bactérien ou autres sont des techniques dérivées de la méthode de Sanger (**Sanger et al., 1977**). Les connaissances acquises grâce à cette méthode étaient très intéressantes mais le besoin et la demande de séquencer des génomes de grande taille, tel que le génome humain, ont amené les chercheurs à développer des techniques de séquençage de plus en plus performantes, rapides et surtout moins chères. (**Lamoril et al., 2008 ; Clyde, 2007**).

Ces techniques en plein essor avec de nouvelles méthodes révolutionnaires pour la plupart vont concurrencer la méthode suprême de dideoxy de séquençage en particulier les techniques basées sur les pyrophosphates « pyrosequencing » telle que la méthode (**Margulies et al., 2005**) connue aussi sous le nom « 454 pyrosequencing » d'après la firme 454 Life Sciences (Branford, CT, USA), qui la commercialise. Ces méthodes sont très avantageuses pour leurs faible coût du séquençage, le gain du temps et la masse d'informations issue d'un seul lancement de la plateforme (appareil) qui génère plus d'un million de lecture individuelle avec une longueur au moyen de 400 bases pour chaque individu (séquence) en 10 heures, ce qui signifie 400-600 millions de bases à peu près 400 à 500 fois plus d'informations obtenues par un lancement d'un puissant séquenceur le MegaBACE™ 4000 DNA Analysis System, 384 capillary sequencer, en 24 heures basé sur la méthode de **Sanger et al., (1977)** .

Ce sont des méthodes qualifiées de « massively parallel ».

7.3) Amplification Enzymatique de l'ADN/ Polymerase Chain Reaction (PCR) :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode d'amplification enzymatique directe d'un fragment d'ADN compris entre deux régions s'hybridant chacune avec une amorce complémentaires et spécifiques à ces deux régions. L'amplification de cet ADN est assurée par la répétition d'un cycle comprenant la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces et l'élongation à partir des amorces par une ADN polymérase thermostable. Cette réaction enzymatique permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN spécifique *in vitro*.

Cette technique (PCR) ou les variantes de cette technique : (RT-PCR), (Multiplex PCR), (QF-PCR) et (PCR-RFLP) sont couramment très utilisées dans plusieurs domaines notamment en médecine ex : pour le diagnostic prénatal de certains maladies , le diagnostic du cancer (**Nicolini et al., 2004 ; Karavitaki, 2005**) et dans le diagnostic rapide des germes pathogènes en particulier les virus et les germes difficilement cultivables (**De Lamballerie,**

1996 ; Jaffe *et al.*, 2000 ; Stewart *et al.*, 2008) évalué leurs résistances aux traitement et le suivi thérapeutique des malades (Caws *et al.*, 2007 ; Herrera-León Let *et al.*, 2005 ; Senturk *et al.*, 2008 ; Wilson *et al.*, 2000) et pour la recherche fondamentale (Chiu *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2006).

7.4) Le clonage moléculaire (technique de l'ADN recombinant) :

7.4.1) Le principe général du clonage :

Le clonage moléculaire consiste en l'isolement et la purification d'un gène (ou d'un groupe de gènes) à partir d'un organisme d'intérêt. Ce ou ces gènes purifiés sont ensuite introduits dans un autre être vivant, appartenant à une espèce différente. Ce récepteur, le plus souvent un unicellulaire (bactérie ou levure) ou une cellule en culture provenant d'un organisme pluricellulaire, en se multipliant, est à l'origine d'une série de cellules (un clone) contenant toutes une copie du gène ou des gènes étrangers.

Les bactéries, les levures et les cellules en culture étant capables de se multiplier rapidement, ces méthodes permettent de produire de nombreuses copies d'un gène donné.

Le clonage moléculaire est l'une des technologies les plus utilisées en biotechnologie pour la production de biomolécules (Arakawa T *et al.*, 1985).

7.4.2 Les étapes du clonage moléculaire :

Le clonage moléculaire implique cinq étapes essentielles.

7.4.2.1 Réalisation du PCR pour le fragment d'intérêt afin de l'obtenir en grande, pur et de bonne qualité ; parfois dans cette étape, on utilise ou pas une digestion enzymatique par des enzymes de restriction pour augmenter le rendement de l'étape suivante.

7.4.2.2 Etape de ligation :

L'ADN à cloner n'est introduit dans la cellule hôte qu'après être lié à un vecteur qui assure sa survie et sa réplication à l'intérieur de cette cellule hôte (vecteur de réplication). En plus, dans certains cas si l'ADN à cloner code pour une protéine, il doit assurer sa réplication et son expression (Vecteur d'expression). C'est pour cela que cette étape est cruciale pour le clonage et le choix du type de vecteur est important.

En plus de ces caractères cités précédemment, les vecteurs portent normalement des gènes qui leur confèrent un avantage sélectif, par exemple une résistance à un antibiotique.

7.4.2.3 La transformation des cellules compétentes :

Depuis sa découverte pour la première fois par **Frederick Griffith** en 1929, la transformation est devenue un outil important en microbiologie, génie génétique, biologie moléculaire et en biotechnologie.

La transformation est le fait qu'une cellule compétente incorpore un fragment d'ADN bicaténaire exogène d'une façon stable et qui peut être exprimé (changement phénotype) ou non.

De nos jours la transformation en biotechnologie n'est plus le phénomène naturel, les cellules bactériennes ne sont plus les seules cellules qui peuvent être transformées (**Himmelbach et al., 2007; Lapidot et al., 2002**) et de plus en plus, on utilise cette technique dans le fondamental : l'étude des gènes, leurs rôles, leurs régulations et leurs expressions (**Enomoto et al., 2001; Ozaki et al., 2005**) que dans l'appliqué (production de Biomolécules «ex : Insuline, vaccins... », OGM) (**Arakawa et al., 1985; Finter et al., 1986**) et prochainement dans la thérapie génique (**Das et al., 1999; Nichol et Kim, 2001; Vinge et al., 2008**).

Le passage de ce fragment d'ADN à travers la membrane plasmique est assuré par plusieurs techniques tels que :

7.4.2.3.1 Eléctroporation :

L'électroporation est l'application d'impulsions électriques contrôlées sur des cellules vivantes afin de perméabiliser la membrane cellulaire : crée des trous « pores » instantanés réversibles au niveau de cette membrane. Cette technique permet d'introduire de façon simple, rapide et efficace de nombreux types de molécules (protéines, ADN) dans de nombreux types de cellules eucaryote et procaryote.

Cette technique est appliquée aussi bien pour la transformation des cellules par l'ADN exogène, en particulier plasmique, que pour son extraction. (**Calvin et Hanawalt, 1988**)

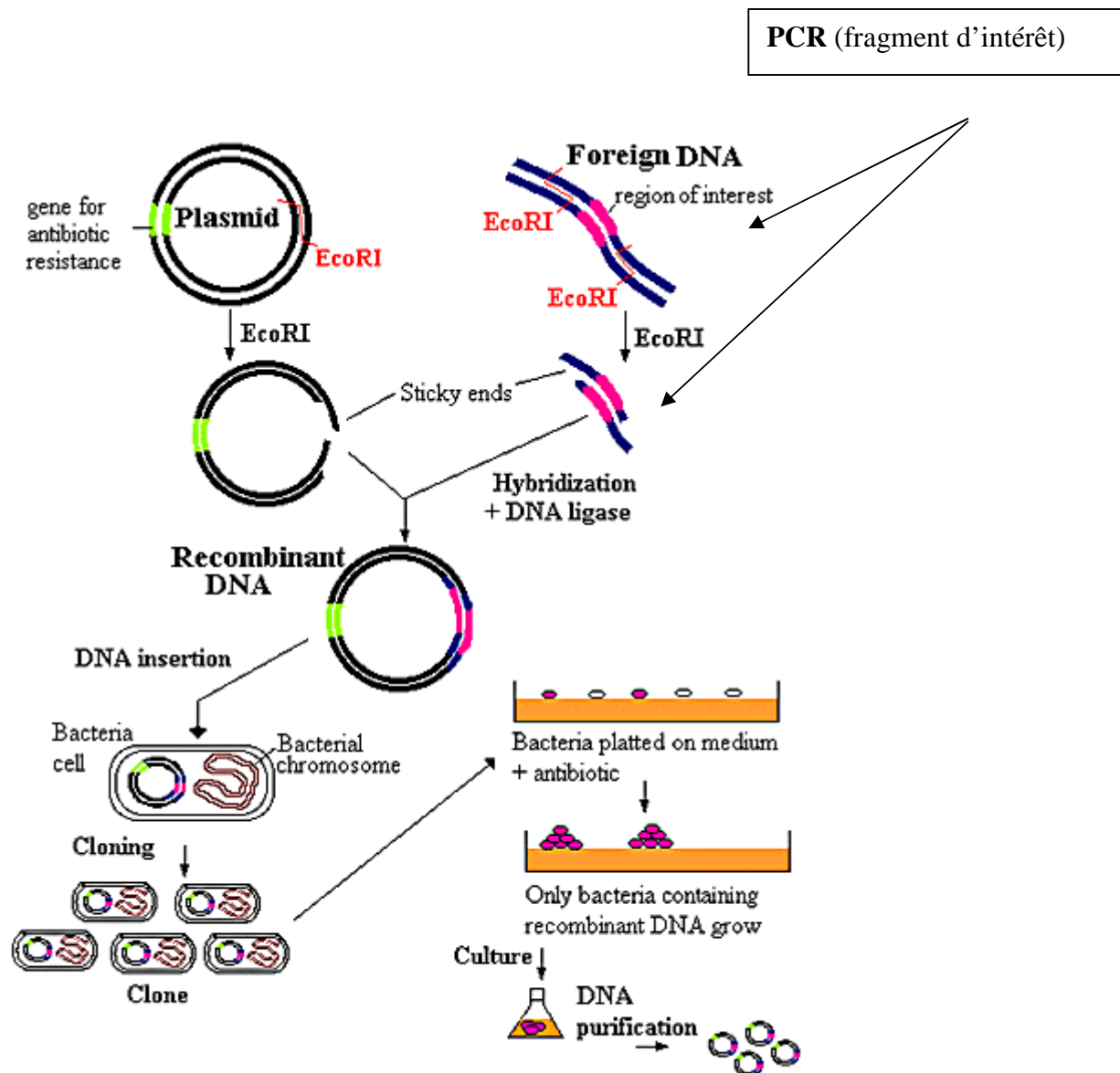
7.4.2.3.2 Le choc thermique :

Il consiste à placer les bactéries à transformer et l'ADN dans un milieu riche en calcium et à soumettre le mélange à un choc thermique (chauffage à 42 °C pendant 45 secs, suivi d'un refroidissement brutal dans la glace) (**Froger et Hall, 2007**).

7.4.2.4 Sélection des clones transformés :

C'est une étape de confirmation. Le but est de savoir si le gène à cloner est bien intégré à l'intérieur de notre cellule hôte.

Cette dernière étape est suivie par une étape d'expression du gène (protéine) ou bien d'extraction du vecteur recombinât (fragment d'intérêt) selon les objectifs.



Cloning into a plasmid

Figure 4 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du clonage moléculaire.

A partir du siteweb :

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Keogh/plasmids.html>

7.5) Construction de l'arbre phylogénétique :

7.5.1) Principe :

La phylogénie moléculaire est l'utilisation de la séquence des macromolécules biologiques pour obtenir des informations sur l'histoire évolutive des êtres vivants et notamment sur leurs liens de parentés, leur phylogénie. Le produit d'une analyse de phylogénie moléculaire est un arbre phylogénétique.

7.5.2) Les étapes de reconstruction d'une phylogénie moléculaire :

La mise en oeuvre d'une reconstruction en phylogénie moléculaire passe par trois étapes:

1. **La construction du jeu de donnée** incluant les séquences d'un ou plusieurs gènes marqueurs dans un certain nombre de taxons d'intérêts. Ces séquences peuvent être nucléotidiques ou bien protéiques (acides aminés) si la portion d'ADN utilisée est codante.
2. **L'alignement des séquences** de ce jeu de donnée pour obtenir une matrice de position homologue, c'est à dire qui dérivent chacune d'une position ancestrale commune. Cette étape passe généralement par l'utilisation d'un programme d'alignement de séquences mais les imperfections des algorithmes requièrent bien souvent une édition manuelle des alignements ainsi qu'une élimination des positions ambiguës.
3. **La phylogénétique proprement dite** par l'analyse de cette matrice de positions grâce à un programme MEGA4 implémentant un algorithme de reconstruction phylogénétique.

7.6) Les banques de séquences :

Les banques des séquences les plus connues sont Genbank (USA), EMBL : *European Molecular Biology Laboratory* (Europe), *DDBJ DNA Data Bank of Japan*. (Japon). Ces banques s'interchangent les informations entre elles. Il suffit de faire le traitement (dépôt, téléchargement et comparaison des séquences) sur une de ces banques de séquences et cela pour ne pas avoir une redondance de l'information.

Ces banques de séquences sont des serveurs (ordinateurs puissants) qui stockent d'énormes quantités de données avec des microprocesseurs très rapides.

Ces banques de séquence sont consultées par l'internet.

CHAPITRE II:

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Zone d'étude :

1.1) Présentation :

Le Sahara algérien s'étend sur les 5/6 de la superficie du pays avec plus de 2 millions de Km². Il recèle d'importantes ressources en eaux. Certaines d'entre elles sont des sources thermales ou des eaux de surface qui peuvent constituer des sebkhas et des chotts à cause de leur forte teneur en sel, elle est due essentiellement à l'évaporation et à la remontée du sel. Ainsi, dans le cadre de ce travail, nous avons étudié deux d'entre elles à savoir la Sebkha d'EL GOLEA et de Hammam El-Hadjeb de Biskra. Nous y avons prélevé des échantillons et étudié la diversité microbienne en particulier la flore thermohalophile. Par ailleurs, nous avons procédé également à un screening pour la mise en évidence de biomolécules pouvant être d'intérêt en particulier dans le domaine de la santé.

1.1.2) Situation géographique:

Sebkha El Golea :

Elle est limitée au Nord par Chebka du M'Zab, au Sud par le plateau de Tademaït, à l'Est par Ouargla et à l'Ouest par l'erg occidental. Elle est éloignée de 270 Km au SN de Ghardaïa et de 380 Km au NE de Timimoun et 1000 Km la sépare d'Alger.

El Goléa (El-Menea) est une oasis au centre du Sahara algérien dans une dépression de Oued Seggeur au Sud-Ouest à mi-chemin de l'axe routier Alger - Tamanrasset.

La Sebkha est alimentée essentiellement par les eaux souterraines, les eaux de drainage de la palmeraie, les eaux domestiques de la ville et enfin par les eaux de précipitations qui sont très rares avec une pluviométrie de 89mm/ans et un fort taux d'évaporation 2121mm/ans durant la session sèche, ce qui fait augmenter de façon continue la salinité qui peut atteindre jusque 30% (W/V) (**Hacène et al., 2004**). Le climat est de type aride, Les Températures varient de 12 à 23°C en hiver et 25 à 35°C été.

Hammam El-Hadjeb :

La ville de Biskra est située à environ 240 km au Sud de Constantine. Le climat y est saharien sec. Au Nord, se trouvent des montagnes et des hauts plateaux ; au Sud des plateaux. Hammam El Baraka ; à El Hadjeb, se situe à 10 km au sud de Biskra.

Son eau est caractérisée par sa haute température qui est de l'ordre de 80°C et sa richesse en éléments minéraux tels fluor, calcium et en soufre.

1.2) Le Prélèvement des échantillons:

Les échantillons ont été prélevés durant le mois de décembre de l'année 2007 au niveau des deux sites Hammam El-Hadjeb et sebkha El Goléa.

Concernant les échantillons en provenance de sebkha El Goléa, deux échantillons (un du bord et un autre du centre du lac) de sols chacun d'une quantité de 1Kg ont été prélevés et deux

échantillons liquide de (01 ℓ) (un du bord et un autre du centre du lac). Pour ce qui est des échantillons de Hammam El-Hadjeb, nous avons échantillonné un volume d'eau de 1ℓ.

1.3) Analyse physicochimique :

La nature et la composition de l'habitat (eau, sol) conditionnent le développement et la répartition de la flore microbienne. C'est pourquoi, nous avons jugé utile d'étudier certains paramètres physicochimiques de nos échantillons provenant de Sebka El Goléa et Hammam El-Hadjeb en particulier la conductivité, le pH, la température et la salinité qui ont été mesurés in situ à l'aide d'un multiparamètre portable.

Pour l'analyse physicochimique des eaux de Hammam El-Hadjeb elle a été faite par **Tabouche et Achour** et celle de Sebka El Goléa par **Hadj Rabia**.

2) Isolement et purification des souches thermohalophiles:

2.1) Isolement:

L'isolement des souches thermohalophiles a été effectué sur le milieu Shigel et Gibbons modifié par **Hacène et al., (2004) (SGMH)** dont la composition est la suivante (par litre d'Eau distillée q.s.p):

Chlorure de sodium (NaCl) 100 ou 200g, Bicarbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) 5g, Sulfate de magnésium (MgSO_4) 1g, Chlorure de potassium (KCl) 3g, Citrate trisodique 3g, Extrait de levure 10g, Casaminoacide 7.5g. Pour le milieu solide on rajoute 20 g/l d'agar (Difco).

Une étape d'enrichissement est préconisée sur le même milieu (**SGMH**) liquide dans des Erlenmeyers de 100 et 250 ml à raison 1/5 (V/V d'air) sous une forte agitation 160 rpm afin de créer l'aérobiose.

L'incubation dans les deux cas est effectuée à 55 °C.

2.2) Purification et conservation des souches isolées :

La purification est réalisée par la méthode des stries et par repiquage successifs sur le milieu SGMH solide (10 ou 20% de NaCl en fonction du milieu d'isolement).

Les boîtes ainsi préparées sont mises dans des sacs en plastique pour éviter la dessiccation précoce du milieu, puis incubées à 55°C pendant 7 jours selon la méthode de **Rodriguez-Valera, (1979)**.

La conservation des souches purifiées a été faite dans des tubes à essai contenant le milieu SGMH gélosé, coulé de façon inclinée.

Après incubation à 55°C pendant 5 jours et vérification de la croissance et de la pureté des souches, les tubes sont conservés à +4°C et au congélateur.

3) Caractérisations des souches isolées :

3.1) Etude Morphologique :

3.1.1) Aspect macroscopique

Il a été déterminé en observant à l'oeil nu les colonies obtenues sur SGMH. Nous avons noté : la forme, l'aspect, la chromogénèse, l'opacité, la consistance et le diamètre.

3.1.2) Aspect microscopique :

L'observation d'une préparation à l'état frais d'une goutte de suspension microbienne entre lame et lamelle par microscope photonique Zeiss aux grossissements (G400 et G1000) nous a permis de déterminer la forme des isolats et leur mobilité si elle existe. Pour nos souches halophiles, nous avons utilisé une eau physiologique à 10% ou 20% en NaCl.

3.2) Etude physiologique et biochimique :

Il est bien de signaler que compte tenu de l'objectif de notre travail qui consiste à isoler des souches thermohalophiles, il nous a fallu adapter l'ensemble des méthodes conventionnelles d'étude en ajoutant du NaCl à différentes concentrations et en effectuant les incubations à 55°C.

3.2.1) Etude physiologique :

3.2.1.1) Détermination de la concentration optimale de salinité nécessaire pour la croissance des souches isolées :

Les souches isolées sont ensemencées par la méthode des stries sur le milieu SGMH solide additionné de NaCl à différentes concentrations: 1%, 2% 5% ,10%,15%, 20% ,25% et 30% une boîte sans sel sert comme témoin. L'incubation est faite à 55°C pendant 5 jours. La concentration optimale correspond à la concentration où la meilleure croissance est obtenue. Ce test nous permet de classer nos isolats selon leur comportement vis-à-vis du sel (NaCl) d'après la classification de (**Ventosa *et al.*, 2008**).

3.2.1.2) Détermination de l'optimum de pH et de température nécessaires pour la croissance des souches sélectionnées :

Pour déterminer le pH et la température optimum de croissance des souches, on utilise le milieu SGMH solide avec la concentration optimale en NaCl de la souche déterminée auparavant et en faisant croître les souches aux valeurs de pH suivantes : 5, 6, 7, 8, 9,10 L'incubation s'effectue à 55°C pendant 5 à 7 jours.

L'étude de la température optimale est réalisée sur milieu SGMH. L'incubation s'effectue à différentes températures 30°C, 40°C, 55°C, 60°C, 70°C.

Les conditions optimales de croissance sont déterminées visuellement là où la croissance est la meilleure.

3.2.2) Etude biochimique :

3.2.2.1) Caractérisation des souches sélectionnées par la galerie API :

La galerie utilisée est l'API 20E. Elle est utilisée afin de caractériser les souches sélectionnées mais non pour les identifier. Les galeries Api utilisent plusieurs types de tests : étude de la fermentation de divers glucides, auxanogramme et la recherche directe et indirecte d'enzymes. Chaque cupule (20 cupules pour notre API20 E) contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir. La galerie ainsi préparée est mise dans d'un sac en plastique pour éviter la dessiccation, puis incubé à 55°C pendant 7 jours.

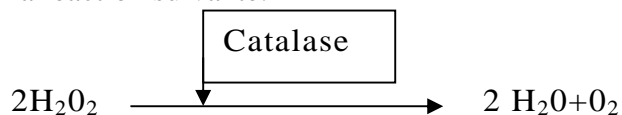
Après addition des réactifs nécessaires à la révélation de différents tests, la galerie est lue conformément aux indications du fabricant Biomérieux et codée. Pour cela, les tests négatifs sont codés (-) alors que le code affecté aux tests positifs est (+).

3.2.2.1) Autres tests enzymatiques utilisés :

En plus des 20 tests analysés par la galerie API 20E, nous avons effectué d'autres tests :

Recherche de la catalase:

La catalase est l'enzyme qui catalyse la réaction de dismutation de l'eau oxygénée selon la réaction suivante:



Elle est mise en évidence en mettant sur une lame propre une goutte de peroxyde d'hydrogène puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée avec une pipette pasteur boutonnée stérile. L'apparition immédiate de bulles gazeuses indique que la réaction est positive.

Étude de la dégradation de l'amidon :

Le milieu SGMH solide est additionné d'une solution d'amidon soluble 10%. Après répartition en boîte de Pétri, le milieu est ensemencé en spot puis incubé à 55°C pendant 7 jours.

Après culture on inonde la boîte avec de l'iode à 10% qui colore l'amidon en bleu violacé et l'action de l'amylase se traduira par des zones claires autour des colonies (**Takashina et al., 1990**).

Étude de la dégradation de la Caséine et de la Cellulose :

Le milieu SGMH sans casaminoacide et sans extrait de levure est additionné avec 0,1% respectivement de caséine et cellulose; pour la solidification du milieu on ajoute 20g/l d'agar. Après ensemencement par striés, les boîtes sont incubées à 55°C pendant 5 à 7 jours. Le résultat positif se traduit par la croissance du microorganisme sur le milieu donc il possède l'enzyme et il a pu utiliser les substances rajoutées comme source de carbone (**Marchal *et al.* , 1987**).

Étude de l'activité lipolytique :

Sur milieu SG, sans casaminoacide et sans extrait de levure, 1 g/l de CaCl₂ 2H₂O et 1 ml de l'huile d'olive (V/V), on ensemence les souches en spot.

Après incubation à 55°C pendant 30 jours, l'activité lipolytique positive se traduit par la croissance des bactéries. (**Marchal *et al.* , 1987**).

3.3) La phylogénie moléculaire :

Les souches sélectionnées ont été étudiées de manière approfondie notamment par une analyse moléculaire du gène de l'ARNr16S du fait que cette étude est primordiale dans l'étude des extremophiles et dans la discrimination du domaine des Archaea de celui des Eubacteria.

Nous avons jugé utile de détailler cette étude qui a été réalisée dans le cadre d'un stage au niveau de l'Université de Warwick en Angleterre.

3.3.1) Le séquençage :

La méthode appliquée pour le séquençage des souches est celle de **Sanger *et al.*, (1977)**.

Le séquençage d'un ADN en suivant cette méthode est réalisé après certaines étapes préparatives qui assurent sa disponibilité, son amplification et sa pureté ces étapes sont : l'extraction d'ADN, l'amplification par PCR et l'électrophorèse des produits amplifiés afin de les purifier pour un séquençage direct ou après Clonage. Ces étapes ont été effectuées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université de Warwick et le séquençage en lui-même était effectué au niveau du service de biologie moléculaire de l'université.

Les souches sélectionnées pour cette étude ont été transportées dans de petits tubes en plastique autoclavable contenant le milieu SGMH incliné.

Elles étaient revivifiées dans du SGMH liquide à 55°C sous agitation à 150 tr/min pendant une semaine.

3.3.1.1) Extraction et purification d'ADN :

L'extraction de l'ADN à partir des cellules a été faite selon deux méthodes :

3.3.1.1.1) La méthode classique (Extraction (phénol / Chloroforme)):

Elle est applicable pour extraire les protéines, ADN et ARN. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines des acides nucléiques. Les acides nucléiques sont ensuite extraits avec du chloroforme. La séparation des phases aqueuse (chloroforme) de la phase organique (phénol) est effectuée par centrifugation à grande vitesse 13000 rmp. La phase aqueuse est par la suite transvasée dans de nouveaux tubes à l'aide d'une micropipette. Les acides nucléiques sont finalement récupérés sous forme solide à la suite d'une précipitation par l'alcool (isopropanol) à 70% (refroidi à +4°C).

De nombreuses préparations sont disponibles. La préparation que nous avons utilisée est celle de Promega : Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:25:1, prêts à l'emploi, ce qui permet de simplifier les opérations de purification.

L'extraction consiste en trois étapes :

Dans la première étape, 1.5 ml de chaque culture liquide des souches analysées est transvasé dans un microtubes de 2.0 ml et centrifugé pour récupérer les cellules. Le surnageant est remplacé par 0.5 ml de solution de lyse (annexe). La réaction de lyse nécessite environ 30 min d'incubation à une température de 37 °C.

Dans, la deuxième étape, on ajoute 20 µl d'eau distillée et 100 µl 10% SDS aux microtubes puis on agite au vortex pendant 1 minute.

La troisième étape est l'extraction proprement dite par l'ajout de 250 µl de solution Phénol/chloroforme/isoamyl alcool 25:25:1. On agite au vortex pendant 30 secondes puis on centrifuge à 13000 rpm pendant 10min et on récupère la phase aqueuse (contenant les acides nucléiques) dans un autre tube. Afin de récupérer plus d'ADN, 200 µl de la solution Tris-EDTA sont ajoutés à la phase phénolique, puis on mélange bien avec le vortex pendant 30 secondes. On centrifuge à 13000 rpm pendant 10min et la phase supérieure est récupérée et ajoutée avec la phase aqueuse de l'étape précédente.

On ajoute 200µl de Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:25:1 à **la phase aqueuse** (afin d'éliminer d'éventuelles protéines résiduelles), on mélange bien avec le vortex pendant 30 secondes, on centrifuge à 13 000 rpm pendant 10 min et on récupère la phase aqueuse. Cette étape est répétée deux fois.

La précipitation de l'ADN est réalisée par l'addition d'une solution d'acétate de potassium (3M en K ; pH 5,5) à raison de 0,1 (V/V) et 1 volume isopropanol à 70%(refroidi à +4°C). Après agitation au vortex pendant 30 secondes on incube 5 min à 20°C. La pelote d'ADN est récupérée après une centrifugation à 13000 rpm pendant 5min.

Le lavage de la pelote d'ADN se fait avec de l'éthanol à 70%. Puis, une Centrifugation à 13000 rpm pendant 2 min. On laisse évaporer le reste de l'éthanol en ouvrant les tubes sous une hote pendant 10 min.

Enfin, pour ne pas altérer l'ADN on dissout la pelote dans 50 µl d'une solution TE (Tris-EDTA ,10:1 mM) et l'ADN est conservé à +4°C (Conservation de courte durée).

3.3.1.1.2) La méthode par les Kits:

Le kit que nous avons utilisé est celui de QIAGEN - DNeasy Blood & Tissue kit. Cette méthode est rapide, moins dangereuse (Non utilisation du phénol) et standardisée. Elle utilise principalement une digestion enzymatique par la protéinase K et des colonnes qui contiennent une membrane spécifique. La séparation est due au fait que les acides nucléiques peuvent s'adsorber à une phase solide (la membrane: silice ou autre) sous certaines conditions de pH et en fonction de la concentration en sel de la soluté de fixation alors que les autres composants cellulaires sont éliminés dans ces conditions. Pour éluer les acides nucléiques, on utilise un tampon d'élution EB (10mM TrisHCl, pH 8.5).

3.3.1.2) Amplification du gène ARN 16S par PCR :

L'amplification du gène de l'ARN 16S par PCR est une étape importante pour son séquençage par la méthode de **Sanger *et al.*, (1977)** et sa purification et ce afin d'obtenir un grand nombre de copies de bonne qualité pour une meilleure détection par le séquenceur.

Le mélange réactionnel que nous avons utilisé pour la PCR contient:

- 2µl D'ADN génomique des souches qui contient le fragment à amplifier,
- 1.5 µl de chacun des primers universels pA/pH (annexe) détectant le gène ribosomal 16S,
- 25 µl du mélange Master Mix (annexe),
- 1Ml BSA pour la saturation des sites non spécifiques,
- 20µl Eau ultra purifiés (free DNase).

L'amplification est faite dans un thermocycleur de marque **Thermo Scientific thermohybrid** comportant 96 puits. Le programme d'amplification pour la PCR « Le cycle thermique » est donné dans le **tableau III**.

Tableau III : Le programme d'amplification pour la PCR « Le cycle thermique ».

Etape	répétition	rôle
95 C° 10min.	1	Dénaturation complète de l'ADN
Cycle principal : 95 C° 1 min 55 C° 1 min 75 C° 1 min 30 secs	35 fois	Amplification (dénaturation, hybridation synthèse,)
75C° 10 min	1	Une élongation finale.
4 C° jusqu'à utilisation	*	Conservation de courte durée

* Reste à cet état (+4 °C) jusqu'à l'arrêt manuel par l'utilisateur

3.3.1.3) Electrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% :

Cette technique est basée sur le déplacement de particules chargées en solution, sous l'influence d'un champ électrique (120V, 250mA) généré par un courant continu pendant une heure 30 min. Les molécules d'ADN chargées négativement à pH neutre migrent alors vers l'anode (+) et leur vitesse est inversement proportionnelle à leur taille. L'électrophorèse permet le contrôle de la qualité de l'ADN obtenu après les étapes d'extraction et de purification à partir des échantillons ainsi que le contrôle des fragments obtenus après amplification de l'ADN par PCR. La visualisation de l'ADN est possible grâce à l'utilisation d'un produit intercalant, le Bromure d'Ethidium (BET Cancérogène) qui émet une fluorescence sous U.V. Le gel d'agarose est préparé avec du tampon d'électrophorèse (TAE 1X). Les produits de la PCR sont mélangés avec du tampon de charge (6x Loading Dye, MBI Fermentas) puis déposés sur le gel ainsi qu'un marqueur de taille " GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder " (Fermentas) permettant de localiser le gène d'ADN codant l'ARN 16S qui est de l'ordre de 1.5 Kb dans la colonne de migration. A la fin de la migration, le gel est photographié avec un appareil d'analyse d'images sous lumière UV (300nm) afin de conserver et d'analyser les résultats.

3.3.1.4) Purification des amplicons (Extraction de l'ADN du gel) :

Les bandes des échantillons de l'ADN pour lesquels l'amplification par PCR est satisfaisante, par leur spécificité et leur rendement sont ensuite coupées à l'aide d'un scalpel stérile. L'extraction de l'ADN du gel et sa purification est effectuée à l'aide du kit "QIAquick PCR purification ou gel extraction" (Qiagen®). Le principe de ce kit, est similaire à celui du QIAGEN - DNeasy Blood & Tissue kit. Il repose sur le fait que dans un milieu à forte concentration saline (tampon PB) et à un pH voisin de 7.5. L'ADN se fixe à une membrane de silice par liaison hydrogène. Les contaminants tels que : l'agarose, les sels, les amorces, les enzymes et les dNTP non incorporés sont ensuite éliminés par lavage alcoolique au tampon PE.

Enfin, l'ADN adsorbé à la membrane est élué avec de la solution EB (10mM TrisHCl, pH 8.5). Une électrophorèse de contrôle permet ensuite de vérifier le bon déroulement de la purification et de quantifier l'ADN.

3.3.1.5) Quantification de l'ADN et le degré de pureté :

La quantification des acides nucléiques a été faite à l'aide d'un appareil spectrométrique **NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific)**. Il mesure la densité optique d'une solution en donnant la quantité ADN ou de protéine en µg à partir d'une goutte de l'ordre d'un (1) µl de cette solution et son degré de pureté de l'ADN (le rapport Do260nm/Donm280). Ce dernier doit être compris entre 1.8 et 2.0 pour que la purification soit considérée comme satisfaisante.

Dans notre étude nous l'avons fait une seule fois après extraction de l'ADN génomique mais chaque fois pour les produits de la PCR et cela afin d'ajuster les concentrations pour un meilleur rendement du séquençage.

L'appareil doit être calibré avant chaque utilisation. Il faut bien mélanger la solution avant de prélever la goutte et faire au moins trois lecture pour le même échantillon.

3.3.1.6) Séquençage des produits d'amplification :

Les gènes de ARN 16S des différentes souches pour lesquels la PCR a été jugée satisfaisante, leurs quantités sont ajustées selon la méthode retenue par le service de biologie moléculaire de l'Université de Warwick qui recommande une concentration de 17ng-67ng par 10µL de volume total pour les fragments entre 1000 et 2000 bases. Pour chaque souche à séquencer deux tubes de 0.5 µl sont utilisés dans les quels un volume final de 10 µl de produit de PCR et 5.5 pico Mol de chacun des primers est ajouté dans l'un ou l'autre des tubes pour permettre le séquençage à partir des deux extrémités du gène de l'ARN 16S avancée (F : Forward) et retardée (R : Reverse). Le séquençage proprement dit est effectué à l'aide du séquenceur de marque **ABI PRISM 3130xl Genetic Analysers**.

La réaction de séquence dérive de la méthode de **Sanger et al., (1977)**. Il s'agit d'une interruption contrôlée de la répliation enzymatique à l'aide de terminateurs marqués: les didésoxynucléotides (ddNTPs). Il en résulte la synthèse de fragments de différents tailles ; une taille donnée reflète la position d'une base donnée. Le gel de migration de différents fragments est ensuite analysé par le séquenceur.

3.3.1.7) Recherche de l'homologie :

Pour l'analyse des séquences, chacune d'elle est comparée aux données des banques de séquences : locale, commerciale ou publique (par exemple Genbank). C'est cette dernière que nous avons ciblée puisqu'elle est considérée parmi les plus grandes banques de séquences accessibles gratuitement sur l'Internet. La similarité doit être interprétée prudemment. Elle doit être de bonne qualité (Absence de nucléotide non résolu « N » et des vides artificiel «- ») et les séquences doivent être issues de laboratoires reconnus sur le plan scientifique.

Cette recherche est accessible grâce à Internet en accédant à un des sites spécialisés qui possèdent des moteurs de recherche pour les séquences nucléotidiques.

Tels que :

Le NCBI avec son moteur de Recherche le Blast.

Le EMBL avec son moteur de recherche le FASTA.

Dans notre cas, nous avons utilisé le Blast.

3.3.2) Le clonage moléculaire (technique de l'ADN recombinant) :

Compte tenu du fait de l'incapacité physique du séquenceur que nous avons utilisé à dépasser le cadre de lecture de 600pb pour le séquençage des produits de PCR, nous avons fait appel au clonage moléculaire pour deux souches seulement les plus intéressantes du fait du coût exorbitant du kit de clonage.

Le clonage a été effectué avec le kit Promega, en suivant les étapes décrites ci-dessous.

3.3.2.1) Réalisation de la PCR :

La PCR est faite à partir de l'extrait d'ADN génomique en utilisant les primers adéquats. Dans ce cas, il s'agit du pA/pH. Les amplicons sont ensuite récupérés pour l'utilisation dans les étapes suivantes :

3.3.2.2) Etape de ligation :

Nous avons mis les amplicons du gène ARN 16 S des souches à cloner en contact avec le vecteur (le plasmide pGEM®-T : Annexe) et en présence de la ligase pendant une nuit à +4 °C afin d'assurer la formation du vecteur recombinant (plasmide recombinant).

3.3.2.3) Transformation des cellules compétentes :

La cellule compétente que nous avons utilisée est une souche d'*E.coli* JM109 (Cat#L2001). Elle provient de la firme Promega sélectionnée par sa capacité d'intégrer l'ADN exogène sous forme de plasmides sous les conditions de transformation. Cette souche est lactose (-) et Ampicilline (sensible).

La technique que nous avons appliquée pour assurer le passage du vecteur à travers la membrane plasmique est celle du choc thermique (chauffage à 44 °C suivi d'un refroidissement brutal dans de la glace).

La réussite de la transformation est traduite par la capacité de la souche *E.coli* à croître sur une gélose LB (Luria-Bertani) additionnée d'ampicilline 100 µg/ml (le caractère de la résistance à l'ampicilline est apporté par le plasmide).

La réussite de la formation d'un vecteur recombinant est visualisée par les colonies blanches qui auraient intégré le gène au milieu du gène de bêta galactosidase aboutissant à la non expression de ce dernier. Les colonies bleues sont généralement des colonies qui seraient transformées par le plasmide intact « plasmide non recombinant ».

3.3.2.4) Sélection des clones transformés :

Les colonies blanches sont prélevées et suspendues dans 20 µl d'eau physiologique stérile. Après une légère agitation, sur 5 µl de cette suspension, on réalise une PCR. On utilise cette fois-ci les primers SP6, T7 (annexe).

Si l'ADN (plasmide recombinant) est bien incorporé (stable), on aura au niveau du gel d'électrophorèse l'apparition d'une seule bande dans chaque colonne de migration au même niveau que la bande 1.5Kb du marqueur de poids moléculaire.

3.3.3) La conception des primers :

Compte tenu du fait que le nombre maximum de base par séquence obtenu est de 900 pb alors que le gène ribosomal 16S est d'environ 1500 pb et afin de compléter au maximum la séquence d'une souche d'intérêt (éclaircir la région centrale) nous avons utilisé une autre stratégie qui fait intervenir des outils de bioinformatique.

Ainsi de nouveaux primers permettent un séquençage par partie du gène ARNr 16S sont conçus. Dans ce cas, les primers doivent se positionner au milieu du gène ribosomal 16 S limitent ainsi avec les primers universel (qui se localisent aux extrémités) les fragments à séquencer avec obligatoirement des régions chevauchantes. Une PCR est ensuite effectuée pour chaque couple de primers (avancé : F, retard : R). Les fragments (amplicons) sont séquencés. Puis on fait l'assemblage final des différentes parties pour obtenir le gène complet.

La stratégie commence par la construction d'une banque de séquences locale (un fichier format FASTA regroupe ces séquences construit localement sur le microordinateur). L'obtention des séquences entières des espèces similaires 97%-99% séquencées par différents auteurs obtenus à partir des premiers résultats (900pb) est faite en utilisant le NCBI-BLAST. Ensuite, on les regroupe et on aligne ces séquences à l'aide du programme bioinformatique clustalW et la séquence consensus obtenue sert à la conception des primers.

La séquence est copiée, collée dans le programme bioinformatique Primer3 selon la méthode de **Rozen et Skaletsky, (2000)**.

Le programme bioinformatique Primer3 en plus du fait qu'il donne les primers et les propriétés de ces primers Tm (température moyenne pour que 50% des sondes soient hybridées), GC%, nous permet aussi d'avoir une idée sur la taille et la position des fragments qui vont être générés par la PCR.

Assemblage des fragments :

L'assemblage des différents fragments séquencés afin d'obtenir la totalité du gène a été réalisé à l'aide du logiciel bioinformatique « BioEdit » .

La première étape de cet assemblage implique l'élimination des nucléotides ambigus (N) des deux extrémités.

La deuxième étape est réalisée en cliquant sur « Accessory Application » puis sur « CAP contig assembly program ». Enfin pour la troisième étape, on accomplit l'assemblage en cliquant sur « Run Application »

3.3.4) La construction de l'arbre phylogénétique :

La séquence obtenue du gène codant l'ARN 16S de la souche est confrontée à une banque de données Genbank par l'intermédiaire du programme de recherche BLAST qui permet de comparer une séquence nucléotidique inconnue avec les banques de séquence et de retenir les séquences les plus proches.

Les séquences des espèces déjà décrites et qui représentent entre 94 et 99 % de similitude sont téléchargées et sauvegardées dans un seul fichier (banque de séquences locales). Alignées par clustalw logiciel intégré dans MEGA 4 (**Tamura et al., 2007**), la construction de l'arbre est faite selon la méthode Neighbor-Joining (**Saitou N and Nei M, 1987**) avec bootstrap test avec 1000 répétitions.

3.3.5) Le dépôt de la séquence :

La banque que nous avons choisie est GenBank. Le dépôt a été fait grâce à son site par la méthode Bankit (spécifique pour le dépôt de séquence individuelle). Pour cela, on remplit les formulaires demandés et le traitement de l'information est fait en quelques jours.

La séquence est ensuite accessible via les moteurs de recherches (BLAST : Basic Local Alignment Search Tool ou FASTA) avec le numéro associé donné.

3.4) La mise en évidence de biomolécules:

3.4.1) Les activités d'antagonisme :

Cette étude est effectuée pour permettre la mise en évidence d'une éventuelle production de substance anti-cellulaire chez les souches isolées contre des souches cibles. Ces dernières sont des :

Archaeobactéries isolées et caractérisées auparavant de la Sebkhia d'EL Golea (TC6 ; G25 : **Boutaiba et al., 2006; Mecknaci, 2008**) qui ont été retenues pour deux raisons principales : ces souches se sont avérées sensibles à de nombreux antibiotiques et notamment à ceux classés parmi les anti tumoraux (Hacène, communication personnelle). La seconde raison est leur résistance aux B-lactamine (car elles ne possèdent pas une véritable paroi).

Eubactéries : des souches bactériennes pathogènes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Micrococcus luteus* la souche 2YB (isolée et caractérisée par **Benmalek et al., 2006**) et *Enterococcus faecalis* ATCC 43300.

Levures : *Saccharomyces cerevisiae*

La production des substances inhibitrices est mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar selon la méthode de **Meseguer et al., (1986)**.

Technique des cylindres d'agar:

À partir des cultures microbiennes liquides citées précédemment et âgées de 18 heures pour les germes pathogènes et *S. cerevisiae* et de sept jours pour la TC6 et G25. Ensuite, on prélève un volume de 0.1 ml de la culture que l'on dépose sur milieu SGMH 25% pour les souches TC6 et G25 et Mueller-Hinton pour le reste des autres souches. L'incubation est faite pendant 5 jours pour TC6 et G25 alors que les autres germes cibles (bactéries et la levure), elle est de 18 heures.

Après, trois disques d'agar de 5mm de diamètre, contenant les différentes souches test et un quatrième disque témoin (disque d'agar non ensemencé), âgées de 7 jours sont déposés à la surface des boîtes « préalablement ensemencées avec le germe cible ».

Les boîtes ainsi préparées sont mises à 4 °C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances inhibitrices, puis incubées à la température et la durée d'incubation adéquates aux germes cibles.

La lecture se fait par la mesure du diamètre des zones d'inhibition.

3.4.2) Activités enzymatiques (Les amylases) :

Le activité amylolytique est mise en évidence selon la technique de **Takashina et al., (1990)**.

CHAPITRE III:

RÉSULTATS ET DISCUSSION :

1) Analyses physicochimiques des échantillons :

Les paramètres physicochimiques des échantillons sont donnés dans le tableau IV

Tableau IV : Paramètres physicochimiques des échantillons des sites des prélèvements.

Site	Type	Localisation	Température C°	pH	Conductivité mS/cm	Salinité g/l
El-Hadjeb		centre	80	7.14	3.19	1,1
El Goléa	Liquide	bord	25	8.52	3.05	1.7
		centre		7.93	137.7	13.8
	Solide	bord		7.75	5.35	3.2
		centre		7.44	4.43	2.6

Il ressort de ces analyses que les eaux de Hammam El-Hadjeb sont des eaux chaudes mais peu salinées alors qu'on constate l'inverse pour les échantillons en provenance de Sebkh El Goléa qui renferment une teneur en sel importante mais la température est relativement basse. On perçoit donc qu'il s'agit de deux type d'échantillons où l'on s'attend respectivement à isoler des hyperthermophiles et halophiles.

Il faut savoir que ces variables (de sebkh d'El Goléa) ont été mesurées au mois de décembre alors que **Hacene et al., 2004** ont trouvé des valeurs plus accentuées du fait que ses mesures ont été faits au mois Mai.

2) Isolement des souches Thermohalophiles:

Concernant les eaux en provenance de Hammam **El-Hadjeb**, aucune souche n'a pu être isolée avec les conditions utilisés à savoir : Le milieu SGMH avec un pH=7 et salinité =10 ou 20%, sous agitation (en aérobiose) et avec une température d'incubation de T=55°C.

L'incapacité d'isoler des souches de ce site peut être expliquée par :

- la pauvreté de ces milieux extrêmes en terme de quantité et en biodiversité des espèces cultivables. Ce résultat a été déjà rapporté par (**Bouanane et al., 2009**) sur d'autres sites chauds.
- le méthode utilisée pour la culture et l'enrichissement d'une petite quantité d'eau, alors qu'on recommande de faire une filtration et un enrichissement de ces membranes de filtration.

S'agissant de la Sebkh El Goléa, il nous a fallu plus de (06) mois d'enrichissements avec agitation (aérobiose), pour que les premières colonies apparaissent sur le milieu de culture. Les conditions imposées compte tenu de l'objectif du travail font que peu de souches soient isolées.

Le nombre des souches isolées a été de 12. Elles ont pu croître dans le milieu utilisé SGMH avec ces conditions de culture (pH=7, T=55°C et salinité =10 ou 20%) tableau V.

Il est important de signaler que le nombre d'isolats obtenu peut varier considérablement par rapport à la saison du prélèvement. **Jiang et Xu (1996)** par exemple ont démontré que les actinobactéries sont généralement plus abondants durant les saisons sèches que pluvieuses.

Addou (2009) a obtenu récemment un résultat similaire au notre, à partir de sabkha d'El Goléa, puisqu'elle n'a pu isoler que (05) souches d'Actinobactéries thermohalophiles.

La première souche a été codifiée **G2**.

(09) souches isolées ont été nommées par la lettre B, suivies d'un nombre correspondant à l'ordre d'isolement. La dernière souche nommée H6 a été apparentée à la famille des Halobactéries.

3) Caractérisation des souches isolées :

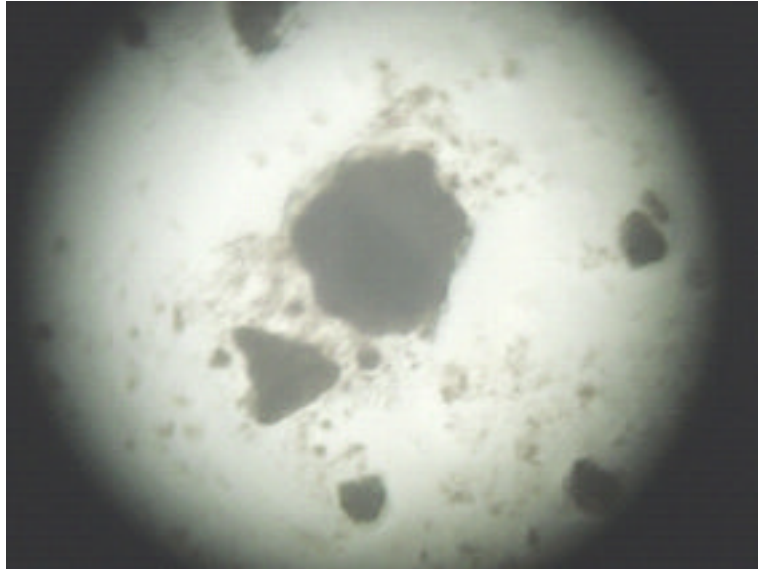
3.1) Etude morphologique :

Les caractères cultureux et la micromorphologie des souches isolées sont regroupés dans le **tableau V** et nous élucidons la morphologie de la souche G2 par des photos (**Figure 5**).

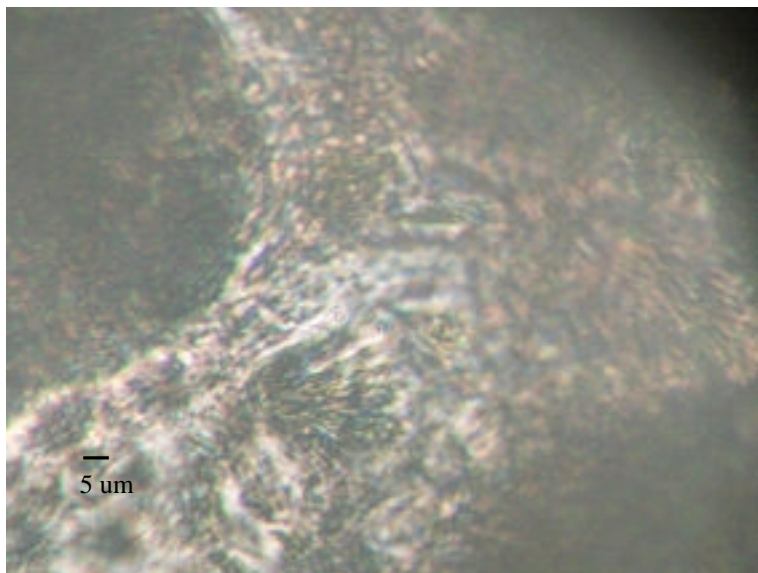
Tableau V : Caractères cultureux et micromorphologie des (12) souches isolées.

Caractères souche	cultureux			Micromorphologie
	Couleur	aspect	diamètre	
G2	blanche	filamenteux	moyen	filamenteuse
B1	jaune	rugueux	petit	cocci immobile
B2	cremeuse	laiteux	petit	batonnets
B3	cremeuse	muqueux	moyen	batonnets avec spores
B4	blanche	brillant	grand	gros batonnets
B5	jaune	lisse	grand	batonnets avec spores
B6	jaune	rugueux	moyen	coccobacille mobile
B7	orange	lisse	petit	batonnets
B8	jaune	lisse	grand	batonnets mobiles
B9	cremeuse	bords irreguliers	grand	batonnets fins mobiles
B10	blanche	bords denteles	moyen	batonnets
H6	orange	lisse, non brillant	moyen	coccobacille court

Petit diamètre inférieur à 01mm. Moyen diamètre se situ entre 01 et 03 mm. Grand diamètre supérieur à 03 mm.



(a) grossissement (x100)



(b) grossissement (x400)

Figure 5 : Aspect microscopique de la souche G2 montrant la présence de filaments (microscopie photonique).

3.2) Etude physiologique et biochimique :

3.2.1) Etude physiologique :

3.2.1.1) Détermination de l'optimum de salinité :

Il ressort des résultats que l'une des souches en l'occurrence la H6 a un optimum de croissance à 20 % en NaCl et peut croître jusqu'à une concentration de 25% alors qu'aucune croissance n'est observée à une concentration inférieure à 15%. Ce profil est caractéristique de la famille de Halobacteriaceae qui appartient au domaine des Archaea (**Grant et al., 2001**).

Par contre, les souches de B1 à B10 ont un optimum de croissance à des teneurs en NaCl moins importantes ; leur optimum se situe entre 5% et 15%. Pour la souche G2 qui peut tolérer jusqu'à 25% en NaCl avec un optimum à 10%, elle ne peut croître à des concentrations inférieures à 5% en NaCl.

En reprenant la classification de **Ventosa et al., (2008)** on peut donc classer ces souches sur la base de leur tolérance au sel (NaCl) de la manière suivante :

Les souches B1 à B10 et G2 sont des halophiles modérés dont l'optimum de croissance se situe entre 3% et 15%.

H6 est un halophile extrême dont l'optimum de croissance se situe entre 15% et 25%.

2.2.2) Détermination de l'optimum de température pour les souches isolées :

Il ressort, des résultats, que parmi les (12) souches isolées, trois d'entre elles poussent à des températures comprises entre 30 et 60 °C.

Toutefois la souche H6 a un optimum à 55 °C. Les espèces de la famille des Halobacteriaceae sont connues avec un optimum de croissance en général entre 37 et 40°C. Notre isolat a donc un optimum supérieur et peut pousser au delà de 55°C. Ceci en plus de son exigence au sel, c'est donc un caractère justifiant sa sélection.

La souche B9 a un optimum de 40 °C.

La souche G2 pousse à des températures allant de 30 à 70 °C avec un optimum de 55 °C.

Les autres souches ont un optimum qui se situe entre 30- 40 et ils ne peuvent pas croître jusqu'à 55 °C.

* Sélection des souches :

L'étude que nous avons effectuée jusqu'à là (morphologique et physiologique : salinité et température) indique que :

- la souche G2 semble être une actinobactérie ; cela en raison de son apparence filamenteuse ramifiée,
- la souche H6 serait une halobactérie en raison de son caractère halophile stricte et la pigmentation de la colonie rouge/orange,
- la souche B9 est un bacille avec un optimum de croissance de 40 °C et pousse jusque 60 C°.

Les trois souches présentent le caractère principal recherché thermohalophile. Ces souches seront entreprises dans la suite de notre étude afin de mieux les caractériser.

2.2.3) Détermination de l'optimum de pH pour les souches sélectionnées :

Il ressort des résultats que la souche G2 pousse d'une manière optimale à un pH neutre et peut tolérer des conditions d'alcalinité ne dépassant pas un pH de 9 alors que les souches B9 et H6 peuvent pousser dans un intervalle de pH allant de 6 à 10 avec un optimum qui se situe entre 8 et 9, ce qui leurs confèrent une légère propriété d'alcalinophile.

3.2.2) Etude biochimique :

Les caractères biochimiques sont mentionnés dans **le tableau VI**.

Tableau VI : Caractères biochimiques des trois souches sélectionnées.

Test	Souche G2	H6	B9
ONPG	-	-	-
ADH	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
CIT	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	-	-
VP	-	-	-
RM	+	+	+
GEL	+	+	+
GLU	+	+	+
MAN	-	-	-
INO	-	-	-
SOR	-	-	-
RHA	+	-	+
SAC	-	-	-
MEL	+	-	+
AMY	+	-	+
ARA	+	+	+
Catalase	-	+	+
dégradation d'amidon	-	+	-
la Caséine	+	+	+
la Cellulose	-	+	-
l'activité lipolytique (l'huile d'olive)	+	+	-
Croissance en anaérobiose	+-	-	+-

Il ressort de ce tableau que les trois souches hydrolysent la caséine et la gélatine. Cette aptitude de dégradation des protéines est expliquée par le milieu utilisé pour leur isolement SGMH qui est riche en ces molécules. On peut noter aussi leur faible pouvoir d'assimilation des différents sucres. Cela peut être expliqué par la pauvreté de leurs habitats en ces éléments.

La souche H6 diffère des autres souches par la dégradation de l'amidon et la cellulose

La souche B9 diffère des autres souches par l'absence de l'activité lipolytique.

La souche G2 diffère des autres souches par le fait qu'elle est catalase -.

3.3) La phylogénie moléculaire et le séquençage de l'ARN 16S :

Les souches sélectionnées (H6, B9, G2) ont été étudiées de manière approfondie notamment par une analyse moléculaire de l'ARNr16S du fait que cette étude est primordiale dans l'étude des extremophiles et dans la discrimination du domaine des Archaea de celui des Eubacteria.

En plus des trois souches sélectionnées, nous avons intégré une autre souche, la B5 à cette étude moléculaire.

3.3.1) Séquençage :

3.3.1.1) PCR et l'électrophorèse :

3.3.1.1.1) PCR après extraction ADN génomique par la méthode classique:

Les résultats obtenus de l'électrophorèse sont indiqués dans (la **figure 6**). On observe l'apparition d'une seule bande d'un poids moléculaire de 1.5 Kb pour les souches B9 et B5. Concernant la souche G2, on remarque une légère bande. Par contre, aucune bande n'apparaît pour la souche H6.

La PCR et l'extraction ont donc réussi pour les deux souches B9 et B5 et partiellement pour la souche G2 (reste à confirmer par séquençage). Par contre, les résultats sont négatifs dans le cas de la souche H6.

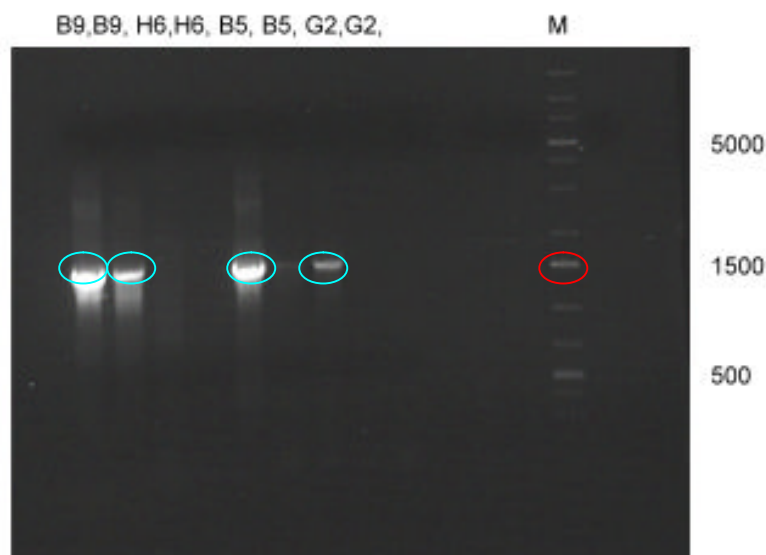


Figure 6 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR du gène l'ARNr 16S des souches sélectionnées en utilisant les primers pA/pH. * L'extraction est faite par la méthode classique.

La réussite partielle pour la souche G2 peut être expliquée par le fait que la PCR était réalisée sur des vieilles colonies au lieu d'une culture jeune liquide recommandée que nous n'avons pu obtenir au cours de notre stage.

Comme nous l'avons vu précédemment, la souche H6 a été rattachée à la famille des Halobactérieaceae (caractères physiologiques, morphologiques et culturels). La non apparition d'une bande est peut être due à :

- des primers non appropriés. Plusieurs auteurs ont rapporté que les primers supposés être universels ne le sont pas et proposent d'autres primers à la base des nouvelles mises à jours des banques de données des séquences en utilisant des outils bioinformatiques (**Baker et Cowan, 2004; Casanueva, 2008**),
- la méthode d'extraction d'ADN génomique non appropriée pour les Archaea. Cela est mentionné par **Leuko et al., (2008)** ou certaines espèces du genre Halococcus sont résistantes à la lyse cellulaire et cela est dû à leur parois particulières.

3.3.1.1.2) PCR après extraction ADN génomique par le Kit :

Avec la méthode de kit (**Figure 7**) on remarque l'apparition d'une seule bande d'un poids moléculaire de 1.5 Kb bien nette pour la souche B9. Une légère bande pour H6 dans deux colonnes de migrations et absence totale de bande pour la souche G2.

La PCR et l'extraction ont été positives pour B9, partiellement réussies pour H6 (reste à confirmer par séquençage) mais pas pour la souche G2.

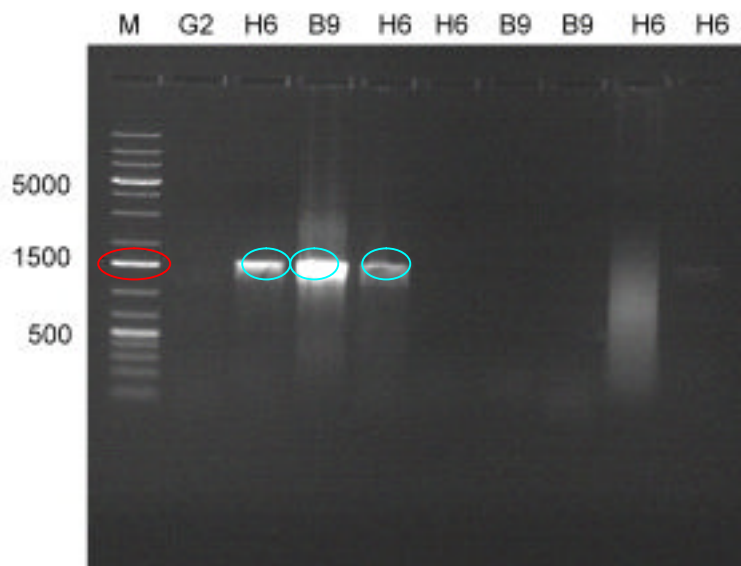


Figure 7 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR du gène de l'ARNr 16S des souches sélectionnées en utilisant les primers pA/pH.* L'extraction est faite par un Kit.

La réussite partielle cette fois ci pour la souche H6 peut être expliquée par le changement de la méthode d'extraction (mais ce résultat reste à vérifier par séquençage).

Concernant les deux techniques, elles donnent de très bons résultats pour les bactéries mais avec un meilleur rendement pour la méthode classique (plus d'intensité).

Concernant la souche H6, il s'avère qu'il est plus intéressant d'appliquer d'autres techniques d'extraction comme le recommande **Leuko et al., (2008)** pour augmenter le rendement. Il reste également à vérifier la qualité des primers après le séquençage.

3.3.1.2) Quantification de l'ADN par NanoDrop :

Quantification de l'ADN après extraction par la méthode classique :

La quantification de l'ADN après extraction **est facultative**. Elle n'a été réalisée que pour la méthode classique (tableau VII) et pour les premiers jours. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII : Quantification de l'ADN Génomique par NanoDrop après extraction par la méthode classique.

Code d'échantillon	Quantité (ng/ul)	Le degré de pureté (Do260nm/Do280nm)
B9(1)	30.34	1.11
B9(2)	122.71	1.42
H6(1)	156.51	1.39
H6(2)	207.97	1.44
B5(1)	253.09	1.59
B5(2)	57.48	1.18
G2(1)	45.03	1.25
G2(2)	50.98	1.95
G2(1 ^{re})	80.12	1.62

Nous remarquons que les quantités et les degrés de pureté sont très différentes d'une extraction à une autre pour toutes les souches et d'une lecture à une autre [G2 (1) / G2 (1^{re})] les différences de degré de pureté et de quantité sont directement liées à l'absorption aux deux longueurs d'ondes utilisées (Do 260nm /Do 280nm).

Cela peut être expliqué par une différence structurale de la composition cellulaire des souches et les erreurs des manipulations et aux erreurs techniques liées à l'appareil.

Quantification de l'ADN après PCR :

Les bandes des gels contenant l'ADN (figures 7 et 8) sont extraites et purifiées par kits **QIAquick PCR purification** et le dosage était effectué par Nano Drop afin de calibrer les quantités pour le séquençage. Les résultats de la quantification de l'ADN sont données dans les tableaux VIII (l'extraction est faite par la méthode classique) et dans le tableau IX (l'extraction est faite par Kit).

Tableau VIII : Quantification de l'ADN des amplicons par NanoDrop en utilisant la méthode d'extraction classique pour extraire l'ADN génomique.

Code d'échantillon	Quantité (ng/ul)	Le degré de pureté (Do260nm/Do280nm)
B5	19.45	2.04
B9	8.74	2.52
B9 (2)	28	2.15
H	8.86	1.82

Tableau IX : Quantification de l'ADN des amplicons par NanoDrop en utilisant la méthode d'extraction par Kit pour extraire l'ADN génomique.

Code d'échantillon	Quantité (ng/ul)	Le degré de pureté (Do260nm/Do280nm)
B9	27.65	1.85
H6	10.43	2.69
H6(2)	7.56	3.03

Pour la méthode d'extraction classique (**Tableau VIII**) le degré de pureté est compris entre les valeurs limites (sauf la souche B9 avec une valeur différente) ; ce qui indique que la purification et les concentrations d'ADN sont acceptables. Elles correspondent à l'intensité des bandes (figure10).

La méthode d'extraction par le kit (**Tableau IX**) révèle que le degré de pureté et la quantité d'ADN ont été bons pour la souche B9 mais ils ne le sont pas pour la souche H6 (2.69, 3.03) ; ce qui montre que notre extraction ou notre PCR n'a pas réussi pour cette souche. Les concentrations d'ADN sont acceptables et elles correspondent à l'intensité des bandes (figure11).

Pour cette quantification, après amplification par PCR, il faut noter que la pureté de l'ADN « l'ADN des amplicons » augment par la deuxième extraction des amplicons, la première étant l'extraction génomique.

Le dosage par le NanoDrop n'est qu'une estimation optique directe de la charge globale des protéines et des acides nucléiques d'une solution.

La lecture des différentes valeurs peut varier d'une technique d'extraction à une autre (performance de la technique), d'une souche à une autre (composition cellulaire), d'une lecture à une autre et pour la même souche et la même technique, cela est dû aux différentes erreurs qui peuvent se produire au cours de cette lecture.

Il faut noter que la bonne estimation de la qualité d'un ADN est mieux appréciée par un gel d'électrophorèse que par une méthode spectroscopique, selon le service de biologie moléculaire, puisque la spectroscopie est très influencée par les produits chimiques de l'extraction : exemple le phénol qui absorbe à 270nm influence la Do des acides nucléiques à 260nm.

3.3.1.3) Analyse des résultats de séquençage :

Les premiers résultats obtenus n'étaient pas interprétables pour la majorité des séquences. Sur les 16 amplicons, seulement 4 ont été positifs avec environ 450-600 pb pour chacun. Cela ne représente que le tiers de la totalité d'un gène de l'ARN 16S pour une espèce donnée.

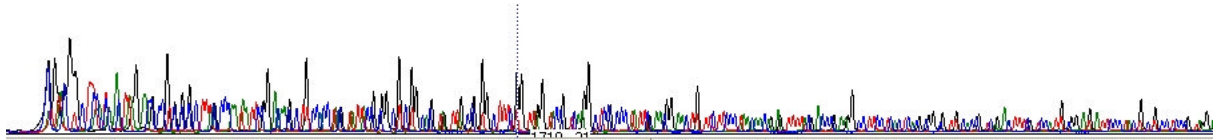


Figure 8 : Profil de séquençage sous un format RAW de la souche B5.

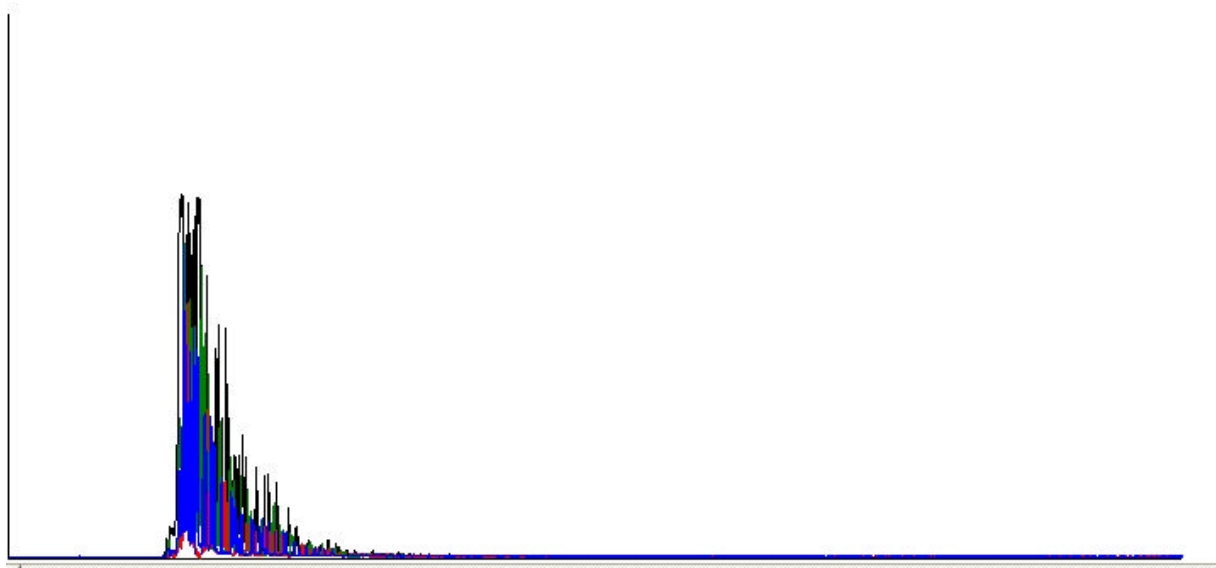


Figure 9 : Profil de séquençage sous un format RAW de la souche B9.

En analysant les profils de séquençage, sous un format RAW (**figure 8**) et (**figure 9**) obtenus à l'aide du programme bioinformatique « Bioedit », des séquences des souches B5 (Figure 8) témoin de bon profil et B9 (**figure 9**), nous pouvons constater que le profil de la figure 10 est de mauvaise qualité (forte intensité du signal et faible résolution des pics). En reprenant les différentes étapes, il nous a paru que l'agent qui a altéré la qualité du séquençage était les résidus d'éthanol, qui auraient interféré avec la DNA polymérase utilisée au cours du séquençage, par le kit gel extraction de Qiagene soit le lavage de la pelote d'ADN par la méthode classique.

Pour y remédier, nous avons augmenté la durée de centrifugation décrite dans le protocole de 1 min à 3 min afin d'éliminer toutes traces d'éthanol. Ce qui nous a donné de meilleurs résultats pour le reste des séquences. Par la suite (aucun des amplicons n'a donné une séquence inférieure à 450 pb).

Le deuxième problème que nous avons rencontré concernant la taille maximale que l'on avait obtenue des deux côtés pour les amplicons. Elle est dans le meilleur des cas de 1000 pb alors que les 500 pb restantes qui représentent la région centrale du gène reste toujours sombre.

Il s'agirait vraisemblablement d'un problème technique lié à la performance du séquenceur qui ne peut pas aller dans notre cas au-delà de 800 pb pour les amplicons des standards. Ainsi, Il faut un autre appareil plus performant qui peut donner jusque 1000 pb pour les standards de chaque coté pour avoir la totalité du gène de ARN 16S ou bien adapter d'autres méthodes tel que le clonage.

Les premiers résultats obtenus comparés aux banques des données pour certaines séquences à révélé que :

- la souche B5 a été rattachée à *Bacillus licheniformis* avec un taux de similarité de 94%,
- la souche B9 se rapproche le plus de l'espèce du genre *Piscibacillus sp* JSM 071073 avec 97% de similitude,
- pour les souches G2 et H6, aucun résultat n'était possible d'obtenir et cela est dû à l'absence d'un ADN de bonne qualité pour G2 et au choix des primers ou bien à la méthodes d'extraction de l'ADN pour H6.

3.3.2) Clonage :

Les amplicons des deux souches du gène ARN 16S des souches H6, B9 étaient ciblés.

3.3.2.1) La transformation des cellules compétentes :

Après incubation des boite de Pétri (cellules compétentes) 18-24 heures à 37°C la transformation est considérée comme positive en cas d'apparition de colonies sur LB additionné avec l'ampicilline.

Dans notre cas et dans les deux expériences de transformation du gène de l'ARN 16 S de la souche B9 (**figure 10**) et H6 nous avons remarqué l'apparition de colonies bleues et blanches, cela signifié la réussite de la transformation dans les deux cas. Dans l'étape suivante, nous vérifierons ce résultat.

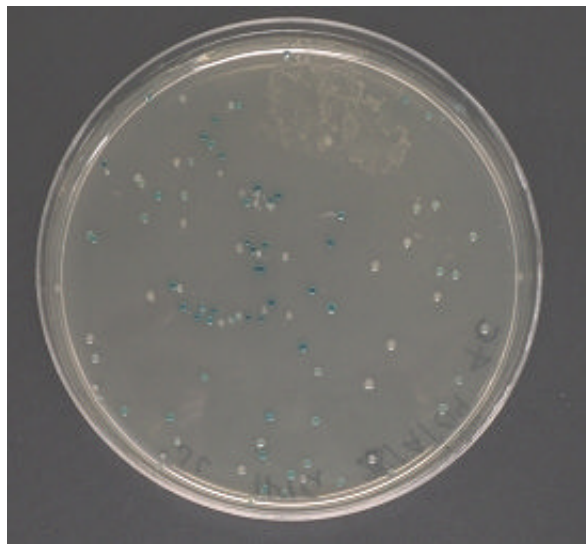


Figure 10 : Boite de Pétri montrant la croissance des colonies bleues et blanches d' *E.coli* après transformation.

3.3.2.2) Sélection des clones transformés :

L'application de la PCR suivie de l'électrophorèse sur les colonies blanches (**figure 11**) révèle que les cellules d'*E.coli* n'étaient pas transformées par un vecteur recombinant stable (cela a été vérifié par séquençage).

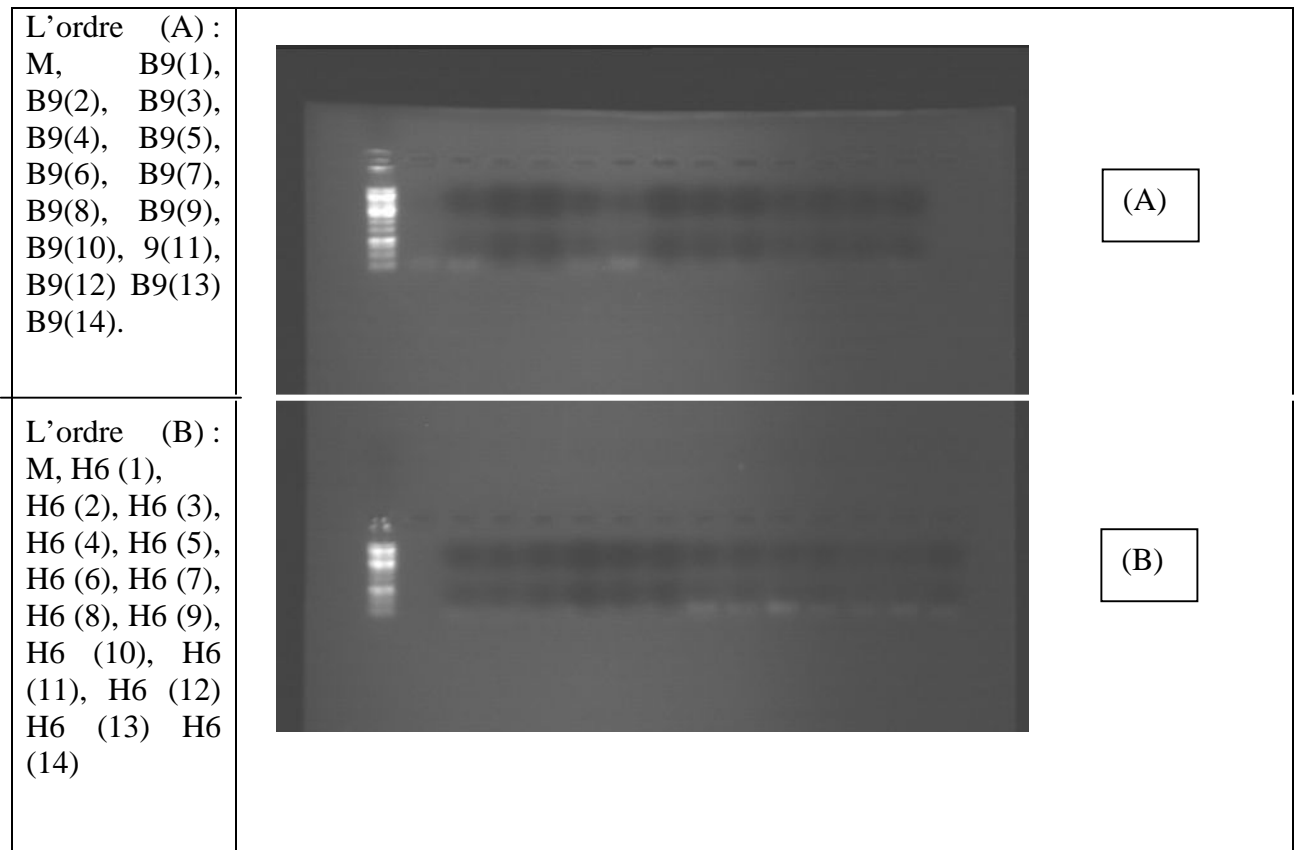


Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR des colonies *E.coli* transformées (banches) : (A) pour la souche B9, (B) pour la souche H6.

Il serait probablement plus intéressant d'utiliser des enzymes de restriction pour la formation de vecteur.

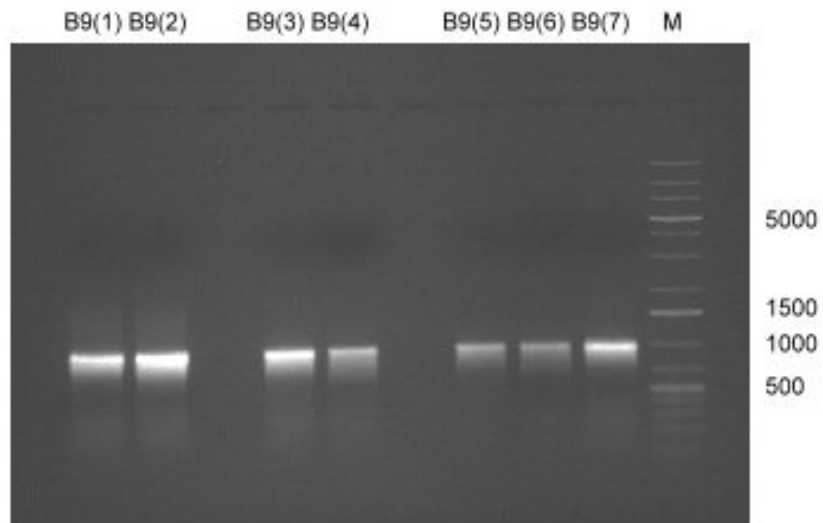
3.3.3) La conception des primers :

3.3.3.1) L'essai des primers :

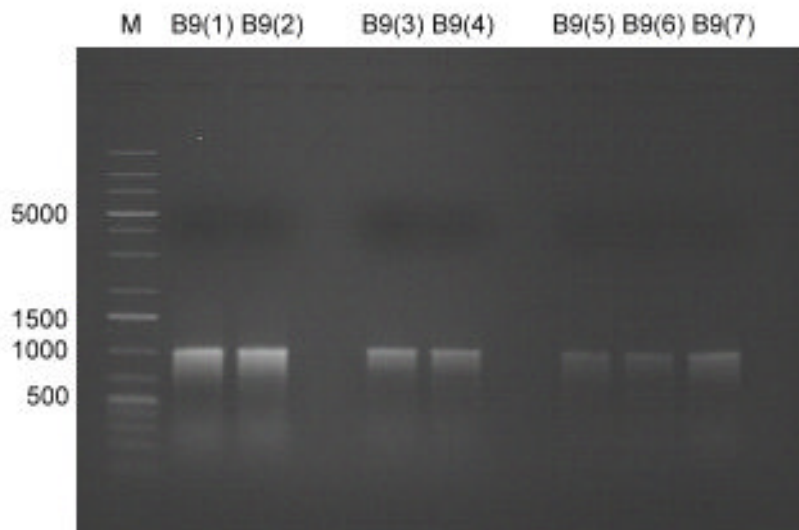
Le fait que le séquençage de l'ARN 16S du gène complet n'était pas possible d'un seul coup (séquençage direct des amplicons), et que le clonage n'a pas réussi, la troisième stratégie consistait à faire un séquençage par partie avec la conception de nouveaux primers qui se localisent à l'intérieur du gène.

Cet essai a été effectué pour la souche **B9** pour la quelle nous avons eu des résultats préliminaires potentiellement intéressants.

Deux primers sont construits et qui couvrent respectivement et approximativement 1000pb chacun avec son opposite (**figure 12**).



(a)



(b)

Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR en utilisant les couples de primers : (a) le couple (pA/RpA), (b) le couple (FpH/pH).

Ainsi, nous remarquons l'apparition d'une seule bande d'un poids moléculaire d'environ (01) Kb. Comme il a été prévu par le logiciel primers3, bien nette pour toutes les colonnes de migration de la souche B9, Les résultats des gels montrent bien la réussite des primers.

Avec les deux nouveaux primers, il était difficile au séquenceur utilisé de mettre en évidence plus de 500 bases de nucléotides de chaque côté des nouveaux fragments qui ne sont pas en faveur de la reconstruction de la totalité du gène.

Ce résultat nous amène à une nouvelle conception de nouveaux primers, pour diviser le gène de ARN 16S en trois parties.

On observe ainsi (**figure 13**) l'apparition d'une seule bande au niveau des colonnes de la première série (**B9(1), B9(2)**) et la deuxième série (B9(1), **B9(2), B9(3)**) d'un poids moléculaire voisin de 700 bases pour B9(1) et 600 base pour B9(2), B9(3). Comme cela était prévu *in silico* (par le programme bioinformatique), les résultats des gels montrent bien la réussite des primers.

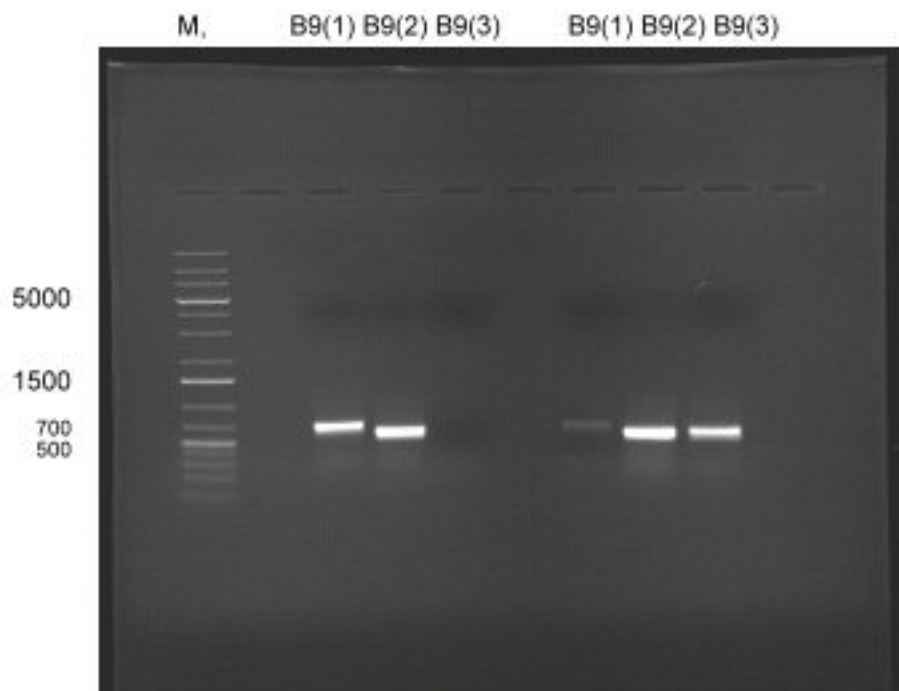


Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des produits de PCR en utilisant les couples de primers : (1) le couple (pA/ RA) , (2) le couple (pM /rpM), (3) le couple (RH/pH).

3.3.3.2) Assemblage des fragments :

L'assemblage des séquences des différents fragments afin d'obtenir la totalité du gène a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit. Il nous a permis d'obtenir une séquence de 1495 bases du gène ARNr 16 S pour la souche B9.

3.3.4) Construction de l'arbre phylogénétique :

La séquence obtenue du gène codant l'ARN 16S de la souche B9 a été confrontée à une banque de données Genbank par l'intermédiaire du programme de recherche BLAST qui permet de comparer une séquence inconnue d'acides nucléotidique ou d'acides aminés avec les banques de séquence et en retient les séquences les plus proches (**figure 14**).

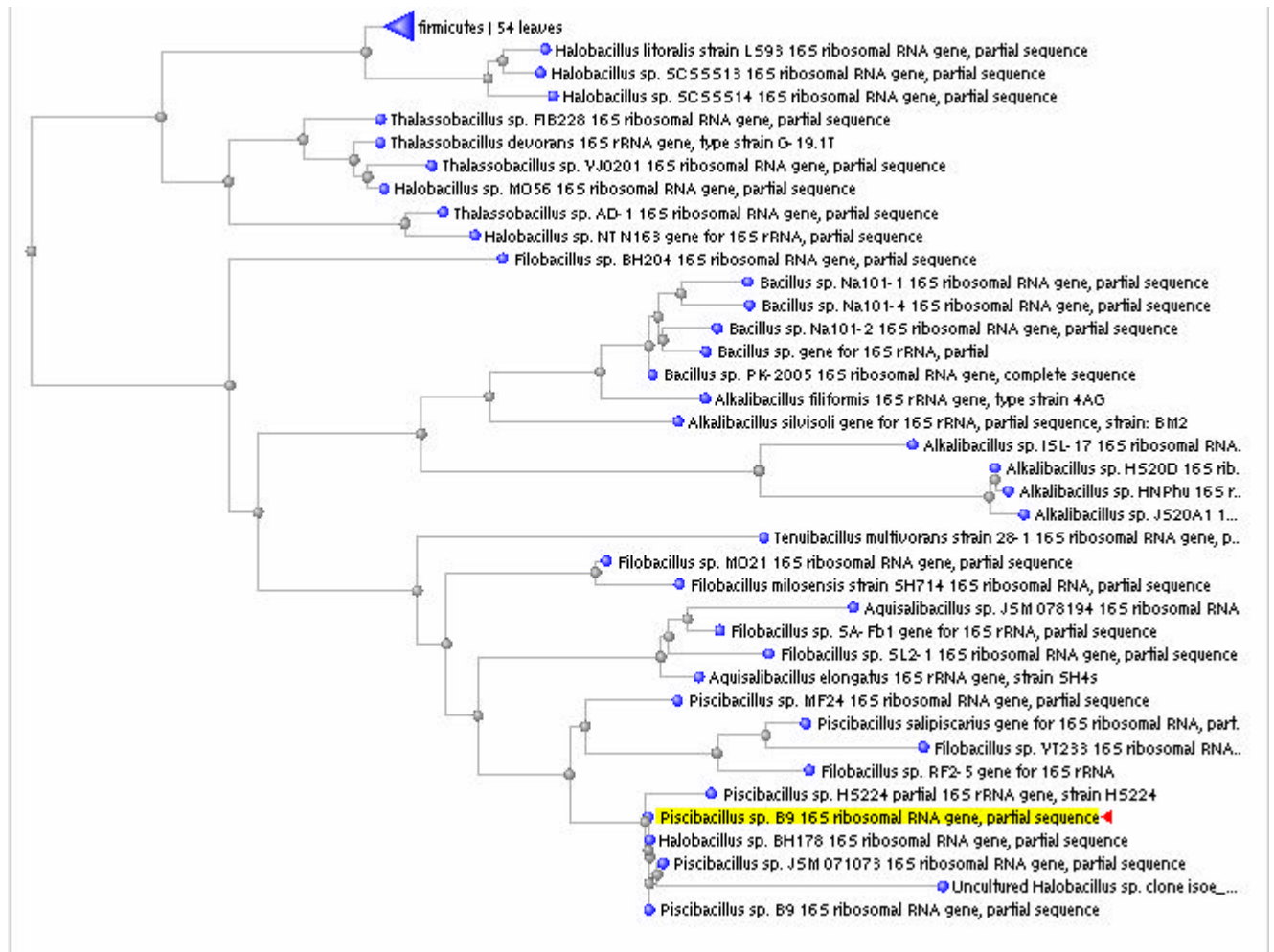


Figure 14 : Représentation des résultats de la recherche sur Genkank en arbre de distance de toutes les séquences disponibles ayant une forte similarité avec la séquence de la souche B9.

* A partir des séquences des espèces déjà décrites ayant 94 et 99 % de similitudes, nous avons construit l'arbre phylogénétique de la souche B9 (**figure 15**)

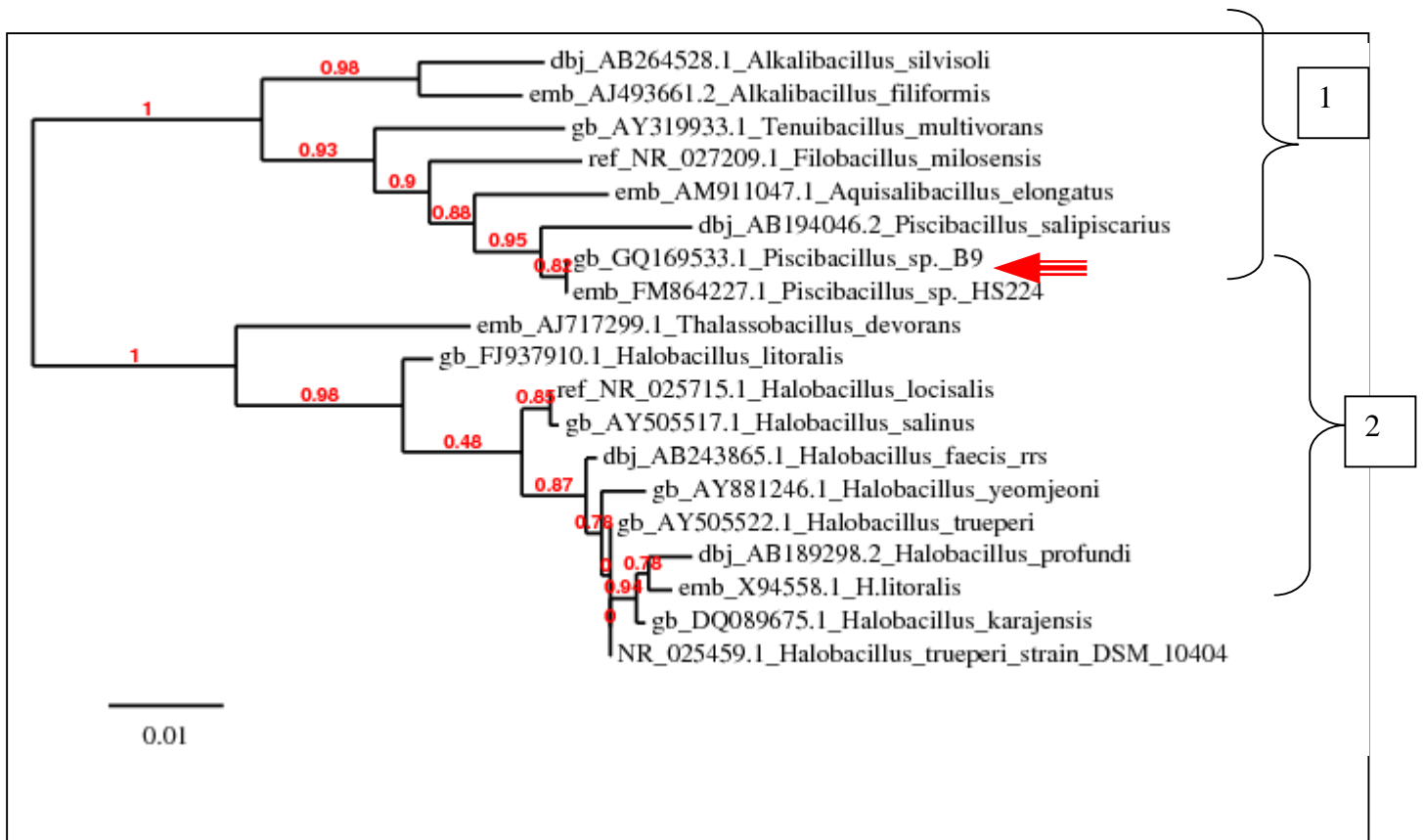


Figure 15 : Arbre phylogénétique de la souche B9 basé sur la séquence de l'ARN 16S.

Interprétation de l'arbre phylogénétique :

Il ressort que l'arbre phylogénétique obtenu est constitué de deux grands groupes (1) et (2). Notre souche se positionne au niveau de la première branche (1^{er} groupe). Elle partage ce groupe avec des espèces alcalinophiles (tels : *Alkalibacillus*) (caractère vérifié pour notre souche). Elle appartient au genre *Piscibacillus* avec 95% de bootstrap et elle se rapproche le plus de *Piscibacillus halophilus* (*Piscibacillus sp. HS224*^T) récemment décrite par **Amoozegar, (2009)**. la première espèce ayant été décrite dans ce genre est *Piscibacillus salipiscarius* (**Tanasupawat et al., 2007**). Ce qui montre que le genre *Piscibacillus* a été récemment découvert.

Les trois autres espèces de ce groupe sont *Aquisalibacillus elongatus* SH4s^T avec 97,68% d'identité (**Márquez et al., 2008**); *Filobacillus milosensis* SH 714^T avec 97,77% (**Schlesner et al., 2001**) et *Tenuibacillus multivorans* 28-1^T avec 96,68% d'identité (Ren & Zhou, 2005).

3.3.5) Comparaison de la souche B9 avec les espèces similaires :

Afin de pouvoir identifier la souche B9 nous l'avons comparée avec les espèces similaires décrites dans le genre *Piscibacillus* et avec l'espèce *Filobacillus milosensis* et l'espèce *Aquisalibacillus elongatus* (tableauX).

Tableau X : Caractéristiques distinguant la souche B9 des espèces similaires proches et décrites

Taxons: **1** : *Piscibacillus halophilus* HS224^T (Amoozegar M-A, 2009); **2** : *Piscibacillus salipiscarius* RBU1-1^T (Tanasupawat *et al.*, 2007); **3** : *Filobacillus milosensis* SH 714^T (Schlesner *et al.*, 2001); **4** : *Aquisalibacillus elongatus* SH4s^T (Márquez *et al.*, 2008);
+ : Positif; - : négatif; W, Faiblement positif; ND, données non disponibles.

souche	B9	1	2	3	4
Caractéristique					
croissance Anaérobique	w	+	w	-	-
Motilité	+	-	+	+	-
intervalle de croissance et en NaCl (% w/v)	1-20 (10)	1-20 (10)	2-30 (10-20)	2-23 (8-14)	3-20 (10)
Température de croissance (°C) (optimum)	30-60(40)	15-55 (35)	15-48 (37)	ND-42 (33-38)	20-55 (37)
pH de croissance (optimum)	6.0-10.0(8)	7.0-10.0 (7.5)	5.0-9.0 (7)	6.5-8.9 (7.3-7.8)	7.0-10.0 (7.5)
Fermentation des sucres :					
ONPG	-	-	+	-	-
D- glucose	+	-	+	-	-
Hydrolyse de:					
Amidon	-	-	+	-	-
Caséine	+	+	+	-	+
Gélatine	+	+	+	-	+
Tween 80	ND	+	-	ND	-

En reprenant les résultats de l'étude morphologique, physiologique et en particulier le séquençage de l'ARNr16S et en comparant avec des souches proches décrites, on peut dire que :

la souche B9 diffère de toutes les autres espèces les plus proches par sa capacité de croître à 60°C. Elle diffère aussi de *Piscibacillus halophilus*, l'espèce la plus proche, par le fait qu'elle soit mobile. Nous pouvons donc conclure qu'il pourrait s'agir d'une nouvelle espèce du genre *Piscibacillus*. Pour confirmer ces résultats, une Hybridation ADN-ADN reste à effectuer avec les quatre espèces similaires décrites et présentant une similitude de 97% ou plus avec la séquence de ARN16S de la souche (B9) (**Stackebrandt E and Goebel B-M, 1994**).

<i>Piscibacillus halophilus</i>	99 %
<i>Piscibacillus salipiscarius</i>	98 %
<i>Filobacillus milosensis</i>	97 %
<i>Aquisalibacillus elongatus</i>	97 %

Stackebrandt et Goebel (1994), considèrent que lorsqu'il existe moins de 97 % d'homologie entre les séquences des ARNr 16S de deux souches, elles appartiennent à des espèces différentes. En revanche, si le pourcentage d'homologie est égal ou supérieur à 97%, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur l'hybridation ADN-ADN. D'autres tests sont recommandés telles : la détermination du type de peptidoglycane et la détermination de G+C (mol%) de ADN pour caractériser le genre.

3.3.6) Dépôt de la séquence :

La séquence du gène de l'ARN 16 S de la souche B9 de 1495 Bases a été déposée au niveau du NCBI Genbank sous le numéro d'accès : GQ169533

3.4) La mise en évidence des biomolécules :

3.4.1) Activités antagonistes :

Parmi toutes les souches testées, la souche H6 s'est montrée active sur *S.cerevisiae* (**figure 16**). La souche G2 sur la souche G25, tous les autres tests se sont révélés négatifs.

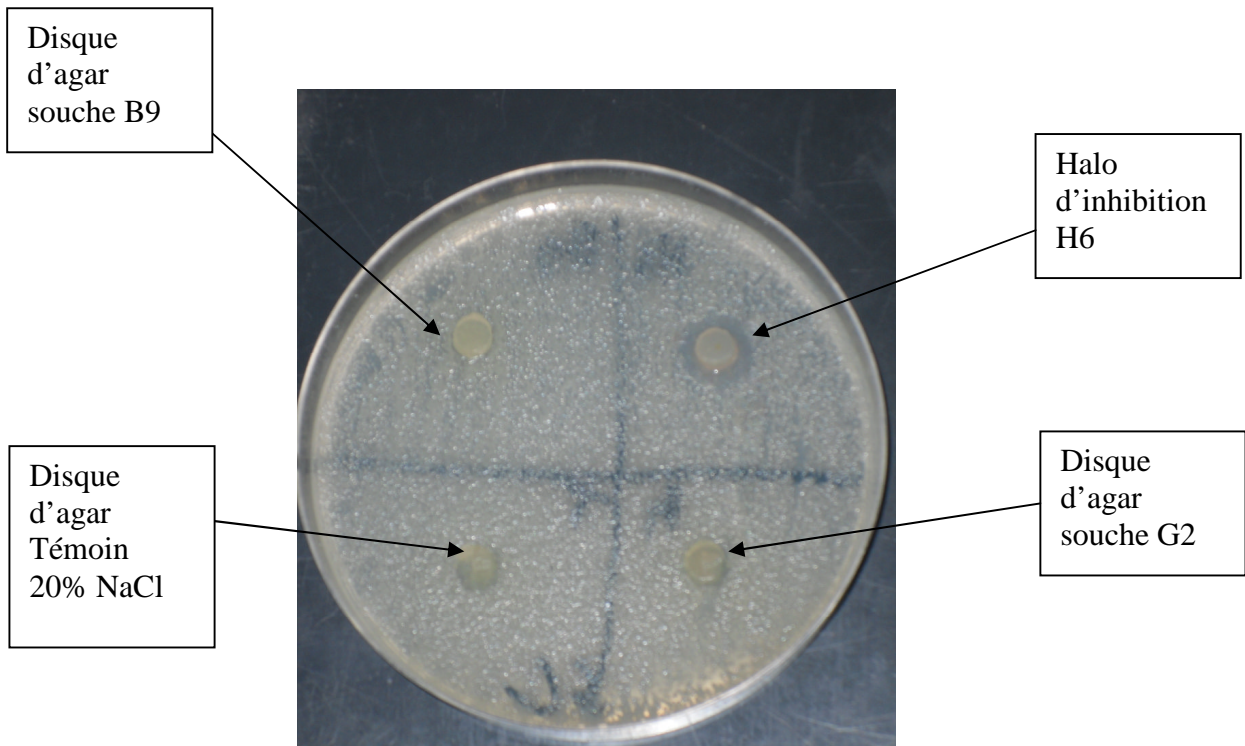


Figure 16 : L'activité d'antagonisme de souche H6 contre *Saccharomyces cerevisiae*

H6 (Archaea) active contre *S.cerevisiae* cela n'est jamais été mentionné dans la documentation consultée.

3.4.2) Activités enzymatiques (Les amylases) :

La bonne croissance de la souche H6 sur le milieu SGMH additionné de l'amidon et la présence d'halo de dégradation (**Figure 17**) indique que la souche possède des amylases.

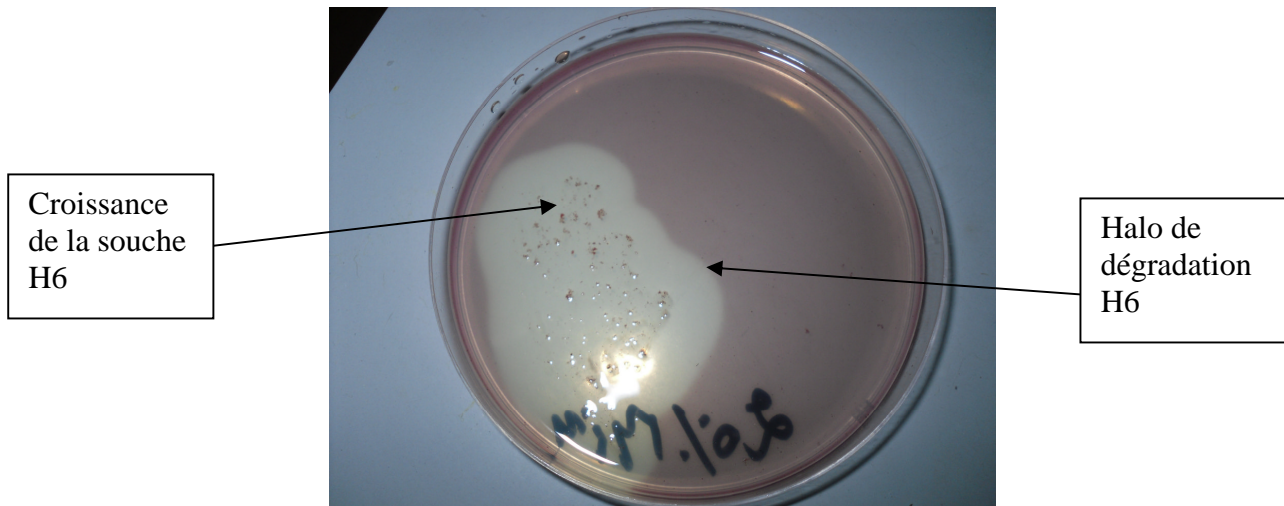


Figure 17 : Mise en évidence de l'activité de dégradation de l'amidon.

Les amylases sont d'un grand intérêt que ce soit sur le plan fondamental ou sur le plan appliqué. Les enzymes issues de ce type de ces microorganismes les thermohalophiles sont très stables au stress de la salinité et la température. Elles sont requises dans de nombreux processus industriels. L'application de ces extremozymes afin de remplacer les enzymes actuelles est intéressante pour la diminution des risques de contamination, amélioration du taux de transfert, diminution de la viscosité et augmentation de la solubilité des substrats (**Aguilar et al., 1998 ; Lin et al., 2008 ; Rohban et al., 2009**).

Conclusion et perspective

L'une des stratégies suivies dans la recherche de nouvelles souches et molécules d'intérêt en particulier dans le domaine de la santé consiste à explorer des écosystèmes ou environnements peu ou pas étudiés. C'est notamment le cas des écosystèmes dont un ou plusieurs des facteurs environnementaux sont extrêmes (salinité, pH, température) et qui sont très abondants dans notre pays.

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés au facteur de salinité, température « combinée » et cela en analysant des échantillons d'eau de Hammam El-Hadjeb (Biskra) et de l'eau et du sol de la sebkha d'El Goléa. Cette dernière constitue l'un des environnements les plus extrêmes qui peut s'assécher plus ou moins complètement donnant alors des surfaces constituées de cristaux de sel. Ainsi, après l'analyse des échantillons, aucune souche microbienne n'a pu être isolée de l'eau du Hammam El-Hadjeb sous les conditions expérimentales appliquées. Pour la sebkha, nous avons pu isoler 12 types de colonies (10 bactéries, 1 actinobactérie et une 1 archaea halophile) sur la base de leur aspect macroscopique et microscopique en utilisant des milieux rendus sélectifs par l'addition de fortes concentrations en NaCl 20% et une incubation à 55°C.

Les isolats obtenus ont été soumis à un screening pour la production de biomolécules d'intérêt biotechnologique en particulier pour le domaine de la santé «Enzymes : amylase lipase, protéase ...et des anti-cellulaires en choisissant comme cible des bactéries de référence ainsi que des Archaeobactéries halophiles sensibles notamment à la novobiocine.»

L'activité antagoniste des différentes souches a été repérée par la technique de diffusion sur gélose par les disques d'agar. Ceci, nous a permis de sélectionner deux souches nommées H6 Archaea et G2 Actionbactérie qui ont montré une activité inhibitrice légère sur *S.cerevisiae* pour H6 et Archaeobactérie halophile G25 pour G2.

Les tentatives d'identification des deux souches par les méthodes moléculaires, n'ont pas réussies, probablement à cause de la position taxonomique de la souche H6 (Archaea) et l'arrêt de la croissance de la souche G2 au laboratoire d'accueil à l'Université de Warwick en Angleterre. Leur identification n'a été faite que par les méthodes classiques en étudiant les caractères morphologiques et physiologiques.

La méthode moléculaire à savoir l'identification par le séquençage des gènes de l'ADNr 16S qui codent pour l'ARNr 16S a donc concerné deux espèces bactériennes B9, B5.

En effet, l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), présent chez toutes les bactéries et les archaea, est devenu le chronomètre de l'évolution. La séquence du gène correspondant est connue pour près de 4000 souches et est accessible par interrogation de bases de données (GenBank, EMBL). Mais pour obtenir cette séquence nous avons suivi plusieurs étapes et utilisé de nombreuses techniques tels l'extraction de l'ADN, la PCR et l'électrophorèse. Pour les souches de l'environnement, il fallait adapter et modifier certains protocoles. Ainsi, on peut déterminer la séquence du gène codant l'ARN 16S et confronter la à une banque de données grâce aux deux programmes FASTA et BLAST pour avoir les séquences les plus proches.

À partir de ces séquences et par utilisation de plusieurs programmes bioinformatiques tels : ClustalW, Bioedit, la construction d'un arbre phylogénétique est réalisée selon différentes méthodes.

Après comparaison de la souche B9 avec les espèces du genre *Piscibacillus*, *Filobacillus milosensis* et *Aquisalibacillus elongatus* et si l'on se réfère aux caractères physiologiques, les températures limites de croissance, la mobilité, nous pouvons supposer donc que la souche B9 pourrait être une nouvelle espèce du genre *Piscibacillus*. Il reste à confirmer cette hypothèse par l'étude d'hybridation ADN-ADN.

Outre son intérêt sur le plan taxonomique, la souche B9 a été un bon modèle pour l'étude génétique : l'extraction de l'ADN était facile par les deux méthodes classique et le kit, la PCR et l'électrophorèse. La souche B9 a été aussi un bon modèle qui nous a permis de nous familiariser avec la bioinformatique, la conception des primers, la construction des arbres phylogénétiques et l'utilisation de plusieurs programmes de bioinformatique monoposte et sur le Net.

Malgré l'incapacité de séquencer la souche H6 qui était affiliée aux Halobacteriaceae par ses caractères physiologiques, morphologiques et culturels, elle présente un potentiel biotechnologique très intéressant. Ce caractère antifongique n'a jamais été signalé auparavant chez cette famille, d'où l'intérêt de reprendre l'étude de cette souche d'une manière approfondie.

La souche G2 se présente comme un cas d'actinobactérie thermohalophile très intéressant puisque elle peut croître à une température de 70 C° qui constitue la limite de définition d'un thermophile modéré non décrit pour ce type de taxon. Ceci en plus de sa capacité de produire une molécule antiarchaea qui serait un autre point fort pour reprendre de nouveau « le séquençage, l'antagonisme, et les enzymes » élaborées par cette souche.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES :

Addou A-N. (2009): Les actinobactéries thermo-halophiles : Isolement systématique et production de métabolites bioactifs. Mémoire de Magister. 124 p

Aguilar A., Ingemansson T. and Magnien E. (1998): Extremophile microorganisms as cell factories: support of the European Union. *Extremophiles Rev 2*, pp: 367- 373.

Allen E-E., facciotti D. And bartlett D-H. (1999): Monounsaturated but Not Polyunsaturated Fatty Acids Are Required for Growth of the Deep-Sea Bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at High Pressure and Low Temperature. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 65, No. 4, pp: 1710–1720

Amoozegar M-A., Sanchez-Porro C., Rohban R., Hajighasemi M and Ventosa A (2009): *Piscibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* (2009); Version online: DOI 10.1099/ij.s.0.012013-0 version papier en cours.

Anderson A-W., Nordan H-C., Cain R-F., Parrish G and Duggan D (1956): Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food. Technol. Rev 10*, pp: 575–577.

Antón J., Oren A., Benloch S., Rodríguez-Valera F., Amann R. and Rosselló-Mora, R. (2002): *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extreme halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Rev 52*, pp: 485–491.

Antranikian G. (2008): Industrial Relevance of Thermophiles and Their Enzymes. In: **Robb F et al.,**(Ed.) : *Thermophiles Biology and Technology at High Temperatures.* USA, CRC Press. pp: 113-160

Aoshima M., Nishibe Y., Hasegawa M., Yamagishi A., Oshima T. (1996): Cloning and sequencing of a gene encoding 16S ribosomal RNA from a novel hyperthermophilic archaeobacterium NC12. *Gene. Rev 180* pp: 183-187

Arakawa T., Alton N-K., and Hsu Y-R (1985): Preparation and Characterization of Recombinant DNA-derived Human Interferon- γ . *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 260, No. 27, pp: 14435-14439.

Asker D, Ohta Y. (1999): Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *J Biosci Bioeng.* 88. pp: 617–621. In: **Margesin R and Schinner F. (2001):** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles 5*, pp: 73–83.

Baati H., Guerhazi S., Amdouni R., Gharsallah N., Sghir A., Ammar E.(2008): Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles Rev12* pp: 505–518.

Bae H., Kim K-P., Lee J-I., Song J-G., Kil E-J., Kim J-S., Kwon S-T. (2009): Characterization of DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus marinus* and its application to PCR. *Extremophiles, Rev. 13* pp: 657–667.

Baker G.C., and Cowan D.A. (2004): 16 S rDNA primers and the unbiased assessment of thermophile diversity. *Biochemical Society Transactions* Vo. 32, part 2 pp: 218-221.

Barns S-M., Delwiche C-F., Palmer J-D and Pace N-R (1996): Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, pp: 9188–9193. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles. Academic Press, Elsevier pp: 1-25.

Battista J-R. (1997): Against all odds, the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. Annu. Rev. Microbiol. 51, pp: 203–224. In: **Rajpurohit Y-S., Gopalakrishnan R. and Misra H-S. (2008):** Involvement of a Protein Kinase Activity Inducer in DNA Double Strand Break Repair and Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. J. Bacteriol. Vol. 190, No. 11, pp: 3948–3954

Beblo K., Rabbow E., Rachel R., Huber H and Rettberg P. (2009): Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. Extremophile 13, pp: 521–531.

Benamotz A. and Avron M., (1989) : The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: Algal and Cyanobacterial Biotechnology, Cresswell R.C., Rees T.A.V., and Shah N., Eds. Longman, Harlow, UK /John Wiley and Sons, New York. pp: 90-114. In: Microbiology and Biochemistry of hypersaline environments, Oren A., 1999. CRC press London, 358 p.

Benmalek Y., Cayol J.L., Bouanane N.A., Hacene H., Fauque G., and Fardeau ML (2009): *Chryseobacterium solincola* sp. nov., isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol. Version online : DOI 10.1099/ijs.0.008631-0 version papier en cours.

Berezovsky I and Shakhnovich E. (2005): Physics and evolution of thermophilic adaptation. Proc Natl Acad Sci USA Vol.102, No. 36, pp: 12742–12747.

Berg P., Baltimore D., Boyer H-W., Cohen S-N., Davis R-W., Hogness D-S., Nathans D., Roblin R., Watson J-D., Weissman S., and Zinder N-D. (1974): Potential Biohazards of Recombinant DNA Molecules. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 71, No. 7, pp: 2593-2594.

Beveridge TJ, Choquet CG, Patel GB & Sprott GD (1993) : Freeze fracture planes of methanogen membranes correlate with the content of tetraether lipids. J. Bacteriol. 175: 1191–1197. In: **Konings W-N., Albers S-V., Koning S and Driessen A-J-M. (2002) :** The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. Antonie van Leeuwenhoek Rev 81, pp: 61–72.

Birbir M. and Eryilmaz S., (2005): Prevention of halobacterial damage on bide caused by lipolytic halophilic archaea with halocins. Scientific Research Project Commission of Marmara University, Project No: Fen-125/081104, 8 p.

Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H-W and Stetter K-O (1997): *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. Extremophiles Rev 1, pp: 14–21.

Bouanane A., Grégoire P., Benkacem R., Boukerrou S., Meknaci R., ollivier B., Fardeau M. L et Hacène H (2009). Ile Congrès International sur les Ecosystème aquatiques El Golea 2-4 Octobre 2009. Communication affichée.

Boutaiba S., Bhatnagar T., Hacene H., Mitchell D.A., and Baratti J.C., (2006): Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. J Mol. Cat. b., 41, pp: 21-26.

Brock T. D. and Freeze H. (1969): *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. J. Bacteriol. 98, pp: 289–297.

Brock T. D., Brock K. M., Belly R. T. and Weiss R. L. (1972): *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch Mikrobiol. 84, pp: 54–68.

Brock T-D (1978): Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures. Springer-Verlag, New York.

Calvin N-M and Hanawalt P-C. (1988): High-Efficiency Transformation of Bacterial Cells by Electroporation. Journal of Bacteriology. Vol. 170, No. 6 pp: 2796-2801.

Casanueva A., Galada N., Baker G.C., Grant W.D., Heaphy S., Jones B., Yanhe M., Ventosa A., Blamey J., and Cowan D-A. (2008): *Nanoarchaeal* 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. Extremophiles Rev 12, pp: 651–656.

Case R-J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W-F., Kjelleberg S. (2007): Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl Environ Microbiol. Rev 73, pp: 278–288.

Castenholz, R. W. and Garcia-Pichel, F. (2000): *Cyanobacterial* responses to UV-radiation. In Ecology of *Cyanobacteria*: Their Diversity in Time and Space (B. A. Whitton and M. Potts, eds), pp. 591–611. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles. Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Cava F., Hidalgo A and Berenguer J. (2009): *Thermus thermophilus* as biological model. Extremophiles Rev 13, pp: 213–231.

Caws M., Tho D-Q., Duy P-M., Lan N-T-N., Hoa D-V., Torok M-E., Chau T-T-H., Chau N-V-V., Chinh N-T and Jeremy Farrar. (2007): PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid, Low-Cost Identification of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 45, No. 6, pp: 1789–1793.

Chae G-T., Kim M-J., Kang T-J., Lee S-B., Shin H-K., Kim J-P., Ko Y-H., Kim S-H. And Kim N-H. (2002): DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. J. Med. Microbiol. Vol. 51, pp: 417–422.

Chakravarty S and Varadarajan R (2002): Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochemistry* 41(25):8152–8161. In : **Sælensminde G., J Øy-H., Jonassen I. (2009):** Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role. *Extremophiles. Rev* 13, pp: 11–20.

Chiu S-T., Hsieh F-J., Chen S-W., Chen C-L., Shu H-F., and Li H. (2005): Clinicopathologic Correlation of Up-regulated Genes Identified Using cDNA Microarray and Real-time Reverse Transcription-PCR in Human Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(2), pp: 437–443.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem. Rev* 162, pp: 156–159.

Clementino M-M., Vieira R-P., Cardoso A-M., Nascimento A-P-A., Silveira C-B., Riva T-C. , Gonzalez A-S-M., Paranhos R., Albano R-M., Ventosa A. , Martins O-B. (2008): Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremophiles Rev* 12, pp: 595–604.

Clyde A. H III. (2007): DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. 18, pp: 6227–6237.

Das D-K., Engelman R-M., Maulik N., Rousou J-A., Flack J-E III., and Deaton D-W. (1999): Molecular targets of gene therapy. *Ann. Thorac. Surg. Rev* 68, pp: 1929-1933.

Das R and Gerstein M (2000): The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Funct Integr Genomics* 1, pp: 76–88. In: **Sælensminde G., J Øy-H., Jonassen I. (2009):** Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role. *Extremophiles. Rev* 13, pp: 11–20.

De Lamballerie X. (1996): Serological and molecular biology screening techniques for HVC infection *Nephrol Dial Transplant. Rev* 11, pp: 9-11.

De Rosa M, Trincone A, Nicolaus B & Gambacorta A (1991): Archaeobacteria: lipids, membrane structures, and adaptations to environmental stresses. In: di Prisco G. (Ed) *Life under Extreme Conditions*, pp: 61–87 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. In: **Konings W-N., Albers S-V., Koning S and Driessen1 A-J-M.(2002) :** The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie van Leeuwenhoek Rev* 81, pp: 61–72.

DiRuggiero J., Santangelo N., Nackerdien Z., Ravel J and Robb F-T (1997): Repair of extensive ionizing-radiation DNA damage at 95°C in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol. Rev* 179, pp: 4643–4645. *Extremophiles. Academic Press, Elsevier*, pp: 1-25.

Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., and Böttger E-C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, pp: 7843–7853. In: **Newsome T., Li**

B-J., Zou N., and Lo S-C. (2004): Presence of Bacterial Phage-Like DNA Sequences in Commercial TaqDNA Polymerase Reagents. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 5, pp: 2264–2267.

El-Fahime E and Ennaji M-M. (2007): Les Technologies De Laboratoire - N°5 Juillet-Août pp : 4 -12.

Elcock AH (1998): The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *J Mol Biol* 284(2), pp: 489–502.

Enomoto A., Itoh K., Nagayoshi E., Haruta J., Kimura T., O'Connor T., Harada T., and Yamamoto M. (2001): High Sensitivity of Nrf2 Knockout Mice to Acetaminophen Hepatotoxicity Associated with Decreased Expression of ARE-Regulated Drug Metabolizing Enzymes and Antioxidant Genes. *Toxicological Sciences. Rev.* 59, pp: 169–177.

Ferreira A-C., Nobre M-F., Moore E-D., Rainey F-A., Battista J-R and da Costa M-S (2000): Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. *Extremophiles* 3, pp: 235–238.

Finter N-B., Ball G-D., Fantes K-H., Johnston M-D., and Lewis W-G.(1986): Interferon Production from Human Cell Cultures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol. Rev* 51, pp: 571-575.

Flannery W-L (1956): Current Status of Knowledge of Halophilic Bacteria. *Bacteriol Rev* 20(2), pp: 49–66.

Forar L. R., Elshafei A., Saker M., Cheikh B. and hacene H., (2007): Screening, Isolation and Characterization of a Novel Antimicrobial Producing Actinomycete, Strain RAF10. *Biotechnology*, 6 (4): 489-496.

Forar L.R., Sifour M., Sakr M. and Hacene H., (2008): A new Actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *World J.Microbiol. Biotechnol.*, 4, pp: 441-596.

Froger A and Hall J-E. (2007): Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method *J Vis Exp.* 6, pp: 253.

Goh F., Leuko S., Allen M-A., Bowman J-P., Kamekura M., Neilan B-A. and Burns B-P. (2006): *Halococcus hamelinensis* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from stromatolites in Shark Bay, Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, pp: 1323-1329.

Gold T (1992): The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, pp: 6045–6049. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): *Methods in Microbiology* Volume 35.

Grant, W.D., M. Kamekura, T.J. McGenity, and Ventosa A., (2001): Order I *Halobacteriales*, second ed In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M., Eds., vol. I, Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, pp: 294-299.

Hacene H, Daoudi-Hammed F, Bhatnagar T, Baratti JC, Lefebvre G (2000): A new aminoglycoside anti *Pseudomonas* antibiotic produced by new strain of *Spirillispora*. *Microbios*. 102, pp: 69-77.

Hacene H., Rafa F., Chebhouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Baratti J.C. And Ollivier B., (2004) Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt Lake, Algerian Sahara. *J Arid. Environ.* 58, pp: 273-284.

Hadj Rabia Y (2008): Etude de molécules bioactives produites par de nouvelles souches de *Nocardiopsis* et de *Saccharomonospora* isolées du Chott Melghir (Biskra). Mémoire de Magister. USTHB/FSB, 83p.

Hansen M-T. (1978): *J. Bacteriol.* 134, 71–75 In : **Liu Y., Zhou J., Omelchenko M-V., Beliaev A-S., Venkateswaran A., Stair J., Wu L., Thompson D-K., Xu D., Rogozin I-B., Gaidamakova E-K., Zhai M., Makarova K-S., Koonin E-V., and Daly M- J. (2003):** Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *PNAS*. Vol. 100 no. 7, pp: 4191–4196.

Hardy C-D and Martin P-K (2008): Biochemical characterization of DNA-binding proteins from *Pyrobaculum aerophilum* and *Aeropyrum pernix*. *Extremophiles Rev* 12, pp: 235–246.

Harris K-A. and Hartley J-C. (2003): Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J. Med. Microbiol. Rev* 52, pp: 685–691.

Herbert R., (1992): A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Tibtech.*, 10, pp: 395 - 402.

Herrera-León L., Molina T., Saíz P., Sáez-Nieto J-A., and Jiménez M-S (2005): New Multiplex PCR for Rapid Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 49, No. 1, pp: 144–147.

Hess M., Katzer M and Antranikian G. (2008): Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*. *Extremophiles, Rev.* 12, pp: 351–364.

Himmelbach A., Zierold U., Hensel G., Riechen J., Douchkov D., Schweizer P., and Kumlehn J. (2007): A Set of Modular Binary Vectors for Transformation of Cereals. *Plant Physiology*. Vol. 145, pp: 1192–1200.

Hincha D-K, Hagemann M (2004): Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem J* 383, pp:277–283. In: **Beblo K., Rabbow E., Rachel R., Huber H and Rettberg P. (2009):** Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. *Extremophiles* (2009) 13, pp: 521–531

Horikoshi K and Grant W-D (eds) (1998): *Extremophiles, Microbial Life in Extreme Environments*, Wiley-Liss Publishers, New York. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** *Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them* In: Rainey F-A (Ed.)

and Oren A (Ed.): Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles. Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K-L and Pace N-R. (1998): Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. J. Bacteriol.180, pp: 366–376. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them. In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles . Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Irgens R-L., Gosink J-J. and Staley J-T. (1996): *Polaromonas vacuolata* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic marine, gas-vacuolate bacterium from Antarctica. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, pp: 822–826. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles . Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

IS Johnson. (1983) : Human insulin from recombinant DNA technology Science Vol. 219. No. 4585, pp: 632 – 637.

Jaenicke R And Sterner R. (2006): Life at High Temperatures. Prokaryotes Rev 2, pp: 167–209.

Jaffe R-I., Lane J-D., Albury S-V., and Niemeyer D-M. (2000): Rapid Extraction from and Direct Identification in Clinical Samples of Methicillin-Resistant *Staphylococci* Using the PCR. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 38, No. 9 pp: 3407–3412.

Jiang C and Xu L (1996): Diversity of aquatic *Actinomycetes* in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. Appl Environ Microbiol 62, pp: 249–253.

Jolivet E., Corre E., L’Haridon S., Forterre P and Prieur D (2004): *Thermococcus marinus* sp. nov., and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. Extremophiles 8, pp: 219–227.

Jr F-E-J and Adams M-W-W. (2008): The impact of extremophiles on structural genomics. Extremophiles Rev.12, pp: 39–50.

Kamekura M (1998): Diversity of extremely halophilic bacteria. Extremophiles 2, pp: 289-295.

Karavitaki N., Lembessis P., Tzanela M., Vlassopoulou V., Thalassinos N. And Koutsilieris M.(2005) : Molecular Staging Using Qualitative RT-PCR Analysis Detecting Thyroglobulin mRNA in the Peripheral Blood of Patients with Differentiated Thyroid Cancer After Therapy. Anticancer Research. Vol. 25, pp: 43135-43142.

Kashefi K. and Lovley D-R. (2003): Extending the upper temperature limit for life. Science 301, 934. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles. Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Kato C., Li L., Nogi Y., Nakamura Y., Tamaoka J. and Horikoshi K (1998): Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, pp: 1510–1513.

Kaurichev IS (1980) *Practicas de Edafologia*. Mir, Moscow. In: **Ventosa A., Mellado E, Sanchez-Porro C, and Marquez M-C (2008):** Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. In: **P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.),** *Microbiology of Extreme Soils*. Soil Biology 13. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag, pp : 87-115.

Kelly D-P and Wood A-P (2000): Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, pp: 511–516: In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** *Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them*. In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): *Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles*. Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Khalil A-B., Abu Zarqa and AL-Qaryouti M. (2006): Production of Antimicrobial Agents from Thermophilic *Yersinia* sp.1 and *Aeromonas hydrophila* Isolated from Hot Spring in Jordan Valley. *Biotechnology* 5 (3), pp: 252-256.

Klouche N., Fardeau M.L., Lascourrèges J.F., Cayol J.L., Hacene H., Thomas P. and Magot M., (2007): *Geosporobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., a spore-forming bacterium isolated from a deep subsurface aquifer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, pp: 1757-1761.

Konings W-N., Albers S-V., Koning S and Driessen1 A-J-M.(2002) : The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie van Leeuwenhoek Rev* 81, pp: 61–72.

Lai D., Springstead J-R., Monbouquette H-G. (2008): Effect of growth temperature on ether lipid biochemistry in *Archaeoglobus fulgidus*. *Extremophiles* 12, pp:271–278.

Lamoril J., Ameziane N., Deybach J-C., Bouizegarene P., Bogard M. (2008) : Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno analyse & biologie spécialisée*. Vol. 23, n°5, pp : 260-279.

Lapidot M., Raveh D., Sivan A., Arad S (Malis) and Shapira M. (2002): Stable Chloroplast Transformation of the Unicellular Red Alga *Porphyridium* Species. *Plant Physiology*, Vol. 129, pp: 7–12.

Larsen H (1986): Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspective, *FEMS Microbiol Rev* 39, 3-7. In: **Chun J., Bae K-S., Moon E-Y, Jung S-O, Lee H-K and Kim S-J (2000):** *Nocardioopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int Jour of System and Evol Microbiol Rev* 50, pp: 1909–1913.

Leedjårv A., Ivask A., and Virta1 M. (2008): Interplay of Different Transporters in the Mediation of Divalent Heavy Metal Resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, Vol. 190, No. 8, pp: 2680–2689.

Leow T-C., Rahman R-N-Z-R-A., Basri M. and Salleh A-B. (2007): A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. *Extremophiles* 11, pp: 527–535.

Leuko S., Goh F., Ibàñez-Peral R., Burns B-P., Walter M-R., and Neilan B-A. (2008): Lysis efficiency of standard DNA extraction methods for *Halococcus* spp. in an organic rich environment. *Extremophiles Rev* 12, pp: 301–308.

Li S., Xiao X., Li J., Luo J., Wang F. (2006): Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *Shewanella* sp. WP3 using RNA arbitrarily primed PCR. *Extremophiles. Rev.*10, pp: 97–104.

Li Y., Xiang H., Liu J., Zhou M., Tan H. (2003): Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* 7, pp: 401–407.

Lin H-Y., Chuang H-H. and Lin F-P (2008): Biochemical characterization of engineered amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E-implicating the non-necessity of its 100 C-terminal amino acid residues. *Extremophiles* 12, pp: 641–650.

López-García P (2005): Extremophiles. In: **M. Gargaud et al.,** (Ed.): Lectures in Astrobiology, Vol. I, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 657–679.

Madern D., Ebel C. and Zaccai G. (2000): Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles Rev* 4, pp: 91-98.

Marchal N., Boudon J-L et Richand C-C (1987) : les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed Doin. Paris. 482p

Margesin R and Schinner F. (2001): Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, pp: 73–83.

Margulies M., Egholm M., Altman W-E., Attiya S., Bader J-S., Bemben L-A., Berka J., Braverman, M-S., Chen Y-J., Chen Z. et al., (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, pp: 376-380. **In: Hall N. (2007):** Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *The Journal of Experimental Biology* 209, pp: 1518-1525.

Márquez M. C., Carrasco I. J., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D. and Ventosa A. (2008): *Aquisalibacillus elongatus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium of the family *Bacillaceae* isolated from a saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, pp: 1922-1926.

Marsic D., J-M Flaman and J-D Ng. (2008): New DNA polymerase from the hyperthermophilic marine archaeon *Thermococcus thio-reducens*. *Extremophiles Rev*12, pp: 775–788.

Marteinsson V-F., Birrien J-L., Reysenbach A-L., Vernet M., Marie D., Gambacorta A., Messner P., Sleytr U-B and Prieur D (1999): *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, pp: 351–359. In: **Rainey F-A and**

Oren A (2006): Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles. Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Mattimore V. and Battista J-R (1996): Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive desiccation. J. Bacteriol. 178, pp: 633–637.

Maugeri T-L., Lentini V., Gugliandolo C., Italiano F., Cousin S., Stackebrandt E. (2009): Bacterial and archaeal populations at two shallow hydrothermal vents off Panarea Island (Eolian Islands, Italy). Extremophiles Rev 13, pp: 199–212.

Maurelli L., Giovane A., Esposito A., Moracci M., Fiume I., Rossi M and Morana A. (2008) : Evidence that the xylanase activity from *Sulfolobus solfataricus* Oa is encoded by the endoglucanase precursor gene (sso1354) and characterization of the associated cellulase activity. Extremophiles, Rev 12, pp: 689–700.

Maxam A-M and Gilbert W. (1977): A new method for sequencing DNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 560–564.

Clyde A. H III. (2007): DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Nucleic Acids Research, Vol. 35, No. 18 pp: 6227–6237.

Mecknaci R (2008) : Caractérisation de substances antibactériennes produites par de nouvelles souches de Halobactéries. Mémoire de Magister. FSB/USTHB. 95 p.

Meseguer I., Rodriguez-valera F. and Ventosa A. (1986) : Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. FEMS. Microbiol. Lett., 36, pp:177-182.

Miller D-N., Bryant J-E ., Madsen E-L., Ghiorse W-C. (1999): Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol. Rev 65, pp: 4715–4724

Miller L-G. and Oremland R-S. (2008): Electricity generation by anaerobic bacteria and anoxic sediments from hypersaline soda lakes. Extremophiles 12, pp: 837–848.

Minton K-W. (1994): DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Mol. Microbiol. 13:9–15. In: **Rajpurohit Y-S., Gopalakrishnan R. and Misra1 H-S. (2008):** Involvement of a Protein Kinase Activity Inducer in DNA Double Strand Break Repair and Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. Journal of Bacteriology, Vol. 190, No. 11, pp: 3948–3954.

Morales J-M. and Campistol J-M.(2000): Transplantation in the Patient with Hepatitis C. J Am Soc Nephrol Rev (11), pp: 1343–1353.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1, pp: 263-273.

Ng I-S., Li C-W., Yeh Y-F., Chen P-T., Chir J-L., Ma C-H., Yu S-M., Ho T-H-D., Tong C-G (2009): A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus sp.*

70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles Rev.* 13, pp: 425–435.

Nichol C and E. Kim E. (2001): Molecular Imaging and Gene Therapy. *J Nucl Med. Rev* 42, pp: 1368–1374.

Nicolini U., Lalatta F., Natacci F., Curcio C and Bui T-H. (2004): The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Human Reproduction Update*, Vol.10, No.6, pp: 541–548.

Nishimura Y., Ino T and Iizuka H. (1988): *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol. Rev* 38, pp: 209–211.

O'Connor EM, Shand RF (2002): Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28 pp: 23–31. In: **Li Y., Xiang H., Liu J., Zhou M., Tan H. (2003):** Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* 7, pp: 401–407.

Oren A. (1999): Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol. Biol Rev* 63 pp: 334–348 In: **Strahl H and Greie J-C. (2008):** The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K⁺ -transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K⁺. *Extremophiles Rev* 12, pp: 741–752.

Oren A (2002): Halophilic Microorganisms and their Environments. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): *Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles* . Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Orfaniotou F., Tzamalís P., Thanassoulas A., Stefanídi E., Zees A., Boutou E., Vlasi M., Nounesis G and Vorgias C-E. (2009): The stability of the archaeal HU histone-like DNA-binding protein from *Thermoplasma volcanium*. *Extremophiles Rev*13, pp: 1–10.

Ozaki M, Ozaki K, Watanabe T, Uwagawa S, Okuno Y, And Shirai T. (2005): Susceptibilities of p53 Knockout and rasH2 Transgenic Mice to Urethane-Induced Lung Carcinogenesis are Inherited from their Original Strains. *Toxicologic Pathology*, Rev. 33, pp: 267–271.

Perron K., Caille O., Rossier C., Delden C., Dumas J-L., and Köhler T. (2004) : CzcR-CzcS, a Two-component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa**. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 10, pp: 8761–8768.

Phillips R-W., Wiegel J., Berry C-J., Fliermans C., Peacock A-D., White D-C and Shimkets L-J (2002): *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, Gram-positive bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Rev*52, pp: 933–938.

Portillo M-C., Srirín V., Kanoksilapatham W., Gonzalez J-M. (2009): Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles Rev* 13, pp: 321–331.

Prangishvili D., Holz I., Stieger E., Nickell S., Kristjansson JK., and Zillig W (2000): Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J Bacteriol* 182, pp: 2985–2988.

Rainey F-A., Ray K., Ferreira M., Gatz B-Z., Nobre N-F., Bagaley D., Rash B-A., Park M-J., Earl A-M., Shank N-C., Small A., Henk M-C., Battista J-R., Kämpfer P. and da Costa M-S. (2005): Extensive diversity of ionizing radiation-resistant bacteria recovered from a Sonoran Desert soil and the description of 9 new species of the genus *Deinococcus* from a single soil sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 17, pp: 5225–5235.

Rainey F-A and Oren A (2006): Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): *Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles*. Academic Press, Elsevier pp: 1-25.

Raspor P and Zupan J (2006): Yeasts in extreme environments. In: Rosa C. (ed.), Gábor P. (ed.): *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Berlin, Springer, pp: 371-417.

Raymond J-A., Christner B-C and Schuster S-C. (2008): A bacterial ice-binding protein from the Vostok ice core. *Extremophiles Rev* 12, pp: 713–717.

Ren P.G. and Zhou P.J. (2005): *Tenuibacillus multivorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Xin-Jiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, pp: 95-99.

Roberts MF (2005): Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1:5. In: **Strahl H and Greie J-C. (2008):** The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K⁺-transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K⁺. *Extremophiles Rev* 12, pp: 741–752.

Rodríguez-Valera F (1988) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In: Rodríguez-Valera F (ed) *Halophilic Bacteria*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp: 3–30. In: **Ventosa A., Mellado E, Sanchez-Porro C, and Marquez M-C (2008):** Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. In: **P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.)**, *Microbiology of Extreme Soils*. Soil Biology 13. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag, pp : 87-115.

Rohban R., M-A Amoozegar and A. Ventosa (2009): Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Rev.* 36, pp: 333-340.

Rothschild, L. J. (1999): Microbes and radiation. In *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environmental Habitats* (J. Seckbach, ed.), pp. 549–562. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. In: **Rainey F-A and Oren A (2006):** Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them In: Rainey F-A (Ed.) and Oren A (Ed.): *Methods in Microbiology Volume 35 Extremophiles*. Academic Press, Elsevier, pp: 1-25.

Rothschild L-J and Mancinelli R-L (2001): Life in extreme environments. *Nature* 409:1092–1101 in: **Raspor P and Zupan J (2006):** Yeasts in extreme environments.

In: Rosa, C. (ed.), Gábor, P. (ed.). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin, Springer, pp: 371-417.

Rozen S. and Skaletsky H. (2000) : Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol. Rev* 132, pp: 365-86.

Rye C-A., Isupov M-N., Lebedev A-A. and Littlechild J-A. (2009): Biochemical and structural studies of a L-haloacid dehalogenase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Extremophiles Rev* 13, pp: 179–190.

Sælensminde G., Jr Øy-H., Helland R., Willassen N-P. and Jonassen I. (2007): Structure-dependent relationships between growth temperature of prokaryotes and the amino acid frequency in their proteins. *Extremophiles, Rev* 11, pp: 585–596.

Sælensminde G., Jr Øy-H., Jonassen I. (2009): Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role. *Extremophiles. Rev* 13, pp: 11–20.

Saitou N and Nei M (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, pp: 406-425.

Sánchez L-A., Gómez F-F and Delgado O-D. (2009): Cold-adapted microorganisms as a source of new antimicrobials. *Extremophiles Rev* 13, pp: 111–120.

Sanger F and Tuppy H. (1951): The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem. J.*, 49, pp: 481–490. In : **Clyde A. H III. (2007)**: DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. 18, pp: 6227–6237.

Sanger F. (1959): Chemistry of insulin: determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science*, 129, pp: 1340–1344. In: **Clyde A. H III. (2007)**: DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. 18, pp: 6227–6237.

Sanger F., Nicklen S., and Coulson A-R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. Vol. 74, No. 12, pp: 5463-5467.

Sauer T, Galinski E-A (1998): Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng Rev* 57 pp: 306–313 In: **Margesin R and Schinner F. (2001)**: Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, pp: 73–83.

Schleper C., Pühler G., Holz I., Gambacorta A., Janovic D., Santarius U., Klenk H-P and Zillig W (1995): *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* 177, pp: 7050–7059.

Schlesner H., Lawson P.A, Collins M.D, Weiss N., Wehmeyer U., Völker H and Thomm M. (2001): *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, pp: 425-431.

- Seckbach J. (ed.) (1994):** Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) and Related Cells, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. In: **Senturk H., Tahan V., Canbakan B., Uraz S., Ulger Y., Ozaras R., Tabak F., Mert A., Ozbay G. (2008):** Chronic hepatitis C responds poorly to combination therapy in chronic hepatitis B carriers., *The Netherlands Journal of Medicine* Vol. 66, No. 5, pp : 191-195.
- Seckbach J (2006):** The Extremophiles: Diversity of Life Environments. In: J. Seckbach (ed.): *Life As we Know It. volume 10 of Cellular Origins, Life in Extreme Habitats and Astrobiology.* Netherlands, Springer, pp: 3-20.
- Stackebrandt E and Goebel B-M (1994):** Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 44, No. 4, p 846-849.
- Stetter, K-O (1996):** Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, pp: 149–158.
- Stetter K-O. (2006):** History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles Rev* 10, pp: 357–362.
- Stewart A., Satterfield B., Cohen M., O’Neill K and Robison R. (2008):** A quadruplex real-time PCR assay for the detection of *Yersinia pestis* and its plasmids *J. Med. Microbiol. Rev* (57), pp: 324–331.
- Strahl H and Greie J-C. (2008):** The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K⁺ -transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K⁺. *Extremophiles Rev* 12, pp:741–752.
- Tabouche N et Achour S. (2004) :** Etude de la qualite des eaux souterraines de la region orientale du sahara septentrional algerien. *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680. n° 03, pp :99-113.
- Takashina T., Hamamoto T., Otozai K., Grant W. D. and Horikoshi K., (1990):** *Haloarcula japonica* sp. nov. a new triangular halophilic *archaeobacterium*. *System. Appl. Microbiol.* 13, pp: 177-181.
- Takishita K., Yubuki N ., Kakizoe N., Inagaki Y., Maruyama T. (2007) :** Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures. *Extremophiles Rev* 11, pp: 563–576
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007):** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, pp: 1596-1599.
- Tanasupawat S., Namwong S., Kudo T. and Itoh T (2007):** *Piscibacillus salipiscarius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 57, pp: 1413-1417.

Tapias A., Leplat C and Confalonieri F (2009): Recovery of ionizing-radiation damage after high doses of gamma ray in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus gammatolerans*. *Extremophiles* 13, pp: 333–343.

Teitzel G-M and. Parsek M-R. (2003): Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 4, pp: 2313–2320.

The Nobel Prize in chemistry 2009. The royal swedish academy of sciences.

Siteweb: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/info.html

Ventosa A., Mellado E, Sanchez-Porro C, and Marquez M-C (2008): Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. In: **P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.)**, *Microbiology of Extreme Soils. Soil Biology Vol 13* .Berlin Heidelberg .Springer-Verlag, pp: 87-115.

Ventosa A., Sánchez-Porro C., Martín S and Mellado E. (2005): Halophilic Archaea and Bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. In: **Gunde-Cimerman N et al., (Ed):** *Adaptation To Life At High Salt Concentrations In Archaea, Bacteria, And Eukarya.* Vol 9, Netherlands, Springer, pp: 337-354.

Ventosa A., Mellado E, Sanchez-Porro C, and Marquez M-C (2008): Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. In: **P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.)**, *Microbiology of Extreme Soils. Soil Biology Vol 13* .Berlin Heidelberg .Springer-Verlag, pp: 87-115.

Vinge L-E., Raake P-W., Koch W-J. (2008): Gene Therapy in Heart Failure. *Circ Res. Rev* 102, pp: 1458-1470.

Voordeckers J-W., Do M-H., Hügler M., Ko V., Sievert S- M., Vetriani C. (2008): Culture dependent and independent analyses of 16S rRNA and ATP citrate lyase genes: a comparison of microbial communities from different black smoker chimneys on the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles Rev* 12, pp: 627–640.

Wilansky B. (1936): Life in the Dead Sea. *Nature* 138, 467 In: **López-García P (2005) :** *Extremophiles.* In: **M. Gargaud et al., (Ed.):** *Lectures in Astrobiology*, Vol. I, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 657–679.

Wilson D-L., Abner S-R., Newman T-C., Mansfield L-S., and Linz J-E. (2000): Identification of Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter jejuni* by Use of a Fluorogenic PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38, No. 11, pp: 3971–3978.

Woese C-R and Fox G-E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 11, pp. 5088-5090.

Woese C-R., Gutell R., Gupta R., and Noller H-F. (1983): Detailed Analysis of the Higher-Order Structure of 16S-Like Ribosomal Ribonucleic Acids. *Microbiology Reviews*. Vol.47. No. 4, pp: 621-669.

Woese C-R ., Kandler O, and Wheelis M-L. (1990): Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 87, pp: 4576-4579

Yakimov M-M., Timmis K-N., Wray V, Fredrickson H-L (1995): Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl Environ Microbiol 61, pp: 1706–1713.

Yang Y-L., Yang F-L., Sch Jao, Chen M-Y, Tsay S-S, Zou W, Wul S-H (2006): Structural elucidation of phosphoglycolipids from strains. J Lipid Res 47, pp: 1823–1832
In: Siristova L., Melzoch K and Rezanka T (2009) Fatty acids, unusual glycolipids and DNA analyses of thermophilic bacteria isolated from hot springs. Extremophiles Rev. 13, pp: 101–109.

Zhao J., Yang N and Zeng R. (2008): Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment. Extremophiles Rev. 12, pp : 97–105.

ANNEXE:

Solution :

Solution de lyse : 20mg lysozyme est suspendu /ml de 25mM : 25mM Tris : EDTA pH 8.0

Storage Buffer (TE buffer): 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1 mM EDTA.

6X DNA Loading Dye (supplied with GeneRuler™ DNA ladders):

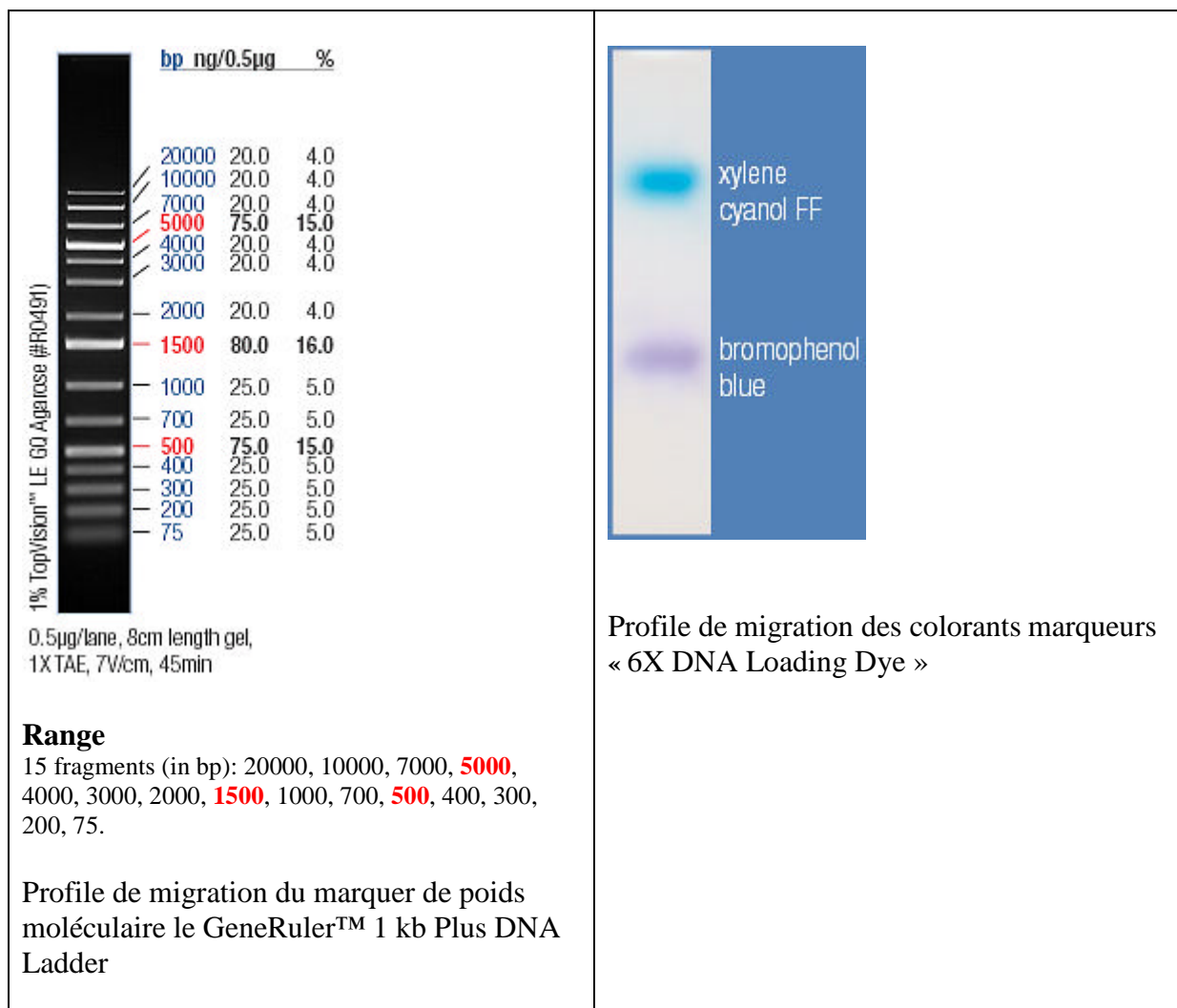
10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60 mM EDTA.

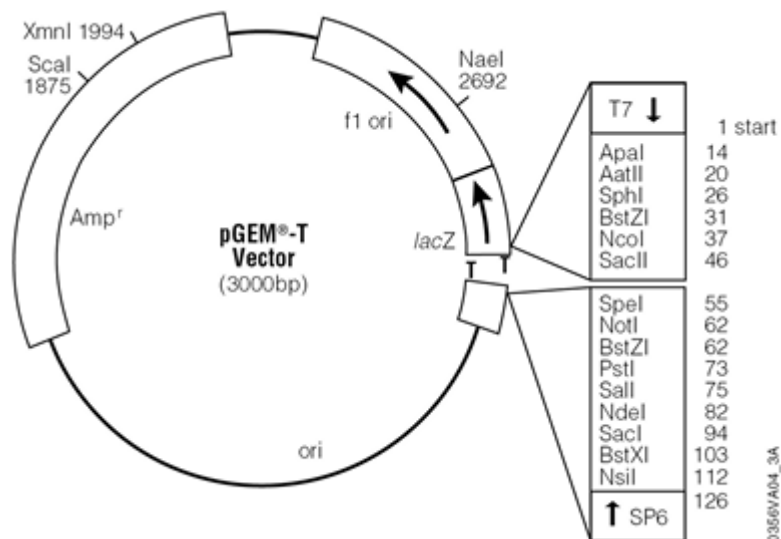
50X TAE (Tris-acetate-EDTA) : 40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA.

Pour chaque électrophorèse une solution fraîche 1X doit être utilisée.

Produits et réactifs :

PCR Master Mix : est une solution préparée à l'usage. Elle contient la Taq ADN polymérase, des dNTPs, du MgCl₂ en solution réactionnelle optimisée pour un meilleur résultat de PCR avec la taille de fragment à amplifier entre 0.2 et 2kb.





Vecteur plasmidique pGEM-T.

Les primers utilisés :

pA et pH ont été conçus par **Edwards et al., 1989**.

<i>primer</i>	<i>sequence</i>	<i>La taille Théorique délimitation avec:</i>	<i>Tm selon to NetPrimer avec les paramètre par défaut</i>
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	pH: 1.5Kb	54.04
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	pA:1.5 Kb	64.97
RpA	TGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	pA :1 Kb	58.83
FpH	CAAGCGTTGTCCGGAATTAT	pH : 1Kb	57.88
RA	TCAAGTTCCTCCAGTTTCCAA	pA: 700pb	57.79
pM	GGCTAACTACGTGCCAGCAG	rpM : 600 pb	58.58
rpM	CCAACATCTCACGACACGAG	pM : 600 pb	56.62
RH	CGGTGGAGCATGTGGTTTA	pH : 600 pb	57.26
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	* selon la taille de l'insert	*
T7	TAATACGACTCACTATAGG	* selon la taille de l'insert	*

Les caractères recherchés par la galerie API 20E:

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 mn, maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
NO ₃ -NO ₂	Tube GLU	Production de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
		Réduction au stade N ₂	Jaune	Rouge
			Zn	
			Rouge	Jaune

Piscibacillus sp. B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS GQ169533 1495 bp DNA linear BCT 23-JUN-2009
 DEFINITION *Piscibacillus* sp. B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION GQ169533
 VERSION GQ169533.1 GI:240153144
 KEYWORDS .
 SOURCE *Piscibacillus* sp. B9
 ORGANISM [Piscibacillus sp. B9](#)
 Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; *Piscibacillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1495)
 AUTHORS Selama,O., Wellington,E., Porter,D. and Hacene,H.
 TITLE *Piscibacillus* sp. isolated from Algerian soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1495)
 AUTHORS Selama,O., Wellington,E., Porter,D. and Hacene,H.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-MAY-2009) LBCM, Faculty of Biological Sciences, El
 Alia Bab Ezzouar, Algiers 16000, Algeria
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1495
 /organism="*Piscibacillus* sp. B9"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="B9"
 /db_xref="taxon:652841"
 /country="Algeria"
[rRNA](#) <1..>1495
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

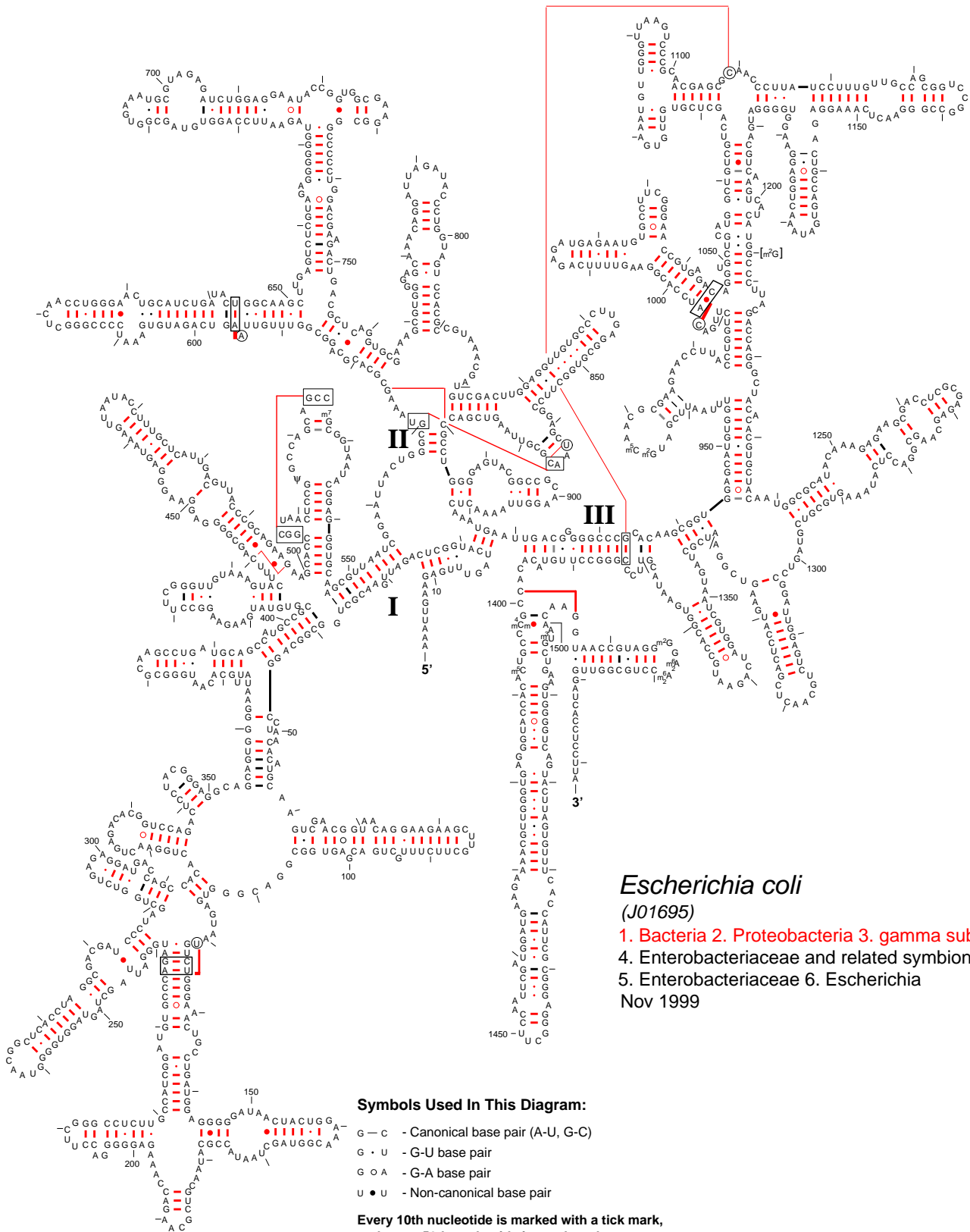
```

1 gctcaggacg aacgctggcg gcgtgcctaa tacatgcaag tcgagcggcg gaagcaaact
61 gaatccttcg ggaggacggt tgtggaacga gcggcgggac ggtgagtaac acgtgggcaa
121 cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat aactcatcgg
181 atcgcatgat ccgaggttga aagatggcct cttgctatca cttacagatg ggccccggcg
241 gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggccac gatgcgtagc cgacctgaga
301 gggatgatcg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacggggag gcagcagtag
361 ggaatcatcc gcaatggacg aaagtctgac ggtgcaacgc cgcgtgagtg aggaaggcct
421 tcgggtcgtg aaactctggt gttagggaag aacaagtccg gttcgaatag ggcggagcct
481 tgacggtacc taaccagaaa gccacgggta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg
541 ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagcggc cgcaggcggg tccttaagtc
601 tgatgtgaaa gccacgggct caaccgtgga gggtcattgg aaactgggga acttgaagac
661 agaagaggag agcgggaatt cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagatatgt ggaggaacac
721 cagtggcgaa ggcggctctc tggctctgtc ttgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc
781 gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctag gtggtagggg
841 tttccaccct tagtgctgca gttaacgcaa taagcactcc gcctggggag tacggccgca
901 aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat
961 tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct cggaccacc tagagatagg
1021 gtcttccctt cggggaccga gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga
1081 gatgttgggt taagtcccg c aacgagcgca acccttgatc ttagttgcca gcattcagtt
1141 gggcactcta agtgactgac cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca
1201 tcatgcccc t atgacctgg gcaacacacg tgctacaatg gatggtacaa tgggcccgcga
1261 agccgcgagg tggagcaaat cccaaaaaac cattctcagt tcggattgta ggtgcaact
1321 cgcctgcatg aagccggaat cgctagtaat cgtggatcag catgccacgg tgaatacgtt
1381 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cagcagagtt ggcaacacc gaagtccgtg
1441 gagtaacctt ttggagctag ccgccgaagg tggggccaat gatggggtga agtcg

```

//

Secondary Structure: small subunit ribosomal RNA



Summary:

The microbial species that thrive in extreme environments are among the most fascinating models for the isolation of new functional biomolecules under extreme conditions, and highly stable (antibiotics, bacteriocins, bacteriorhodopsin, osmosisregulator, enzymes etc. ...).

Algeria, and especially the Sahara, provides a vast field of investigation for the isolation and study of these organisms.

This study focused on a particular category of these microorganisms namely thermohalophiles.

12 strains have been isolated from the Sebkhah of El Golea because the two stressors imposed in the isolation that are salinity and temperature. Some of them have been characterized at the species level by applying the techniques of conventional microbiology and techniques of molecular biology and bioinformatics.

The study revealed that among the isolated strains, one belongs to the family Halobacteriaceae designated H6, extreme halophile that can grow at a temperature of 60 ° C. This strain demonstrate a significant interest in terms of production of biomolecules (enzymes and anti-fungal).

A strain designated B9 related to genus *Piscibacillus* can grow at a temperature of 60 ° C in the presence of (200 g / l NaCl).

An actinobacteria designated G2 can grow at a temperature of 70 ° C in the presence of (250 g / l NaCl).

Key words: Extreme environment, Sebkhah of El Golea, Microorganism, Thermohalophile, Biomolecules

الملخص:

الأنواع الجرثومية التي تنمو و (أو تعيش) في الظروف القاسية تعتبر من أحسن النماذج لعزل الجزيئات الحيوية الوظيفية الجديدة التي تعطي درجة عالية من الاستقرار (مضادات الحيوية، بكتريوسين، بكتريودوبسين، ، انزيم الخ...).

الجزائر ، وخاصة الصحراء ، توفر مجالا واسعا لعزل ودراسة هذه الكائنات .

هذه الدراسة تركز على فئة معينة من هذه الكائنات ، الكائنات الدقيقة المحبة للحرارة والملح .

12 سلالة تم عزلها من سبخة المنيعية (El Goléa) وهذا راجع للضغوط المفروضة في أثناء العزل، الملوحة والحرارة. بعضها قد تميزت على مستوى الأنواع من خلال تطبيق تقنيات التقليدية في علم الأحياء المجهرية وكذلك تقنيات البيولوجيا الجزيئية والمعلوماتية الحيوية .

وكشفت الدراسة أن من بين السلالات المعزولة، واحدة منها المعينة H6 محبة للملحة تنتمي إلى عائلة Halobacteriaceae حيث يمكنها أن تنمو في درجة حرارة 60 مئوية. هذه الأخيرة أظهرت القدرة على إنتاج جزيئات حيوية (إنزيمات و مضادة الفطريات).

سلالة معينة B9 تم ربطها إلى جنس *Piscibacillus* يمكن أن تنمو عند درجة حرارة 60 مئوية في وجود (200 غرام / لتر كلوريد الصوديوم).

و *Actinobacteria* المعينة G2 يمكن أن تنمو في درجة حرارة 70 مئوية في وجود (250 غرام / لتر كلوريد الصوديوم).

الكلمات المفتاحية: بيئة متطرفة ، سبخة المنيعية ، كائن دقيق ، محب للحرارة والملح، جزئ حيوي.